

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS DE INTERESSE INDUSTRIAL OBTIDOS A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO

Gláucia Lais Pereira Lima Neco¹; Sandra Aparecida Assis²;

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: glaucialaisneco@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Micro-organismos; semi-árido; Exopolissacarídeos.

INTRODUÇÃO

Uma variedade de produtos com aplicação tecnológica pode ser obtida a partir de micro-organismos. No Brasil, o semi-árido baiano apresenta grande diversidade de micro-organismos ainda não explorados, que podem ser utilizados como agentes biológicos para prospecção biotecnológica. Dentre as várias ferramentas ou sistemas utilizados pela biotecnologia, os micro-organismos têm destaque (MELO, 2005).

Os polissacarídeos são polímeros naturais, constituídos de um único tipo ou diferentes tipos de monossacarídeos, e embora estejam presentes em todos os seres vivos, a maior diversidade encontra-se no reino microbiano. Os polissacarídeos constituem um grupo de compostos abundantes e relevantes na biosfera, temos como exemplo, celulose e amido nos vegetais e glicogênio nos animais (LEHNINGER, 2002; GUIMARÃES et al., 2009).

Os polissacarídeos podem ser classificados como exopolissacarídeos (EPS) ou glucanas. Os EPS são metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, definidos por polissacarídeos extracelulares produzidos por grupos de bactérias e fungos (SUTHERLAND, 1998). Os polissacarídeos encontrados na parede celular de fungos são denominados glucanas, que são polímeros de glicose vastamente distribuídos na natureza e classificados de acordo com o tipo de ligação glicosídica - α , β - da cadeia principal (SILVA et al., 2006).

Vários exopolissacarídeos produzidos por micro-organismos ainda não foram adequadamente explorados e somente poucos têm sido produzidos em larga escala. Durante a produção dos exopolissacarídeos pelos micro-organismos, há parâmetros que podem influenciar no rendimento e na composição monossacarídica dessas moléculas, (SOUZA, 2004).

Polissacarídeos derivados de micro-organismos apresentam algumas vantagens de obtenção em relação às demais espécies, tais como: a não dependência das condições climáticas, maior rapidez na obtenção do produto acabado, o fato de poder utilizar matérias primas regionais e a necessidade de um menor espaço físico das instalações (ERNANDES et al., 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados micro-organismos isolados e identificados, provenientes do Laboratório de Enzimologia (LAEN), da Universidade Estadual de Feira de Santana, e mantidos em estufa a 28°C, até início da fermentação.

Condições de cultivo e extração

Os micro-organismos foram inoculados em placa de Petri contendo meio YM sólido (Composição: extrato de levedura 3,0 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; peptona de

carne 5,0 g/L; glucose 10,0 g/L e ágar 15,0 g/L) sob temperatura de refrigeração e cultivado em estufa de crescimento a 28 °C. Após esse período de crescimento, alçadas do micro-organismo foram inoculados em solução salina 0,45% até alcançar a absorvância de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Após isso, 10 ml deste inoculo foram acrescentado em 100 ml de meio YM líquido contendo extrato de levedura 3,2g/L, extrato de malte 3,0 g/L, peptona 5,0 g/L, glicose 10,0 g/L, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 2,0 g/L, fosfato de magnésio heptahidratado (MgSO_4) 2,7 g/L. A fermentação ocorreu em shaker durante 5 dias, a 100 rpm e 28°C. Após a fermentação foi realizada centrifugação e a biomassa foi seca em estufa a 50°C até se obter peso constante. O sobrenadante foi utilizado para a obtenção de exopolissacarídeos, sendo adicionado etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol/sobrenadante), e conservado a 4°C por 24 horas, para precipitar os polissacarídeos.

Processo de purificação

Para a purificação do exopolissacarídeo e da biomassa adicionou-se 10 volumes de NaOH 0,1M em 0,300g de polissacarídeo. Foram utilizados nove tubos de ensaio devidamente identificados, incubados em banho-maria com temperaturas e tempo segundo o planejamento experimental Dohlert (tempo: 60, 90, 120, 150, 180 minutos; temperatura: 50°C, 70°C e 90°C). Depois da incubação, as amostras foram centrifugadas em 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi identificado como fração álcali solúvel e o precipitado como a fração álcali insolúvel. As amostras foram secas a 55°C por 24h até atingir peso constante.

