

JULIANA NEGRÃO BORGES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA
PAREDE CELULAR DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Mara Woranovicz Barreira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tania Maria Bordin Bonfim

CURITIBA

2006

TERMO DE APROVAÇÃO

Ao meu querido marido Kiyoshi,
pelo amor incondicional e apoio em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da UFPR, que me receberam de portas abertas. Às minhas orientadoras, Sandra e Tania, que riram comigo e me mostraram os caminhos que me possibilitaram chegar aonde cheguei. Vocês se tornaram as minhas “segundas mães”.

Às equipes dos laboratórios de Síntese de Fármacos e Enzimologia e Tecnologia de Fermentações. Eu vou sentir muitas saudades da minha “casa na Federal”.

Às equipes dos laboratórios de Bioquimitecnologia na figura dos professores Fontana e Maurício; de Fitoquímica, professores Obdúlio e Tomoe; e de Tecnologia de Alimentos Dietéticos; professoras Patrícia e Grace, que me prestaram um auxílio valioso quando mais precisei.

Aos queridos amigos do programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Diogo, Fernanda, Juliana, Lauro, Marco, Rodrigo e Thales, pelo carinho e grande amizade com que me receberam!

Ao amigo Ricardo Wagner por todas as suas contribuições técnicas e toda a atenção, pelas brincadeiras e sumiços dos meus materiais do liofilizador!

À querida Ana Carolina, a minha prima Carol Cristina, pela amizade cativante, momentos de descontração e pelas escapulidas para tomar “milkshake” no Karina!

À amiga Maria Eugênia, que sempre “levantava a minha moral” quando me achava meio tristonha no corredor.

Ao “trio parada dura”, Valdina, Ignês e Hilda, sempre tão divertidas e tão calorosas.

Ao amigo Acyr, sempre pronto para me ouvir quando as coisas não iam bem. Eu sempre saía da sua sala com meu ânimo renovado depois de tantas risadas.

A todos que me acompanharam nestes 24 meses, riram ou choraram e participaram de sessões de terapia no corredor,

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, que sonharam em ver seus filhos formados e trabalharam para isso. Esse trabalho é também de vocês!

Ao meu marido Kiyoshi, que não deixou faltar o apoio e o amor nem ao longo desses dois anos de trabalho, nem ao longo dos quatro anos de convivência!

“...que a aritmética pode bem ser o assunto das cidades democráticas, pois ela ensina as relações de igualdade, mas somente a geometria deve ser ensinada nas oligarquias, pois demonstra as proporções na desigualdade.”

Michel Foucault – A Ordem do Discurso

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 POLISSACARÍDEOS.....	7
3.2 PAREDE CELULAR	10
3.3 A LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 MICRORGANISMO	24
4.2 OBTENÇÃO DA CULTURA PURA.....	24
4.3 MEIOS DE CULTIVO.....	24
4.3.1 Meio de manutenção da cepa	24
4.3.2 Meio pró-carotenogênico	25
4.3.3 Conservação do microrganismo	25
4.4 PREPARO DO INÓCULO.....	26
4.5 CULTIVO	26
4.5.1 Determinação do crescimento celular (Método turbidimétrico).....	27
4.6 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR	27
4.7 DOSEAMENTO DE ASTAXANTINA	27
4.8 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	28
4.9 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	32
4.9.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo	32
4.9.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling.....	32
4.9.3 Separação dos polissacarídeos do sobrenadante de Fehling por precipitação com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio).....	34

4.10	MÉTODOS QUÍMICOS.....	35
4.10.1	Hidrólise Ácida Total.....	35
4.10.2	Redução e Acetilação.....	36
4.10.3	Hidrólise Ácida Parcial.....	36
4.10.4	Metilação	37
4.11	MÉTODOS ANALÍTICOS	38
4.11.1	Cromatografia em Papel (CP) analítica	38
4.11.2	Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	38
4.11.3	Análise por Cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS)	39
4.11.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	39
4.11.5	Polarimetria	40
4.11.6	Doseamento de ácidos urônicos	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	OBTENÇÃO DA BIOMASSA CELULAR	42
5.2	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	42
5.3	PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	45
5.4	ANÁLISE DE RMN DAS FRAÇÕES DM FS E DM FP	52
5.5	ANÁLISE DA FRAÇÃO AQ I C10	54
6	CONCLUSÕES.....	66
7	REFERÊNCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Formas piranosídica e furanosídica da α -D-glucose.....	8
FIGURA 2 – Fórmulas em perspectiva de Haworth das formas piranosídicas da α -D-glucose e β -D-glucose.....	8
FIGURA 3 – Fórmula do dissacarídeo maltose.....	10
FIGURA 4 – Microscopia eletrônica de varredura de células vegetativas da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	18
FIGURA 6 – Isômeros da astaxantina.....	20
FIGURA 7 – Fluxograma do tratamento da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i> com dodecilsulfato de sódio	30
FIGURA 8 – Fluxograma da extração dos polissacarídeos da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	31
FIGURA 9 – Fluxograma do Processo de Purificação da Fração DM (extraída com dimetilsulfóxido) da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	45
FIGURA 10 – Fluxograma do Processo de Purificação das Frações AQ (extraídas com água a 80°C) da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i> .	46
FIGURA 11 – Espectro de HPSEC-MALLS obtido da fração AQ I FS solubilizada em água Milli-Q	50
FIGURA 12 - Espectro de HPSEC-MALLS obtido da fração AQ I C10 solubilizada em água Milli-Q	52
FIGURA 13 – Espectro de RMN ^{13}C da α -D-(1 \rightarrow 3)-glucana isolada na fração DM FS da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	53
FIGURA 14 – Espectro de RMN ^{13}C da fração AQ I C10 da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	55
FIGURA 15 – Espectro de RMN ^{13}C da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	57
FIGURA 16 – Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	58
FIGURA 17 – Espectro de ^1H , ^1H COSY da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	60
FIGURA 18 – Espectro de ^1H , ^1H TOCSY da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição monossacarídica qualitativa da parede celular de leveduras Basidiomicetos que não foram analisadas em RMN ¹ H no estudo de GORIN e SPENCER, 1966	14
TABELA 2 – Fragmentos oligossacarídicos formados a partir de acetólise parcial de polissacarídeos contendo manose em cadeias principais α-(1→6)-D-manopiranosose de leveduras Basidiomicetos em estudo de GORIN e SPENCER, 1966	15
TABELA 3 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de extração da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	43
TABELA 4 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de purificação por congelamento e degelo da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	48
TABELA 5 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de purificação por precipitação com solução de Fehling da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	49
TABELA 6 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de Cetavlon em diferentes pH da fração AQ I da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	51
TABELA 7 - Composição monossacarídica da fração “hidrólise parcial AQ I C10” em comparação com a composição do polímero original	56
TABELA 8 – Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C obtidos do heteropolímero da parede celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	59
TABELA 9 – Análise por metilação do heteropolímero da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i> , antes e após hidrólise parcial	62

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	- deslocamento químico
~	- aproximadamente
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY	- <i>two-dimensional homonuclear ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-correlated NMR spectroscopy</i>
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY	- <i>two-dimensional homonuclear ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-total correlated spectroscopy</i>
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMQC	- <i>two-dimensional heteronuclear ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$)-multiple-quantum coherence spectroscopy</i>
Cetavlon	- brometo de hexadeciltrimetilamônio
CLAE-FR	- cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
COSY	- <i>correlated spectroscopy</i>
CP	- cromatografia em papel
-D-	- açúcar da série D
Da	- Dalton
DEPT	- <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	- dimetilsulfóxido
Gal	- Galactose
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- Glucose
HMQC	- <i>heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy</i>
Hz	- Hertz
IR	- índice de refração
Man	- Manose
MHz	- megahertz
p	- piranosídico
p/v	- peso por volume
ppm	- partes por milhão

RMN ¹³ C	- ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	- ressonância magnética nuclear de próton
RMN	- ressonância magnética nuclear
rpm	- rotações por minuto
SDS	- dodecil sulfato de sódio
TOCSY	- <i>total correlated spectroscopy</i>
v/v	- volume por volume
Xyl	- Xilose

RESUMO

A levedura *Phaffia rhodozyma* vem sendo estudada como fonte de pigmentos carotenóides para emprego na ração em aquicultura. Apesar da alta produção de carotenóides, seu emprego é limitado devido à resistência da sua parede celular, que constitui uma barreira para a biodisponibilidade dos pigmentos. Células da levedura foram produzidas empregando processo descontínuo para estudo dos polissacarídeos da parede celular. Os polissacarídeos foram obtidos por extração aquosa em temperatura ambiente e a 80°C e dimetilsulfóxido. Em seguida, as frações obtidas foram purificadas por congelamento e degelo, precipitação com solução de Fehling e precipitação com solução de Cetavlon. Uma α -D-glucana e um heteropolissacarídeo foram isolados e estruturalmente investigados usando espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C (incluindo técnicas de COSY, TOCSY e HMQC), metilação e composição monossacarídica. A α -D-glucana foi isolada da fração extraída com dimetilsulfóxido e apresentou estrutura linear composta por uma cadeia de α -D-(1 \rightarrow 3)-glucopiranosose, semelhante à pseudonigerana isolada no fungo *Aspergillus niger* e outros polissacarídeos descritos em leveduras dos gêneros *Schizosaccharomyces* e *Cryptococcus*. O heteropolissacarídeo foi isolado da fração extraída com água em 80°C e apresentou uma estrutura complexa com cadeia principal α -D-(1 \rightarrow 4)-manopiranosose, cadeias laterais de β -D-(1 \rightarrow 4)-xilopiranosose e unidades internas e terminais não redutores de D-manose, D-galactose, D-glucose e D-xilose.

ABSTRACT

The yeast *Phaffia rhodozyma* has been studied as a source of carotenoid pigments for diet formulation in aquaculture. Even though its carotenoid production is high, its application is limited due to the resistance of the cell wall, which is a barrier for its pigments bioavailability. Yeast cells were cultivated using batch process and applied on cell wall polysaccharide research. The polysaccharides were obtained via aqueous extraction using cool water and 80°C heated water and dimethyl sulfoxide. Afterwards, the fractions were purified via freeze-thawing, Fehling's solution precipitation and Cetavlon precipitation. A α -D-glucan and a heteropolysaccharide were isolated and structurally investigated using ^{13}C and ^1H -NMR (including COSY, TOCSY and HMQC techniques), methylation analysis and monosaccharide composition determination. The α -D-glucan was isolated from dimethyl sulfoxide extraction and its structure was determined as a linear chain of α -D-(1 \rightarrow 3)-glucopyranosyl units, alike the pseudonigeran isolated from *Aspergillus niger* and other polysaccharides from various yeast of the genus *Schizosaccharomyces* and *Cryptococcus*. The heteropolysaccharide was isolated from 80°C heated water extraction and showed a complex structure containing α -D-(1 \rightarrow 4)-manopyranosyl units as main chain, β -D-(1 \rightarrow 4)-xylopyranosyl units in the side chains and D-mannose, D-galactose, D-glucose and D-xylose internal units and non reducing terminus.

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Phaffia rhodozyma* é um fungo Basidiomiceto e foi isolado por Herman Phaff na década de 70. Esta levedura fermenta a glucose e tem como característica marcante a produção de carotenóides, em especial a astaxantina, que corresponde a cerca de 80% da mistura total de carotenóides produzidos. O seu ciclo sexual ainda não foi demonstrado (JOHNSON; AN, 1991).

A astaxantina é o principal pigmento carotenóide empregado na aquicultura, principalmente na criação de salmões e trutas, sendo responsável pela coloração característica da carne destes peixes. Apesar de naturalmente estes animais apresentarem esse pigmento, eles não são capazes de sintetizá-los. Dessa forma o pigmento deve ser adicionado à sua dieta uma vez que a coloração característica das espécies é fator determinante da sua aceitação no mercado. A astaxantina sintética é a mais empregada por criadores, entretanto o custo é elevado e os pigmentos sintéticos podem apresentar configurações isoméricas menos eficientes ou mesmo outros derivados da síntese, diminuindo a eficiência da absorção do pigmento (JOHNSON; AN, 1991).

Existe uma tendência mundial em deixar de empregar nutrientes sintéticos na cadeia alimentar, aumentando o interesse nas fontes naturais. O emprego da levedura *Phaffia rhodozyma* como aditivo da ração animal vem sendo estudado devido a sua capacidade de utilizar diversas fontes de carbono como substrato, apresentar uma taxa de crescimento relativamente rápida e ainda possuir qualidade nutricional e segurança como aditivo alimentar (ACHEAMPONG, MARTIN; 1995).

Entretanto existe um impedimento para a utilização da levedura *Phaffia rhodozyma* em bioprocessos para produção industrial da astaxantina. A sua parede celular oferece uma barreira à absorção do pigmento por algumas espécies, reduzindo a sua biodisponibilidade. A parede celular da levedura é resistente, mesmo a métodos de lise enzimática e mecânica, principalmente quando se busca uma ampliação de escala laboratorial para industrial (CALO; GONZÁLEZ, 1995; SANTOPIETRO *et al.*, 1995).

A determinação da estrutura dos polissacarídeos constituintes da parede celular da levedura pode auxiliar no desenvolvimento de metodologias de lise específicas que possam ser empregadas em larga escala, visando aumentar a biodisponibilidade dos pigmentos carotenóides, especialmente a astaxantina. Assim, pode ser viabilizada a utilização da levedura *Phaffia rhodozyma* na produção de carotenóides por processos biotecnológicos em escala industrial.

Este trabalho tem como objetivo geral extrair, purificar e caracterizar os polissacarídeos constituintes da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- a. Obter células da levedura *Phaffia rhodozyma* utilizando processo descontínuo;
- b. Extrair, purificar, quantificar e analisar a composição do(s) polissacarídeo(s) da fração sobrenadante de Fehling da parede celular;
- c. Extrair, purificar, quantificar e analisar a composição do(s) polissacarídeo(s) da fração precipitado de Cetavlon da parede celular;
- d. Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos por meio de métodos químicos e espectroscópicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são o grupo de compostos mais amplamente distribuído na natureza e vêm despertando crescente interesse devido às suas propriedades físicas, bioquímicas e tecnológicas únicas e à variedade de aplicações em diversos aspectos da vida moderna (ZAIKOV, 2005). Podem exercer as mais variadas funções em sistemas biológicos, agindo como material de reserva, lubrificante de articulações, agentes de coesão e sinalização celular, componentes estruturais e substâncias de proteção (ASPINAL, 1982).

Os polissacarídeos são um dos três principais grupos de carboidratos, juntamente com os oligossacarídeos e os monossacarídeos. Estes últimos são os carboidratos mais simples e constituem as unidades químicas fundamentais a partir das quais são formados os outros tipos de carboidratos (ASPINAL, 1982; COLLINS; FERRIER, 1996).

Os monossacarídeos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas constituídos de 3 a 7 átomos de carbono, também denominados açúcares redutores. Todos os açúcares redutores, com exceção da diidroxicetona, possuem ao menos um carbono assimétrico sendo dessa forma opticamente ativos. Por convenção, os isômeros são denominados D ou L, de acordo com a configuração do carbono quiral mais distante do grupamento carbonila (ASPINAL, 1982; COLLINS; FERRIER, 1996).

Os açúcares redutores existem basicamente na sua forma cíclica, denominada hemiacetal no caso de um açúcar aldeídico e hemicetal no caso de um cetônico. Nesta configuração o grupamento carbonila (em C-1 para as aldoses e em C-2 para as cetoses) forma uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila presente na molécula (ASPINAL, 1982; COLLINS; FERRIER, 1996). No caso das pentoses e das hexoses, monossacarídeos de maior interesse biológico, o hemiacetal (ou cetal) em solução pode se apresentar como um anel de seis

membros, (forma piranosídica), ou como um anel de cinco membros, (forma furanosídica) (FIGURA 1) (ASPINAL, 1982; PARPHENYUK; DAVYDOVA, 2005).

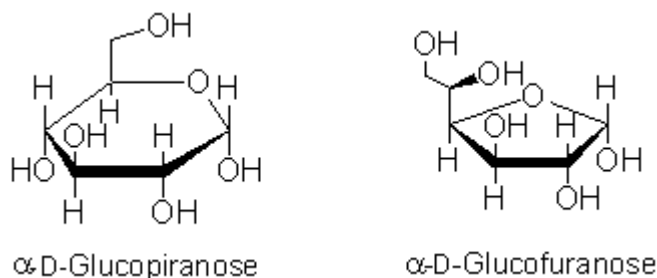


FIGURA 1 – Formas piranosídica e furanosídica da α -D-glucose

Em solução aquosa estas formas são interconvertíveis e esta conversão ocorre de modo que se estabeleça um rápido equilíbrio entre o intermediário acíclico e as formas cíclicas ocorrendo na maioria dos casos um predomínio da forma piranosídica devido a sua maior estabilidade em solução aquosa. A ciclização dos açúcares redutores leva à formação de um novo carbono assimétrico na molécula em C-1 para as aldoses e em C-2 para as cetoses, gerando duas novas formas anoméricas designadas α e β (FIGURA 2) e que são interconvertíveis entre si, fenômeno denominado mutarrotação (ASPINAL, 1982; COLLINS; FERRIER, 1996).

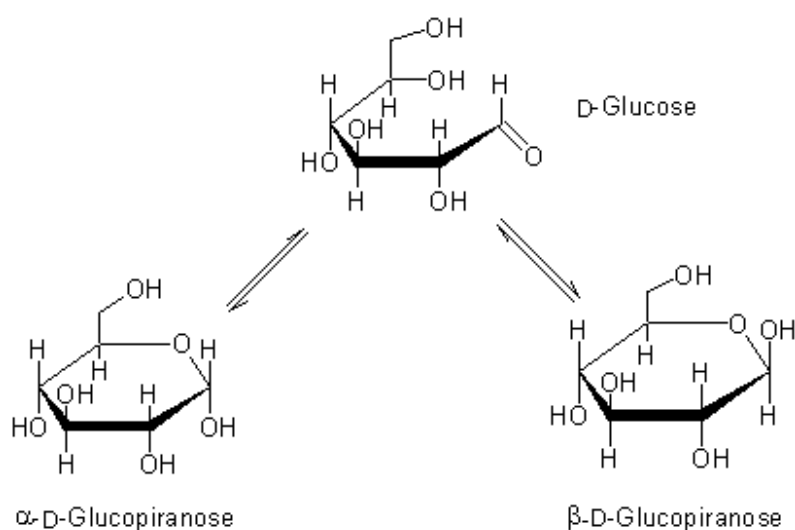


FIGURA 2 – Fórmulas em perspectiva de Haworth das formas piranosídicas da α -D-glucose e β -D-glucose

Os oligossacarídeos e polissacarídeos são moléculas mais complexas. Os oligossacarídeos são cadeias curtas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, que podem ser constituídas de dois a dez monossacarídeos sendo a sacarose o dissacarídeo tipicamente representante desta classe (PARPHENYUK; DAVYDOVA, 2005).

