



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



PATRÍCIA MORAIS LOPES PEREIRA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DE *Sporidiobolus ruineniae***

Feira de Santana – BA
2015

PATRÍCIA MORAIS LOPES PEREIRA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DE *Sporidiobolus ruineniae***

Feira de Santana – BA
2015

PATRÍCIA MORAIS LOPES PEREIRA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DE *Sporidiobolus ruineniae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Aparecida de Assis

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Elinalva Maciel Paulo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Flavia Oliveira de Lima

Feira de Santana – BA
2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoelito Coelho dos Santos Júnior

Prof^a. Dr^a. Clícia Maria de Jesus Benevides

Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2015

Às mulheres que dedicam sua vida em prol
do desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

*À Deus por mais uma etapa vencida,
Ao meu pai e minha mãe, Nilo e Avany, pelo amor e apoio que vocês têm me dado.
Ao meu irmão, Alfredo de Moraes Neto, por me mostrar que a vitória vem se a gente lutar.*

Aos meus primos irmãos Igor, Luiz e Junior, por estarem sempre presentes.

À minhas tias amadas, pelo afeto e pelas orações em meu favor.

À todos os meus primos e primas, pelo carinho e amizade.

Aos meus sogros, Aparecida e José, pelo apoio.

À Márcio, meu grande amor, por sonhar comigo os meus sonhos e me ajudar a transforma-los em realidade.

Às minhas filhas Bibia e Gigi, por ser minha felicidade.

Às meus colegas amigos do LAEN e do Biotério, por dividirem comigo momentos de luta e alegria que a UEFS nos proporcionou.

Aos Funcionários do Biotério, por nos auxiliar no desenvolvimento desta pesquisa.

À Tami, Grasi, Mona e Sofia, amigas com quem sempre posso contar.

À minha orientadora Sandra e às minhas co-orientadoras Elinalva e Flávia, pelo aprendizado que obtive durante essa jornada.

*À Capes que oportunizou a minha dedicação exclusiva aos estudos
A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho o meu*

“MUITO OBRIGADA!”

Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.

Jean Cocteau, Mark Twain

RESUMO GERAL

A região do semiárido baiano apresenta uma vasta diversidade de micro-organismos com potencial para prospecção biotecnológica. Indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis, entre outras, vêm utilizando polissacarídeos de origem microbiana para diversas funções como flocculantes, espessantes ou estabilizadores, entre outros. O presente estudo teve por objetivo produzir e caracterizar a estrutura química, otimizar a produção e avaliar a atividade antinociceptiva dos polissacarídeos obtidos da levedura *Sporidiobolus ruineniae*. Dois tipos de polissacarídeos foram obtidos a partir de diferentes metodologias aplicadas ao micro-organismo estudado: o polissacarídeo extracelular (EPS *Sporidiobolus ruineniae*) e o polissacarídeo estrutural de parede celular (PEPC *Sporidiobolus ruineniae*). O EPS de *Sporidiobolus ruineniae* foi recuperado do sobrenadante do caldo fermentativo centrifugado e o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* foi extraído das células constituintes do material sedimentado. Os dois tipos de polissacarídeos foram submetidos à extração alcalina (NaOH) para separação de suas frações solúvel e insolúvel em álcali. As frações solúveis foram selecionadas para prosseguimento do estudo. O rendimento das frações solúveis foi de 91% para o EPS *Sporidiobolus ruineniae* e de 20,75% para o PEPC *Sporidiobolus ruineniae*. As caracterizações das estruturas moleculares revelaram presença de unidades de glicose e manose nos dois polissacarídeos. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear revelou sinal característico de β -glucana no PEPC *Sporidiobolus ruineniae*. Para otimização da extração dos dois tipos de polissacarídeos foi utilizado a matriz experimental Doehlert. Para a avaliação da atividade antinociceptiva foram realizados três modelos experimentais de nocicepção (teste de contorção abdominal, teste de formalina e teste de imersão de cauda). As análises realizadas neste estudo revelaram que os biopolímeros extraídos da levedura *Sporidiobolus ruineniae* apresentaram ação antinociceptiva periférica, podendo ser consideradas substâncias biologicamente ativas de importância farmacêutica. Contudo, estudos complementares devem ser realizados para a determinação da sua estrutura química e melhor elucidar os mecanismos de ação dos polissacarídeos em sua atividade antinociceptiva.

PALAVRAS-CHAVE:

Micro-organismos, polissacarídeo, atividade antinociceptiva, planejamento Doehlert.

ABSTRACT

Bahia's semi-arid region features a wide diversity of microorganisms with potential for prospecting biotechnology. Pharmaceutical, food, textiles, among others industries, have been using polysaccharides of microbial origin for various functions such as the production of antibiotics, chemicals and dietary supplements, for the manufacture of fabrics, among others. Hence, this study aimed to produce and characterize the chemical structure, optimize production and evaluate the antinociceptive activity of polysaccharides obtained from the yeast *Sporidiobolus ruineniae*. Two types of polysaccharides were obtained from different methodologies applied to the studied microorganism: the extracellular polysaccharide (EPS *Sporidiobolus ruineniae*) and structural cell wall polysaccharide (PEPC *Sporidiobolus ruineniae*). The EPS *Sporidiobolus ruineniae* was recovered from the supernatant of the fermentation broth and PEPC *Sporidiobolus ruineniae* was extracted from the cells which make up the pellet material. The two types of polysaccharides were subjected to alkaline extraction (NaOH) for the separation of their soluble and insoluble fractions in alkali. The soluble fractions were selected for further study. The yield of the soluble fraction was 91% for EPS *Sporidiobolus ruineniae* and 20.75% for the PEPC *Sporidiobolus ruineniae*. The characterizations of the molecular structures revealed the presence of glucose and mannose units in the two polysaccharides. The nuclear magnetic resonance spectroscopy revealed characteristic sign of β -glucan in PEPC *Sporidiobolus ruineniae*. For optimization of the extraction of two types of polysaccharides, the experimental Doehlert matrix was used. To evaluate the antinociceptive activity, three experimental models of nociception (abdominal writhing test, the formalin test and tail-immersion test) were performed. The analyzes performed in this study revealed that the biopolymers extracted from *Sporidiobolus ruineniae* yeast showed peripheral antinociceptive action, being able to be considered biologically active substances of pharmaceutical importance. However, further studies should be conducted to determine the chemical structure and to further elucidate the mechanisms of action of polysaccharides in their antinociceptive activity.

