



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIANE KAORI FUKUDA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA DO FUNGO
ASCOMICETO *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**

Londrina
2007

ELIANE KAORI FUKUDA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA DO FUNGO
ASCOMICETO *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra Maria de Lourdes Corradi
Custodio da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa

Londrina
2007

**Catálogo na Publicação Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F961e Fukuda, Eliane Kaori.

Extração, purificação e caracterização de polissacarídeos da biomassa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 / Eliane Kaori Fukuda. – Londrina, 2007.
119f. : il.

Orientador : Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva.

Co-orientador : Aneli de Melo Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Teses. 2. *Botryosphaeria rhodina* – Fungo ascomiceto – Teses. 3. Polissacarídeos – Teses. 4. Fungos – Biotecnologia – Teses. I. Silva, Maria de Lourdes Corradi Custódio da. II. Barbosa, Aneli de Melo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 641:577.1

ELIANE KAORI FUKUDA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA DO FUNGO
ASCOMICETO *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito à obtenção
de título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Maria de Lourdes Corradi Custodio da
Silva
Universidade Estadual Paulista
Julio de Mesquita Filho-UNESP

Profa. Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr Carlos Kemmelmeier
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 14 de setembro de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Toshiuki e Teruyo pela dedicação e carinho que me motivou a sonhar e a ter coragem e ousadia para tornar o sonho em realidade.

Ao meu esposo Wilson pelo amor e pelo apoio indispensáveis para a conquista dessa grande vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso, que me deu força possibilitando a vitória nesta importante batalha que significará muito em minha vida.

Aos meus queridos pais (Toshiuki e Teruyo), pelo exemplo de vida e de caráter, pelo enorme carinho, pelo apoio e por sempre me motivar acreditando em meu potencial! Devo a vocês, tudo que consegui até hoje e por tudo que ainda conseguirei nesta vida!

À minha querida orientadora Dra Maria de Lourdes Corradi da Silva, pela imensa contribuição como orientadora presente em todos os dias, pelo exemplo de dedicação e competência tanto como profissional no laboratório e como mãe lapidando seus filhos. Pelos inúmeros chaqualhões que muitas vezes tirou de meus olhos lágrimas, trabalhos árduos que me fez suar, mas com objetivo nobre de regar o meu trabalho de dissertação. Um ano que estive em Presidente Prudente foi o ano mais produtivo, um treinamento intensivo para crescer como profissional e me lapidar como pessoa.

À minha co-orientadora Dra Aneli de Melo Barbosa, que tenho profunda admiração pela integridade em pessoa e pela paixão contagiante que tem pela pesquisa científica.

Ao professor Dr Dekker, pela indispensável contribuição para escrever trabalhos e artigos científicos.

À prof^a Dra Joana L. M. S. Ganter, ao Dr Guilherme L. Sasaki e à Dra Elaine R. Carbonero pela realização das análises de RMN-¹³C e de CG-MS.

Aos docentes e funcionários da UEL e da UNESP de Presidente Prudente, em especial para o técnico Nelson da UEL e para a técnica Marilsa de Presidente Prudente. Sem a ajuda de vocês seria impossível realizar este trabalho.

À Aninha Dundi que todos os dias que estive em Presidente Prudente me recepcionava com um sorriso contagiante e um café muito saboroso que tornava os meus dias mais alegres!!!

À Ana Flora pela companhia, pela disponibilidade em ajudar e ensinar, e pelo suor e lágrimas que ajudaram a regar esse trabalho!!! Considere-se a madrinha dele!!!

À Ana Pires que tem um enorme coração, pela amizade e pelos inúmeros favores realizados!!!

Ao prof. Roberto e a Ana Maria Osório pela atenção e valiosas dicas e conselhos nos corredores na hora do café!!!

Aos ex-estagiários do laboratório de bioquímica Mariana, Gabriel e a estagiária Janaína pela profunda amizade, incentivo constante e auxílio no laboratório.

Aos estagiários Nilson e Andreza pela indispensável contribuição na realização dos experimentos e na preparação e edição das figuras.

À minha querida avó (*in memorian*) que tive privilégio de conviver e pelos cuidados e ensinamentos, principalmente a como viver melhor através da sua alegria e de seu otimismo.

Ao meu amado esposo pelo amor, carinho, compreensão e pelos conselhos que muitas vezes me serviram para não desanimar e fazer a escolha certa.

Aos meus queridos irmãos, Tomás, Airton e Ernesto, pelos conselhos, pelo carinho, pelas palavras de incentivo e mesmo na correria do dia-dia, sempre lembraram de me chamar para o almoço ou para o churrasco de final de semana onde voltava ao trabalho renovada!!!

Ao meu amigo Ryuiti (*in memorian*) que foi exemplo de vida e que me ensinou muito através do jeito bem humorado e *Carpe diem*!!!

À minha grande amiga Marcela, que para mim é como a irmã e minha super companheira Michelle, pela profunda amizade e paciência de longa data!!!

Às minhas amigas Amanda, Cinthia, Kaoru, Marcia, Paole, Patrícia, Rosana, Saori, Sonia, Sueli, Tatiane e Teruko que foram essenciais pelo apoio que me deram na fase da vida que eu mais precisei.

Aos meus amigos do mestrado, Cassiano, Mimi, Robinho, Tiski, Elaine, Dani Sassá, Flávio, Josana e Jake, pelo tempo que me aturaram, pelas brincadeiras que me alegraram!!Adoro vocês, sentirei muitas saudades!!!

A todos os professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia, que contribuíram para a minha formação.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

E a todos os familiares e amigos que torceram e de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho!!!

Quando você se lança numa jornada e o fim parece cada vez mais distante, então você percebe que o verdadeiro fim é o percurso.

Karlfried Grif Durckhein

FUKUDA, Eliane Kaori. **Extração, purificação e caracterização de polissacarídeos da biomassa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.** 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RESUMO

A biomassa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, cultivado em glucose como fonte de carbono, foi separada do exopolissacarídeo para investigar a composição, em polissacarídeos, da biomassa. Para obtenção desses polissacarídeos a biomassa foi lavada com água, exaustivamente, até que nenhum resíduo de açúcar livre fosse detectado pelo ensaio do fenol-ácido sulfúrico, garantindo a total remoção do EPS. A massa micelial foi liofilizada, fragmentada e submetida, consecutivamente, a diferentes procedimentos extrativos, a saber, água fria (3x), água fervente (4x) e hidróxido de potássio a 2%, 100°C (2x). Esse procedimento separou as biomoléculas em grupos, de acordo com suas solubilidades. As frações Q₁ (aquosa a quente) e K₁ (alcalina) foram selecionadas para dar prosseguimento aos estudos por serem quantitativamente majoritárias e com grande diferença percentual entre seus constituintes monossacarídicos. A fração Q₁ foi fracionada por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-4B em Q_{1A}, Q_{1B}, Q_{1C} e Q_{1D}. A sub-fração Q_{1A} com maior tamanho molecular, de acordo com seu volume de eluição na cromatografia de filtração em gel, apresentou glucose como componente majoritário. Estudos espectroscópicos por infravermelho e ressonância magnética nuclear de carbono treze mostraram que todas as ligações glicosídicas encontravam-se em configuração β. A ausência de sinal na região de δ 60 ppm e a presença de um sinal intenso em 69,01, bem como os resultados provenientes da metilação permitiram caracterizar a sub-fração Q_{1A} como uma β-(1→6)-D-glucana. A sub-fração Q_{1C}, constituída principalmente de galactose, após análises espectroscópicas e de metilação teve sua estrutura determinada como de uma galactofuranana com unidades 5-O e 6-O substituídas. As sub-frações Q_{1B} e Q_{1D} não foram investigadas neste trabalho porque os experimentos conduzidos indicaram a necessidade de etapas adicionais de purificação. A fração K₁, obtida como primeira extração alcalina, após neutralização, diálise, precipitação em etanol e solubilização em água apresentou um resíduo (K₁P) que foi separado por tratamentos sucessivos de gelo e degelo da parte solúvel (K₁S). O material insolúvel, denominado K₁P, constituído principalmente de glucose (93%) foi caracterizado como uma glucana β-(1→3) com ramificação em C-6 através de análises espectroscópicas e de metilação. A fração solúvel (K₁S), fracionada por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B, apresentou três picos denominados de K₁S_A, K₁S_B e K₁S_C. A sub-fração K₁S_A, após hidrólise ácida apresentou principalmente glucose (92%) e a cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis apresentou três picos, identificados como 2,3,4,6-tetra-O-metil, 2,3,6-tri-O-metil e 2,3-di-O-metil derivados. Os sinais de FTIR em 1550 e 920 cm⁻¹ foram característicos de glucanas e em 850 cm⁻¹ de α-glucanas. O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze mostrou sinais que correspondem a uma α-(1→4) D-glucana com pequeno grau de substituição em C-6. Os resultados encontrados neste estudo indicam que a composição da biomassa do ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* é semelhante à biomassa de diferentes fungos e, provavelmente, as diferenças no grau de substituição correspondem às variações no tempo de cultivo e/ou a necessidade de etapas adicionais de purificação.

Palavras-chave: *Botryosphaeria rhodina*. Polissacarídeos de biomassa fúngica. Glicanas. Metilação.RMN-¹³C.

FUKUDA, Eliane Kaori. **Extraction, purification and characterisation of the biomass polysaccharides of the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.** 2007. 124f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology)-State of University of Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The composition of the polysaccharides constituting the biomass of the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, cultivated on glucose as carbon source was investigated following separation of the exopolysaccharides (EPS). Fungal mycelial biomass was exhaustingly washed with water at room temperature until no residual sugars could be detected (phenol-sulfuric acid method), indicating total removal of the EPS, botryosphaeran. The mycelium was then lyophilised, followed by homogenisation and consecutively submitted to the following extraction procedures to extract the biomass polysaccharides: cold water (3x), boiling water (4x) and 2 % KOH/100 °C (2x), which separated the biomacromolecules into groups according to their solubilities in these solvents. Fractions Q₁ (hot water extract) and K₁ (alkaline extract) were selected for further studies: quantification and monosaccharide constitution. Fraction Q₁ was fractionated by Sepharose CL-4B gel filtration chromatography into four peaks: Q_{1A}, Q_{1B}, Q_{1C} and Q_{1D}. Sub-fraction Q_{1A} with an apparent large molecular mass as indicated by its elution volume on a chromatographic run, presented glucose as the major component. Spectroscopy studies (Fourier Transformation-Infra-Red (FT-IR), and ¹³Carbon-nuclear magnetic resonance, ¹³C-NMR) demonstrated that all of the glycosidic linkages were of the β-configuration. The absence of a signal in the region δ 60.0 ppm and the presence of an intense signal at 69.01, as well as the results arising from methylation, characterized Q_{1A} as a β-(1→6)-D-glucan. Sub-fraction Q_{1C} consisting mainly of galactose residues had a structure characterised as galactofuranan with substitutions at 5-O and 6-O as indicated by spectroscopy and methylation analyses. Sub-fractions Q_{1B} and Q_{1D} were not further investigated in this work because they required detailed purification. The fraction from alkaline extraction (K₁) followed by neutralization, dialysis, ethanol precipitation and solubilisation in water, presented an insoluble residue (K₁P) which could be separated from its soluble counterpart (K₁S) by successive treatments of freezing and thawing. K₁P consisted mainly of glucose (93 %) and was characterized through spectroscopy and methylation analyses as a β-(1→3)-glucan with ramifications at C-6. K₁S fractionated by Sepharose CL-4B gel filtration chromatography resolved into three peaks: K₁S_A, K₁S_B and K₁S_C. Sub-fraction K₁S_A, after acid hydrolysis presented mainly glucose (92 %), and analysis by gas chromatography of the alditol acetate derivatives presented three peaks identified as: 2,3,4,6-tetra-O-methyl-, 2,3,6-tri-O-methyl- and 2,3-di-O-methyl-glucitol. FT-IR signals at 1550 and 920 cm⁻¹ were characteristic of glucans, and 850 cm⁻¹ of α-glucans. ¹³C-NMR spectra showed signals corresponding to α-(1→4)-D-glucan with a low degree of substitution at C-6. The results found in this study indicate that the composition of the biomass polysaccharides of the ascomycete *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was similar to the biomass of other fungi reported in the literature, and the differences in the degree of substitutions of the polysaccharides probably reflects variations in times of cultivation, and/or the relative degrees of purity.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*. Fungal biomass polysaccharides. Glycans. Methylation. ¹³C-NMR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos da biomassa do *B. rhodina* 36
- Figura 2** – Cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL -4B da primeira extração aquosa a quente (Q₁) da biomassa do *B. rhodina*. Total de material aplicado: 10 mg; fluxo: 1,2mL/min.; eluente: água; fração: 5 mL; volume da coluna: 226 mL..... 55
- Figura 3** – Análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD das sub-frações provenientes da cromatografia de filtração em gel da primeira extração aquosa a quente (Q₁). 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. Padrões (Pd): 1- fucose, 2-rhamnose, 3- galactose, 4-glucose e 5-manose..... 57
- Figura 4** – Espectro de FT-IR das sub-frações Q_{1A} e Q_{1C} provenientes da primeira extração aquosa a quente (Q₁) do ascomiceto *B. rhodina*, após purificação por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B..... 58
- Figura 5** – Espectros de RMN - ¹³C das frações provenientes do extrato a quente do *B. rhodina* (Q_{1A} e Q_{1C}) após purificação por cromatografia de filtração em gel..... 61
- Figura 6** – Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL -4B do sobrenadante da primeira extração alcalina (K_{1S}) após o processo de gelo e degelo da biomassa do *B. rhodina*. Total de material aplicado: 10 mg; fluxo: 1,2mL/min.; eluente: água; fração: 5 mL; volume da coluna: 225,7 mL..... 65
- Figura 7** – Análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD das sub-frações provenientes da cromatografia de filtração em gel da primeira extração alcalina a quente (K₁). 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. Padrões (Pd): 1- fucose, 2-rhamnose, 3- galactose, 4-glucose e 5-manose..... 65
- Figura 8** – Espectro de FT-IR das frações da extração alcalina do ascomiceto *B. rhodina* após o processo de gelo e degelo e purificação por cromatografia de filtração em gel (CL-4B)..... 66

Figura 9 – Espectros de RMN de ^{13}C das frações do extrato alcalino do micélio da *B. rhodina* após o processo de purificação de gelo-degelo e filtração por cromatografia de exclusão molecular ($\text{K}_1\text{S}_\text{A}$ e K_1P) 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso das frações liofilizadas, quantificação de açúcares totais e proteínas dos diferentes extratos obtidos da biomassa de <i>B. rhodina</i>	51
Tabela 2 – Composição percentual dos açúcares neutros obtidos por hidrólise ácida dos extratos da biomassa do fitopatógeno <i>Botryosphaeria rhodina</i> por HPAEC/PAD	53
Tabela 3 – Composição percentual em monossacarídeos após hidrólise ácida da primeira extração a quente (Q ₁) e suas sub-frações, obtidas por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B.....	56
Tabela 4 – Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na análise de metilação dos polissacarídeos encontrados nas subfrações Q _{1A} , Q _{1C} , K _{1P} e K _{1S_A}	62
Tabela 5 – Composição percentual dos açúcares neutros obtidos por hidrólise ácida das frações K _{1P} (insolúvel), K _{1S} (solúvel) e suas sub-frações analisados por HPAEC/PAD	64

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

% – porcentagem

± – aproximadamente

λ – comprimento de onda

α – configuração alfa

β – configuração beta

°C – grau Celsius

ATR – reflexão total acumulada

B. rhodina – *Botryosphaeria rhodina*

BRMP – polissacarídeo modificador de resposta biológica

BSA – soro albumina bovina

C – carbono

cm – centímetro

cm⁻¹ – por centímetro

-D- – açúcar da série D

d.i – diâmetro interno

Da – Dalton

DEAE – dietilaminoetil

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EPS – exopolissacarídeo

et al – e outros

eV – elétron volts

f – furanosídico

FT-IR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GAL – galactose

GC-MS – (*GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROSCOPY*) - cromatografia gasosa
acoplada à espectrometria de massa

H⁺ – íon hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HPAEC – (*HIGH PERFORMANCE ANIONIC EXCHANGE CHROMATOGRAPHY*)-
cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica

IAD – detector de amperometria integrada
KBr – brometo de potássio
KOH – hidróxido de potássio
L – litro
-L – açúcar da série L
m/v – massa por volume
m/z – massa por carga
m/z – massa por carga
mg – miligrama
MHz – megahertz
min. – minuto
mL – milímetro
mm – milímetro
mM – milimolar
NaOH – hidróxido de sódio
NK – *natural killer*
nm – nanômetro
O – ligado ao oxigênio (ligação glicogênica)
p – piranosídico
P.A – para análise
p/v – peso por volume
PAD – (*PULSED AMPEROMETRIC DETECTION*) - detecção por amperometria pulsada
Pd – padrão
ppm – partes por milhão
RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de próton
rpm – rotações por minuto
TFA – ácido trifluoracético
v/v – volume por volume
δ – deslocamento químico
μg – micrograma
μL – microlitro
F₁ – primeiro extrato aquoso a frio
F₂ – segundo extrato aquoso a frio

F₃ – terceiro extrato aquoso a frio

K₁ – primeiro extrato alcalino

K₁P – precipitado do extrato alcalino após gelo-degelo

K₁S – sobrenadante do extrato alcalino após gelo-degelo

K₁S_A – primeira fração do sobrenadante do extrato alcalino após a filtração em gel

K₁S_B – segunda fração do sobrenadante do extrato alcalino após a filtração em gel

K₁S_C – terceira fração do sobrenadante do extrato alcalino após a filtração em gel

K₂ – segundo extrato alcalino

Q₁ – primeiro extrato aquoso a quente

Q_{1A} – primeira fração do extrato aquoso a quente após a filtração em gel

Q_{1B} – segunda fração do extrato aquoso a quente após a filtração em gel

Q_{1C} – terceira fração do extrato aquoso a quente após a filtração em gel

Q_{1D} – quarta fração do extrato aquoso a quente após a filtração em gel

Q₂ – segundo extrato aquoso a quente

Q₃ – terceiro extrato aquoso a quente

Q₄ – quarto extrato aquoso a quente

R₁ – resíduo da extração a frio

R₂ – resíduo da extração a quente

R₃ – resíduo da extração alcalina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 BIOMASSA FÚNGICA	19
2.2 PAREDE CELULAR FÚNGICA	21
2.3 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR FÚNGICA	24
2.4 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR	26
2.5 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR FÚNGICA: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	27
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR FÚNGICA	32
2.7 <i>BOTRYOSPHAERIA RHODINA</i>	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAIS	37
4.1.1 Microrganismo	37
4.1.2 Reagentes	37
4.1.3 Equipamentos	37
4.2 MÉTODOS GERAIS	38
4.2.1 Manutenção do Microrganismo	38
4.2.2 Preparo do Inoculo	39
4.2.3 Isolamento da Biomassa	39
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.3.1 Quantificação de Proteínas nos Extratos	40
4.3.2 Quantificação de Açúcares Totais	40
4.3.3 Quantificação de Açúcares Redutores	41
4.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	41

4.4.1 Extração Aquosa a Fria	41
4.4.2 Extração Aquosa a Quente	42
4.4.3 Extração Alcalina com KOH 2% a Quente	42
4.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	43
4.5.1 Separação dos Polissacarídeos Solúveis e Insolúveis, do Precipitado Etanólico da Extração Alcalina, por Congelamento e Degelo.....	43
4.5.2 Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sepharose CL-4B	43
4.5.3 Análise da Composição em Monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC).....	44
4.5.3.1 Análise dos açúcares neutros	44
4.5.3.2 Análise dos açúcares aminados	45
4.5.4 Análise das Ligações Glicosídicas dos Polissacarídeos Purificados.....	46
4.5.4.1 Metilação pelo método de Ciucanu e Kerek.....	46
4.5.4.2 Hidrólise e redução.....	46
4.5.4.3 Acetilação	47
4.5.4.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	47
4.5.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	48
4.5.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA CELULAR	49
5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	50
5.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS CONTENDO POLISSACARÍDEOS	53
5.3.1 Extrato Q ₁	54
5.3.2 Extrato K ₁	62
6 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	89
ANEXO A – Artigo científico: “Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização”	90
ANEXO B – Guia para autores do periódico Semina	122

1 INTRODUÇÃO

Os biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos, representam os mais abundantes compostos orgânicos da biosfera, exibindo importantes propriedades e diferentes aplicações, relacionadas com suas características químicas.

Fungos, bactérias e plantas vêm sendo pesquisados como potenciais fontes dessas macromoléculas, principalmente de polissacarídeos. A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, tem levado a intensivos estudos relacionados à sua extração e caracterização (GERN, et al., 2007).

Polissacarídeos bioativos isolados da parede celular fúngica têm sido caracterizados como homopolímeros, heteropolímeros ou, ainda, encontram-se ligados aos resíduos de proteínas formando complexos polissacarídeo-proteína (ZHANG et al., 2002; KIM et al., 2003).

Embora estudos sobre a composição da parede celular de vários fungos sejam efetuados, o maior número de informações disponíveis na literatura está relacionado com a estrutura de parede do ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae*, que é composta por β -D-glucanas, quitinas e manoproteínas (LIPKE; OVALLE, 1998; KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999; NOBEL; VAN DEN ENDE; KLIS, 2000; NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006). Alguns patógenos humanos, como *Candida albicans* e espécies do gênero, também vêm tendo a constituição de parede celular investigada, que poderá ser utilizada como possível alvo de drogas antifúngicas (GEORGOPAPADAKOU; TKACZ, 1995; SHIBATA et al., 1995; POULAIN; JOUAULT, 2004).

Estudos realizados por Falch e colaboradores (2000) mostram que glucanas β -(1 \rightarrow 3) ramificadas possuem efeitos estimulantes para o sistema imune. Entretanto os mecanismos celulares pelos quais estas substâncias agem não estão muito bem definidos, sendo a principal hipótese a existência de receptores específicos para estas glucanas nas superfícies das células (MUELLER et al., 2000),

Fatores físico-químicos podem influenciar no efeito destes polissacarídeos sobre o organismo, dentre eles o grau de ramificação, a massa molecular e a conformação apresentada pelo material (YOUNG; JACOBS, 1998; LEUNG et al., 2006). Para compreender os mecanismos de atuação dessas moléculas biológicas todos os parâmetros de caracterização química e conformação devem ser estudados.

O *Botryosphaeria rhodina*, um fungo filamentosso causador de cancro em eucalipto e objeto desse estudo, é produtor de lacases (VASCONCELOS et al., 2000) e de uma goma formada por um exopolissacarídeo que proporciona uma alta viscosidade, quando cultivado em meio submerso (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996). O exopolissacarídeo, denominado botriosferana, foi caracterizado estruturalmente como sendo uma glucana com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) na cadeia principal e ramificações com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) (BARBOSA et al., 2003; CORRADI da SILVA et al., 2005). Ainda não existem relatos quanto à composição química em polissacarídeos da parede celular deste microrganismo.

Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a composição química, em polissacarídeos, da biomassa micelial do *B. rhodina*, para que os conhecimentos obtidos possam auxiliar, por exemplo, o desenvolvimento futuro de novos medicamentos antifúngicos, além do que as próprias moléculas isoladas poderão ser aplicadas em diferentes campos biotecnológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMASSA FÚNGICA

Os fungos são microrganismos eucariontes heterotróficos que obtêm sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar diversos nichos ecológicos, atuando como parasitas, sapróbios ou então estabelecendo relações simbióticas, por exemplo, com algas, formando os líquens. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

No ambiente terrestre, os fungos são de importância fundamental como organismos decompositores, patógenos ou simbiontes, tendo papel importante nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio ou fósforo (BOSWELL; et al., 2003). Como fitopatógenos, estes organismos possuem mecanismos de adesão ao hospedeiro, onde as moléculas de reconhecimento e união são, na maior parte dos casos, de natureza protéica ou glicoprotéica. (XIAO et al., 1994; SUGUI; LEITE; NICHOLSON, 1998) e, por isso, a produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares têm sido associadas à capacidade do microrganismo causar doenças em plantas (DOSS, 1999; GIL-AD; BAR-NUN; MAYER, 2001; LEITE et al., 2001).

Os fungos podem ser considerados como os agentes mais importantes de degradação da biosfera, principalmente quando se estuda os ecossistemas florestais, onde esses microrganismos são os principais decompositores de celulose e lignina. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é em grande parte controlado por fungos degradadores de madeira, que determinam as taxas dos nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Além de sua atuação nos ecossistemas, os fungos também apresentam um grande potencial de aplicação nas diferentes áreas industriais, como alimentos, cosméticos, medicamentos, assim como na área ambiental, na detoxificação de compostos em ambientes contaminados. A utilização desses microrganismos pode ser através do seu material celular (biomassa) ou então de macromoléculas isoladas.

Há uma forte tendência em se explorar comercialmente a biomassa fúngica para isolamento de seus componentes celulares e conseqüentemente de seus principais constituintes, tais como enzimas (invertases, glucosidases), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas) e principalmente polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas), além de

lipídeos, como fosfolipídeos e ergosterol, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, conseqüentemente, de grande valor agregado (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; KOLLÁR; STURDIK; SAJBIDOR, 1992; BELEM; LEE, 1998; BEROVIČ et al., 2003; PAVLOVA, PANCHEV; HRISTOZOVA, 2005).