Os polissacarídeos são polímeros de condensação, constituídos de longas cadeias de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas. A ligação glicosídica ocorre entre o carbono anomérico C-1 de um hemiacetal ou C-2 de um hemicetal e um grupo hidroxila qualquer de outro açúcar que age comoceptor ou aglicona, apresentando uma conformação α ou β dependendo da configuração do carbono anomérico em ligação (ASPINAL, 1982).

Uma vez que as agliconas são compostos poli-hidroxilados, qualquer grupo hidroxila pode estar envolvido na ligação ou mesmo num mesmo monossacarídeo mais de um grupo hidroxila atue comoceptor. Desta forma, os polissacarídeos podem apresentar as mais variadas composições e conformações, além da possibilidade de serem lineares ou apresentarem ramificações. Cadeias compostas de um único tipo de unidade monossacarídica são chamadas homopolissacarídeos enquanto as compostas de diferentes tipos são heteropolissacarídeos. Os homopolímeros recebem uma denominação de acordo com o monossacarídeo que os compõe como, por exemplo, glucana para um homopolissacarídeo de glucose, manana para manose. De forma similar, os heteropolissacarídeos são denominados dependendo de sua composição. No caso de uma cadeia principal composta de manose contendo substituições de xilose, este polissacarídeo é denominado uma xilomanana (ASPINAL, 1982).

Quando se denomina polissacarídeo, deve-se levar em consideração o tipo de ligação glicosídica presente, informando não somente a conformação (furanosídica ou piranosídica) e o tamanho do anel de cada unidade envolvida, mas também suas formas enantioméricas D ou L, anoméricas α ou β , possíveis substituições nos monossacarídeos e tipo de ligação indicado com seta do grupo

glicosil para a aglicona. Como exemplo, pode-se citar a maltose como *O*- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosose (FIGURA 3), onde duas unidades de glucose na forma piranosídica encontram-se ligadas, o hemiacetal em configuração α em relação ao grupamento hidroxila de C-4 da aglicona (ASPINAL, 1982).

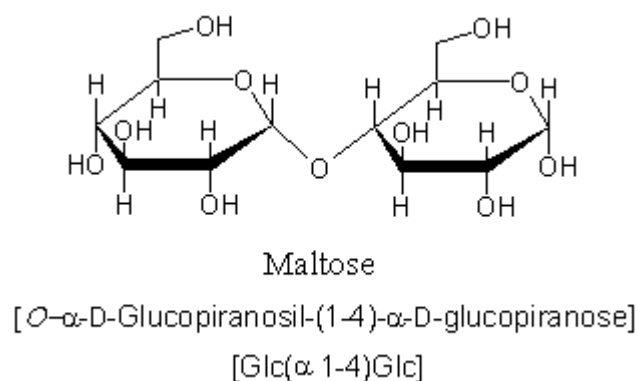


FIGURA 3 – Fórmula do dissacarídeo maltose

3.2 PAREDE CELULAR

A parede celular é uma camada relativamente rígida presente nas células de vegetais e microrganismos como bactérias, algas e fungos. Ela fornece suporte osmótico e determina o formato da célula, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e digestão extracelular (MAGNELLI, *et al.*, 2005).

Estruturalmente a parede celular dos fungos é muito semelhante à parede celular de vegetais, entretanto sua composição química é distinta desta. Os polissacarídeos correspondem a cerca de 80% a 90% da composição química da parede celular dos fungos, sendo os outros componentes proteínas, lipídios, polifosfatos e íons inorgânicos que constituem a matriz de sustentação da parede celular (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983; MADIGAN, *et al.*, 1997; LIPKE; OVALLE, 1998, CABIB, *et al.*, 2001).

A natureza dos polissacarídeos componentes da parede celular está freqüentemente ligada à posição taxonômica do fungo, sendo que diferentes espécies apresentam variações em seus constituintes e estrutura. Além disso, as

funções dos polissacarídeos na parede celular, sejam estruturais ou fisiológicas, são determinadas pelas suas propriedades físicas e estão diretamente relacionadas às diferenças de composição, à estrutura (primária, secundária e terciária) das cadeias poliméricas individuais e à maneira pela qual se arranjam para formar a parede celular (BUSH; HORISBERGER, 1972; SUGAWARA *et al.*, 2004).

A parede celular é uma estrutura complexa, composta de polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas interligados (MAGNELLI, *et al.*, 2005). Correlações taxonômicas foram propostas, baseadas nas diferentes interações entre as diferentes moléculas constituintes da parede celular dos fungos, especialmente a composição dos polissacarídeos. Diferentes associações foram relatadas, como a de celulose-glicogênio, celulose-glucana, celulose-quitina, quitosana-quitina, quitina-glucana, manana-glucana (ou polissacarídeos contendo manose-glucana), manana-quitina e poligalactosamina-galactana (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983). A maioria dos fungos apresenta a associação de quitina-glucana, sendo a quitina o principal componente estrutural dos fungos filamentosos (PERKINS; ROGERS, 1968; GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983).

As leveduras apresentam uma parede celular que corresponde a 15 a 25% do peso seco celular e é constituída de uma camada mais externa de polissacarídeo contendo manose ou manoproteínas sobrepondo uma camada de glucana insolúvel (BOTTON; SIEHR, 1979; LIPKE; OVALLE, 1998, GACTO, *et al.*, 2000). A camada interna de glucana insolúvel seria responsável pela resistência mecânica da parede celular, sendo seu principal componente estrutural. A camada externa seria responsável por eventos de reconhecimento célula-célula, além de limitar o acesso de agentes líticos às porções mais internas da parede celular e à membrana celular (KLIS, *et al.*, 2002).

As primeiras investigações acerca da parede celular de fungos unicelulares datam de 1894, quando Salkowski pesquisou materiais insolúveis remanescentes da extração de leveduras de panificação, (*Saccharomyces cerevisiae*), com hidróxido de sódio diluído a quente (PERKINS; ROGERS, 1968). Estudos sobre a composição

da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* realizados nesta época relatam como os seus principais constituintes glucanas, mananas e proteínas, sendo observada pequena quantidade de quitina (COOK, 1958; PERKINS; ROGERS, 1968).

Atualmente as características da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são bastante conhecidas, sendo uma estrutura organizada em camadas apresentando uma camada mais interna eletr-transparente e uma mais externa eletr-densa. A camada mais interna é constituída de 80 a 90% por uma β -(1 \rightarrow 3) glucana que apresenta de 3 a 4% de ramificações de segmentos β -(1 \rightarrow 6)-D-glucose dependendo do grau de maturação da célula (LEVIN, 2005). Esta glucana pode ser ainda dividida em duas frações que apresentam comportamentos distintos quando em contato com água, uma fração solúvel e uma insolúvel (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983, LIPKE; OVALLE, 1998; GACTO, *et al.*, 2000).

Os demais constituintes da camada interna são a quitina, um homopolímero linear de β -(1 \rightarrow 4) *N*-acetilglucosamina, presente em proporções reduzidas nas regiões de cicatrizes de brotamento e uma α -(1 \rightarrow 6)-glucana altamente ramificada, solúvel em água (KLIS, *et al.*, 2002; LEVIN, 2005). Finalmente, uma manana constituída de uma cadeia principal de α -(1 \rightarrow 6)-D-manopiranosose altamente ramificada foi descrita como constituinte da parede celular. As ramificações são 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 (STEWART, *et al.*, 1968).

As glucanas de estrutura predominantemente linear com ligações β -(1 \rightarrow 3) ou β -(1 \rightarrow 6) estão presentes na parede celular de varias espécies diferentes de leveduras, com maior ocorrência de estruturas 3- β -D-glucospiranosil (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983). Existe um crescente interesse no estudo destas β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas devido às suas propriedades imunomodulatórias (SUGAWARA, *et al.* 2004).

A parede celular da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, espécie considerada modelo de estudo da relação entre a formação da parede celular e o ciclo celular, apresenta de 46 a 54% de β -(1 \rightarrow 3) glucana que pode apresentar pequena proporção (4%) de ligações β -(1 \rightarrow 6) e um grau de ramificação de até 14% (MANNERS; MEYER, 1977; MAGNELLI, *et al.*, 2005). A quitina não está presente, mas outros polissacarídeos identificados são 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; SUGAWARA, *et al.* 2004).

Dentre as leveduras pertencentes à classe Basidiomiceto, destaca-se o interesse pelo estudo dos componentes da parede celular das espécies do gênero *Cryptococcus*, leveduras patogênicas de relevante importância médica. As glucanas são os principais componentes da parede celular dessas espécies. Na parede celular de *Cryptococcus albidus* a glucose é o monossacarídeo neutro mais abundantemente encontrado. A espécie *Cryptococcus neoformans* apresenta uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucopiranosana com 3% de ligações α -(1 \rightarrow 4) e nenhuma ramificação, uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucopiranosana com cerca de 10% de ramificações no carbono 3 (C-3) de cadeias laterais de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp. Em *Cryptococcus laurentii* foi extraída uma glucana constituída de ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6), e uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana linear foi extraída de diversas outras espécies de *Cryptococcus* (JAMES, *et al.* 1990).

Em 1966, GORIN e SPENCER analisaram as mananas constituintes da parede celular de 450 espécies de leveduras utilizando ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H). Dentre os objetos de estudo, leveduras pertencentes à classe Basidiomiceto foram investigadas, como diversas espécies do gênero *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Torulopsis*. As estruturas das mananas do gênero *Cryptococcus* e de espécies do gênero *Trichosporon* não foram determinadas devido à formação de soluções muito viscosas para análise, embora a composição monossacarídica destas frações tenha sido determinada qualitativamente (TABELA 1).

TABELA 1 – Composição monossacarídica qualitativa da parede celular de leveduras Basidiomicetos que não foram analisadas em RMN ¹H no estudo de GORIN e SPENCER, 1966

Espécie	Monossacarídeos ^a
<i>Cryptococcus laurentii</i> PRL 316-63	Gal, Man, Xyl, ácido urônico
<i>Cryptococcus melibiosum</i> PRL Y-125	Man, ácido urônico, tr. Gal
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Man, Xyl, ácido urônico
<i>Cryptococcus skinneri</i> PRL Y-126	Glc, Man, Xyl
<i>Cryptococcus terreus</i> PRL 62-507	Gal, Man, Xyl
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> PRL 62-518	Glc, Man, Xyl
<i>Sporobolomyces albidus</i> PRL 1985	Gal, Man, Xyl, ácido urônico
<i>Trichosporon cutaneum</i> PRL RS-1	Man, Ara, Xyl
<i>Trichosporon inkin</i> IGC 3727	Man, Xyl, tr. Fuc, Gal
<i>Trichosporon pullulans</i> NCYC 477	Man, Xyl
<i>Trichosporon sericeum</i> CBS-2544	Man, Xyl
<i>Trichosporon undulatum</i> CBS 2546	Man, Xyl

^a Ara: arabinose; Fuc: fucose; Gal: galactose; Glc: glucose; Man: manose; Xyl: xilose; tr.: traços; ácido urônico: ácido galacturônico ou glucurônico.
 FONTE: GORIN; SPENCER, 1966

Em diversas espécies dos gêneros *Torulopsis* e *Trichosporon* foram encontradas mananas formadas de cadeias principais de α -(1→6)-D-manopiranosose e as estruturas de oligossacarídeos formados por hidrólise parcial foram determinadas (TABELA 2). Outros arranjos estruturais diferentes da α -manana foram encontrados. Em *Trichosporon cutaneum* a cadeia principal da manana é formada por ligações α -(1→3), enquanto espécies de *Rhodotorula* e a levedura *Sporobolomyces roseus*

apresentam ligações alternadas de β -(1→3)-D-manopiranosose e β -(1→4)-D-manopiranosose.

TABELA 2 – Fragmentos oligossacarídicos formados a partir de acetólise parcial de polissacarídeos contendo manose em cadeias principais α -(1→6)-D-manopiranosose de leveduras Basidiomicetos em estudo de GORIN e SPENCER, 1966

Espécie	Oligossacarídeo formado por acetólise parcial de polissacarídeo ^a
<i>Torulopsis apícola</i> CBS 2868	$[\alpha$ -(1→2)-D-Manp] ₂₋₆ ^b
<i>T. bombicola</i> PRL 319-67	$[\alpha$ -(1→2)-D-Manp] ₂₋₈
<i>T. gropengiesseri</i> NRRL Y1445	$[\alpha$ -(1→2)-D-Manp] ₂₋₃
<i>T. lactis-condensi</i> CBS 52	α -D-Manp-(1→2)-D-Manp, α -D-Galp-(1→6)- α -D-Manp-(1→2)-D-Manp
<i>T. magnoliae</i> CBS 166	$[\alpha$ -(1→2)-D-Manp] ₂₋₁₀
<i>Trichosporon aculeatum</i> IGC 3551	$[\alpha$ -(1→2)-D-Manp] ₂₋₆
<i>T. fermentans</i> PRL 2263	α -D-Manp-(1→2)-D-Manp, α -D-Galp-(1→2)- α -D-Manp-(1→2)-D-Manp

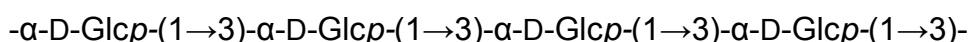
^a Manp: manopiranosose; Galp: galactopiranosose.

^b número de unidades no oligossacarídeo

FONTE: GORIN; SPENCER, 1966

A levedura *Phaffia rhodozyma* apresenta alta proporção de glucose na parede celular, sendo sugerida a presença da estrutura pseudonigerana como é encontrada em leveduras Basidiomicetos e Ascomicetos não formadores de brotos como, por exemplo, os gêneros *Schizosaccharomyces* e *Endomyces* (MILLER *et al.*, 1976). O termo pseudonigerana foi primeiramente utilizado para descrever um polissacarídeo insolúvel em água quente isolado do *Aspergillus niger* NRRL 326. Esta amostra mostrou ser uma α -D-glucopiranosana 3-O-ligada quase que

exclusivamente linear. A pseudonigerana é uma α -D-glucana insolúvel em água quente, sendo fortemente dextrorrotatória. É composta principalmente de unidades α -D-glucopiranosil 3-O-substituídas com 6% de terminais não-redutores, como apresentado na estrutura **1**. Polissacarídeos similares foram isolados de diversas espécies diferentes como, por exemplo, *Polyporus betulinus*, *Cryptococcus* e *Schizosaccharomyces* spp. (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983).



1

Análises preliminares da composição da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma* sugerem a presença de β -glucose na forma 1,3- β -D-glucana e 1,6- β -D-glucana; α -glucose como 1,3- α -D-glucana e a presença de um heteropolissacarídeo complexo formado por L-arabinose, D-xilose, D-ácido glucurônico e D-galactose (CALO; GONZÁLEZ, 1995).

BONFIM (1999) realizou uma investigação prévia dos polissacarídeos constituintes da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*. Foram obtidas duas frações principais, uma fração resultante de extração com dimetilsulfóxido em temperatura ambiente e fracionamento por diferença de solubilidade em solução aquosa de hidróxido de potássio e uma fração resultante de extração com solução aquosa de isotiocianato de lítio fracionada por diferença de solubilidade em solução aquosa de hidróxido de potássio, que foram analisadas por RMN ^{13}C . A α -glucose representou 70% da composição monossacarídica em ambas as frações, sugerindo a presença de uma α -glucana como polímero predominante. Outros açúcares monoméricos apresentados foram: galactose (de 1,5 a 3,5%), xilose (de 8 a 9%), e manose (de 13 a 30%) nas duas frações de extração. BONFIM (1999) sugere ainda a presença de uma cadeia de amilose ou de uma α -D-manana ramificada na parede celular.

3.3 A LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

A levedura *Phaffia rhodozyma* pertence à classe Basidiomiceto, assim classificada devido à presença de uma parede celular multicamada ou multilamelar, à composição polissacarídica dessa parede celular e da presença de brotamento enteroblástico. Foi isolada no início dos anos 1970 por Herman Phaff, Martin Miller, Minoru Yoneyama e Masumi Soneda a partir de exsudatos que se desprendem prematuramente de árvores decíduas de regiões montanhosas do Japão e Alasca, sendo inicialmente designada *Rhodozyma montanae*. Esta denominação foi posteriormente adequada ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica para *Phaffia rhodozyma* em homenagem aos diversos anos que Phaff dedicou ao estudo de leveduras (MILLER *et al.*, 1976; JOHNSON; AN 1991).

GOLUBEV (1995) propôs posteriormente a demonstração em laboratório do seu ciclo sexual de reprodução e denominou para essa levedura um novo gênero e espécie. A forma teleomórfica ou perfeita passou a ser conhecida por *Xanthophyllomyces dendrorhous* Golubev sp nov., e a forma anamórfica ou incompleta, *Phaffia rhodozyma*. Anos mais tarde, análises da região intergênica do DNA ribossomal, por meio de técnicas de biologia molecular, de cepas de cada um dos isolados dessas leveduras demonstraram haver diferenças significantes que separam os microrganismos como pertencentes a espécies diferentes (FELL e BLATT, 1999).

A levedura *Phaffia rhodozyma* apresenta células vegetativas elípticas isoladas (FIGURA 4), em pares ou formando cadeias curtas; pode apresentar um feixe de células ou pseudomicélio rudimentar sem micélio verdadeiro (MILLER *et al.*, 1976). Possui um mecanismo de brotamento semelhante ao das leveduras heterobasidiomicetos, apresentando uma parede celular com multicamadas próximo à área onde ocorre formação repetida de brotos. Essas camadas externas extras formam um colar quando um novo broto emerge enquanto a camada externa é contínua (MILLER *et al.*, 1976; ANDREWES *et al.*, 1976).



FIGURA 4 – Microscopia eletrônica de varredura de células vegetativas da levedura *Phaffia rhodozyma*.
 Fonte: JOHNSON; AN, 1991.

Uma característica distinta da levedura *Phaffia rhodozyma*, além de ser um microrganismo fermentador da glucose, é a sua capacidade de produzir pigmentos carotenóides. Nenhum dos pigmentos produzidos pela levedura encontra-se na sua forma esterificada e a astaxantina (FIGURA 5) é o pigmento mais abundantemente produzido, correspondendo a 83,87% da mistura total de carotenóides. Embora a configuração *trans* da astaxantina tenha sido a principal isolada, a configuração *cis* também é encontrada em todas as cepas (ANDREWES, *et al.*, 1976).

