

RODRIGO VASSOLER SERRATO

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA BACTÉRIA
DIAZOTRÓFICA ENDOFÍTICA *Burkholderia tropicalis*:
Estrutura Química e Fisiologia**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientadores: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki
Prof. Dr. Leonardo M. Cruz

CURITIBA

2004

TERMO DE APROVAÇÃO

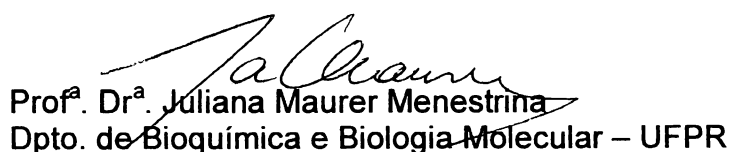
RODRIGO VASSOLER SERRATO

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA ENDOFÍTICA *Burkholderia tropicalis*: Estrutura Química e Fisiologia

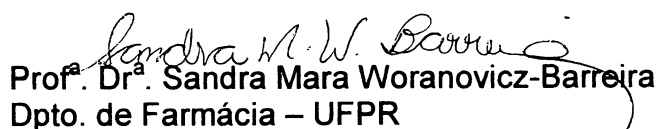
Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



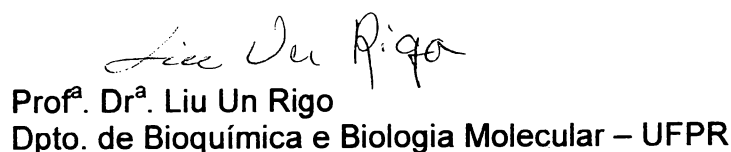
Prof. Dr. Marcello Iacomini (Orientador)
Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr.ª Juliana Maurer Menestrina
Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr.ª Sandra Mara Woranovicz-Barreira
Dpto. de Farmácia – UFPR



Prof.ª Dr.ª Liu Un Rigo
Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 13 de fevereiro de 2004

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-Orientadores: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki
Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

A sabedoria não nos é concedida; devemos descobri-la após uma jornada a qual ninguém pode nos tirar e ninguém pode nos poupar.

Marcel Proust (1871 - 1922)

Àqueles que tornaram tudo possível e continuam me incentivando e ajudando para que eu realize meus sonhos e cresça cada vez mais: meus pais Vilson e Meure. Muito obrigado, devo tudo a vocês!

Ao Prof. Marcello Iacomini pela orientação e pela confiança investida em mim para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Guilherme e Leonardo pela co-orientação, mas principalmente pela amizade e incentivo. Ambos foram essenciais para o desenvolvimento desta nova linha de pesquisa.

Sou profundamente grato ao Prof. Philip Gorin pelo privilégio e pelo prazer de trabalhar com aquele que fez história no ramo da química de carboidratos. Muito obrigado por seus ensinamentos tanto científicos quanto pessoais.

Ao Prof. Fábio Pedrosa pela oportunidade de interação e a todos os integrantes do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, em especial a Roseli Prado, pela valorosa ajuda.

Ao meu grande “irmão” Renato Bochicchio pelas inúmeras conversas e conselhos, científicos e pessoais, acompanhados por muitos litros de café.

Ao meu trio favorito: Juliana, Rosiane e Fernanda. Muito obrigado pela amizade e companheirismo. Vocês são especiais e têm lugar reservado no meu coração.

Aos meus amigos do laboratório vizinho, Adriano e Alan, pela grande amizade cultivada no dia-a-dia e por todas as festas realizadas regadas a muita cerveja.

Agradeço imensamente a Lilian, Rose Adele e Ana Paula Andreazza pela ajuda e conselhos envolvendo o material biológico e a parte de cultivo deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório: Ana Helena, Thales, Lauro, Reis, Elaine, Fábio, Ricardo, Caroline, Juliana Curi e Lucimara.

Ao Sérgio pela ajuda com o equipamento de HPLC.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

À CAPES e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho e ajudaram na manutenção da sanidade do autor.

MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. EXOPOLISSACARÍDEOS.....	2
1.1.1. Exopolissacarídeos Bacterianos.....	3
1.1.2. Parede Celular Bacteriana.....	6
1.1.2.1. Parede Celular de Bactérias Gram-Positivas.....	8
1.1.2.2. Parede Celular de Bactérias Gram-Negativas.....	9
1.1.3. Lipopolissacarídeos.....	10
1.1.4. Cápsulas.....	11
1.1.5. Biofilmes.....	11
1.2. BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	12
1.2.1. Diazotrofos Associativos.....	14
1.2.1.1. Gênero <i>Burkholderia</i>	14
1.3. EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	15
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. MICROORGANISMO.....	22
3.2. MEIO DE CULTURA.....	22
3.3. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	23
3.3.1. Cinética de Crescimento.....	23
3.3.2. Cinética de Produção de EPS.....	23
3.3.4. Produção e Obtenção dos EPS.....	24
3.4. TESTES DE FISILOGIA.....	24
3.5. MÉTODOS QUÍMICOS.....	25
3.5.1. Hidrólise Ácida Total.....	25
3.5.2. Carboxirredução de Polissacarídeos Ácidos.....	25
3.5.3. Degradação Controlada de Smith.....	25
3.5.4. Derivatização para Análise em GC-MS.....	26
3.5.4.1. Acetilação.....	26
3.5.4.2. Metilação.....	26
3.5.5. Métodos Cromatográficos.....	27
3.5.5.1. Cromatografia em Papel (CP) e de Camada Delgada (TLC).....	27
3.5.5.2. Cromatografia Líquida.....	27
3.5.5.2.1. “Fast Performance Liquid Chromatography” (FPLC).....	27
3.5.5.2.2. “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC).....	28
3.5.5.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). ..	28
3.5.6. Métodos Espectrométricos e Espectroscópicos.....	29
3.5.6.1. Espectroscopia por Infravermelho (FT-IR).....	29
3.5.6.2. “Electrospray Ionization Mass Spectrometry” (ESI-MS).....	29
3.5.6.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. FISILOGIA.....	31
4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS.....	35
5. CONCLUSÕES.....	50
ANEXO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Estrutura secundária do a) β -D-ácido manurônico, b) α -L-ácido gulurônico e c) alginato (ERTESVAG, 1998).....	4
FIGURA 02 - Estrutura geral dos peptideoglicanos. AMA: ácido acetilmurâmico (MurNAc), AGA: acetilglicosamina (GlcNAc). A estrutura ao lado mostra em detalhes a composição do peptideoglicano de <i>Escherichia coli</i> (PELCZAR, 1980).....	7
FIGURA 03 - Representação esquemática da parede celular bacteriana de organismos gram-positivos e gram-negativos.....	9
FIGURA 04 - Estrutura do lipopolissacarídeo encontrado em <i>Salmonella</i> sp. (R = Ácidos graxos de cadeia longa) (COLLINS & FERRIER, 1995).....	10
FIGURA 05 - Estrutura da succinoglucana (EPS I) e da galactoglucana (EPS II) produzidos por <i>Rhizobium melioli</i>	16
FIGURA 06 - Estrutura do EPS Cepaciana sintetizado por <i>Burkholderia cepacia</i>	17
FIGURA 07 - Cinética de crescimento de <i>B. tropicalis</i> e evolução do pH do meio de cultura.....	31
FIGURA 08 - Cinética de crescimento de <i>B. tropicalis</i> e quantificação de açúcares totais encontrados no meio.....	32
FIGURA 09 - Cromatografia de camada delgada dos produtos de hidrólise dos EPS obtidos de <i>Burkholderia tropicalis</i> em diferentes condições de cultivo. P) padrões (Rha, Glc, GlcA); 1) PPe8 2624; 2) PPe8 3024; 3) PPe8 2672; 4) PPe8 3072.....	35
FIGURA 10 - Perfil de eluição em HPLC de PPe8 3024 e PPe8 3072 após diferentes condições de hidrólise. 1) Aldobiurônico (8,34 min), 2) Ácido glucurônico (9,26 min), 3) Glucose (10,39 min), 4) Ramnose (11,67 min).....	36
FIGURA 11 - Espectro de ^{13}C -RMN de PPe8 3072 em D_2O . A região de campo mais baixo é mostrada em detalhe. Os valores são mostrados em δ (ppm).....	37
FIGURA 12 - Perfil de eluição de PPe8 3072 em coluna de troca aniônica acoplada a sistema de FPLC e detecção de açúcares totais.....	38
FIGURA 13 - Perfil de eluição de PPe8 3072-CR em HPLC.....	39

FIGURA 14 - Isolamento do aldobiurônico (Oligo-A) por eluição preparativa em HPLC.....	39
FIGURA 15 - Perfil de fragmentação de Oligo-A por ESI-MS modo negativo; 339 <i>m/z</i> : [M – Na] ⁺ , 193 <i>m/z</i> : [X – Na] ⁺ , 146 <i>m/z</i> : [Y – H] ⁺ (não observado).....	41
FIGURA 16 - Espectro de ¹³ C-RMN de PPe8 3072-CR em D ₂ O. A região de C-6 não substituído é mostrada em detalhe. Os valores são mostrados em δ (ppm).....	41
FIGURA 17 - ¹ H-RMN de PPe8 3072 (A) e PPe8-CR (B). Os valores são mostrados em δ (ppm).....	43
FIGURA 18 - ¹ H-RMN da região anomérica de PPe8 3072 (A) e PPe8-CR (B). A área relativa é mostrada abaixo dos sinais. J – Constante de acoplamento em Hz.....	45
FIGURA 19 - Espectro de ¹³ C-RMN de PPe8-CRox em D ₂ O. Os valores são mostrados em δ (ppm).....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Exemplos de exopolissacarídeos e microorganismos produtores.....	5
TABELA 02 - Estimativa de nitrogênio fixado em escala global.....	13
TABELA 03 - Fisiologia de produção de EPS por <i>Burkholderia tropicalis</i> PPe8.....	33
TABELA 04 - Rendimento do material exocelular produzido por <i>Burkholderia tropicalis</i> em diferentes temperaturas e tempos de cultivo.....	34
TABELA 05 - Assinalamentos de ^1H - e ^{13}C -RMN para Oligo-A obtidos a partir dos espectros de HMQC, COSY e TOCSY.....	40
TABELA 06 - Análise de derivados alditol acetato parcialmente metilados do EPS nativo e carboxireduzido produzido por <i>Burkholderia tropicalis</i> PPe8.....	42
TABELA 07 - Assinalamentos* de ^1H e ^{13}C para PPe8 3072 e PPe8-CR.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% – Porcentagem

λ – Comprimento de Onda

δ – ppm

AcOH – Ácido Acético

AGA – *N*-Acetil Glucosamina

AMA – Ácido *N*-Acetil Murâmico

ATP – Adenosina Trifosfato

BNF – Fixação Biológica de Nitrogênio

C:N – Relação Carbono-Nitrogênio

COSY – “*Correlation Spectroscopy*”

CPS – Polissacarídeo Capsular

DEPT – “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*”

d.i. – Diâmetro Interno

DMF – Dimetil Formamida

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

D.O.₆₀₀ – Densidade Óptica em 600 μm

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS – Exopolissacarídeo

ESI-MS – Ionização por “*Electrospray*” acoplada a Espectrometria de Massa

EtOH – Alcool Etílico

f – Furanosídico

FPLC – “*Fast Performance Liquid Chromatography*”

FT-IR – Espectrometria em Infra Vermelho acoplada a Transformada de Fourier

Gal – Galactose

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

Glc – Glucose

GlcA – Ácido Glucurônico

GlcNAc – *N*-Acetil Glucosamina

HMQC – “*Heteronuclear Multi Quantum Coherence Spectroscopy*”

HPLC – “*High Performance Liquid Chromatography*”

Kdo – Ácido Cetodeoxioctulosônico

LPS – Lipopolissacarídeo

MeOH – Álcool Metílico

MES – Ácido 2-*N*-Morfolina-Etanosulfônico

meV – Milieletron Volts

MurNAc – Ácido *N*-Acetil Murâmico

m/z – Relação entre massa e carga

p – Piranosídico

PC – Cromatografia em Papel

pH – Potencial Hidrogeniônico

ppt – Precipitado

Rha – Ramnose

RNA – Ácido Ribonucleico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – Rotações por Minuto

sbn – Sobrenadante

Tal – Talose

TFA – Ácido Trifluoracético

TLC – Cromatografia em Camada Delgada

TOCSY – “*Total Correlation Spectroscopy*”

TRIS – Aminometilidenotrimetanol

RESUMO

Burkholderia tropicalis, estirpe PPe8, é uma bactéria diazotrófica endofítica de gramíneas. Quando crescida em meio sintético contendo manitol e glutamato, produz um exopolissacarídeo (EPS) deixando o meio de cultura com um aspecto viscoso. Testes de aeração e concentração de fonte de carbono foram realizados com o intuito de estabelecer a melhor condição para a produção deste EPS. Este mostrou tratar-se de um heteropolissacarídeo ácido ramificado contendo unidades de GlcA, Glc e Rha numa razão molar de 1:2:2 respectivamente. Também são encontrados grupamentos acetil substituintes. Uma combinação de dados de metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D revela uma possível unidade pentassacarídica repetitiva O-acetilada contendo unidades de $\rightarrow 3$)- β -L-Rha, $\rightarrow 2,4$)- α -L-Rha, $\rightarrow 4$)- β -D-Glc e $\rightarrow 4$)- α -D-Glc na cadeia principal e com ramificação em C-4 das unidades de α -rhamnose contendo uma unidade de α -D-GlcA como terminal não redutor. Os espectros de COSY e TOCSY mostram que a substituição do grupamento acetil esterificando o C-2 da unidade de $\rightarrow 3$)- β -L-Rha. As unidades monossacarídicas encontradas para este EPS mostram similaridade com outros polímeros descritos para o gênero *Burkholderia*, contudo a estrutura ramificada de *B. tropicalis* PPe8 encontrada neste trabalho ainda não foi descrita até a presente data, apresentando, deste modo, um caráter inédito na literatura.

ABSTRACT

Burkholderia tropicalis, strain PPe8, is a diazotrophic bacterial endophyte of gramineous spp. When grown in synthetic medium containing mannitol and glutamate, it produces an exopolysaccharide (EPS) which renders the medium more viscous. Tests on aeration and carbon source concentration were carried out in order to determine the best growth condition for EPS production. It proved to be an acidic branched heteropolysaccharide containing GlcA, Glc and Rha in a 1:2:2 molar ratio respectively. Acetyl substituents were also found to be present. A combination of methylation analysis and NMR spectroscopy were used to reveal a repeating O-acetylated pentasaccharide group forming a polysaccharide with $\rightarrow 3$)- β -L-Rha, $\rightarrow 2,4$)- α -L-Rha, $\rightarrow 4$)- β -D-Glc and $\rightarrow 4$)- α -D-Glc as the main chain units and α -D-GlcA as non-reducing end-units attached to O-4 of the α -rhamnosyl units. COSY and TOCSY spectra showed an acetyl group esterifying O-2 of the $\rightarrow 3$)- β -L-Rha units. The composition found for this polysaccharide had similarities to other polysaccharides described for the genus *Burkholderia*. However, the branched structure now found for *B. tropicalis* PPe8 appears to be an exopolysaccharide not described to date.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. EXOPOLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos sintetizados por diversos organismos podem ser divididos em três principais grupos de acordo com sua localização morfológica: (i) polissacarídeos extracelulares que podem estar relacionados de alguma forma com a célula (cápsula em microorganismos) ou totalmente livres no ambiente sem relação física com a célula, (ii) polissacarídeos de parede celular (para procariotos e algas unicelulares) e (iii) polissacarídeos intracelulares ou somáticos localizados no citoplasma dentro da membrana plasmática celular (STACEY & BARKER, 1960). Polissacarídeos exocelulares são polímeros de carboidratos sintetizados e transportados pela célula para o exterior da membrana plasmática (SUTHERLAND, 1980). Estes polissacarídeos de superfície são amplamente observados em isolados procarióticos, incluindo aqueles que são patogênicos para humanos, animais e plantas e também em saprófitos de vida livre (SUTHERLAND, 1988). Podem também ser observados em células eucarióticas, principalmente leveduras e fungos patogênicos mas ocorrem também em protozoários e algas unicelulares.

A definição de polissacarídeos e moléculas relacionadas encontradas na superfície de células – principalmente procarióticas – fornece uma ampla variedade de nomenclaturas. Não há confusão em relação aos componentes poliméricos que formam a parede celular tais como peptideoglicanas, lipopolissacarídeos e ácidos teicóico e teicurônico. O termo *exopolissacarídeo* (EPS) tem sido amplamente utilizado para nomear polissacarídeos encontrados no exterior da célula microbiana e tem a vantagem de incluir polímeros com tipos físicos e composições químicas diversas (SUTHERLAND, 1988). O termo *glicocálix* possui a desvantagem de incluir arranjos moleculares ainda mais complexos incluindo ambos exopolissacarídeos e componentes da parede celular juntamente com outras espécies químicas observadas dentro e intimamente associadas com a parede celular. Este termo também falha no entendimento de uma definição química destes polímeros por incluir uma variedade de materiais que não contém carboidratos (SUTHERLAND, 1988).

1.1.1. Exopolissacarídeos Bacterianos

Polissacarídeos bacterianos formam um grupo de polímeros onde as variações estruturais são quase ilimitadas, geralmente apresentando unidades monossacarídicas pouco comuns. Alguns polissacarídeos bacterianos são comercialmente importantes e produzidos industrialmente. A maioria destes polissacarídeos são antigênicos e alguns são utilizados na fabricação de vacinas (KENNE & LINDBERG, 1983).

Polissacarídeos que apresentam alta especificidade imunológica são produzidos por um tipo, espécie ou grupo de bactérias. Estes polissacarídeos são geralmente compostos de unidades repetitivas de oligossacarídeos sintetizados em blocos para a formação da molécula polimerizada. Outros polissacarídeos não apresentam especificidade e podem ser produzidos por bactérias de diferentes grupos ou famílias. Estes apresentam uma estrutura geralmente menos regular (KENNE & LINDBERG, 1983).

A grande diversidade de estruturas e de microorganismos produtores de EPS está relacionada às diferentes funções desempenhadas por estas macromoléculas. Talvez a principal função dos exopolissacarídeos na fisiologia microbiana seja a de promover a adesão das células, seja a superfícies sólidas ou entre células, formando agregados na forma de flóculos (CHRISTENSEN, 1989). A agregação de bactérias envolvidas por EPS forma uma matriz altamente organizada e hidratada na qual múltiplas camadas de células estão embebidas. A existência desta matriz hidratada confere às células uma série de vantagens seletivas tais como a adesão a superfícies inertes, proteção contra variações bruscas no macroambiente, aumento da variabilidade antigênica, retenção de íons e nutrientes e proteção extrema ao mecanismo de defesa de vegetais e animais bem como antibióticos (COSTERTON, *et al.*, 1995). Contudo, a verdadeira função dos EPS depende do tipo de célula bacteriana que o produz. Especula-se que em bactérias diazotróficas a produção de EPS está relacionada tanto na sinalização planta-bactéria, para diazotróficos noduladores, quanto para a proteção do complexo da nitrogenase uma vez que a camada gelatinosa formada diminui a pressão de oxigênio a que a célula é exposta.

Atualmente podem ser observados vários exemplos de EPS produzidos por bactérias que possuem interesse industrial e biotecnológico. Provavelmente o polímero bacteriano mais utilizado industrialmente seja o alginato, uma molécula

linear formada por unidades de β -D-ácido manurônico ligada 1 $\rightarrow$ 4 a unidades α -L-ácido gulurônico (FIGURA 01), e sintetizada principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii* (GACESA, 1998). Considerando os casos de patogenicidade relacionados ao gênero *Pseudomonas*, visando o uso do ácido algínico na industrial alimentícia e farmacêutica, *Azotobacter vinelandii* parece ser mais adequado para a produção comercial deste polímero. *A. vinelandii* pertence ao grupo das bactérias fixadoras de nitrogênio que vivem aerobicamente. Uma vez que o complexo da nitrogenase é irreversivelmente inativado pela presença do oxigênio, a bactéria adota mecanismos de proteção. Proteção respiratória e conformacional são relatadas como os mecanismos utilizados para proteger o complexo da nitrogenase e não há na literatura indicações de que haja relação entre a produção de alginato e a taxa de fixação de nitrogênio em *A. vinelandii* (SABRA, 1998).

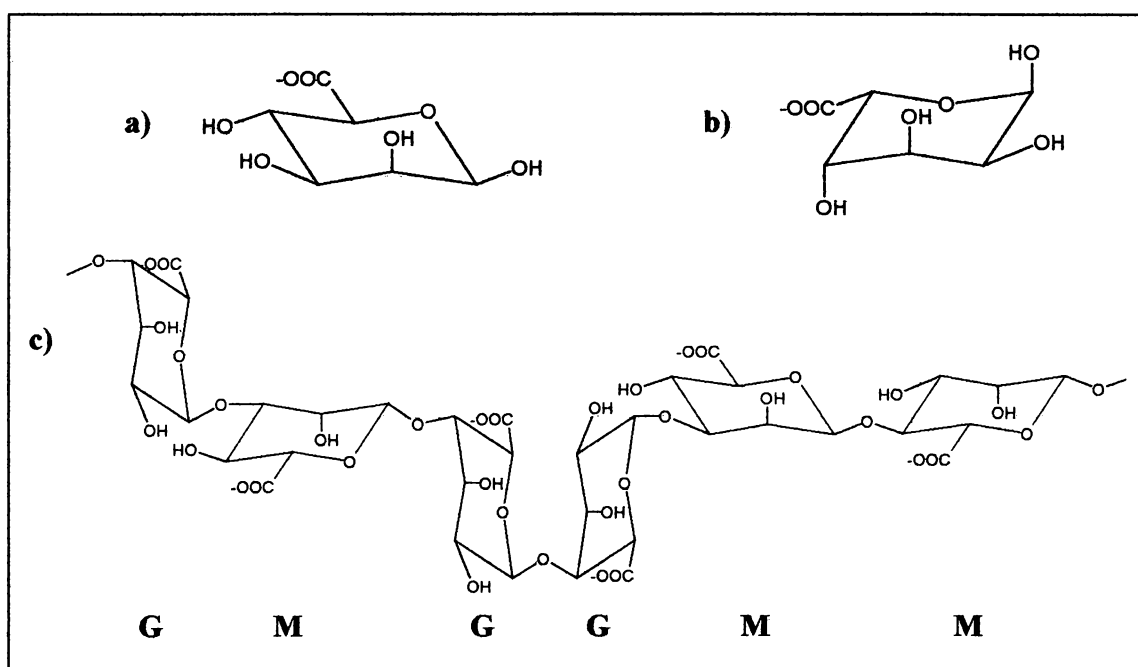


FIGURA 01. Estrutura secundária do a) β -D-ácido manurônico, b) α -L-ácido gulurônico e c) alginato (ERTESVAG, 1998).

A diversidade de estruturas sintetizadas por microorganismos é tamanha que os estudos de fisiologia de produção, genética de biossíntese e propriedades físico-químicas destas moléculas ainda não são suficientes para cobrir a demanda biotecnológica e o interesse da indústria nestes polímeros. Várias estruturas já são comercialmente produzidas e possuem funções diversas, outras estão sendo melhor estudadas e ainda precisam de aprovação dos órgãos competentes para serem

utilizadas comercialmente (TABELA 01). O grande potencial biotecnológico dos EPS microbianos, bem como os interesses financeiros que eles podem trazer, levou a um grande aumento na procura e identificação de microorganismos produtores destes polímeros.

TABELA 01. Exemplos de exopolissacarídeos e microorganismos produtores.