Key words:

Microorganisms, polysaccharide, antinociceptive activity, planning Doehlert.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	13
	CAPÍTULO 1 - POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	16
1	A IMPORTÂNCIA DOS MICRO-ORGANISMOS COMO FONTE DE PRODUTOS PARA BENEFÍCIO HUMANO.	17
2	LEVEDURAS: MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE POLISSACARÍDEOS	18
3	POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS: UM GRANDE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	19
4	POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS).	24
5	POLISSACARÍDEOS ESTRUTURAIS DE PAREDE CELULAR (PEPC)	26
	CAPÍTULO 2 - EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	33
1	INTRODUÇÃO	36
2	MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1	PROCEDÊNCIA DO MICRO-ORGANISMO	37
2.2	PLAQUEAMENTO	37
2.3	CONDIÇÕES DE CULTURA DE <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	37
2.4	EXTRAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO DE <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	38
2.5	MODELO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO EPS <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	39
2.6	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	39
2.7	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	39
2.8	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	40
2.8.1	TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.	40
2.8.2	TESTE DE FORMALINA	41
2.8.3	TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA (TAIL FLICK)	41
2.8.4	DROGAS E DILUIÇÕES	42
2.8.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS EXPERIMENTOS COM ANIMAIS	42
3	RESULTADOS	42
3.1	EXTRAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	42

3.2	CARACTERIZAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO POR ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA	45
3.3	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	45
3.3.1	TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.	45
3.3.2	TESTE DE FORMALINA	46
3.3.3	TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA (TAIL FLICK)	47
4	DISCUSSÃO	48

CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEO ESTRUTURAL DE PAREDE CELULAR OBTIDOS DE *Sporidiobolus ruineniae*

		53
1	INTRODUÇÃO	56
2	MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1	PROCEDÊNCIA DO MICRO-ORGANISMO	57
2.2	PLAQUEAMENTO	57
2.3	CONDIÇÕES DE CULTURA DE <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	58
2.4	EXTRAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO DE <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	58
2.5	MODELO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO PEPC <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	59
2.6	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO PEPC <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	60
2.7	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO PEPC <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	60
2.8	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	61
2.8.1	TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.	61
2.8.2	TESTE DE FORMALINA	61
2.8.3	TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA (TAIL FLICK)	62
2.8.4	DROGAS E DILUIÇÕES	62
2.8.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS EXPERIMENTOS COM ANIMAIS	62
3	RESULTADOS	63
3.1	EXTRAÇÃO DO PEPC <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	63
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO PEPC <i>Sporidiobolus ruineniae</i> POR ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA	65
3.3	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	66
3.3.1	TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.	66

3.3.2	TESTE DE FORMALINA	67
3.3.3	TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA (TAIL FLICK)	68
4	DISCUSSÃO	69
	CONCLUSÃO	75

INTRODUÇÃO GERAL

O semiárido do estado da Bahia é formado por 258 municípios, localizados em uma área de 388.274 Km², compreendendo 70% da área do estado. É uma região caracterizada por um balanço hídrico negativo, sendo que a maior parte dela, geralmente, ocorre em três meses, com média anual inferior a 800 mm (LOBÃO et al 2004). Embora a elevada disponibilidade de radiação solar, associada à irregularidade do regime pluviométrico, contribua para o aumento das taxas de evaporação, esta região apresenta paisagem diversa, tanto em relação à sua geomorfologia quanto à sua biodiversidade (GIULIETTI et al, 2006).

Os fungos estão entre os organismos mais diversificados do planeta, podendo se desenvolver em ambientes com temperaturas elevadas ou extremamente baixas, com restrição de água ou com alta umidade, além de ambientes pobres em nutrientes. Estudos da diversidade de fungos na região de semiárido da Bahia têm revelado um número elevado de novos registros (GUSMÃO; MARQUES, 2006).

Os micro-organismos (algas, bactérias e fungos), assim como as plantas, produzem diferentes polissacarídeos com diversas e importantes aplicações biotecnológicas (SILVA et al., 2006). *Sporidiobolus rueneniae* é uma levedura pigmentada isolada da região do semiárido baiano. Sua produção de carotenoides confere uma coloração característica, que lhe promove proteção contra raios UV (GUAMAN-BURNEO et al, 2009), sendo, portanto, um micro-organismo adaptado a ambientes com elevada temperatura. Além disso, possui capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares e de parede celular, cuja atividade antinociceptiva pôde ser avaliada no presente estudo.

Polissacarídeos provenientes de micro-organismos apresentam vantagens quando comparados aos de vegetais, porque a produção não está sujeita a alterações climáticas, problemas na colheita ou a contaminação marinha. Outra grande vantagem está na capacidade de manter um alto padrão de qualidade das suas propriedades químicas e físicas devido ao rígido controle de sua produção (ASHTAPUTRE; SHAH, 1995).

O conhecimento detalhado da estrutura primária de um polissacarídeo é fundamental para que se tenha um completo entendimento de suas propriedades, funções e aplicações, tendo em vista a necessidade de obter informações estruturais de diferentes polissacarídeos, com potencial atividade biológica ou que possuam funções específicas de comunicação celular (SERRATO, 2008).

Pesquisas sobre a composição química dos polissacarídeos têm sido intensificadas nos últimos anos pela necessidade de encontrar novos biopolímeros, modificar suas propriedades naturais e estender suas aplicações biológicas. A importância dessas moléculas vem sendo enfatizada devido a novas descobertas, nas quais os carboidratos foram reconhecidos como agentes da expressão da identidade biológica e dos processos de comunicação e reconhecimento celular, além das funções estruturais e de reserva (SERRATO, 2008).

Atualmente, polissacarídeos de origem microbiana têm sido utilizados nas indústrias por suas propriedades emulsificantes, espessantes e geleificantes (KAWAI, et al, 2006), porém estudos vêm comprovando sua aplicação também na saúde humana (KIM et al, 2006). Segundo Pereira (2009) as pesquisas relacionadas ao uso medicinal de polissacarídeos têm se concentrado em aplicá-los como agentes anticancerígenos com ação anti-inflamatória, no tratamento da artrite reumatoide, na síntese de antígenos para produção de anticorpos, na proteção contra danos oxidativos no DNA.

Considerando o crescente interesse biotecnológico pelo uso de polissacarídeos de origem microbiana, o propósito do presente trabalho foi otimizar a produção, caracterizar estruturalmente e avaliar a atividade antinociceptiva do polissacarídeo extracelular e do polissacarídeo estrutural de parede celular obtidos da levedura *Sporidiobolus ruineniae*.

Referências:

- ASHTAPURE, A. A.; SHAH, A.K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Shingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, V.61, n.3, 1995, p.1159-1162.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de; RAPINI, A. Apresentando o Cenário In: **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). Brasília, 2006. p. 15 -18.
- GUAMÁN-BURNEO, C.; CARVAJAL-BARRIGA, J. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. **Universitas Scientiarum**, V. 14, N° 2-3, 2009, p. 187-197
- GUSMÃO, L. F. P.; MARQUES, M. F. O. Diversidade de Fungos no Semi-árido Brasileiro. In: **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). Brasília, 2006. p. 83-86.
- KAWAI, L. A.; PINOTTI, M. H.; P. C. CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de exopolissacarídeos pela cianobactéria *Nostoc sp* em diferentes concentrações de nitrogênio e glicose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, 2006, V. 27, n. 1, jan./jun. 2006, p. 33 - 39.
- KIM, S. Y.; SONG, H. J.; LEE, Y. Y.; CHO, K.-H.; ROH, Y. K. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. **Journal Korean of Medical Science**, Seoul, v. 21, n. 10, 2006, p. 781-789.
- LOBÃO, J. S. B.; FRANCA ROCHA, W. DE J. S; FREITAS, N. B. Semi-árido da bahia, limites físico ou sócio-político? Uma abordagem geotecnológica para a delimitação oficial. In: II Simpósio Regional de Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto, 2004, Aracaju. **Anais**. Aracaju/SE, 10 a 12 de novembro de 2004.
- PEREIRA, S. R. S. **Produção, isolamento e caracterização química do exopolissacarídeo do fungo da podridão branca da madeira *Trametes versicolor***. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade de Aveiro, 2009.
- SERRATO, R. V.. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por Bactérias diazotróficas endofíticas**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2008.
- SILVA, M. DE L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. DE M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, V. 29, N°. 1, 2006, 85-92.