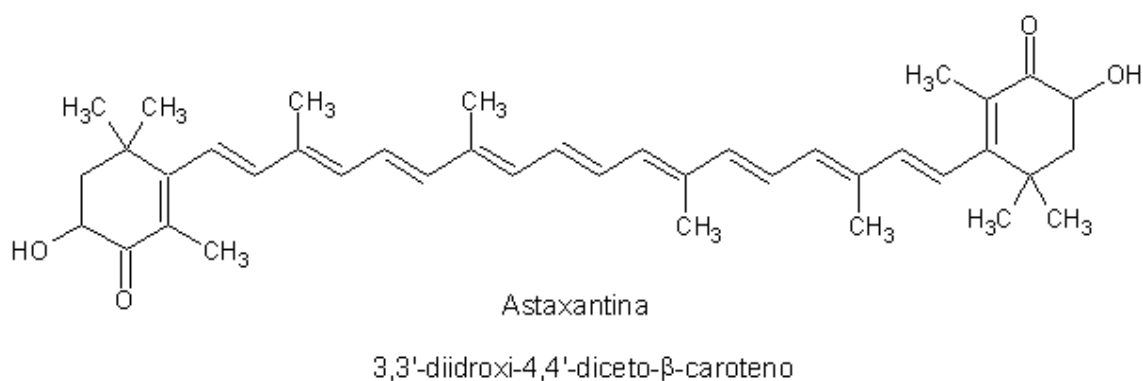


FIGURA 5 – Fórmula estrutural da astaxantina

Outros carotenóides identificados na mistura produzida pela levedura foram o β -caroteno, γ -caroteno, neurosporeno, licopeno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3-hidróxi-3,4-dideidro- β - ψ -caroten-4-ona (HDCO) e fenicoxantina. Além desses, relata-se também a presença de 4-hidróxi-3',4-dideidro- β - ψ -caroteno (HDC) e cantaxantina na cepa ATCC 24228. A função primária desses carotenóides na levedura é a proteção contra dano oxidativo, uma vez que reagem rapidamente com radicais livres formados e são produzidos em resposta a eles (ANDREWES, *et al.*, 1976; PARAJÓ, *et al.*, 1997).

A astaxantina (3,3'-diidróxi-4,4'-diceto- β -caroteno) é um pigmento carotenóide vermelho-alaranjado responsável pela pigmentação de animais maiores que se alimentam dos organismos produtores. Além da levedura *Phaffia rhodozyma*, outras fontes naturais de astaxantina são a microalga *Haematococcus pluvialis*, e crustáceos, principalmente o camarão *Pandalus borealis* e o "krill" *Euphansia pacifica* (JOHNSON; LEWIS, 1979; JOHNSON; AN, 1991).

O emprego da levedura *Phaffia rhodozyma* como aditivo da alimentação de salmonídeos tem sido estudado, principalmente devido ao fato da astaxantina ser o pigmento naturalmente encontrado nesses peixes e sua deposição na carne de salmões e trutas ser mais eficiente que outros carotenóides. Há uma tendência ao emprego de aditivos advindos de fontes naturais e uma preocupação crescente de produtores e consumidores de não inserirem aditivos químicos sintéticos na cadeia alimentar, por mais semelhantes aos naturais que estes possam ser (JOHNSON; AN, 1991).

Além do fato de que a coloração da carne de peixes como salmão e a truta é um fator determinante da aceitação e preço final destes produtos no mercado, a astaxantina ainda pode ser empregada na alimentação de aves visando o aumento da coloração de carnes de frangos e gema de ovos e resultando num aumento da sua atratividade no mercado (DIKE *et al.*, 1992; GOODWIN, 1992; STOREBAKKEN; NO, 1992).

O grande interesse no uso de fontes biológicas da astaxantina deve-se ainda ao seu elevado valor comercial e às desvantagens de sua síntese química total complexa, devido à presença de dois centros quirais em sua estrutura nos carbonos 3 e 3' fazendo com que esta possa se apresentar em quatro configurações (AN *et al.*,1991; REYNDERS *et al.*,1996). Das quatro configurações possíveis, 3R3'R, 3S3'S e as formas isoméricas 3R3'S e 3S3'R (FIGURA 6), a astaxantina 3R,3'R é configuração presente na levedura *Phaffia rhodozyma* e também naturalmente encontrada nos salmonídeos (JOHNSON; AN, 1991). Pigmentos carotenóides podem ser produzidos por meios químicos ou biotecnológicos e a astaxantina obtida a partir de fontes biológicas é uma alternativa mais atrativa à síntese química total uma vez que sistemas biológicos efetuam reações de síntese com maior seletividade (PARAJÓ *et al.*, 1998).

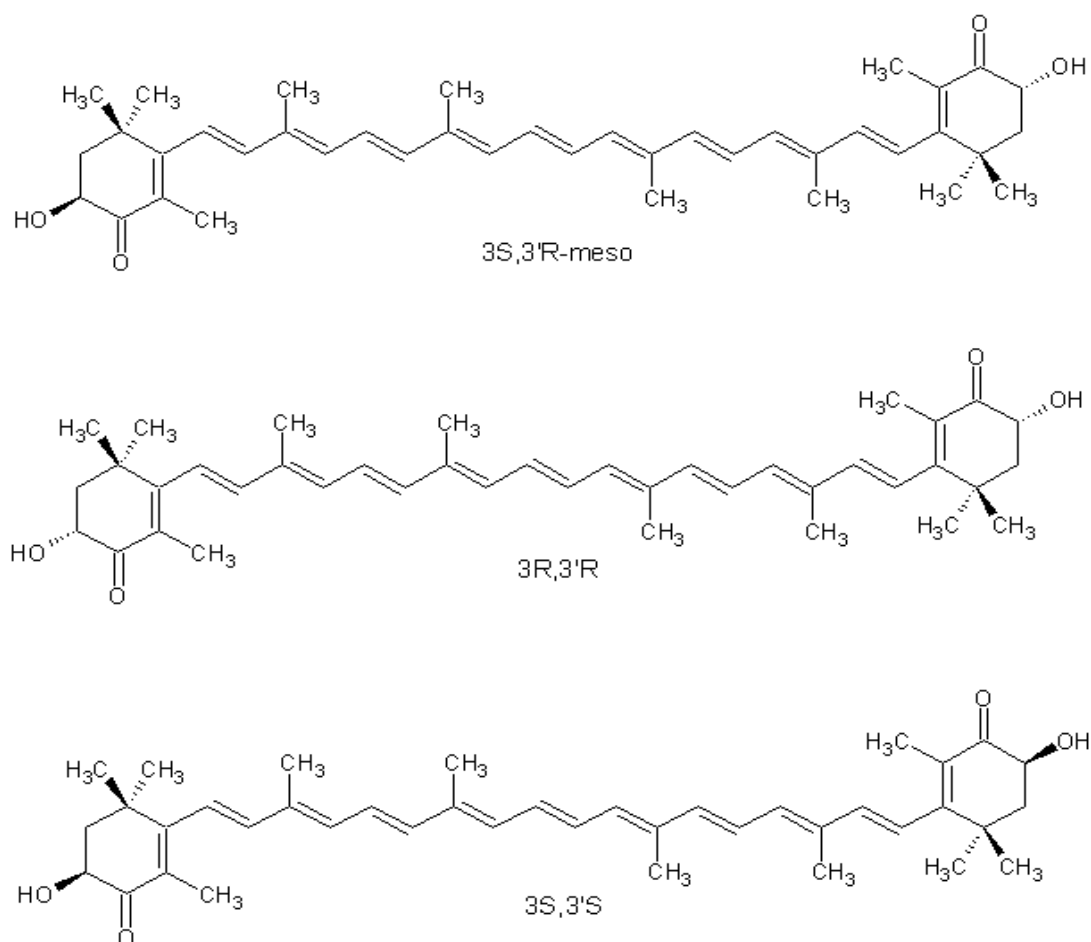


FIGURA 6 – Isômeros da astaxantina

No final de 2003, o mercado europeu de carotenóides contabilizou um total de US\$ 348,5 milhões, sendo as previsões para 2010 de até US\$ 419,6 milhões. O mercado de astaxantina, embora menor que o de licopeno e β -caroteno, tem crescido rapidamente, sendo previsto um aumento da sua participação no mercado de 26% entre 2000 e 2010. O segmento de aditivos de alimentação animal será o mais lucrativo até o ano de 2010, seguido pelo de suplementos e alimentos fortificados (NUTRAINGREDIENTS, 2005).

A levedura *Phaffia rhodozyma* pode ser utilizada como suplemento da dieta, não só como fonte de astaxantina, mas também como fonte alternativa de proteína, uma vez que sua composição de aminoácidos é semelhante à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, exceto pelos teores de metionina (FONTANA *et al.*, 1996).

Entretanto, a parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma* é um obstáculo para a absorção da astaxantina para algumas espécies. Quando da utilização de células intactas da levedura como complemento alimentar de trutas criadas em cativeiro, pouca ou nenhuma deposição dos pigmentos foi observada, enquanto na utilização de células rompidas observa-se uma alta pigmentação (JOHNSON *et al.*, 1977; JOHNSON *et al.*, 1980).

Para realizar a ruptura da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma* podem ser utilizados métodos mecânicos e enzimáticos. Entretanto, os métodos mecânicos disponíveis, como a prensa de French e o homogeneizador de Braun, são caros e podem ser utilizados para tratar apenas pequenos volumes de células (CALO; GONZÁLEZ, 1995). Os métodos enzimáticos são pouco aplicáveis devido à resistência da parede celular à digestão com zimolases ou outras β -1,3-D-glucanases (SANTOPIETRO *et al.*, 1995). Foram realizados ensaios onde se obteve digestão da parede celular utilizando meios de crescimento ricos em enzimas obtidos a partir da bactéria *Bacillus circulans*. Este procedimento permitiu a maior

liberação dos pigmentos, porém se aplicam efetivamente apenas em baixas concentrações de levedura (JOHNSON *et al.*, 1978; OKAGBUE; LEWIS, 1983, 1984, 1985).

Desta maneira, o conhecimento da estrutura da parede celular da levedura se torna importante para o desenvolvimento de metodologias enzimáticas que possam ser utilizadas em escala industrial visando aumentar a biodisponibilidade da astaxantina (BONFIM, 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

Cultura pura da levedura *Phaffia rhodozyma* (ATCC 24202) adquirida da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos da América.

4.2 OBTENÇÃO DA CULTURA PURA

Com o objetivo de obter uma cultura isenta de contaminação, um tubo contendo a levedura *Phaffia rhodozyma* cultivada em meio de conservação foi lavado com 5 mL de água destilada estéril. Desta suspensão de leveduras, 1 mL foi adicionado a um tubo contendo 9 mL de água destilada estéril, resultando na diluição 1:10 da suspensão original. Diluições sucessivas foram realizadas a partir da primeira diluição obtida, resultando nas diluições 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000. De cada diluição foram semeados 200 μ L em placas de Petri contendo meio sólido pró-carotenogênico acrescido de estreptomicina 30 μ g/mL e em meio sólido pró-carotenogênico acrescido de 0,6% (v/v) de uma solução aquosa de ácido tartárico 10% (p/v). As placas foram incubadas a 25°C durante 72 horas. As colônias isoladas foram selecionadas e repicadas em tubos contendo meio sólido pró-carotenogênico e incubadas nas mesmas condições. Após observação em microscópio, utilizando técnica a fresco, as culturas puras da levedura *Phaffia rhodozyma* foram repicadas em tubos contendo meio sólido pró-carotenogênico, incubados a 25°C durante 72 horas e em seguida armazenados sob refrigeração (4°C).

4.3 MEIOS DE CULTIVO

4.3.1 Meio de manutenção da cepa

A composição do meio de cultura para a manutenção da cepa da levedura *Phaffia rhodozyma* utilizada foi:

Sacarose	0,1 g
Extrato de levedura	0,05 g
Peptona	0,05 g
Água destilada q.s.p	100 mL

4.3.2 Meio pró-carotenogênico

O meio pró-carotenogênico utilizado foi composto por:

Sacarose	2 g
Extrato de levedura	0,1 g
Peptona	0,5 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Os meios para manutenção da cepa e o meio pró-carotenogênico sólido foram preparados em erlenmeyer e adicionados de 1,5 g de ágar por 100 mL de meio preparado. Os meios foram distribuídos a quente em tubos de ensaio e, após esterilização, inclinados para solidificação.

O meio pró-carotenogênico líquido utilizado no desenvolvimento do inóculo, e na obtenção da massa celular teve o pH ajustado para 6,0 com solução de hidróxido de sódio 2 mol/L. Os meios para manutenção, o meio pró-carotenogênico sólido e o meio pró-carotenogênico líquido foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atmosfera (atm) de pressão durante 20 minutos.

4.3.3 Conservação do microrganismo

O microrganismo foi cultivado no meio de manutenção durante 72 horas em estufa a 25°C e conservado em geladeira a 4°C. Foram realizados repiques trimestrais.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

A partir de uma cultura pura cultivada por 72 horas em meio pró-carotenogênico sólido foi preparada uma suspensão de células num balão volumétrico de 50 mL previamente esterilizado, tendo como diluente água destilada estéril. Essa suspensão foi capaz de fornecer densidade ótica em torno de 0,200 a 650 nm. Utilizando uma pipeta estéril, quantidade suficiente de suspensão de células foi transferida para Erlenmeyers contendo o meio de pró-carotenogênico líquido (item 4.4.2) previamente esterilizado. Os Erlenmeyers foram incubados em agitador orbital a 150 rpm, 24°C, durante 48 horas. Para verificar a pureza da suspensão das células, foram realizadas análises de coloração de Gram e exame a fresco em lâmina ao microscópio ótico (BIER, 1980). Os frascos onde foi efetuado o desenvolvimento do inóculo estavam preenchidos de modo a respeitar a proporção 1:5 entre o volume de meio de cultivo e volume do frasco. Após a incubação foi realizada a determinação da concentração celular pelo método da contagem de células em câmara de Neubauer e novo exame a fresco em microscópio ótico.

4.5 CULTIVO

O cultivo para obtenção das células foi realizado em bioreator de 5 L a 24°C, a 300 rpm, fluxo de aeração de 4 Lmin⁻¹ durante 96 horas (BONFIM, 1999). Amostras foram retiradas em intervalos regulares de 24 em 24 horas para acompanhamento do crescimento celular por determinação da densidade ótica (método turbidimétrico), determinação da concentração celular por contagem em câmara de Neubauer e controle do pH. Durante o cultivo a dorna do bioreator foi protegida com folhas de alumínio para evitar a degradação dos pigmentos carotenóides por ação da luz. Foi realizado o doseamento de astaxantina nas células secas obtidas após 96 horas de cultivo.

4.5.1 Determinação do crescimento celular (Método turbidimétrico)

O método turbidimétrico foi o método utilizado na determinação da concentração celular durante todo o processo, permitindo o acompanhamento do crescimento celular em cada intervalo de tempo de 24 horas. Pelo método turbidimétrico, a avaliação da concentração celular foi realizada por meio da diluição adequada das amostras com água destilada, seguida pela leitura em espectrofotômetro a 650 nm, a fim de obter uma leitura inferior a 0,60, onde existe linearidade entre a densidade ótica e a concentração celular, neste comprimento de onda (SLININGER *et al.*, 1982).

4.6 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR

A biomassa celular foi separada do meio de cultivo por centrifugação a 6000 rpm, com lavagens utilizando água destilada e em seguida as células foram congeladas e secadas em liofilizador até peso constante.

4.7 DOSEAMENTO DE ASTAXANTINA

A determinação da concentração celular e volumétrica de astaxantina foi realizada no final do processo, a fim de se determinar as produtividades e rendimentos do sistema em relação ao produto.

A 500 mg de células secas, foram adicionados 5 mL de acetona, seguido da imersão em nitrogênio líquido e maceração em gral com pistilo. A fração "solvente orgânico" foi coletada utilizando filtração em suporte de filtro de celulose. A extração do resíduo foi repetida duas vezes (extração exaustiva). As frações orgânicas foram reunidas resultando um volume final de aproximadamente 15 mL e homogeneizadas em vórtex. Em seguida a fração orgânica foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante filtrado em suporte de acetato de celulose regenerada (0,2 µm). Foi coletada uma alíquota de 1 mL para posterior análise por cromatografia

líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR). Desta amostra, foram injetados 10 µL em cromatógrafo líquido modelo Shimadzu LC-10A, equipado com coluna C18 Vydac 201TP54 4,6 mm x 250 mm. A coluna foi termostaticada a 30°C (Shimadzu CTO-10A). A fase móvel utilizada foi metanol:acetonitrila na proporção 90:10 (v/v), com fluxo de 1 mL/minuto. A identificação dos carotenóides foi realizada utilizando-se detector UV-visível Shimadzu SPD-10A em comprimento de onda de 477nm, com base no tempo de retenção dos compostos de interesse, determinado previamente por meio de cromatografia de amostras-padrão de concentração 1 mg/mL nas mesmas condições descritas. A dosagem dos compostos carotenóides está baseada em curva-padrão de astaxantina (2 – 10 mg/L), considerando a área dos picos de interesse para efeito de cálculos. Ao longo do processo de manipulação das amostras, o material foi mantido ao abrigo da luz, protegendo os recipientes com papel alumínio.

4.8 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

Dez gramas de células secas foram tratadas com 200 mL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 2% v/v sob agitação, durante 12 horas em temperatura ambiente. Os resíduos celulares foram separados do sobrenadante (rico em proteínas e ácidos nucleicos) por centrifugação a 15000 rpm durante 15 minutos (FIGURA 7). Este processo foi repetido quatro vezes obtendo-se quatro sobrenadantes: I, II, III e IV (BONFIM, 1999).

Cinco gramas do precipitado (rico em parede celular) foram extraídos com 100 mL de água destilada sob agitação constante, em temperatura ambiente durante 24 horas e em seguida centrifugados a 9000 rpm durante 15 minutos, repetindo-se o procedimento três vezes. Os sobrenadantes foram tratados com 3 volumes de etanol absoluto e o precipitado formado foi separado por centrifugação. O precipitado foi solubilizado em água quente, dialisado durante 24 horas e secado por liofilização

(FIGURA 8). De cada etapa de extração foram obtidas as frações AF I, AF II e AF III respectivamente.

O restante do material proveniente da extração com água fria foi extraído três vezes com 100 mL de água destilada aquecida a 80°C sob agitação constante durante 24 horas seguida de centrifugação a 9000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram tratados com 3 volumes de etanol absoluto e o precipitado formado foi separado por centrifugação. O precipitado foi tratado da mesma maneira que o obtido da extração com água fria. De cada etapa de extração foram obtidas as frações AQ I, AQ II e AQ III respectivamente.

O resíduo desta extração foi extraído três vezes com 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a frio durante 2 horas seguida de centrifugação a 9000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram tratados da mesma maneira descrita para as extrações com água. De cada etapa deste processo foram obtidas as frações DM I, DM II e DM III.

O resíduo celular resultante da extração com dimetilsulfóxido a frio foi congelado e reservado para análises posteriores e testes de extração com soluções alcalinas.

Após a secagem por liofilização de cada uma das frações obtidas dos processos de extração, foram calculados os rendimentos e determinada a composição monossacarídica conforme metodologias descritas a seguir.

Esse experimento de extração foi realizado três vezes, e cada processo empregando diferentes agentes extratores foi efetuado em três etapas (I, II e III).