Trabalhos como os realizados por Mendes-Costa e Moraes (1999) mostraram que é possível isolar da biomassa de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frações de carboidratos solúveis, e que estas moléculas podem ser utilizadas como indutoras de mecanismos de defesa em plantas. O mesmo foi observado em experimentos com soja (HAHN; ALBERSHEIM, 1978; SHARP; VALENT; ALBERSHEIM, 1984), e sorgo (PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005), onde se detectou a produção de fitoalexinas, substâncias envolvidas no mecanismo de defesa vegetal, quando as plantas foram colocadas em contato com glucanas isoladas de *S. cerevisiae* e de *Phytophthora megasperma*.

A biomassa excedente da produção industrial de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, além de ser aproveitada para ração para gado e ou no preparo de fertilizantes (MUZZARELLI et al., 2000), também vem se mostrando uma fonte viável de moléculas importantes, como os polissacarídeos do tipo glucanas (WANG et al., 2007), aplicados na área medicinal devido a suas atividades antitumorais e imunomoduladoras.

Durante um processo fermentativo para a produção de exopolissacarídeos (EPS), um grande percentual de biomassa também é obtido. Entretanto, as quantidades de massa micelial e EPS não são necessários proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, grau de aeração, entre outros. Estes parâmetros podem interferir tanto na produção da biomassa quanto dos componentes isolados desse substrato. Segundo alguns autores (SEVIOUR et al., 1992; WANG; McNEILL, 1995; SELBMANN; CROGNALÉ; PETRUCCIOLI, 2002; BARBOSA et al., 2004) o que se espera obter no final do procedimento, se biomassa ou EPS, determinará como essas variáveis serão aplicadas no cultivo microbiano.

A influência desses parâmetros pode ser ilustrada, por exemplo, por Park e colaboradores (2002), que trabalhando com *Cordyceps militaris* para a produção de exopolissacarídeos (EPS), observaram que o aumento da taxa de aeração favorecia a produção de biomassa em relação à de macromoléculas. Tang e Zhong (2003) mostraram que variações nos níveis de saturação de ar em cultivos de *Ganoderma lucidum* influenciavam o fornecimento de oxigênio, levando a produção de quantidades diferentes de polissacarídeos

intracelulares, extracelulares e de ácido ganodérico pelo fungo. Os pesquisadores observaram que uma menor saturação de ar (10 %) favorecia a produção de polissacarídeo extracelular (0,7 g/L), enquanto que com um grau de saturação de ar maior (25 %) havia um aumento de polissacarídeos intracelulares (1,6 g/L) e de ácido ganodérico (350 mg/L).

Portanto, pode-se concluir que valores significativos de biomassa podem ser obtidos por otimização de condições de cultivo, e que isso permite um aumento nas quantidades de componentes celulares que podem ser extraídos e terem suas moléculas básicas investigadas, para posteriores aplicações industriais.

2.2 PAREDE CELULAR FÚNGICA

Nos fungos, a estrutura celular é semelhante a dos outros eucariotos, constituída basicamente por uma membrana, um citoplasma com as organelas distribuídas aleatoriamente por todo interior celular e um compartimento especial, o núcleo, que armazena o material genético. As células podem ser encontradas na forma unicelular, como as leveduras, ou então formando conjuntos de hifas, septadas ou não, denominadas de micélio, como no caso dos fungos filamentosos. Tanto as células leveduriformes quanto o micélio estão envolvidos por uma camada protetora externa denominada de parede celular, quimicamente diferente da parede encontrada em vegetais, ainda que possa exercer os mesmos tipos de funções (De ROBERTIS; HIB; PONZIO, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A parede celular fúngica pode ser caracterizada como uma estrutura relativamente rígida, porém dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula. Ela determina o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução (PÉREZ; RIBAS, 2004; NIMRICHTER et al., 2005; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005), sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos nos ambientes onde são encontrados (DURAN; NOMBELA, 2004).

O crescimento micelial é dependente do processo de translocação, onde o material celular é direcionado para as regiões em desenvolvimento (BOSWELL et al., 2003), permitindo a formação das estruturas celulares, como a parede, facilitando a ocupação dos ambientes pelo microrganismo. Em condições normais de desenvolvimento, a estrutura da

parede celular é baseada na parede já existente nas células progenitoras, que são estendidas e remodeladas. Neste caso, ela serve como um arcabouço para a incorporação de novos materiais dentro dos pontos de crescimento (KLIS; BOORSMA; De GROOT, 2006).

A parede celular compreende cerca de 20-30% do peso seco da célula fúngica (SMITH et al., 1999), sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular (KLIS; BOORSMA; De GROOT, 2006).

A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais freqüentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004).

O conhecimento da constituição química da parede, principalmente em relação à presença de polissacarídeos, é um dado importante para o emprego biotecnológico dos fungos, pois estas moléculas podem ser utilizadas em processos industriais, para a produção de alimentos, medicamentos, entre outros ou, ainda, serem úteis para a classificação taxonômica desses organismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Vários estudos têm sido realizados para o conhecimento da composição química da parede celular de fungos, principalmente leveduras, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*, muito utilizadas em industriais de alimentos (GALICHET et al., 2001; DURAN; NOMBELA, 2004; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005; KIM; YUN, 2005; NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006).

De acordo com Aguilar-Uscanga e François, (2003) a parede celular de leveduras apresenta como componentes polímeros de manose (constituindo manoproteínas), glicanas (principalmente beta-glucanas, mas galactanas também podem ser encontradas) e polímeros de N-acetilglucosamina (formando quitina).

Cerca de 60 a 90% do peso seco da parede celular de *S. cerevisiae* é constituída de glucanas e mananas (CHAUD; SGARBIERI, 2006). Para Kapteyn e colaboradores (1999), a parede celular desta levedura é organizada em duas camadas formadas por quatro classes de macromoléculas como proteínas de parede celular (CWPs), β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana e quitina, com estes componentes interconectados através de ligações covalentes.

Lipke e Ovalle (1998) através de estudos realizados com microscopia eletrônica observaram a disposição em camadas dos polissacarídeos da parede celular de *S.*

cerevisiae. A camada mais interna é constituída principalmente por uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana com pequeno grau de substituição em C-6 por resíduos glucopiranosídicos, que variavam em relação ao grau de maturação da célula. Segundo esses autores, a glucana poderia ser solúvel ou insolúvel, em solução aquosa, dependendo do percentual de ramificação. Os demais constituintes da camada interna observados foram a quitina, presente em proporções reduzidas nas regiões de cicatrizes de brotamento, e uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana altamente ramificada, solúvel em água (KLIS et al., 2002). Finalmente, uma manana constituída de uma cadeia principal de α -(1 \rightarrow 6)-D-manopiranosose altamente ramificada também foi descrita como constituinte da parede celular em *S. cerevisiae*. As ramificações foram caracterizadas como cadeias laterais de comprimentos variados de unidades de manose α -(1 \rightarrow 2) e em menor proporção α -(1 \rightarrow 3) ligadas, distribuídas de forma complexa ao longo da cadeia principal (KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999).

A levedura *Schizosaccharomyces pombe*, espécie considerada modelo para o estudo da relação entre a formação da parede celular e o ciclo celular, também apresenta β -(1 \rightarrow 3) glucana com ramificação em C-6 (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005). Uma característica distinta desta levedura é a ausência de quitina, um polissacarídeo geralmente presente em outros fungos. Foram identificados outros polissacarídeos como uma α -(1 \rightarrow 3) glucana e uma galactomanana típica de leveduras, formada por uma cadeia principal de α -(1 \rightarrow 2) manopiranosose, com unidades de galactose substituindo as posições terminais (PÉREZ; RIBAS, 2004).

A parede celular dos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, responsáveis por doenças em humanos, apresenta componentes como manana (*Candida*), galactomanana (*Aspergillus*) e β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana (ambos os microrganismos) que podem ser utilizados para o diagnóstico de infecções fúngicas invasivas, pois estas moléculas, consideradas como antígenos circulantes, são detectados no sangue em uma fase inicial da infecção e antes do surgimento dos sintomas clínicos. A detecção desses antígenos é um procedimento mais rápido que os métodos tradicionais, realizados por estudos histológicos ou cultura de células. A presença desses antígenos também pode ser utilizada para monitorar a resposta dos pacientes ao tratamento com agentes antifúngicos (ERJAVEČ; VERWEIJ, 2002).

Como a parede celular é essencial para a sobrevivência da célula fúngica e está ausente em células de mamíferos, ela se torna um alvo atrativo para a ação de drogas. Portanto, o conhecimento da síntese da parede celular, bem como de sua composição química

podem dar informações valiosas para aplicação desses agentes antifúngicos (PÉREZ; RIBAS, 2004).

2.3 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR FÚNGICA

Os polissacarídeos constituem uma classe de biopolímeros produzidos por todos os organismos vivos. Eles exibem diferentes tipos de estruturas químicas, funções fisiológicas e aplicações (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). 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/hemicetal 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 (PAZUR, 1994).

Nos organismos vivos, os polissacarídeos podem estar sozinhos ou covalentemente combinados com outros compostos de diferentes classes biológicas, principalmente proteínas e lipídeos, constituindo os glicoconjugados. Em combinação ou livres, essas moléculas têm importantes funções biológicas (NELSON; COX, 2002).

Em microrganismos, os polissacarídeos podem ser estruturais, excretados ao meio como exopolissacarídeos (EPS) ou localizarem-se no citoplasma, exercendo a função de reserva energética (KRCMAR et al., 1999; NELSON; COX, 2002). Os polissacarídeos microbianos têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de aplicação em diferentes áreas industriais incluindo cosméticos e alimentos funcionais, além de medicamentos (VANDAMME et al., 2002, BAIS et al., 2005, FRANÇOIS; ROJAS; DARAIO, 2005, METHACANON et al., 2005).

Nos fungos, os polissacarídeos constituem um percentual importante da biomassa, onde a parede da hifa é formada por mais de 75% dessas moléculas, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como um suporte para a hifa, essas macromoléculas também podem constituir uma “capa” extracelular ao redor do micélio (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996).

A composição e estrutura química dos polissacarídeos de parede celular são variáveis entre as diferentes espécies de microrganismos. Com base nos resultados

provenientes da caracterização química dessas macromoléculas, alguns autores propõem a sua utilização como marcadores para a classificação taxonômica de fungos filamentosos, leveduras e líquens (BARTNICKI-GARCIA, 1968; GORIN; SPENCER, 1970; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995; CARBONERO et al., 2003; CARBONERO et al., 2005a; PESSONI et al., 2005).

Devido ao grande número de fungos encontrados na natureza e a possibilidade de terem em sua composição endopolissacarídeos e exopolissacarídeos com diferentes aplicações medicinais, estudos estão sendo realizados para verificar o potencial dessas macromoléculas como antioxidantes, antimutagênicos, anticoagulantes, antitrombóticos e imunomoduladores. (FREIMUND et al., 2003; ZHANG et al., 2005; CORRADI da SILVA et al., 2006).

Dentre os polissacarídeos encontrados na parede celular fúngica as glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns. A maioria é linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa (α) ou beta (β). As β -glucanas são a forma predominante, podendo estar livres ou associadas às proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos. A conformação destas moléculas pode variar desde simples até tripla hélice, que é a forma mais comum, onde três cadeias de polímeros são agregadas por ligações de hidrogênio nos oxigênios do C-2 (WILLIAMS, 1997).

As β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas encontradas em extratos celulares de *Saccharomyces cerevisiae* possuem ramificações em C-6 e esses terminais não redutores podem estar covalentemente ligados à cadeia de quitina através de ligação α -(1 \rightarrow 4) (LESAGE; BUSSEY, 2006).

A síntese de β -glucanas em fungos envolve várias etapas: reações de iniciação, alongamento da cadeia e ramificação, das quais a mais estudada é o alongamento da cadeia que envolve a reação catalisada pela enzima glucana β -(1 \rightarrow 3) sintase a partir de uridina difosfato-glucose (UDP-glucose) como substrato (RUIZ-HERRERA, 1991). De acordo com Douglas (2001), a polimerização dos açúcares é gradativa, sendo adicionado uma unidade de glucose por vez, até se formar as longas cadeias.

Na parede celular de algumas leveduras, como *Candida dubliniensis*, foi encontrado um componente majoritário rico em manose associado a uma proteína, constituindo as manoproteínas. A esse tipo de glicoconjugado têm sido atribuídas funções de adesão entre células, habilidades imunomoduladores e variabilidade antigênica (LIŽIČÁROVÁ et al., 2007). Moléculas de manose podem, também, ser encontradas como galactomananas, que são heteropolissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de

manose ligada a resíduos de galactose, presentes em espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. fumigatus* e *A. wentii*, e *Chaetosartorya chrysellae*, fungos estudados em relação à patogenicidade humana (GÓMEZ-MIRANDA et al., 2004). Dependendo do grau de ramificação, bem como do tamanho da cadeia lateral, as galactomananas apresentam propriedades físicas e químicas distintas, que permitem classificá-las como uma família de macromoléculas.

Um constituinte menor da parede celular e comum em fungos é a quitina, um homopolímero linear, longo, formado por resíduos de N-acetilglucosamina β -(1 \rightarrow 4) ligados. Compreende cerca de 1 a 2% da parede celular de leveduras embora seja encontrada em maior proporção (10 a 20%) em fungos filamentosos. Pontes de hidrogênio inter-cadeia dão origem a microfibrilas de quitina. Essas estruturas suportam grandes pressões e, portanto, tornam-se responsáveis pela integridade da parede celular. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMAN; FREE, 2006).

A caracterização química dos constituintes da parede celular fúngica contribuirá para o conhecimento básico do microrganismo, para o entendimento de suas relações com o meio e a provável utilização biotecnológica de seus componentes isolados.

2.4 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR

Visto que a biomassa fúngica constitui uma valiosa fonte de proteínas, lipídeos e principalmente de polissacarídeos que apresentam inúmeras propriedades benéficas para a saúde humana, animal e vegetal, diferentes métodos são utilizados para o isolamento e caracterização destes polissacarídeos.

Primeiramente, é necessário efetuar a extração eficiente dos polissacarídeos evitando, tanto quanto possível, reações de degradação. Os procedimentos mais comuns são as extrações aquosas a frio, a quente e/ou alcalina, com NaOH ou KOH, ou até mesmo com auxílio de enzimas específicas. Os extratos obtidos, geralmente são constituídos por uma mistura de polissacarídeos (PÉREZ; RIBAS, 2004).

Precedendo a caracterização (PAZUR, 1994), procedimentos de purificação devem ser efetuados até que a composição monossacarídica da macromolécula em estudo se

mantenha constante por, pelo menos, dois métodos diferentes. Normalmente, métodos cromatográficos e/ou químicos dão informações em relação à pureza da preparação polissacarídica (DANISHEFSKY; WHISTLER; BETTELHEIM, 1970; BOYER, 1993).

Considerando-se a pureza do material o primeiro procedimento químico para conhecer a composição de uma fração rica em carboidrato é fragmentá-la, para ter os resíduos monossacarídicos que a constitui (NELSON; COX, 2002). Esta fragmentação pode ser realizada através de hidrólises enzimática ou ácida. Estabelecidas às condições ideais de hidrólise, a identificação dos monômeros passa a ser a etapa seguinte da análise. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados e a cromatografia líquida de alta pressão em troca aniônica (HPAEC) tem sido, juntamente com a cromatografia gasosa, os de preferência (RUAS-MADIEDO; LOS REYES-GAVILAN, 2005).

O tipo de ligação glicosídica geralmente é determinado após a análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS) e a configuração anomérica dos monossacarídeos que constituem a macromolécula por FT-IR. (SILVERSTEIN, 1994; MOHAČEK-GROŠEV; BOŽAC; PUPPELS, 2001) e RMN de ^{13}C (GORIN, 1981; CORRADI da SILVA et al., 2006).

2.5 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR FÚNGICA: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Estudos demonstram que os polissacarídeos fúngicos podem ser isolados da parede celular do corpo de frutificação, do micélio, do esclerócio (forma de resistência) ou então serem provenientes de meios de cultivo livres de células (extracelulares) (MONDAL et al., 2004; WANG et al., 2004; CORRADI da SILVA et al., 2006).

Vários polissacarídeos foram isolados da parede celular do *Phytophthora parasitica*, um fungo fitopatogênico. A mistura polissacarídica foi fracionada por cromatografias sucessivas em DEAE-celulose, Sephadex G-25, Concanavalina-A Sepharose e Sephadex G-200. Os polissacarídeos neutros consistiam de uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) cuja massa molecular ficou entre 9×10^3 a 200×10^3 Da. Todos estes polissacarídeos eram constituídos por uma cadeia principal de resíduos de glucose β -(1 \rightarrow 3) ligados (FABRE et al., 1984).

O principal componente encontrado no extrato aquoso do corpo de frutificação de *Boletus erythropus* foi uma β -glucana contendo resíduos de glucose com

ligações (1→3), sendo substituídas em O-6 por terminais não redutores de -D-Glcp, na frequência de 1:3 (CHAUVEUAU et al., 1996).

Ruiz-Herrera e colaboradores (1996) mostraram que as composições monossacarídicas do micélio e da levedura de *Ustilago maydis*, um hemibasidiomiceto fitopatogênico que causa doença em milho, são distintas. Glucose (41%), galactose (32%), manose (16%) e xilose (11%), monossacarídeos encontrados na forma micelial diferiram daqueles encontrados na forma leveduriforme: glucose (26%), xilose (23%), manose (23%), galactose (11%), fucose (6%), arabinose (6%) e ribose (5%).

Prieto e colaboradores (1997) isolaram um polissacarídeo complexo, por extração alcalina, da parede celular dos fungos *Trichoderma reesei*, *T. koningii* (forma teleomórfica) e *Hypocrea psychrophila* (anamórfica). Esses fungos, encontrados no solo, têm grande importância econômica por atuarem como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos e por serem produtores de enzimas como as celulases. Após hidrólise ácida do polissacarídeo complexo solúvel em água foram detectados por cromatografia gasosa, como acetato de alditóis, os açúcares glucose, galactose e manose. Análises de metilação e ressonância magnética nuclear de carbono 13 e próton uni- e bidimensional mostraram uma estrutura altamente complexa com uma cadeia principal constituída de unidades manopiranosídicas α -(1→6) ligadas, algumas unidades substituídas em 2 por oligossacarídeos com unidades galactofuranosídicas alternadas com ácido glucurônico ou em 3 por unidades α manopiranosídicas.

Ahrazem e colaboradores (1997) caracterizaram um polissacarídeo ácido isolado da parede celular de *Cylindrocladium* e de sua forma anamórfica *Calonectria*, por extração alcalina. Os acetatos de alditóis, galactose, glucose e manose foram detectados por cromatografia gasosa, além da presença de ácido urônico. Análises de metilação mostraram os derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol e 3-5-di-O-metil galacitol, além de 5% de 2,3,4-tri-O-metil manitol, e 3,4-di-O-metil manitol. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou apenas dois sinais na região anomérica, δ 107,1 ppm e 176,2 ppm, atribuídos, respectivamente, aos resíduos β -galactofuranosídicos e carbonila, confirmando a presença de ácido urônico.

Uma β -D-glucana-(1→3) solúvel substituída em C-6, em uma proporção de aproximadamente 30%, foi encontrada como principal componente da extração alcalina da parede celular de *Cryphonectria parasítica* (MOLINARO et al., 2000).

Zhang e colaboradores (2000) extraíram uma glucana do corpo de frutificação do basidiomiceto *Ganoderma lucidum*. Após resultados das análises de metilação,

oxidação pelo periodato, ressonância magnética nuclear de carbono 13 e espectroscopia de infravermelho, a molécula foi caracterizada como um polímero linear constituído de resíduos glucosídicos α -(1 \rightarrow 3) ligados.

Um polissacarídeo solúvel foi isolado do extrato aquoso a quente do corpo de frutificação de *Agaricus blazei* (Murr) por precipitação etanólica, cromatografia de troca-iônica e cromatografia de filtração em gel. As análises de metilação, degradação de Smith, hidrólise branda e espectroscopia de RMN de ^{13}C mostraram que o polissacarídeo era composto por uma cadeia principal de resíduos glucosídicos em ligação β -(1 \rightarrow 6), substituídos em C-3 por resíduos laminaribiosídicos (DONG et al., 2002).

O corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum*, tem sido usado tradicionalmente na medicina chinesa e em outros países asiáticos por apresentarem efeitos medicinais contra câncer, hipertensão, hepatite e hipercolesterolemia e vários polissacarídeos têm sido obtidos a partir do extrato aquoso dessa estrutura de *Ganoderma* (BAO et al., 2002a). Uma das glucanas isoladas foi caracterizada como tendo uma cadeia principal constituída de unidades glucopiranosídicas β -(1 \rightarrow 3) substituídas em O-6 por uma unidade de glucose (BAO et al., 2001; BAO et al., 2002a). Glucanas com estrutura química semelhantes também foram isoladas dos esporos deste mesmo fungo (BAO et al., 2002b).

Domenech e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram uma galactomanana do extrato alcalino da parede celular de três linhagens de *Verticillium fungicola*, considerado um dos patógenos mais comuns no cultivo do cogumelo *Agaricus biosporus*. A fração F1SS, das três linhagens estudadas, era constituída por manose e galactose. A análise de metilação mostrou dois picos identificados como 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-galacitol, que correspondem a galactopiranoose, e 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-manitol e um pequeno percentual de Man β 6-O-substituído. A massa molecular média dos polissacarídeos, determinada por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B, ficou entre 70 a 80 kDa. Os resultados da análise de metilação juntamente com espectros de RMN de H^1 e de $^{13}\text{C}^1$ sugeriram uma estrutura formada por uma cadeia principal de unidades manopiranosídicas α -(1 \rightarrow 6) ligadas e substituídas em O-4 por resíduo β -D-galactopiranosídicos. Esses resultados confirmam a semelhança estrutural dos polissacarídeos nas diferentes linhagens e reforçam a aplicação dos polissacarídeos como marcadores taxonômicos.

Ahrazem e colaboradores (2002) caracterizaram um polissacarídeo solúvel em água, extraída com álcali de paredes celulares das espécies de *Geotrichum spp.* (forma anamórfica), *Galactomyces* e *Dipodascus* (formas teleomórficas). Por análise de metilação e

ressonância magnética nuclear concluíram que o polissacarídeo era uma galactomanana com cadeia principal constituída de unidades α -D-manp 1 \rightarrow 6 e substituídas em 2 por (α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-1 \rightarrow). Todas as espécies estudadas apresentaram o mesmo polissacarídeo e, portanto, concluíram tratar-se do mesmo gênero.

Uma linhagem selvagem de *Poria cocos* foi cultivada, separadamente, em extrato de cevada e em extrato fermentado de milho e denominadas de wb e wc, respectivamente. Seis frações polissacarídeos foram isoladas, seqüencialmente, dos dois micélios por extrações com NaCl 0,9% (PCM1), aquosa a quente (PCM2), NaOH 0,5M (PCM3-I e -II) e ácido fórmico a 88% (PCM4-I e -II). Glucanas extraídas com NaOH 0,5M se separam em duas frações, denominadas PCM3-I e PCM3-II, após neutralização com ácido acético. As características físicas e químicas foram determinadas por espectroscopia de IV (Infra-Vermelho), cromatografia gasosa (CG), RMN-¹³C, light scattering (LS) e viscosimetria. Os resultados indicaram que as frações PCM-1 e PCM-2 dos cultivos em wb e wc eram constituídas por heteropolissacarídeos formados por glucose, manose e galactose, enquanto que em PCM3-I foram encontradas glucanas lineares com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3). As frações PCM3-II, PCM4-I e PCM4-II eram compostas de glucanas lineares com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) (JIN et al., 2003).

Em 2004, Jia e colaboradores elucidaram a estrutura de um heteropolissacarídeo de peso molecular de $1,8 \times 10^4$ Da, composto por ramnose, glucose e galactose na proporção de 1,19: 3,81: 1,00, isolado do corpo de frutificação do fungo medicinal chinês *Hericium erinaceus*. Suas características estruturais foram investigadas utilizando análise de metilação, hidrólise parcial, espectroscopia de infravermelho e de RMN. Os resultados mostraram que a cadeia principal era formada por unidades α -D-galactopiranosídicas com ramificações em O-2 por resíduos de ramnose e glucose.

Chakraborty e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram uma heteroglucana da extração aquosa a quente (100°C, 6h) do corpo de frutificação do fungo comestível *Astraeus hygrometricus* que constitui micorrizas crescendo junto com as raízes de árvores auxiliando na extração de nutrientes, especialmente o fósforo do solo, e de substâncias orgânicas. A fração solúvel do extrato aquoso foi investigada e os resultados das análises de hidrólise ácida total, metilação e RMN permitiram concluir que se tratava de uma glucana com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 6).

Mondal e colaboradores (2004) realizaram uma extração aquosa do corpo de frutificação (100°C, 6h) de *Termitomyces eurhizus*, um cogumelo de grande interesse devido a suas propriedades imunomoduladoras e seu alto valor nutritivo. O extrato deste

microrganismo, depois de dializado e precipitado com etanol, foi submetido à purificação pela cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50 onde foram separadas duas frações homogêneas, denominadas PS-I e PS-II. Análises de metilação, oxidação com periodato, RMN do ^{13}C e de ^1H , mostraram que o polissacarídeo da fração PS-I era composto por unidades glucopiranosídicas unidas por ligações do tipo α -(1→3) e α -(1→6) na proporção de 2,5:1. PS-II também era um polímero de glucose mas com ligações do tipo α -(1→6).

Uma glucana isolada do micélio de um fungo comestível chinês *Cordyceps sinensis* foi caracterizada por análise de metilação, degradação de Smith, acetólise, espectroscopia de RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C - ^1H 2D-COSY) e hidrólise ácida total. Os resultados mostraram que cadeia principal era composta de resíduos α -(1→4)-D-glucopiranosídicos ligados a um único resíduo α -(1→6)-D-glucosídicos (YALIN; CUIRONG; YUANJIANG, 2006).