EPS	Tipo	Microorganismo	Referência
Alginato	Linear; Ácido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EVANS & LINKER, 1973
		<i>Azotobacter vinelandii</i>	GORIN <i>et al.</i> , 1966
Marginalana	Galactoglucana ácida	<i>Pseudomonas</i> spp.	FETT <i>et al.</i> , 1995
Xantana	Cadeia celulósica ramificada	<i>Xantomonas campestris</i>	JANSSON <i>et al.</i> , 1975
Gelana Welana Rhamsana	Linear; Ácido	<i>Sphingomonas</i> sp.	SUTHERLAND, 1996
Amilovorana Stewartana	Ramificado; Ácido	<i>Erwinia</i> sp.	NIMITZ <i>et al.</i> , 1996
Acetana	Cadeia celulósica ácida ramificada	<i>Acetobacter</i> sp.	COLQUHOUN <i>et al.</i> , 1995
Succinoglucana	Ramificado; Neutro	<i>Rhizobium melioli</i>	LEIGH & WALKER, 1994
Galactoglucana	Linear; Neutro		GONZÁLES <i>et al.</i> , 1996
Polímero V2-7	Sulfatado	<i>Halomonas eurihalina</i>	BÉJAR <i>et al.</i> , 1998
Zooglana	Ramificado; Neutro	<i>Zoogloea ramigera</i>	TROYANO <i>et al.</i> , 1996
Ácido Colânico	Ramificado; Ácido	<i>Escherichia coli</i>	SUTHERLAND, 1969
	Variável	<i>Lactobacillus</i> sp.	CERNING, 1990
		<i>Streptococcus</i> sp.	Van der BERG, 1995

EPS bacterianos possuem várias vantagens sobre polissacarídeos industriais classicamente utilizados que são obtidos de algas marinhas ou plantas. Entre estas vantagens podem-se destacar: *i)* a possibilidade de produção contínua, independente de variações sazonais ou efeito de poluição de águas, ar ou solo, *ii)* a possibilidade de obtenção de polímeros mais homogêneos, através do controle de condições de fermentação, *iii)* a não necessidade do uso de solventes ou químicos para a purificação dos polissacarídeos, *iv)* as novas técnicas de manipulação gênica

e biologia molecular, que poderiam produzir EPS modificados adaptáveis a usos industriais específicos.

1.1.2. Parede Celular Bacteriana

Na maioria das células bacterianas uma membrana rígida – parede celular – protege o delicado protoplasma de choques mecânicos e osmóticos. A parede celular também determina a forma da célula uma vez que o protoplasma (célula sem a parede celular) será sempre esférico independentemente da forma da célula quando a parede celular está presente. A parede celular também funciona como uma peneira molecular impedindo que muitos compostos atinjam a superfície da membrana plasmática, incluindo alguns antibióticos. Contudo a parede celular não deve ser vista meramente como uma proteção inerte envolvendo uma célula, ela possui um papel ativo na regulação da captação de moléculas pela célula e no reconhecimento celular por outras bactérias e outros organismos (SINGLETON, 1992).

O peptideoglicano é o principal componente da parede celular bacteriana. Ambos organismos Gram-Negativos e Gram-Positivos formam uma rede contínua de carboidratos contendo ligações cruzadas por pontes peptídicas cobrindo toda a superfície celular como uma macromolécula gigante (GLASER, 1973). Os peptideoglicanos são formados por três tipos de moléculas principais: (1) N-acetilglicosamina (2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosose) (AGA ou GlcNAc), (2) ácido N-acetilmurâmico (2-acetamido-2-deoxi-3-O-lactil-D-glucopiranosose) (AMA ou MurNAc) e (3) um peptídeo constituído de quatro ou cinco aminoácidos de variedade limitada. Vários aminoácidos existem na forma D, geralmente não encontrados em outras moléculas na natureza (PELCZAR, 1980). Um peptideoglicano pode ser melhor representado como um esqueleto de cadeias heteropolissacarídicas de aminoaçúcares ligados β -(1 $\rightarrow$ 4) (COLLINS & FERRIER, 1995), compostas de unidades alternadas de AGA e AMA, com pequenas cadeias peptídicas, que se projetam das unidades AMA. Algumas destas cadeias peptídicas são unidas de maneira cruzada a outro polissacarídeo, dando grande rigidez à estrutura (FIGURA 02).

O mecanismo de crescimento desta macromolécula deve ser correspondente com a forma da célula. A parede celular também possui importância vital na divisão

celular. Para que uma célula bacteriana cresça e se divida é necessário que a parede celular seja em parte rompida permitindo a expansão do protoplasma. Enzimas são responsáveis pela quebra dos peptídeoglicanos da parede, contudo grandes orifícios na parede devem ser evitados sob risco de rompimento da membrana celular, e uma parede celular é sintetizada formando um septo entre as células filhas antes da separação. A formação do septo deve ocorrer em uma posição em que cada célula filha receba pelo menos uma cópia do genoma. Devido a este último passo, a síntese de polissacarídeos da parede celular e a síntese do DNA bacteriano devem ser intimamente relacionadas (GLASER, 1973).

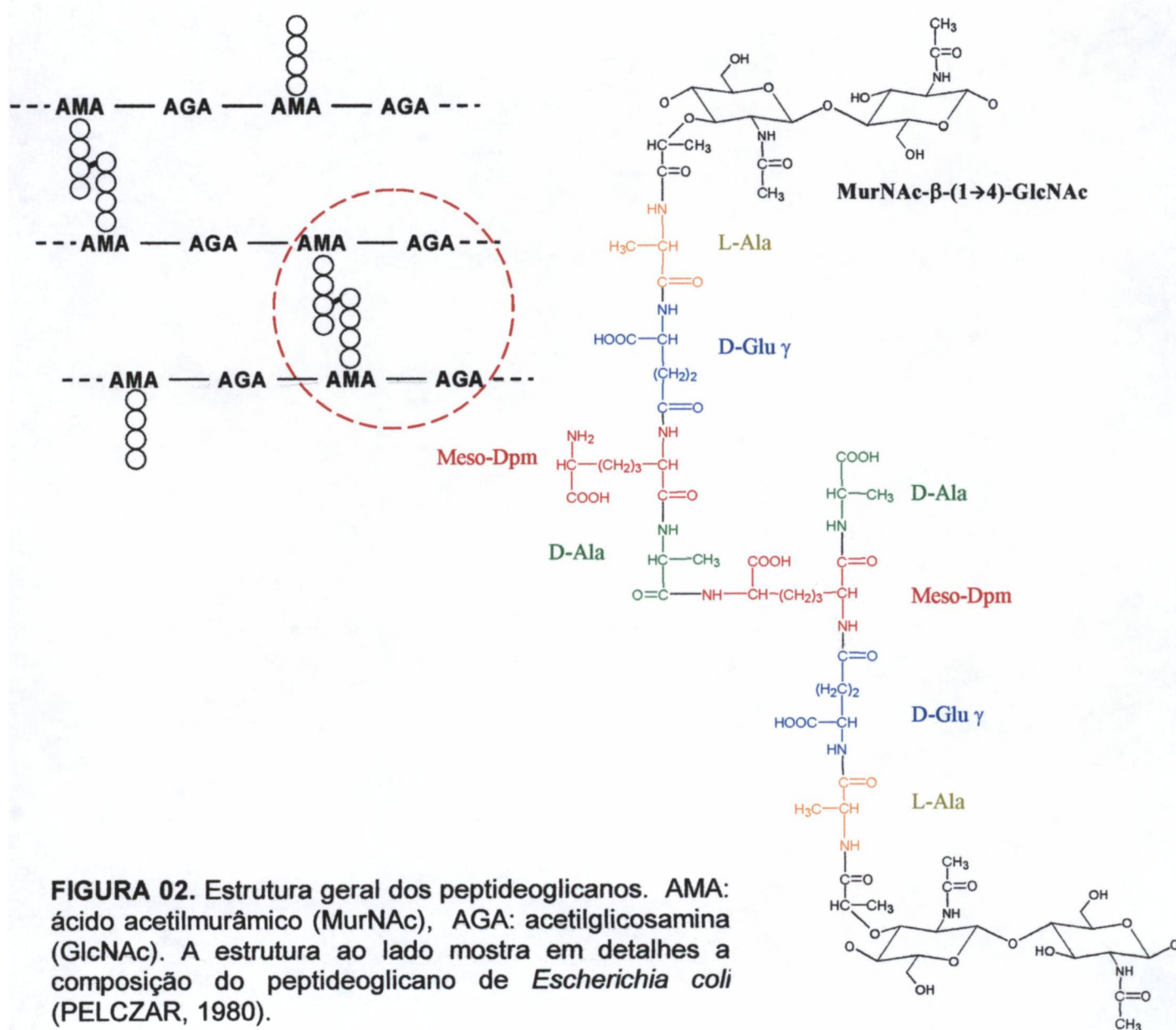


FIGURA 02. Estrutura geral dos peptídeoglicanos. AMA: ácido acetilmurâmico (MurNAc), AGA: acetilglicosamina (GlcNAc). A estrutura ao lado mostra em detalhes a composição do peptídeoglicano de *Escherichia coli* (PELCZAR, 1980).

A molécula de proteoglicana também é alvo de enzimas chamadas lisozimas. Estas lisozimas são encontradas nos fluidos e mucosas, especialmente nas secreções lacrimais, e é uma das proteínas encontradas em ovos. São específicas para as ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) do polissacarídeo de MurNAc e GlcNAc clivando a ligação glicosídica e fornecendo o dissacarídeo GlcNAc- β -(1 $\rightarrow$ 4)-MurNAc. Outra importante propriedade da parede celular é a susceptibilidade ao ataque de antibióticos. Algumas drogas antibióticas atuam na síntese do peptídeoglicano fazendo com que a parede celular das células bacterianas filhas sejam defeituosas após a divisão e inviáveis, desta forma a colônia não pode crescer (SHARON, 1975).

A parede celular de diferentes espécies pode ser muito diferente em estrutura, espessura e composição. Contudo, entre as eubactérias, apenas dois grupos principais diferem em suas paredes celulares. Estes grupos são determinados pela reação da parede celular a certos corantes (cristal violeta e iodo) denominada coloração de Gram. A coloração de Gram está relacionada com a estrutura de parede celular presente nas células. Bactérias que retêm a coloração de Gram após tratamento com os corantes e lavagem com etanol ou acetona são chamadas Gram-Positivas, já as bactérias que perdem a cor após a lavagem são denominadas Gram-Negativas. Há uma grande diferença entre a estrutura de parede celular destes grupos (FIGURA 03).

1.1.2.1. Parede Celular de Bactérias Gram-Positivas

Na parede celular de bactérias Gram-Positivas o peptídeoglicano é o principal constituinte. Em certos organismos tal como *Micrococcus luteus*, o peptídeoglicano é responsável por $\frac{3}{4}$ do peso seco total da parede celular. Outros polissacarídeos também podem estar presentes ligados covalentemente ao peptídeoglicano por ligações fosfodiéster (SHARON, 1975). A parede celular é relativamente grossa (30–100 nm). Ligados covalentemente ao peptídeoglicano há compostos como o ácido teicóico: polímeros de glicerol fosfato, ribitol fosfato (SINGLETON, 1992), ou 3-O- β -D-glucopiranosilglicerol fosfato que podem ter monossacarídeos, oligossacarídeos ou aminoácidos ligados a hidroxilas não substituídas (COLLINS & FERRIER, 1995). Ácido teicóico freqüentemente corresponde até 30% do peso seco da parede celular. O papel do ácido teicóico na parede celular ainda não está esclarecido, muitos são sorologicamente ativos e geralmente constituem um componente grupo-específico

de bactérias gram-positivas. Eles também servem de receptores para fagos. É sugerido que estas estruturas estão envolvidas na ligação de íons divalentes (particularmente Mg^{2+}) a superfície da célula (SHARON, 1975). Algumas bactérias ainda podem apresentar outros tipos de carboidratos e lipídeos ligados a parede celular.

1.1.2.2. Parede Celular de Bactérias Gram-Negativas

A parede celular de bactérias gram-negativas é consideravelmente mais complexa em comparação com células gram-positivas. A estrutura que envolve bactérias gram-negativas é melhor descrita pelo termo envelope celular. Neste caso uma fina porção de peptideoglicano, muitas vezes monocamada, encontra-se comprimida entre a membrana plasmática e a membrana externa (SHARON, 1975). A camada externa contém proteínas, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas. Desta forma, o peptideoglicano não é acessível a ação de lisozimas ou outras enzimas líticas ao menos que esta membrana seja danificada física (gelo e degelo) ou quimicamente (tratamento alcalino ou quelante – EDTA). Esta membrana externa também possui uma certa permeabilidade a determinados compostos incluindo vários antibióticos, sendo portanto altamente responsável pela resistência destas bactérias (SHARON, 1975). A membrana externa aparece ligada não covalentemente ao peptideoglicano por uma proteína hidrofóbica. Esta proteína está covalentemente ligada por seu terminal carboxílico ao grupo amino de um aminoácido do peptideoglicano que não está fazendo ligação cruzada. O terminal amino da proteína hidrofóbica está ligada a um lipídeo que encontra-se ancorado por forças hidrofóbicas na membrana externa (COLLINS & FERRIER, 1995).

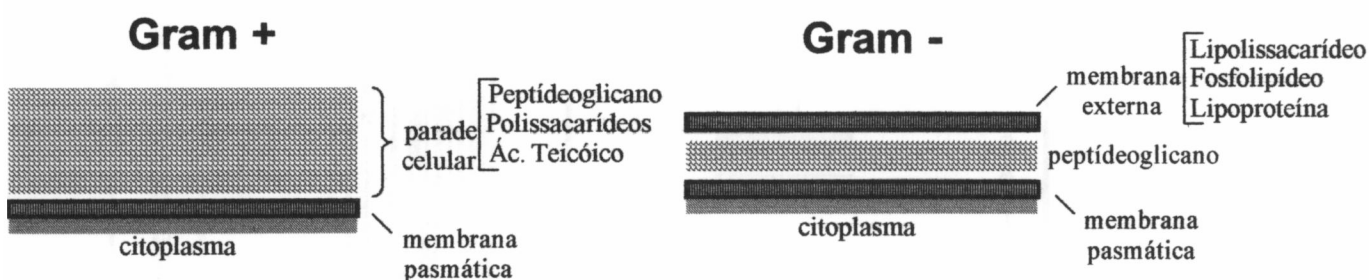


FIGURA 03. Representação esquemática da parede celular bacteriana de organismos gram-positivos e gram-negativos.

1.1.3. Lipopolissacarídeos

A membrana externa de bactérias gram-negativas contém lipopolissacarídeos (LPS) extremamente complexos (FIGURA 04) os quais são formados por pelo menos três partes características: o componente chamado lipídeo A, o núcleo (esqueleto) e a região externa (COLLINS & FERRIER, 1995). O lipídeo A não varia muito entre as espécies e é basicamente constituído por ligações β -(1 $\rightarrow$ 6) entre dímeros de 2-amino-2-deoxi-D-glucose contendo dois fosfatos na forma de ésteres e substituídos por longas cadeias de ácidos graxos. Este é ligado ao núcleo por uma ponte de ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico (Kdo – ácido cetodeoxioctulosônico) ligados glicosidicamente (2 $\rightarrow$ 7). Ao lipídeo A também são ligados oligo e polissacarídeos, fazendo parte da região externa, que são antigênicos e podem auxiliar na classificação de bactérias gram-negativas de acordo com seus serotipos (COLLINS & FERRIER, 1995).

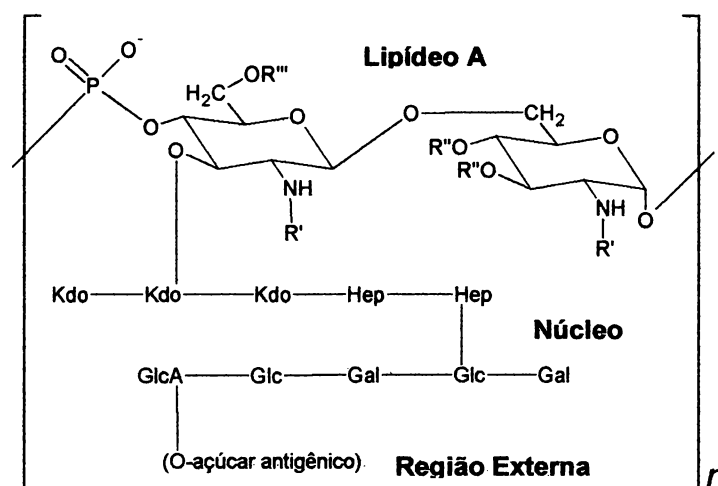


FIGURA 04. Estrutura do lipopolissacarídeo encontrado em *Salmonella* sp. (R = Ácidos graxos de cadeia longa) (COLLINS & FERRIER, 1995).

A porção lipídeo A é a região mais conservada e possui estrutura similar na maioria dos lipopolissacarídeos estudados. O núcleo tem a mesma estrutura nos grandes grupos de bactérias, portanto todas as espécies de *Salmonella* parecem possuir o mesmo núcleo. Por outro lado a região externa O-específica determina a antigenicidade e especificidade de cada bactéria e apresenta uma enorme variação estrutural (KENNE & LINDBERG, 1983).

LPS tem sido objeto de intensas investigações biológicas por várias razões importantes. São imunologicamente ativos e geralmente servem de receptores para

bacteriófagos. Outra propriedade importante é sua atividade farmacológica e toxicidade em animais superiores (SHARON, 1975).

1.1.4. Cápsulas

Há uma distinção entre a parede celular e a cápsula. A última pode ser descrita como a camada de revestimento fora da parede celular. A presença da cápsula é um dos fatores limitantes da virulência de um microorganismo. Este revestimento é geralmente composto de um único polissacarídeo com pequenas quantidades de DNA e RNA ou em alguns casos, como em *Bacillus megatherium*, proteínas incomuns, ácido poli-D-glutâmico juntamente com o polissacarídeo. O material capsular é extremamente hidratado e de aspecto gelatinoso. Em condições favoráveis, especialmente em meios líquidos, os polissacarídeos capsulares podem ser sintetizados por enzimas extracelulares a distâncias ligeiramente remotas da célula (STACEY & BARKER, 1960).

Bactérias Gram-negativas geralmente produzem polissacarídeos capsulares que assumem suas características imunológicas. Normalmente estes são de caráter ácido contendo ácidos urônicos ou ulosônicos, ácido pirúvico como substituintes acetais cíclicos, ou grupos fosfato (COLLINS & FERRIER, 1995).

1.1.5. Biofilmes

Biofilmes são definidos como uma população de bactérias englobadas por uma matriz aderente uma as outras ou a superfícies inertes. Esta definição inclui agregados e flóculos microbianos a populações aderentes (COSTERTON *et al.*, 1995). Com a evidenciação de que muitos, provavelmente a maioria dos microorganismos existem naturalmente como comunidades não-planctônicas, o interesse neste fenômeno tem aumentado consideravelmente (SUTHERLAND, 2001).

É muito claro que os biofilmes constituem uma fase de crescimento distinta para bactérias sésseis que é profundamente diferente das bactérias planctônicas. Durante o complexo processo de adesão, as células bacterianas alteram seus fenótipos em resposta a proximidade da superfície. Durante a fase inicial da formação de biofilmes, bactérias sésseis encontram-se justapostas com células da mesma espécie ou espécies diferentes formando microcolônias. Esta justaposição

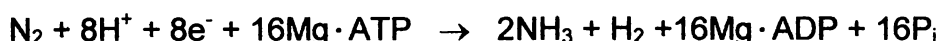
celular juntamente com a exuberante matriz exopolissacarídica condiciona o microambiente de cada biofilme. Bactérias em diferentes posições no biofilme respondem a condição do microambiente com diferentes padrões de crescimento. Cooperatividade fisiológica é um fator chave para a arquitetura do biofilme e para o estabelecimento de justaposições tornando o biofilme uma comunidade microbiana muito eficiente aderida a superfícies (COSTERTON *et al.*, 1995).

A matriz pode ser considerada como um sistema imobilizado contendo atividade enzimática no qual uma variedade de enzimas está constantemente mudando e evoluindo para a formação de um estado de homeostase. A maior parte do biofilme – talvez até 97% – é formado por água. A água pode estar capturada dentro da cápsula celular ou existir como um solvente livre na matriz. Além da água e da rede polissacarídica, a matriz é formada por nutrientes e metabólitos, produtos da lise celular e material particulado capturado do ambiente. Portanto, todas as classes de macromoléculas – proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA – podem estar presente além de peptideoglicano, lipídeo, fosfolipídeos e outros componentes celulares (SUTHERLAND, 2001).

1.2. BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Com exceção da água, o nitrogênio é normalmente considerado o componente mais limitante para o desenvolvimento de plantas em seu ambiente natural (FRANCO & DÖBEREINER, 1994). Aproximadamente 80% da atmosfera terrestre é composta por nitrogênio molecular ou dinitrogênio (N₂). Contudo, N₂ não é diretamente utilizado pela maioria dos organismos. Todos os organismos usam nitrogênio na forma mais reduzida, como amônia (NH₃), na fabricação de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, além de outros compostos nitrogenados.

A fixação biológica do nitrogênio (BNF) é o processo que transforma o N₂ inerte em NH₃ biologicamente útil. Este processo é realizado na natureza apenas por um seleto grupo de procariotos que consegue converter enzimaticamente o nitrogênio atmosférico em amônia através do complexo da nitrogenase. Sob condições ótimas, a estequiometria geral da redução do dinitrogênio pela nitrogenase é a seguinte (SIMPSON & BURRIS, 1984):



As bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas, constituem a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. A estimativa é de que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente seja de 140 a 180 x 10⁶ toneladas por ano, pelo menos o dobro da fixação química (TABELA 02) além de garantir um ecossistema em equilíbrio evitando a contaminação das águas e solos por compostos nitrogenados prejudiciais (PEOPLES & CRASWELL, 1992).

TABELA 02. Estimativa de nitrogênio fixado em escala global.

Tipo de Fixação	N₂ fixado (10⁶ ton/ano)	Total
Não-Biológica		
Industrial	Aprox. 50	~80.000.000 ton.ano ⁻¹
Combustão	Aprox. 20	
Natural (Raios)	Aprox. 10	
Biológica		
Terras de Cultivo	Aprox. 90	~175.000.000 ton.ano ⁻¹
Florestas	Aprox. 50	
Mares e Oceanos	Aprox. 35	

Dados de várias fontes, compilados por BEZDICEK & KENNEDY (1998).
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/nitrogen.htm>

Segundo Evans e Burris (1992), podemos classificar as bactérias fixadoras de nitrogênio em três grupos: (i) diazotrofos de vida livre, que fixam N₂ para seu próprio consumo, (ii) diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento de plantas (principalmente gramíneas) sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo simbiose, e os (iii) diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma relação muito estreita entre o macro e microssimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas especializadas denominadas nódulos (especialmente em leguminosas). Dentre estes organismos, muitos são heterotróficos, aeróbicos ou anaeróbicos, necessitando de um suplemento de carbono reduzido, o que depende indiretamente de energia luminosa e em geral requer uma simbiose com eucariotos. Outros são encontrados livres competindo com outros microorganismos pela matéria orgânica disponível. Alguns são autotróficos (cianobactérias), podendo reduzir CO₂ na presença de luz.

1.2.1. Diazotrofos Associativos

Este grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio, também denominados de diazotrofos endofíticos, pode ser dividido em dois subgrupos de acordo com a proposição de Baldani *et al.* (1997): endofíticos facultativos, podendo colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, e endofíticos obrigatórios, colonizando o interior das raízes.

Dentre os diazotrofos caracterizados como endofíticos estão incluídos os gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (BALDANI *et al.*, 1997). Os dois primeiros gêneros pertencem a divisão alfa das proteobactérias e os demais pertencem a divisão beta. As alfa proteobactérias abrangem também outros diazotrofos como os simbióticos que formam o grupo dos rizóbios; de bactérias de vida livre, como *Beijerinckia*; fototrópicos, como *Rhodopseudomonas*; e fitopatógenos como *Agrobacterium* (YOUNG, 1992). As beta proteobactérias incluem diversos fitopatógenos e contrariamente à subdivisão alfa, possui relativamente poucas espécies capazes de fixar N₂, como nos gêneros *Derxia*, *Alcaligenes* e *Thiobacillus* (YOUNG, 1992), além daqueles já citados.