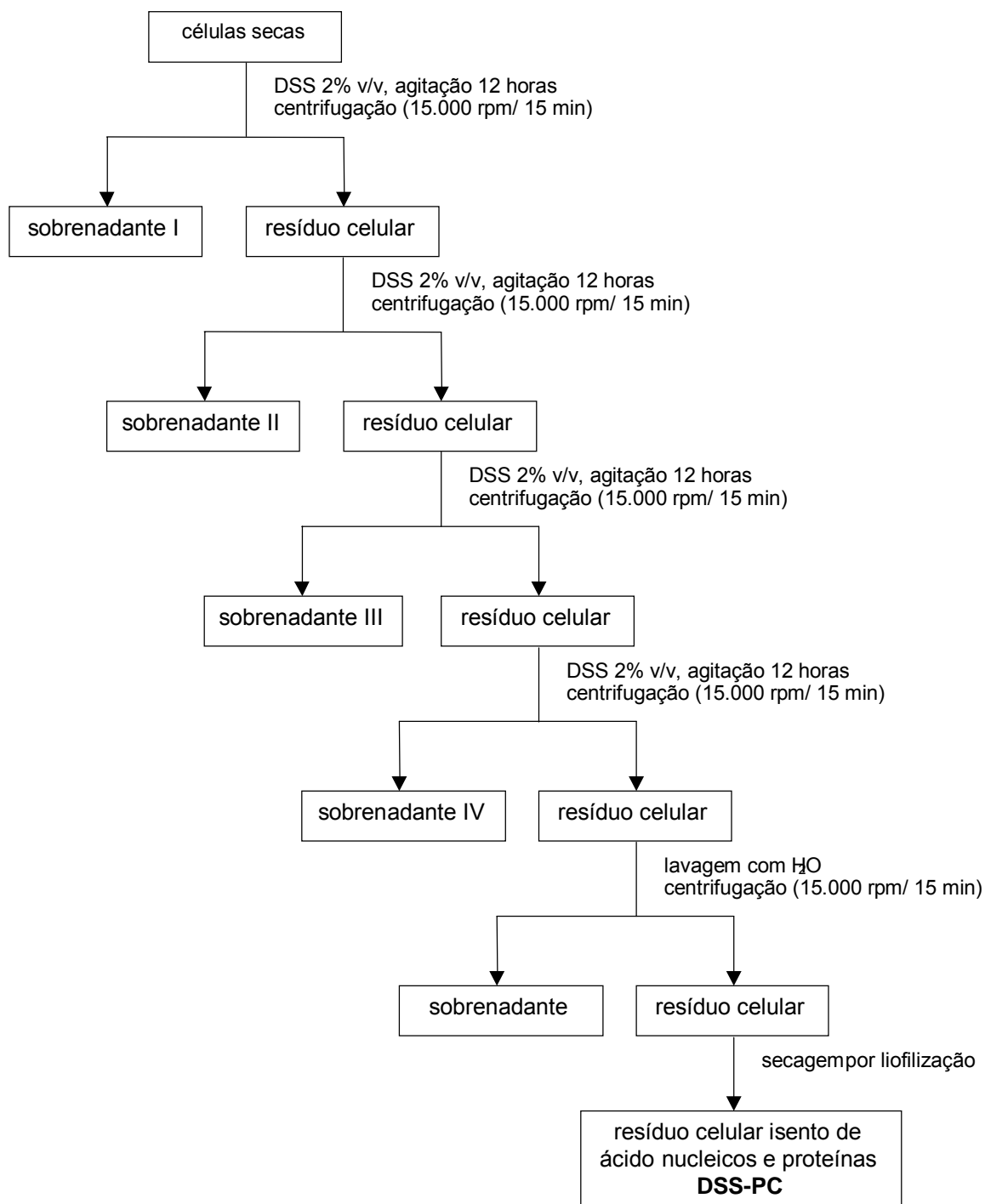


FIGURA 7 – Fluxograma do tratamento da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma* com dodecilsulfato de sódio

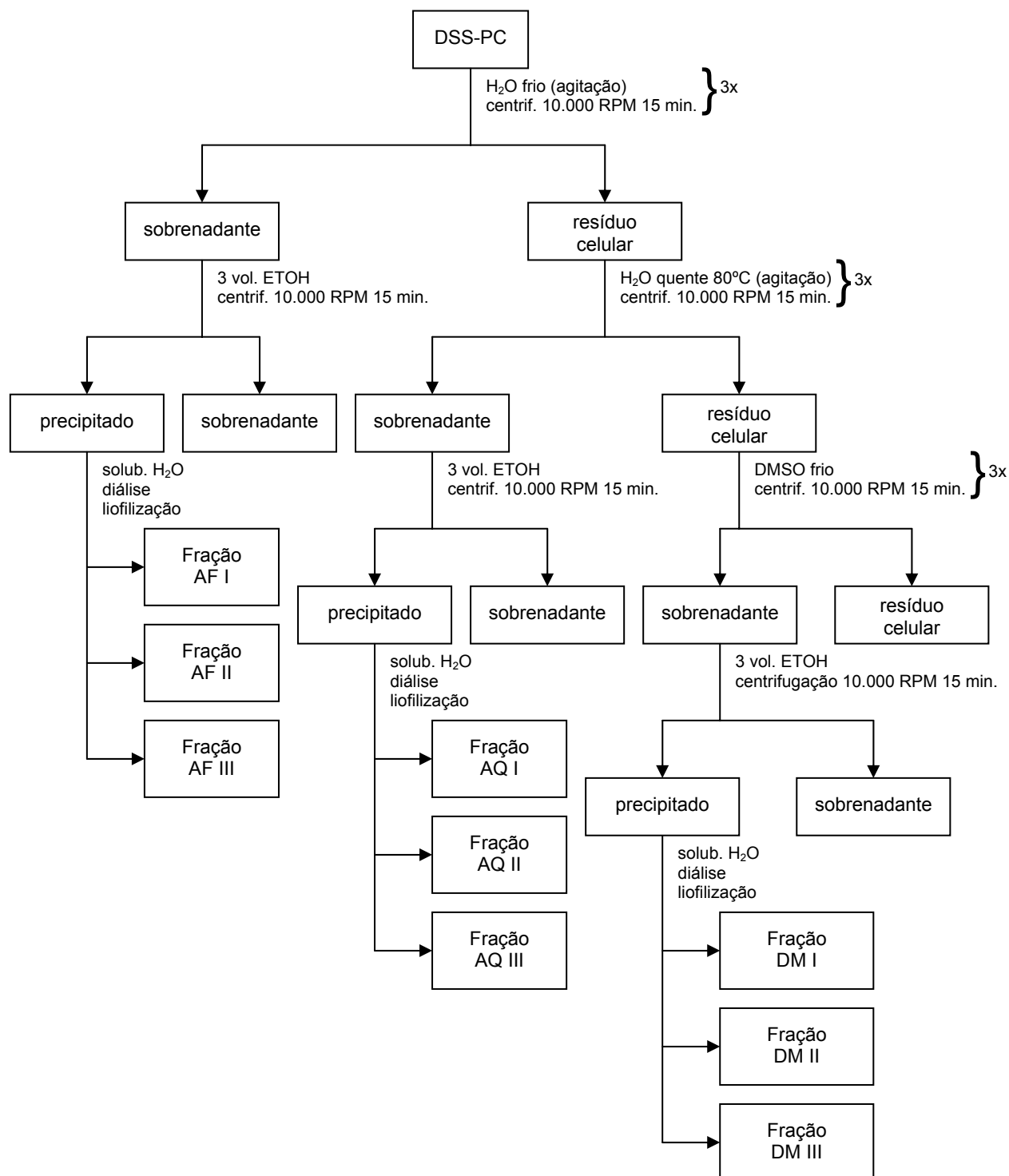


FIGURA 8 – Fluxograma da extração dos polissacarídeos da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*.

4.9 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.9.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

Os polissacarídeos componentes das frações obtidas foram submetidos ao processo de purificação por congelamento e degelo. Cada fração foi solubilizada em água destilada e a seguir submetida ao congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos componentes solúveis por centrifugação a 10.000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C, segundo BARON e colaboradores (1989). Em seguida, as frações obtidas foram novamente submetidas ao congelamento e degelo, separando o precipitado insolúvel do sobrenadante. Este processo de purificação foi repetido tantas vezes quanto necessário para que as frações “sobrenadante” e “precipitado” fossem adequadamente separadas, sendo o “sobrenadante” isento de formação de precipitado, e o “precipitado”, insolúvel, sem que fossem detectados polissacarídeos solúveis após tentativa de solubilização deste último em água destilada. A presença de polissacarídeos solúveis foi detectada pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Após estas etapas, os sobrenadantes foram reunidos, bem como os precipitados, e secados por liofilização. Deste procedimento foram obtidas as frações Precipitado e Sobrenadante do congelamento e degelo.

4.9.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling.

O sobrenadante seco resultante do processo congelamento-degelo das frações aquosas e o precipitado seco das frações extraídas com solvente orgânico (frações escolhidas devido ao maior rendimento) foram dissolvidos em volume de água suficiente para solubilizá-los (~40 mL). Em seguida adicionou-se igual volume da solução de Fehling. Após forte agitação manual, este material foi levado ao

congelador durante 10 minutos, e em seguida levado à geladeira durante 48 horas. O precipitado foi separado do sobrenadante de Fehling mediante centrifugação a 3.200 rpm, durante 8 minutos (JONES; STOODLEY, 1965).

O precipitado de Fehling foi lavado com solução aquosa de hidróxido de potássio 2% sob agitação e em seguida centrifugado a 3.200 rpm durante 8 minutos. Esta etapa foi realizada 4 vezes; na última vez foi realizada uma dosagem de açúcares no sobrenadante utilizando o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

O precipitado foi então lavado com metanol e centrifugado a 3.200 rpm durante 8 minutos, processo realizado três vezes. Em seguida, o complexo cúprico insolúvel foi decomposto por agitação em suspensão aquosa de resina Dowex na forma catiônica durante 1 hora. Após filtração dos polissacarídeos em solução, o pH foi ajustado para 7,0 utilizando solução de hidróxido de amônio 50% (v/v). A resina foi lavada cinco vezes com água destilada, a fim de serem totalmente retirados os polissacarídeos. A sua presença foi verificada pelo teste de fenol-ácido sulfúrico. A solução dos polissacarídeos foi concentrada sob pressão reduzida, dialisada contra água corrente durante 48 horas, congelada e secada por liofilização, a fim de ser obtido o rendimento.

O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético glacial na temperatura de 0-2°C até pH 7,0. Em seguida, foi dialisado contra água corrente e então deionizado por resinas Dowex nas formas catiônica e aniônica. Após esses procedimentos, o material foi concentrado sob pressão reduzida, congelado e secado por liofilização para ser calculado o rendimento. Esse material foi em seguida fracionado por Cetavlon.

4.9.3 Separação dos polissacarídeos do sobrenadante de Fehling por precipitação com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio).

O material proveniente da extração aquosa (AQ) obtido na fração sobrenadante de Fehling foi dissolvido em água destilada e submetido a um novo processo de fracionamento utilizando-se sal de amônio quaternário em diferentes pH, como descrito por SCOTT (1965) e DUARTE e JONES (1971).

Uma solução aquosa de Cetavlon 3%, pH 7,0, foi adicionada em igual volume (~50 mL) à solução dos polissacarídeos em água. Após a agitação magnética durante 30 minutos, a solução foi centrifugada a 3.200 rpm, durante 15 minutos. O precipitado formado nesta etapa foi descomplexado com solução de cloreto de sódio 4 mol/L; à solução obtida foi adicionado excesso de etanol e o precipitado separado por centrifugação a 8.000 rpm durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Em seguida o precipitado foi solubilizado em água destilada, dialisado contra água corrente durante 48 horas, congelado e secado por liofilização.

Ao sobrenadante da porção tratada com Cetavlon 3%, adicionou-se igual volume de tampão borato pH 8,5, sendo formado outro precipitado. Após agitação durante 1 hora, o precipitado obtido na forma de complexo polissacarídico boratado com base quaternária foi separado do sobrenadante mediante centrifugação a 3.200 rpm, durante 20 minutos. O precipitado foi descomplexado da mesma maneira acima descrita, exceto que o agente descomplexador utilizado foi solução aquosa de ácido acético em concentração 2 mol/L. Após esses procedimentos, calculou-se o rendimento dos materiais.

O sobrenadante da precipitação em pH 8,5 foi tratado com solução aquosa de hidróxido de sódio em concentração 1 mol/L com o auxílio do potenciômetro e sob agitação até pH 10,0. Após 30 minutos, foi observada a presença de pequena quantidade de precipitado, que foi isolado e descomplexado da mesma maneira descrita para o precipitado em pH 7,0.

Finalmente, o pH do sobrenadante foi elevado a 12,0 com solução aquosa de hidróxido de sódio em concentração 1 mol/L mantido em agitação. Após 30 minutos, também foi observada a presença de pouca quantidade de precipitado, que foi igualmente descomplexado.

Após, neutralizou-se a solução “sobrenadante final” com ácido acético concentrado na temperatura de 0-2°C. Foi realizado então um teste de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), o qual indicou a presença de açúcares nesta fração (sobrenadante de Cetavlon pH 12,0).

Essa porção teve seu volume reduzido no rotaevaporador; em seguida foi congelada e secada por liofilização. Após esse tratamento, a amostra foi dissolvida em pequeno volume de água e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada em 3.500 rpm durante 15 minutos. Ao precipitado foi adicionado excesso de etanol novamente. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. O precipitado final foi solubilizado em água destilada, dialisado durante 48 horas contra água corrente e secado por liofilização.

Os precipitados das etapas de complexação com Cetavlon tiveram os rendimentos e as composições monossacarídicas determinados para cada fração em estudo.

No presente trabalho apenas as estruturas das frações precipitadas por Cetavlon com borato pH 10,0 foram estudadas.

4.10 MÉTODOS QUÍMICOS

4.10.1 Hidrólise Ácida Total

Cinco miligramas do polissacarídeo foram submetidos à hidrólise ácida total com ácido trifluoroacético (HOUGH, *et al.*, 1972) 1 mol/L, durante 8 horas a 100°C, para a obtenção das unidades monossacarídicas que constituem os polissacarídeos (WORANOVICZ, 1995). Após este período o ácido trifluoroacético

foi removido do meio por evaporação até a secura. Uma vez seco, o material foi novamente solubilizado em pequena quantidade de água, sendo retirada uma pequena alíquota para análise por cromatografia descendente em papel para pesquisa de ácidos urônicos conforme descrito no item 4.11.1. O restante do material foi reduzido e acetilado para análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) (item 4.11.2).

4.10.2 Redução e Acetilação

O material totalmente hidrolisado foi solubilizado em água destilada e reduzido com boridreto de sódio durante 12 horas em temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Decorrido este período a solução foi tratada com resina catiônica fortemente ácida, filtrada e levada à secura em rotaevaporador sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi removido pela dissolução e evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila.

A reação para formação dos acetatos de alditóis foi feita com anidrido acético:piridina (1:1, v/v) em temperatura ambiente durante 16 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). O processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo moído, e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual da fração clorofórmica foi extraída mediante diversas lavagens com solução aquosa de sulfato de cobre a 5% (p/v) e a fração clorofórmica foi deixada evaporar até a secura. Uma vez secas, as amostras foram analisadas por GC-MS.

4.10.3 Hidrólise Ácida Parcial

Vinte miligramas do material polissacarídico foram submetidos à hidrólise ácida parcial com ácido trifluoroacético 0,1 mol/L em aparelho de refluxo durante 2 horas para a obtenção de oligossacarídeos a partir dos polissacarídeos originais. Decorrido este período, o aquecimento foi desligado e o sistema deixado resfriar até

temperatura ambiente. Depois de frio, o material foi congelado e secado por liofilização para remoção do ácido trifluoroacético. Em seguida, o material hidrolisado foi deixado em diálise fechada em tubo de 8000 Da durante 24 horas. Este procedimento foi repetido, e os dialisados foram concentrados e secados por liofilização. O material retido no tubo de diálise foi secado por liofilização e utilizado em análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e ensaios de metilação.

4.10.4 Metilação

Amostras de 5 mg dos polissacarídeos originais e de 3 mg do material de hidrólise parcial foram totalmente solubilizados em 2 mL de dimetilsulfóxido, sendo adicionado excesso de hidróxido de sódio anidro pulverizado. Em seguida foi adicionado 1 mL de iodeto de metila e a mistura foi agitada durante 30 minutos com auxílio de vórtex (CIUCANU; KEREK, 1984). A solução com o polissacarídeo metilado foi então neutralizada com gotas de solução aquosa de ácido acético 50% (v/v), dialisada contra água corrente durante 48 horas e secada por liofilização. O material foi submetido a uma nova repetição do procedimento de metilação, sendo, após a neutralização, extraído com clorofórmio. A fase clorofórmica foi lavada com água destilada diversas vezes para remoção do material inorgânico e do dimetilsulfóxido. Em seguida o clorofórmio foi evaporado e o material submetido à hidrólise com ácido sulfúrico 72% (p/v) em banho de gelo durante 1 hora. Após esse período foram adicionados 4 mL de água destilada e o material foi transferido para estufa a 100°C durante 18 horas (SAEMAN *et al.*, 1954). O material metilado foi neutralizado com carbonato de bário, centrifugado e secado por liofilização. Após a secagem, o material foi submetido ao processo de acetilação como descrito, exceto pelo passo de redução que será feito com boroidreto de sódio deuterado.

4.11 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.11.1 Cromatografia em Papel (CP) analítica

Cromatografias analíticas descendentes foram realizadas em papel Whatman n° 1 para os materiais totalmente hidrolisados para a observação das unidades monossacarídicas presentes nos polissacarídeos (utilizando padrões conhecidos) e determinação da presença de monossacarídeos ácidos. Os solventes utilizados como fase móvel foram *n*-butanol:piridina:água (5:3:3) com tempo de corrida de 24 horas (HOUGH; JONES, 1962). A revelação das cromatografias em papel foi feita pela detecção dos açúcares com soluções saturada de nitrato de prata:acetona (1:250 v/v), hidróxido de sódio (40%):etanol (1:25 v/v) e tiosulfato de sódio 5% (p/v) (TREVELYAN *et al.*, 1950).

4.11.2 Análise por 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.

As colunas usadas para as análises foram DB-225 ou DB-23, ambas de sílica fundida com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As amostras foram diluídas em acetona e 1 µl 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.

4.11.3 Análise por Cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS)

Amostras dos polissacarídeos purificados foram submetidas à análise de cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores para determinação de sua homogeneidade. As amostras de 1 mg foram solubilizadas em 1 mL de água miliQ. A solução macromolecular foi filtrada através de membrana de Millipore de 0,20 μm e aplicada ao cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de espalhamento de luz em multiângulos a 632,8 nm (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série.

O cromatógrafo está equipado com 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão $1 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ em série. Foi utilizado como eluente NaNO_2 0,1 mol/L, contendo NaN_3 200 ppm, com um fluxo de 0,6 mL/minuto, 30°C e pressão de 920 psi, monitorada por bomba peristáltica WATER 515. O programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY) foi utilizado para obtenção dos valores de massa molecular.

4.11.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os polissacarídeos foram caracterizados estruturalmente utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais realizados em espectrômetro Bruker Avance DRX 400, série AVANCE, com frequência para o próton de 400,1319 MHz. As amostras foram analisadas a 50°C ou 70°C em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro em 150 mm de comprimento utilizando óxido de deutério ou dimetilsulfóxido deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, utilizando padrão de acetona considerando-se como referência o sinal de δ 2,224 para RMN ^1H e δ 30,2 para RMN ^{13}C .