CAPÍTULO 1

Polissacarídeos fúngicos: Propriedades bioquímicas e atividades biológicas

1 A importância dos micro-organismos como fonte de produtos para benefício humano.

Antes mesmo de se ter conhecimento sobre micro-organismos, antigas civilizações já os utilizavam para a fabricação de alimentos, para a melhoria do rendimento da colheita e para o descarte de resíduos. No início do século XX, no entanto, o conhecimento sobre os micro-organismos e sua capacidade de realizar transformações químicas aumentou significativamente. Estes começaram a ser aplicados em indústrias e à medida que estudos eram realizados, aumentavam também as suas aplicações nas mais diversas áreas. Devido a isso, tornou-se necessário a busca por mais informações sobre esses seres vivos e cientistas passaram a identificar e caracterizar as moléculas produzidas por fungos e bactérias (STEVENSON, 1974; PELCZAR et al, 1996). Desde então, os micro-organismos vêm sendo utilizados como fonte de produtos de interesse para indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis, entre outras (KAWAI et al, 2006).

A busca por produtos do metabolismo celular de micro-organismos tornou-se uma ciência responsável por uma grande modificação na vida dos seres humanos, já que, a partir dela, foram desenvolvidos tratamentos médicos capazes de promover a cura ou até mesmo evitar o contágio de doenças e infecções antes letais (INGRAHAM J. L.; INGRAHAM, C. A., 2011). Muitos produtos industriais elaborados por meio da atividade biossintética de fungos e bactérias deram origem a substâncias novas, valiosas e de vasta atividade para benefício humano, tais como antibióticos, vacinas, enzimas, entre outras (PELCZAR et al, 1996).

A microbiologia industrial tradicional passou a produzir os mesmos produtos gerados naturalmente por micro-organismos em escala industrial, o que impulsiona a realização de vários estudos com diferentes linhagens de fungos e bactérias para obtenção de novos produtos. O desenvolvimento de novas tecnologias, que utilizam como fonte células e moléculas biológicas para a geração de novos produtos, apresentam vantagens sobre as que utilizam organismos macroscópicos, dentre elas destaca-se a especificidade das interações, o que nos possibilita utilizar ferramentas e técnicas precisas, que foram desenvolvidas para operar de forma conhecida e previsível (KREUZER; MASSEY, 2002).

Produtos de origem microbiana não dependem de condições climáticas, apresentam um tempo curto para obtenção e necessitam de pequenos espaços para serem produzidos. Apresentam também, maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do micro-organismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de cultivo, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo e composição do meio de cultura (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Para se obter produtos originados do metabolismo de organismos unicelulares, estes devem ser cultivados em meio de cultura, sob condições satisfatórias. O crescimento dos micro-organismos ocorre a partir, primariamente, de um aumento no tamanho de suas células, que se dividem proporcionando o aumento do número de indivíduos. Este crescimento depende do suprimento de nutrientes e condições físicas adequadas, tais como fonte de carbono, temperatura e pH específicos. Seu crescimento apresenta três fases: a fase latente (lag), que é uma fase de adaptação ao meio de cultura; a fase logarítmica (log), que é a fase de rápido crescimento, na qual ocorre a divisão regular de todas as células; e a fase estacionária finalizando as divisões celulares (TORTORA et al, 2012).

2 Leveduras: micro-organismos produtores de polissacarídeos.

Leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, não filamentosos, na maioria ovais, mas podem apresentar formato alongado ou esférico e se reproduzem por brotamento. São, em geral, maiores que as bactérias, variando em tamanho de 1 a 5 µm em largura e 5 a 30 µm de comprimento. Não possuem flagelos ou outras estruturas para locomoção (TORTORA et al, 2012; INGRAHAM J. L.; INGRAHAM, C. A., 2011; PELCZAR et al, 1996). São organismos eucariotos, apresentando um citoplasma compartimentado por um sistema de membranas que formam organelas citoplasmáticas, apresentam também, um núcleo envolto por uma cariomembrana e uma parede celular recobrendo a superfície celular (PELCZAR et al, 1996).

O termo levedura não se refere à taxonomia de um único grupo, sendo usado para designar fungos unicelulares pertencentes às classes Ascomycetos, Deuteromicetos e Zigomicetos. Originalmente o termo era utilizado somente para designar cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, leveduras de grande importância para

indústria alimentar por ser responsável pela fermentação de pães, cerveja e vinhos. Atualmente, especialistas o utilizam para englobar quaisquer das centenas de espécies de fungos que apresentem as características descritas anteriormente (INGRAHAM J. L.; INGRAHAM, C. A., 2011).

As leveduras são extensamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em folhas, frutas, néctar de flores, no solo, no corpo de animais e em carnes curadas. Quando inoculadas em meio sólido formam colônias lisas e brilhantes que se assemelham às colônias de bactérias (TORTORA et al, 2012).

Leveduras são seres anaeróbicos facultativos, podendo utilizar o oxigênio ou outro composto como aceptor final de elétrons e essa característica lhes possibilita sobreviver em vários ambientes. Em meio, com presença de oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono, produzindo dióxido de carbono e água. Na ausência de oxigênio, as leveduras fermentam os hidratos de carbono, obtendo dióxido de carbono e etanol como resultado do seu metabolismo celular. O processo de fermentação possibilita a produção de cervejas, vinhos, produtos de panificação, entre outros (TORTORA et al, 2012).

Muitos organismos, incluindo leveduras, outros fungos e bactérias, sintetizam biopolímeros a partir da glicose, sendo que estes biopolímeros são utilizados por indústrias de diversas áreas (STEVENSON, 1974). Um exemplo de um biopolímero encontrado em células de micro-organismos são os polissacarídeos, que são moléculas constituídas por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, formadas a partir da eliminação de uma molécula de água entre o grupo hidroxila hemiacetal de um resíduo e um grupo hidroxila primário ou secundário de outro resíduo adjacente. Esses polímeros naturais, também chamados de glucanas, são macromoléculas presentes em todos os organismos vivos, como por exemplo a celulose e o amido dos vegetais, sendo, por tanto, um dos compostos mais abundantes da biosfera (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

3 Polissacarídeos microbianos: um grande potencial biotecnológico.

Os polissacarídeos são constituídos por mais de 20 unidades de monossacarídeos, formados por unidades repetidas de D-glicose, que se

diferenciam no tipo de ligação glicosídica existentes entre essas unidades. Estes polímeros podem desempenhar funções estruturais, de armazenamento de energia, proteção celular, entre outras. São constituídos geralmente por unidades glicosídicas em ligação alfa ou beta, sendo as beta-glucanas a forma predominante encontrada em fungos (SUTHERLAND, 1998). Suas cadeias podem ser lineares, ramificadas ou cíclicas e sua massa molecular pode variar de milhares a milhões de Daltons. Podem ainda ser constituídos pela união de várias unidades de um mesmo monossacarídeo ou por unidades de monossacarídeos diferentes (INGRAHAM J. L.; INGRAHAM, C. A., 2011; SUTHERLAND, 1998).