1.2.1.1. Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* é formado por bactérias gram-negativas e compreende cerca de 25 espécies sendo algumas descritas como fixadoras de nitrogênio. Recentemente duas novas espécies isoladas em plantas de arroz, batata doce e mandioca (raiz, tubérculo e caule) cultivadas no Brasil foram caracterizadas como diazotróficas pertencentes a este gênero, através de análises morfológicas, fisiológicas e seqüenciamento parcial do gene para o RNA ribossomal de 23S (23S rDNA), sendo nomeadas *Burkholderia brasilensis* (M130) e *Burkholderia tropicalis* (PPe8) (BALDANI, 1996). Entretanto o seqüenciamento do gene para o RNA ribossomal de 16S (16S rDNA) da estirpe M130 mostrou que há 100% de homologia com outra espécie deste gênero: *Burkholderia kururiensis*. Um grande número destes diazotróficos tem sido encontrado no interior de raízes de arroz sem causar danos à célula (BALDANI *et al.*, 1997). Este gênero também inclui vários patógenos, inclusive para humanos, e foi criado a partir de um grupo homólogo de

Pseudomonas, contendo originalmente sete espécies sendo a espécie *Burkholderia cepacia* uma nova fixadora de nitrogênio isolada da rizosfera de arroz (YABUUCHI *et al.*, 1992) também encontrada em pacientes com fibrose cística (GOLDMAN & KLINGER, 1986) e como contaminante de soluções empregadas em práticas hospitalares (DEVIVINO *et al.*, 1994). Sua inclusão no gênero deve-se a sua alta homologia DNA:DNA e DNA:rDNA e características fenotípicas (TRAN VAN *et al.*, 1994). Esta bactéria foi originalmente descrita como o agente causal da podridão mole em cebola (BURKHOLDER, 1950), e tem sido encontrada em diferentes tipos de solos e raízes. Atualmente o gênero *Burkholderia* é considerado de grande importância devido a sua ampla distribuição em solos, águas e rizosferas de plantas e pelo seu uso em controle biológico, apresentando antagonismo a alguns fungos e patógenos de plantas existentes no solo (McLOUGHLIN *et al.*, 1992) assim como por degradar alguns pesticidas (JACOBSEN, 1997; MARS *et al.*, 1996).

1.3. EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

A produção de exopolissacarídeos é um traço comum a várias bactérias fixadoras de nitrogênio. A capacidade de floculação e agregação de fixadores de nitrogênio de vida livre tais como *Azospirillum* e *Azotobacter* está ligada a produção destas macromoléculas, o que pode ser interessante do ponto de vista da dispersão e da sobrevivência destes microorganismos no solo (BURDMAN *et al.*, 1998; GACESA, 1998).

No processo de infecção parasitária por fitopatógenos, os exopolissacarídeos, por serem hidrofílicos, criam um ambiente favorável ao crescimento do patógeno no interior da planta infectada e podem agir como barreiras protetoras contra os mecanismos de defesa da planta, portanto a síntese de EPS é considerada um fator essencial na interação planta-bactéria (LEIGH & COPLIN, 1992). A interrupção de genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos (genes *exo*) resulta na perda ou limitação dos sintomas causados por *Erwinia stewartii* e *Xantomonas axopodis* em seus respectivos hospedeiros (DENNY, 1995). No caso de *Xantomonas campestris*, foi demonstrado que uma mutação no gene *gumD*, que codifica uma glucose transferase envolvida no processo de produção do EPS xantana, diminui drasticamente a patogenicidade deste organismo (CHOU *et al.*, 1997).

A família Rhizobiaceae possui vários gêneros produtores de exopolissacarídeos tais como *Agrobacterium*, *Chromobacterium* e *Rhizobium*. Apesar do estreito relacionamento entre os gêneros *Agrobacterium* e *Rhizobium* observado pela grande homologia entre as seqüências de seus RNAs 16S, apenas o gênero *Rhizobium* é capaz de fixar nitrogênio atmosférico (AIRD *et al.*, 1991).

Diversas espécies de *Rhizobium* já foram estudadas e vários exopolissacarídeos caracterizados, incluindo polissacarídeos capsulares. *Rhizobium melioli* apresenta uma cápsula composta por unidades repetitivas de um octassacarídeo contendo Glcp e Galp. Uma grande diversificação estrutural também é observada em outras espécies de *Rhizobium* – *R. leguminosarium*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* – em polissacarídeos apresentando principalmente RibfA, GlcpA, Galp, Rhap (KENNE & LINDBERG, 1983). Em *R. melioli*, a produção do exopolissacarídeo succinoglucana, EPS I (FIGURA 05) é fundamental para o estabelecimento de nódulos fixadores de nitrogênio funcionais na simbiose desta espécie com plantas de *Medicago sativa* (alfafa), no entanto o papel exato do EPS I ainda não é conhecido (LEIGH & COPLIN, 1992; LEIGH & WALKER, 1994). Em certas condições, uma galactoglucana, EPS II (FIGURA 05), também pode ser produzida e é capaz de substituir o EPS I no estabelecimento dos nódulos fixadores de nitrogênio (GONZÁLES *et al.*, 1996). Mutantes deficientes na biossíntese do EPS I são capazes de induzir o nódulo, porém estes não contêm bactérias e portanto são incapazes de fixar dinitrogênio (LEIGH *et al.*, 1987).

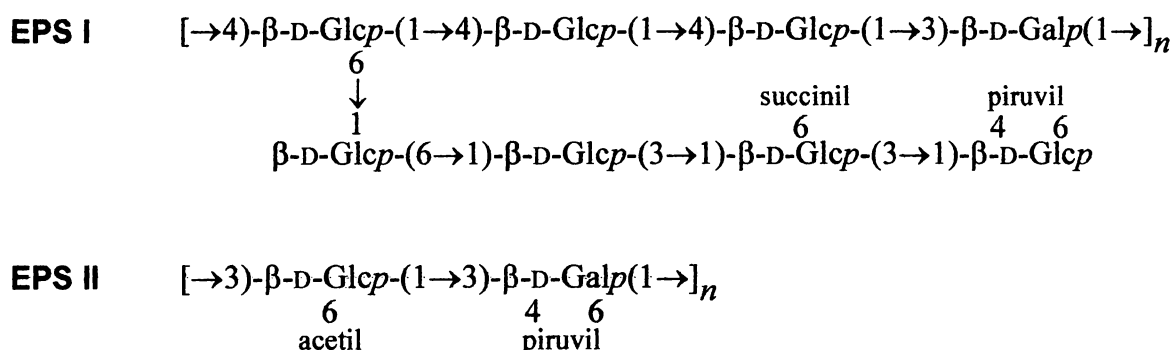


FIGURA 05. Estrutura da succinoglucana (EPS I) e da galactoglucana (EPS II) produzidos por *Rhizobium melioli*.

Algumas espécies do gênero *Burkholderia* são descritas como produtoras de EPS. *Burkholderia cepacia* é certamente a espécie mais estudada e dois EPS são

descritos: uma galactoglucana linear composta por unidades repetitivas do dissacarídeo $\rightarrow 3)$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ com substituições em C-4 e C-6 na unidade de Galp por acetal de ácido pirúvico (SIST *et al.*, 2003; LAGATOLLA *et al.*, 2002) e um polissacarídeo extremamente complexo e ramificado chamado Cepaciana (Figura 06) (CERANTOLA & MONTROZIER, 2001). Este polissacarídeo possui propriedades físico-químicas interessantes devido a sua unidade de GlcAp totalmente substituída conferindo características reológicas de interesse (LINKER *et al.*, 2001).

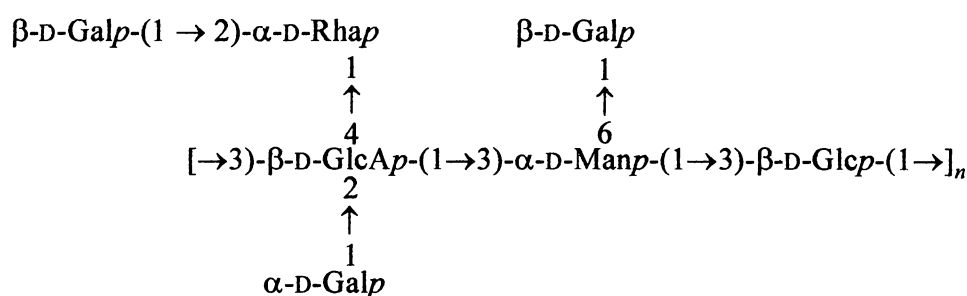


FIGURA 06. Estrutura do EPS Cepaciana sintetizado por *Burkholderia cepacia*.

Mattos *et al.* (2001) observaram a produção de dois EPS para a estirpe M130 de *Burkholderia brasiliensis*. A elucidação estrutural de um dos exopolissacarídeos produzidos mostrou uma molécula cuja unidade repetitiva é um pentassacarídeo linear com a seguinte estrutura: $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcAp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow]_n$. Unidades de açúcares raros também são encontradas como nos exopolissacarídeos descritos para *Burkholderia caribensis* (VANHAVERBEKE *et al.*, 2001) que possui unidades de α -L-6dTal na cadeia principal e ramificação de β -Kdop e *Burkholderia pseudomallei* (STEINMETZ *et al.*, 2000; KAWAHARA *et al.*, 1998) que sintetiza um EPS linear contendo Galp e Kdop.

Vários trabalhos citam o papel de polissacarídeos O-específicos e lipopolissacarídeos na interação entre a planta e o microorganismo. Estas estruturas foram isoladas de *Azospirillum brasilense* Sp245 e caracterizados quimicamente por espectroscopia (^1H e ^{13}C -RMN) apresentando uma estrutura composta por D-Rhap ligadas β -(1 $\rightarrow$ 2) e β -(1 $\rightarrow$ 3) (FEDONENKO *et al.*, 2002). Estudos de interação entre espécies de *Azospirillum* e raízes de trigo relacionando polissacarídeos produzidos pelo microorganismos também são encontrados (SKVORTSOV e IGNATOV, 1998;

KONNOVA *et al.*, 1994). Trabalhos mostram a composição de polissacarídeos extracelulares relacionados a agregação celular e floculação de *A. brasilense* (BURDMAN *et al.*, 2000) e *A. lipoferum* (SADASIVAN & NEYRA, 1985) bem como aspectos genéticos, bioquímicos e ecológicos da associação planta-bactéria (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de exopolissacarídeos (EPS) pela bactéria diazotrófica endofítica *Burkholderia tropicalis*, estirpe PPe8.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter informações básicas sobre a fisiologia de produção de exopolissacarídeos pela bactéria diazotrófica endofítica *Burkholderia tropicalis* PPe8.
- Estabelecer as condições de produção bem como a metodologia de quantificação e purificação dos EPS produzidos.
- Caracterizar química e estruturalmente os polissacarídeos obtidos utilizando métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMO

A bactéria *Burkholderia tropicalis*, estirpe PPe8, utilizada neste estudo é proveniente da coleção de culturas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e foi cedida pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná. As células de *B. tropicalis* foram mantidas em estoque suspensas em glicerol 50% a -20°C , permanecendo viáveis por um período de até dois anos.

3.2. MEIO DE CULTURA

Para o crescimento e produção de exopolissacarídeos foi utilizado o meio sintético JMV (BALDANI *et al.*, 1996) contendo: K_2HPO_4 ($0,6 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,8 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), NaCl ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mg.L^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($2,4 \text{ mg.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($2,8 \text{ mg.L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,24 \text{ mg.L}^{-1}$) suplementado com 4ml de FeEDTA (1,64%) e 1ml de biotina ($100 \mu\text{g/ml}$). A fonte de carbono utilizada foi manitol ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$ ou $27,5 \text{ mM}$) e como fonte de nitrogênio foi usado L-glutamato monossódico monohidratado ($1,87 \text{ g.L}^{-1}$ ou 10 mM) (ANEXO 01). Originalmente o meio continha extrato de levedura (100 mg.L^{-1}) que foi excluído para manter a composição do meio melhor definida. Outras alterações na composição do meio também foram feitas para testar diferentes condições fisiológicas para a produção de EPS, tais modificações são descritas oportunamente.

As soluções de FeEDTA (1,64%) e glutamato de sódio 1M foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio na hora do uso. Todos os outros sais foram solubilizados em água destilada e autoclavados por 20 min (120°C , 1 atm) e o pH ajustado até 4,5 com H_2SO_4 2N. Pode-se adicionar 2 ml de solução indicadora de pH (Azul de Bromotimol – 0,5% em KOH 0,2N).

3.3. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para a preparação dos pré-inóculos, frascos de 60 ml contendo 10 ml de JMV foram inoculados com 40 μ L da suspensão de células em glicerol 50% e crescidos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em shaker rotatório (120 rpm) e após 48h um repique foi feito com 10 μ L da cultura crescida em outro frasco de 60 ml com 10 ml de JMV nas mesmas condições por 24h.

A partir do pré-inóculo fresco os inóculos teste foram feitos em frascos de 60 ml ou erlenmeyers e crescidos em diferentes condições de acordo com o experimento realizado.

3.3.1. Cinética de Crescimento

Para o estudo da cinética de crescimento foram utilizados 42 frascos de 60 ml, cada um contendo 10 ml de meio JMV previamente inoculado com *B. tropicalis* PPe8 numa D.O.₆₀₀ de 0,05. Todos os frascos foram incubados em shaker rotatório (120 rpm) a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Três frascos eram coletados a cada 2 horas nas primeiras 12 horas de experimento e em intervalos regulares até que fossem completadas 72 horas de crescimento. A densidade óptica de cada frasco foi determinada em espectrofotômetro Hitachi U-2001 e comprimento de onda de 600 nm (D.O.₆₀₀). As amostras eram diluídas quando necessário para que nenhuma leitura fosse superior a 0,3. Os valores eram corrigidos posteriormente conforme a diluição. O pH de cada frasco também foi determinado utilizando potenciômetro Micronal (modelo B374).

3.3.2. Cinética de Produção de EPS

A análise de produção de exopolissacarídeos por *B. tropicalis* PPe8 foi realizada com os frascos do estudo da cinética de crescimento. Aliquotas de 1 ml de cada frasco eram coletadas em eppendorfs e, após centrifugação, 500 μ L do meio livre de células era submetido ao teste colorimétrico com PhOH:H₂SO₄ para determinação de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956). Soluções de D-glucose foram utilizadas como padrão para a determinação da concentração de açúcares totais no meio em mg.L⁻¹ (490 nm).

3.3.3. Produção e Obtenção dos EPS

Quatro frascos tipo erlenmeyer de 2L foram utilizados para a produção de quantidades significativas de polissacarídeos extracelulares. Cada frasco continha 500 ml de meio JMV inoculados com pré-inóculo fresco de *B. tropicalis* PPe8 (D.O.₆₀₀ de 0,05) e crescidos em shaker rotatório (120 rpm) a 30°C ± 1°C durante 72h.

Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas (10.000 g, 10 min) e o meio livre de células foi concentrado, dialisado e submetido a precipitação com etanol (3v/v) a frio. O material precipitado (ppt EtOH) foi coletado por centrifugação (10.000 g, 10 min) e ressolubilizado em água para ser centrifugado novamente a 30.000 g por 30 minutos. O material solúvel desta última centrifugação (EPS solúvel) foi liofilizado para obtenção do peso seco de EPS produzido e posteriormente analisado química e estruturalmente.

3.4. TESTES DE FISILOGIA

Alterações na composição do meio JMV e nas condições de crescimento foram realizadas com o intuito de observar o comportamento de *B. tropicalis* PPe8 em relação a produção de EPS. Nove frascos tipo erlenmeyer de 500 ml foram utilizados para os testes de aeração e relação carbono:nitrogênio (C:N). A variação da relação Carbono:Nitrogênio foi feita utilizando três diferentes concentrações de manitol: 15 g.L⁻¹ ("High" C:N), 10 g.L⁻¹ e 5 g.L⁻¹ ("Low" C:N). A aeração em cada frasco foi controlada pelo volume de meio utilizado sendo três as condições utilizadas: 400 ml (aeração +), 250 ml (aeração ++) e 100 ml (aeração +++). Cada condição de aeração foi testada simultaneamente com todas as condições de relação C:N.

Cada frasco foi inoculado com pré-inóculo fresco de *B. tropicalis* PPe8 (D.O.₆₀₀ 0,05) e incubados em shaker rotatório (120 rpm) a 30°C ± 1°C. Após 24h o material foi centrifugado e o meio livre de células foi submetido ao teste colorimétrico do PhOH:H₂SO₄ como descrito e ao processo de obtenção de EPS para determinação do peso seco de material extracelular produzido.

Para analisar o efeito da temperatura na produção de exopolissacarídeos por *B. tropicalis* PPe8, frascos tipo erlenmeyers de 2 L foram inoculados com pré-inóculo

fresco em 500 ml de meio JMV (D.O.₆₀₀ 0,05) e crescidos em shaker rotatório (120 rpm) a 30°C e 26°C em dois tempos finais de cultivo: 24h e 72h. O material produzido foi coletado como descrito e seu peso seco determinado após liofilização.

3.5. MÉTODOS QUÍMICOS

3.5.1. Hidrólise Ácida Total

O material exocelular obtido foi submetido a hidrólise ácida total com ácido trifluoracético (TFA) 1M, durante 8 horas a 100°C, para a obtenção das unidades monossacarídicas que constituem os polissacarídeos obtidos (WHITON *et al*, 1985).

3.5.2. Carboxirredução de Polissacarídeos Ácidos

Polissacarídeos contendo ácidos urônicos encontrados nas amostras foram carboxireduzidos pelo método descrito por TAYLOR & CONRAD (1972). Cerca de 20 mg de material foram dissolvidos em solução de ácido 2-*N*-morfolina-etanosulfônico (tampão MES) 0,2M pH 4,75 com posterior adição de *N*-ciclohexil-*N'*-[β-(metil-morfolina)etil]-carbodiimida *p*-toluenosulfonato com agitação constante por 2 horas. A solução foi neutralizada com tampão TRIS 2 M pH 7,0 e boridreto de sódio (NaBH₄) foi adicionado até a concentração de 2 M. O material foi reduzido por 12 horas e posteriormente neutralizado com HCl até pH 5,0 e dialisado exaustivamente antes de ser liofilizado.

3.5.3. Degradação Controlada de Smith

O material obtido de *B. tropicalis* PPe8 (200 mg) foi solubilizado 25 ml de água com posterior adição de 25 ml de solução de periodato de sódio (NaIO) 0,1M resultando numa concentração final de 50 mM. O material em oxidação permaneceu 72 horas ao abrigo da luz, a temperatura ambiente e sem agitação. O excesso de periodato foi esgotado pela adição de 5 ml de etileno glicol e a solução foi dialisada exaustivamente. O polialdeído resultante foi dissolvido em água e boridreto de sódio (NaBH₄) foi adicionado aos poucos até pH 10,0. Após 12 horas de redução a

solução foi neutralizada com ácido acético, dialisada contra água destilada e liofilizada. O material foi então hidrolisado com TFA pH 2,0 a 100°C durante 30 minutos (GOLDSTEIN *et al.*, 1965). O material resultante da hidrólise foi ressolubilizado em água e foi recuperado por precipitação com acetona a frio (5 v/v).

3.5.4. Derivatização para Análise em GC-MS

3.5.4.1. Redução e Acetilação

A composição monossacarídica dos exopolissacarídeos obtidos de cada cultivo foi determinada por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. O material foi totalmente hidrolisado como descrito anteriormente e em seguida reduzido com boridreto de sódio (NaBH_4) durante 12 horas. A reação para formação dos alditol-acetatos foi feita com anidrido acético a 120°C por 1 hora (WHITON *et al.*, 1985).

3.5.4.2. Metilação

Para a formação dos alditol-acetatos parcialmente O-metilados, 10 mg do material polissacarídico foram primeiramente reduzidos com NaBH_4 por 12 horas e então solubilizados em 10 ml de NaOH 30%. Adições de 500 μL de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ (dimetil sulfato) eram feitas a cada 30 minutos, num total de 4 ml (HAWORTH, 1915). Após 18 horas sob agitação constante e temperatura ambiente a reação foi interrompida pelo aquecimento a 100°C sob refluxo por 30 minutos, eliminando o excesso de sulfato de dimetila, a solução foi neutralizada com ácido acético e dialisada por 48h em água corrente.

Após liofilização, o material parcialmente metilado foi solubilizado em DMSO (dimetil sulfóxido) e NaOH anidro pulverizado foi adicionado em excesso. Adições de 0,1 ml de CH_3I (iodeto de metila) eram feitas a cada 5 minutos, durante 30 minutos, agitando-se o material em vortex (CIUCANU & KEREK, 1985). A solução com o polissacarídeo totalmente metilado foi então neutralizada com gotas de H_2SO_4 2N, dialisada contra água corrente por 48h e liofilizada. O material foi então submetido a metanólise com MeOH:HCl 3%, por 2 horas a 80°C, seguido por neutralização com

AgCO_3 e extração do subrenadante com acetona (GORIN & IACOMINI, 1984). Após liofilização, o material foi submetido ao processo de acetilação como descrito, exceto pelo passo de redução que foi feito com NaBD_4 (boridreto de sódio deuterado).

3.5.5. Métodos Cromatográficos

3.5.5.1. Cromatografia em Papel (CP) e de Camada Delgada (TLC)

Cromatografias descendentes em papel Whatman no.1 foram realizadas para os materiais totalmente hidrolisados para a observação das unidades monossacarídicas presentes nos EPS utilizando padrões conhecidos. Dois solventes foram utilizados conforme as características da amostra: *n*-butanol:piridina: H_2O (1:1:1) ou (5:3:3) (HOUGH & JONES, 1962). A revelação das cromatografias em papel foi feita pela detecção dos açúcares com soluções de AgNO_3 :acetona (1:250 v/v), NaOH (40%): EtOH (1:25 v/v) e tiosulfato de sódio 5% (p/v), de acordo com o método descrito por TREVELYAN *et al.*, (1950).

Para as cromatografias de camada delgada foram utilizadas placas de alumínio revestidas de sílica. Os solventes utilizados foram: acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1) ou propanol:água (7:3) dependendo das características da amostra (HOUGH & JONES, 1962). A detecção dos açúcares na TLC foi feita utilizando-se o revelador orcinol ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) em solução etanólica de H_2SO_4 5%.

3.5.5.2. Cromatografia Líquida

3.5.5.2.1. “Fast Performance Liquid Chromatography” (FPLC)

O material obtido do meio de crescimento de *B. tropicalis* PPe8 foi analisado por cromatografia líquida acoplada a sistema de FPLC (Pharmacia) numa coluna de troca aniônica forte Q-Sepharose (Pharmacia Biotech) com volume total de 30 ml ($170 \times 15 \text{ mm d.i.}$). Foi utilizado um “loop” de 2 ml para a injeção do material numa concentração de 2 mg.ml^{-1} . Dois tampões foram utilizados para criar um gradiente iônico contínuo durante a eluição: Tampão A ($\text{TRIS } 500 \text{ mmol.L}^{-1}$; $\text{EDTA } 1 \text{ mmol.L}^{-1}$)

e Tampão B (TRIS 500 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; NaCl 1 mol.L⁻¹). O fluxo foi mantido constante a 0,3 ml.min⁻¹ e alíquotas foram coletadas em tubos de ensaio a cada 1 minuto. A detecção do material nos tubos foi feita pelo método do PhOH:H₂SO₄ como descrito por DUBOIS *et al.* (1956).

3.5.5.2.2. “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC)

As análises cromatográficas em HPLC foram realizadas em aparelho SHIMADZU acoplado a um detector de índice de refração (RID 10A) mantido a 40°C. A coluna utilizada foi a coluna para ácidos orgânicos (HPX-87H 300 x 7,80 mm – AMINEX[®] ION EXCLUSION-BIO RAD) e a fase móvel utilizada para eluição foi ácido sulfúrico 8 mM.L⁻¹ em H₂O milliQ degaseificada com gás hélio. A coluna foi mantida num forno (CTO 10A) com temperatura constante de 65°C e o fluxo utilizado foi de 0,6 ml.min⁻¹. As amostras eram solubilizadas em H₂O milliQ numa concentração de 1mg.ml⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µl para análises quantitativas e de 100 µl para eluições preparativas onde as amostras desejadas eram recolhidas por um coletor (FRC 10A) acoplado ao equipamento.