4.11.5 Polarimetria

As rotações específicas das amostras solúveis em água foram obtidas com soluções aquosas 0,1% (p/v) em polarímetro digital RUDOLPH RESEARCH AUTOPOL II, em comprimento de onda de 546 e 589 nm na temperatura de 25°C.

4.11.6 Doseamento de ácidos urônicos

O doseamento de ácidos urônicos foi realizado segundo a metodologia descrita por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Foi preparada uma solução do polissacarídeo na concentração de 10 mg/mL. A curva padrão utilizada foi preparada empregando solução de ácido glucurônico 100 µg/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Da solução de polissacarídeo preparada, foram separados 400 µL de amostra, em tubo de ensaio, sendo adicionados em seguida 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico/sulfamato de potássio 4 mol/L. Posteriormente foram adicionados 2,4 mL de solução de tetraborato de potássio 75 mmol/L em ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi agitado vigorosamente co auxílio de Vórtex e a mistura aquecida em banho-maria fervente durante 20 minutos. Após decorrido esse tempo, a mistura foi resfriada e foram adicionados 80 µL de solução de *m*-hidroxi-bifenil (Sigma) 0,15% em solução aquosa de hidróxido de sódio 0,5% para formação do complexo colorido, que tem leitura no comprimento de onda de 525 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA CELULAR

Para a obtenção de quantidade suficiente de biomassa celular foram realizados diversos cultivos sucessivos, sendo que a biomassa obtida dos diferentes cultivos foi reunida em uma biomassa total para a extração dos polissacarídeos da parede celular. Após a homogeneização das células, foi realizado o doseamento de astaxantina conforme descrito no item 4.7. A concentração de astaxantina da biomassa total foi de 163,33 $\mu\text{g/g}$ de biomassa.

Diversos autores realizaram estudos sobre a produção de astaxantina por cepas selvagens da levedura *Phaffia rhodozyma*. Entre estes, VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJÓ (1997) estudaram o efeito de várias fontes de carbono em oito cepas selvagens da levedura *Phaffia rhodozyma*. Quando cultivada em sacarose a cepa selvagem ATCC 24202 apresentou rendimento em carotenóide de 137 $\mu\text{g/g}$ de biomassa, valor próximo ao obtido neste trabalho empregando a mesma cepa da levedura, demonstrando o desenvolvimento sadio do microrganismo durante os processos de obtenção de massa celular.

Embora a produção do carotenóide não seja objetivo deste trabalho, convém ressaltar que a produtividade do microrganismo pode ser elevada quando empregadas condições apropriadas. Rendimentos superiores a 300 $\mu\text{g/g}$ de biomassa foram relatados em outros estudos, sendo demonstrados rendimentos de até 600 $\mu\text{g/g}$ de biomassa utilizando como fonte de carbono matéria-prima de baixo custo (HAYMAN, *et al.*, 1995; ACHEAMPONG, MARTIN, 1995; FONTANA, *et al.*, 1996; FONTANA, *et al.*, 1997; PARAJÓ, *et al.*, 1998; MORIEL, *et al.*, 2004; MORIEL, *et al.*, 2005).

5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A extração dos polissacarídeos foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos, item 4.8. Foram realizados três experimentos, constituídos de três processos de extração que empregaram os solventes extratores na seguinte

ordem: água em temperatura ambiente, água a 80°C e dimetilsulfóxido. Cada processo de extração foi composto por três etapas, e cada etapa deu origem a uma fração diferente. Dessa forma, de cada experimento realizado foram obtidas três frações do processo empregando água em temperatura ambiente, três do processo empregando água a 80°C e três empregando dimetilsulfóxido, num total de nove frações por experimento. Cada experimento utilizou uma porção proveniente da mesma biomassa total (um experimento empregou 20g e dois empregaram 5g). Após a realização de cada experimento, foram calculados o rendimento e a composição monossacarídica do material obtido. Os resultados que estão apresentados na TABELA 3 correspondem à média entre os dados dos experimentos.

TABELA 3 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de extração da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

Fração	Rendimento (g%) ^a	Monossacarídeos constituintes da fração (mol%) ^b			
		Xyl	Man	Gal	Glc
AF I	2,72	20,4	48,1	11,7	19,9
AF II	1,51	11,8	32,6	13,4	42,2
AF III	0,84	19,8	44,9	15,2	20,1
	5,07				
AQ I	3,04	21,0	50,9	11,0	17,1
AQ II	4,73	14,7	39,6	9,4	36,3
AQ III	2,55	11,6	31,0	9,9	47,5
	10,32				
DM I	6,45	4,5	11,6	5,9	78,0
DM II	2,80	4,2	10,9	2,8	82,1
DM III	0,68	2,9	8,6	2,8	85,7
	9,93				

^aRendimento calculado com base no peso total da célula seca sem tratamento prévio com dodecilsulfato de sódio 2% (p/v). ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40°C → 220°C.

As frações extraídas com água a 80°C e dimetilsulfóxido foram as escolhidas para dar procedimento aos processos de purificação, uma vez que apresentaram rendimento de aproximadamente 10% cada, em contraste com as frações extraídas com água em temperatura ambiente, que forneceu rendimento de aproximadamente 5%. As frações extraídas empregando água em temperatura ambiente foram reservadas para estudos posteriores.

Observou-se que as frações obtidas com água em temperatura ambiente e com dimetilsulfóxido apresentaram rendimento decrescente: de 2,72 a 0,84% e de 6,45 a 0,68% respectivamente. Na extração empregando água a 80°C, entretanto, esse comportamento não se repetiu, sendo obtido o maior rendimento na segunda etapa do processo. Esse comportamento sugere que a primeira etapa de extração com esse solvente não foi eficiente para esgotamento do material solúvel, explicando o aumento do rendimento da segunda etapa.

Analisando os conteúdos percentuais de manose e glucose entre os processos de extração, verificou-se conteúdo decrescente de manose (de 50,88 a 8,59 mol%) em paralelo a um conteúdo crescente de glucose (de 17,06 a 85,72 mol%). Essa observação é condizente com dados da literatura que descrevem a parede celular da levedura em estudo como constituída de uma camada mais externa composta por polímeros de manose sobreposta a uma camada interna composta por polímeros de glucose (MILLER *et al*, 1976; GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983; JOHNSON; AN, 1991).

Foram realizadas análises por cromatografia em papel e doseamento de ácidos urônicos, conforme Material e Métodos, itens 4.11.1 e 4.11.6, mas esses não foram detectados em nenhuma das frações em estudo.

Para a realização dos processos de purificação, cada uma das frações obtidas com água a 80°C (frações AQ) foi tratada isoladamente devido à considerável diferença na sua composição monossacarídica. No caso das frações de extração com dimetilsulfóxido houve similaridade na composição monossacarídica,

sendo então as três frações agrupadas numa única fração denominada DM, que foi submetida aos procedimentos de purificação.

5.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

O esquema de purificação das frações em estudo encontra-se representado nas figuras 9 e 10.

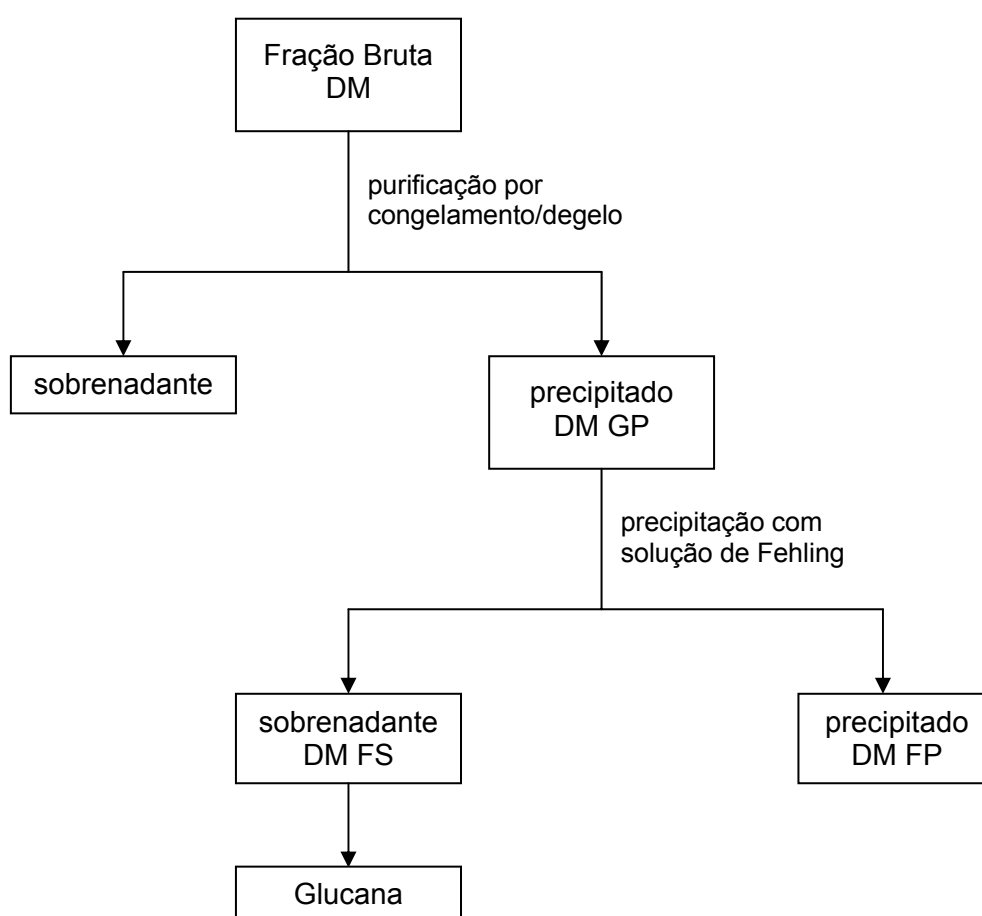


FIGURA 9 – Fluxograma do Processo de Purificação da Fração DM (extraída com dimetilsulfóxido) da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

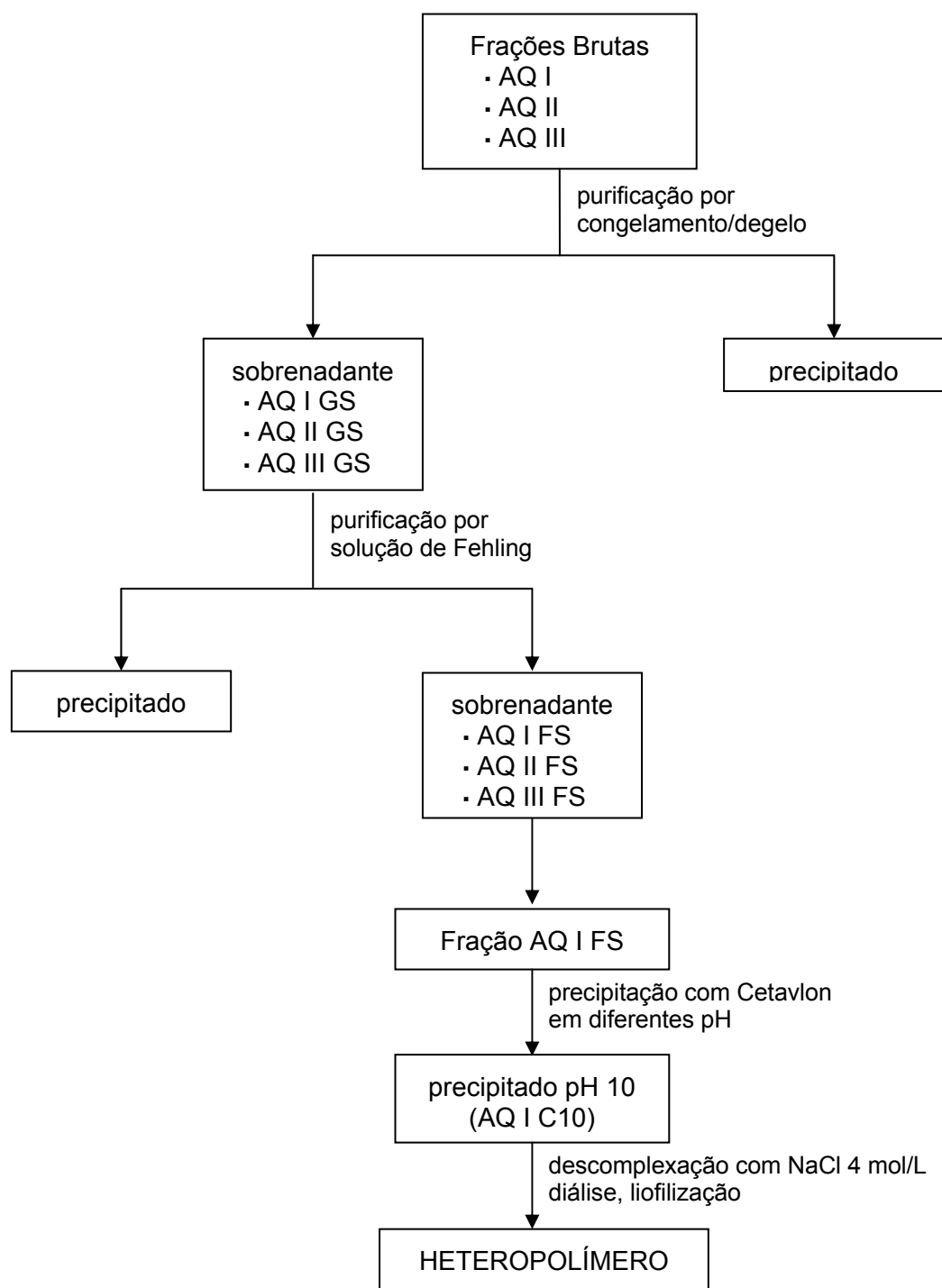


FIGURA 10 – Fluxograma do Processo de Purificação das Frações AQ (extraídas com água a 80°C) da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

As frações AQ I, AQ II, AQ III e DM foram primeiramente submetidas ao processo de purificação por congelamento e degelo (Material e Métodos, item 4.9.1). A partir de cada uma das frações brutas foram obtidas duas frações de congelamento e degelo, a fração “sobrenadante” e a fração “precipitado”. As frações brutas AQ apresentaram como subfração principal a fração “sobrenadante” de congelamento e degelo (AQ I GS, AQ II GS, AQ III GS), enquanto a fração bruta DM apresentou como subfração principal a fração “precipitado” (DM GP). Os rendimentos e composição monossacarídica de cada fração de congelamento e degelo foram calculados (tabela 4), com exceção da composição das frações com rendimento abaixo de 1%, que não foram analisadas.

Comparando os valores obtidos nas tabelas 3 e 4, verificou-se que houve um aumento na concentração molar relativa de manose e galactose nas frações AQ I GS e AQ II GS. Esse aumento da concentração dos monossacarídeos citados não ocorre na fração AQ III GS, onde se verifica a redução desses açúcares e o aumento da concentração de glucose na fração. Esse comportamento pode sugerir a presença de um heteropolímero composto majoritariamente por manose, além de uma glucana ou mistura de glucanas como polímeros predominantes nessas frações. Como na fração DM não se observou modificação significativa nas concentrações molares relativas dos monossacarídeos e a fração “sobrenadante” (DM GS) apresentou rendimento abaixo de 1%, verificou-se que os prováveis contaminantes do polímero principal dessa fração têm baixa solubilidade em água.

As amostras em que se obtiveram maiores rendimentos foram submetidas à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, com exceção da amostra DM GP que não pôde ser analisada por essa metodologia devido à sua insolubilidade em água. Como todas as amostras apresentaram heterogeneidade (dados não mostrados), procedeu-se à purificação por precipitação com solução de Fehling.

TABELA 4 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de purificação por congelamento e degelo da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

Fração	Congelamento/ degelo	Rendimento (g%) ^a	Monossacarídeos constituintes da fração (mol%) ^b			
			Xyl	Man	Gal	Glc
AQ I GS	sobrenadante	2,28	17,1	51,8	11,4	19,7
AQ I GP	precipitado	0,42	nd	nd	nd	nd
AQ II GS	sobrenadante	1,85	13,6	42,6	10,1	33,7
AQ II GP	precipitado	0,81	nd	nd	nd	nd
AQ III GS	sobrenadante	1,25	7,5	25,2	8,3	59,1
AQ III GP	precipitado	0,90	nd	nd	nd	nd
DM GS	sobrenadante	0,47	nd	nd	nd	nd
DM GP	precipitado	8,78	4,3	12,6	2,5	80,5

^aRendimento calculado com base no peso total da célula seca sem tratamento prévio com dodecilsulfato de sódio 2% (p/v). ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40 °C → 220 °C. tr: traços; nd: não determinado.

Dentre as amostras obtidas por congelamento e degelo, todo o material obtido das amostras AQ I GS, AQ II GS e AQ III GS foi solubilizado em quantidade suficiente de água e adicionado de igual volume de solução de Fehling. A amostra DM GP foi solubilizada primeiramente no reagente B de Fehling e em seguida foi adicionado volume suficiente do reagente A de Fehling. Os passos seguintes foram realizados conforme descrito em Materiais e Métodos, item 4.9.2. Desse procedimento foram obtidas as subfrações “sobrenadante” e “precipitado” de Fehling a partir de cada uma das frações submetidas ao método. Os rendimentos e composição monossacarídica das frações de maior rendimento estão apresentados na tabela 5.

Comparando os valores obtidos nas tabelas 4 e 5, verificou-se que das frações obtidas com água a 80°C, apenas na fração AQ I FS houve aumento da concentração molar relativa de manose e com formação de pequena quantidade de precipitado. Nas frações AQ II FS e AQ III FS, observou-se um comportamento diferente do ocorrido com a fração AQ I FS com relação à glucose, manose e xilose.

A fração DM foi a única onde se observou rendimento significativo nas duas frações de Fehling. Entre estas, a fração DM FS apresentou o maior rendimento e a maior concentração de glucose.

TABELA 5 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de purificação por precipitação com solução de Fehling da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

Fração	Fehling	Rendimento (g%) ^a	Monossacarídeos constituintes da fração (mol%) ^b			
			Xyl	Man	Gal	Glc
AQ I FS	sobrenadante	1,34	18,0	56,6	10,7	14,7
AQ I FP	precipitado	0,62	nd	nd	nd	nd
AQ II FS	sobrenadante	1,38	12,6	36,9	6,7	43,8
AQ II FP	precipitado	tr	nd	nd	nd	nd
AQ III FS	sobrenadante	1,02	7,8	19,8	3,8	68,6
AQ III FP	precipitado	tr	nd	nd	nd	nd
DM FS	sobrenadante	4,46	4,3	9,4	1,4	84,9
DM FP	precipitado	3,29	4,9	14,5	5,1	75,6

^aRendimento calculado com base no peso total da célula seca sem tratamento prévio com dodecilsulfato de sódio 2% (p/v). ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40 °C → 220 °C. tr: traços; nd: não determinado.