Um polissacarídeo insolúvel em água foi isolado da extração alcalina (NaOH) do micélio de *Penicillium chrysogenum*. O peso molecular desse polímero, 180 KDa, foi determinado por cromatografia de permeação em gel. Após hidrólise ácida total e análise dos derivados acetilados por cromatografia líquido-gasosa (GLC) foram encontrados os açúcares glucose, manose e galactose nas proporções 98,7: 0,6: 0,7. O espectro de FT-IR apresentou picos de absorção em 929, 846 e 820 cm^{-1} característicos de glucanas com ligações do tipo α -(1→3). O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 apresentou 6 sinais de intensidades semelhantes. Os deslocamentos químicos em 101,20 ppm e 83,66 ppm foram atribuídos ao carbono anomérico dos resíduos de glucose e ao C-3-O-substituído, respectivamente (WANG et al., 2007).

Um endopolissacarídeo foi isolado do extrato aquoso a quente do micélio do *Inonotus obliquus*, (fungo de degradação branca) e purificado por cromatografia de troca iônica e de filtração em gel. Após caracterização, o polissacarídeo mostrou-se constituído por resíduos de fucose, glucose e manose e massa molecular de aproximadamente 1×10^6 Da. Verificou-se que esse endopolissacarídeo é um ativador específico de células B e de macrófagos. Os resultados *in vivo* e *in vitro* comprovaram que a atividade antitumoral não se deve ao efeito tumoricida e sim ao efeito imunomodulador (KIM et al., 2006).

2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR FÚNGICA

Os biopolímeros, de maneira geral, têm sido objetos de pesquisas devido ao seu potencial de aplicação. Estudos realizados com os polissacarídeos da parede celular fúngica demonstram que essas moléculas apresentam uma variedade de respostas biológicas de defesa, mas sua aplicação terapêutica parece estar relacionada com a estrutura química e a conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais entre polímeros resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (CORRADI da SILVA et al, 2006).

Diferentes funções biológicas desses polímeros foram analisadas, como hipoglicemiantes, anti-trombóticas, antibióticas, atividades anti-tumorais e anti-virais, atuação na diminuição da pressão arterial e na concentração de lipídios sanguíneos, na inibição da ação inflamatória e microbiana. (ZHANG et al., 2000; HWANG et al., 2003; ALQUINI et al., 2004; ZHANG et al., 2007). Estudos com os basidiomicetos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*, utilizados na medicina popular japonesa e chinesa para prevenção e tratamento de doenças, mostraram que essas atividades poderiam estar ligadas aos polissacarídeos presentes nestes fungos (LIMA et al., 2001; DELMANTO et al., 2001; CHEN; SHAO; SU, 2004).

As glucanas são os polissacarídeos mais estudados em relação à atividade biológica. Essas moléculas, principalmente do tipo β -(1 \rightarrow 3) e/ou β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), são capazes de ativar células do sistema imunológico humano, como macrófagos, neutrófilos e células NK (*natural killer*), para a secreção de citocinas (interleucinas, interferon e fator necrosante tumoral) que são substâncias que atuam como sinais químicos nos processos de diferenciação, proliferação e apoptose celulares, contribuindo para a manutenção da homeostase no organismo (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; HABIJANIĆ et al., 2001).

Muitos medicamentos utilizados em neoplasias apresentam como efeito colateral uma ação imunossupressora, que pode acarretar em infecção e septicemia. Devido à capacidade das β -glucanas em estimular o sistema imunológico, elas podem ser utilizadas como adjuvantes desses quimioterápicos no tratamento de pacientes imunocomprometidos. (BOHN; BeMILLER, 1995; LEE et al., 2001; SUGAWARA et al., 2004; ZHANG et al., 2005; LEUNG et al., 2006).

Além das glucanas, outros polissacarídeos de parede também estão sendo investigados com o intuito de determinar suas atividades biológicas.

De acordo com Zhang e colaboradores (2007), manoglucanas, galactomananas, e glucomananas, obtidas da biomassa de basidiomicetos, tais como *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* e diferentes espécies do gênero *Pleurotus*, como *P. cittinopileatus*, também podem apresentar atividades antitumorais ou imunomoduladoras.

Martinichen-Herrero e colaboradores (2005) isolaram e caracterizaram uma galactomanana do líquen *Cladonia ibitipocae* e a modificaram quimicamente pela inserção de grupamentos sulfato, num processo denominado sulfatação; os polissacarídeos original e modificado apresentaram atividades anticoagulante e antitrombótica distintas em experimentos realizados em ratos, com os resultados mais positivos relacionados à molécula sulfatada.

Trabalhos realizados por Krizková e colaboradores (2001), investigaram glucomananas isoladas de *Candida utilis* e mananas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Eles observaram que essas moléculas apresentavam atividade antimutagênica, pois eram capazes de reduzir danos oxidativos ao DNA de cloroplastos do flagelado *Euglena gracilis*, e que esta ação poderia estar relacionada à característica das moléculas em sequestrar radicais livres, demonstrando também que esses polissacarídeos possuem atividade antioxidante.

Além das funções biológicas destacadas acima, é importante também ressaltar que dependendo das características químicas que esses biopolímeros apresentem como, por exemplo, o grau de solubilidade em soluções aquosas, é possível também a sua utilização nos mais diversos segmentos industriais, como indústrias de alimentos, cosméticos, etc (SUTHERLAND, 1998; SHAH et al., 2000; WANG et al., 2004; METHACANON et al., 2005).

2.7 BOTRYOSPHAERIA RHODINA

O ascomiceto *Botryosphaeria* sp isolado de cancro de eucalipto por Barbosa e colaboradores em 1996, foi recentemente classificado como *Botryosphaeria rhodina* (GARCIA et al., 2004). Este fungo é um ascomiceto produtor constitutivo de lacases e teve a produção da enzima aumentada na presença de álcool veratrílico, considerado indutor para produção de polifenoloxidasas (VASCONCELOS et al., 2000; VASCONCELOS et al, 2001).

Em 2001, Dekker e Barbosa relataram a produção de β -D-glucana pelo *Botryosphaeria rhodina* quando cultivado em concentrações crescentes de glucose (1 a 4% m/v). Posteriormente, este exopolissacarídeo foi caracterizado estruturalmente como uma β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana, com aproximadamente 22% de ramificação em C-6, o qual foi denominado botriosferana. Os produtos obtidos da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo demonstraram que as ramificações consistiam de resíduos glucopiranosídicos e gentiobiosídicos ligados à cadeia principal por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) (BARBOSA et al., 2003).

A β -D-glucana do *Botryosphaeria rhodina* foi produzida em diferentes fontes de carbono tais como glucose, frutose, manose, sacarose e melão de cana de açúcar. A maior produção do exopolissacarídeo ($3,7 \pm 0,5$ g/L) e de biomassa micelial ($17,4 \pm 1,9$ g/L) foi obtida em sacarose comercial, seguido da glucose cuja produção de EPS ($2,8 \pm 0,5$ g/L) e de biomassa ($15,4 \pm 2,2$ g/L) também foram relevantes (STELUTI et al., 2004). O grau de ramificação do EPS variou nas diferentes fontes de carbono utilizadas. Corradi da Silva e colaboradores (2005) verificaram que o polissacarídeo obtido em frutose, como fonte de carbono, possuía 31% de ramificações em sua cadeia principal, diferentemente de sacarose (21%) e de glucose (20%).

Bioensaios com botriosferana foram realizados por Miranda e colaboradores e os resultados obtidos demonstraram importantes propriedades como a ausência de mutagenicidade, atividades antimutagênicas, hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicas (MIRANDA et al., 2006).

Considerando-se que a biomassa micelial passa a ser um resíduo da produção de EPS por *Botryosphaeria rhodina* e que não existem relatos na literatura sobre a composição da biomassa micelial e, principalmente, dos polissacarídeos constituintes da sua parede celular, faz-se necessário desenvolver estudos sobre sua composição química. Portanto, este trabalho pretende obter cientificamente parte destas informações, as quais certamente irão contribuir no futuro para o aproveitamento adequado e racional da biomassa fúngica, para pesquisas de novas drogas antifúngicas visando o controle de patógenos de diferentes organismos, ou ainda a utilização biotecnológica das moléculas isoladas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, purificar e caracterizar quimicamente polissacarídeos da biomassa do fitopatógeno *Botryosphaeria rhodina*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos, de acordo com suas solubilidades em água fria, água quente e solução aquosa de hidróxido de potássio, em tempos variáveis e repetidas vezes.
- Purificar os polissacarídeos obtidos nas extrações aquosa e alcalina utilizando tratamentos de gelo/degelo e cromatografia de filtração em gel.
- Determinar os constituintes monossacarídicos por cromatografia líquida de troca iônica, após hidrólise ácida total dos polissacarídeos.
- Determinar a configuração da ligação glicosídica por ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN-¹³C) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).
- Determinar a posição da ligação glicosídica dos polissacarídeos analisando, por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, os acetatos de alditóis parcialmente metilados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

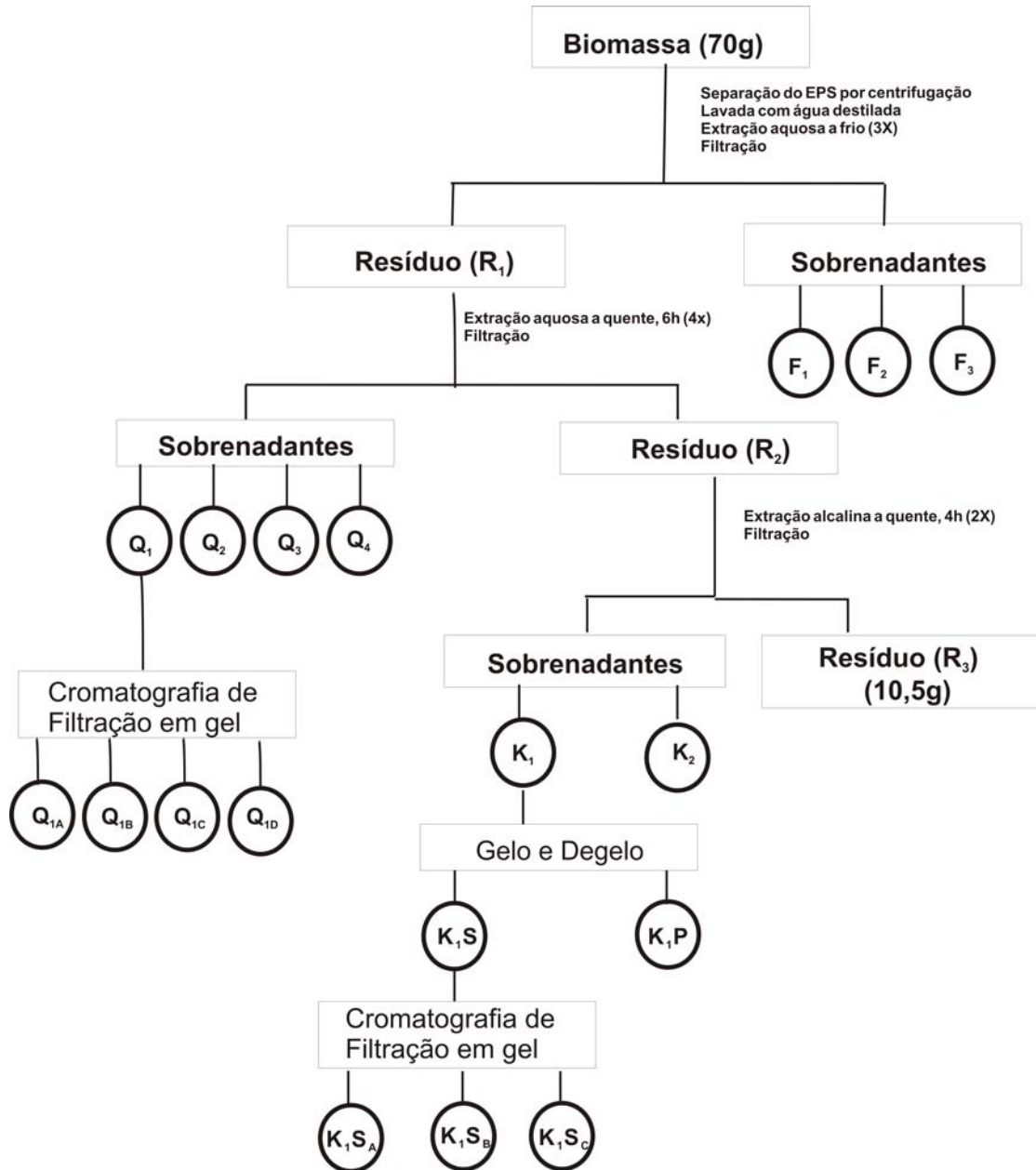


Figura 1 – Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos da biomassa do *B. rhodina*

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismo

O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 do de cancro de eucalipto por Barbosa, Dekker e Hardy (1996).

4.1.2 Reagentes

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

4.1.3 Equipamentos

As pesagens, em geral foram realizadas em Balanças Analíticas Mettler Toledo AB204, Micronal e em balanças semi-analítica Gehaka BG-440; Gehaka BG-2000.

Os meios de cultivo e outros materias foram esterilizados em autoclave vertical Fabbre, modelo 103, a 121 °C por 20 minutos.

As inoculações dos microrganismos e toda a manipulação de material estéril foram feitas em câmara de fluxo laminar Veco, modelo VLFS-09.

Os cultivos em meio sólido foram incubados em estufa incubadora Nova Ética 411D, e os cultivos líquidos foram mantidos em incubadora orbital Cientec CT-712.

As centrifugações foram feitas em centrífuga refrigerada Boeco U-32R na fase de cultivo para produção da biomassa.

As evaporações foram realizadas em evaporador rotativo Buchi, modelo R-114, com auxílio do banho-maria Buchi, modelo B-480.

As centrifugações realizadas para o fracionamento de polissacarídeos dos extratos da biomassa foram realizadas na centrífuga Damon, modelo HT e na microcentrífuga Beckman.

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

As hidrólises dos polissacarídeos foram realizadas em bloco de aquecimento modelo Digi Block, Laboratory Devices INC.

As análises de monossacarídeos foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Troca Iônica (HPAEC) com detector Eletroquímico Modelo ED 40, Bomba Gradiente Modelo GP 40 e Integrador modelo 4600, marca Dionex.

As purificações dos polissacarídeos foram realizadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna de vidro preenchida de gel sepharose CL-4B, com auxílio da bomba peristáltica Pump P-1, Amersham Pharmacia Biotech.

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

As filtrações dos extratos foram realizadas por um sistema constituído por um funil de Buchner, filtro de nylon e um kitasato conectado a bomba de vácuo Dia Pump, da Fanem.

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

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

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

4.2 MÉTODOS GERAIS

4.2.1 Manutenção do Microrganismo

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

4.2.2 Preparo do Inoculo

Para o preparo do inóculo, o fungo foi transferido para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) glucose 1% (p/v) e ágar 2% (p/v). As placas foram incubadas durante 5 dias a $28\pm 2^\circ\text{C}$. Após este período de desenvolvimento, foram transferidas pequenas porções de hifas do fungo da superfície das placas para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, modificados com quatro inserções na parede, contendo meio mínimo de Vogel e glucose 0,5% (p/v).

O pré-inóculo foi mantido sob agitação constante durante 48 horas a $28\pm 2^\circ\text{C}$ e 180 rpm. Em seguida os micélios foram transferidos, assepticamente para um homogeneizador, previamente autoclavado, onde foram homogeneizados por 30 segundos a velocidade máxima. O homogeinato foi centrifugado durante 10 minutos a $1790\times g$, os sobrenadantes resultantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em uma solução de salina fisiológica estéril. A suspensão micelial foi diluída em solução de salina fisiológica estéril, até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 2L contendo 400 mL de meio de Vogel (STELUTI et al., 2004) e glucose na concentração de 5% (p/v). Em cada frasco foi inoculado 16 mL do homogeinato de micélios. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante durante 72 horas a $28\pm 2^\circ\text{C}$ e 180 rpm.

4.2.3 Isolamento da Biomassa

Os cultivos foram interrompidos através de centrifugação ($9056\times g$ por 30 minutos) obtendo-se o sobrenadante contendo exopolissacarídeos e o precipitado contendo a biomassa que foi lavada exaustivamente, com água destilada, para total remoção do exopolissacarídeos. Este procedimento foi repetido até que a água de lavagem não apresentasse nenhum açúcar, determinado pelo método de fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Quantificação de Proteínas nos Extratos

O método de Bradford foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas em todas as etapas da purificação (BRADFORD, 1976). Este método baseia-se na ligação do corante (Coomassie Blue G-250) com as moléculas de 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 (COMPTON; JONES, 1985). Utilizou-se o protocolo original do método, com algumas modificações, conforme descrito a seguir:

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

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

Procedimento: adicionou-se 1 mL da solução de uso, contendo o corante, à 100 µL da amostra, e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm, num período de 2 a 20 minutos após o início da reação.

A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de calibração com albumina bovina (BSA), na faixa de concentração de 5 a 50 µg.

4.3.2 Quantificação de Açúcares Totais

O método do fenol-ácido sulfúrico ou de Dubois e colaboradores (1956) foi utilizado para a determinação da concentração e detecção de carboidrato total durante as etapas de extração e purificação dos polissacarídeos, bem como durante a caracterização estrutural. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela.

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

Procedimento: 0,5 mL da solução de Fenol foi adicionada a 0,5 mL da amostra, e, em um único jato, 2,5mL de H₂SO₄ concentrado. Após 20 minutos foi feita a leitura espectrofotométrica a 490 nm.

Para calcular a concentração de carboidratos foi feita uma curva padrão de glucose (0,01 g %) na faixa de concentração de 10 a 50 µg.

4.3.3 Quantificação de Açúcares Redutores

No método de Somogyi-Nelson os açúcares redutores reduzem o reativo cupro-alcálico de Somogyi formando óxido-cuproso. Este na presença do reativo arseno-molibdico de Nelson forma um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável (NELSON, 1944).

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

Procedimento: a 0,5 mL da solução contendo de 10 a 80 µg de açúcares redutores foi acrescentado 0,5 mL do reativo de Somogyi e deixado em banho-maria fervente por 10 minutos, cobrindo os tubos com pérolas de vidro, evitando a evaporação do solvente. Após resfriamento foram adicionados 0,5 mL do reativo de Nelson e, em seguida, acrescentados 3,5 mL de água destilada, agitada e lido em espectrofotômetro a 540 nm.

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras utilizou-se uma curva padrão de glucose 0,1 g%, na faixa de 10 a 80 µg, em concentrações variáveis de acordo com a estimativa do teor de carboidrato da amostra.

4.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.4.1 Extração Aquosa a Fria

Aproximadamente, 70 g de biomassa liofilizada e macerada, livre de EPS, foram extraídos com quatro litros de água destilada, a 4°C, sob agitação em agitadores

magnéticos por um período de 12 horas. Após filtração por tecido de nylon, o resíduo (R_1) foi submetido a mais dois procedimentos idênticos de extração. Os extratos aquosos a frio (F_1 , F_2 e F_3) tiveram seus volumes reduzidos por evaporação à baixa pressão. Em seguida foi realizada a precipitação das macromoléculas com aproximadamente 3 volumes de etanol P.A. Os precipitados etanólicos foram separados por centrifugação ($8000\times g$, 15 min.), ressolubilizados em água e submetidos à diálise exaustiva para eliminar impurezas e então foram liofilizados. Após pesagem de F_1 , F_2 e F_3 foram retiradas alíquotas para hidrólise ácida total e para quantificação de açúcares totais, redutores e proteínas.

4.4.2 Extração Aquosa a Quente

O resíduo final da extração aquosa a frio (R_1) foi tratado com água destilada (3L) a 100°C , durante 6 horas. Após esse período, foi filtrado por tecido de nylon, ainda quente, e o resíduo resultante foi submetido ao mesmo procedimento extrativo, por mais três vezes.

Os extratos aquosos a quente (Q_1 , Q_2 , Q_3 e Q_4) foram concentrados, precipitados com álcool etílico P.A., dialisados exaustivamente e liofilizados e pesados. Após a pesagem, foram retiradas alíquotas para hidrólise ácida total e para quantificação de açúcares totais, redutores e proteínas.

4.4.3 Extração Alcalina com KOH 2% a Quente

O resíduo da extração aquosa a quente (R_2) foi tratado com solução aquosa de KOH a 2% (2L), a 100°C , por aproximadamente 2 horas. Após esse período, foi filtrado por tecido de nylon, ainda quente, e o resíduo resultante foi submetido ao mesmo procedimento extrativo, por mais uma vez. Em seguida o extrato alcalino (K_1 e K_2), resultante da filtração, foi neutralizado com ácido acético glacial, sob banho de gelo. No processo de redução de volume no evaporador rotativo, foi necessária a adição de um tensoativo (octanol) para evitar o refluxo causado pela intensa formação de espuma. Após a redução de volume

dos extratos foi realizada a precipitação com etanol P.A., seguido de diálise exautiva e a liofilização dos extratos. Foram realizadas as pesagens dos materiais liofilizados e então retiradas as alíquotas para hidrólise ácida total e para quantificação de açúcares totais, redutores e proteínas. O resíduo (R₃) final foi seco em estufa e então pesado (10,5g).

4.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.5.1 Separação dos Polissacarídeos Solúveis e Insolúveis, do Precipitado Etanólico da Extração Alcalina, por Congelamento e Degelo

O precipitado etanólico da extração alcalina selecionado para estudo, denominado K₁, foi purificado por tratamentos repetidos de gelo e degelo (BARON; GORIN, IACOMINI, 1989). A fração K₁ foi solubilizada em água destilada, a seguir congelada (overnight) e então descongelada a temperatura ambiente. Este procedimento gerou um resíduo insolúvel que foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000×g, 30 minutos, 10°C). Este processo de purificação foi repetido diversas vezes, até que o sobrenadante aquoso não formasse mais resíduo por congelamento e degelo, e o resíduo aquoso após tentativa de solubilização em água, não apresentasse mais polissacarídeos solúveis em água fria, detectados pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Após essas etapas, os sobrenadantes foram reunidos, bem como os precipitados e, individualmente, liofilizados. Deste procedimento de purificação foram obtidas as frações precipitado e sobrenadante do congelamento e degelo, denominadas, respectivamente, K₁P e K₁S.

4.5.2 Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sepharose CL-4B

As frações Q₁ e K₁S, solúveis em água, foram cromatografadas em gel de agarose.

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).

Condição da coluna: A coluna de vidro utilizada (2,5 x 50 cm) apresentou volume de 225,7 mL. O eluente utilizado foi a água destilada com fluxo de 1,2 mL/min e o volume das frações coletadas foi de 5mL.

Procedimento: 10mg do material liofilizado foram solubilizados em um volume de 2 mL de H₂O (0,5%) sob agitação, durante 15 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 10000 rpm, durante 5 minutos, e o sobrenadante aplicado na coluna de gel sepharose CL-4B. Antes de iniciar a aplicação da amostra em cada coluna foi aplicado 1mL de uma solução de 1mg/mL de Blue Dextran, uma dextrana com elevada massa molecular, utilizada não para determinar o volume morte, mas sim como um parâmetro par verificar o empacotamento da coluna. Alíquotas de cada uma das frações foram analisadas para açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

Após determinar o perfil de eluição, as frações referentes aos picos distintos foram reunidas, reduzidas à baixa pressão e liofilizadas (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996).

4.5.3 Análise da Composição em Monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC)

4.5.3.1 Análise dos açúcares neutros

Preparo da Amostra: uma amostra de cada etapa da purificação, contendo 50µg de açúcares totais foi liofilizada em pequenos tubos eppendorf.

Hidrólise: a hidrólise ácida foi feita pela adição de 300 µl de TFA 5M à amostra seca, o tubo foi selado e aquecido a 100°C por 16 horas (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996, CORRADI da SILVA et al., 2005). O ácido foi removido por evaporação utilizando-se uma centrífuga a vácuo (Heto – DNA Plus), seguido por três ciclos de adição de 200 µl de H₂O e evaporação.

Padrões: para fins comparativos, utilizou-se uma mistura contendo 20 µg/ml de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-fucose, L-ramnose, D-galactose e D-glucose, D-manose.

Análise por HPAEC (cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons): os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de troca iônica de alta pressão, consistindo de um sistema Dionex DX 500 e um Detector de Amperometria Integrada (IAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente (NaOH 14 mM) usando-se uma coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm) equipada com uma guarda coluna PA1 a velocidade de fluxo de 1,0 ml/min. As condições de eluição foram produzidas usando H₂O deionizada (eluyente 1) e NaOH 200 mM (eluyente 2), preparada a partir de solução de NaOH 50%. A coluna foi regenerada após 25 min de corrida com 100% do eluyente 2, por 10 min, seguida pelo retorno a H₂O deionizada, precedida por um período de 15 minutos nas mesmas condições da corrida (para equilibrar a coluna) antes da injeção da amostra.

4.5.3.2 Análise dos açúcares aaminados

O tratamento dado aos açúcares aaminados diferiu dos neutros nas condições de hidrólise ácida e da corrida cromatográfica. As modificações estão descritas a seguir.

Hidrólise: foi feita pela adição de 300 µl de TFA 2M à amostra seca. O tubo foi selado e aquecido a 121°C por 1 hora (MANZI; VARKI, 1993).

Padrão: para fins comparativos utilizou-se uma mistura contendo 20 µg/ml dos açúcares L-fucose, D-galactosamina, D-glucosamina, D-manose, D-galactose e D-glucose.