Análise estatística

Após obtenção dos resultados, os mesmos foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) através do programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA), para indicar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e o ajuste do modelo aos dados experimentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram, que a partir do micro-organismo *Cryptococcus liquefaciens* (302) obteve-se uma produção total de 21,87 gramas de exopolissacarídeo e 14,93 gramas de biomassa em três litros de inoculo (proporção de 0,729 g/100mL e 0,498 g/100mL respectivamente), já o micro-organismo *Rhodotorula orizycola* (D2T61) apresentou uma produção total de 31,11 gramas de exopolissacarídeo e 14,75 gramas de biomassa em quatro litros de inoculo (proporção de 0,778 g/100mL e 0,369 g/100mL respectivamente). Como mostra a Figura 1, a produção de exopolissacarídeo e da biomassa, foram quantificados para cada 100mL de meio YM líquido.

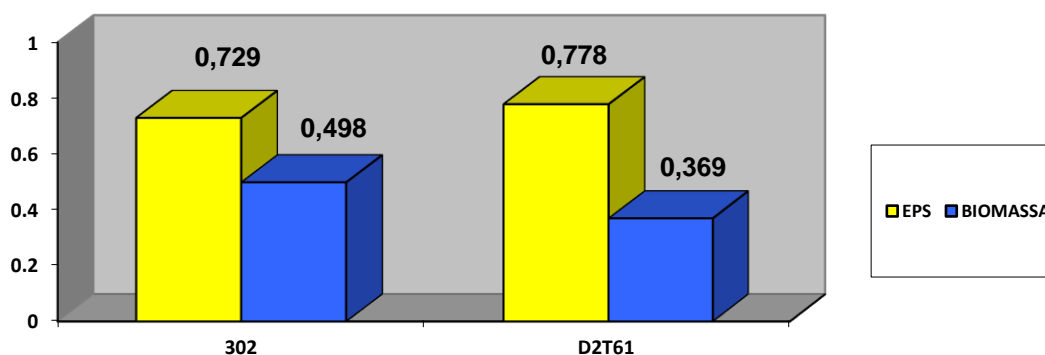


Gráfico 1: Produção de polissacarídeos a partir dos micro-organismos estudados (*Cryptococcus liquefaciens*, *Rhodotorula orizycola*), na proporção de g/100mL).

O objetivo da purificação é a obtenção do material desejado, com as características e as suas funções preservadas, eliminando as substâncias indesejadas, que resultaram da fermentação (DINI, 2010).

A partir dos resultados do micro-organismo *Cryptococcus liquefaciens* foram plotados os gráficos de superfície de resposta e de curvas de níveis (Figura 1) aonde se pode visualizar que a produção ótima em temperaturas de 45°C a 95°C, em tempos variando de 40 a 120 minutos. O valor de R^2 obtido é 0,98 (Tabela 1), indicando que 98% dos resultados são explicados pelo modelo experimental. O teste F, mostrou que o modelo está bem ajustado, uma vez que o valor de F calculado da falta de ajuste (0,19) é bem menor do que F tabelado (18,81). De acordo com o nível de confiança de 95%, a regressão correspondente é significativa, sendo que o F calculado = 31,73 é maior que F tabelado = 9,01.

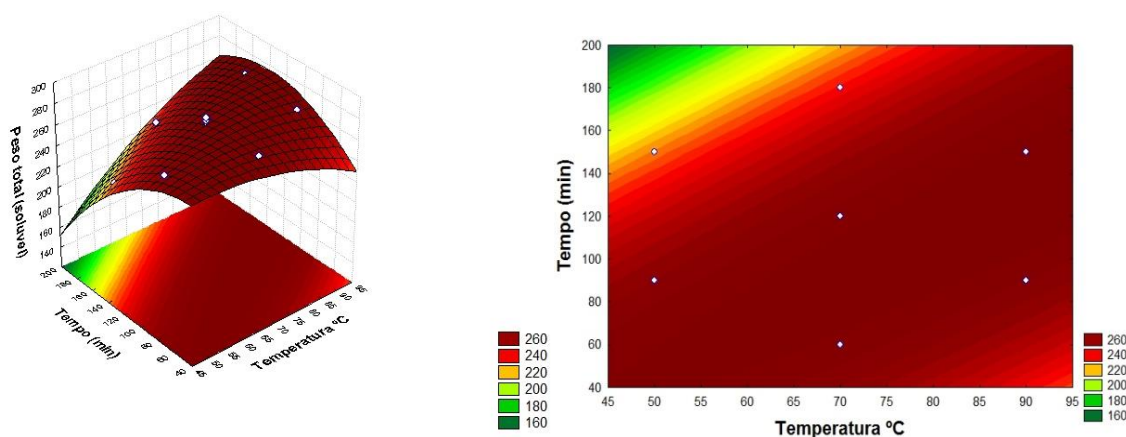


Figura 1: Gráfico superfície de resposta e curva de níveis - Influência do tempo e da temperatura na purificação da fração solúvel do exopolissacarídeo do micro-organismo *Cryptococcus liquefaciens*.