Foram realizadas análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS das frações AQ I FS, AQ II FS e AQ III FS, onde se verificou que as frações ainda não estavam homogêneas (por exemplo, espectro da fração AQ I FS, figura 11). Mesmo sendo observados elevados teores de glucose presentes nas frações AQ II FS e, principalmente, AQ III FS, essas frações foram reservadas para estudos posteriores, dando procedimento à purificação da fração AQ I FS. A fração AQ I FS foi escolhida devido ao seu elevado teor de manose, proporcionando o isolamento de uma manana constituinte da parede celular da levedura com rendimento suficiente para a realização de metodologias de determinação estrutural propriamente ditas.

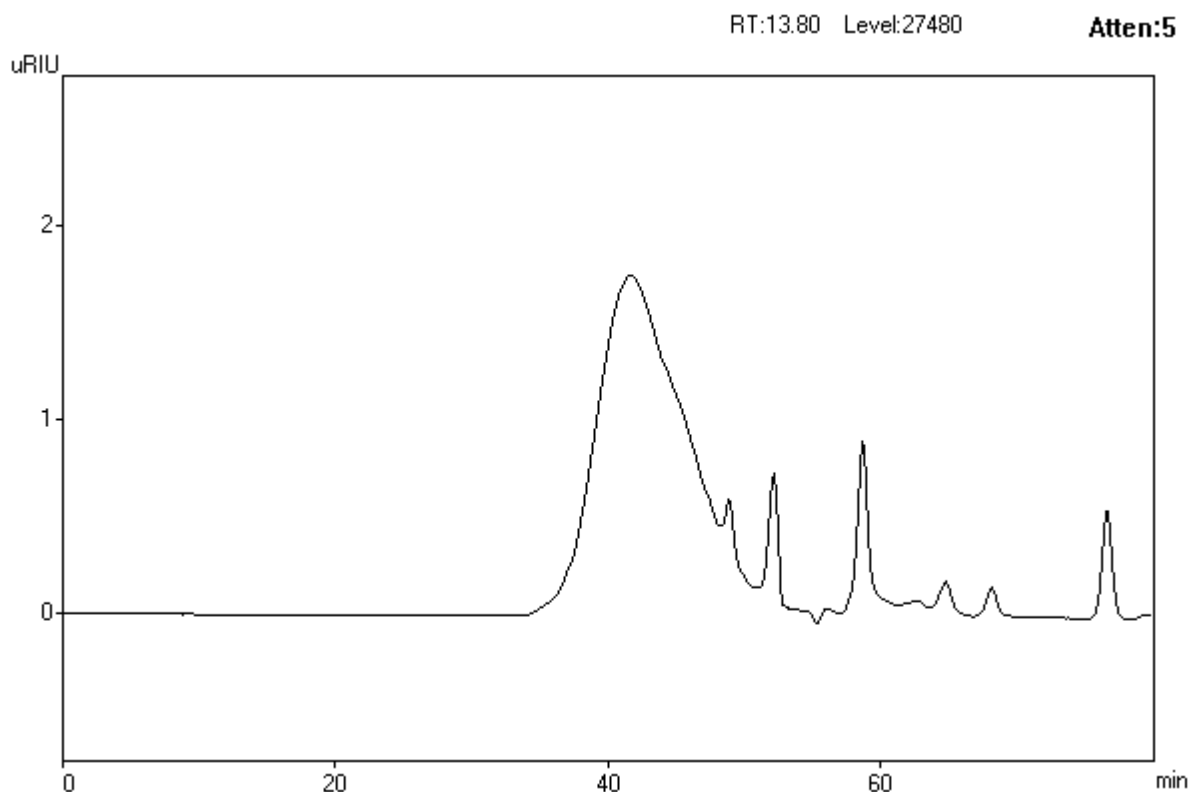


FIGURA 11 – Espectro de HPSEC-MALLS obtido da fração AQ I FS solubilizada em água Milli-Q

As frações DM FS e DM FP foram preparadas para análise de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C). A análise dos espectros obtidos revelou a presença de uma glucana como componente predominante da fração DM FS cuja elucidação estrutural está descrita no item 5.4 (pg. 53).

Dando seqüência aos procedimentos de purificação da fração AQ I FS, esta foi solubilizada em quantidade suficiente de água e à solução foi adicionado igual volume de solução aquosa de Cetavlon 3% (p/v). Procedeu-se ao ajuste do pH conforme descrito em Material e Métodos, item 4.9.3, sendo obtidas duas frações principais, a de precipitação em pH 8,5 e em pH 10,0, que foram denominadas AQ I C8,5 e AQ I C10 respectivamente. O sobrenadante final da precipitação por Cetavlon foi neutralizado com ácido acético concentrado, dialisado e secado por liofilização. Um precipitado foi obtido, mas esse material não foi analisado devido ao baixo

rendimento. Os rendimentos e as composições monossacarídicas das frações encontram-se na tabela 6.

TABELA 6 - Rendimento e composição monossacarídica das frações de Cetavlon em diferentes pH da fração AQ I da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

Fração (pH)	Rendimento (g%) ^a	Monossacarídeos constituintes da fração (mol%) ^b			
		Xyl	Man	Gal	Glc
AQ I C7 pH 7,0	tr	nd	nd	nd	nd
AQ I C8,5 pH 8,5	0,34	18,7	49,1	17,8	14,4
AQ I C10 pH 10,0	0,49	21,8	67,0	6,8	4,4
AQ I C12 pH 12,0	tr	nd	nd	nd	nd
Sobrenadante final	0,07	nd	nd	nd	nd

^aRendimento calculado com base no peso total da célula seca sem tratamento prévio com dodecilsulfato de sódio 2% (p/v). ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40 °C → 220 °C. tr: traços; nd: não determinado.

Após as análises de homogeneidade, verificou-se que ambas as frações AQ I C8,5 e AQ I C10 estavam homogêneas (por exemplo, espectro da fração AQ I C10, figura 12). Procedeu-se à elucidação estrutural do polissacarídeo componente da fração AQ I C10, devido ao seu teor de manose mais elevado (em torno de 27%) em relação à fração AQ I C8,5, que foi reservada para estudos posteriores.

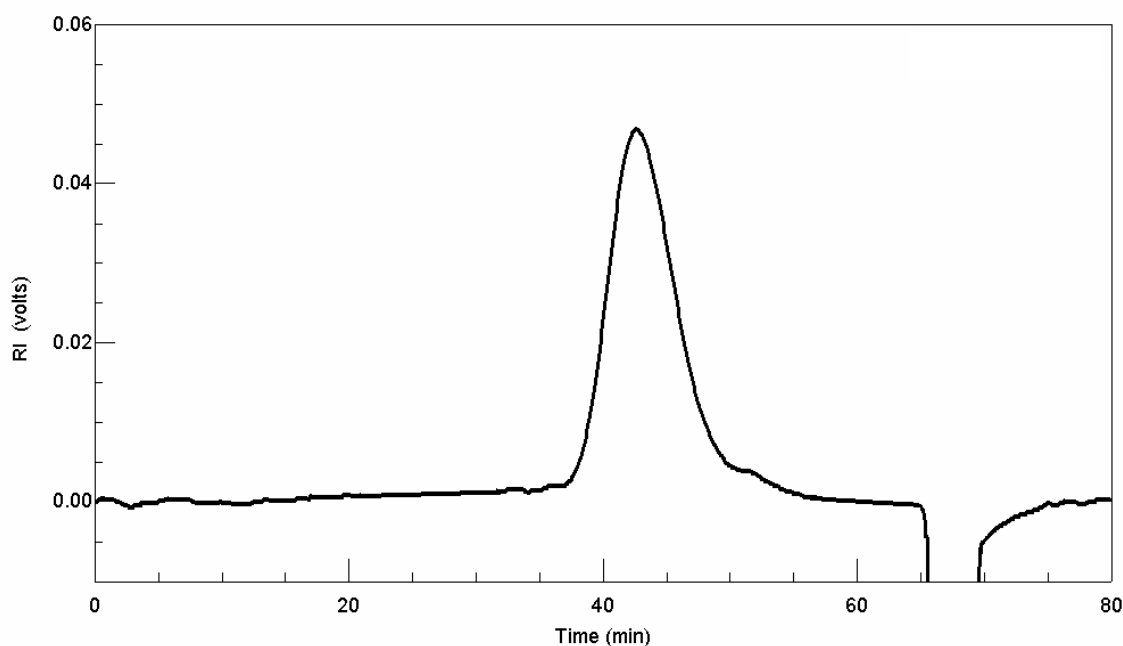


FIGURA 12 - Espectro de HPSEC-MALLS obtido da fração AQ I C10 solubilizada em água Milli-Q

5.4 ANÁLISE DE RMN DAS FRAÇÕES DM FS E DM FP

As frações DM FS e DM FP foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado e submetidas à análise de RMN ^{13}C em temperatura de 70°C . O espectro de RMN ^{13}C da fração DM FP se mostrou complexo, com vários sinais na região do carbono anomérico. Com base nesse espectro verificou-se a necessidade da realização de procedimentos de purificação adicionais nessa fração para que se pudesse isolar um ou mais polímeros. Dada a impossibilidade da realização da purificação desta fração por precipitação com sal de amônio quaternário (Cetavlon) devido a sua baixa solubilidade em água, essa fração foi reservada para estudos posteriores e proceder à análise da fração DM FS.

O espectro de RMN ^{13}C da fração DM FS apresentou apenas um sinal na região do carbono anomérico, sendo constituído no total de seis sinais proeminentes (figura 13), levando-se em consideração as intensidades relativas dos sinais e a comparação de espectros de RMN ^{13}C de outras glucanas. Devido ao fato desta

fração ser composta de 84,86 mol% de glucose, esses sinais foram atribuídos à estrutura de uma glucana linear. O sinal em δ 99,6 foi atribuído ao C-1 das unidades α -D-Glc_p, enquanto o sinal em δ 82,8 ao C-3 ligado. Os outros sinais predominantes foram atribuídos aos demais carbonos da α -D-(1→3)-glucana: C-2 em δ 70,8; C-4 em δ 69,5; C-5 em δ 72,0 e C-6 em δ 60,3 (GORIN, 1981; SUGAWARA, *et al.*, 2004). Ao analisar a composição monossacarídica dessa fração, verificou-se que ela não estava completamente pura, entretanto sinais provenientes de possíveis contaminantes não foram evidenciados no espectro de RMN desta amostra, com exceção do sinal em δ 73,1, que não pôde ser assinalado por falta de referencial.

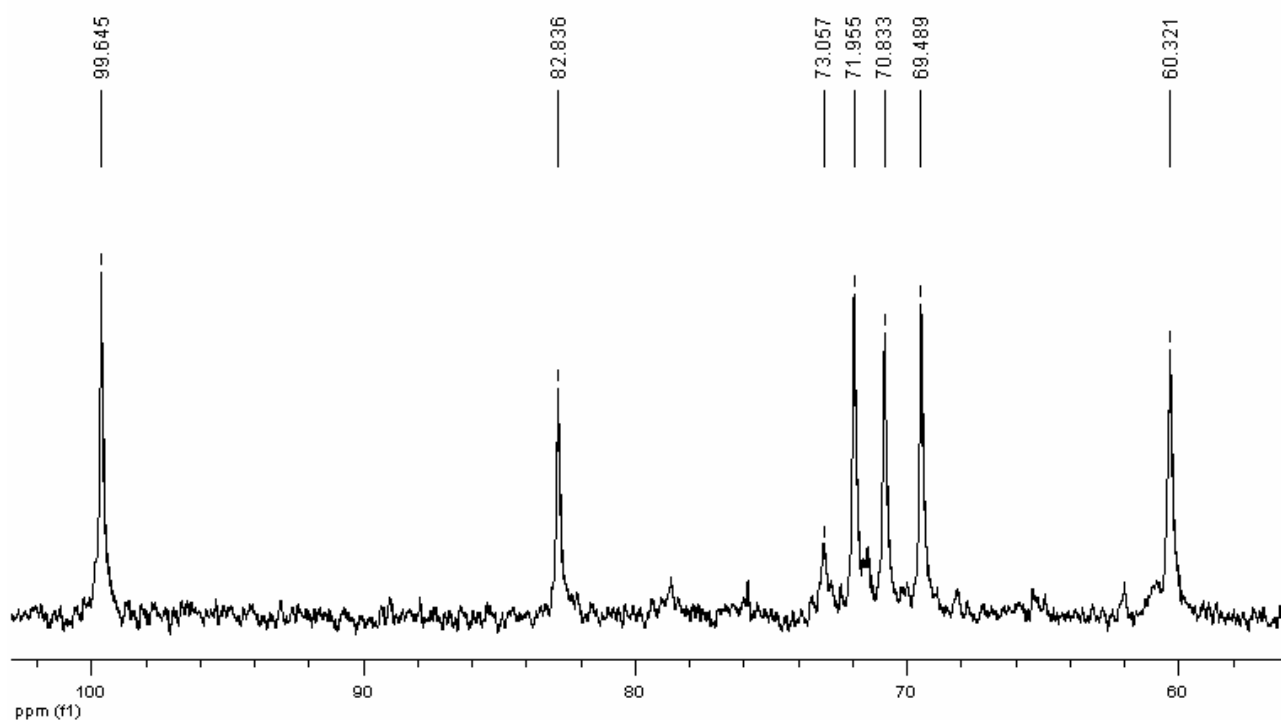


FIGURA 13 – Espectro de RMN ^{13}C da α -D-(1→3)-glucana isolada na fração DM FS da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

A análise de metilação desse polímero apresentou como principal acetato de alditol parcialmente metilado o 2,4,6-tri-O-metil-glucose, correspondente a 75 mol%. Outros acetatos de alditóis parcialmente metilados foram detectados em

menores proporções e são provavelmente oriundos de monossacarídeos constituintes de polímeros contaminantes.

Com base nesses dados, a estrutura do polissacarídeo isolado na fração DM FS foi proposta como sendo semelhante à estrutura da pseudonigerana. Estes dados estão de acordo com BONFIM (1999), que observou a predominância de α -glucose, sugerindo a existência de uma α -glucana na parede celular e confirmam a suposição de MILLER e colaboradores (1976) que propuseram que esta glucana apresentaria uma estrutura semelhante à pseudonigerana (ver estrutura 1, Revisão Bibliográfica item 3.2, p. 17). Como citado anteriormente, o termo foi empregado para descrever a α -glucana insolúvel em água quente isolada de *Aspergillus niger* NRRL 326, mas outros polímeros neste mesmo arranjo foram isolados a partir de diversas espécies de fungos, como *Polyporus betulinus*, *Tremella mesenterica*, *Aspergillus nidulans*, *Schizophyllum communes* e espécies de *Cryptococcus* e *Schizosaccharomyces* (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983).

5.5 ANÁLISE DA FRAÇÃO AQ I C10

Conforme descrito anteriormente, foi realizada análise da homogeneidade da fração AQ I C10 por HPSEC-MALLS, sendo que essa fração se mostrou homogênea. O peso molecular foi determinado pelo cálculo da constante dn/dc que foi utilizada pelo software ASTRA (WYATT TECHNOLOGY). O dn/dc calculado foi de 0,143, fornecendo o valor de peso molecular igual a 87300 g/mol, com erro de $\pm 10\%$. A rotação específica do polissacarídeo constituinte da fração AQ I C10 foi determinada como (+30) em comprimento de onda λ 589 nm (Material e Métodos, item 4.11.5).

O polissacarídeo foi dissolvido em água deuterada e submetido à análise de RMN ^{13}C em temperatura de 50°C. O espectro obtido apresentou-se complexo, com vários sinais na região do carbono anomérico, sugerindo elevado grau de

ramificação (figura 14). Os sinais obtidos na região do carbono anomérico foram assinalados como: δ 99,6 (C-1 de α -Glc p), δ 101,7 (C-1 de α -Man p), δ 102,8 (C-1 de β -Xyl p) e δ 103,1 (C-1 de β -Gal p) (GORIN, 1981; GORIN; MAZUREK, 1982, BARREIRA, 1999).

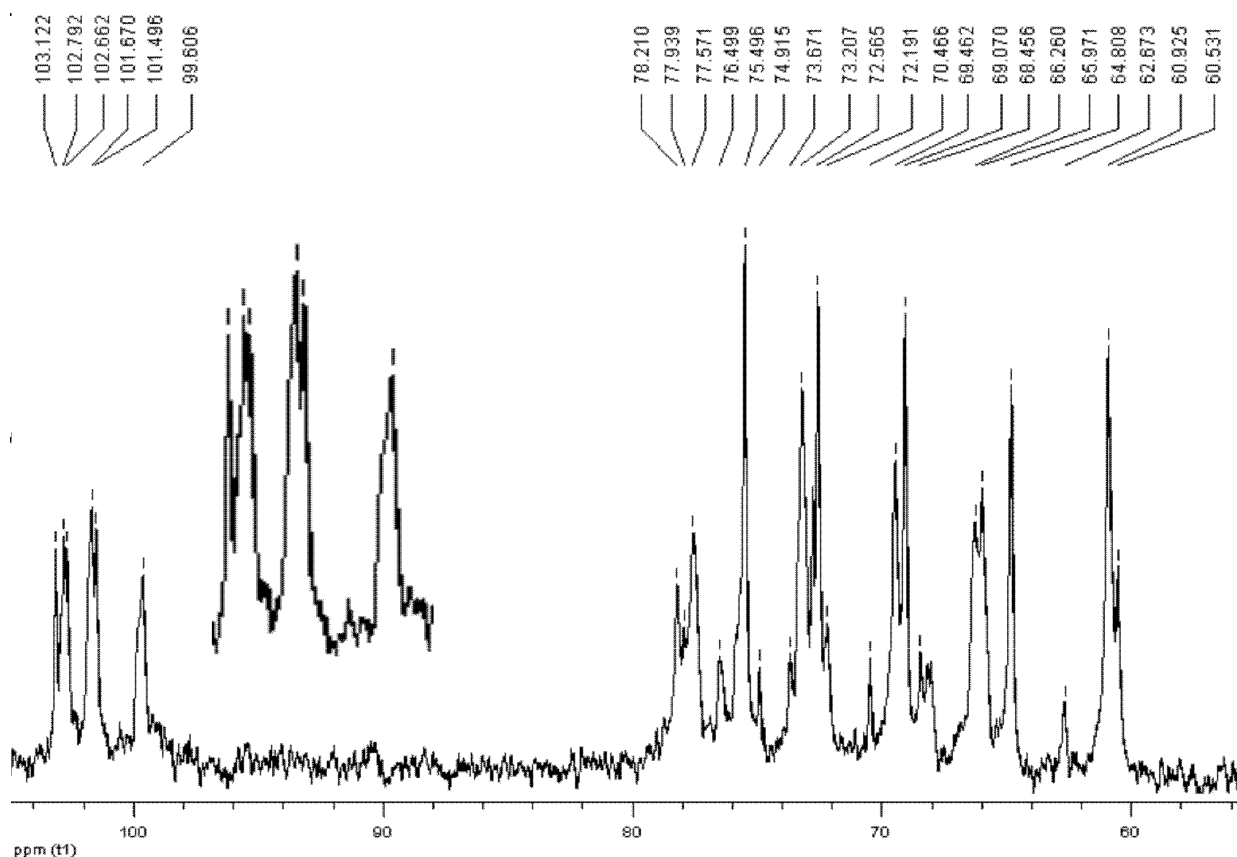


FIGURA 14 – Espectro de RMN ^{13}C da fração AQ I C10 da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

A fim de auxiliar a elucidação estrutural do polímero original, foi realizada uma hidrólise ácida parcial a partir de 20 mg do polissacarídeo (Material e Métodos, item 4.10.3). Após a diálise fechada em tubo de 8.000 Da, o material retido no tubo foi secado por liofilização, sendo obtida a fração “hidrólise parcial AQ I C10”, cuja composição monossacarídica é apresentada na tabela 7.