3.5.5.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

Após conveniente derivatização do material na forma de alditol-acetatos ou alditol-acetatos parcialmente O-metilados, foram realizadas análises cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (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 meV.

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 (MERCK) 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.

3.5.6. Métodos Espectrométricos e Espectroscópicos

3.5.6.1. Espectroscopia por Infravermelho (FT-IR)

Para verificar a eficiência do processo de carboxirredução dos polissacarídeos ácidos, foram realizadas análises de espectroscopia por infravermelho acopladas a transformada de Fourier (FT-IR). As análises foram realizadas em espectrofotômetro BOMEM HARTMAN (MB-Series) utilizando discos feitos com 100 mg de KBr (Brometo de Potássio) contendo 2% do material a ser analisado.

3.5.6.2. “*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*” (ESI-MS)

ESI-MS foi utilizado para a determinação da massa dos íons pseudomoleculares dos oligossacarídeos obtidos a partir do EPS. Para tal, 300 µg do material foram dissolvidos em MeOH e injetados por infusão direta em um espectrômetro Micromass Quattro LC. As análises foram feitas utilizando apenas um quadrupolo com uma janela de massa de 100 – 800 m/z. Os parâmetros utilizados para a obtenção de íons no modo negativo foram os seguintes: capilar 5,00 kV, cone 200 V e energia do íon 1,9 V.

3.5.6.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Polissacarídeos obtidos foram caracterizados estruturalmente utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais realizados em um 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 ou 10 mm de diâmetro em 150 mm de comprimento utilizando óxido de deutério (D₂O) como solvente. Para as análises monodimensionais foi utilizado padrão de acetona tomando-se como referência o sinal de δ 2,224 para ¹H-RMN e δ 30,2 para ¹³C-RMN.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FISILOGIA

Os testes de fisiologia em *Burkholderia tropicalis* PPe8 foram realizados com o intuito de observar a resposta na produção de exopolissacarídeos em condições variadas de crescimento. Optou-se por remover o extrato de levedura do meio JMV para torná-lo melhor definido durante os testes de fisiologia. Essa alteração afetou muito pouco o crescimento do microorganismo e foi, portanto, mantida durante todo o trabalho. Quando as células de *B. tropicalis* são inoculadas em meio JMV líquido a partir da suspensão em glicerol 50%, observa-se que há a produção de um material exocelular viscoso. A cinética de crescimento deste microorganismo foi acompanhada por 72 horas através da densidade óptica do meio de cultura em comprimento de onda de 600 nm (D.O.₆₀₀). A partir de um pré-inóculo fresco, foram inoculados 450 ml de meio JMV que foram posteriormente divididos em 42 frascos de 60 ml contendo 10 ml de meio cada numa D.O.₆₀₀ inicial de 0,05. Os frascos foram mantidos em agitação constante (120 rpm) e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a cada 2 horas, nas primeiras 12 horas, e em intervalos regulares após a 12ª hora eram coletados 3 frascos que tinham sua D.O.₆₀₀ e pH determinados (FIGURA 07).

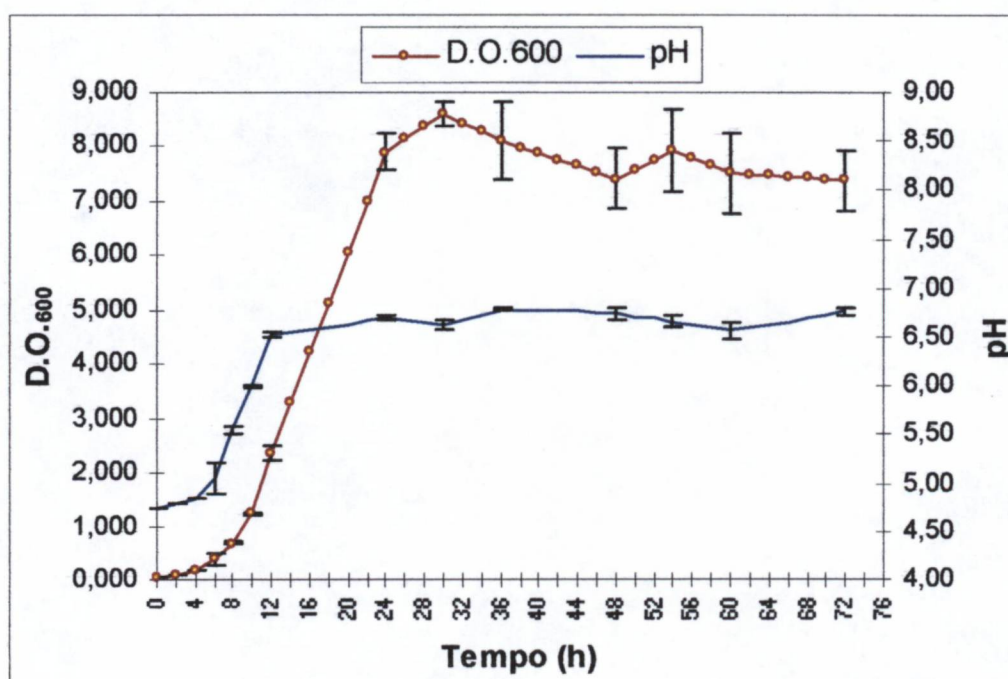


FIGURA 07. Cinética de crescimento de *B. tropicalis* e evolução do pH em meio de cultura JMV por 72 horas. —○— D.O.₆₀₀ — pH

Nas condições de crescimento estabelecidas, *B. tropicalis* PPe8 entra na sua fase logarítmica de crescimento a partir da 10^a hora mantendo-se até a 24^a hora de cultivo aproximadamente. O tempo de duplicação foi estimado em aproximadamente 2 horas. O pH do meio subiu significativamente até a 12^a hora de incubação quando atingiu 6,5 mantendo-se estável até o final do experimento.

Para acompanhar a produção de EPS durante o crescimento de *B. tropicalis*, alíquotas dos 42 frascos foram submetidos a análise de determinação de açúcares totais pelo método do PhOH:H₂SO₄ como descrito (FIGURA 08). Haja vista que a fonte de carbono utilizada no meio foi manitol, certa interferência deste açúcar é esperada nas leituras, contudo, por ser uma unidade monossacarídica reduzida, a interferência torna-se desprezível em relação a quantidade de EPS produzida, principalmente nas horas finais de cultivo quando a maior parte desta fonte de carbono já terá sido consumida pelo microorganismo.

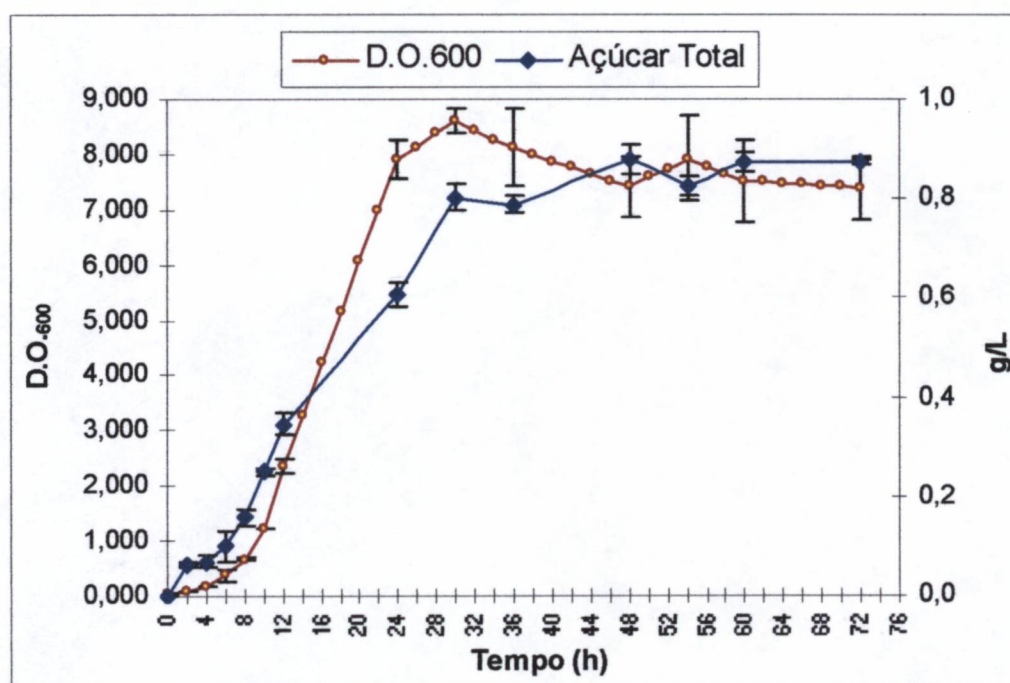


FIGURA 08. Cinética de crescimento de *B. tropicalis* e quantificação de açúcares totais encontrados no meio JMV durante 72 horas. —○— D.O.600 —◆— Açúcar Total

A produção de EPS acompanha o crescimento das células até a 12^a hora de cultivo. Após este período a taxa de produção diminui significativamente até estabilizar-se na 48^a hora mantendo-se constante em cerca de 870 mg/L até o final das 72 horas de incubação.

Testes de aeração foram realizados para observar a variação na produção de EPS de acordo com a quantidade de oxigênio dissolvido no meio. Para tanto, nove frascos tipo erlenmeyer de 500 ml foram utilizados, cada um contendo volumes diferentes de meio JMV (100, 250 ou 400 ml) e concentrações diferentes de manitol (g, 10 e 15 g.L⁻¹) com o intuito de analisar conjuntamente o efeito da relação C:N na produção de EPS (TABELA 03). Todas as outras condições foram mantidas constantes. O rendimento de EPS produzido foi calculado a partir do peso seco do material obtido do meio de cultura dialisado em membrana com limite de exclusão de 14 kD.

TABELA 03. Fisiologia de produção de EPS por *Burkholderia tropicalis* PPe8.

Manitol	Aeração ^a	D.O. ₆₀₀ final	pH final	EPS ^b
5 g/L (“low” C:N)	+	8,72	7,42	910 mg/L
	+	4,02	7,37	612 mg/L
	+	1,48	7,22	363 mg/L
10 g/L	+	8,04	7,44	660 mg/L
	+	3,96	7,33	260 mg/L
	+	1,40	7,07	240 mg/L
15 g/L (“high” C:N)	+	8,00	7,43	980 mg/L
	+	4,16	7,37	384 mg/L
	+	1,40	7,08	253 mg/L

^a Em frascos de 500 ml: (+ + +) 100 ml de JMV, (+ +) 250 ml de JMV, (+) 400 ml de JMV.

^b Determinado pelo método do PhOH:H₂SO₄ (DUBOIS *et al.*, 1956).

O crescimento das células, medido pela D.O.₆₀₀ do meio após 24 horas, mostrou-se praticamente idêntica para as três condições de aeração em todas as relações C:N. O pH final do meio foi muito próximo relacionando as mesmas condições de aeração e para todas as condições de C:N nota-se uma variação bem definida de pH que ficou entre 7 e 7,5 segundo o aumento da aeração. O maior rendimento na produção de EPS, 980 mg/L, foi observado para o meio contendo 15 g/L de manitol e aeração mais intensa utilizada. Contudo, levando-se em conta a quantidade de fonte de carbono utilizada, a condição considerada mais relevante para a produção de EPS foi aquela contendo meio JMV com 5 g/L de manitol e intensa aeração produzindo 910 mg/L de EPS. A condição de “low” C:N (5 g/L) mostrou uma tendência linear na produção de EPS sendo esta diretamente proporcional a aeração utilizada, ou seja, linearmente inversamente proporcional ao volume de meio nos frascos. Os dados obtidos neste experimento estão de acordo

com a quantificação de açúcares totais em relação a D.O.₆₀₀ medida no meio como mostrado anteriormente na figura 08.

Sabendo que a temperatura é um fator importante na fisiologia de microorganismos, foram realizados cultivos de *B. tropicalis* PPe8 em duas temperaturas. Oito frascos tipo erlenmeyer de 2 litros foram utilizados, cada um com 500 ml de meio JMV inoculado com *B. tropicalis* PPe8 numa D.O.₆₀₀ inicial de 0,05. Quatro frascos foram mantidos a 26°C e quatro a 30°C. Após 24 horas dois frascos de cada temperatura foram recolhido e seu material exocelular analisado, o mesmo foi feito para os frascos restantes na 72ª hora (TABELA 04).

TABELA 04. Rendimento do material exocelular produzido por *Burkholderia tropicalis* em diferentes temperaturas e tempos de cultivo.

Temperatura	Tempo de Crescimento	PESO DAS FRAÇÕES (g)		
		Sbn EtOH ^a	Ppt EtOH ^a	
			"Pellet" ^b	EPS solúvel ^b
26°C	24 h	0,091	0,494	0,350
	72 h	0,173	1,471	0,929
30°C	24 h	0,286	0,692	0,502
	72 h	0,231	1,237	0,940

^a Meio de cultura livre de células, dialisado e precipitado com 3 volumes de EtOH (4°C).

^b Centrifugação do precipitado etanólico após ressolubilização em água (30.000 x g, 30 min).

Pode-se observar que a produção de EPS nas primeiras 24 horas de cultivo é maior para as células crescidas a 30°C, porém após 72 horas o rendimento de EPS é praticamente igual para ambas as temperaturas.

Baseado nos resultados do teste de fisiologia realizados levando em consideração a aeração, relação C:N e temperatura de crescimento, a condição de produção de EPS para caracterização química foi definida como sendo o meio JMV contendo 5 g/L de manitol e intensa aeração com um volume de meio utilizado não ultrapassando 1/5 ou 1/4 do volume total do frasco, temperatura de incubação de 30°C ± 1°C em shaker rotatório (120 rpm) por 72 horas.

4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS

O material obtido do cultivo de 72 horas a 30°C (PPe8 3072) foi escolhido para ser quimicamente caracterizado devido a quantidade de material disponível. Os EPS obtidos com outras condições de cultivo também foram analisados, porém menos extensivamente. Primeiramente PPe8 3072 e PPe8 3024 (EPS do cultivo de 24 horas a 30°C), PPe8 2624 (26°C e 24h) e PPe8 2672 (26°C e 72h) foram submetidos a hidrólise total como descrito e submetidos a cromatografia de camada delgada (FIGURA 09). Todos os EPS apresentaram os mesmos produtos de hidrólise e mostraram a presença de unidades de ramnose e glucose bem como um produto que possui o mesmo R_f do padrão de ácido glucurônico, porém é corado diferentemente quando submetido a reação com orcinol como descrito.

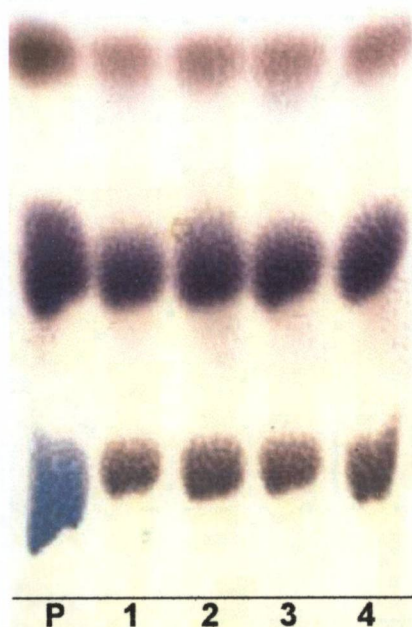
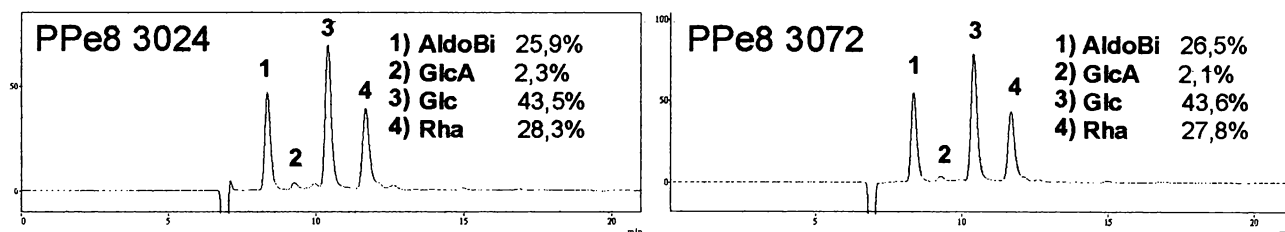


FIGURA 09. Cromatografia de camada delgada dos produtos de hidrólise dos EPS obtidos de *Burkholderia tropicalis* em diferentes condições de cultivo. **P)** padrões (Rha, Glc, GlcA); **1)** PPe8 2624; **2)** PPe8 3024; **3)** PPe8 2672; **4)** PPe8 3072.

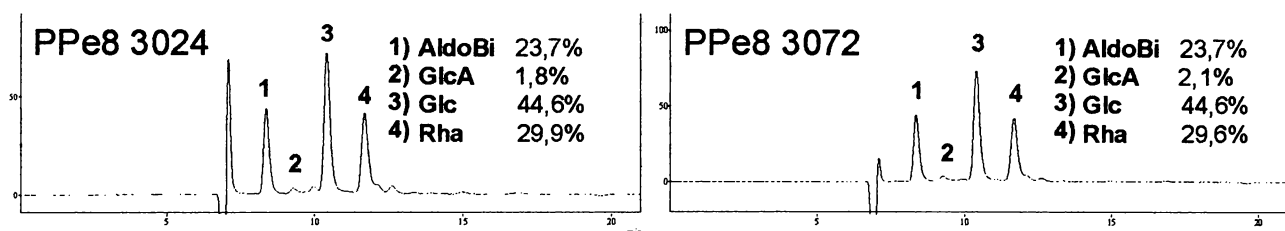
Os EPS PPe8 3024 e PPe8 3072 foram também analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (FIGURA 10). A presença do material com tempo de retenção de 8,34 minutos indicou a presença de um dissacarídeo ácido (aldobiurônico) remanescente da hidrólise do polissacarídeo. Também foi possível caracterizar a presença de pequenas quantidades de GlcA com tempo de retenção

de 9,26 minutos, bem como quantidades significativas de Glc e Rha em 10,39 e 11,67 minutos respectivamente. Na tentativa de hidrolisar o aldobiurônico, ambos os materiais foram submetidos a condições de hidrólise mais drásticas com TFA 4M a 100°C durante 4 horas (FIGURA 10-B) e TFA 4M a 100°C durante 12 horas (FIGURA 10-C).

A) Hidrólise: TFA 1M, 8h, 100°C



B) Hidrólise: TFA 4M, 4h, 100°C



C) Hidrólise: TFA 4M, 12h, 100°C

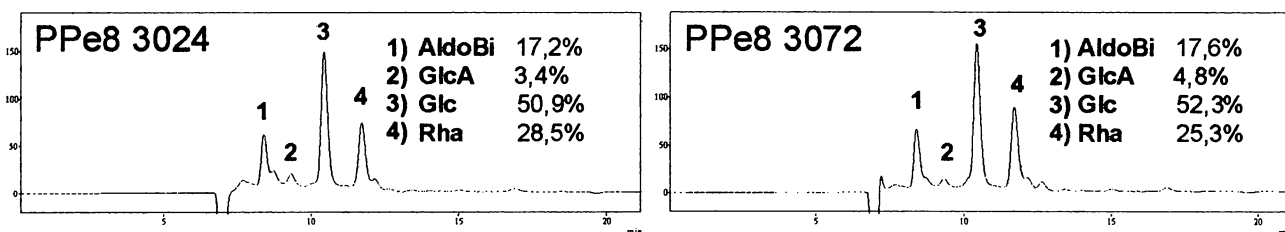


FIGURA 10. Perfil de eluição em HPLC de PPe8 3024 e PPe8 3072 após diferentes condições de hidrólise. 1) Aldobiurônico (8,34 min), 2) Ácido glucurônico (9,26 min), 3) Glucose (10,39 min), 4) Ramnose (11,67 min).

Em condições mais drásticas de hidrólise, houve um discreto aumento na concentração de ácido glucurônico livre liberado do polissacarídeo. A utilização desta condição de hidrólise levou a diminuição significativa da concentração de aldobiurônico, deste modo, atribuiu-se a unidade de GlcA como sendo um dos componentes deste dissacarídeo. A razão molar das unidades de ramnose manteve-se constante em todas as condições utilizadas, por outro lado, um grande aumento na quantidade de glucose é observado nas condições mais severas de hidrólise.

Nas condições consideradas normais para hidrólise ácida (TFA 1M, 8h, 100°C), a razão molar para Glc, Rha, aldobiurônico e GlcA foi de 24:13:12:1 respectivamente, contudo, se for considerado que a pequena porcentagem de unidades livres de GlcA for resultante da hidrólise do aldobiurônico, a razão entre os produtos de hidrólise será de aproximadamente 26:13:13 para Glc, Rha e AldoBi respectivamente. Portanto, para cada unidade de ramnose presente, haverá também um dissacarídeo ácido e duas unidades de glucose.

A análise do EPS PPe8 3072 por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^{13}C -RMN) (FIGURA 11) mostra uma região anomérica contendo quatro sinais bem definidos. Também foi possível observar o sinal característico em δ 81,18 provavelmente de uma ligação do tipo 1 $\rightarrow$ 3. Os sinais obtidos em δ 77,1 e δ 79,5 são possivelmente correspondentes a C-4 substituídos. Os sinais em δ 60,98 e δ 60,77 foram atribuídos a C-6 livres das unidades de Glc presentes no polissacarídeo. Uma análise de DEPT (espectro não mostrado) mostrou que não há ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 6 uma vez que nenhum sinal de C-6 ($-\text{CH}_2$) foi encontrado deslocado para campo mais baixo. Em campo mais alto são observados sinais em δ 16,75, referente ao C-6 das unidades de ramnose, e δ 20,31, característico do grupamento metil ($-\text{CH}_3$) de substituições de acetil presentes na molécula. Outro sinal característico de acetil substituinte é observado em δ 175,48, desta vez referente ao grupamento carboxílico ligado por ligação do tipo éster. O sinal de C-6 carboxílico ($-\text{COO}^-$) das unidades de GlcA foi detectado em δ 173,48.

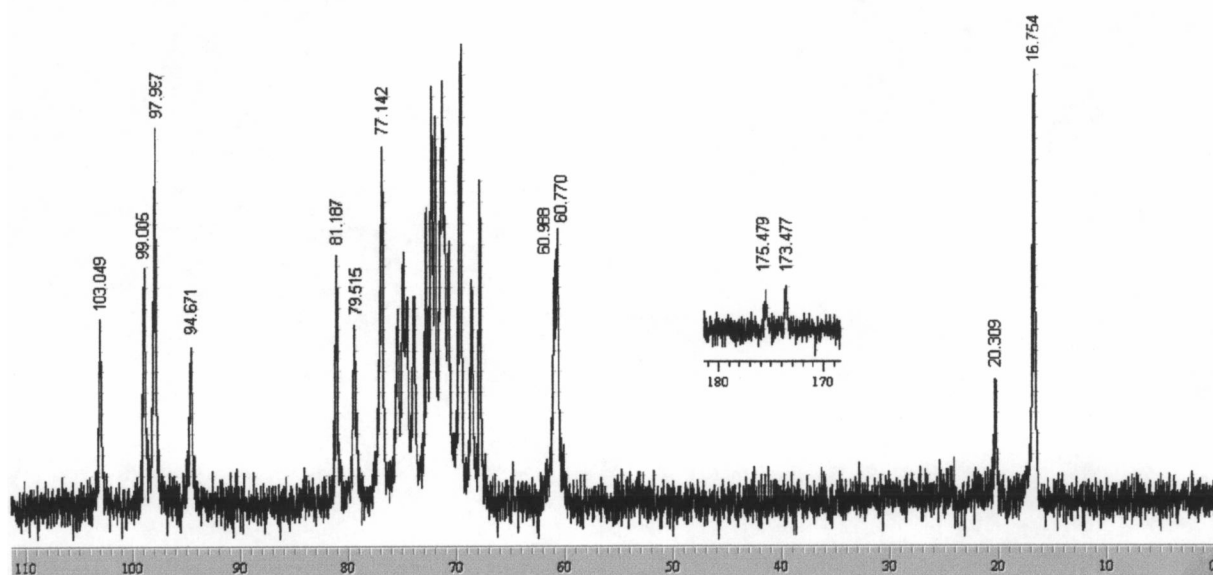


FIGURA 11. Espectro de ^{13}C -RMN de PPe8 3072 em D_2O . A região de campo mais baixo é mostrada em detalhe. Os valores são mostrados em δ (ppm).