Análise dos Açúcares Aaminados por HPAEC: os açúcares aaminados foram separados isocraticamente (NaOH 20 mM), usando uma CarboPac PA 1 (4x250 mm) equipada com uma guarda coluna Aminotrap na velocidade de fluxo de 1 mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando NaOH 200 mM e H₂O deionizada. A coluna foi regenerada após 25 min, com 100% de NaOH 200 mM, por 10 min, seguida do retorno da coluna nas condições da análise.

4.5.4 Análise das Ligações Glicosídicas dos Polissacarídeos Purificados

4.5.4.1 Metilação pelo método de Ciucanu e Kerek

Amostras de 5 a 10 mg dos polissacarídeos (Q₁A, Q₁C, K₁P e K₁S_A) foram, individualmente, solubilizadas em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, adicionados 40mg de hidróxido de sódio anidro (micropérolas), permanecendo em agitação por 15 minutos. Após esse tempo, acrescentou-se 0,2 mL de iodeto de metila seguido de agitação por mais 30 minutos (CIUCANU; KEREK, 1984).

A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de água destilada gelada e o material metilado foi extraído com clorofórmio, ocorrendo a formação de duas fases, aquosa e clorofórmica. A fase aquosa foi desprezada e a porção clorofórmica, contendo o polissacarídeo metilado, foi lavada 3 vezes com água destilada gelada. A água residual da fase clorofórmica foi retirada pela adição de sulfato de sódio anidro, filtrada em algodão e o material metilado foi levada à secura em evaporador rotativo.

Esse procedimento de metilação foi repetido mais 4 vezes, a fim de garantir polissacarídeos totalmente metilados.

4.5.4.2 Hidrólise e redução

Os polissacarídeos completamente metilados foram submetidos à hidrólise, acrescentando 0,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 50% (v/v), em banho de gelo, até total dissolução do material, seguido da adição de 4 mL de água destilada de maneira que a concentração final da solução ficasse próxima de 5,5 %. Esta solução foi mantida em estufa a 100°C por 18 horas (SAEMAN et al., 1954). O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário e o filtrado, límpido, foi deionizado por meio de resina catiônica IRA-120 Amberlit (forma H⁺). Após filtração, a solução resultante foi evaporada a um pequeno volume e tratada com boroidreto de sódio, durante 15 horas, à temperatura ambiente (BLAKENEY et al., 1983). Decorrido o período de redução, os íons sódio foram eliminados da preparação

pelo tratamento com a resina IRA-120 Amberlit (forma H^+) e o ácido bórico formado foi removido, na forma de borato de trimetila, por co-destilação com metanol.

4.5.4.3 Acetilação

A reação para formação dos acetatos a partir dos alditóis parcialmente metilados foi efetuada pela adição de 1,2 mL de anidrido acético e 1,2 mL de piridina (1:1, v/v) permanecendo a temperatura ambiente por 16 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963). A reação foi interrompida pela adição de gelo moído, e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual da fração clorofórmica foi extraída por sucessivas lavagens com solução aquosa de sulfato de cobre a 5% (p/v). À fração clorofórmica, isenta de piridina, foi adicionado sulfato de sódio anidro e em seguida submetida à filtração. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram evaporados à secura e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS).

4.5.4.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Após derivatização do material na forma de acetatos de alditóis ou acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados, foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso VARIAN (Saturn 2000), tendo hélio como gás de arraste, acoplado em série a um “ion trap” com varredura de massa entre 20 e 650 m/z e energia de geração de elétrons de 70 eV (elétron volts).

A coluna usada para as análises foi OV-225, de sílica fundida com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As amostras foram diluídas em acetona e 1 μ L foi o volume de injeção. A temperatura inicial de corrida foi de 50°C com uma rampa de 40°C.min⁻¹ até 220°C, permanecendo constante até o final da análise.

4.5.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Essa análise foi efetuada para confirmar a configuração anomérica das ligações glicosídicas dos polissacarídeos Q₁A, Q₁C, K₁P e K₁S_A. Os espectros foram obtidos através de um espectrômetro BRUKER modelo Vector 22, acoplado ao transformador Fourier. Os polissacarídeos (1,0 mg), em 250 mg de KBr, foram examinados na forma microparticulada utilizando o acessório de ATR (reflexão total acumulada). As análises foram conduzidas na região de comprimento de onda (λ) de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 1 cm⁻¹ (MOHAČEK-GROŠEV; BOŽAC; PUPPELS, 2001; LIM et al., 2005).

4.5.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN - ¹³C dos polissacarídeos em estudo, Q₁A, Q₁C, K₁P e K₁S_A, foram utilizados para identificar a configuração anomérica das ligações glicosídicas. Para tal análise os espectros do material em estudo foram comparados aos espectros de padrões, normalmente encontrados na literatura de espectroscopia de ressonância nuclear (GORIN, 1981). Os espectros foram obtidos em aparelho Bruker DRX-400 incorporado ao transformador Fourier. Os polissacarídeos em estudo (15 a 25 mg) foram examinados 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 ¹H (90,56 MHz em relação ao núcleo de ¹³C). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, relativos à ressonância do Me₄Si ($\delta=0$) determinada em experimento separado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA CELULAR

A parede celular determina a forma da célula fúngica e é essencial para a sua integridade (KOLLÁR et al., 1995). Caracteriza-se como um sistema dinâmico cuja função é proteger o microrganismo das adversidades do ambiente e, portanto, a sua composição e estrutura se modificam em resposta às mudanças no meio (KLIS et al., 2002). A parede celular é formada principalmente de carboidratos, alguns livres, geralmente como macromoléculas, e outros ligados à proteína. Os principais componentes são glucanas β -(1 \rightarrow 3) que podem ter ou não ramificações do tipo β -(1 \rightarrow 6). Glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 6) também são encontradas como constituintes menores das paredes celulares (KOLLÁR et al., 1995). Essas moléculas formam complexos compactos com quitinas, proteínas e glicoproteínas. Portanto, para determinar a estrutura química de cada um desses constituintes é necessário extraí-los, adequadamente, por procedimentos químicos e/ou enzimáticos.

Magnelli e colaboradores (2005) obtiveram polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando enzimas, um método anteriormente empregado para determinar a composição da parede celular do patógeno *Candida albicans* (HERRERO et al., 2004), entretanto, não pôde se tornar um procedimento padrão devido às diferenças na composição da parede celular de espécies distintas. O emprego de enzimas para extração de polissacarídeos requer um conhecimento prévio da composição da parede celular devido à especificidade desses catalisadores por seus substratos, bem como ao seu elevado custo de aquisição.

Não há na literatura nenhum registro sobre a composição da biomassa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* que tem sido, na última década, alvo de intensa investigação como produtor de lacases (DEKKER; LING; BARBOSA, 2000; VASCONCELOS et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2001; DEKKER; BARBOSA, 2001) e de um exopolissacarídeo, denominado botriosferana (BARBOSA et al., 2003; STELUTI et al., 2004; CORRADI da SILVA et al., 2005; GIESE et al., 2005). Portanto, numa tentativa de preencher a lacuna existente, a proposta desse trabalho foi desenvolver estudos, aplicando métodos convencionais da química de carboidratos, cujos resultados possibilitem determinar, pelo menos em parte, a composição da biomassa do *Botryosphaeria rhodina*.

As extrações foram efetuadas com o objetivo de remover as macromoléculas de acordo com as suas características químicas de solubilidade, desde a utilização de condições suaves (aquosa a frio) até condições mais severas, como alcalina a quente.

Para obtenção da biomassa o microrganismo *Botryosphaeria rhodina* foi cultivado nas condições pré-estabelecidas para a produção de exopolissacarídeos (STELUTI et al., 2004) e a biomassa, separada por centrifugação, foi lavada com água destilada até que nenhum resíduo de açúcar fosse detectado na água de lavagem, indicando a remoção completa do EPS.

5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A extração aquosa a frio, com a biomassa fragmentada para possibilitar uma maior interação com o solvente extrativo, remove parte das proteínas e ou glicoproteínas frouxamente ligadas à parede celular; a extração aquosa a quente remove β -glucanas e parte das galactomananas (CORRADI da SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993) e a extração com álcali, a quente, destrói a parede celular expondo os constituintes da mesma tais como glicoproteínas, β glucanas e galactomananas e pode, ainda, saponificar a membrana plasmática e expor o conteúdo do interior da célula tais como α -glucanas, que são polissacarídeos de reserva energética dos organismos vivos. Portanto, a aplicação dos diferentes procedimentos separa, eficientemente, os polissacarídeos em grupos.

A metodologia utilizada para a separação dos polímeros da biomassa do *Botryosphaeria rhodina* (Figura 1 - página 37) foi adaptada do trabalho de extração, purificação e caracterização dos polissacarídeos de diferentes microrganismos (PENG et al., 2005; ZHANG et al., 2007). A condição de extração foi modificada quando o rendimento em açúcares totais, para aquela etapa, diminuía sensivelmente (F_1 156 mg e F_3 34 mg). Todos os extratos foram adicionados, individualmente, ao etanol numa proporção de 1:3, que teve como objetivo solubilizar componentes de pequena massa molecular e impurezas e separá-los dos polissacarídeos precipitados.

Os resultados da quantificação de açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) nos diferentes extratos (Tabela 1), mostraram que mais de 95% do material extraído corresponde a carboidratos; somente nas extrações aquosa a frio

(F₂ e F₃) e alcalina (K₁) o teor de proteínas foi superior a 5%, quando quantificadas pelo método de Bradford (1976). Os maiores rendimentos em açúcares totais foram encontrados nas primeiras extrações aquosa a quente (Q₁) e alcalina (K₁). A soma das massas encontradas para açúcares totais e proteínas compreendeu, praticamente, o peso total de cada fração extraída e liofilizada. A ausência de açúcares redutores nas frações, por quantificação pelo método de Somogyi (1952), indica que a diálise exaustiva separou, eficientemente, os polímeros das pequenas moléculas de carboidrato que poderiam ter sido extraídas nas condições utilizadas.

Os resultados encontrados mostram que os métodos extrativos adotados nesse trabalho foram eficientes, principalmente, para a remoção de polissacarídeos. Procedimentos semelhantes foram utilizados para obtenção de polissacarídeos de parede celular de líquens (CARBONERO et al., 2003), levedura (KRIŽKOVÁ et al., 2001) e fungos (PENG et al., 2005). Alguns desses procedimentos foram precedidos por tratamentos com solventes orgânicos que objetivavam a delipidificação bem como a obtenção de componentes de baixo peso molecular (CARBONERO et al., 2006). Rout e colaboradores (2006) extraíram uma fração rica em carboidratos (98%) do corpo de frutificação de *Pleurotus florida* por tratamento aquoso a quente (100°C, 6h). Esta condição quando utilizada no *Botryosphaeria rhodina* também rendeu o mesmo percentual de açúcares totais (99% a 97% de Q₁ a Q₄, respectivamente).

Tabela 1 – Peso das frações liofilizadas, quantificação de açúcares totais e proteínas dos diferentes extratos obtidos da biomassa de *B. rhodina*

Frações	Peso (mg)	Açúcar Total (mg)	Proteína (mg)	Açúcar Total (%)	Proteína (%)
F ₁	162,0	156,8	4,6	97	03
F ₂	83,5	77,6	5,6	93	07
F ₃	37,0	34,4	2,4	93	07
Q ₁	350,0	344,8	4,4	99	01
Q ₂	265,0	258,4	5,6	98	02
Q ₃	143,0	138,0	4,4	97	03
Q ₄	125,0	120,8	4,0	97	03
K ₁	1038,0	970,0	59,5	94	06
K ₂	396,0	388,0	7,2	98	02

F: Extrações aquosa a frio; Q: Extrações aquosa a quente; K: Extrações alcalinas com KOH.

Antes de iniciar a purificação dos extratos é conveniente conhecer as suas composições em monossacarídeos. Para isso a hidrólise ácida é geralmente adotada como primeiro procedimento químico (NELSON; COX, 2002). Embora a condição de hidrólise utilizada seja muito geral, a detecção do deoxiaçúcar fucose e do monossacarídeo manose (Tabela 2) pode sugerir a possível extração a frio de glicoproteínas, desde que as *N*-ligadas possuem um “core” de manose, bem como resíduos de fucose (RICE; CORRADI da SILVA, 1996); entretanto, glucosamina e galactosamina, também comuns em glicoproteínas, não puderam ser detectados nas condições de hidrólise para açúcares aminados, utilizadas neste trabalho.

Leung e colaboradores (2006) relataram que as quitinas, formadas por *N*-acetilglucosamina, fazem parte de fibras insolúveis encontradas na parede celular de fungos. A ausência de açúcar aminado nos extratos da biomassa do *Botryosphaeria rhodina*, poderia estar associada a um material insolúvel, separado por centrifugação, presente em todos os extratos aquosos a quente após serem mantidos em temperatura de geladeira, durante a noite. Embora este precipitado não tenha sido investigado, indicou a necessidade de mudanças no protocolo de purificação dos polissacarídeos extraídos com KOH a 2%, sugerindo a adição de um procedimento de gelo-degelo para separação de moléculas insolúveis das solúveis a frio.

A composição percentual dos açúcares (Tabela 2) fucose (4 a 1%), manose (19 a 2%) e galactose (72 a 19%) decresceu em condições mais severas de extração, enquanto a concentração de glucose foi crescente (5 a 78%). Esses resultados concordam com aqueles da literatura que descrevem a parede celular de leveduras como uma camada mais externa composta de polímeros de manose sobrepondo-se a uma mais interna formada, principalmente, por polímeros de glucose e extraídos em condições mais severas (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983; PENG et al., 2005).

De acordo com Kollár e colaboradores (1995) há evidências que diferentes polissacarídeos da parede celular de leveduras encontram-se covalentemente ligados, tais como β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas e manoproteínas. Em *Saccharomyces cerevisiae* a presença de ligações covalentes entre quitina e uma β glucana, extraídas com álcali, foi evidenciada nos experimentos conduzidos por Mol e Wessels (1987) que, após tratamento com quitinase, forneceu um polímero de glucose praticamente puro e solúvel em água. No extrato alcalino da parede celular do *Schizosaccharomyces pombe* foram encontradas três diferentes D-glucanas: α -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) e uma α -galactomanana. Esses resultados evidenciam que as etapas de purificação são necessárias para a separação confiável de diferentes polímeros, bem como para obtenção de moléculas com pequeno grau de polidispersividade.

Tabela 2 – Composição percentual dos açúcares neutros obtidos por hidrólise ácida dos extratos da biomassa do fitopatógeno *Botryosphaeria rhodina* por HPAEC/PAD

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

Condições de hidrólise: TFA 5 M, 16 h, 100 °C ; condições de análise: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos); Coluna: CarboPac PA1.

Conhecendo-se a composição monossacarídica dos diferentes extratos da biomassa do *Botryosphaeria rhodina* a etapa subsequente foi verificar o grau de pureza de cada um, antes de dar início aos estudos de caracterização química.

Considerando-se os três diferentes tipos de extração, bem como a repetição desses procedimentos, um número relativamente grande de extratos foi obtido (9 extratos), de modo que foram selecionados para este trabalho apenas as primeiras extrações aquosa a quente (Q₁) e alcalina a quente (K₁), por serem quantitativamente majoritários e com grande diferença percentual entre seus constituintes monossacarídicos.

5.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS CONTENDO POLISSACARÍDEOS

Extratos contendo mistura de polissacarídeos podem ser purificados por combinação de técnicas tais como precipitação etanólica, precipitações fracionadas, gelo-degelo, cromatografias de troca-iônica, filtração em gel e afinidade, entre outras.

Procedimentos químicos para separação de mananas e/ou galactomananas das glucanas são alcançados pela formação de complexos cúpricos insolúveis (solução de

Fehling) com polímeros contendo manose; separação de polissacarídeos acidícos dos neutros tem sido realizada pela precipitação dos primeiros com sais de amônio quaternário. Essas técnicas separam com bastante eficiência os diferentes grupos de moléculas, entretanto, necessitam de várias etapas adicionais para desfazer os complexos, neutralizar as soluções, deionizar o material pelo uso de resinas além de diálises exaustivas. Essas inúmeras etapas levam a rendimentos muito baixos, ainda que cuidados sejam tomados.

As separações por métodos cromatográficos como filtração em gel, troca iônica e afinidade, envolvem um número menor de etapas, porém, como desvantagem, a quantidade inicial de material a ser purificado não pode exceder a capacidade de carregamento da fase estacionária, ainda que a separação proceda em condições semi-preparativas. O perfil da corrida cromatográfica retrata a pureza do polissacarídeo e, a simetria no pico de eluição pode ser um sinal do grau de homogeneidade do material (DANISHEFSKY; WHISTLER; BETTELHEIM, 1970; BOYER, 1993).

A cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B foi selecionada como primeiro procedimento de purificação, sendo a cromatografia de troca-iônica preferida devido ao baixo percentual de proteína e/ou glicoproteína (Tabela 1), principalmente no extrato Q₁, indicando a ausência de moléculas carregadas.

5.3.1 Extrato Q₁

Na cromatografia de filtração em gel a ordem de eluição é diretamente proporcional ao tamanho das moléculas (BOYER, 1993). Portanto, de acordo com as condições da análise cromatográfica de Q₁ (Figura 2) eluíram 04 picos em ordem decrescente de massas moleculares denominados de Q_{1A}, Q_{1B}, Q_{1C} e Q_{1D}, após o Blue Dextran, indicando que o gel utilizado possui tamanho de poros para uma separação confiável e eficiente. A simetria dos 1º e 3º picos (Q_{1A} e Q_{1C}) sugere que estes componentes possam estar homogêneos e, segundo Boyer (1993), a homogeneidade é um forte indicativo de um material puro.

A caracterização química dos polímeros é um processo laborioso desde que 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 e heteropolímeros que possuem blocos construtores com disposições variadas. Portanto, a estrutura química é

determinada após um conjunto de técnicas que, juntas, fornecem a composição monossacarídica, configuração e posição das ligações glicosídicas, sequência dos monossacarídeos na molécula, etc.

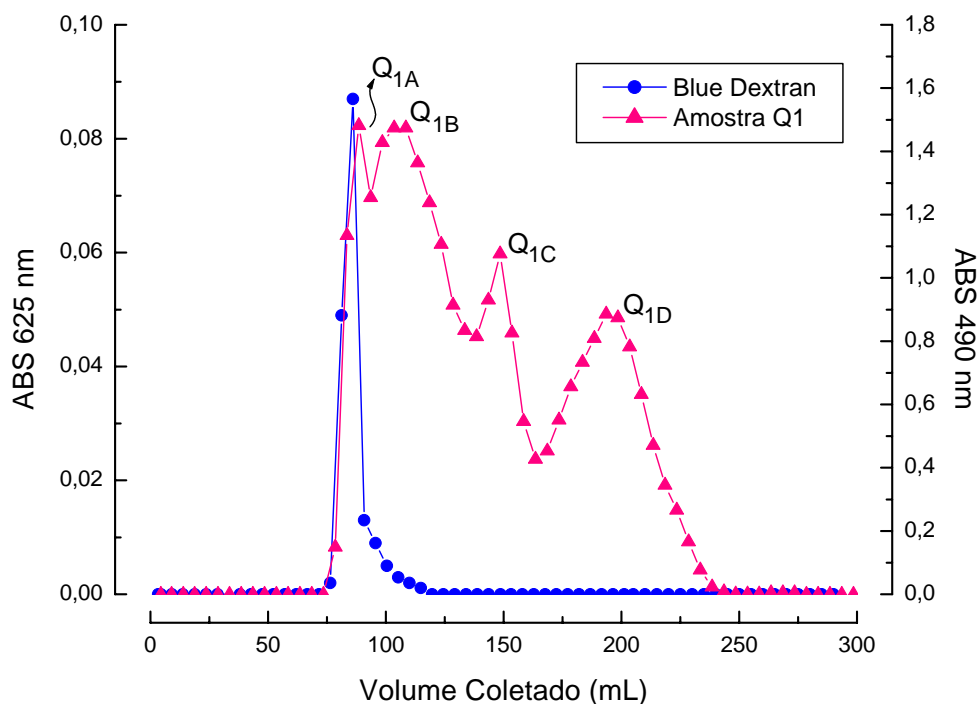


Figura 2 – Cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL -4B da primeira extração aquosa a quente (Q_1) da biomassa do *B. rhodina*. Total de material aplicado: 10 mg; fluxo: 1,2mL/min.; eluente: água; fração: 5 mL; volume da coluna: 226 mL.

O primeiro método para determinar a estrutura de um polissacarídeo é a análise da composição monossacarídica. Esta técnica envolve a quebra de todas as ligações glicosídicas, fracionamento dos monossacarídeos resultantes e detecção e quantificação de cada açúcar (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003; PÉREZ; RIBAS, 2004). Entre os vários sistemas utilizados para esse fim, a cromatografia líquida de troca iônica em alta pressão, com detecção por amperometria integrada (HPAEC-PAD), foi desenvolvida para substituir os métodos tradicionais, desde que ela não requer a derivatização dos monossacarídeos presentes no hidrolisado. Os resultados de hidrólise ácida e análise por HPAEC/PAD mostraram que os monossacarídeos constituintes de cada pico são os mesmos da fração original, porém, em diferentes proporções (Tabela 3).

O pico Q_{1A} que apresenta o maior tamanho molecular, de acordo com a ordem de eluição na cromatografia de filtração em gel, correspondeu à única sub-fração de Q_1

contendo glucose como componente majoritário de seu polímero, as demais sub-frações Q_{1B}, Q_{1C} e Q_{1D} apresentaram principalmente galactose, além de glucose e manose (Figura 3).

Tabela 3 – Composição percentual em monossacarídeos após hidrólise ácida da primeira extração a quente (Q₁) e suas sub-frações, obtidas por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B

Frações	Fucose (%)	Galactose (%)	Glucose (%)	Manose (%)
Q ₁	03	56	25	16
Q _{1A}	nd	15	74	11
Q _{1B}	nd	66	14	20
Q _{1C}	01	83	04	12
Q _{1D}	01	67	24	08

Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 h, 100 °C; condições da análise cromatográfica: NaOH 14mM, 25 minutos; coluna: CarboPac PA1.
nd: não detectado.

Para dar continuidade aos experimentos que auxiliam na caracterização das moléculas os métodos físico-químicos são os primeiros e dentre eles estão as análises espectroscópicas, em parte, porque, geralmente, não são degradativas e, portanto, o material utilizado pode ser reaproveitado em outros experimentos.

A espectroscopia de infravermelho, uma espectroscopia vibracional, detecta as transições entre os níveis de energia resultantes das vibrações das ligações interatômicas; as frequências vibracionais são específicas para cada grupo funcional da molécula e são sensíveis ao ambiente molecular, conformação e características das cadeias tornando-a um bom método para análises de biopolímeros (CAMPBELL; WHITE, 1989). Embora o espectro de 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 da molécula. A presença das bandas características de grupos permite a obtenção de informações estruturais úteis, através do exame do espectro e de consulta a tabelas. Esta técnica tem como vantagens a facilidade de execução, utilização de pequena quantidade de amostra, entre outras (BOULET; WILLIANS; DOCO, 2007).

Os espectros de infravermelho de carboidratos são complexos e usualmente restringem-se à identificação da configuração das ligações glicosídicas (α e/ou β), a presença de ácido urônico, através do sinal característico da carboxila e, até mesmo, a presença de

proteína. O espectro de FTIR da sub-fração Q_{1A} (Figura 4) apresentou sinais de absorção em 1558 cm⁻¹ e 920 cm⁻¹ correspondendo a polímeros de glucose e em 890 cm⁻¹ ao anômero β de glucopiranosose. De acordo com Peng e colaboradores (2003) esses sinais de absorção são característicos de β-D-glucanas.

Um sinal de menor intensidade, em 827 cm⁻¹, foi atribuído a um anômero α, que poderia estar relacionado a uma contaminação pela sub-fração eluída como Q_{1B}, desde que ela contém 20% de manose e α-mananas são constituintes da parede celular de leveduras e fungos (KRIŽKOVÁ et al., 2001).