TABELA 7 - Composição monossacarídica da fração “hidrólise parcial AQ I C10” em comparação com a composição do polímero original

	Monossacarídeos constituintes da fração (mol%) ^a			
	Xyl	Man	Gal	Glc
polímero original	21,82	67,03	6,77	4,38
hidrólise ácida parcial	9,68	80,23	6,12	3,97

^aPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40° C→220° C

A análise dos dados de composição monossacarídica do polissacarídeo original e após a hidrólise ácida parcial sugere que as unidades de xilose estejam presentes nas porções mais externas da molécula, uma vez que a concentração molar relativa desta pentose diminuiu 55,6% após o tratamento de hidrólise parcial do polissacarídeo.

A fração “hidrólise parcial AQ I C10” foi solubilizada em dimetilsulfóxido deuterado, uma vez que se mostrou insolúvel em água deuterada, e submetida à análise de RMN ¹³C e DEPT. A análise do espectro de RMN ¹³C (figura 15) permitiu o assinalamento dos carbonos da manose: δ 101,7 (C-1 em ligação α); δ 69,4 (C-2); δ 73,5 (C-3); δ 78,5 (C-4 ligado); δ 76,0 (C-5); e δ 61,0 (C-6). Na análise de DEPT, que mostra a inversão dos CH₂, verificou-se a inversão do sinal de C-6 em δ 61,0, demonstrando não haver ligação deste carbono (dado não mostrado). Os outros sinais na região do carbono anomérico foram assinalados como: δ 103,4 (C-1 de β -Galp), δ 102,7 (C-1 de β -Xylp) e δ 99,3 (C-1 de α -Glc p) (GORIN; MAZUREK, 1974; GORIN, 1981; GORIN; MAZUREK, 1982; GANTER *et al.*, 1995; BARREIRA, 1999; PETKOWICZ, *et al.*, 2000). Outros assinalamentos puderam ser realizados indicando cadeias laterais de β -Xylp (1→4): δ 72,8 (C-2), δ 75,2 (C-3), δ 77,0 (C-4 ligado) e δ 65,3 (C-5) (KOVAC; HIRSCH, 1980; GORIN, 1981; HABIBI; VIGNON, 2005).

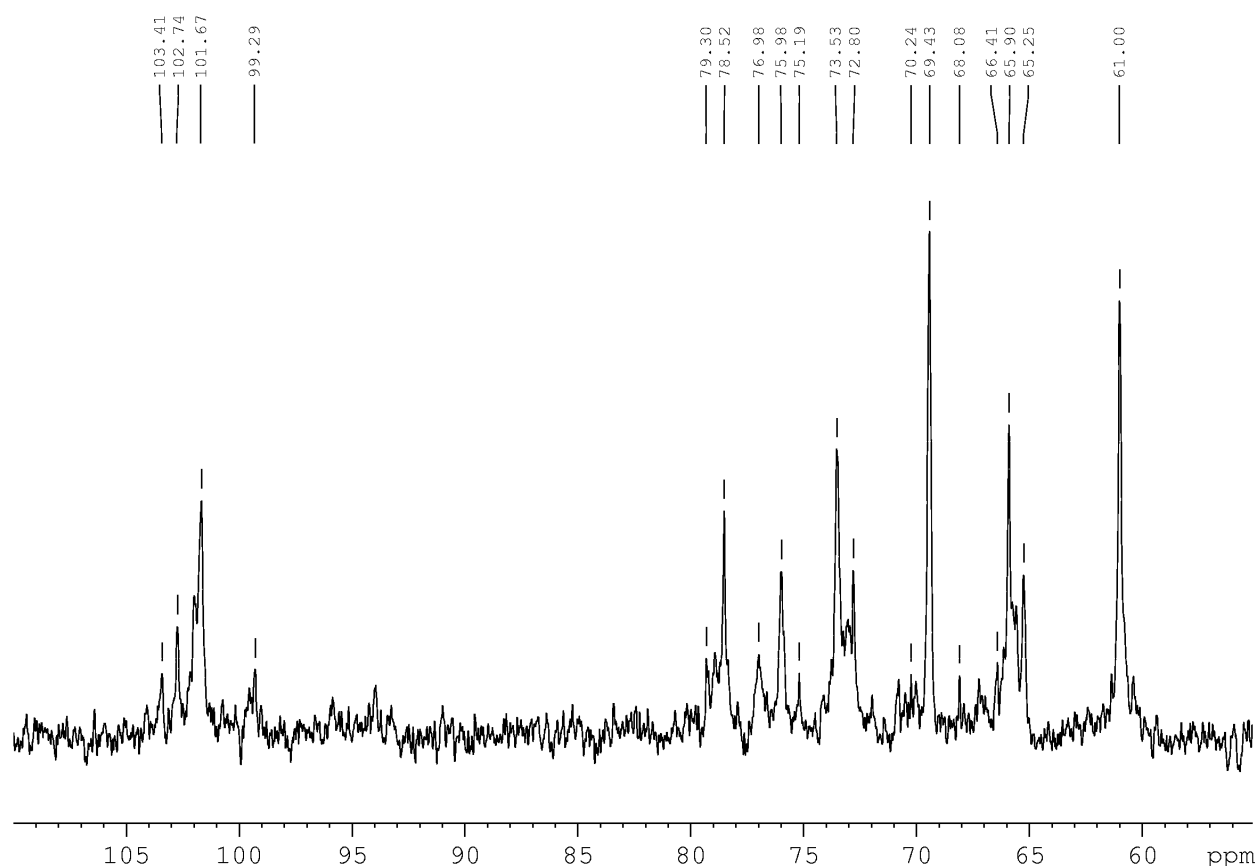


FIGURA 15 – Espectro de RMN ^{13}C da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

No espectro de HMQC (figura 16) foi possível identificar as correlações entre os prótons e os carbonos da manose. O sinal de C-1 (δ 101,7) das unidades de manose supostamente pertencentes à cadeia principal correlacionou com δ 5,1 que foi atribuído a H-1. A configuração da ligação α do carbono anomérico das unidades de manose foi confirmada pelo experimento de HMQC acoplado onde foi possível verificar o acoplamento de 178 Hz entre C1 e H1, característico de unidades α -ligadas. Pela análise do experimento de HMQC foi possível ainda assinalar os demais núcleos de hidrogênio ligados a átomos de carbono da cadeia de manose, sendo essas correlações apresentadas na tabela 8. Os assinalamentos foram confirmados pelo experimento de COSY (figura 17), no qual foram obtidas as correlações entre os núcleos de hidrogênio ligados a carbonos vizinhos. Neste experimento puderam ser observadas as correlações entre H-1 (δ 5,07) e H-2 (δ

4,11), H-2 e H-3 (δ 3,80), H-3 e H-4 (δ 3,89), H-4 e H-5 (δ 4,02) e H-5 e H-6 (δ 3,66). Confirmação adicional foi obtida pelo experimento de TOCSY (figura 18), no qual foi observada a correlação dos sinais de H-1 (δ 5,07) com H-2 (δ 4,11) e com H-3 (δ 3,80) das unidades de manose.

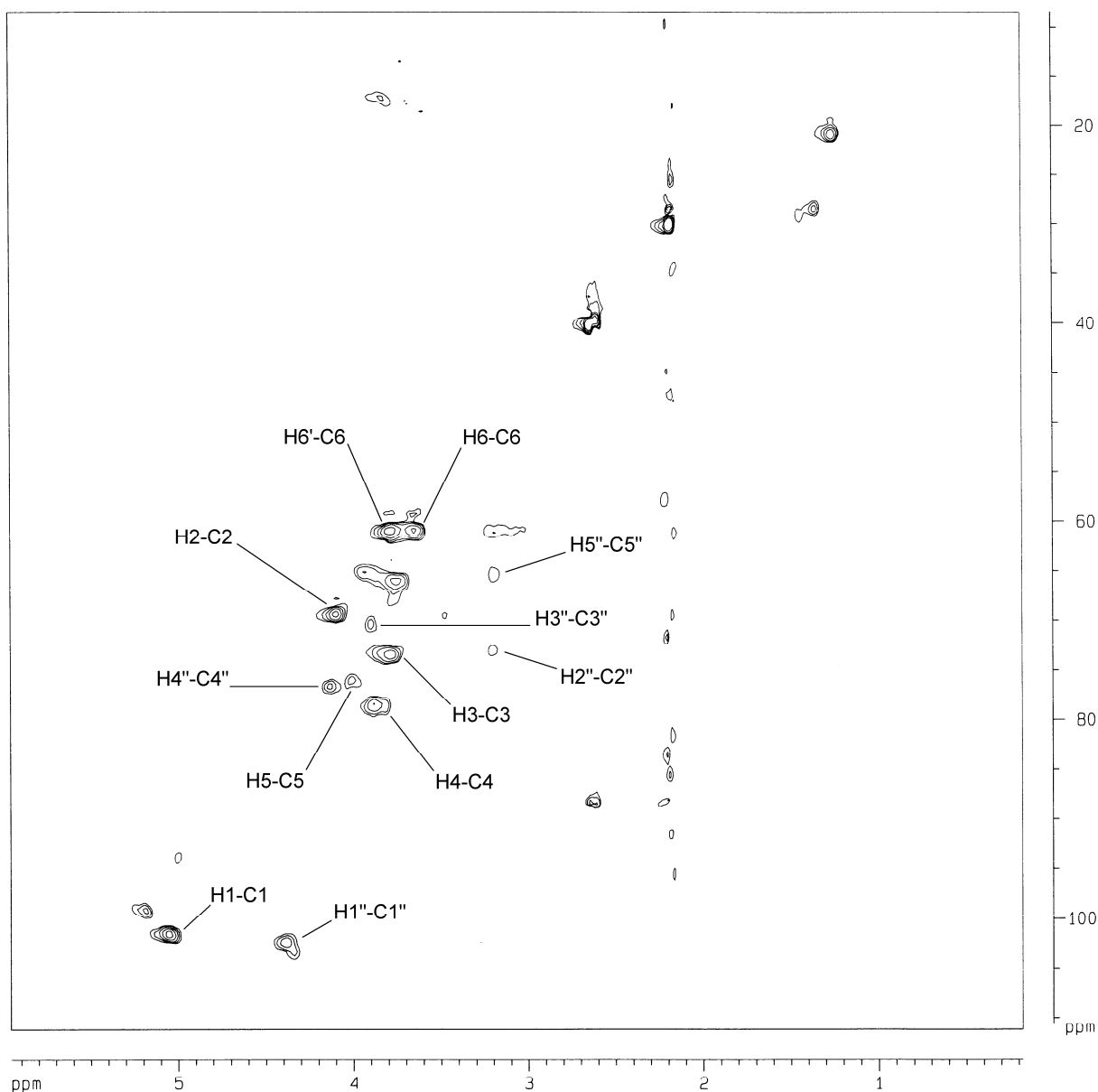


FIGURA 16 – Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da levedura *Phaffia rhodozyma*, em dimetilsulfóxido deuterado a 50°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. H1-C1: correlação entre H-1 e C-1 das unidades de manose da cadeia principal; H1''-C1'': correlação entre H-1 e C-1 das unidades de xilose das cadeias laterais.

Ainda pelo experimento de HMQC e COSY foi possível estabelecer as correlações entre os átomos de carbono e os respectivos átomos de hidrogênio de unidades de xilose provavelmente pertencentes às cadeias laterais. O sinal de C-1 (δ 102,7) correlacionou com o sinal δ 4,4 que foi atribuído a H-1 de unidades β -Xylp, sendo a configuração β destas unidades confirmadas no experimento de HMQC acoplado onde se verificou o acoplamento característico de 163 Hz entre C1 e H1 das unidades de β -xilopirranose. Os demais assinalamentos para os átomos de carbono e hidrogênio das cadeias laterais de xilose encontram-se na tabela 8.

TABELA 8 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C obtidos do heteropolímero da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*

Unidades de H e C	Cadeia (1 \rightarrow 4)- α -D-Manp		Cadeia lateral (1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
H-1/C-1	5,07	101,7	4,40	102,7
H-2/C-2	4,11	69,4	3,21	72,8
H-3/C-3	3,80	73,5	3,91	75,2
H-4/C-4	3,89	78,5	4,14	77,0
H-5/C-5	4,02	76,0	3,20	65,3
H-6/C-6	3,66	61,0		
H-6'/C-6	3,80			

Dados obtidos dos experimentos de ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC e TOCSY; amostra dissolvida em dimetilsulfóxido deuterado.

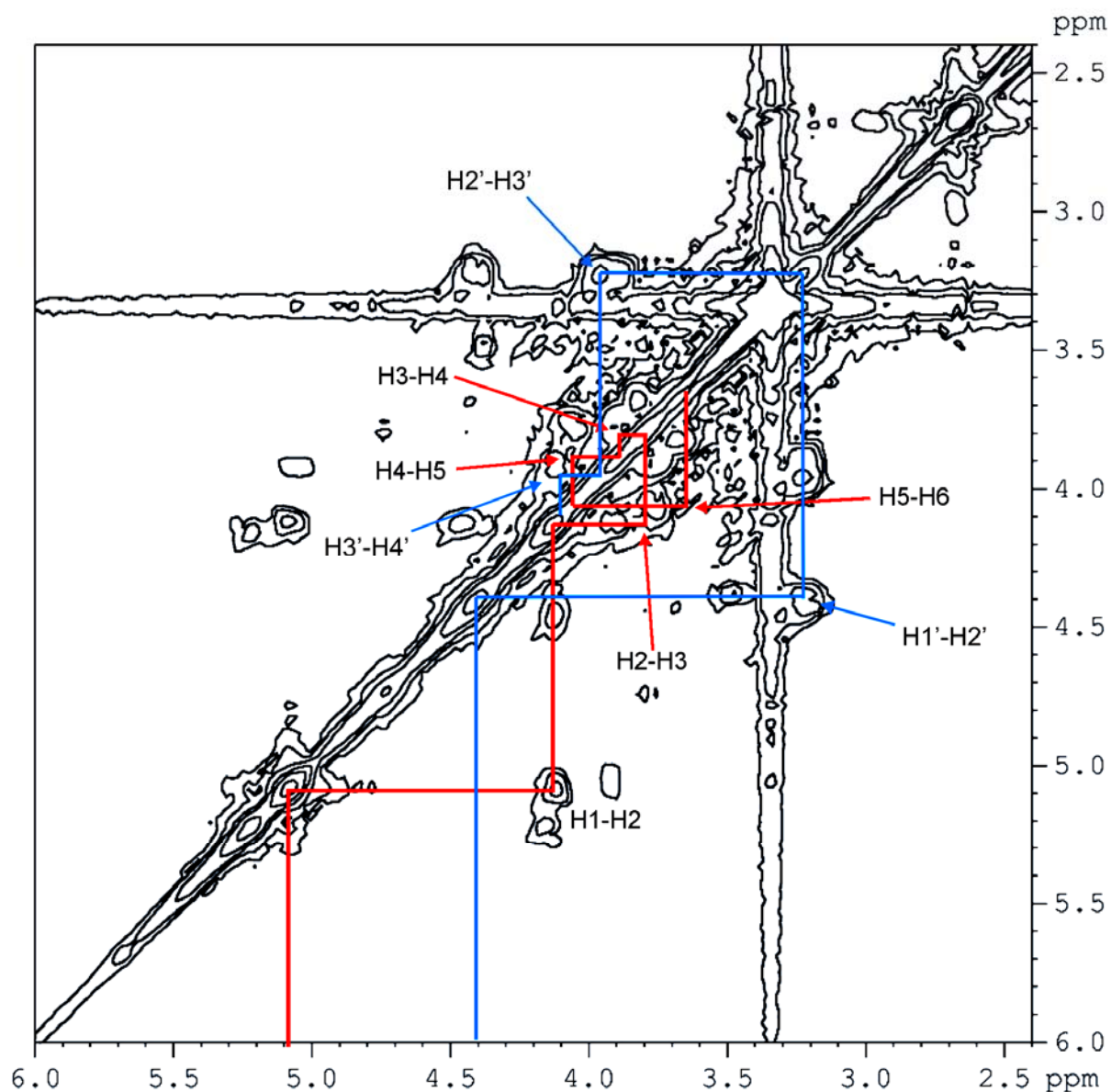


FIGURA 17 – Espectro de ^1H , ^1H COSY da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da levedura *Phaffia rhodozyma*, em dimetilsulfóxido deuterado a 50°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. H1-H2: correlação entre H-1 e H-2 das unidades de manose; H1'-H2': correlação entre H-1 e H-2 das unidades de xilose das cadeias laterais.