Sabendo que o EPS tratava-se de uma molécula ácida, PPe8 3072 foi eluído em uma coluna de troca aniônica forte Q-Sepharose (Pharmacia Biotech) com gradiente iônico contínuo (NaCl 0 a 1M). A detecção de açúcares totais pelo método do PhOH:H₂SO₄ mostrou a presença de uma única fração eluída com 520 mM de NaCl (FIGURA 12).

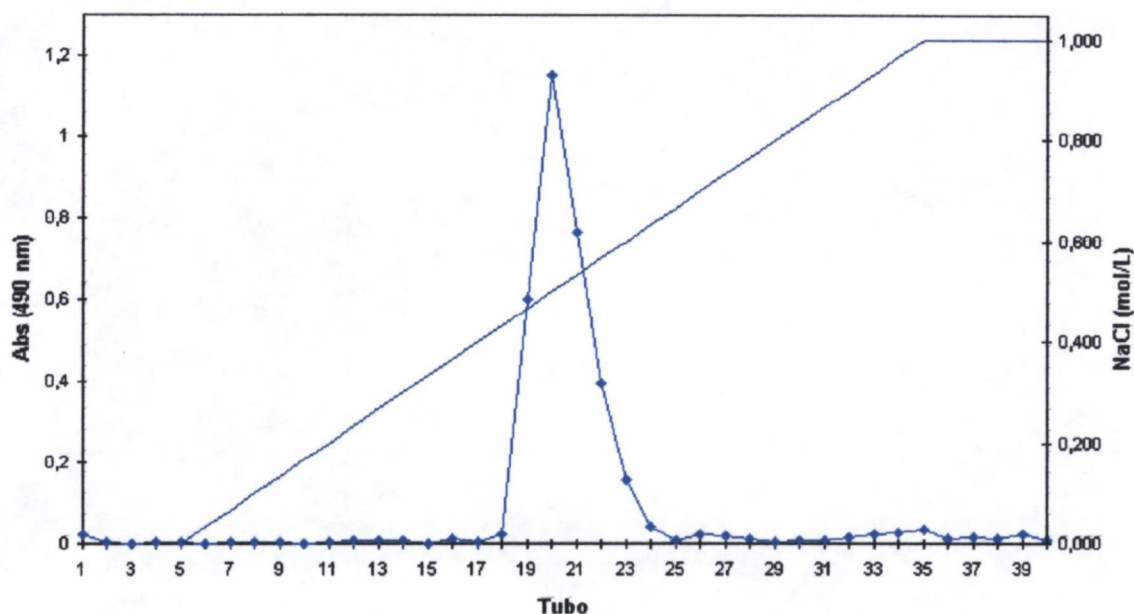


FIGURA 12. Perfil de eluição de PPe8 3072 em coluna de troca aniônica acoplada a sistema de FPLC e detecção de açúcares totais.

PPe8 3072 foi submetido a tratamento com carbodiimida com posterior adição de NaBH₄ como descrito para carboxiredução das unidades de GlcA presentes no EPS. O material reduzido (PPe8-CR) foi analisado por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) que confirmou a eficácia do processo de carboxiredução uma vez que a banda com comprimento de onda de 1740 cm⁻¹, correspondente ao grupamento carboxílico da molécula de GlcA, não é mais detectada, tendo sido portanto este grupamento reduzido a sua forma hidroxílica (ANEXO 02).

O material obtido após a carboxiredução foi submetido a hidrólise ácida total e analisado por HPLC. O perfil de eluição de PPe8-CR mostrou a presença de 62,6% de glucose (10,39 min) e 37,4% de ramnose (11,67 min), sendo portanto a razão molar entre estas duas unidades de 3:2 respectivamente (FIGURA 13).

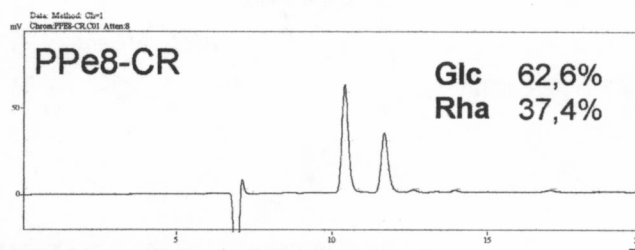


FIGURA 13. Perfil de eluição de PPe8-CR em HPLC.

Uma vez que apenas Glc e Rha foram encontrados no hidrolisado, foi possível dizer que o aldobiurônico encontrado em PPe8 3072 apresenta GlcA como sua unidade ácida. A unidade redutora deste oligossacarídeo é portanto uma unidade de glucose ou ramnose. Para esclarecer a estrutura deste dissacarídeo, 50 mg de PPe8 3072 foram hidrolisados e submetidos a eluição preparativa em sistema de HPLC acoplado a um coletor de frações. O pico correspondente ao aldobiurônico (8,34 min) foi coletado após várias injeções consecutivas. O material isolado rendeu 2,5 mg e foi denominado Oligo-A (FIGURA 14).

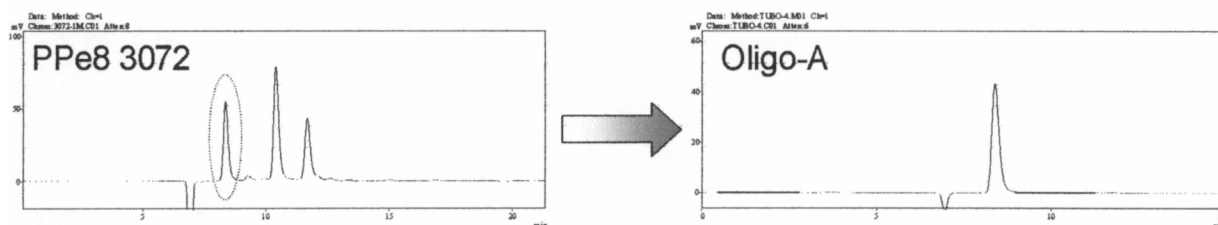


FIGURA 14. Isolamento do aldobiurônico (Oligo-A) por eluição preparativa em HPLC.

Após liofilização, os 2,5 mg isolados de Oligo-A foram dissolvidos em D₂O e submetidos a análise bidimensional de ressonância magnética nuclear. O espectro de correlação ¹H - ¹³C (HMQC) (ANEXO 03) revelou um sinal característico de C-6 de unidades de ramnose (δ 1,350 – 17,060). Os sinais correlacionados de ¹H em δ 3,94 e de ¹³C em δ 76,61 foram atribuídos a uma ligação tipo 1 $\rightarrow$ 4. Com base nos sinais obtidos na região de carbono anomérico foi possível definir a estrutura deste dissacarídeo como sendo α -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)-L-Rha. Os sinais em 5,13 / 96,6 ppm correspondem a configuração α de C-1 da unidade de GlcA. Os sinais em δ 5,18 / 94,7 e δ 4,90 / 94,2 são provenientes da unidade redutora da ramnose na sua forma α e β respectivamente. Para este dissacarídeo também foram realizadas análises de

RMN bidimensional de correlação ^1H - ^1H . Com os espectros de COSY e TOCSY (ANEXO 04 e 05) foi possível definir cada sinal de próton encontrado nas unidades de GlcA e Rha do Oligo-A, bem como os sinais ^{13}C do espectro de HMQC (TABELA 05).

TABELA 05. Assinalamentos de ^1H - e ^{13}C -RMN para Oligo-A obtidos a partir dos espectros de HMQC, COSY e TOCSY.

Unidade	C ou H	^1H	^{13}C
α -D-GlcAp	1	5,13	96,6
	2	3,68	72,1
	3	4,25	72,9
	4	3,96	69,5
	5	3,58	73,0
	6	-	-
L-Rhap	1	5,18 / 4,90 ^a	94,7 / 94,2 ^a
	2	4,19	68,8
	3	3,88	73,8
	4	3,94	76,6
	5	3,48	73,0
	6	1,35	17,2

^a Configuração α / β da unidade redutora de L-Rhap.

A estrutura do Oligo-A foi ainda comprovada através de ionização por “*electrospray*” acoplado a espectrometria de massa (ESI-MS) em modo negativo. A massa nominal (M) deste dissacarídeo é 340 *m/z*, na sua forma de sal sódico (MNa) sua massa passa a ser 362 *m/z*. O padrão de fragmentação do Oligo-A está mostrado (FIGURA 15). Foi possível observar os fragmentos 339 *m/z*, correspondente ao íon molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$, e 193 *m/z* correspondente a unidade de ácido glucurônico na sua forma ionizada $[\text{X} - \text{H}]^-$. Também é possível observar um sinal de menor intensidade em 361 *m/z* proveniente do fragmento $[\text{MNa} - \text{H}]^-$. Não foi possível localizar o sinal correspondente a unidade de ramnose $[\text{Y} - \text{H}]^-$ que deveria aparecer em 146 *m/z*. Os sinais em 155 *m/z* e 249 *m/z* são provenientes de fragmentações mais complexas, envolvendo a quebra do anel da unidade de ramnose, possivelmente devido a alta voltagem aplicada durante a análise.

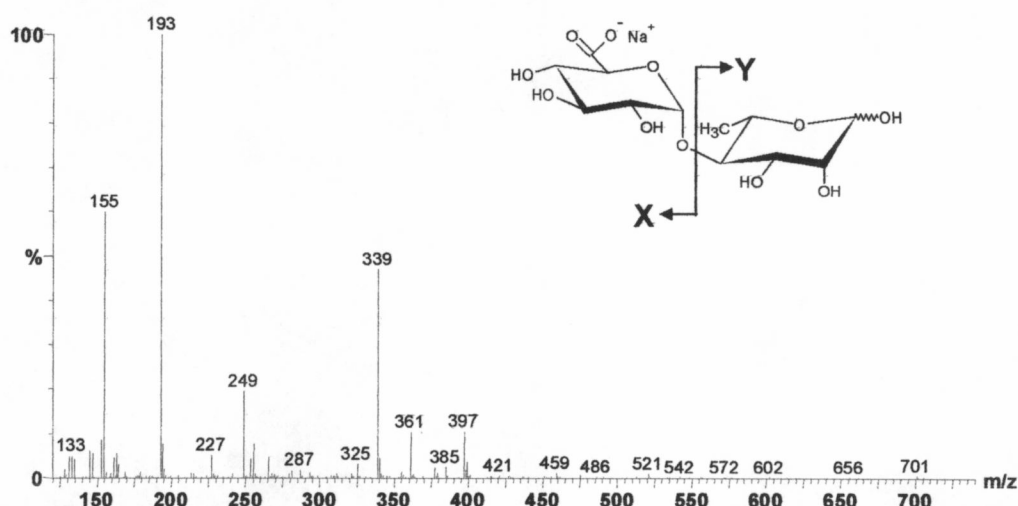


FIGURA 15. Perfil de fragmentação de Oligo-A por ESI-MS modo negativo; 361 m/z : $[MNa - H]^-$, 339 m/z : $[M - H]^-$, 193 m/z : $[X - H]^-$, 146 m/z : $[Y - H]^-$ (não observado).

O exopolissacarídeo carboxirreduzido (PPe8-CR) foi analisado por ^{13}C -RMN (FIGURA 16) para ser comparado com o espectro obtido do EPS nativo. É possível observar que os sinais em campo mais baixo referentes a carboxila do ácido urônico (173,48 ppm) e a carbonila das substituições por acetil (175,48 ppm) não aparecem mais devido ao processo de carboxirredução que além de reduzir o C-6 das unidades de GlcA, também remove os grupamentos acetil substituintes devido a alcalinidade do meio de reação. Desta forma o sinal do grupo metil do acetil substituinte em δ 20,31 não é observado. O sinal de C-6 do GlcA reduzido a sua unidade correspondente aparece agora em região de campo mais alto como C-6 livre de uma unidade de glucose.

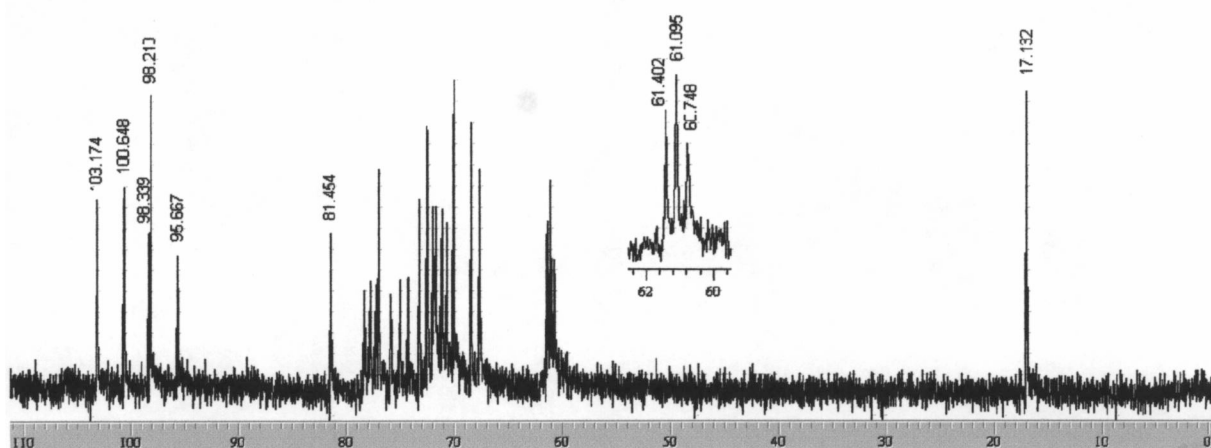


FIGURA 16. Espectro de ^{13}C -RMN de PPe8-CR em D_2O . A região de C-6 não substituído é mostrada em detalhe. Os valores são mostrados em δ (ppm).

PPe8 3072 e PPe8-CR foram submetidos ao processo de metilação como descrito e a análise dos derivados alditol acetato parcialmente metilados mostrou que o derivado 1,5-OAc₂-2,3,4,6-OMe₄-Glc_p, correspondente a uma unidade terminal não redutora de glucose, aparece somente no material carboxireduzido (21,97%). Isto mostra que a unidade de ácido glucurônico faz parte de uma ramificação da cadeia principal e é o terminal não redutor desta ramificação. (TABELA 06). Ambos os alditol acetatos parcialmente O-metilados derivados da ramnose e o derivado de glucose terminal apresentaram aproximadamente 20% de ocorrência. Os derivados de glucose substituídos em C-4 correspondem a cerca de 40% dos produtos obtidos. Baseado em dados da literatura e suportado pelas análises de RMN que mostram uma região anomérica com 5 sinais, supõe-se que haja na estrutura unidades de glucose substituída em C-4 nas suas duas conformações anoméricas, α e β , e que portanto ambas estariam igualmente representadas nos 40% dos derivados metilados obtidos. Desta forma, as unidades de 3-Rhap, 2,4-Rhap, *t*-Glc_p, α -4-Glc_p e β -4-Glc_p estariam presentes na estrutura, possivelmente como uma unidade pentassacarídica repetitiva, numa razão molar de 1:1:1:1:1 respectivamente,.

TABELA 06. Análise de derivados alditol acetato parcialmente metilados do EPS nativo e carboxireduzido produzido por *Burkholderia tropicalis* PPe8.

Derivado ^a	Rt ^b	Ligação	PPe8 3072 (%)	
			nativo	CR ^c
1,3,5-OAc ₃ -2,4-OMe ₂ -Rhap	9,95	→3)-Rhap-(1→	23,92	17,08
1,5-OAc ₄ -2,3,4,6-OMe ₄ -Glc _p	10,15	<i>t</i> -Glc	-	21,97
1,2,4,5-OAc ₄ -3-OMe-Rhap	12,55	→2,4)-Rhap-(1→	26,67	18,92
1,4,5-OAc ₃ -2,3,6-OMe ₃ -Glc _p	14,41	→4)-Glc _p -(1→	49,41	42,03

^a Alditol acetatos parcialmente metilados obtidos após metilação sucessiva segundo Haworth (1915) e Ciucanu & Kerek (1984), metanólise (MeOH:HCl 3%, 2h, 80°C), hidrólise (H₂SO₄ 1M, 8h, 100°C), redução com NaBH₄ e acetilação (OAc₂, 1h, 120°C).

^b Tempo de retenção em minutos em coluna capilar DB-225 (50°C a 220°C, 40°C min⁻¹).

^c Carboxila dos ácidos urônicos presentes no EPS reduzida com carbodiimida segundo Taylor & Conrad (1972).

O processo de oxidação do polissacarídeo PPe8 3072 mostrou que, após hidrólise total do material e derivatização para análise em GC-MS, eritritol foi um dos produtos formados (45%) bem como unidades intactas de ramnose (55%). Tal resultado comprova a presença de unidades de ramnose substituídas em C-3, que não são oxidadas pelo NaIO₄, bem como as unidades de ramnose substituídas em

C-2 e C-4. A degradação de Smith também comprova a presença de unidades de glucose substituídas em C-4 formando eritritol após sua oxidação e redução.

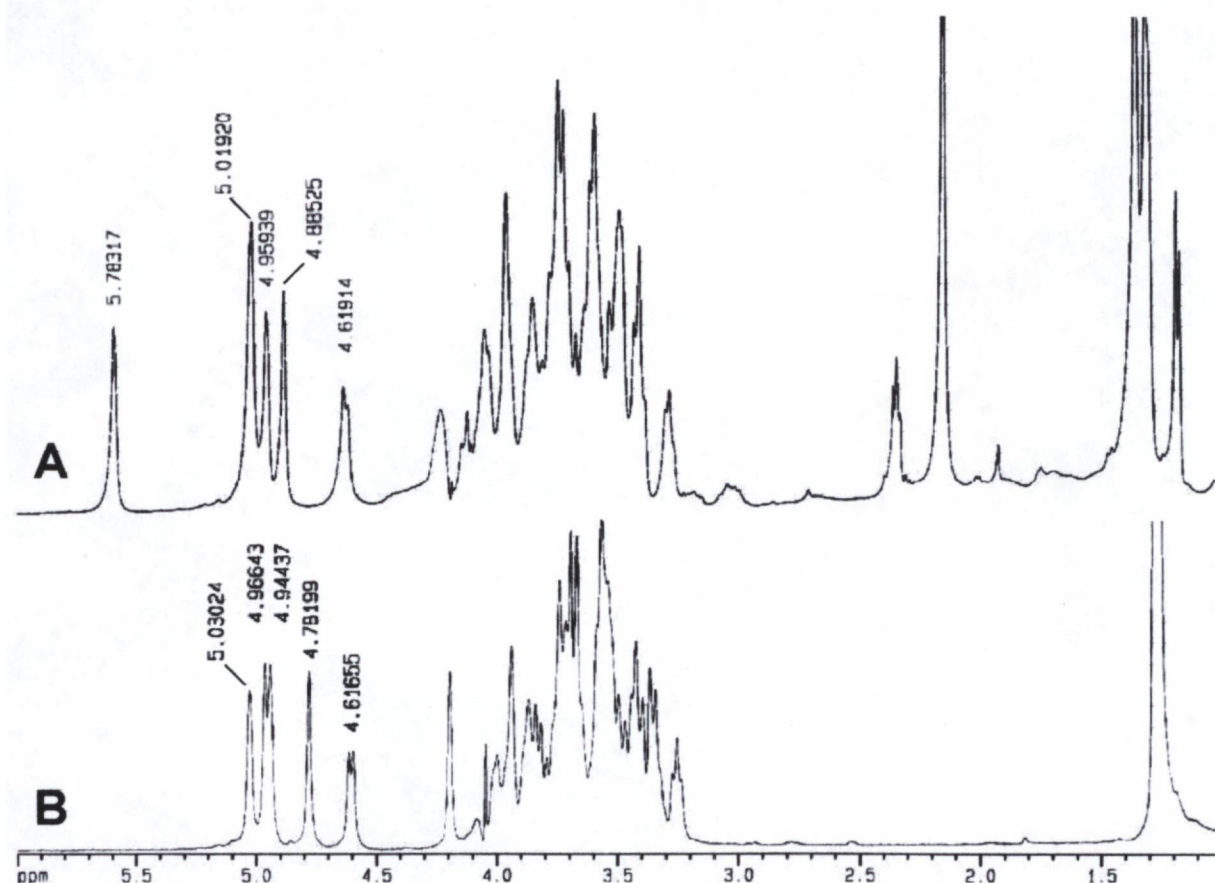


FIGURA 17. ¹H-RMN de PPe8 3072 (A) e PPe8-CR (B). Os valores são mostrados em δ (ppm).

Análises de ¹H-RMN foram realizadas para PPe8 3072 e PPe8-CR com a finalidade de definir a conformação anomérica das unidades do polissacarídeo (FIGURA 17). A região anomérica obtida para o espectro de PPe8 3072 mostrou apenas quatro sinais, contudo, quando comparada com a mesma região para o material carboxireduzido, pôde-se observar o aparecimento de outro sinal. Desta forma concluiu-se que no primeiro espectro haviam sinais sobrepostos em δ 5,02 referentes ao H-1 das unidades de α -D-GlcAp e β -L-Rhap. Os outros sinais anoméricos obtidos para PPe8 3072 foram atribuídos as unidades de α -D-Glcp (δ 4,95), α -L-Rhap (δ 4,88) e β -D-Glcp (δ 4,62).

Também é possível observar o sinal referente ao próton metílico da substituição do grupo acetil em δ 2,14, que não aparece em PPe8-CR, bem como os sinais de H-6 das unidades de ramnose em δ 1,30 e δ 1,34.

A integração dos sinais referentes aos prótons anoméricos para PPe8 3072 mostrou uma relação de 2:1:1:1 respectivamente, contudo, como o sinal em 5,02 é formado por uma sobreposição de duas unidades, todas as unidades apresentam-se nas mesmas proporções. Esta proporcionalidade pode ser observada no espectro de PPe8-CR onde a integração dos sinais mostra uma proporção de 1:1:1:1:1. A constante de acoplamento (J) obtida para a unidade de β -D-Glcp foi de 7,05 Hz. (FIGURA 18).

O deslocamento observado para ambas as unidades de ramnose após a carboxiredução pode ser resultado da retirada do grupamento acetil devido a alcalinidade do meio de reação. A unidade de 3- β -L-Rhap, que aparecia em δ 5,02 no material original, é observada em δ 4,96 após a carboxiredução, enquanto que a unidade de 2,4- α -L-Rhap teve um deslocamento mais acentuado passando de δ 4,88 para δ 4,78.

Através de análises de RMN bidimensionais foi possível assinalar alguns sinais referentes a ambas as moléculas: PPe8 3072 e PPe8-CR (TABELA 07). Os espectros de correlação ^1H - ^{13}C (HMQC) mostram claramente os sinais anoméricos para ambas as moléculas (ANEXO 06 e 09). Com o espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) de PPe8 3072 (ANEXO 06) foi possível determinar a posição do grupamento acetil presente. O sinal em campo mais baixo com deslocamento de 5,78 ppm observado no espectro unidimensional (FIGURA 17-A) é referente ao H-2 da unidade de 3- β -L-Rhap. Desta forma o grupo acetil encontra-se ligado em C-2 desta unidade. O espectro de TOCSY obtido para PPe8 3072 é mostrado em anexo (ANEXO 07), bem como os espectros de correlação ^1H - ^1H para PPe8-CR, respectivamente COSY (ANEXO 08) e TOCSY (ANEXO 09).