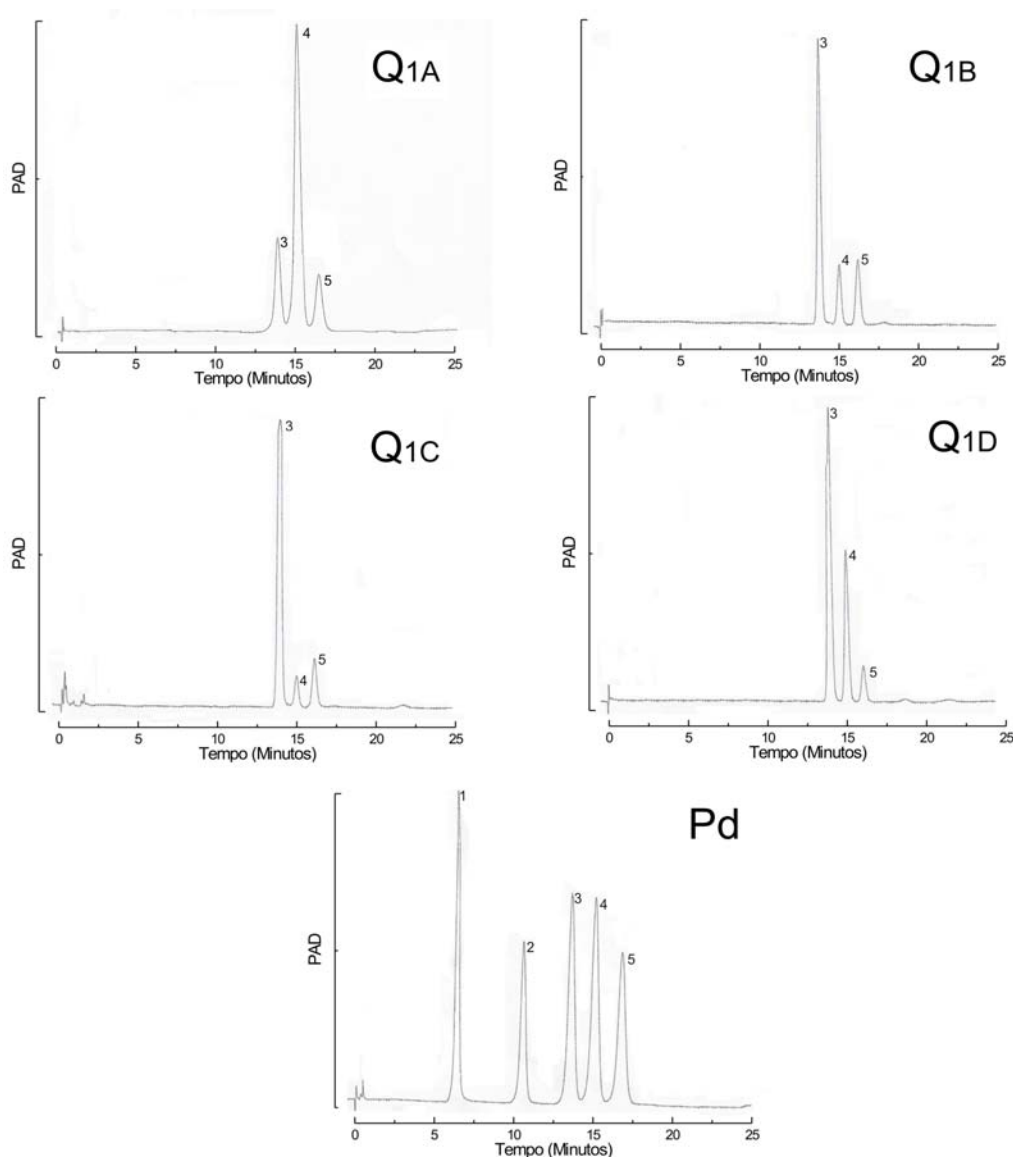


Figura 3 – Análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD das sub-frações provenientes da cromatografia de filtração em gel da primeira extração aquosa a quente (Q₁). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 horas, 100°C. Quantidade de material: 50 µg. Padrões (Pd): 1- fucose, 2- rhamnose, 3- galactose, 4- glucose e 5- manose.

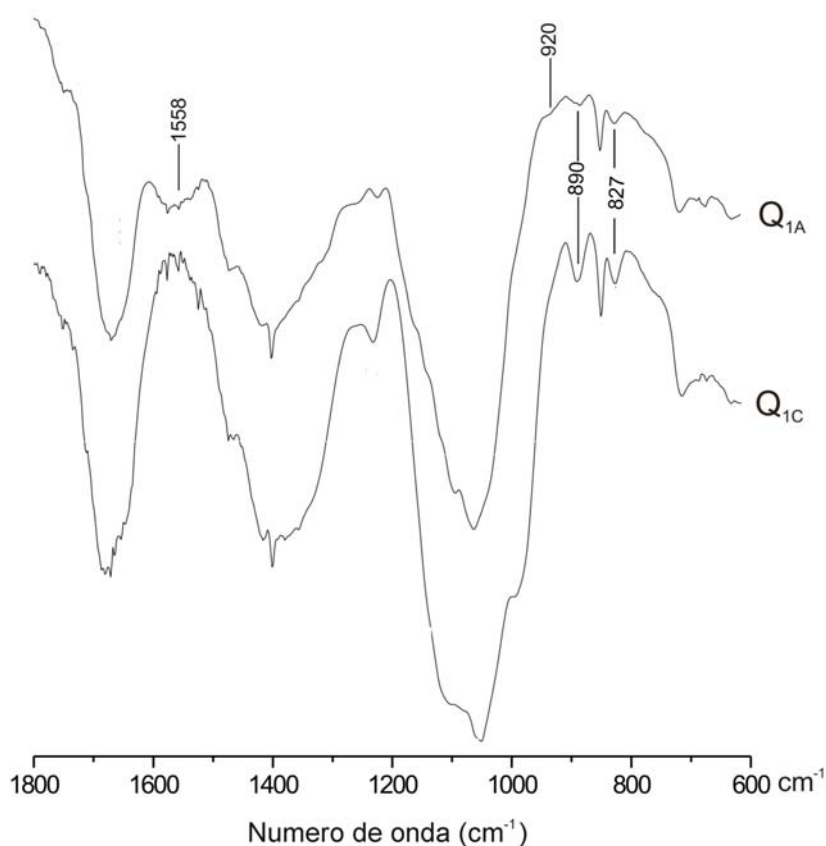


Figura 4 – Espectro de FT-IR das sub-frações Q_{1A} e Q_{1C} provenientes da primeira extração aquosa a quente (Q₁) do ascomiceto *B. rhodina*, após purificação por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B

O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN – ¹³C) da fração Q_{1A} (Figura 5) apresentou sinais de deslocamentos químicos consistentes com aqueles registrados na literatura (SUGAWARA et al., 2004; GONZAGA et al., 2005) para glucanas β-(1→6). A ausência de sinal na região de δ 60.0 ppm indica que todos os carbonos primários (C-6) estão envolvidos na ligação glicosídica, neste caso representados pelo sinal intenso em δ 69,01 ppm. Um único sinal na região de carbono anomérico caracteriza a molécula como um polímero linear e o δ em 102,96 ppm indica que as unidades glucopiranosídicas estão em configuração β. Os demais deslocamentos químicos em 75,89, 75,06, 73,22 e 69,93 ppm foram atribuídos aos carbonos C-3, C-5, C-2 e C-4, respectivamente. Sugawara e colaboradores (2004) isolaram da parede celular do *Schizosaccharomyces pombe* um polissacarídeo que foi caracterizado por ressonância magnética nuclear como uma β-(1→6)-D-glucana, levemente substituída em C-3 por resíduos glucopiranosídicos. Segundo os mesmos autores tal polímero já havia sido identificado na

parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, porém com maior grau de substituição em C-3. A ausência de sinal na região entre δ 84,0 e 80,0 ppm indica que β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana encontrada em Q_{1A} não é substituída em C-3, assim como a glucana isolada do cogumelo *Armillariella tabescens* (KIHO, et al., 1992). Gonzaga e colaboradores (2005) isolaram e caracterizam alguns polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Agaricus blazei* Murrill, entre eles uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, não substituída, foi extraída a 10°C e a 100°C e separada dos demais polímeros por precipitação etanólica fracionada.

A metilação da sub-fração Q_{1A}, seguida da análise por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa de seus respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados mostrou apenas um derivado. A análise dos fragmentos primários e secundários (Tabela 4) desse componente o caracterizou como 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-glucitol (SASSAKI et al., 2005).

Os espectros de FTIR das sub-frações Q_{1B}, Q_{1C} e Q_{1D} foram muito semelhantes (espectros das sub-frações Q_{1B} e Q_{1D} não foram mostrados). Os resultados da hidrólise ácida (Tabela 3 e Figura 3) e da ressonância magnética nuclear de carbono 13 mostraram que as três frações continham um polissacarídeo comum, entretanto a fração Q_{1C} mostrou-se mais pura que as demais e, portanto foi selecionada para ser estruturalmente investigada.

O espectro de FT-IR da sub-fração Q_{1C} apresentou um sinal intenso de absorção em 890 cm⁻¹ (Figura 4) correspondente a um polímero com ligações do tipo β (PENG et al., 2003) e a ausência de sinais em 1558 e 920 cm⁻¹ indica que o principal constituinte dessa fração não é uma glucana. A metilação da sub-fração Q_{1C}, seguida da análise por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa de seus respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados, mostrou um cromatograma bastante complexo embora dois derivados principais foram identificados como resíduos galatocfuranosídicos 5-O- e 6-O-substituídas (Tabela 4).

A presença desses resíduos foi confirmada na análise de ressonância magnética nuclear de carbono treze em δ 107,90 e 107,11 ppm (Figura 5) correspondendo, respectivamente, ao C-1 das unidades 5-O-substituídas e 6-O-substituídas de β galactofuranose (PRIETO et al., 1997; CORDEIRO et al., 2005). Essas atribuições correspondem aos deslocamentos químicos encontrados em polissacarídeos constituídos por resíduos de galactose furanosídicas isoladas de bactérias (NAGAOKA et al., 1996), de líquens (CARBONERO et al., 2005b; CORDEIRO et al., 2005) e de fungos (LEAL et al., 1995; AHRAZEM et al., 1997, PRIETO et al., 1997; SASSAKI et al., 2002; AHRAZEM et al.,

2007). Os sinais entre δ 83,42 ppm a 81,36 ppm, muitos deles sobrepostos correspondem aos C-4 e C-2 de todas as unidades galactofuranosídicas (AHRAZEM et al., 2007). Os sinais em δ 77,01 ppm e δ 74,69 ppm foram atribuídos aos C-5 substituído e livre (SASSAKI et al., 2002) e δ 70,90 e 63,01 ppm aos C-6 substituído e livre, respectivamente (CORDEIRO et al., 2005).

A atribuição de sinais no espectro de ressonância magnética nuclear é um processo efetuado em comparação à composição monossacarídica do polissacarídeo hidrolisado. É importante realçar que as condições de hidrólise ácida realizada nesse trabalho provavelmente tenham degradado unidades galactofuranosídicas, que são mais ácido-lábeis que as piranosídicas e, como consequência, os percentuais de manose e glucose, nessa fração, foram superestimados. Essa proposição pode ser confirmada desde que os sinais de carbono anomérico no RMN- ^{13}C corresponderam apenas às unidades galactofuranosídicas. Não há sinal na região de carbono anomérico que possa ser atribuído à estrutura piranosídica (Figura 5), entretanto, de acordo com vários registros há um grande número de polissacarídeos contendo cadeias galactofuranosídicas com diferentes tipos de ligação “atachadas” a um núcleo constituído por resíduos α -D-manopiranosídicos-(1 \rightarrow 6) ligados.

Leal e colaboradores (1995) isolaram da parede celular do fungo *Neosartorya* uma β -galactofurana com uma cadeia principal constituída de unidades 1 \rightarrow 5 e 1 \rightarrow 6 substituídas na proporção de 2:1 também encontrada em fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Eupenicillium*. Sasaki e colaboradores (2002) isolaram um polímero do fitopatógeno *Guignardia citricarpa* constituído, principalmente, por unidades β -D-galactofuranosídicas 6-*O*-substituídas e menor proporção de unidades 5,6-di-*O*-substituídas e terminais não redutores de galf.

Galactofurananas com diferentes tipos de substituição têm sido encontradas em extratos alcalinos da parede celular de fungos (AHRAZEM et al., 2001; AHRAZEM et al., 2006; AHRAZEM et al., 2007) cuja presença é associada, entre outras funções, ao fenômeno de reconhecimento célula-célula e célula-hospedeiro.

A complexidade da fração Q_{1C} , visualizada no RMN- ^{13}C , demanda maior tempo de investigação para que todos os sinais de ressonância possam ser adequadamente atribuídos, embora seja possível deduzir que se trata de um polímero com uma cadeia principal formada, principalmente, por resíduos β -galactofuranosídicas 5-*O*-substituídos e uma menor proporção de resíduos 6-*O*-substituídos. As sub-frações, Q_{1B} e Q_{1D} do extrato aquoso e K_{1S_B} e K_{1S_C} , do extrato alcalino apresentaram espectros de ressonância semelhantes (dados não mostrados), mas para serem caracterizadas, necessitarão de várias etapas

adicionais de purificação, fragmentação e caracterização dos fragmentos, incompatível com o tempo de realização deste trabalho.

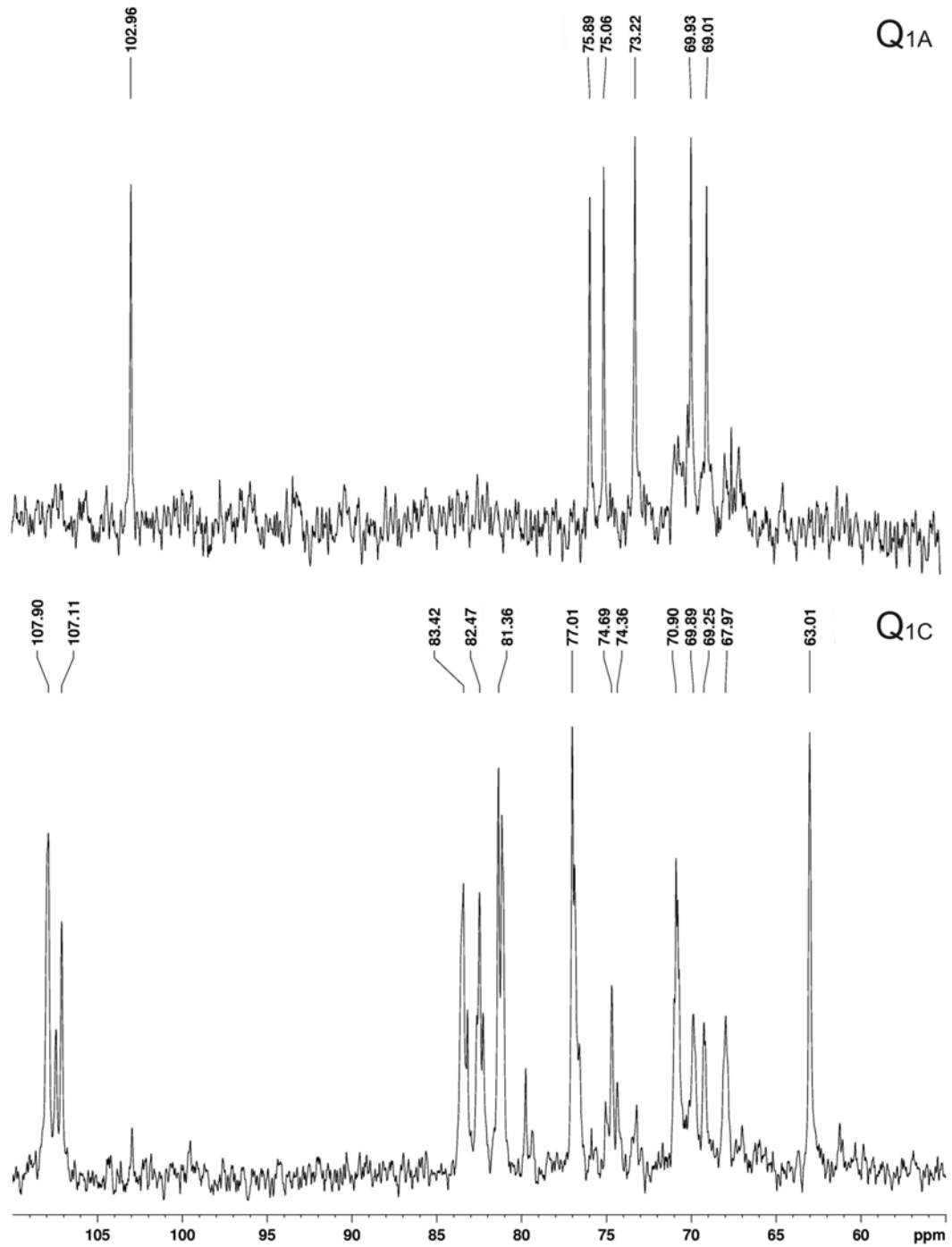


Figura 5 – Espectros de RMN - ^{13}C das frações provenientes do extrato a quente do *B. rhodina* (Q_{1A} e Q_{1C}) após purificação por cromatografia de filtração em gel.

Tabela 4 – Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na análise de metilação dos polissacarídeos encontrados nas subfrações Q_{1A}, Q_{1C}, K_{1P} e K_{1S_A}.

Sub frações	Acetatos de alditóis parcialmente metilados	T _R ^a	Principais Fragmentos	Composição relativa (%)	Tipo de ligações
Q _{1A}	2,3,4 - Me ₃ -glcp	2,20	87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233	100	→6)-glcp-(1→
Q _{1C}	2,3,6-Me ₃ -galf	2,22	87, 101, 113, 117, 131, 162, 173, 233	70	→5)-galf-(1→
	2,3,5-Me ₃ -galf	2,76	102, 117, 118, 130, 162, 173, 233	30	→6)-galf-(1→
K _{1P}	2,3,4,6-Me ₄ -glcp	1,00	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	20	glcp-(1→
	2,4,6-Me ₃ -glcp	1,82	87, 101, 117, 129, 161	62	→3)-glcp-(1→
	2,4-Me ₂ -glcp	4,20	87, 117, 129, 139, 159, 189, 201, 217	18	→3,6)-glcp-(1→
K _{1S_A}	2,3,4,6-Me ₄ -glcp	1,00	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	08	glcp-(1→
	2,3,6-Me ₃ -glcp	2,32	87, 99, 101, 113, 117, 233	87	→4)-glcp-(1→
	2,3-Me ₂ -glcp	4,50	101, 117, 261	05	→4,6)-glcp-(1→

^a Os tempos de retenção dos derivados acetatos de alditóis parcialmente metilados foram comparados ao 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucitol. Coluna OV 225.

5.3.2 Extrato K₁

A primeira extração alcalina denominada K₁, como dito anteriormente, foi selecionada para este trabalho porque apresentou melhor rendimento e composição percentual de açúcares diferente daquela encontrada na extração aquosa. O extrato alcalino (K₁), após neutralização e diálise exaustiva, foi concentrado a pequeno volume e precipitado em etanol absoluto numa proporção de 1:3. O precipitado etanólico, contendo os polissacarídeos, quando solubilizados em água formaram uma solução de coloração marrom escura, levemente turva, sugerindo a necessidade da separação desse material insolúvel, da parte solúvel.

O procedimento adotado para a separação foi submeter o material a tratamentos de gelo e degelo, até que nenhum precipitado fosse formado após o degelo. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para separação de polissacarídeos extraídos com álcali a quente, mas insolúveis em água. A aplicação deste protocolo tem separado eficientemente β-glucanas insolúveis de α-glucanas, galactoglucomanas e/ou galactomananas solúveis (CORRADI da SILVA et al., 1993; CARBONERO et al., 2002). A utilização desse tratamento rendeu uma sub-fração de K₁ solúvel (K_{1S}) contendo 75% dos açúcares da fração inicial e um precipitado, denominado K_{1P}.

O resultado da análise monossacarídica da fração K₁P mostrou principalmente glucose (Tabela 5). Os sinais no espectro de FTIR (Figura 8) em 1558 e 920 cm⁻¹ indicam a presença de uma glucana e aquele em 890 cm⁻¹ especifica uma β-glucana. O espectro de RMN-¹³C (Figura 9) foi semelhante àquele encontrado na literatura para glucanas β-(1→3) com ramificação em C-6. A possibilidade de unidades em configuração α foi descartada pela ausência de sinais na região de 100 ppm. O sinal em 102,98 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 β desloca o sinal de ressonância para campo mais alto (SCHMID et al., 2001; BARBOSA et al., 2003), pode-se inferir que o sinal δ 102,54 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 δ 84,80 e δ 84,58 ppm; o mais intenso em δ 84,80 ppm foi atribuído aos C-3 da cadeia principal e δ 84,58 ppm às unidades 3,6 di-*O*-substituídas. Os sinais em δ 69,97 e 60,99 ppm foram atribuídos aos C-6 substituído e livre, respectivamente. Os demais deslocamentos químicos em δ 75,93/75,06; 73,20 e 68,98/68,32 foram assinalados para os C-5, C-2 e C-4 dos resíduos glucopiranosídicos 3-*O* e/ou 3,6-di-*O*-substituídos. Toda a atribuição foi efetuada por comparação aos espectros de polissacarídeos semelhantes, encontrados na literatura (GORIN, 1981; GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983; ZHANG et al., 1995; GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996; CARBONERO et al., 2006; SMIDERLE et al., 2006).

A metilação da fração K₁P, seguida da análise por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa de seus respectivos acetatos de alditóis, parcialmente metilados, mostrou três derivados principais, identificados como 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6 tetra-*O*-metil-D-glucitol; 1,3,5-tri-*O*-acetil-2,4,6 tri-*O*-metil-D-glucitol e 1,3,5,6-tetra-*O*-acetil-2,4 di-*O*-metil-D-glucitol (Tabela 4). Esses resultados validam a análise de ressonância mostrando que o polissacarídeo em estudo é uma glucana com cadeia principal constituída por unidades glucopiranosídicas (1→3) com ramificação em C-6. O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* produz um exopolissacarídeo, denominado botriosferana, constituído por uma cadeia principal de resíduos glucosídicos β-(1→3) e substituídos em *O*-6 por unidades glucosídicas e/ou gentiobiosídicas.(BARBOSA et al., 2003).

Várias glucanas β-(1→3) e β-(1→3; 1→6) têm sido isoladas de diferentes fungos e estudadas por suas atuações como imunomoduladores e antitumorígenos (ZHANG et al., 2005; CHAKRABORTY et al., 2006; CARBONERO et al., 2006; DONG; JIA; FANG, 2006). Apesar desses efeitos positivos, tem sido constatado que a administração de soluções contendo β-glucanas pode provocar hepatoesplenomegalia, microembolismo e aumento das

toxinas endógenas devido, em parte, à solubilidade limitada dessas moléculas. Portanto, para amenizar essa resposta indesejada reações de derivatização dessas β -glucanas, como sulfatação e carboxilação, têm sido realizadas com o propósito principal de aumentar a solubilidade das soluções polissacarídicas. β -glucanas do tipo (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) podem ser solúveis ou insolúveis em sistemas aquosos e essa característica físico-química está relacionada com a proporção dessas ligações na molécula (LEE et al., 2001).

A fração solúvel do tratamento por gelo/degelo, denominada K₁S, foi hidrolisada e os resultados, mostrados na Tabela 5, indicaram a necessidade de purificação adicional. A cromatografia de filtração em gel foi selecionada como primeiro procedimento para purificação dessa fração solúvel e a análise foi realizada nas mesmas condições utilizadas para a purificação da fração Q₁.

Tabela 5 – Composição percentual dos açúcares neutros obtidos por hidrólise ácida das frações K₁P (insolúvel), K₁S (solúvel) e suas sub-frações analisados por HPAEC/PAD

Sub-frações	Galactose (%)	Glucose (%)	Manose (%)
K ₁ P	07	93	nd
K ₁ S	30	65	05
K ₁ S _A	08	92	nd
K ₁ S _B	50	42	08
K ₁ S _C	44	50	06

Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 h, 100 °C; condições da análise cromatográfica: NaOH 14mM, 25 minutos; coluna: CarboPac PA1.

Os resultados da análise cromatográfica de K₁S foram três picos, eluídos em ordem decrescente de massa molecular de acordo com o princípio da separação por filtração em gel (BOYER, 1993), denominadas de K₁S_A, K₁S_B e K₁S_C (Figura 8).

A sub-fração denominada K₁S_A, após hidrólise ácida apresentou principalmente glucose (92%), com pequeno percentual de galactose (9%) e ausência de manose. Considerando que as demais sub-frações K₁S_B e K₁S_C têm como principal constituinte monossacarídico a galactose, é provável que esse açúcar seja um contaminante da sub-fração K₁S_A (Figura 7).

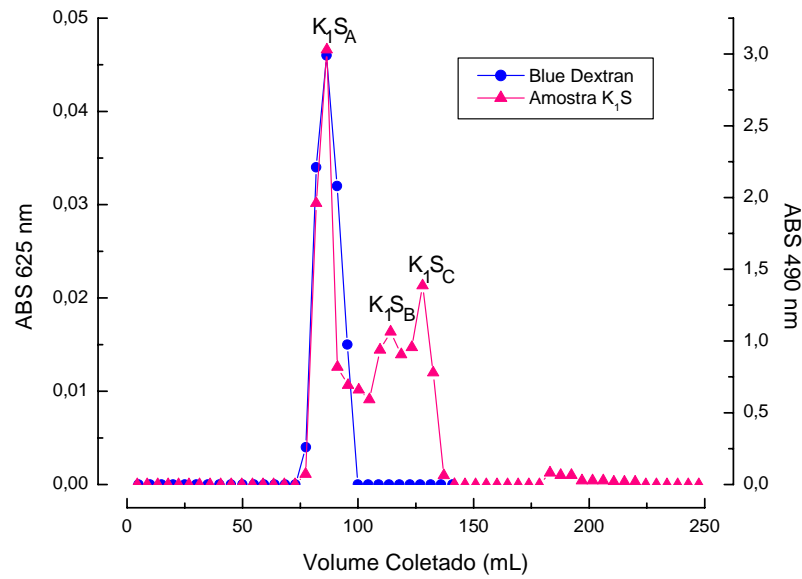


Figura 6 – Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL -4B do sobrenadante da primeira extração alcalina (K_1S) após o processo de gelo e degelo da biomassa do *B. rhodina*. Total de material aplicado: 10 mg; fluxo: 1,2mL/min.; eluente: água; fração: 5 mL; volume da coluna: 225,7 mL.