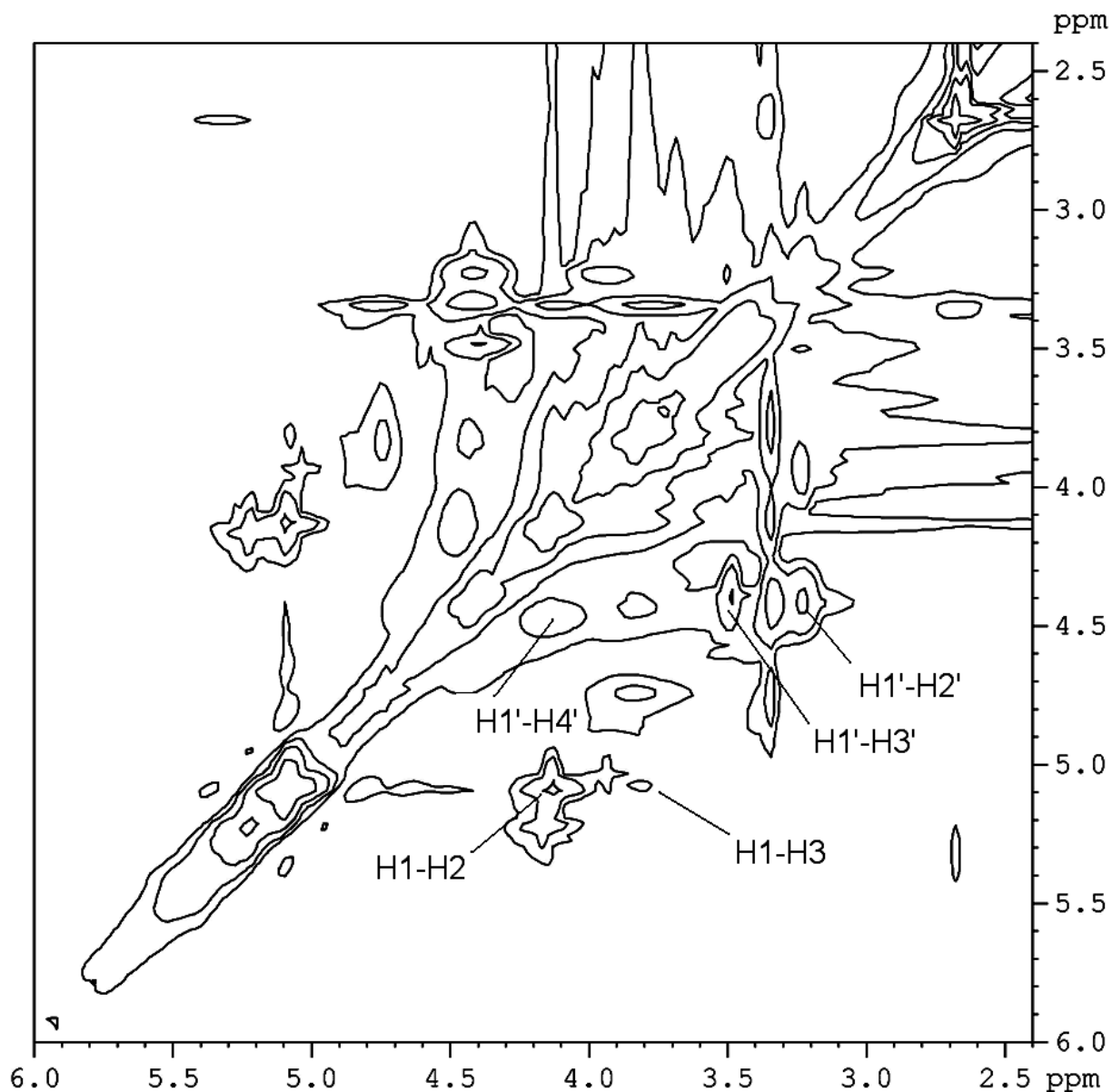


FIGURA 18 – Espectro de ^1H , ^1H TOCSY da fração “hidrólise parcial AQ I C10” da levedura *Phaffia rhodozyma*, em dimetilsulfóxido deuterado a 50°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. H1-H2: correlação entre H-1 e H-2 das unidades de manose. H1'-H2': correlação entre H-1 e H-2 das unidades de xilose das cadeias laterais.

Os dados de análise de metilação do heteropolímero original e do polímero obtido por hidrólise ácida parcial podem ser observados na tabela 9.

TABELA 9 – Análise por metilação do heteropolímero da levedura *Phaffia rhodozyma*, antes e após hidrólise parcial

O-Metilalditol ^b	Polissacarídeo ^a	
	Original	Hidrólise parcial
2,3,4-Me ₃ -Xyl	15,12	6,60
2,3,4,6-Me ₄ - Man	10,99	16,89
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	5,35	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	10,90	6,39
2,3-Me ₂ -Xyl	12,03	5,52
3,4,6-Me ₃ -Man	7,30	8,78
2,4,6- Me ₃ -Man	2,30	-
2,3,6-Me ₃ -Man	17,40	31,18
2,3,4-Me ₃ -Gal	2,40	5,63
2,3,6-Me ₃ -Glc	-	2,72
2,6-Me ₂ -Man	2,12	3,55
3,6-Me ₂ -Man	5,20	6,00
2,3-Me ₂ -Glc	1,87	-
3,4-Me ₂ -Man	4,57	3,69
4-Me ₁ -Glc	2,02	3,06

^aProporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos.

^bAnalisado como peracetato.

Analisando os dados da tabela, verificou-se a presença de diversos acetatos de alditóis parcialmente metilados confirmando a complexidade do heteropolímero. Foi observada a presença dos derivados 2,3,4-tri-O-metil-xilose referente a terminais não redutores de xilose que, após o processo de hidrólise ácida parcial apresentou uma redução de 44% nos seus teores. Além dos terminais não redutores de xilose, foram identificados os derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose

e 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucose, sugerindo a presença de terminais não redutores de galactose e glucose, dado que condiz com a análise de RMN ^{13}C (figura 14), o qual mostrou sinal de β -galactose em δ 103,41 e de α -glucose em δ 99,29. Pela análise da concentração desses derivados metilados pode-se dizer que houve maior remoção dos terminais não redutores de glucose, totalmente removidos pelo processo de hidrólise parcial do polissacarídeo original; enquanto os terminais não redutores de galactose foram reduzidos em cerca de 40%.

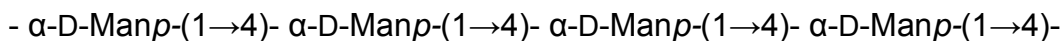
Verificou-se a presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil-manose, indicando a existência de terminais não redutores de manose no polissacarídeo original. O aumento da concentração deste derivado após a hidrólise parcial pode ser um indicativo de que haja unidades internas de manose nas cadeias laterais do polímero. Estas unidades internas se tornaram expostas pela remoção de porções externas do polissacarídeo passando a ser terminais não redutores quando empregado o processo de hidrólise ácida parcial.

Os demais acetatos de alditol parcialmente metilados foram identificados segundo seu perfil de fragmentação e com a comparação dos tempos de retenção de padrões conhecidos (SASSAKI, *et al.*, 2005). Foram identificados os derivados 2,3-di-O-metil-xilose, correspondente a unidades de xilose 4-O-substituídas; 3,4,6-tri-O-metil-manose, correspondente a unidades de manose 2-O-substituídas; 2,4,6-tri-O-metil-manose, correspondente a unidades de manose 3-O-substituídas; 2,3,6-tri-O-metil-manose, correspondente a unidades de manose 4-O-substituídas; 2,3,4-tri-O-metil-galactose, correspondente a unidades de galactose 6-O-substituídas; 2,3,6-tri-O-metil-glucose, correspondente a unidades de glucose 4-O-substituídas; e derivados de unidades di-substituídas 2,6-di-O-metil-manose; 3,6-di-O-metil-manose; 3,4-di-O-metil-manose correspondentes a unidades de manose 3,4-; 2,4-; 2,6-di-O-substituídas respectivamente. Ainda o derivado 2,3-di-O-metil-glucose, referente a unidades de glucose 4,6-di-O-substituídas, e o derivado mono-substituído 4-mono-O-metil-glucose de unidades 2,3,6-tri-O-substituídas.

Analisando os dados de metilação do polissacarídeo original e do obtido após o procedimento de hidrólise ácida parcial, verificou-se a redução da concentração do derivado metilado 2,3-di-*O*-metil-xilose de 12,03% para 5,52%, sugerindo que as unidades de xilose 4-*O*-substituídas pertençam a porções mais externas do polissacarídeo, provavelmente em cadeias laterais que foram removidas pela hidrólise parcial. A redução na concentração de 3,4-di-*O*-metil-manose pode ser considerada da mesma maneira. De forma contrária, constatou-se o aumento da concentração de 3,4,6-tri-*O*-metil-manose e 2,3,4-tri-*O*-metil-galactose, bem como dos derivados di-substituídos 2,6-di-*O*-metil-manose, 3,6-di-*O*-metil-manose, 3,4-di-*O*-metil-manose e do mono-substituído 4-mono-*O*-metil-glucose referente a unidades de glucose tri-substituídas após o procedimento de hidrólise parcial. Essas unidades provavelmente pertençam a cadeias internas do polissacarídeo original, sendo esse aumento decorrência da redução do tamanho do polímero após a hidrólise parcial.

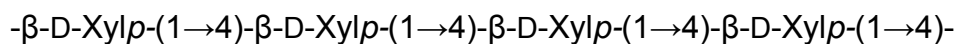
Dentre os derivados di-substituídos, pode-se associar a eliminação de 2,3-di-*O*-metil-glucose (referente a unidades de glucose 4,6-substituídas) à formação de 2,3,6-tri-*O*-metil-glucose referente a unidades de glucose 4-substituídas, observadas após a hidrólise parcial. Este dado pode sugerir a remoção de substituintes ligados em C-6 das unidades de glucose pelo procedimento de hidrólise parcial.

Nos dados de RMN ^{13}C foram evidenciados sinais correspondentes a unidades de α -manose 4-*O*-ligados, observando os sinais atribuídos ao C-4 ligado em δ 78,52 e ao C-1 de unidades α -Manp em δ 101,67. A confirmação da ligação α foi obtida com os dados de RMN ^1H e análises bidimensionais, onde foi verificado o acoplamento característico de C-1 com H-1 de 178 Hz. Os dados de metilação antes e após a hidrólise parcial do polissacarídeo demonstram um aumento de 17,40% para 31,18% na concentração molar relativa do acetato de alditol parcialmente metilado 2,3,6-tri-*O*-metil-manose, o que demonstra não só a conservação das unidades Manp 4-*O*-ligadas após a hidrólise parcial, como também serve de embasamento para a suposição de que a cadeia principal deste heteropolímero é composta de unidades de α -(1 \rightarrow 4)-manopirranose, segundo a estrutura **2**.



2

Devido à existência de um grande número de derivados metilados, pode-se apenas propor fragmentos dessa molécula que podem ser pertencentes a cadeias laterais. Por meio das análises de RMN e dos dados de metilação, foi possível detectar a presença de unidades de xilose 4-*O*-substituídas que podem justificar a proposição da presença de cadeias laterais como por exemplo a estrutura **3**.



3

Apesar dessas proposições, mais dados são necessários para a determinação da estrutura de fragmentos deste heteropolímero. Com essa finalidade, faz-se necessária a produção de oligossacarídeos a partir do polissacarídeo original empregando métodos de acetólise, hidrólise parcial e enzimólise, além de Degradação de Smith.

O estudo e pesquisa desta dissertação permitem que sejam consideradas as seguintes conclusões:

a) O emprego do processo descontínuo foi eficiente na obtenção de células da levedura *Phaffia rhodozyma* com adequada pigmentação das células para o estudo da parede celular.

b) Uma α -D-glucana cuja estrutura é semelhante à pseudonigerana foi isolada da fração DM FS.

c) Da fração AQ I C10 foi isolado um heteropolissacarídeo complexo que apresenta cadeia principal de α -D-(1 \rightarrow 4)-manose, com terminais não redutores de manose, galactose, glucose e xilose; unidades de β -D-(1 \rightarrow 4)-xilose nas cadeias laterais, assim como outros açúcares em grande diversidade de tipos de ligações. Não foram encontrados açúcares ácidos nesse polímero.

ACHEAMPONG, E. A.; MARTIN, A. M. Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, n. 3, p. 147-155, 1995.

AN, G.-H.; BIELICH, J.; AUERBACH, R.; JOHNSON, E.A. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. **Bio-Technology**, Martinsville, v. 9, p. 70-73, 1991.

ANDREWES, A.G.; PHAFF, H.J.; STARR, M.P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, p. 1003-1007, 1976.

ASPINAL, G.O. General introduction. In: _____. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, v.1, p. 1-18, 1982.

BARON, M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. **Agricultura & Biological Chemistry**, Tokyo, v.53, n. 7, p. 1751-1738, 1989

BARREIRA, S.M.W. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de líquens do gênero *Cladonia***. Curitiba, 1999. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, p.828, 1980.

BONFIM, T.M.B. **Produção de Astaxantina pela Levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a Partir de Meios de Cultura de Baixo Custo**. Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BOTTON, C. B.; SIEHR, D. J. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the hyphal wall of the Basidiomycete *Coprinus macrorhizus* var. *microsporus*. **Carbohydrate Research**, v. 77, p. 169-181, 1979.

BUSH, D. A.; HORISBERGUER, M. Structure of a β -D-glucan from the mycelial wall of *Basidiomycete* QM 806. **Carbohydrate Research**, v. 22, p. 361-367, 1972

CABIB, E.; ROH, D. H.; SCHMIDT, M.; CROTTI, L. B.; VARMA, A. The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19679-19682, 2001.

CALO, P.; GONZÁLEZ, T. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. **Microbiologia SEM**, v. 11, p. 386-388, 1995.

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

COLLINS, P.; FERRIER, R. **Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products**. Chichester: John Wiley&Sons Ltd, p.5-35, 1996.

COOK, A. H. **The Chemistry and Biology of Yeasts**. New York: Academic Press INC, p. 237-380, 1958.

DIKE, A.O.; LETTNER, F.; ZOLLITSCH, W. The supplementation of layers feed with the yeast - *Phaffia rhodozyma* – as pigment carrier. **Archiv für geflügelkunde**, Kingston, v. 5, p. 205-209, 1992.

- DUARTE, J. H.; JONES, J. K. N. Some studies on the galactans from the albumen glands of the snail, *Strophocheilus oblongus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 327-335, 1971.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350- 356, 1956.
- FELL, J. W.; BLATT, G. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 677-681, 1999.
- FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.
- FONTANA, J. D., CZECZUGA, B., BONFIM, T.M.B., CHOCIAI, M.B., OLIVEIRA, B.H., GUIMARÃES, M.F., BARON, M. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v.58, n.2, p. 121-125, 1996.
- FONTANA, J. D., CHOCIAI, M.B., BARON, M., GUIMARÃES, M.F., MARASCHIN, M., ULHOA, C., FLORÊNCIO, J.A., BONFIM, T.M.B. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63, p. 305-314, 1997.
- GACTO, M.; VICENTE-SOLER, J.; CANSADO, J.; VILLA, T. G. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 961-967, 2000.
- GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, N.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17, n. 1, p. 13-19, 1995.
- GOLUBEV, W.I. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, Sussex, v. 11, p. 101-110, 1995.
- GOODWIN, T.W. Distribution of Carotenoids. **Methods in enzymology**, California, v. 213, p. 167-172, **Carotenoids**, Part A: Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation, 1992.
- GORIN, P.A.J., SPENCER, J.F.T. Exocellular alginic acid from *Azotobacter venelandii*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 44, p. 993-998, 1966
- GORIN, P. A. J., MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v.53, p. 1212-1222, 1974.
- GORIN, P.A.J., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, San Diego, v. 38, p. 13-104, 1981.
- GORIN, P. A. J., MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- α -D-mannopyranans from yeasts. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.105, n.2, p. 283-287, 1982.
- GORIN, P.A.J., BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In **The Polysaccharides**, Aspinnall, G. O., Academic Press, INC, 1983.

HABIBI, Y.; VIGNON, M.R. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1431-1436, 2005.

HAYMAN, G. T.; MANNARELLI, B. M.; LEATHERS, T. D. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling coproducts. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 389-395, 1995.

HOUGH, L., JONES, J.K.N. Chromatography on paper. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 1., p. 21-31, 1962

HOUGH, L., JONES, J.V.S., WUSTEMAN, P. On the automated analysis of neutral monosaccharides in glycoproteins and polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 21., n. 1, p. 9-17, 1972

JAMES, P.G., CHERNIAK, R., JONES, R.G., STORTZ, C.A. Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* CAP 67. **Carbohydrate Research**, v. 198, p. 23-38, 1990.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOHNSON, E.A; CONKLIN, D.E.; LEWIS, M.J. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 34, p. 2417-2421, 1977.

JOHNSON, E.A.; VILLA, T.G.; LEWIS, M.J. Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 35, p. 1155-1159, 1978.

JOHNSON, E.A.; LEWIS, M.J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 115, p. 173-183, 1979.

JOHNSON, E.A.; LEWIS, M.J.; GRAU, C.R.; Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Poultry Sciences**, Champaign, v. 59, p. 1777-1782, 1980.

JOHNSON, E.A.; AN, G.-H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnonology**, Boca Raton, v.11, n.4, p. 297-326, 1991.

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

KOVAC, P.; HIRSCH, J. ¹³C-N.M.R. spectra of xylo-oligosaccharides and their applicatoin to the elucidation of xylan structures. **Carbohydrate Research**, v. 85, p. 177-185, 1980.

LEVIN, D. E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.69, n.2, p. 262-291, 2005.

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

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall International, Inc. p. 774, 1997

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

MANNERS, D. J.; MEYER, M. T. The molecular structure of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. **Carbohydrate Research**, v. 57, p. 189-203, 1977

MILLER, M.W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 26, n.2, p. 286-291, 1976.

MORIEL, D.G., MACHADO, I.M.P., FONTANA, J.D., BONFIM, T.M.B. Optimization of biomass and astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n.3, p. 421-424, 2004.

MORIEL, D.G., CHOCIAI, M.B., MACHADO, I.M.P., FONTANA, J.D., BONFIM, T.M.B. Effects of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.3, p. 397-401, 2005.

NUTRAINGREDIENTS. **Europe's health food industry has 'under-utilized' the nutraceutical properties of carotenoids and consumers are still unaware of their health benefits, finds a new report on the \$348.5 million (€291.4m) carotenoid market.** Disponível em: <<http://www.nutraingredients.com/news/news-NG.asp?n=48112-carotenoids-untapped-potential>>. Acesso em: 02 mar 2005.

OKAGBUE, R.N.; LEWIS, M.J. Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: yeast-wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 5, p. 731-736, 1983.

OKAGBUE, R.N.; LEWIS, M.J. Use of alfalfa residual juice as substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Belin, v. 20, p.33-39, 1984.

OKAGBUE, R.N.; LEWIS, M.J. Influence of mixed culture conditions on yeast-wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.59, n.11, p. 243-255, 1985.

PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Biotechnology Letters**, v. 19, n.2, p. 139-141, 1997

PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n.4, p. 501-506, 1998.

PARPHENYUK, E. V.; DAVYDOVA, O.I. Molecular complexes of mono- and oligosaccharides in solution. In **Chemistry of Polyssaccharides**, Zaikov, G. E., Ridderprint BV, Ridderkerk, 2005.

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

PERKINS, H.R.; ROGERS, H. F. **Cell Walls and Membranes**. London: E.&F. SPON LTD, p. 135-144, 1968.

PETKOWICZ, C.L. de O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F.R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 107-112, 2000.

REYNDERS, M.B.; RAWLINGS, D.E.; HARRISON, S.T.L. Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnonology Letters**, Middlesex, v.18, n.6, p. 649-654, 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.

SANTOPIETRO, L.M.D.; SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M.; SIÑERIZ, F. Formation of protoplasts from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Techniques**, Middlesex, v. 9, n.5, p. 339-344, 1995.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCOTT, J. E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 38-44, 1965.

SLININGER, P. J. *et al.* Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p. 371-384, 1982.

STEWART, T. S.; MENDERSHAUSEN, P. B., BALLOU, C. E. Preparation of a mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. **Biochemistry**, v. 7, n. 5, p. 1843-1854, 1968.

STOREBAKKEN, T.; NO, H.K. Pigmentation of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v.100, p. 209-229, 1992.

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.

TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P., HARRISON, J.S. Detection of Sugars on Paper Chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 144-145, 1950

VÁZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJÓ, J. C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 263-268, 1997.

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

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v.2, p. 65-67, 1963b.

WORANOVICZ, S. M. **Estudo comparativo de heteropolissacarídeos isolados dos líquens *Cladonia signata* (Eschw.) Vainio, *Cladonia furcata* (Hudson) Schrader e *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.** Curitiba, 1995. 109 f. Tese (Mestrado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

ZAIKOV, G. E. **Chemistry of Polyssacharides**. Leiden: Ridderprint BV, Ridderkerk, 2005. p. 15-18.