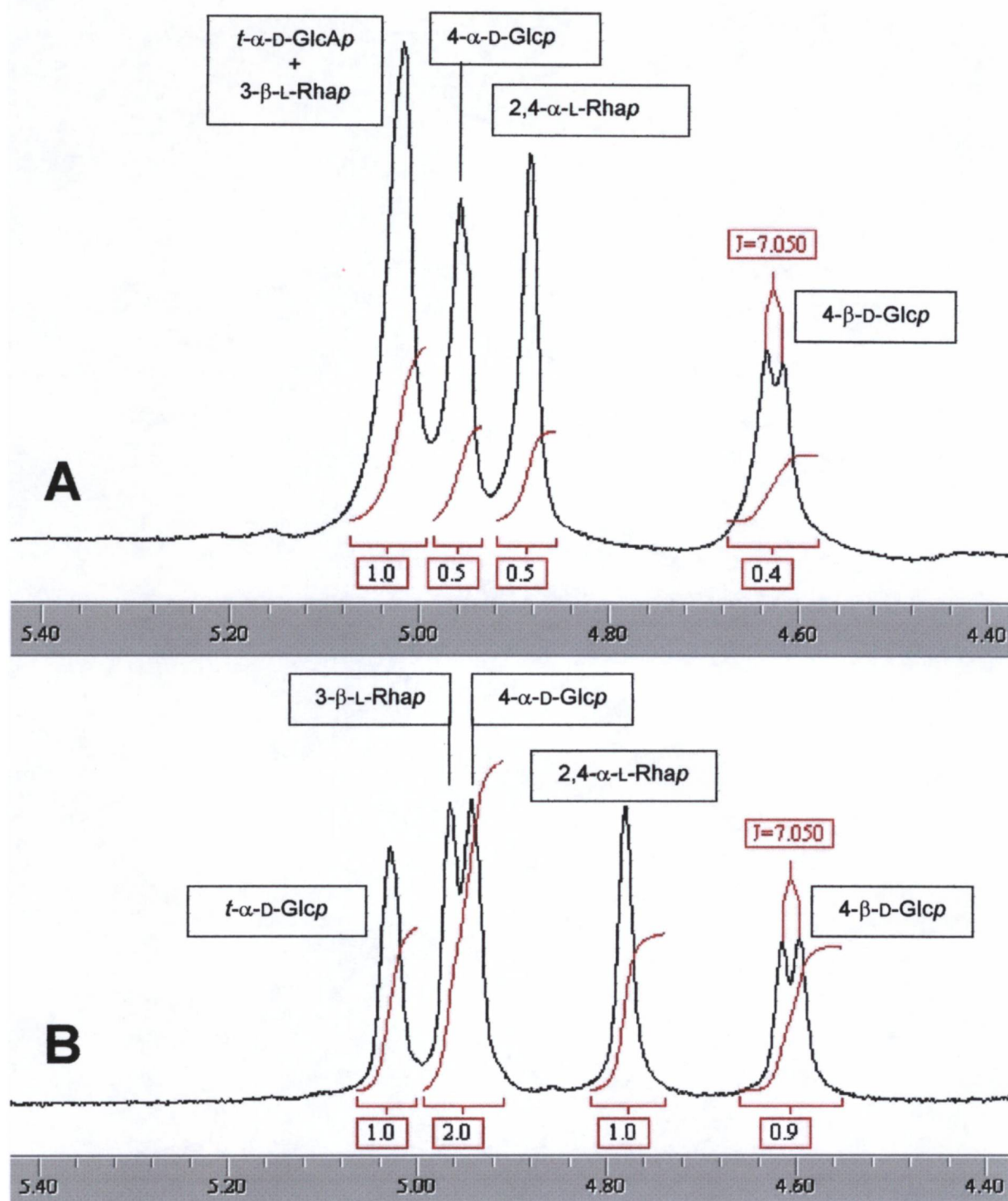


FIGURA 18. ^1H -RMN da região anomérica de PPe8 3072 (A) e PPe8-CR (B). A área relativa é mostrada abaixo dos sinais. J – Constante de acoplamento em Hz

TABELA 07. Assinalamentos* de ^1H e ^{13}C para PPe8 3072 e PPe8-CR.

Unidade	PPe8 3072												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C=O ^a
→2,4)-α-L-Rhap-(1→	4.88	3.94	3.39	3.67	4.06	1.27	98.0	72.0	74.5	71.1	72.3	16.8	-
→3)-(2-OAc)-β-L-Rhap-(1→	5.02	5.59	3.84	3.46	3.47	1.32	99.0	68.1	81.0	nd	70.8	16.7	173.6
→4)-β-D-Glcp-(1→	4.62	3.26	3.57	3.41	nd	3.71	103.1	73.8	75.5	nd	nd	61.0	-
→4)-α-D-Glcp-(1→	4.96	3.51	nd	3.62	nd	3.76	98.0	72.1	nd	79.3	nd	60.8	-
α-D-GlcAp-(1→	5.02	3.55	3.26	nd	nd	-	94.7	75.6	nd	nd	nd	175.5	-
	PPe8-CR												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C=O ^a
→2,4)-α-L-Rhap-(1→	4.73	4.21	3.59	3.43	3.35	1.26	100.7	67.0	75.5	71.3	70.2	16.6	-
→3)-β-L-Rhap-(1→	4.94	3.50	3.64	nd	4.00	1.30	98.3	79.9	80.9	nd	69.6	16.6	-
→4)-β-D-Glcp-(1→	4.61	3.28	nd	nd	nd	3.72	103.2	73.9	nd	nd	nd	61.3	-
→4)-α-D-Glcp-(1→	4.97	3.96	3.55	3.25	nd	3.67	98.2	67.9	67.1	77.1	nd	59.8	-
α-D-Glcp-(1→	5.03	3.54	nd	nd	nd	3.74	95.7	77.4	nd	nd	nd	59.3	-

^a Carbonila do grupamento acetil substituinte. Não presente em PPe8-CR. Os assinalamentos de ^1H e ^{13}C para o grupo metílico (-CH₃) do acetil substituinte foram 2,15 e 20,34 ppm respectivamente.

* Os valores são fornecidos em δ (ppm).

nd – Não definido

Após o processo de degradação por NaIO_4 , PPe8-CR foi submetido a redução com boridreto de sódio e hidrólise parcial com TFA pH 2,0. Uma análise de ^{13}C -RMN deste material (PPe8-CRox) foi realizada com a intenção de observar quais sinais permaneceriam em relação ao espectro do polissacarídeo intacto (FIGURA 19). O sinal em δ 81,4 referente ao C-3 da unidade de β -L-Rhap não aparece mais no material oxidado indicando, portanto, que a outra unidade de ramnose, $\rightarrow 2,4\text{-}\alpha$ -L-Rhap, não é substituinte desta, caso contrário o sinal permaneceria no espectro pois a condição de hidrólise utilizada não seria suficiente para quebrar a ligação glicosídica entre os dois anéis não oxidados. Os sinais de C-6 de ambas as unidades de ramnose podem ser observados em δ 16,9 e 17,2. Devido a formação de eritritol e glicerol durante o processo de degradação, vários sinais são encontrados na região de $-\text{CH}_2\text{OH}$.

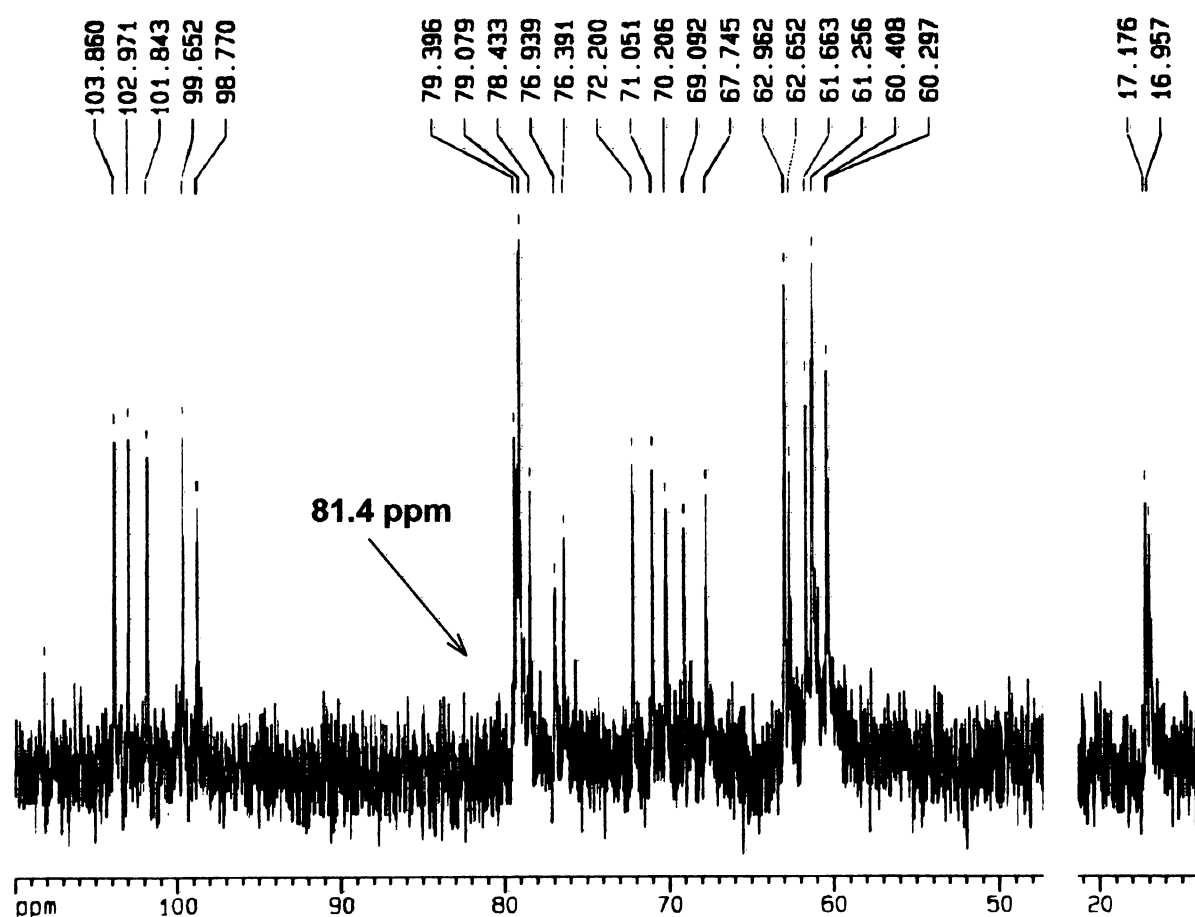


FIGURA 19. Espectro de ^{13}C -RMN de PPe8-CRox em D_2O . Os valores são mostrados em δ (ppm).

Através da análise dos resultados obtidos para o exopolissacarídeo ácido produzido por *Burkholderia tropicalis* PPe8, utilizando dados de metilação e análises de RMN 1D e 2D, foi possível definir parcialmente a estrutura deste polímero. Para uma elucidação estrutural completa da molécula faz-se necessário a obtenção de oligossacarídeos provenientes de hidrólise ácida parcial do EPS. Uma vez que a estrutura parece ser formada por um pentassacarídeo repetitivo, o isolamento de um tetrassacarídeo seria suficiente para o total esclarecimento da estrutura.

Um refinamento nas condições de cultivo pode ser útil no entendimento da fisiologia de produção deste EPS. Uma vez que este polímero apresenta características interessantes em meio líquido, deixando o meio de cultura viscoso, um aumento no rendimento de produção através de alterações do meio de crescimento parece ser um objeto válido de investigação.

O papel de exopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas ainda não é esclarecido, desta forma, sabendo que a aeração é um dos fatores importantes para a produção de EPS, a relação deste com o complexo da nitrogenase, que é irreversivelmente inibido pelo oxigênio, também pode ser explorada.

CONCLUSÕES

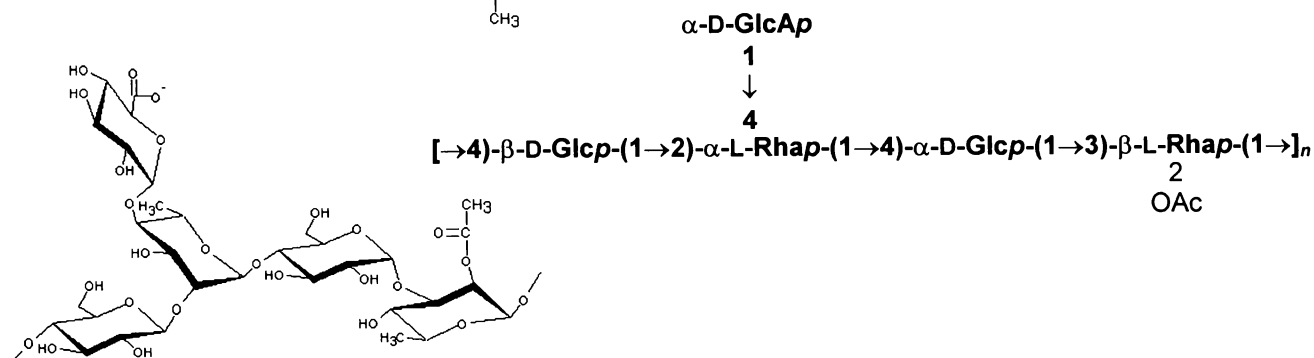
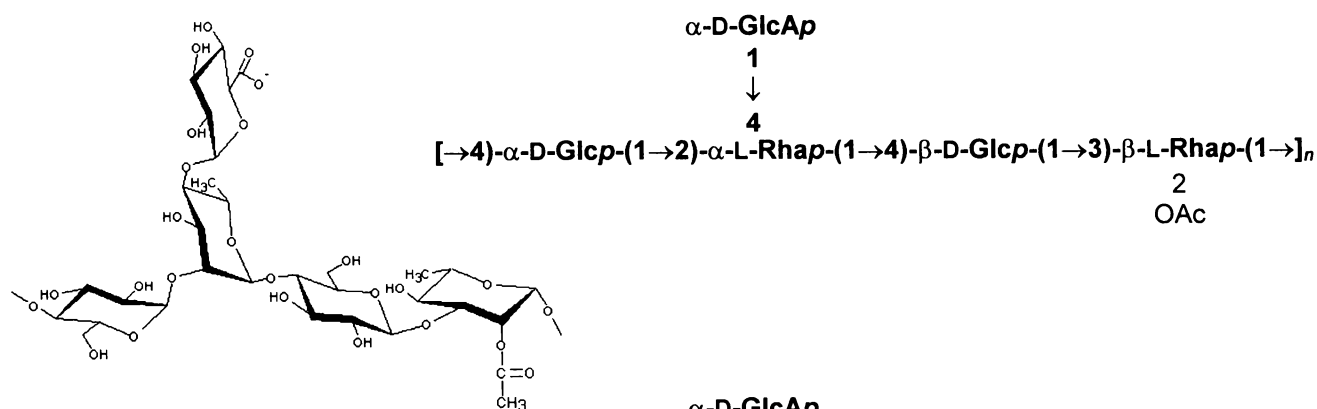
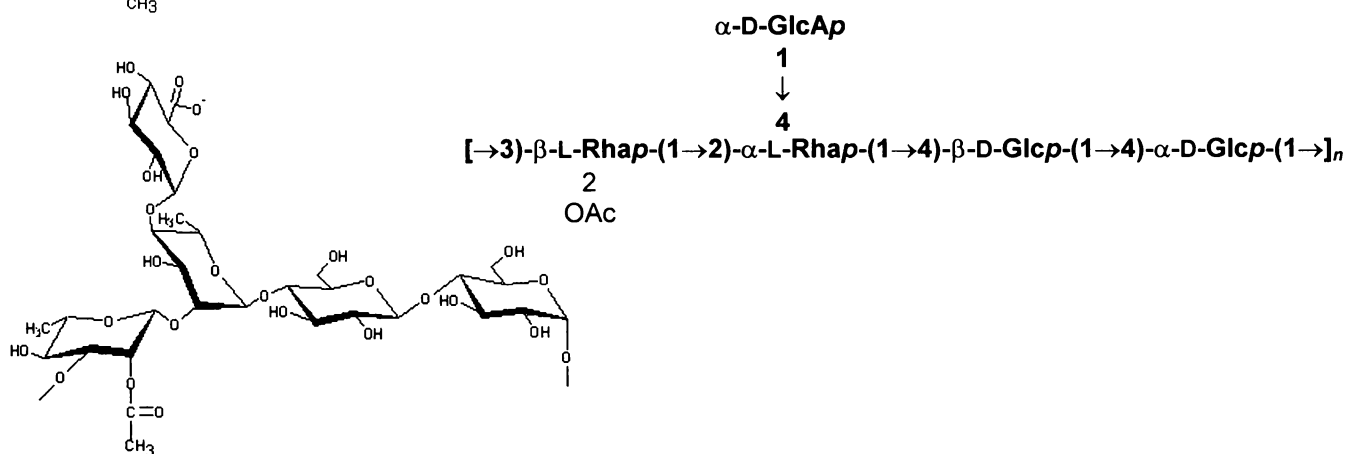
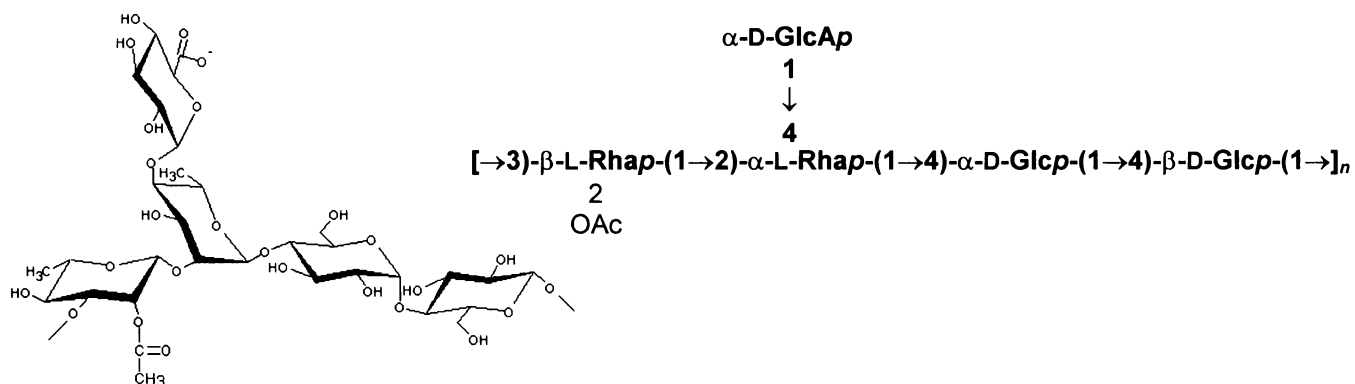
5. CONCLUSÕES

A análise de todos os resultados obtidos para a bactéria diazotrófica endofítica *Burkholderia tropicalis*, estirpe PPe8, em relação a fisiologia de produção de exopolissacarídeo e estrutura química deste, permite que sejam consideradas as seguintes conclusões:

- *Burkholderia tropicalis* PPe8 sintetiza um polissacarídeo que é excretado pelas células quando inoculadas em meio JMV líquido nas condições estabelecidas, contendo manitol e glutamato como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente, deixando o meio levemente viscoso a partir da 24^a hora de cultivo.
- A taxa produção do exopolissacarídeo (EPS) e a variação do pH do meio de cultura acompanham o crescimento das células nas primeiras 12 horas de cultivo. Após este período o pH do meio líquido estabiliza-se em torno de 6,5 enquanto que a produção de EPS avança mantendo-se constante a partir da 48^a hora de incubação.
- Das condições testadas para a produção de EPS, obteve-se o melhor rendimento em relação a quantidade de fonte de carbono crescendo-se a bactéria por 24 horas em meio JMV líquido contendo 5,0 g.L⁻¹ de manitol (27,5 mM) e 1,87 g.L⁻¹ de L-glutamato (10 mM), sob forte aeração – volume de meio igual a 1/5 do volume total do frasco – obtendo-se assim um rendimento de 910 mg de EPS por litro de meio de cultura.
- A temperatura de crescimento parece influenciar na produção de EPS nas primeiras 24 horas de cultivo, contudo, para ambas as temperaturas testadas – 26°C e 30° – a quantidade de EPS produzido foi semelhante após 72 horas de crescimento.

- Todos os exopolissacarídeos produzidos por *Burkholderia tropicalis* PPe8 em diferentes condições de cultivo mostraram ser moléculas ácidas, contendo na sua composição monossacarídica unidades de ramnose, glucose e ácido glucurônico.
- O EPS PPe8-3072 produzido nas condições padrão de cultivo (JVM, 30°C, 72h), foi caracterizado como sendo um polissacarídeo ácido ramificado, sendo formado por unidades de Glc, Rha e GlcA numa razão molar de 2:2:1 respectivamente. Seu correspondente carboxireduzido (PPe8-CR) apresentou apenas Glc e Rha na razão molar de 3:2 respectivamente.
- O aldobiurônico isolado a partir da hidrólise do EPS PPe8 3072 mostrou possuir a seguinte estrutura: α -D-GlcAp-(1→4)-L-Rhap. A unidade de GlcA mostrou ser a unidade não-redutora do EPS, ramificando a cadeia principal em C-4 da unidade de 2,4- α -L-Rhap.
- PPe8-3072 mostrou estar esterificado por um grupamento acetil ligado a C-2 da unidade de 3- β -L-Rhap, como demonstrado pelo sinal em δ referente ao H-2 da unidade de 3- β -(2-OAc)-L-Rhap.
- A composição monossacarídica do EPS produzido por *Burkholderia tropicalis* PPe8 bem como a anomericidade e das unidades e a substituição por grupamento acetil é compatível com outros exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Burkholderia* como descrito na literatura (MATTOS et al., 2001), contudo, a estrutura ramificada contendo GlcA como unidade não-redutora ainda não está descrita, tratando-se portanto de uma molécula ainda inédita produzida por um microorganismo diazotrófico.

- A combinação dos resultados de metilação e análises de ^1H - e ^{13}C -RMN do EPS nativo (PPe8-3072) e do seu correspondente carboxireduzido (PPe8-CR) forneceu dados suficientes para limitar a estrutura possível do exopolissacarídeo a um pentassacarídeo repetitivo apresentando uma das 4 estruturas seguintes:



Para preparar 1,0 litros de meio de cultura JMV:

	Peso/Volume	Conc. Final
Manitol	5,0 g	5,0 g.L ⁻¹
K₂PO₄	0,6 g	0,6 g.L ⁻¹
KH₂PO₄	1,8 g	1,8 g.L ⁻¹
MgSO₄ · 7H₂O	0,2 g	0,2 g.L ⁻¹
NaCl	0,1 g	0,1 g.L ⁻¹
CaCl₂ · 2H₂O	0,2 g	0,2 g.L ⁻¹
Solução de Microelementos	2,0 ml	
Fe EDTA 1,64%	4,0 ml	
Solução de Biotina 100 µg/ml	1,0 ml	0.1 mg.L ⁻¹
Extrato de Levedura	100 mg	100 mg.L ⁻¹

O pH final deve ficar em torno de 6,5. Autoclavar por 20 minutos.

Fonte de Nitrogênio – Glutamato de Sódio 10 mmol/L

Pode-se adicionar 2,0 ml de indicador de pH (Azul de Bromotimol – sol. 0,5% em KOH 0,2N). Neste caso o pH final deve ser ajustado para 4,5.