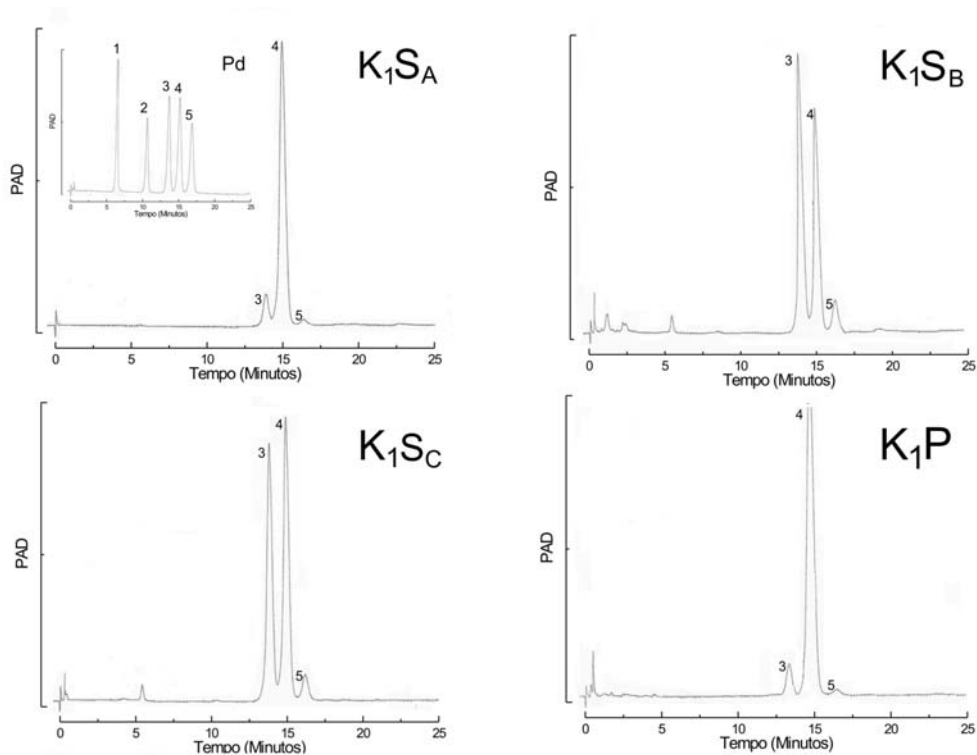


Figura 7 – Análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD das sub-frações provenientes da cromatografia de filtração em gel da primeira extração alcalina a quente (K_1). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 horas, 100°C. Quantidade de material: 50 µg. Padrões (Pd): 1- fucose, 2-rhamnose, 3- galactose, 4-glucose e 5-manose.

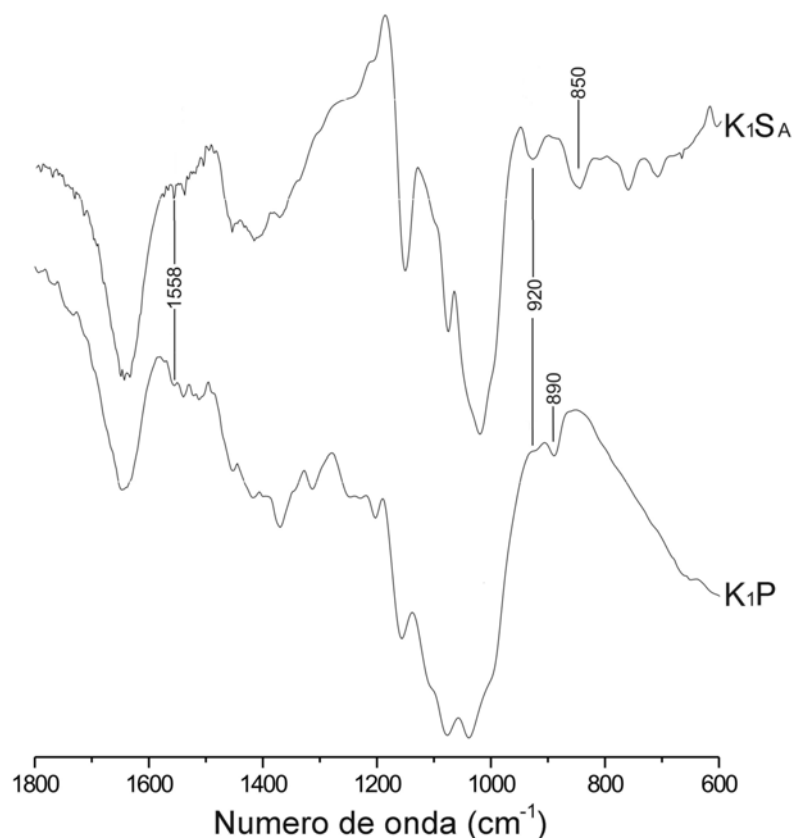


Figura 8 – Espectro de FT-IR das frações da extração alcalina do ascomiceto *B. rhodina* após o processo de gelo e degelo e purificação por cromatografia de filtração em gel (CL-4B)

A cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis metilados da fração K_{1S_A} mostrou três picos que foram identificados como 2,3,4,6-tetra-*O*-metil, 2,3,6-tri-*O*-metil e 2,3-di-*O*-metil derivados, de acordo com seus fragmentos de massa (Tabela 4). Esses resultados indicam um polissacarídeo com uma cadeia principal 1→4 com ramificações 1→6. O espectro de infravermelho (Figura 8) mostrou picos de absorção em 1558 e 920 cm^{-1} característicos de glucanas e um sinal intenso em 850,0 cm^{-1} , característico de α -D-glucanas (WANG et al., 2007). O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (Figura 9) mostrou seis sinais mais intensos relativos aos carbonos das unidades glicosídicas α -(1→4) em δ 100,39 ppm, atribuído ao carbono anomérico, e δ 78,26 ppm ao C-4 envolvido na ligação glicosídica; os demais valores de deslocamentos químicos 73,95, 72,32, 72,07 e 61,41 ppm foram assinalados para os C-3, C-2, C-5 e C-6, respectivamente (GONZAGA et al., 2005; CUI et al., 2007). Sinais menos intensos em δ 99,26 e δ 70,33 ppm foram assinalados para os C-1 das unidades 4,6-di-*O*-substituídas e aos C-6 substituídos, respectivamente. Esses

sinais menos intensos concordam com os dados de metilação, mostrando que o polímero é uma α -(1 \rightarrow 4)-D-glucana com pequeno grau de ramificação em C-6. Um polissacarídeo semelhante foi isolado do micélio de um fungo comestível, *Cordyceps sinensis* que após estudos de metilação, degradação de Smith, acetólise e RMN de carbono e prótons teve sua estrutura elucidada como uma α -D-glucana constituída por uma cadeia principal (1 \rightarrow 4), com poucos resíduos 6-*O*-substituídos, por unidades glucosídicas (YALIN; CUIRONG; YUANJIANG, 2006).

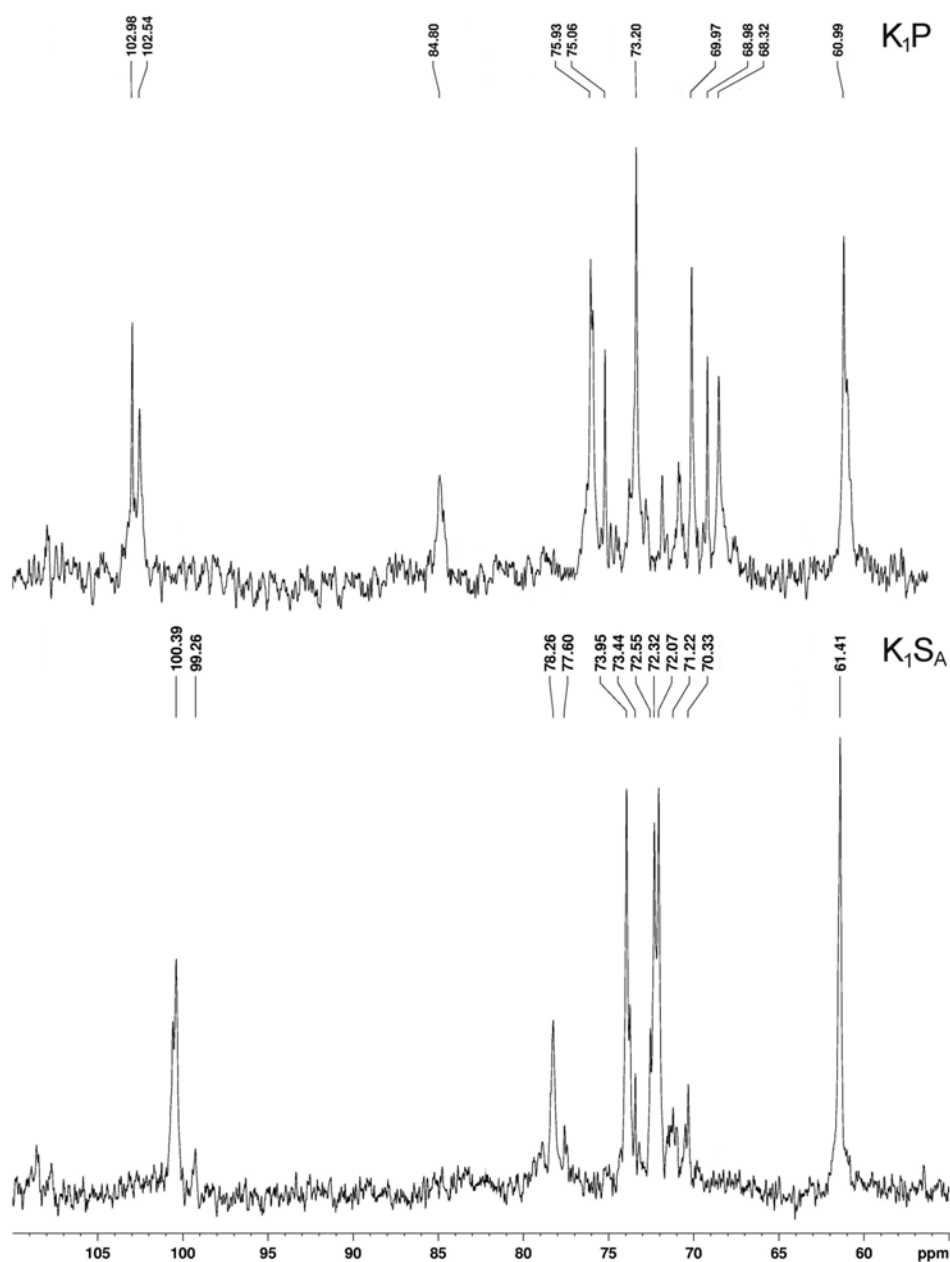


Figura 9 – Espectros de RMN de ¹³C das frações do extrato alcalino do micélio da *B. rhodina* após o processo de purificação de gelo-degelo e filtração por cromatografia de exclusão molecular (K₁S_A e K₁P).

Vários polissacarídeos e/ou complexos polissacarídeo-proteína têm sido isolados de fungos e estão sendo usados como fontes de agentes terapêuticos. Beta glucanas do tipo (1→3) e (1→6) e α -glucanas com ligações (1→4) são usadas como agentes antitumorais e imunomoduladores (YALIN; CUIRONG; YUANJIANG, 2006; PANG et al., 2007).

Os resultados de hidrólise ácida e RMN-¹³C das sub-frações K₁S_B e K₁S_C indicaram a necessidade de purificação adicional, antes da caracterização química. Portanto, essas sub-frações, assim como algumas obtidas no extrato aquoso a quente, serão posteriormente investigadas.

É importante salientar que todas as moléculas isoladas e caracterizadas neste trabalho, com exceção de K₁P, foram completamente solúveis em água. Essa propriedade confere à solução desses polissacarídeos facilidade na aplicação dos testes de atividade biológica (LEE et al., 2001).

Considerando que o *Botryosphaeria rhodina* é um fitopatógeno, o conhecimento da composição da biomassa micelial poderá fornecer dados auxiliares para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas e a grande quantidade de biomassa, proveniente da produção do botriosferana (EPS), poderá ser aproveitada como fonte de diferentes polímeros que poderão ser, futuramente, matéria prima para as indústrias de alimento, farmacêutica e cosmética.

6 CONCLUSÕES

Os métodos de extração, purificação e caracterização dos polissacarídeos da biomassa do fungo *Botryosphaeria rhodina* requereram uma laboriosa e cuidadosa execução dos protocolos estabelecidos.

1. Procedimentos extrativos distintos possibilitaram extrair os polissacarídeos de acordo com a sua solubilidade e pela localização na biomassa micelial.
2. O extrato aquoso a quente (Q_1) e o extrato alcalino (K_1) foram selecionadas por serem quantitativamente majoritárias e com grande diferença percentual entre seus constituintes monossacarídicos.
3. A sub-fração Q_{1A} por hidrólise ácida rendeu principalmente glucose. Os resultados da espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de carbono treze mostraram tratar-se de uma β -glucana. As atribuições dos sinais de deslocamentos químicos no RMN- ^{13}C bem como os resultados das análises de metilação permitiram concluir que a subfração Q_{1A} é uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana.
4. A sub-fração Q_{1C} , constituída principalmente de galactose, por análise de seus espectros de FTIR e RMN- ^{13}C e de seus derivados metilados mostrou ser uma β -galactofuranana 5-*O* e 6-*O*-substituída.
5. A sub-fração K_{1P} , constituída principalmente de glucose, teve sua estrutura determinada como sendo uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana, com ramificações em C-6.
6. A subfração K_{1SA} , constituída principalmente de glucose, foi caracterizada por análises de FTIR, RMN- ^{13}C e metilação como uma α -(1 \rightarrow 4)-D-glucana, com pequeno grau de ramificação em C-6.
7. As demais sub-frações Q_{1B} , Q_{1D} , K_{1SB} e K_{1SC} não foram caracterizadas por necessitarem de purificação adicional.

8. Com base nos resultados apresentados neste trabalho é possível concluir que a biomassa do *Botryosphaeria rhodina*, considerado um resíduo na produção de EPS constitui uma excelente fonte de diferentes polissacarídeos. As características químicas dos polissacarídeos como a composição em açúcares, tipo de ligação, anomericidade separam em grupos que apresentam propriedades diferenciadas permitindo o direcionamento da aplicação desses polissacarídeos nos diversos setores industriais e medicinais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2000. p. 235-269.

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANCOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 268–274, 2003.

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

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 246–252, 2006.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Fungal cell wall polysaccharides isolated from *Discula destructiva* spp. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1138-1143, 2007.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GOMEZ-MIRANDA, B.; DOMENECH, J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 67-72, 1997.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Fungal cell-wall galactomannans isolated from *Geotrichum* spp. and their teleomorphs, *Dipodascus* e *Galactomyces*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2347-2351, 2002.

ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; CONSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **Microbiology Letters**, v. 230, p. 47-52, 2004.

BAIS, D.; LAPASIN, R.; PARTAL, P.; GALLEGOS, C. Rheological characterization of polysaccharide – surfactant matrices for cosmetic O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 290, p. 546-556, 2005.

BAO, X.; FANG, J.; LI, X. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. **Biosciences of Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 2384-2391, 2001.

BAO, X.; WANG, X.; DONG, Q.; FANG, J.; LI, X. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 175–181, 2002a.

BAO, X.; ZHEN, Y.; RUAN, L.; FANG, J. Purification, characterization and modification of lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 623-629, 2002b.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI da SILVA, M. L. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, p. 29-42, 2004.

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

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

BARON, M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. **Agricultura and Biological Chemistry**, Tokyo, v.53, p. 1751-1738, 1989.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review Microbiology**, v. 22, p. 87–108, 1968.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 38, p. 565-598, 1998.

BEROVIČ, M.; HABIJANIČ, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODŽAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 103, p. 77-86, 2003.

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

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

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, p. 447-477, 2003.

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

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799–808, 2006.

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

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

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* effective bioemulsifier. **Applied and environmental Microbiology**, v. 54, p. 1420-1425, 1988.

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

CARBONERO, A. R.; CORDEIRO, L. M. C.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; STOCKER-WORGOTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannans with novel structures from the lichen *Roccella decipiens* Darb. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1699–1705, 2005b.

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**, v. 66, p. 929-934, 2005a.

CARBONERO, E. R.; MONTAIA, A. V.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp. significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 61, p. 681–686, 2002.

CARBONERO, E. R.; SMIDERLE, F. R.; GRACHER, A. H. P.; MELLINGER, C. G.; TORRI, G. T. AHTI, T.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 13-18, 2006.

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**, v. 53, p. 469–473, 2003.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2249–2254, 2004.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. A water-insoluble (1→3)- β -D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2990–2993, 2006.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 369-379, 2006.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; CHAVANT, L. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, 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**, v. 4, p. 403-409, 2004.

CIUCANU, J.; KEREK, F.A. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 13, p. 209-217, 1984.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p. 369-374, 1985.

CORDEIRO, L. M. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A fungus-type β -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 244, p. 193-19, 2005.

CORRADI da SILVA, M. L.; GORIN, P. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 715-717, 1993.

CORRADI da SILVA, M. L.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. B.; DEKKER, R. F. H. Purification and structural characterization of (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 10-17, 2005.

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

CUI, F. J.; TAO, W. Y.; XU, Z. H.; GUO, W. J.; XU, H. Y.; AO, Z. H.; JIN, J.; WEI, Y. Q. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 395-401, 2007.

DANISHEFSKY, I.; WHISTLER, R. L.; BETTELHEIM, F. A. In: **The Polysaccharides**. 2nd. ed. (Eds. W.Pigman e D.Horton), v. 2, Academic Press Inc., New York, 1970, p.375-412.

De ROBERTIS, Eduardo M.F.; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia Celular e Molecular**. 14^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

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

DEKKER, R. F. H.; LING, K. Y.; BARBOSA, A. M. A simple method for monitoring chromatography column eluates for laccase activity during enzyme purification. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 105-108, 2000.

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**, v. 496, p 15-21, 2001.

DOMENECH, J.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of three strains of *Verticillium fungicola*. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 209-212, 2002.

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

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.-t.; FANG, J.-n. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1417–1421, 2002.

DOSS, R. P. Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 404-408, 1999.

DOUGLAS, C. M. Fungal β - (1 \rightarrow 3)-D-Glucan synthesis. **Medical Mycology**, v. 39, p. 55-66, 2001.

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

DURAN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, p. 3099–3103, 2004.

ERJAVEČ, Z.; VERWEIJ, P. E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. **Drug Resistance Updates**. v. 5, p. 3-10, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

FABRE, I.; BRUNETEAU, M.; RICCI, P.; MICHEL, G. Isolation and structural studies of glucans from *Phytophthora parasitica*. **European Journal of Biochemistry**, v. 142, p. 99-103, 1984.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B. T. The cytokine stimulating activity of (1→3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 587-59, 2000.

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

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A. New non – degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 159-171, 2003.

GALICHET, A.; SOCKALINGUM, G. D.; BELARBI, A.; MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 197, p. 179-186, 2001.

GARCIA, J. E.; VILAS-BOAS, L. A.; DEKKER, R. F. H.; FUNGARO, M. H. P.; BARBOSA A. M. Gen bank, 29 apr. 2004; accession number AY612337.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; TKACZ, J. S. The fungal cell wall as drug target. **Trends in Microbiology**, v. 98, p. 98-104, 1995.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, 2007 (*in press*).

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI da SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3783-3788, 2005.

GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of glucan sheath of *Botrytis cinerea*: Effects on the distribution of enzyme activities. **Microbiology Letters**. v. 199, p. 109-113, 2001.

GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Differences among the cell wall galactomannans from *Aspergillus wentii* and *Chaetosartorya chrysella* and that of *Aspergillus fumigatus*. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, p. 239-246, 2004.

GONZAGA, M. L. C.; RICARDO, N. P. S.; HEATLEY, F.; SOARES, S. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill **Carbohydrate Polymers**, 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.; SPENCER, J. F. T. Structures of the L-rhamno-D-mannan from *Ceratocystis ulmi* and the D-gluco-mannan from *Ceratocystis brunnea*. **Carbohydrate Research**, v. 13, p.339-349, 1970.

GORIN, P.A.J.; BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In **The Polysaccharides**, Aspinall, G. O., Academic Press, INC, 1983.

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

HABIJANIČ, J.; BEROVIČ, M.; WRABER, B.; HODŽAR, D.; BOH, B. Immunostimulatory effects of fungal polysaccharides from *Ganoderma lucidum* submerged biomass cultivation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 327–331, 2001.

HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, v. 62, p. 107-111, 1978.

HERRERO, A. B.; MAGNELLI, P.; MANSOUR, M.; LEVITZ, S.; BUSSEY, H.; ABEIJON, C. Null mutants of *Candida albicans* KRE5 gene are virulent and have altered cell wall composition and hyphal formation properties. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 1423-1432, 2004.

HWANG, H.; KIM, S.; CHOI J.; YUN J. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 309-319, 2003.

JIA, L-M.; LIU, L.; DONG, Q.; FANG, J-N. Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericium erinaceus*. **Carbohydrate Research**, v 339, p. 2667-2671, 2004.

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**, v. 338, p. 1507-1515, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.

KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Review: The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 373-383, 1999.

KIHO, T.; SHIOSE, Y.; NAGAI, K.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 2110-2114, 1992.

KIM, H. O.; YUN, J. W. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 728-738, 2005.

KIM, G-Y.; PARK, H-S.; NAM, B-H.; LEE, S-J.; LEE, J-D. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 81-87, 2003.

KIM, Y. O.; PARK, H. W.; KIM, J. H.; LEE, J. Y.; MOON, S. H.; SHIN, C. S. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. **Life Sciences**, v. 79, p. 72-80, 2006.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.

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.

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.

KOLLÁR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n.3, p.225-237, 1992.

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**, v.24, p.61-64, 1999.

KRIZKOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidant and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, p. 213-222, 2001.

LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PARRA, E.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Structural investigation of cell-wall polysaccharides from *Neosartorya*: relationships with their putative anamorphs of *Aspergillus*. **Carbohydrate Research**, v. 273, p. 255-262, 1995.

LEE, J.-N.; LEE, D.-Y.; JI, I.-H.; KIM, G.-E.; KIM, H. N.; SOHN, J.; KIM, S.; KIM, C.-W. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.65, p. 837-841, 2001.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. In: WILMAR, C. da Luz. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS, 2001, v. 9, p. 119-157.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 317–343, 2006.

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

LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, H. O.; KIM, H. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata* TG-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 296–303, 2005.

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 agents *in vivo*. **Mutation Research**, v. 496, p. 23-32, 2001.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIŽIČÁROVÁ, I.; MATULOVÁ, M.; MACHOVÁ, E.; CAPEK, P. Cell wall mannan of human pathogen *Candida dubliniensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 191-195, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10^a ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, p. 449-474.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, p. 202-212, 2005.

MANZI, A. E.; VARKI, A. Composition analysis of glycoproteins. In: M. FUKUDA E A. KOBATA. **Glycobiology: A practical approach**. Oxford-U.K.: Oxford University Press, 1993, p. 27-76.

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**, v. 35, p. 97-102, 2005.

MENDES-COSTA, M. C.; MORAES, W. B. C. Comparação entre os teores de carboidratos totais solúveis presentes em distintas frações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, **Revista Brasileira de Biologia**. v. 59, p. 1-9, 1999.

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

MIRANDA, C. C. B. O. **Produção de botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

MOL, P. C.; WESSELS, J. G. H. Linkages between glucosaminoglycan and glucan determine alkali-insolubility of the glucan in walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 41, p. 95-99, 1987.

MOLINARO, A.; LANZETTA, R.; MANCINO, A.; EVIDENTE, A.; DI ROSA, M.; IANARO, A. Immunostimulant (1,3)-D-glucans from the cell wall of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr strain 263. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 441-445, 2000.

MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; SYED, S.; ISLAM, S. S. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigatio **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1135-1140, 2004.

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

MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; TARSI, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 55-61, 2000.

NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; SHIBATA, H.; KIMURA, I.; KIMURA, K.; SAWADA, H.; YOKOKURA, T. Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 289-291, 1996.

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

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

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, V. 7, p. 789-798, 2005.

NOBEL, H.; VAN DEN ENDE, H. V. D.; KLIS, F. M. Cell wall maintenance in fungi. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 344-345, 2000.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends in Microbiology**, v.14, p. 15-21, 2006.

PANG, X.; YAO, W.; YANG, X.; XIE, C.; LIU, D.; ZHANG, J.; GAO, X. Purification, characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, 2007 (*In press*).

PARK, J. P.; KIM, Y. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHO, Y. J.; LEE, Y. S.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and *exo*-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1257-1262, 2002.

PAVLOVA, K.; PANCHEV, I.; HRISTOZOVA, Ts. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 279-283, 2005.

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

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

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; Xu, Y. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 297-303, 2003.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell wall analysis. **Methods**, v. 33, p. 245-251, 2004.

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.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, p. 5-9, 2005.

POULAIN, D.; JOUAULT, T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 342-349, 2004.

PRIETO, A.; LEAL, J. A.; POVEDA, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GOMEZ-MIRANDA, B.; DOMENECH, J.; AHRAZEM, O. BERNABÉ, M. Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. **Carbohydrate Research**, v. 304, p. 281-291, 1997.

RICE, K. G.; CORRADI da SILVA, M. L. Preparative purification of tyrosinamide *N*-linked oligosaccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 235-249, 1996.

ROUT, D.; SOUMITRA MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ISLAM, S. S. The structure of a polysaccharide from Fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Research**, v.341, p. 995–1002, 2006.

RUAS-MADIEDO, P.; De 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**, v.88, p.843-856, 2005.

RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of beta-glucans in fungi. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 72-81, 1991.

RUIZ-HERRERA, J.; LEON, C. G.; CARABEZ-TREJO, A.; REYES-SALINAS, E. Structure and Chemical Composition of the Cell Walls from the Haploid Yeast and Mycelial Forms of *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, p. 133-142, 1996.

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

SASSAKI, G. L.; FERREIRA, J. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; TORRI, G.; DE TONI, F.; 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**, v.48, p. 385-389, 2002.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; REIS, R. A. SERRATO, R. V.; ELÍFIO, S.; IACOMINI, M.; Carbohydrate, glycolipid, and lipid components from the photobiont (*Scytonema* sp.) of the lichen, *Dictyomema glabratum*. **Carbohydrate Research**, v.340, p. 808–1817, 2005.

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

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.

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**, v. 40, p. 274-278, 2000.