No ambiente natural, algumas espécies de micro-organismos são capazes de secretar polissacarídeos para o meio em que se encontram e tais polissacarídeos podem exercer diferentes funções, como a de adesão celular a superfícies, proteção contra a desidratação de estruturas celulares, auxiliar interações microbianas ou podem estar associados à virulência (SUTHERLAND, 1998; RUAS-MADIEDO et al, 2002).

Fatores ambientais também podem exercer influencia sobre a produção de polissacarídeos de origem microbiana em habitat natural. Em alguns micro-organismos, a fonte de carbono pode ser responsável pela quantidade do polissacarídeo, bem como pela qualidade do produto sintetizado (KANG; COTTRELL, 1979).

A grande maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos. Os carboidratos eram considerados componentes biológicos simples, cuja função se limitava ao armazenamento de energia e estrutura celular, no entanto, pesquisas demonstraram que sua importância em interações moleculares complexas foi subestimada. Estudos revelaram que os carboidratos são capazes de estimular a resposta imunológica, aumentando o número e a atividade das células de defesa, podendo atuar também como moléculas sinalizadoras para células e substâncias que participam da resposta inflamatória. Hoje, portanto, já é conhecida sua grande importância em funções fisiológicas necessárias para o reconhecimento celular e molecular, como interações antígeno-anticorpo (KREUZER; MASSEY, 2002).

Os polissacarídeos podem ser classificados em homopolissacarídeos, quando possui em toda sua extensão somente um tipo de unidade monométrica ou em heteropolissacarídeos, quando são formados por diferentes unidades ligadas entre si (TONG et al., 2009). Alguns homopolissacarídeos desempenham função estrutural, como é o caso da celulose e da quitina, outros, como por exemplo o amido, apresentam como função o armazenamento de energia. Os heteropolissacarídeos, por sua vez, provem suporte extracelular para diversos organismos, o peptídeoglicano, por exemplo, é um heteropolissacarídeo formador da camada rígida do envelope celular bacteriano (NELSON; COX, 2000).

A qualidade e fornecimento de polissacarídeos produzidos por plantas e algas marinhas utilizados no cultivo tradicional podem ser afetados por fatores ambientais, com variações sazonais e eutrofização. Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de desenvolver polissacarídeos com propriedades superiores às dos polímeros existentes devido à diversidade de micro-organismos presentes na biosfera (ASHTAPUTRE; SHAH, 1995). Além disso, vários estudos têm demonstrado uma variação estrutural em polissacarídeos produzidos por um mesmo micro-organismo, o que demonstra que diferentes polissacarídeos podem ser produzidos a partir de um único micro-organismo (SEVIOUR et al, 1992).

As glucanas são moléculas modificadoras da resposta biológica (MRBs), por desencadear respostas no hospedeiro, através da ativação do sistema imunológico (BOHN; BEMILLER, 1995). A ativação do sistema imunológico via sistema complemento, direta ou, com a atuação de anticorpos, desencadeia a produção de fatores quimiotáticos que induzem a migração de leucócitos para o sítio da infecção (NICHOLAS; SHAUN, 2001). As β -glucanas têm sido reconhecidas por seu potencial imunomodulador. Esse polímero, ao ser reconhecido por receptores específicos de superfície celular desencadeia uma série de eventos advindos do sistema imune (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

As glucanas com ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) atuam ativando células T “helper”, células natural “killer” e macrófagos. Acredita-se que a modulação do sistema imunológico tem seu início no reconhecimento do polímero por receptores específicos dos macrófagos ativando essas células (WILLIAMS,

1997). Tais receptores identificados em células do sistema imunológico, como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células natural Killer (NK), também foram encontrados em células não pertencentes ao sistema imunológico como células endoteliais, fibroblastos, células do epitélio alveolar e de Langerhans (BROWN; GORDON, 2003).

A ausência de enzimas específicas para a degradação dessas moléculas contribui para sua longa permanência no organismo de mamíferos, o que permite que os biopolímeros fiquem acumulados em órgãos do sistema reticulo endotelial sem sofrer alterações importantes, sendo assim a metabolização ocorre de forma lenta por oxidação (NONO et al, 1991), favorecendo à sua atividade biológica.

Alguns estudos têm comprovado efeitos benéficos da ingestão continuada de β -glucanas em humanos e animais. Estes polímeros vêm se destacando entre os ingredientes utilizados em alimentos funcionais (TOKUNAKA et al, 2002), atuando como probióticos capazes de estimular seletivamente a microbiota benéfica presente no trato intestinal do hospedeiro (PRZEMYSŁAW; PIOTR, 2003), assim como reduzir os índices de colesterol e glicemia sanguíneos (KIM et al, 2006).

Estudos clínicos em camundongos revelaram que a administração de 1,3-glucana solúveis os protegem contra infecções e em processos cirúrgicos diminuem complicações sépticas e melhoram a sobrevida dos animais estudados (ENGSTAD et al, 2002).

Estudos realizados com diferentes polissacarídeos têm comprovado diversas atividades biológicas voltadas para saúde humana. Polissacarídeos constituídos por ramnose, manose e galactose apresentaram eficácia na cicatrização de feridas cutâneas provocadas por queimaduras (He et al, 2014). Testes biológicos com heteropolissacarídeos constituídos por manana, galactana e glucana, extraídos de *Pleurotus ostreatus* e *Chorella pyrenoidosa*, apresentaram forte ação antitumoral destes polissacarídeos (TONG et al., 2009). Estudos realizados por Krizková e colaboradores (2001) comprovaram a atividade antimutagênica de glucomananas isoladas de *Candida utilis*.

Para desenvolver estudos com polissacarídeos de origem microbiana são necessários vários estágios como a seleção de cepas, a produção em meio de cultura através de processo fermentativo, a otimização do processo de produção, a caracterização estrutural e a análise de sua aplicação biológica.

A metodologia de extração dos polissacarídeos permite subdividi-los em duas frações devido ao seu grau de solubilidade em soluções aquosas, sendo elas a fração solúvel e a fração insolúvel. A fração solúvel possui características estruturais semelhantes a insolúvel, mas com maior quantidade de ramificações em sua cadeia principal (MANNERS et al, 1973). Segundo Kapteyn et al. (1997), a característica responsável pela insolubilidade de heteropolissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* é a ligação entre o resíduo terminal reduzido da quitina β (1-4) e o terminal não reduzido da β (1-3) glucana. A insolubilidade, além de dificultar a administração medicamentosa dessa fração, pode também causar efeitos colaterais e baixa digestibilidade, devido a sua resistência a hidrólise no trato digestivo (WILLIAMS, 1997; BRITO, 2013). Assim, se faz necessário o desenvolvimento de processos capazes de solubilizar estas frações para eliminar seus efeitos colaterais e otimizar sua atividade biológica.

Na biossíntese dos carboidratos celulares, diferentes tipos de polissacarídeos são produzidos. Os exopolissacarídeos (polissacarídeos extracelulares) podem permanecer envolvendo a célula como uma cápsula, ou podem ser completamente expelidos no meio ambiente, deixando de ter contato com a mesma. Já os polissacarídeos estruturais desempenham funções importantes para a composição celular (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Há atualmente uma grande procura por novos polissacarídeos estruturais de parede celular (PEPC) e extracelulares (EPS), que possuam propriedades interessantes para a indústria, levando ao crescimento na identificação de micro-organismos produtores. Diante disso, é de fundamental importância a realização de pesquisas envolvendo a aplicabilidade de novos polissacarídeos produzidos por micro-organismos.