Solução de Fe-EDTA

FeSO₄ (1 g) + Na₂H₂ EDTA (Titriplex III) (2,8 g)

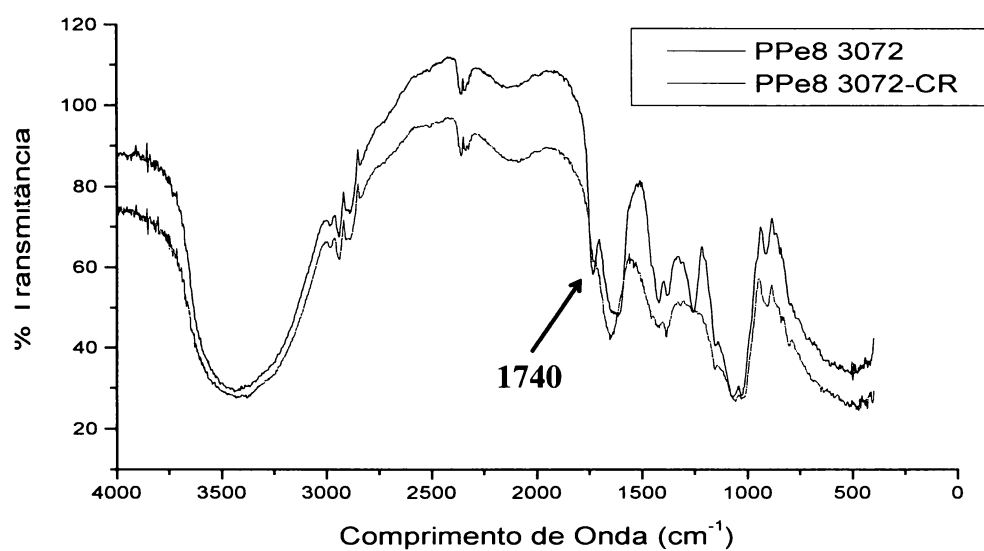
Ferver água milliQ e preparar 30 ml de FeSO₄ e 30 ml de EDTA separadamente. Juntar ambas e completar o volume para 100 ml.

SOLUÇÃO DE MICROELEMENTOS

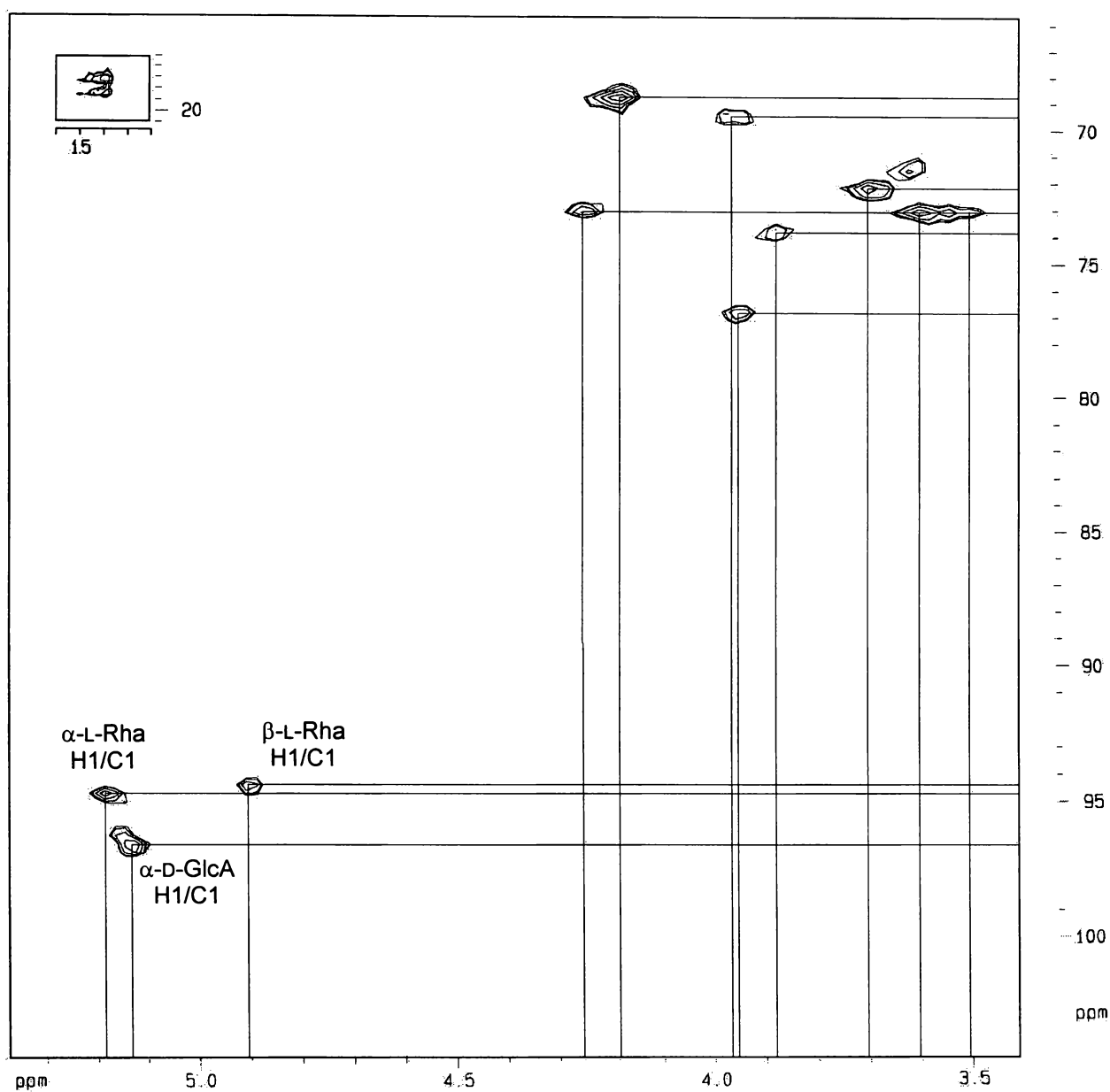
	g/L	vol/L	conc./L
Na₂MoO₄ · 2H₂O	1 g	2 ml	2.0 x 10 ⁻³
MnSO₄ · H₂O	1.175 g	2 ml	2.35 x 10 ⁻³
	1.4 g	2 ml	2.8 x 10 ⁻³
H₃BO₃			
	0.04 g	2 ml	8.0 x 10 ⁻⁵
CuSO₄ · 5H₂O			
ZnSO₄ · 7H₂O	0.12 g	2 ml	2.4 x 10 ⁻⁴

Pesar e dissolver em água destilada. Preparar individualmente, pegar 2 ml de cada um, total de 10 ml para 1 litro e meio.

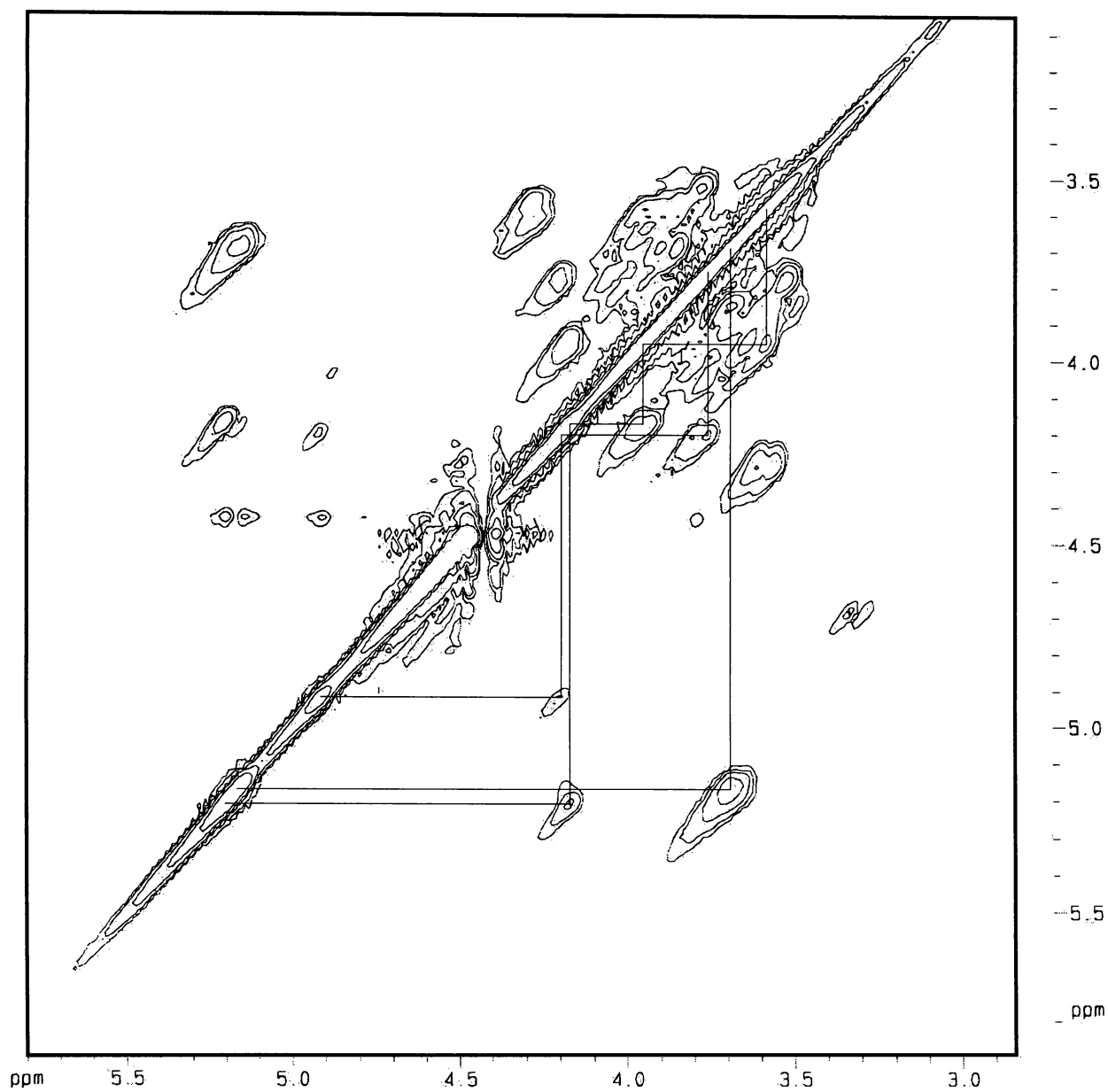
ANEXO 01. Receita para preparação do meio JMV.



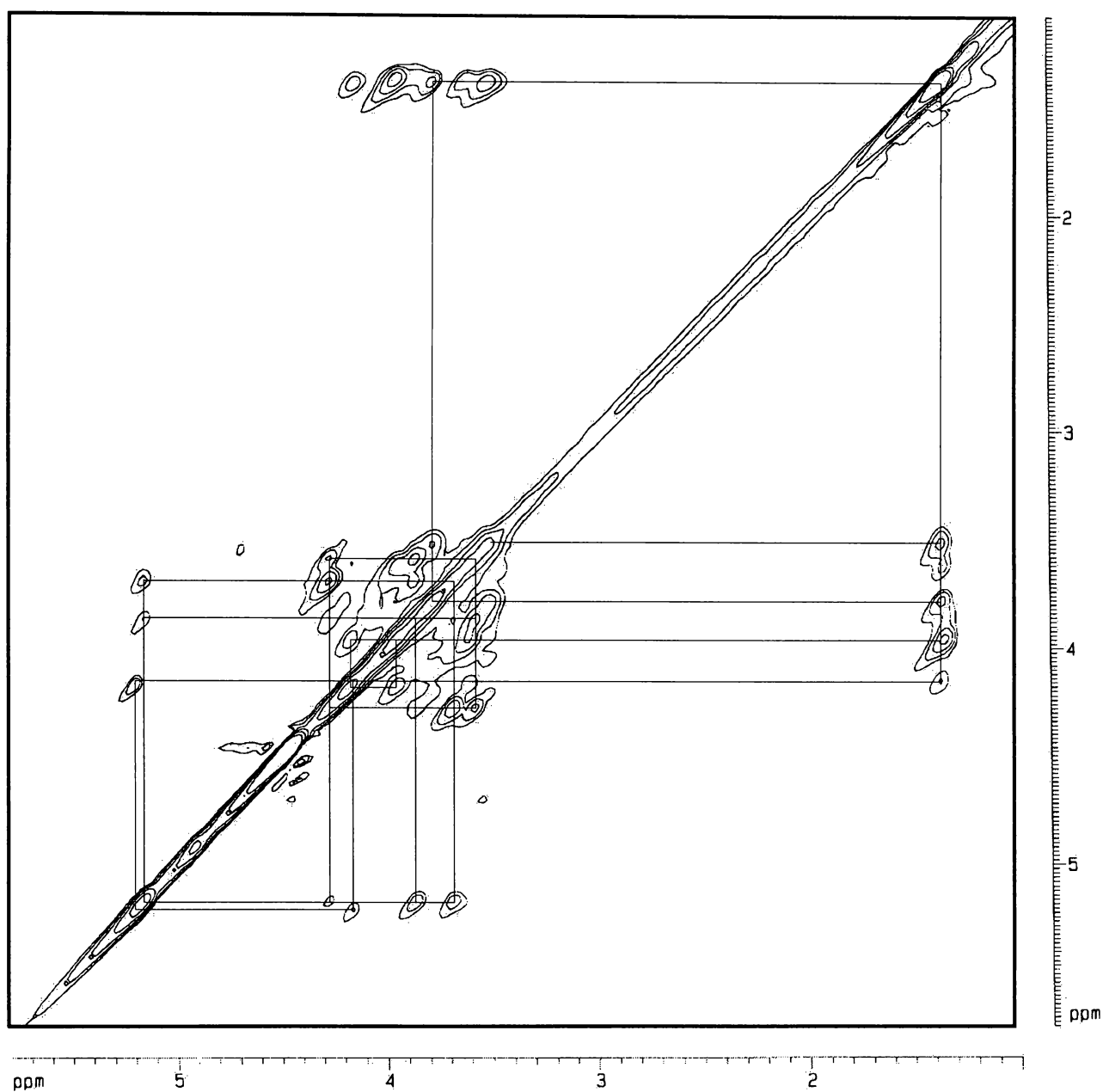
ANEXO 02. Espectro de FT-IR de PPe8 3072 e PPe8 3072-CR. 1740 cm⁻¹ – banda referente ao grupamento carboxílico.



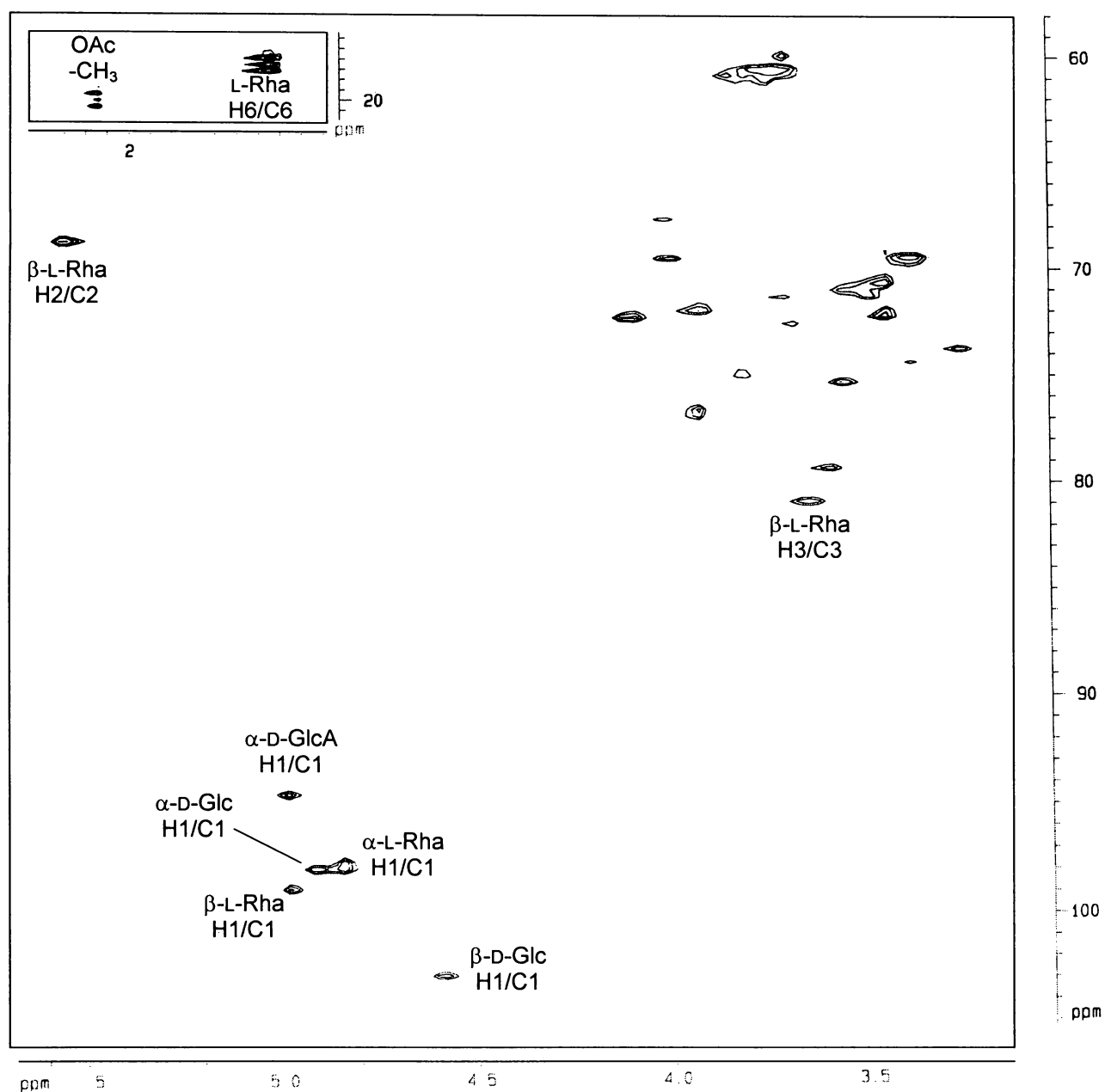
ANEXO 03. Espectro 2D de correlação heteronuclear (HMQC) de Oligo-A. O inserto no canto superior esquerdo mostra a correlação C-6/H-6 da unidade de ramnose.



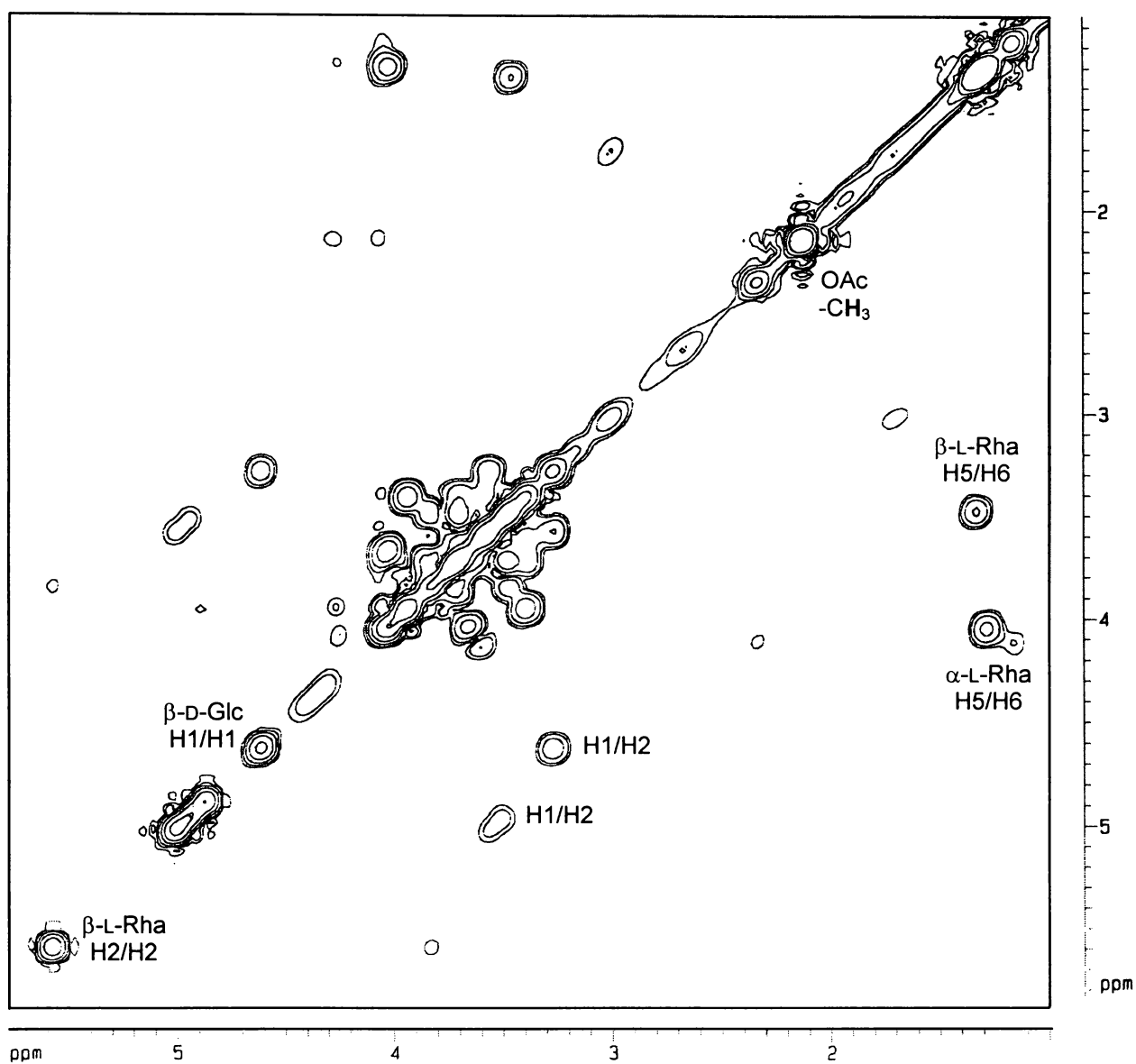
ANEXO 04. Espectro 2D de correlação homonuclear (COSY) de Oligo-A. A região de campo mais alto não é mostrada.



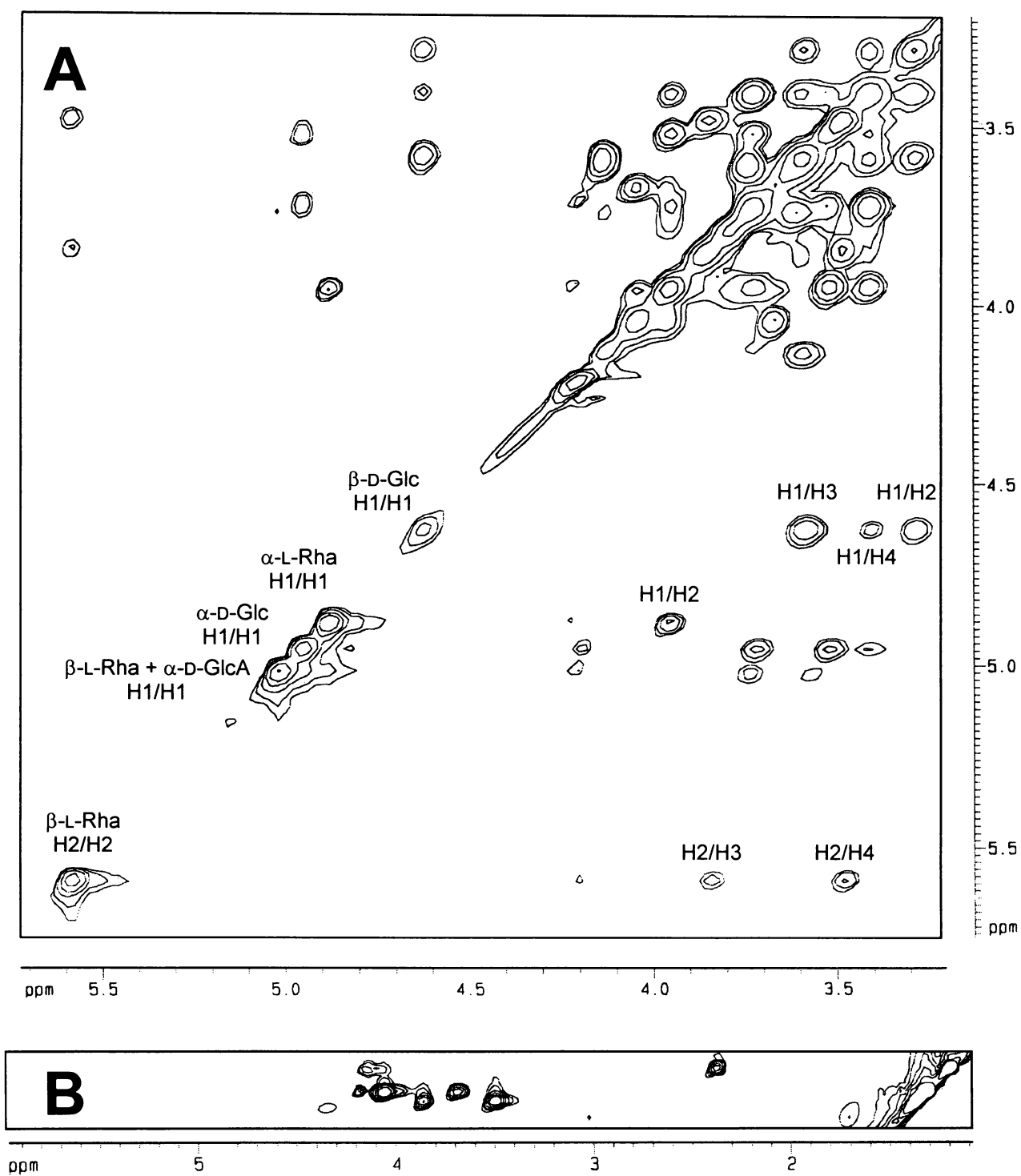
ANEXO 05. Espectro de correlação homonuclear (TOCSY) de Oligo-A.