SHARP, J. K.; VALENT, B.; ALBERSHEIM, P. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 259, p. 11312-11320, 1984.

SHIBATA, N., IKUTA, K., IMAI, T., SATOH, Y., SATOH, R., SUZUKI, A., KOJIMA, C., KOBAYASHI, H., HISAMICHI, K. AND SUZUKI, S. Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*; Structure-antigenicity relationship between cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 1113–1122, 1995.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p 387.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J; IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2189–2196, 2006.

SMITH, G. J.; KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Cell wall dynamics in yeast. **Currente Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 348-352, 1999.

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

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p.19-23, 1952.

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

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**, v. 339, p. 2255–2265, 2004.

SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Characterization of the extracellular matrix released by *Colletotrichum graminicola* onto artificial hydrophobic surface. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 52, p. 411-425. 1998.

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

TANG, Y.-J.; ZHONG, J.-J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 478-484, 2003.

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**, v. 266 p. 309-314, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6^aed, Porto Alegre: Artmed, 2000, p. 320.

VANDAMME, T. F.; LEONOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J-C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 219-231, 2002.

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

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. Comparison of the laccases, molecular marker proteins, and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. **Mycoscience**, v. 42, p. 543-548, 2001.

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

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

WANG, Y.; McNEIL, Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium glaucanicum* in an airlift reactor with an external loop. **Journal chemical technology and Biotechnology**, London, v. 63, p. 215-222, 1995.

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.

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

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v.2, p. 211-215, 1963.

XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMKURA, T.; ISHIYAMA, T.; YAMAGUSHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbiology Interaction**, v. 7, p. 639-644, 1994.

YALIN, W.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P. Studies on isolation and structural features of a polysaccharide from the mycelium of an Chinese edible fungus (*Cordyceps sinensis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 251–256, 2006.

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

ANEXO A

Artigo científico: “Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização”

ANEXO A –

Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização

Autor Principal: Maria de Lourdes Corradi da Silva

**Livre-docente em Bioquímica – Química de Carboidratos
Universidade Estadual Paulista-UNESP/2003**

**Pós-doutorado pela Ohio State University/1992 a 1994
Supervisor: Dr. Kevin Gerald Rice**

**Doutorado em Bioquímica pela UFPR/1992
Química de Carboidratos
Orientador: Prof. Dr. Philip Albert James Gorin**

**Mestre em Bioquímica pela UFPR/1986
Química de Carboidratos
Orientador: Dr. Philip Albert James Gorin**

**Graduação: Farmacêutica-Bioquímica
UFRJ/1980**

**Endereço Profissional:
Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNESP Caixa Postal 467
Departamento de Física, Química e Biologia.
Rua Roberto Simonsen, 305.
CEP 19061-520 Presidente Prudente, SP.
Email: corradi@fct.unesp.br
Fone: (18) 32295355 ramal 26 e 27.
FAX: (18) 32215682.**

Categoria do trabalho: revisão

**Área de publicação da Semina: Agrárias
Área CNPq: 2.08.00.00-2
Sub-área CNPq: 2.08.01.00-9
Especialidade: 2.08.01.03-3**

Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização**Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization**

Eliane Kaori Fukuda¹, Ana Flora D. Vasconcelos², Andreza C. Mathias, Aneli de Melo Barbosa¹, Robert F. H. Dekker³, Maria de Lourdes Corradi da Silva^{1,2*}

¹ Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina.

² Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

³ Universidad de Castilla-La Mancha – IRICA, 13071 Ciudad Real, España.

Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização

RESUMO

A parede celular é uma estrutura rígida, essencial para a sobrevivência dos fungos, e o conhecimento de sua composição poderá ser útil para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Neste contexto, os polissacarídeos que estão entre os seus principais componentes têm sido alvos de intensa investigação científica. As informações, provenientes do conhecimento da estrutura dessas macromoléculas, poderão ser valiosas para o entendimento dos mecanismos de síntese da parede celular de fungos causadores de patologias, tanto em plantas quanto em animais. A determinação da estrutura química de um endopolissacarídeo deve ser precedida por experimentos de extração e purificação. As extrações, geralmente conduzidas em soluções aquosas neutras e/ou alcalinas, separaram as biomoléculas em grupos, de acordo com suas solubilidades. Os extratos, contendo mistura de polissacarídeos, podem ser purificados pela combinação de métodos químicos e cromatográficos. Após purificação, os polissacarídeos considerados homogêneos são caracterizados estruturalmente com as técnicas convencionais em química de carboidratos tais como hidrólise, metilação, FT-IR e RMN-¹³C e ¹H. Esta revisão tem como proposta efetuar um levantamento das principais investigações científicas conduzidas com o objetivo de caracterizar polissacarídeos da parede celular fúngica.

Palavras-chave: Biomassa, Parede celular fúngica, Polissacarídeos, Caracterização química.

Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization

ABSTRACT

The cell wall is a rigid structure essential for the survival of fungi. A knowledge of its composition is therefore useful for the development of novel anti-fungal drugs. In this context, polysaccharides as main components of the fungal cell wall have been the subject of intense scientific study over the years. The information gained from the knowledge of the structure of these macromolecules could therefore be valuable in elucidating the mechanisms of their biosynthesis in the cell walls of pathogenic fungi infecting plants and animals alike. Determination of the chemical structures of these polysaccharides (*endo*) is preceded by their extraction and purification. The extractions, generally lead to neutral and/or alkaline soluble biopolymers in groups according to their solubilities. Mixtures of polysaccharides in these extracts can then be purified by a combination of chemical and chromatographic methods. Following purification, the polysaccharides, considered homogeneous, can be characterized structurally using conventional techniques of carbohydrate chemistry, such as hydrolysis, methylation analysis, and FT-IR, ^{13}C - and ^1H - NMR spectroscopy. This review surveys the main scientific literature that characterizes polysaccharides constituting the fungal cell wall.

Key words: Biomass; fungal cell wall; polysaccharides; chemical characterization.

Introdução

Os biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos, representam os mais abundantes compostos orgânicos da biosfera, exibindo importantes propriedades e diferentes aplicações, relacionadas com suas características químicas.

Fungos, bactérias e plantas vêm sendo pesquisados como potenciais fontes dessas macromoléculas, principalmente de polissacarídeos. A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, tem levado a intensivos estudos relacionados à sua extração e caracterização (GERN, et al., 2007).

Polissacarídeos bioativos isolados da parede celular fúngica têm sido caracterizados como homopolímeros, heteropolímeros ou, ainda, encontram-se ligados aos resíduos de proteínas formando complexos polissacarídeo-proteína (ZHANG et al., 2002; KIM et al., 2003).

Embora estudos sobre a composição da parede celular de vários fungos sejam efetuados, o maior número de informações disponíveis na literatura está relacionado com a estrutura de parede do ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae*, que é composta por β -D-glucanas, quitinas e manoproteínas (LIPKE; OVALLE, 1998; KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999; NOBEL; VAN DEN ENDE; KLIS, 2000; NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006). Alguns patógenos humanos, como *Cândida albicans* e espécies do gênero *Aspergillus*, também vêm tendo a constituição de parede celular investigada, que poderá ser utilizada como possível alvo de drogas antifúngicas (GEORGOPAPADAKOU; TKACZ, 1995; SHIBATA et al., 1995; POULAIN; JOUAULT, 2004).

Estudos realizados por Falch e colaboradores (2000) mostram que glucanas β -(1 \rightarrow 3) ramificadas possuem efeitos estimulantes para o sistema imune. Entretanto os mecanismos celulares pelos quais estas substâncias agem não estão muito bem definidos, sendo a principal hipótese a existência de receptores específicos para estas glucanas nas superfícies das células (MUELLER et al., 2000),

Fatores físico-químicos podem influenciar no efeito destes polissacarídeos sobre o organismo, dentre eles o grau de ramificação, a massa molecular e a conformação apresentada pelo material (YOUNG; JACOBS, 1998; LEUNG et al., 2006). Para compreender os mecanismos de atuação dessas moléculas biológicas todos os parâmetros de caracterização química e conformação devem ser estudados.

Portanto, esta revisão tem como principal objetivo apresentar dados de pesquisas referentes à caracterização química dos polissacarídeos de parede celular fúngica, fornecendo material inicial para investigação nessa área de conhecimento.

Biomassa Fúngica

Os fungos são microrganismos eucariontes heterotróficos que obtêm sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar diversos nichos ecológicos, atuando como parasitas, sapróbios ou então estabelecendo relações simbióticas, por exemplo, com algas, formando os líquens. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

No ambiente terrestre, os fungos são de importância fundamental como organismos decompositores, patógenos ou simbiontes, tendo papel importante nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio ou fósforo (BOSWELL; et al., 2003). Como fitopatógenos, estes organismos possuem mecanismos de adesão ao hospedeiro, onde as moléculas de reconhecimento e união são, na maior parte dos casos, de natureza protéica ou glicoprotéica. (XIAO et al., 1994; SUGUI; LEITE; NICHOLSON, 1998) e, por isso, a produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares têm sido associadas à capacidade do microrganismo causar doenças em plantas (DOSS, 1999; GIL-AD; BARNUN; MAYER, 2001; LEITE et al., 2001).

Os fungos podem ser considerados como os agentes mais importantes de degradação da Terra, principalmente quando se estuda os ecossistemas florestais, onde esses microrganismos são os principais decompositores de celulose e lignina. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é em grande parte controlado por fungos degradadores de madeira, que determinam as taxas dos nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004)

Além de sua atuação nos ecossistemas, os fungos também apresentam um grande potencial de aplicação nas diferentes áreas industriais, como alimentos, cosméticos, medicamentos, assim como na área ambiental, na detoxificação de compostos em ambientes contaminados. A utilização desses microrganismos pode ser através do seu material celular (biomassa) ou então de macromoléculas isoladas.

Há uma forte tendência em se explorar comercialmente a biomassa fúngica para isolamento de seus componentes celulares e conseqüentemente de seus principais constituintes, tais como enzimas (invertases, glucosídeos), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas) e principalmente

polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas), além de lipídeos, como fosfolipídeos e ergosterol, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, conseqüentemente, de grande valor agregado (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; KOLLÁR; STURDIK; SAJBIDOR, 1992; BELEM; LEE, 1998; BEROVIČ et al., 2003; PAVLOVA, PANCHEV; HRISTOZOVA, 2005).

Trabalhos como os realizados por Mendes-Costa e Moraes (1999) mostraram que é possível isolar da biomassa de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frações de carboidratos solúveis, e que estas moléculas podem ser utilizadas como indutoras de mecanismos de defesa em plantas. O mesmo foi observado em experimentos com soja (HAHN; ALBERSHEIM, 1978; SHARP; VALENT; ALBERSHEIM, 1984), e sorgo (PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005), onde se detectou a produção de fitoalexinas, substâncias envolvidas no mecanismo de defesa vegetal, quando as plantas foram colocadas em contato com glucanas isoladas de *S. cerevisiae* e de *Phytophthora megasperma*.

A biomassa excedente da produção industrial de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, além de ser aproveitada para ração para gado e ou no preparo de fertilizantes (MUZZARELLI et al., 2000), também vem se mostrando uma fonte viável de moléculas importantes, como os polissacarídeos do tipo glucanas (WANG et al., 2007), aplicados na área medicinal devido a suas atividades antitumorais e imunomoduladoras.

Durante um processo fermentativo para a produção de exopolissacarídeos (EPS), um grande percentual de biomassa também é obtido. Entretanto, as quantidades de massa micelial e EPS não são necessários proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, grau de aeração, entre outros. Estes parâmetros podem interferir tanto na produção da biomassa quanto dos componentes isolados desse substrato. Segundo alguns autores (SEVIOUR et al., 1992; WANG; McNEILL, 1995; SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002; BARBOSA et al., 2004) o que se espera obter no final do procedimento, se biomassa ou EPS, determinará como essas variáveis serão aplicadas no cultivo microbiano.

A influência desses parâmetros pode ser ilustrada, por exemplo, por Park e colaboradores (2002), que trabalhando com *Cordyceps militaris* para a produção de exopolissacarídeos (EPS), observaram que o aumento da taxa de aeração favorecia a produção de biomassa em relação à de macromoléculas. Tang e Zhong (2003) mostraram que variações nos níveis de saturação de ar em cultivos de *Ganoderma lucidum* influenciavam o fornecimento de oxigênio, levando a produção de quantidades diferentes de polissacarídeos intracelulares, extracelulares e de ácido ganodérico pelo fungo. Os pesquisadores observaram que uma menor saturação de ar (10 %) favorecia a produção de polissacarídeo extracelular (0,7 g/L), enquanto que com um grau de saturação de ar maior (25 %) havia um aumento de polissacarídeos intracelulares (1,6 g/L) e de ácido ganodérico (350 mg/L).

Portanto, pode-se concluir que valores significativos de biomassa podem ser obtidos por otimização de condições de cultivo, e que isso permite um aumento nas quantidades de componentes celulares que podem ser extraídos e terem suas moléculas básicas investigadas, para posteriores aplicações industriais.

Parede Celular Fúngica

Nos fungos, a estrutura celular é semelhante a dos outros eucariotos, constituída basicamente por uma membrana, um citoplasma com as organelas distribuídas aleatoriamente por todo interior celular e um compartimento especial, o núcleo, que armazena o material genético. As células podem ser encontradas na forma unicelular, como as leveduras, ou então formando conjuntos de hifas, septadas ou não, denominadas de micélio, como no caso dos fungos filamentosos. Tanto as células leveduriformes quanto o micélio estão envolvidos por uma camada protetora externa denominada de parede celular, quimicamente diferente da parede encontrada em vegetais, ainda que possa exercer os mesmos tipos de funções (De ROBERTIS; HIB; PONZIO, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A parede celular fúngica pode ser caracterizada como uma estrutura relativamente rígida, porém dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula. Ela determina

o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução (PÉREZ; RIBAS, 2004; NIMRICHTER et al., 2005; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005), sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos nos ambientes onde são encontrados (DURAN; NOMBELA, 2004).

O crescimento micelial é dependente do processo de translocação, onde o material celular é direcionado para as regiões em desenvolvimento (BOSWELL et al., 2003), permitindo a formação das estruturas celulares, como a parede, facilitando a ocupação dos ambientes pelo microrganismo. Em condições normais de desenvolvimento, a estrutura da parede celular é baseada na parede já existente nas células progenitoras, que são estendidas e remodeladas. Neste caso, ela serve como um arcabouço para a incorporação de novos materiais dentro dos pontos de crescimento (KLIS; BOORSMA; De GROOT, 2006).

A parede celular compreende cerca de 20-30% do peso seco da célula fúngica (SMITH et al., 1999), sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular (KLIS; BOORSMA; De GROOT, 2006).

A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais freqüentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004).

O conhecimento da constituição química da parede, principalmente em relação à presença de polissacarídeos, é um dado importante para o emprego biotecnológico dos fungos, pois estas moléculas podem ser utilizadas em processos industriais, para a produção de alimentos, medicamentos, entre outros ou, ainda, serem úteis para a classificação taxonômica desses organismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Vários estudos têm sido realizados para o conhecimento da composição química da parede celular de fungos, principalmente leveduras, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*, muito utilizadas em industriais de alimentos (GALICHET et al., 2001;

DURAN; NOMBELA, 2004; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005; KIM; YUN, 2005; NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006).

De acordo com Aguilar-Uscanga e François, (2003) a parede celular de leveduras apresenta como componentes polímeros de manose (constituindo manoproteínas), glicanas (principalmente beta-glucanas, mas galactanas também podem ser encontradas) e polímeros de N-acetilglucosamina (formando quitina).

Cerca de 60 a 90% do peso seco da parede celular de *S. cerevisiae* é constituída de glucanas e mananas (CHAUD; SGARBIERI, 2006). Para Kapteyn e colaboradores (1999), a parede celular desta levedura é organizada em duas camadas formadas por quatro classes de macromoléculas como proteínas de parede celular (CWPs), β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana e quitina, com estes componentes interconectados através de ligações covalentes.

Lipke e Ovalle (1998) através de estudos realizados com microscopia eletrônica observaram a disposição em camadas dos polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae*. A camada mais interna é constituída principalmente por uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana com pequeno grau de substituição em C-6 por resíduos glucopiranosídicos, que variavam em relação ao grau de maturação da célula. Segundo esses autores, a glucana poderia ser solúvel ou insolúvel, em solução aquosa, dependendo do percentual de ramificação. Os demais constituintes da camada interna observados foram a quitina, presente em proporções reduzidas nas regiões de cicatrizes de brotamento, e uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana altamente ramificada, solúvel em água (KLIS et al., 2002). Finalmente, uma manana constituída de uma cadeia principal de α -(1 \rightarrow 6)-D-manopiranosose altamente ramificada também foi descrita como constituinte da parede celular em *S. cerevisiae*. As ramificações foram caracterizadas como cadeias laterais de comprimentos variados de unidades de manose α -(1 \rightarrow 2) e em menor proporção α -(1 \rightarrow 3) ligadas, distribuídas de forma complexa ao longo da cadeia principal (KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999).

A levedura *Schizosaccharomyces pombe*, espécie considerada modelo para o estudo da relação entre a formação da parede celular e o ciclo celular, também apresenta β -(1 \rightarrow 3) glucana com ramificação em C-6 (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005). Uma característica

distinta desta levedura é a ausência de quitina, um polissacarídeo geralmente presente em outros fungos. Foram identificados outros polissacarídeos como uma α -(1→3) glucana e uma galactomanana típica de leveduras, formada por uma cadeia principal de α -(1→2) manopirranose, com unidades de galactose substituindo as posições terminais (PÉREZ; RIBAS, 2004).

A parede celular dos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, responsáveis por doenças em humanos, apresenta componentes como manana (*Candida*), galactomanana (*Aspergillus*) e β -(1→3)-D-glucana (ambos microrganismos) que podem ser utilizados para o diagnóstico de infecções fúngicas invasivas, pois estas moléculas, consideradas como antígenos circulantes, são detectados no sangue em uma fase inicial da infecção e antes do surgimento dos sintomas clínicos. A detecção desses antígenos é um procedimento mais rápido que os métodos tradicionais, realizados por estudos histológicos ou cultura de células. A presença desses antígenos também pode ser utilizada para monitorar a resposta dos pacientes ao tratamento com agentes antifúngicos (ERJAVEČ; VERWEIJ, 2002).

Como a parede celular é essencial para a sobrevivência da célula fúngica e está ausente em células de mamíferos, ela se torna um alvo atrativo para a ação de drogas. Portanto, o conhecimento da síntese da parede celular, bem como de sua composição química podem dar informações valiosas para aplicação desses agentes antifúngicos (PÉREZ; RIBAS, 2004).

Polissacarídeos de Parede Celular Fúngica

Os polissacarídeos são uma classe de biopolímeros produzidos por todos os organismos vivos. Eles exibem diferentes tipos de estruturas químicas, funções fisiológicas e aplicações (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Estas moléculas são polímeros de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, formadas a partir da eliminação de uma molécula de água ente o grupo hidroxila hemiacetal/hemicetal 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 (PAZUR, 1994).

Nos organismos vivos, os polissacarídeos podem estar sozinhos ou covalentemente combinados com outros compostos de diferentes classes biológicas, principalmente proteínas e lipídeos, constituindo os glicoconjugados. Em combinação ou livres, essas moléculas têm importantes funções biológicas (NELSON; COX, 2002).

Em microrganismos, os polissacarídeos podem ser estruturais, excretados ao meio como exopolissacarídeos (EPS) ou localizarem-se no citoplasma, exercendo a função de reserva energética (KRCMAR et al., 1999; NELSON; COX, 2002). Os polissacarídeos microbianos têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de aplicação em diferentes áreas industriais incluindo cosméticos e alimentos funcionais, além de medicamentos (VANDAMME et al., 2002, BAIS et al., 2005, FRANÇOIS; ROJAS; DARAIO, 2005, METHACANON et al., 2005).

Nos fungos, os polissacarídeos constituem um percentual importante da biomassa, onde a parede da hifa é formada por mais de 75% dessas moléculas, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como um suporte para a hifa, essas macromoléculas também podem constituir uma “capa” extracelular ao redor do micélio (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996).

A composição e estrutura química dos polissacarídeos de parede celular são variáveis entre as diferentes espécies de microrganismos. Com base nos resultados provenientes da caracterização química dessas macromoléculas, alguns autores propõem a sua utilização 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).

Devido ao grande número de fungos encontrados na natureza e a possibilidade de terem em sua composição endopolissacarídeos e exopolissacarídeos com diferentes aplicações medicinais, estudos estão sendo realizados para verificar o potencial dessas macromoléculas como antioxidantes, antimutagênicos, anticoagulantes, antitrombóticos e imunomoduladores. (FREIMUND et al., 2003; ZHANG et al., 2005; CORRADI da SILVA et al., 2006).

Dentre os polissacarídeos encontrados na parede celular fúngica as glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns. A maioria é linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa (α) ou beta (β). As β -glucanas são a forma predominante, podendo estar livres ou associadas às proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos. A conformação destas moléculas pode variar desde simples até tripla hélice, que é a forma mais comum, onde três cadeias de polímeros são agregadas por ligações de hidrogênio nos oxigênios do C-2 (WILLIAMS, 1997).

As β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas encontradas em extratos celulares de *Saccharomyces cerevisiae* possuem ramificações em C-6 e esses terminais não redutores podem estar covalentemente ligados à cadeia de quitina através de ligação α -(1 \rightarrow 4) (LESAGE; BUSSEY, 2006).

A síntese de β -glucanas em fungos envolve várias etapas: reações de iniciação, alongamento da cadeia e ramificação, das quais a mais estudada é o alongamento da cadeia que envolve a reação catalisada pela enzima glucana β -(1 \rightarrow 3) sintetase a partir de uridina difosfato-glucose (UDP-glucose) como substrato (RUIZ-HERRERA, 1991). De acordo com Douglas (2001), a polimerização dos açúcares é gradativa, sendo adicionado uma unidade de glucose por vez, até se formar as longas cadeias.

Na parede celular de algumas leveduras, como *Cândida dubliniensis*, foi encontrado um componente majoritário rico em manose associado a uma proteína, constituindo as manoproteínas. A esse tipo de glicoconjugado têm sido atribuídas funções de adesão entre células, habilidades imunomoduladores e variabilidade antigênica (LIŽIČÁROVÁ et al., 2007). Moléculas de manose podem, também, ser encontradas como galactomananas, que são heteropolissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de manose ligada a resíduos de galactose, presentes em espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. fumigatus* e *A. wentii*, e *Chaetosartorya chrysella*, fungos estudados em relação à patogenicidade humana (GÓMEZ-MIRANDA et al., 2004). Dependendo do grau de ramificação, bem como do tamanho da cadeia lateral, as galactomananas apresentam propriedades físicas e químicas distintas, que permitem classificá-las como uma família de macromoléculas.

Um constituinte menor da parede celular e comum em fungos é a quitina, um homopolímero linear, longo, formado por resíduos de N-acetilglucosamina β -(1 \rightarrow 4) ligados.

Compreende cerca de 1 a 2% da parede celular de leveduras embora seja encontrada em maior proporção (10 a 20%) em fungos filamentosos. Pontes de hidrogênio inter-cadeia dão origem a microfibrilas de quitina. Essas estruturas suportam grandes pressões e, portanto, tornam-se responsáveis pela integridade da parede celular. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMAN; FREE, 2006).

A caracterização química dos constituintes da parede celular fúngica contribuirá para o conhecimento básico do microrganismo, para o entendimento de suas relações com o meio e a provável utilização biotecnológica de seus componentes isolados.

Procedimentos Gerais para Purificação e Caracterização de Polissacarídeos de Parede Celular

Visto que a biomassa fúngica constitui uma valiosa fonte de proteínas, lipídeos e principalmente de polissacarídeos que apresentam inúmeras propriedades benéficas para a saúde humana, animal e vegetal, diferentes métodos são utilizados para o isolamento e caracterização destes polissacarídeos.

Primeiramente, é necessário efetuar a extração eficiente dos polissacarídeos evitando, tanto quanto possível, reações de degradação. Os procedimentos mais comuns são as extrações aquosas a frio, a quente e/ou alcalina, com NaOH ou KOH, ou até mesmo com auxílio de enzimas específicas. Os extratos obtidos, geralmente são constituídos por uma mistura de polissacarídeos (PÉREZ; RIBAS, 2004).

Precedendo a caracterização (PAZUR, 1994), procedimentos de purificação devem ser efetuados até que a composição monossacarídica da macromolécula em estudo se mantenha constante por, pelo menos, dois métodos diferentes. Normalmente, métodos cromatográficos e/ou químicos dão informações em relação à pureza da preparação polissacarídica (DANISHEFSKY; WHISTLER; BETTELHEIM, 1970; BOYER, 1993).

Considerando-se a pureza do material o primeiro procedimento químico para conhecer a composição de uma fração rica em carboidrato é fragmentá-la, para ter os resíduos monossacarídicos que a constitui (NELSON; COX, 2002). Esta fragmentação pode ser realizada através de hidrólises enzimática ou ácida. Estabelecidas às condições ideais de hidrólise, a identificação dos monômeros passa a ser a etapa seguinte da análise. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados e a cromatografia líquida de alta pressão em troca aniônica (HPAEC) tem sido, juntamente com a cromatografia gasosa, os de preferência (RUAS-MADIEDO; LOS REYES-GAVILAN, 2005).

O tipo de ligação glicosídica geralmente é determinado após a análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (cg/em) e a configuração anomérica dos monossacarídeos que constituem a macromolécula por FT-IR. (SILVERSTEIN, 1994; MOHAČEK-GROŠEV; BOŽAC; PUPPELS, 2001) e RMN de ^{13}C (GORIN, 1981; CORRADI da SILVA et al., 2006).