4 Polissacarídeos extracelulares (EPS).

Os exopolissacarídeos (EPS) são metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, definidos por polissacarídeos extracelulares secretados por grupos de bactérias e fungos (SUTHERLAND, 1998).

Os exopolissacarídeos de origem microbiana têm sido utilizados nos mais diversos setores, tendo aplicações em indústrias alimentícias, têxteis, de tintas, de cosméticos, de papel, e farmacêuticas, como flocculantes, espessantes ou estabilizadores, substituindo os polissacarídeos de macroalgas e plantas (KAWAI, et al, 2006).

No ambiente natural, a produção de exopolissacarídeos pode estar associada a fatores com virulência, à interação entre planta e micro-organismo, proteção da célula microbiana contra dessecação e contra o ataque por bacteriófagos e protozoários (SUTHERLAND, 1998). Exopolissacarídeos de micro-organismos encontrados em regiões de frio extremo funcionam como uma estratégia para manutenção desses organismos no ambiente, pois parecem conferir proteção contra baixas temperaturas (SELBMAN et al, 2002). Pode-se dizer, portanto, que a biossíntese de exopolissacarídeos, no ambiente natural, está associada a mecanismos de sobrevivência do organismo.

Muitos polissacarídeos microbianos extracelulares possuem a capacidade de produzir soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações. A reologia da fermentação e a viscosidade desses exopolissacarídeos podem modificar o meio de cultivo formando, de início, um fluido Newtoniano de baixa viscosidade e finalizando com um fluido não Newtoniano de alta viscosidade (MARGARITIS; PACE, 1985).

Fatores como pH, temperatura, concentração do EPS, massa molecular, solubilidade e características morfológicas dos fungos produtores podem influenciar na viscosidade das soluções de EPS, sendo quanto maior for a viscosidade, maior a lucratividade do produto (BARBOSA et al, 2004). Entre os polissacarídeos microbianos já utilizados comercialmente estão a xantana, a dextrana, o alginato, a

gelana, produzidos por bactérias e o escleroglucana e a pulana, produzidos por fungos (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

A partir de 1944 foram iniciadas experiências de aplicação de exopolissacarídeos como polímeros bioativos. Nelas a dextrana foi utilizada como substituinte de plasma sanguíneo com a finalidade de manter o volume de sangue circulante bem como a pressão osmótica em casos de perda maciça de sangue (SHINGEL, 2004).

Os exopolissacarídeos (EPS) possuem uma estrutura altamente diversificada, fator que possibilita extensa variação em suas propriedades físicas e composições químicas (SUTHERLAND, 1998). EPS microbianos têm sido utilizados como produtos biotecnológicos por apresentarem diversas vantagens devido às suas propriedades químicas e físicas únicas, muitas vezes superando às dos polissacarídeos produzidos por vegetais e algas marinhas. Contudo seu custo de produção ainda é relativamente alto quando comparado aos tradicionais, devido ao baixo rendimento da produção dos micro-organismos conhecidos, conseqüentemente, sua exploração comercial ainda é muito baixa (SELBMANN et al, 2002).

Os micro-organismos com maior capacidade de produção de exopolissacarídeos possuem grande potencial para comercialização, considerando a habilidade desses polissacarídeos se difundirem dentro da fase líquida durante o processo de fermentação tornando mais simples a recuperação dos exopolissacarídeos do meio de fermentação (MARGARITIS; PACE, 1985).

Os exopolissacarídeos podem ser extraídos do caldo fermentativo através de centrifugação, filtração e uso de agentes precipitantes. A centrifugação sedimenta as células, separando-as do EPS presente no meio extracelular. Após a adição de agentes precipitantes utiliza-se novamente a centrifugação que irá auxiliar na sedimentação do EPS. O etanol é o agente precipitante mais utilizado.

Segundo Pereira (2009) as pesquisas relacionadas ao uso medicinal de exopolissacarídeos têm se concentrado em aplicá-los como agentes

anticancerígenos, no tratamento da artrite reumatoide, na síntese de antígenos para produção de anticorpos e na proteção contra danos oxidativos ao DNA.

5 Polissacarídeos estruturais de parede celular (PEPC)

A parede celular de leveduras e outros fungos é uma estrutura rígida que tem como função a proteção da célula, determinando o formato celular e mantendo a integridade do organismo. Sua composição é variada e apresenta estrutura química específica em cada espécie (TRABUSI; ALTERTHUM, 2008).

A conformação da parede celular apresenta um processo dinâmico podendo ser alterado para adaptar-se às alterações da fisiologia celular, como as que ocorrem em fases de divisão celular, e em mudanças morfológicas responsáveis pela esporulação, conjugação ou formação de pseudo-hifas. A parede celular fúngica pode sofrer alterações também devido a fatores externos, mecanismos compensatórios da parede celular, por exemplo, podem ser ativados em resposta a agentes perturbadores da parede celular, permitindo remodelação da parede para a lise celular de combate (KLIS et al., 2002). Essa estrutura celular pode possuir até oito camadas, chegando a medir de 200 a 350 nm, compostas geralmente por glucanas, mananas, quitina, proteínas e lipídeos. Na parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estes componentes encontram-se organizados por duas camadas principais: a camada mais externa, composta por moléculas de manana ligadas a proteínas e a mais interna, composta por moléculas de glucana entrelaçadas por fibrilas de quitina, formando uma estrutura interconectada por ligações covalentes (KLIS et al., 2002).

As glucanas que compõem a parede celular são normalmente formadas por polímeros de D-glicose, ligadas por pontes β -glicosídicas (TRABUSI; ALTERTHUM, 2008). As glucanas fúngicas servem como arcabouço na formação da parede celular de leveduras.

As glucanas de parede celular podem ser classificadas em dois subtipos determinados pelo tipo de ligação glicosídica de suas moléculas: os de cadeias longas com unidades 1,3-glicose que representa em torno de 85% do total da

parede celular, e os de cadeias curtas com unidades 1,6-glicose representando cerca de 15% do total da parede celular (KLIS et al., 2002).

Os polissacarídeos fúngicos são constituídos, em sua maioria, por (1→3)-β-D-glucanas ou (1→6)-β-D-glucanas (ZHANG et al, 2002). Suas propriedades dependem diretamente de suas características físicas, químicas e estruturais de cada biopolímero, como sua configuração anomérica (α ou β), conformação molecular (linear, ramificada, helicoidal, agregação entre cadeias), massa molecular, tipos e grau de substituição dos monômeros, presença de grupamentos, entre outros. Sendo assim, a caracterização química dos polímeros estudados se torna imprescindível para o direcionamento de sua aplicação nas indústrias (BARBOSA et al, 2004).

A atividade biológica dos polissacarídeos depende diretamente de sua estrutura química e de cada conformação espacial de suas moléculas e pequenas alterações moleculares são responsáveis por características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (COLLEONI-SIRGHIE et al, 2003). Características como tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação e composição monossacarídicas são responsáveis pelas suas propriedades físicas e fisiológicas (BURJACK, 2010). As variações no grau de suas ramificações podem afetar diretamente a solubilidade das moléculas dos polissacarídeos e, conseqüentemente, alterar sua atividade biológica (SUTHERLAND, 1998).