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) para purificação do exopolissacarídeo do micro-organismo *Cryptococcus liquefaciens*

TABELA DA ANOVA

	SQ	gl	QM	Fcal	Ftab 5%	R^2
Regressão	2441,83	5	488,3667	31,73	9,01	0,98
Resíduo	46,17	3	15,38889			
Ajuste	4,17	1	4,166667	0,19	18,81	
Erro	42,00	2	21			
Total	2488,00					

FONTE: Autora

Em relação ao micro-organismo *Rhodotorula orizycola*. A partir dos resultados foram plotados os gráficos de superfície de resposta e de curvas de níveis (Figura 2) aonde se pode visualizar que a produção ótima em temperaturas de 45°C a 75°C, em tempos inferiores a 120 minutos. O valor de R^2 obtido é 0,98 (Tabela 2), indicando que 98% dos resultados são explicados pelo modelo experimental. O teste F, mostrou que o modelo está bem ajustado, uma vez que o valor de F calculado da falta de ajuste (0,64) é bem menor do que F tabelado (18,81). De acordo com o nível de confiança de 95%, a regressão correspondente é significativa, sendo que o F calculado = 43,05, é maior que F tabelado = 9,01.

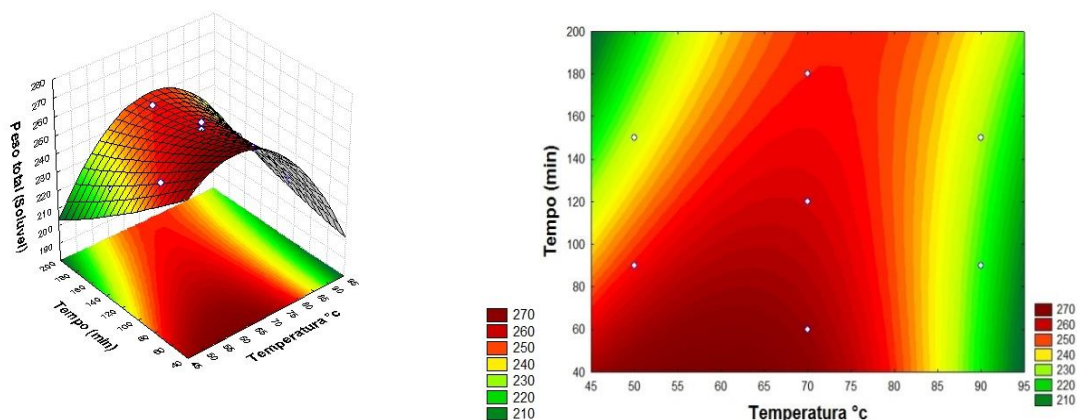


Figura 2: Gráfico superfície de resposta e curva de níveis - Influência do tempo e da temperatura na purificação da fração solúvel do exopolissacarídeo do micro-organismo *Rhodotorula orizycola*.

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para purificação do exopolissacarídeo do micro-organismo *Rhodotorula orizycola*.

TABELA DA ANOVA

	SQ	gl	QM	Fcal	Ftab 5%	R ²
Regressão	1770,22	5	354,0444	43,05	9,01	0,98
Resíduo	24,67	3	8,222222			
Ajuste	6,00	1	6	0,64	18,81	
Erro	18,67	2	9,333333			
Total	1794,89					

FONTE: Autora

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que foi possível a obtenção de polissacarídeos a partir dos micro-organismos *Cryptococcus liquefaciens* (302) e *Rhodotorula orizycola* (D2T61). Os polissacarídeos estão sendo identificados e serão avaliados quanto a atividade antioceptiva, antioxidante e anticoagulante.

REFERÊNCIAS

- DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização das proteases de Thermomucorindicae-seudaticae n 31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. G. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 69-80, 2005.
- GUIMARÃES, L. B. et al. **Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo Diaporthe phaseolorum var. caulivora.** **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, São Paula, 2009.
- LEHNINGER, A. L. et al. **Princípios de Bioquímica.** 5. ed. São Paulo: CBL, 2002.
- MELO, D. L. F. M. **Potencial biotecnológico do umbu: perspectivas para o semi-árido.** 2005.
- SILVA, M. DE L. C. et al. Caracterização química de glucanasfúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*. Vol. 29, No. 1, 85-92, 2006.
- SOUZA, D. M.; Garcia-Cruz, C. H.; **Semina ciênc. agrar.** 2004.
- SUTHERLAND, I. W. **Novel and established applications of microbial polysaccharides.** Trends in Biotechnology, Limerick, v.16, p.41-46, 1998.