Polissacarídeos de Parede Celular Fúngica: Purificação e Caracterização

Estudos demonstram que os polissacarídeos fúngicos podem ser isolados da parede celular do corpo de frutificação, do micélio, do esclerócio (forma de resistência) ou então serem provenientes de meios de cultivo livres de células (extracelulares) (MONDAL et al., 2004; WANG et al., 2004; CORRADI da SILVA et al., 2006).

Vários polissacarídeos foram isolados da parede celular do *Phytophthora parasitica*, um fungo fitopatogênico. A mistura polissacarídica foi fracionada por cromatografias sucessivas em DEAE-celulose, Sephadex G-25, Concanavalina-A Sepharose e Sephadex G-200. Os polissacarídeos neutros consistiam de uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) cuja massa molecular ficou entre 9×10^3 a 200×10^3 Da. Todos estes polissacarídeos eram constituídos por uma cadeia principal de resíduos de glucose β -(1 \rightarrow 3) ligados (FABRE et al., 1984).

O principal componente encontrado no extrato aquoso do corpo de frutificação de *Boletus erythropus* foi uma β -glucana contendo resíduos de glucose com ligações (1 \rightarrow 3), sendo substituídas em O-6 por terminais não redutores de -D-Glcp, na frequência de 1:3 (CHAUVEUAU et al., 1996).

Ruiz-Herrera e colaboradores (1996) mostraram que as composições monossacarídicas do micélio e da levedura de *Ustilago maydis*, um hemibasidiomiceto fitopatogênico que causa doença em milho, são distintas. Glucose (41%), galactose (32%), manose (16%) e xilose (11%), monossacarídeos encontrados na forma micelial diferiram daqueles encontrados na forma leveduriforme: glucose (26%), xilose (23%), manose (23%), galactose (11%), fucose (6%), arabinose (6%) e ribose (5%).

Prieto e colaboradores (1997) isolaram um polissacarídeo complexo, por extração alcalina, da parede celular dos fungos *Trichoderma reesei*, *T. koningii* (forma teleomórfica) e *Hypocrea psychrophila* (anamórfica). Esses fungos, encontrados no solo, têm grande importância econômica por atuarem como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos e por serem produtores de enzimas como as celulases. Após hidrólise ácida do polissacarídeo complexo solúvel em água foram detectados por cromatografia gasosa, como acetato de alditóis, os açúcares glucose, galactose e manose. Análises de metilação e ressonância magnética nuclear de carbono 13 e próton uni- e bidimensional mostraram um estrutura altamente complexa com uma cadeia principal constituída de unidades manopiranosídicas α -(1 \rightarrow 6) ligadas, algumas unidades substituídas em 2 por oligossacarídeos com unidades galactofuranosídicas alternadas com ácido glucurônico ou em 3 por unidades α manopiranosídicas.

Ahrazem e colaboradores (1997) caracterizaram um polissacarídeo ácido isolado da parede celular de *Cylindrocladium* e de sua forma anamórfica *Calonectria*, por extração alcalina. Os acetatos de alditóis, galactose, glucose e manose foram detectados por cromatografia gasosa, além da presença de ácido urônico. Análises de metilação mostraram os derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol e 3-5-di-O-metil galacitol, além de 5% de 2,3,4-tri-O-metil manitol, e 3,4-di-O-metil manitol. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou apenas dois sinais na região anomérica, δ 107,1 ppm e 176,2 ppm,

atribuídos, respectivamente, aos resíduos β -galactofuranosídicos e carbonila, confirmando a presença de ácido urônico.

Uma β -D-glucana-(1 \rightarrow 3) solúvel substituída em C-6, em uma proporção de aproximadamente 30%, foi encontrada como principal componente da extração alcalina da parede celular de *Cryphonectria parasítica* (MOLINARO et al., 2000).

Zhang e colaboradores (2000) extraíram uma glucana do corpo de frutificação do basidiomiceto *Ganoderma lucidum*. Após resultados das análises de metilação, oxidação pelo periodato, ressonância magnética nuclear de carbono 13 e espectroscopia de infravermelho, a molécula foi caracterizada como um polímero linear constituído de resíduos glucosídicos α -(1 \rightarrow 3) ligados.

Um polissacarídeo solúvel foi isolado do extrato aquoso a quente do corpo de frutificação de *Agaricus blazei* (Murr) por precipitação etanólica, cromatografia de troca-iônica e cromatografia de filtração em gel. As análises de metilação, degradação de Smith, hidrólise branda e espectroscopia de RMN de ^{13}C mostraram que o polissacarídeo era composto por uma cadeia principal de resíduos glucosídicos em ligação β -(1 \rightarrow 6), substituídos em C-3 por resíduos laminaribiosídicos (DONG et al., 2002).

O corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum*, tem sido usado tradicionalmente na medicina chinesa e em outros países asiáticos por apresentarem efeitos medicinais contra câncer, hipertensão, hepatite e hipercolesterolemia e vários polissacarídeos têm sido obtidos a partir do extrato aquoso dessa estrutura de *Ganoderma* (BAO et al., 2002a). Uma das glucanas isoladas foi caracterizada como tendo uma cadeia principal constituída de unidades glucopiranosídicas β -(1 \rightarrow 3) substituídas em O-6 por uma unidade de glucose (BAO et al., 2001; BAO et al., 2002a). Glucanas com estrutura química semelhantes também foram isoladas dos esporos deste mesmo fungo (BAO et al., 2002b).

Domenech e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram uma galactomanana do extrato alcalino da parede celular de três linhagens de *Verticillium fungicola*, considerado um dos patógenos mais comuns no cultivo do cogumelo *Agaricus biosporus*. A fração F1SS, das três linhagens estudadas, era constituída por manose e galactose. A análise de metilação mostrou dois

picos identificados como 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-galacitol, que correspondem a galactopiranosose, e 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-manitol e um pequeno percentual de Manp 6-O-substituído. A massa molecular média dos polissacarídeos, determinada por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B, ficou entre 70 a 80 kDa. Os resultados da análise de metilação juntamente com espectros de RMN de H^1 e de $^{13}C^1$ sugeriram uma estrutura formada por uma cadeia principal de unidades manopiranosídicas α -(1 \rightarrow 6) ligadas e substituídas em O-4 por resíduo β -D-galactopiranosídicos. Esses resultados confirmam a semelhança estrutural dos polissacarídeos nas diferentes linhagens e reforçam a aplicação dos polissacarídeos como marcadores taxonômicos.

Ahrazem e colaboradores (2002) caracterizaram um polissacarídeo solúvel em água, extraída com álcali de paredes celulares das espécies de *Geotrichum spp.* (forma anamórfica), *Galactomyces* e *Dipodascus* (formas teleomórficas). Por análise de metilação e ressonância magnética nuclear concluíram que o polissacarídeo era uma galactomanana com cadeia principal constituída de unidades α -D-manp 1 \rightarrow 6 e substituídas em 2 por (α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-1 \rightarrow). Todas as espécies estudadas apresentaram o mesmo polissacarídeo e, portanto, concluíram tratar-se do mesmo gênero.

Uma linhagem selvagem de *Poria cocos* foi cultivada, separadamente, em extrato de cevada e em extrato fermentado de milho e denominadas de wb e wc, respectivamente. Seis frações polissacarídeos foram isoladas, seqüencialmente, dos dois micélios por extrações com NaCl 0,9% (PCM1), aquosa a quente (PCM2), NaOH 0,5M (PCM3-I e -II) e ácido fórmico a 88% (PCM-4-I e -II). Glucanas extraídas com NaOH 0,5M se separam em duas frações, denominadas PCM3-I e PCM3-II, após neutralização com ácido acético. As características físicas e químicas foram determinadas por espectroscopia de IV (Infra-Vermelho), cromatografia gasosa (CG), RMN- ^{13}C , light scattering (LS) e viscosimetria. Os resultados indicaram que as frações PCM-1 e PCM-2 dos cultivos em wb e wc eram constituídas por heteropolissacarídeos formados por glucose, manose e galactose, enquanto que em PCM3-I foram encontradas glucanas lineares com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3). As frações PCM3-II, PCM4-I e PCM4-II eram compostas de glucanas lineares com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) (JIN et al., 2003).

Em 2004, Jia e colaboradores elucidaram a estrutura de um heteropolissacarídeo de peso molecular de $1,8 \times 10^4$ Da, composto por ramnose, glucose e galactose na proporção de 1,19: 3,81: 1,00, isolado do corpo de frutificação do fungo medicinal chinês *Hericium erinaceus*. Suas características estruturais foram investigadas utilizando análise de metilação, hidrólise parcial, espectroscopia de infravermelho e de RMN. Os resultados mostraram que a cadeia principal era formada por unidades α -D-galactopiranosídicas com ramificações em O-2 por resíduos de ramnose e glucose.

Chakraborty e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram uma heteroglucana da extração aquosa a quente (100°C, 6h) do corpo de frutificação do fungo comestível *Astraeus hygrometricus* que constitui micorrizas crescendo junto com as raízes de árvores auxiliando na extração de nutrientes, especialmente o fósforo do solo, e de substâncias orgânicas. A fração solúvel do extrato aquoso foi investigada e os resultados das análises de hidrólise ácida total, metilação e RMN permitiram concluir que se tratava de uma glucana com ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) e β -(1→6).

Mondal e colaboradores (2004) realizaram uma extração aquosa do corpo de frutificação (100°C, 6h) de *Termitomyces eurhizus*, um cogumelo de grande interesse devido a suas propriedades imunomoduladora e seu alto valor nutritivo. O extrato deste microrganismo, depois de dializado e precipitado com etanol, foi submetido à purificação pela cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50 onde foram separadas duas frações homogêneas, denominadas PS-I e PS-II. Análises de metilação, oxidação com periodato, RMN do ^{13}C e de ^1H , mostraram que o polissacarídeo da fração PS-I era composto por unidades glucopiranosídicas unidas por ligações do tipo α -(1→3) e α -(1→6) na proporção de 2,5:1. PS-II também era um polímero de glucose mas com ligações do tipo α -(1→6).

Uma glucana isolada do micélio de um fungo comestível chinês *Cordyceps sinensis* foi caracterizada por análise de metilação, degradação de Smith, acetólise, espectroscopia de NMR (^1H , ^{13}C , ^{13}C - ^1H 2D-COSY) e hidrólise ácida total. Os resultados mostraram que cadeia principal era composta de resíduos α -(1→4)-D-glucopiranosídicos ligados a um único resíduo α -(1→6)-D-glucosídicos (YALIN; CUIRONG; YUANJIANG, 2006).

Um polissacarídeo insolúvel em água foi isolado da extração alcalina (NaOH) do micélio de *Penicillium chrysogenum*. O peso molecular desse polímero, 180 KDa, foi determinado por cromatografia de permeação em gel. Após hidrólise ácida total e análise dos derivados acetilados por cromatografia líquido-gasosa (GLC) foram encontrados os açúcares glucose, manose e galactose nas proporções 98,7: 0,6: 0,7. O espectro de FT-IR apresentou picos de absorção em 929, 846 e 820 cm^{-1} característicos de glucanas com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3). O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 apresentou 6 sinais de intensidades semelhantes. Os deslocamentos químicos em 101,20 ppm e 83,66 ppm foram atribuídos ao carbono anomérico dos resíduos de glucose e ao C-3-O-substituído, respectivamente (WANG et al., 2007).

Um endopolissacarídeo foi isolado do extrato aquoso a quente do micélio do *Inonotus obliquus*, (fungo de degradação branca) e purificado por cromatografia de troca iônica e de filtração em gel. Após caracterização, o polissacarídeo mostrou-se constituído por resíduos de fucose, glucose e manose e massa molecular de aproximadamente 1×10^6 Da. Verificou-se que esse endopolissacarídeo é um ativador específico de células B e de macrófagos. Os resultados *in vivo* e *in vitro* comprovaram que a atividade antitumoral não se deve ao efeito tumoricida e sim ao efeito imunomodulador (KIM et al., 2006).

Atividades Biológicas dos Polissacarídeos de Parede Celular Fúngica

Os biopolímeros, de maneira geral, têm sido objetos de pesquisas devido ao seu potencial de aplicação. Estudos realizados com os polissacarídeos da parede celular fúngica demonstram que essas moléculas apresentam uma variedade de respostas biológicas de defesa, mas sua aplicação terapêutica parece estar relacionada com a estrutura química e a conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais entre polímeros resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (CORRADI da SILVA et al, 2006).

Diferentes funções biológicas desses polímeros foram analisadas, como hipoglicemiantes, anti-trombóticas, antibióticas, atividades anti-tumorais e anti-virais, atuação na

diminuição da pressão arterial e na concentração de lipídios sanguíneos, na inibição da ação inflamatória e microbiana. (ZHANG et al., 2000; HWANG et al., 2003; ALQUINI et al., 2004; ZHANG et al., 2007). Estudos com os basidiomicetos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*, utilizados na medicina popular japonesa e chinesa para prevenção e tratamento de doenças, mostraram que essas atividades poderiam estar ligadas aos polissacarídeos presentes nestes fungos (LIMA et al., 2001; DELMANTO et al., 2001; CHEN; SHAO; SU, 2004).

As glucanas são os polissacarídeos mais estudados em relação à atividade biológica. Essas moléculas, principalmente do tipo β -(1 \rightarrow 3) e/ou β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), são capazes de ativar células do sistema imunológico humano, como macrófagos, neutrófilos e células NK (*natural killer*), para a secreção de citocinas (interleucinas, interferon e fator necrosante tumoral) que são substâncias que atuam como sinais químicos nos processos de diferenciação, proliferação e apoptose celulares, contribuindo para a manutenção da homeostase no organismo (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; HABIJANIČ et al., 2001).

Muitos medicamentos utilizados em neoplasias apresentam como efeito colateral uma ação imunossupressora, que pode acarretar em infecção e septicemia. Devido à capacidade das β -glucanas em estimular o sistema imunológico, elas podem ser utilizadas como adjuvantes desses quimioterápicos no tratamento de pacientes imunocomprometidos. (BOHN; BeMILLER, 1995; LEE et al., 2001; SUGAWARA et al., 2004; ZHANG et al., 2005; LEUNG et al., 2006).

Além das glucanas, outros polissacarídeos de parede também estão sendo investigados com o intuito de determinar suas atividades biológicas.

De acordo com Zhang e colaboradores (2007), manoglucanas, galactomananas, e glucomananas, obtidas da biomassa de basidiomicetos, tais como *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* e diferentes espécies do gênero *Pleurotus*, como *P. cittinopileatus*, também podem apresentar atividades antitumorais ou imunomoduladoras.

Martinichen-Herrero e colaboradores (2005) isolaram e caracterizaram uma galactomanana do líquen *Cladonia ibitipocae* e a modificaram quimicamente pela inserção de grupamentos sulfato, num processo denominado sulfatação; os polissacarídeos original e modificado

apresentaram atividades anticoagulante e antitrombótica distintas em experimentos realizados em ratos, com os resultados mais positivos relacionados à molécula sulfatada.

Trabalhos realizados por Krizková e colaboradores (2001), investigaram glucomananas isoladas de *Candida utilis* e mananas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Eles observaram que essas moléculas apresentavam atividade antimutagênica, pois eram capazes de reduzir danos oxidativos ao DNA de cloroplastos do flagelado *Euglena gracilis*, e que esta ação poderia estar relacionada à característica das moléculas em seqüestrar radicais livres, demonstrando também que esses polissacarídeos possuem atividade antioxidante.

Além das funções biológicas destacadas acima, é importante também ressaltar que dependendo das características químicas que esses biopolímeros apresentem como, por exemplo, o grau de solubilidade em soluções aquosas, é possível também a sua utilização nos mais diversos segmentos industriais, como indústrias de alimentos, cosméticos, etc (SUTHERLAND, 1998; SHAH et al., 2000; WANG et al., 2004; METHACANON et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2000. p. 235-269.

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANCOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 268-274, 2003.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Fungal cell-wall galactomannans isolated from *Geotrichum* spp. and their teleomorphs, *Dipodascus* e *Galactomyces*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2347-2351, 2002.

ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; CONSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **Microbiology Letters**, v. 230, p. 47-52, 2004.

BAO, X.; WANG, X.; DONG, Q.; FANG, J.; LI, X. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 175-181, 2002a.

BAO, X.; ZHEN, Y.; RUAN, L.; FANG, J. Purification, characterization and modification of lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 623-629, 2002b.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI da SILVA, M. L. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, p. 29-42, 2004.

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

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

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 38, p. 565-598, 1998.

BEROVIČ, M.; HABIJANIČ, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODŽAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 103, p. 77-86, 2003.

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

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, p. 447-477, 2003.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799–808, 2006.

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

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* effective bioemulsifier. **Applied and environmental Microbiology**, v. 54, p. 1420-1425, 1988.

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**, v. 53, p. 469–473, 2003.

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**, v. 66, p. 929-934, 2005.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2249–2254, 2004.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 369-379, 2006.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; CHAVANT, L. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, 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**, v. 4, p. 403-409, 2004.

CORRADI da SILVA, M. L.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. B.; DEKKER, R. F. H. Purification and structural characterization of (1→3; 1→6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 10-17, 2005.

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

DANISHEFSKY, I.; WHISTLER, R. L.; BETTELHEIM, F. A. In: **The Polysaccharides**. 2nd ed. (Eds. W.Pigman e D.Horton), v. 2, Academic Press Inc., New York, 1970, p.375-412.

De ROBERTIS, Eduardo M.F.; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia Celular e Molecular**. 14^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 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**, v. 496, p 15-21, 2001.

- DOMENECH, J.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of three strains of *Verticillium fungicola*. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 209-212, 2002.
- DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.-t.; FANG, J.-n. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1417-1421, 2002.
- DOUGLAS, C. M. Fungal β - (1 \rightarrow 3)-D-Glucan synthesis. **Medical Mycology**, v. 39, p. 55-66, 2001.
- DURAN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, p. 3099-3103, 2004.
- ERJAVEČ, Z.; VERWEIJ, P. E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. **Drug Resistance Updates**, v. 5, p. 3-10, 2002.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.
- FABRE, I.; BRUNETEAU, M.; RICCI, P.; MICHEL, G. Isolation and structural studies of glucans from *Phytophthora parasitica*. **European Journal of Biochemistry**, v. 142, p. 99-103, 1984.
- FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B. T. The cytokine stimulating activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 587-59, 2000.
- FRANÇOIS, N.J.; ROJAS, A. M.; DARAIÓ, M. E. Rheological and drug-release behaviour of a scleroglucan gel matrix at different drug loadings. **Polymer International**, v. 54, p. 1613-1619, 2005.
- FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A. New non - degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 159-171, 2003.
- GALICHET, A.; SOCKALINGUM, G. D.; BELARBI, A.; MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 197, p. 179-186, 2001.
- GEORGOPAPADAKOU, N. H.; TKACZ, J. S. The fungal cell wall as drug target. **Trends in Microbiology**, v. 98, p. 98-104, 1995.
- GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, 2007 (*in press*).
- GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of glucan sheath of *Botrytis cinerea*: Effects on the distribution of enzyme activities. **Microbiology Letters**, v. 199, p. 109-113, 2001.
- GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Differences among the cell wall galactomannans from *Aspergillus wentii* and *Chaetosartorya chrysella* and that of *Aspergillus fumigatus*. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, p. 239-246, 2004.

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

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

HABIJANIČ, J.; BEROVIČ, M.; WRABER, B.; HODŽAR, D.; BOH, B. Immunostimulatory effects of fungal polysaccharides from *Ganoderma lucidum* submerged biomass cultivation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 327–331, 2001.

HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, v. 62, p. 107-111, 1978.

HWANG, H.; KIM, S.; CHOI J.; YUN J. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 309-319, 2003.

JIA, L-M.; LIU, L.; DONG, Q.; FANG, J-N. Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericium erinaceus*. **Carbohydrate Research**, v 339, p. 2667-2671, 2004.

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**, v. 338, p. 1507-1515, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.

KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Review: The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 373-383, 1999.

KIM, H. O.; YUN, J. W. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 728-738, 2005.

KIM, G-Y.; PARK, H-S.; NAM, B-H.; LEE, S-J.; LEE, J-D. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 81–87, 2003.

KIM, Y. O.; PARK, H. W.; KIM, J. H.; LEE, J. Y.; MOON, S. H.; SHIN, C. S. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. **Life Sciences**, v. 79, p. 72–80, 2006.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185–202, 2006.

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.

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.

KOLLÁR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n.3, p.225-237, 1992.

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**, v.24, p.61-64, 1999.

KRIZKOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidant and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, p. 213-222, 2001.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. In: WILMAR, C. da Luz. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS, 2001, v. 9, p. 119-157.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 317-343, 2006.

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

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 agents *in vivo*. **Mutation Research**, v. 496, p. 23-32, 2001.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIŽIČAROVÁ, I.; MATULOVÁ, M.; MACHOVÁ, E.; CAPEK, P. Cell wall mannan of human pathogen *Candida dubliniensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 191-195, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10^a ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, p. 449-474.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v.336, p. 202-212, 2005.

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**, v. 35, p. 97-102, 2005.

MENDES-COSTA, M. C.; MORAES, W. B. C. Comparação entre os teores de carboidratos totais solúveis presentes em distintas frações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, **Revista Brasileira de Biologia**. v. 59, p. 1-9, 1999.

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

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

- MOLINARO, A.; LANZETTA, R.; MANCINO, A.; EVIDENTE, A.; DI ROSA, M.; IANARO, A. Immunostimulant (1,3)-D-glucans from the cell wall of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr strain 263. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 441–445, 2000.
- MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; SYED, S.; ISLAM, S. S. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigatio **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1135–1140, 2004.
- MUELLER, A.; RAPTIS, J.; RICE, P. J.; KALBFLESCHE, J. H.; STOUT, R. D.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. L. The Influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1,3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v.10, p. 339-346, 2000.
- MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; TARSI, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 55–61, 2000.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Princípio de Bioquímica**. 3^a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, V. 7, p. 789–798, 2005.
- NOBEL, H.; VAN DEN ENDE, H. V. D.; KLIS, F. M. Cell wall maintenance in fungi. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 344-345, 2000.
- NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends in Microbiology**, v.14, p. 15-21, 2006.
- PARK, J. P.; KIM, Y. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHO, Y. J.; LEE, Y. S.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and *exo*-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1257-1262, 2002.
- PAVLOVA, K.; PANCHEV, I.; HRISTOZOVA, Ts. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 279-283, 2005.
- PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In M.F. Chaplin and J.F. Kennedy. **Carbohydrate Analysis: A Practical Approach**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1994.p. 73-124.
- PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell wall analysis. **Methods**, v. 33, p. 245-251, 2004.
- 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.
- PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, p. 5-9, 2005.
- POULAIN, D.; JOUAULT, T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 342-349, 2004.

PRIETO, A.; LEAL, J. A.; POVEDA, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GOMEZ-MIRANDA, B.; DOMENECH, J.; AHRAZEM, O. BERNABÉ, M. Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. **Carbohydrate Research**, v. 304, p. 281-291, 1997.

RUAS-MADIEDO, P.; De 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**, v.88, p.843-856, 2005.

RUIZ-HERRERA, J.; LEON, C. G.; CARABEZ-TREJO, A.; REYES-SALINAS, E. Structure and Chemical Composition of the Cell Walls from the Haploid Yeast and Mycelial Forms of *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, p. 133-142, 1996.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium glucanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.34, p.51-55, 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**, v. 40, p. 274-278, 2000.

SHARP, J. K.; VALENT, B.; ALBERSHEIM, P. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 259, p. 11312-11320, 1984.

SHIBATA, N., IKUTA, K., IMAI, T., SATOH, Y., SATOH, R., SUZUKI, A., KOJIMA, C., KOBAYASHI, H., HISAMICHI, K. AND SUZUKI, S. Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*; Structure-antigenicity relationship between cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 1113-1122, 1995.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p 387.

SMITH, G. J.; KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 348-352, 1999.

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**, v. 339, p. 2255-2265, 2004.

SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Characterization of the extracellular matrix released by *Colletotrichum graminicola* onto artificial hydrophobic surface. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 52, p. 411-425. 1998.

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

TANG, Y.-J.; ZHONG, J.-J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 478-484, 2003.

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**, v. 266 p. 309-314, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6^aed, Porto Alegre: Artmed, 2000, p. 320.

VANDAMME, T. F.; LEONOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J-C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 219-231, 2002.

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

WANG, Y.; McNEIL, Production of the fungal exopolisaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium glaucum* in an airlift reactor with an external loop. **Journal chemical technology and Biotechnology**, London, v. 63, p. 215-222, 1995.

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.

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

XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMKURA, T.; ISHIYAMA, T.; YAMAGUSHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbiology Interaction**, v. 7, p. 639-644, 1994.

YALIN, W.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P. Studies on isolation and structural features of a polysaccharide from the mycelium of an Chinese edible fungus (*Cordyceps sinensis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 251–256, 2006.

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

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

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

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

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

ANEXO B**Guia para autores do periódico Semina**



Normas Editoriais para Publicação

Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;

b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;

c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPES.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "Ad hoc" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.
6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.
7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.
8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Edição da SEMINA
Campus Universitário - Caixa Postal 6001
86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.

Contatos com a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação:

Nome - Área - Ramal:	e-mail:
Prof. Dr. Édison Miglioranza - PROPPG/DP - 4513	emiglior@uel.br
Ivone Yurika Mizubuti - PROPPG/DCA - 4105	mizubuti@uel.br
Égle Maria de Souza - PROPPG/DCA - 4449	eglema@uel.br

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução do conteúdo das páginas em qualquer meio de comunicação, eletrônico ou impresso, sem autorização escrita dos autores