A aplicação terapêutica desses biopolímeros depende de sua estrutura química e da conformidade espacial de cada macromolécula, por isso, torna-se fundamental a realização de estudos que tenham como objetivo a caracterização da estrutura química desses compostos (BARBOSA et al, 2004; SERRATO, 2008).

6. Dor e nocicepção

A dor é um dispositivo de defesa evolutivo que alerta o organismo para estímulos nocivos capazes de lhe causar danos (WOOLF; SALTER, 2000). Ela pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tissular real ou potencial ou descrita em termos de tal dano (IASP, 1994). A nocicepção, por sua vez, é o componente fisiológico da dor, que ocorre através de

processos de transdução, transmissão e modulação do estímulo nociceptivo (KLAUMANN et al, 2008).

A sinalização da dor é desencadeada por mediadores químicos como aminoácidos excitatórios, peptídeos, lipídeos e citocinas, que causam a ativação das fibras nociceptivas aferentes primárias A e C (SCHOLZ; WOOLF, 2002). Nestas fibras, o estímulo é convertido em potenciais de ação, que são projetados da periferia para o corno dorsal da medula espinal, estabelecendo conexões sinápticas com neurônios de segunda ordem (neurônios espinais). Na medula espinal, o impulso ascende para o tronco encefálico e tálamo que, em seguida, transmitem a informação nociva para o córtex, local onde esta é processada, e para sistema límbico, que integra os aspectos emocionais e afetivos à experiência dolorosa (KLAUMANN et al, 2008).

Os aspectos emocionais gerados pela experiência dolorosa não são detectáveis em animais, já que os mesmos não conseguem verbalizar suas sensações e emoções. Com isso, surgiu a necessidade de substituir os termos dor e analgesia pelos termos nocicepção e antinocicepção ao utilizar modelos experimentais de dor em animais (MILANO, 2008).

Na busca para encontrar novos fármacos com atividade antinociceptiva e poucos efeitos colaterais, estudos vêm sendo realizados com bioprodutos como agentes anti-inflamatórios nas várias fases de inflamação (PATHER et al, 2011). Os micro-organismos apresentam um potencial biotecnológico para saúde humana e animal já reconhecido mundialmente, mas poucos foram devidamente investigados. Sendo assim, pesquisas realizadas com micro-organismos ainda não estudados podem ter grande importância para o desenvolvimento de novas drogas antinociceptivas.

Referências:

ASHTAPURE, A.A.; SHAH, A.K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Shingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, V.61, n.3, p.1159-1162, 1995.

BARBOSA, A. M.; Cunha, P. D. T.; Pigatto, M. M.; Corradi da Silva, M. L. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, jan./jun 2004, p. 29-42.

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

BRITO, R. G. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citrônolol em roedores**. Dissertação. Aracaju, 2013. Universidade Federal de Sergipe.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Glucans Minireview and Mammalian Immunity. **Immunity**, V. 19, September, 2003, p.311–315,.

BURJACK, J.R. **Produção de exopolissacarídeos e polissacarídeos de parede celular de leveduras negras de interesse clínico**. Curitiba, 2010. Dissertação. Universidade Federal do Paraná.

COLLEONI-SIRGHIE, M.; FULTON, D.B.; WHITE, P.J. Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- β -Dglucans from high- β -glucan and traditional oat lines. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, 2003, p. 237-249.

ENGSTAD, C. S., ENGSTAD, R. E., OLSEN, J., ØSTERUD, J. “The effect of soluble β -1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood,” **International Immunopharmacology**, V. 2, nº. 11, 2002, p. 1585–1597.

GLAZER, A.; NIKAIIDO, H.; **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**, W.H. Freeman, New York, 1995, p. 50.

HE,Y.; YE,M.; DU, Z.; WANG, H.; WU, Y. ; YANG, L. Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM405. Y. **Carbohydrate Polymers**, V.105, 2014. p. 169–176.

IASP. Classification of chronic pain: **descriptors of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. 2. ed. Seattle: IASP Press, 1994.

INGRAHAM, J. L., INGRAHAM, C. A. **Introdução à microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de casos**. 3^a Ed. Cengage Learning. 2011. 776p.

KANG, K. S.; COTTRELL, I. W. Polysaccharides, In: **Microbial Technology**, Peppler, H. J.; Perlman, D., eds.; Academic Press: New York, 1979, p. 417-481.

KAPTEYN, J. C.; RAM, A. F.; GROOS, E. M.; KOLLAR, R.; MONTIJN, R. C.; VAN DEN ENDE, H.; LLOBELL, A. A.; CABIB, E.; KLIS, F. M. Altered extent of cross-linking of β 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3 glucan content. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 20, 1997, p. 6279-6284.

KAWAI, L. A.; PINOTTI, M. H.; P. C. CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de exopolissacarídeos pela cianobactéria *Nostoc sp* em diferentes concentrações de nitrogênio e glicose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 27, n. 1, jan./jun. 2006, p. 33 – 39.

KIM, S. Y.; SONG, H. J.; LEE, Y. Y.; CHO, K.-H.; ROH, Y. K. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. **Journal Korean of Medical Science**, Seoul, v. 21, n. 10, 2006. p. 781-789.

KLAUMANN, P. R. 1 ; WOUK, A. F. P. F. 2 ; SILLAS, T. 1 Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, 2008, p. 1-12.

KLIS, F., MOL, P., HELLINGWERF, K. ; BRUL, S. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, V. 26, 2002, p.239–256.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 434.

KRIZKOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidant and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 497, n. 1-2, 2001, p. 213-222.

MAGNANI, M., CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, jul./set. 2008, p. 631-650.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. A.; BJORNDAL, H.; LINDBERG, B. The structure of a β (1-6)- D- glucan from yeast cell walls. **Biochemistry Journal**, Washington, v.135, n. 1, 1973, p.31-36.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. **Comprehensive Biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**; Blanch, H. W.; Drew, S.; Wang, D. I. C., eds.; Pergamon Press: New York, 1985, p. 1005.

MILANO, J. **Avaliação do Potencial Antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1hpirazol metil ésteres Inéditos em Camundongos.** Santa Maria, 2008. Tese. Universidade Federal de Santa Maria.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3rd ed., Worth Publishers: New York, 2000, cap. 9.

NICHOLAS, J. C.; SHAUN, R. M. C. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 8, 2001, p. 5176-5182.

NONO, I.; OHNO, N.; MASUDA, A.; OIKAWA, S.; YADOMAE, T. Oxidative degradation of an antitumor (1-3)- β -D-glucan, grifolan. **Journal of Pharmacobio-dynamics**, Tokyo, v. 14, n. 1, 1991, p. 9-19.

PATHER, N; VILJOENB, A. M.; KRAMER, B. A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**. 2011. V.133, p.364–70.

PELCZAR, M. J.; REID, R. D.; CHAN, Eddie C. S. **Microbiologia : conceitos e aplicações**. 2. Ed. Sao Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, S. R. S. **Produção, isolamento e caracterização química do exopolissacarídeo do fungo da podridão branca da madeira *Trametes versicolor***. Aveiro, 2009 Dissertação. Departamento de Química. Universidade de Aveiro.