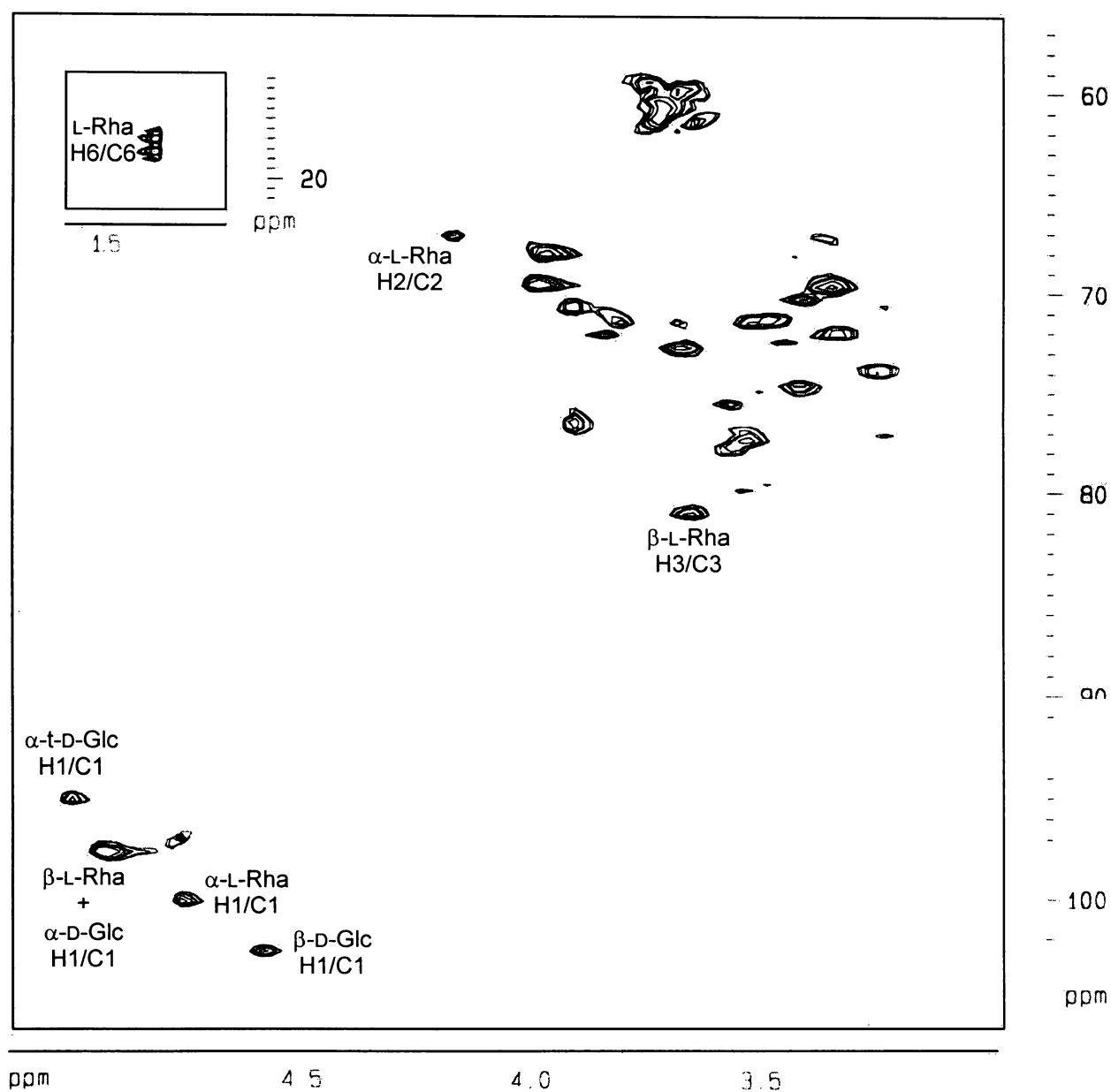
ANEXO 06. Espectro 2D de correlação heteronuclear (HMQC) de PPe8 3072. O inserto no canto superior esquerdo mostra a correlação C-6/H-6 da unidade de ramnose e a correlação C-H do grupamento metílico do acetil substituínte.



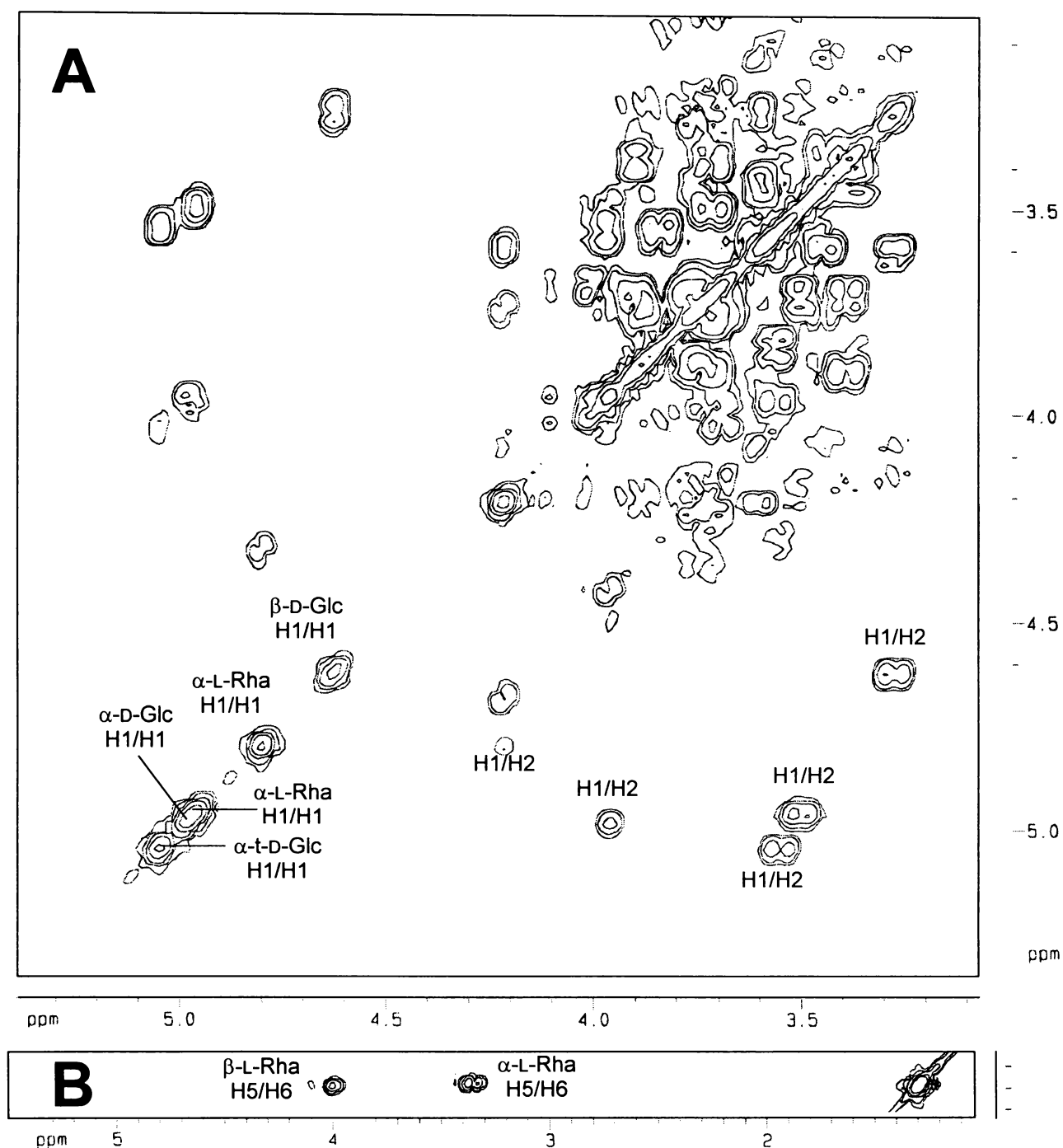
ANEXO 07. Espectro 2D de correlação homonuclear (COSY) de PPe8 3072.



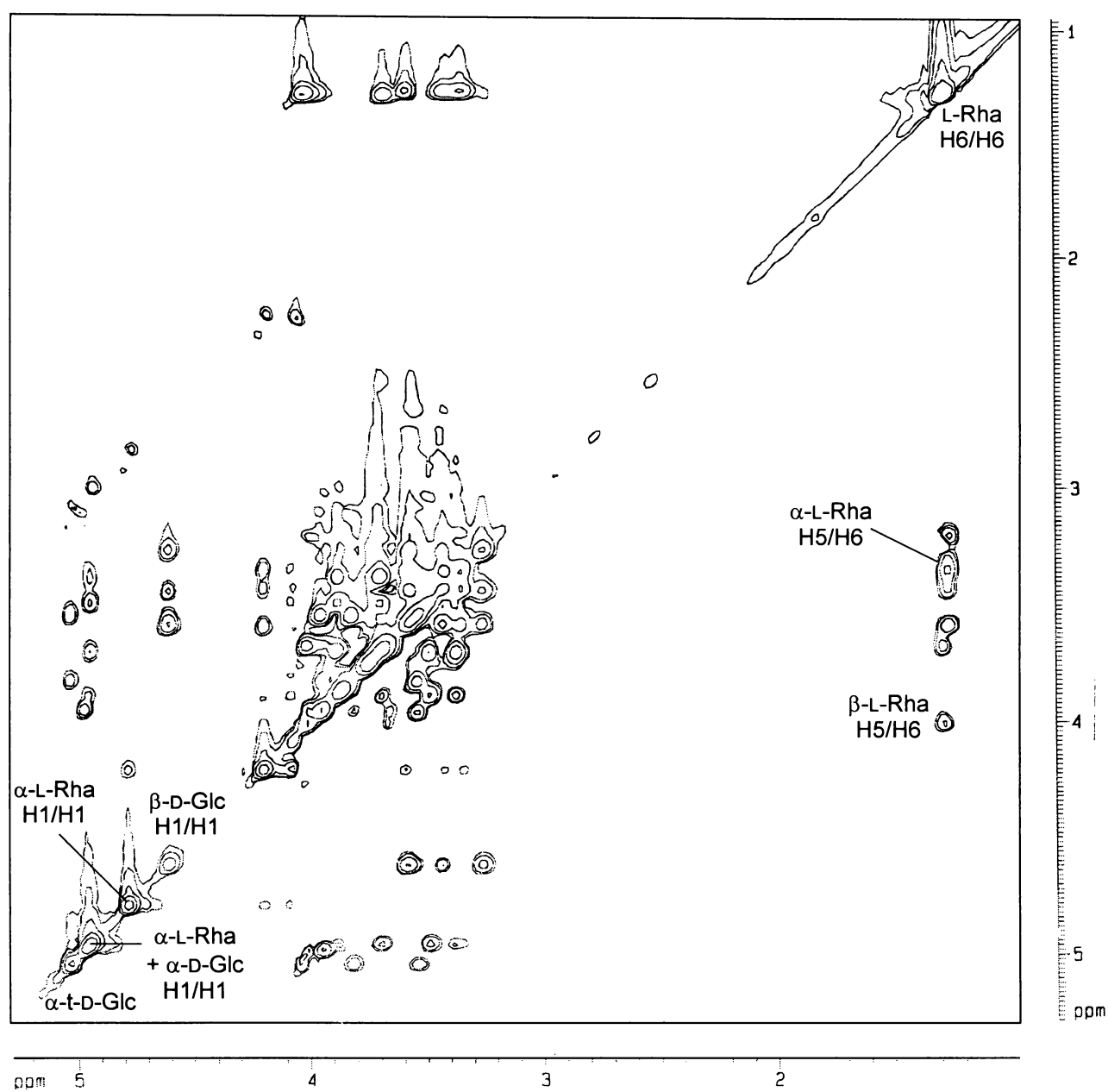
ANEXO 08. A) Espectro parcial 2D de correlação homonuclear (TOCSY) de PPe8 3072. **B)** Região referente às correlações de $-\text{CH}_3$ pertencentes às unidades de Rha.



ANEXO 09. Espectro 2D parcial de correlação heteronuclear (HMQC) de PPe8-CR. O inserto no canto superior esquerdo mostra a correlação C-6/H-6 da unidade de ramnose.



ANEXO 10. A) Espectro parcial 2D de correlação homonuclear (COSY) de PPe8-CR. **B)** Região referente às correlações de $-\text{CH}_3$ pertencentes às unidades de Rhap.



ANEXO 11. Espectro 2D de correlação homonuclear (TOCSY) de PPe8-CR.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, E. L. H., BRIGHTWELL, G., JONES, M. A. and JOHNSTON, A. W. B. Identification of the *exo* loci required for exopolysaccharide synthesis in *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 2287-2297, 1991
- BALDANI, J.I.; POR, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 46, n.3, p. 802-810, 1996
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D. L GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumen plants. **Soil Biol. Biochem.**, Bethesda, v. 29, n. 5, p. 911-922, 1997
- BÉJAR, V.; LLAMAS, V.; CALVO, C.; QUESADA, E. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. **J. Biotechnology**, v. 61, p. 135-141, 1998
- BEZDICEK, D. F.; KENNEDY, A. C. (1998) *Microorganisms in Action*, (eds. JM Lynch & JE Hobbie). Blackwell Scientific Publications.
- BURDMAN, S., JURKEVICH, E., SCHWARTSBURD, B., HAMPEL, M. and OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, v. 144, p. 1989-1999, 1998
- BURDMAN, S., JURKEVICH, E., SORIA-DÍAZ, M. E., SERRANO, A. M. G., OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 189, p. 259-264, 2000
- BURKHOLDER, Wh. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**. St. Paul, v. 40, p. 115-117, 1950
- CÉRANTOLA, S.; MONTROZIER, H. Production in vitro, on different solid culture media, of two distinct exopolysaccharides by a mucoid clinical strain of *Burkholderia cepacia* **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p. 129-133, 2001
- CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by acidic lactic bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 87, p. 113-130, 1990
- CHOU, F.L.; CHOU, H.C.; LIN, Y.S.; YANG, B.Y.; LIN, N.T.; WENG, S.F. TSENG, Y.H. The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot **Biochem. and Biophys. Res. Communications**, v. 233, p. 265-269, 1997

CHRISTENSEN, B. E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 10, p. 181-202, 1989

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

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. (1995) **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**, p. 463 - 524, Ed. John Wiley & Sons

COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M.; MORRIS, V. J. NMR studies of acetan and the related bacterial polysaccharide, CR1/4, produced by a mutant strain of *Acetobacter xilinum*. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1995

COSTERTON, J. W., LAWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. and LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995

DENNY, T. Involvement of bacterial exopolysaccharides in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 33, p. 173-197, 1995

DOBEREINER, J. (1993) Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereal and tuber plants – In: PALACIOS, R. et al., (eds) **New Horizons in Nitrogen Fixation**, p. 671-676 Netherlands: Kluwer Academic Publishers

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956

ERTESVAG, E.; VALLA, S. Biosynthesis and application of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998

EVANS, L.R.; LINKER, A. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*, **J. Bacteriol.**, v. 116, p. 915-924, 1973

FEDONENKO, Y. P., ZATONSKY, G. V., KONNOVA, S. A., ZDOROVENKO, E. L., IGNATOV, V. V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolisaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 869-872, 2002

FETT, W.F., WELLS, J.M.; CESCUTI, P.; WIJEL, C. Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent *Pseudomonas* associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 513-517, 1995

FRANCO, A. A.; DOBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, p. 68-74, 1994

GACESA, P. P. Bacterial alginate biosynthesis: recent progress and prospects. **Microbiology**, v. 144, p. 1133-1143, 1998

GLASER, L. Bacterial cell surface polysaccharides. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 42, p. 91-112, 1973

GOLDMANN, D.A.; KLINGER, J.D. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 108, p.806-812, 1986

GOLDSTEIN, I. J., HAY, G. W., LEWIS, B. A., SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L., WOLFROM, M. L. (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 5, p. 361-369, 1965.

GONZÁLES, J. E., REUHS, B. L.; WALKER, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium melioli* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **PNAS**, v. 93, p. 8636–8641, 1996

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. **Can. J. Chem.**, v. 44, p. 993-998, 1966

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc.**, London, v. 107, p. 8-16, 1915.

HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Chromatography on paper. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 1, p. 21-31, 1962

JACOBSEN, C.S. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4D contaminated soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189 (1), p.139-144, 1997

JANSSON, P.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, **Carbohydrate Research**, v. 45 (1), p. 275-282, 1975

KAWAHARA, K.; DEJSIRILERT, S.; EZAKI, T. Characterisation of three capsular polysaccharides produced by *Burkholderia pseudomallei* **FEMS Microbiology Letters**, v. 169, p. 283-287, 1998

KENNE, L.; LINDBERG, B. (1983) Bacterial Polysaccharides In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**, v. 2, p. 287–363, Academic Press.

KONNOVA, S. A., MARAKOV, O. E., SKVORTSOV, I. M., IGNATOV, V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interaction. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 118, p. 93-100, 1994

LAGATOLLA, C.; SKERLAVAJ, S.; DOLZANI, L.; TONIN, E.A.; BRAGADIN, C.M.; BOSCO, M.; RIZZO, R.; GIGLIO, L.; CESCUTTI, P. Microbiological characterisation of *Burkholderia cepacia* isolates from cystic fibrosis patients: investigation of exopolysaccharides produced **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 99-106, 2002

LEIGH, J. A., REED, J. W., HANKS, J. F., HIRSCH, A. M. and WALKER, G. C. *Rhizobium melioli* mutants that fail to succinilate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. **Cell**, v. 51, p. 579-587, 1987

LEIGH, J. A.; COPLIN, D. L. Exopolisaccharides in plant-bacteria interaction. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 307-346, 1992

LEIGH, J. A., WALKER, G. C. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. **Trends in Genet.**, v. 10, p. 63-67, 1994

LINKER, A.; EVANS, L.R.; IMPALLOMENI, G. The structure of a polysaccharide from infectious strains of *Burkholderia cepacia* **Carbohydrate research**, v. 335, p. 45-54, 2001

MARS. A.E.; HOUWING, J.; DOLFING, J.; JANSSEN, D.B. Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62 (3), p. 886-891, 1996

MATTOS, K.A.; JONES, C.; HEISE, N.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis* **Eur. J. Biochem**, v. 268, p. 3174-3179, 2001

MCLOUGHLIN, F.J.; QUINN, J.P.; BETTRMANN, A.; BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58 (5), p.1760-1763, 1992

MORRISON, I.M. (1986) **Carbohydrate analysis: a practical approach**. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F., p. 205-221, Oxford: IRL-PRESS

NIMITZ, M.; MORT, A.; WRAY, V.; DOMKE, T.; ZHANG, Y.; COPLIN, D. L.; GEIGER, K. Structure of stewartan, the capsular exopolysaccharide from the corn pathogen *Erwinia stewartii*. **Carbohydrate Research**, v. 288, p. 189-201, 1996

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E. C. S. (1980) **Microbiologia**, v. 1, Ed. McGraw-Hill do Brasil.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141 (1), p.13-39, 1992

SABRA, W. Microaerophilic production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. Tese de Doutorado, Fakultät der Technischen Universität Caloro-Wilhelmina, Alexandria, Egito, 143 páginas, 1998

SADASIVAN, L. and NEYRA C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharide and cyst formation. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 716-723, 1985

SKVORTSOV, I. M., IGNATOV, V. V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 165, p. 223-229, 1998

SHARON, N. (1975) **Complex Carbohydrates**, p. 318-416, Addison-Wesley Publishing Company.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, Washington DC, v. 224, p. 1095-1096, 1984

SIST, P.; CESCUTTI, P.; SKERLAVAJ, S.; URBANI, R., LEITÃO, J.H.; SÁ-CORREIA, I.; RIZZO, R. Macromolecular and solution properties of Cepacian: the exopolysaccharide produced by a strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. **Carbohydrate Research**, p. 1-7, 2003

STACEY, F. R. S. and BARKER, S. A. (1960) **Polysaccharides of Microorganisms**, p. 75-113, Oxford Press

STEENHOUDT, O. and VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 487-506, 2000

STEINMETZ, I.; NIMTZ, M.; WRAY, V.; HAUBLER, S.; REGANZEROWSKI, A.; BRENNEKE, B. Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei* **Acta Tropica**, v. 74, p. 211-214, 2000

SUTHERLAND, I. W. Structural studies on the colanic acid, the common exopolysaccharide found in the enterobacteriaceae, by partial acid hydrolysis; oligosaccharides from colanic acid. **Biochemical Journal**, v. 155, p. 935-948, 1969

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 34, p. 79 – 150, 1980

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **Internat. Rev. Cytology**, v. 113, p. 187-231, 1988

SUTHERLAND, I. W. (1990) **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**, Cambridge University Press

SUTHERLAND, I. W.; KENNEDY, L. Polysaccharide lyases from gelatin producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology**, v. 142, p. 867 – 872, 1996

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: not an immobilized but a dynamic microbial environment. **Trends in Microbiol.**, v. 9, p. 222-227, 2001

TAYLOR, R.L.; CONRAD, H.E. Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides following Reduction of their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972

TRAN VAN, V.; GILLIS, M.; HEBBER, K.P.; FERNANDEZ, M.; SEGERS, P.; MARTEL, M.H.; BERGE, O.; MEYER, J.M.; HEULIN, T. Isolation from the rice rhizosphere of a new species of nitrogen-fixing Proteobacteria, belonging to the genus *Burkholderia*. In: NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, sixth, 1994, Cairo. **Proceedings**. Cairo: American University in Cairo Press, 1994, p. 299-309

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

TROYANO, E.; LEE, S.P.; RHA, C.K.; SINSKEY, A.J. Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, p. 35-40, 1996

VAN DEN BERG, D. C.; ROBJIN, G. W.; JANSSEN, A. C.; GIUSEPPIN, M. L. F.; VREEKER, R.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J. F. G.; LEDEBOER, A. M.; VERRIPS, T. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2840-2844, 1995

VANHAVERBEKE, C.; HEYRAUD, A.; ACHOUAK, W.; HEULIN, T. Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. **Carbohydrate Research**, v.334, p. 127-133, 2001

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, Y.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 36, p. 1251-1275, 1992

YOUNG, J. P. W. (1992) **Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms**. In: STACEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, H. S. Biological Nitrogen Fixation, p. 43-86 New York, London Chapman & Hall

WHITON, R. S., LAU, P., MORGAN, S. L., GILBART, J., FOX, A. Modifications in the alditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **J. Chromatography**. v. 347, p. 109-120, 1985