PRZEMYSŁAW, J. T.; PIOTR, T. Probiotics and Prebiotics. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 80, n. 2, 2003, p. 113-117.

RUAS-MADIEDO, P., HUGENHOLTZ, J. AND ZOON, P. An Overview of the Functionality of Exopolysaccharides Produced By lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, 12, 2002, p. 163-171.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neurosci**, v. 5, 2002, p. 1062-1067.

SELBMANN L, ONOFRI S, FENICE M, FEDERICI F, PETRUCCIOLI M: Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research Microbiology**. 2002, V. 153, p. 585-592.

SERRATO, R. V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por Bactérias diazotróficas endofíticas**. Curitiba, 2008. Tese. Universidade federal do Paraná.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; GIBBS, P. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.12, 1992, p.279-298.

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

SOUZA, D. M. DE; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, out./dez. 2004, p. 331-340.

STEVENSON, G. B. **Biologia dos fungos, bactérias e vírus**, Polígono Edusp, São Paulo, 1974.

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

TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; MIURA, N. N.; YADOMAE, T. Application of Candida solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **Internacional Immunopharmacology**, Amsterdam, v.2, n. 1, 2002, p.59-67.

TONG, H., XIA, F., FENG, K., SUN, G., GAO, X., SUN, L., ET AL. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, V.100, 2009, p. 1682–1686.

TORTORA, G. J.; FUNK, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. P. 894

TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2008, p. 760.

WILLIAMS, D. L. Overview of (1→3)- β -D-glucan Immunobiology. **Mediators of Inflammation**, V. 6, 1997, p. 247-250.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, 2000, p. 1765-1769.

ZHANG, L., ZHANG, M., ZHOU, Q., CHEN, J. AND ZENG, F. Solution properties of antitumor sulfated derivative of alpha-(1→3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, V. 64, 2002, p. 2172-8.

CAPÍTULO 2

Extração, caracterização e avaliação da atividade antinociceptiva de exopolissacarídeos produzidos por *Sporidiobolus ruineniae*

Resumo

Alguns micro-organismos possuem a capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares (EPS) como metabólitos secundários para seu crescimento e desenvolvimento em condições desfavoráveis e para adesão celular a superfícies. Atualmente muitas pesquisas vêm sendo realizadas para a busca de novos exopolissacarídeos, levando a um crescimento na identificação de micro-organismos produtores de EPS. O presente estudo teve por objetivo extrair e elucidar a estrutura química do polissacarídeo extracelular obtido da levedura *Sporidiobolus ruineniae*, micro-organismo isolado da região do semi-árido baiano, bem como avaliar seu efeito antinociceptivo. O EPS de *Sporidiobolus ruineniae* foi submetido à extração alcalina (NaOH 0,1 M). Foi obtida uma fração solúvel em álcali com rendimento de 91% do extrato bruto. A caracterização da estrutura molecular do EPS *Sporidiobolus ruineniae* foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (AsciiPeds PE IR Spectrum 1.60, Spectrum One FT-IR Spectrometer). Essa análise revelou sua composição monossacarídica contendo 60% de glucose e 40% de manose. Para otimização da produção foi utilizada a matriz experimental Doehlert com duas variáveis independentes (tempo e temperatura). O maior rendimento (0,275g) foi obtido utilizando o tempo de 120 min e a temperatura de extração de 70°C. Para a avaliação da atividade antinociceptiva foram realizados três modelos experimentais de indução de nocicepção (teste de contorção abdominal, teste de formalina e teste de imersão de cauda). Os testes evidenciaram que o EPS possui ação antinociceptiva periférica, no entanto, investigações experimentais mais aprofundadas são necessárias para a compreensão dos mecanismos de ação do polissacarídeo, assim com da sua estrutura molecular.

Palavras-chave:

Micro-organismos, exopolissacarídeo, atividade nociceptiva, purificação.

Abstract

Some microorganisms have the ability to produce extracellular polysaccharides (EPS) as secondary metabolites for their growth and development under unfavorable conditions and cell adhesion to surfaces. Currently many researches have been carried out in search of new exopolysaccharides, leading to an increase in the identification of microorganisms producers of EPS. This study aimed to extract and elucidate the chemical structure of the extracellular polysaccharide obtained from the yeast *Sporidiobolus ruineniae*, isolated microorganism of Bahia's semi-arid region, and to assess its analgesic effect. EPS *Sporidiobolus ruineniae* was subjected to alkaline extraction (0,1M NaOH). A soluble fraction in alkali with yield of 91 % of the crude extract was obtained. The characterization of the molecular structure of the EPS *Sporidiobolus ruineniae* was performed using infrared Fourier Transform spectrophotometer (PE AsciiPeds 1.60 IR Spectrum, Spectrum One FT-IR Spectrometer). This analysis revealed a monosaccharide composition containing 60% glucose and 40% of mannose. For the production optimization Doehlert experimental matrix with two independent variables (time and temperature) was used. The highest yield (0,275g) was obtained using time 120 min and extraction temperature 70 ° C. To evaluate the antinociceptive activity, three experimental models of induction of nociception (abdominal writhing test, the formalin test and tail-immersion test) were performed. The tests showed that the EPS has peripheral antinociceptive action, however, more extensive experimental research is needed to understand the mechanisms of action of polysaccharide, as well their molecular structure.

Key words:

Microorganisms, exopolysaccharide, antinociceptive activity, purification.

1 Introdução

Alguns micro-organismos sintetizam polissacarídeos e excretam polímeros solúveis ou insolúveis, para fora de suas células. Exopolissacarídeos (EPS) são carboidratos secretados para o meio extracelular, que podem formar cápsulas ao redor da célula, envolvendo a parede celular, ou podem ser exsudados completamente, difundindo-se no caldo fermentativo durante o processo de fermentação, gerando um aumento significativo na viscosidade do meio (SILVA et al., 2006).

Uma rede de exopolissacarídeos forma, no ambiente natural, um material gelificado que fornece uma via porosa para difusão dos nutrientes e oxigênio para as células individuais (LEHNINGER; NELSON, 2011). As propriedades biológicas de polissacarídeos hidrossolúveis apresentam grande potencial biotecnológico, sendo utilizados por indústrias de diversos setores como emulsificantes, estabilizantes, espessantes e agentes de suspensão (FERREIRA et al, 2009).

Sua estrutura química e a conformação espacial são responsáveis por características peculiares dos polissacarídeos, pelas quais diferentes aplicações biotecnológicas podem ser exploradas (COLLEONI-SIRGHIE et al, 2003). Polissacarídeos extracelulares têm sido utilizados em indústrias alimentícias, têxteis, de tintas, de cosméticos, de papel, e farmacêuticas (KAWAI, et al, 2006).

Os EPS também têm sido alvo de pesquisas devido ao seu potencial imunomodulador, alterando a resposta biológica de seu hospedeiro por ativar o seu sistema imunológico (MENDES et al, 2009). Além disso, seu uso na área médica se mostra eficaz como matriz hidrofílica para a liberação de fármacos (MATRICARDI et al, 2006), para o desenvolvimento de vacinas bacteriana, efeito hiperglicêmico, hipocolesterolêmico, como agente cicatrizante e no controle de tumores (ZHANG et al, 2007).

A seleção de micro-organismos produtores de polissacarídeos, que apresentem propriedades biológicas economicamente interessantes, bem como, estudos da otimização do rendimento e a produtividade da extração para obtenção destes é um desafio constante (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Este artigo descreve os processos de extração, caracterização estrutural e otimização da produção do exopolissacarídeo solúvel em álcali obtido da levedura *Sporidiobolus ruineniae* e a avaliação de sua atividade antinociceptiva utilizando modelos experimentais de dor em camundongos.

2 Materiais e métodos

2.1 Procedência do micro-organismo.

A levedura *Sporidiobolus ruineniae* foi obtida do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, situado na Universidade Estadual de Feira de Santana.

2.2 Plaqueamento

Inicialmente foi realizado um inóculo da levedura *Sporidiobolus ruineniae* em solução salina estéril a 0,85% contendo 1 de absorbância em 540 nm. Em seguida foram feitas diluições seriadas. Três diluições foram selecionadas e 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em triplicatas na superfície de placas de Agar YM. O inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido. As placas foram incubadas em temperatura de 35°C por 48 horas. Foram selecionadas placas com 20 a 250 colônias típicas de *Sporidiobolus ruineniae* para contagem das colônias.

2.3 Condições de cultura de *Sporidiobolus ruineniae*.

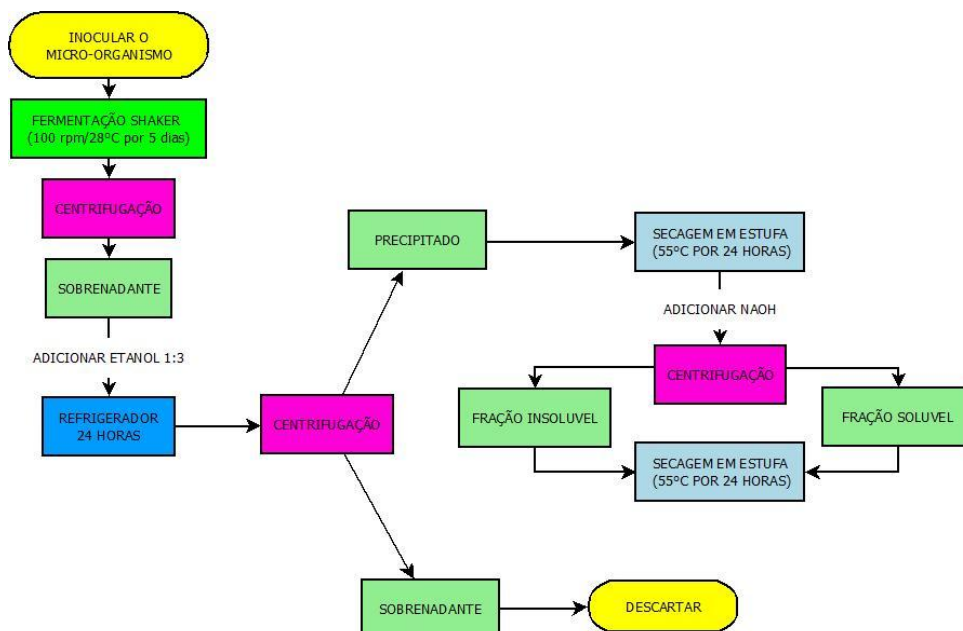
A levedura foi inoculada em placas contendo meio de cultura Agar YM para a reativação do seu metabolismo celular utilizando a técnica de repique contínuo. As placas foram incubadas a 28°C (± 1) por 24 horas e este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas. O cultivo foi realizado em 100 mL do meio líquido YM contendo (g/L): Extrato de levedura, 3,2, Extrato de malte, 3,0, Peptona de carne, 5,0, Glicose, 10,0, K₂HPO₄, 2,0, MgSO₄ 2,7, KH₂PO₄ 13,62. Os inóculos foram padronizados em solução salina estéril a 0,45% contendo em média $3,28 \times 10^{-7}$ UFC/mL de *Sporidiobolus ruineniae*. A incubação foi realizada a 100 rpm por 5 dias em um agitador rotativo à temperatura de 28°C. Após a fermentação, o caldo

fermentativo foi centrifugado (Centrífuga 5804R-Eppendorf, São Paulo, Brasil), em 10000 rpm por 15 min a 4°C, e o sobrenadante, contendo o exopolissacarídeo produzido por *Sporidiobolus ruineniae*, foi utilizado para extrair o biopolímero.

2.4 Extração do exopolissacarídeo obtido de *Sporidiobolus ruineniae*.

O caldo fermentativo (1000mL) foi centrifugado retirando-se o sobrenadante, a este foi adicionado etanol absoluto na proporção 1:3 (sobrenadante/etanol) e levado ao refrigerador por um período de 24 horas, sendo esta mistura centrifugada para separar o precipitado, que foi colocado em estufa a 55°C para secagem até peso constante. Após a secagem, o material foi pesado e transferido para um recipiente e acondicionado em temperatura ambiente. Ao exopolissacarídeo desidratado foram adicionados 10 volumes de NaOH 0,1 M. As extrações foram realizadas em temperatura de 70°C durante o período de 120 min. A suspensão foi centrifugada a 10000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi seco em estufa à temperatura de 55°C até peso constante (figura 1).

Figura 1: Fluxograma de extração do exopolissacarídeo solúvel da levedura *Sporidiobolus ruineniae*.



2.5 Modelo experimental para otimização da produção do EPS *Sporidiobolus ruineniae*.

Para a otimização da produção foram utilizadas três diferentes temperaturas (50°C, 70°C e 90°C) utilizadas para extração do polissacarídeo em diferentes intervalos de tempo (60, 90, 120, 150 e 180 min). Os diferentes níveis de temperatura e tempo de extração foram relacionados segundo o modelo experimental Doehlert para o desenvolvimento de nove ensaios experimentais (contendo cada ensaio 0,3 g do extrato bruto), sendo que três destes foram repetições do ponto central. Para a análise estatística deste trabalho foi utilizado o software statistica[®] version 7.0.

2.6 Identificação estrutural do EPS *Sporidiobolus ruineniae*.

A caracterização estrutural do polissacarídeo estudado foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (AsciiPeds PE IR Spectrum 1.60, Spectrum One FT-IR Spectrometer). O polímero seco foi moído com brometo de potássio (KBr) em pó e prensados em peletes por medição espectral FT-IR na gama de 1500-4000 cm⁻¹. Na análise por espectroscopia de RMN, todos os espectros foram registrados a 300 K em um espectrômetro Varian Inova 500 operando a 11,7 t, observando-¹H a 500 MHz e ¹³C a 125 MHz e usando Sonda de detecção direta de 5 mm. A amostra foi dissolvida em D₂O / DMSO (6: 1) e transferida para um tubo de RMN. Utilizou-se TMS como uma referência de desvio químico (δ 0.0). O D₂O (99,9%) e DMSO (99,9%) utilizados foram de procedência da Cambridge Isotope Laboratories, EUA.

2.7 Composição monossacarídica do EPS *Sporidiobolus ruineniae*.

20 mg do polissacarídeo foi hidrolisado com ácido trifluorácetico (TFA) em 100°C durante 8 h, seguida de evaporação (RUTHES et al, 2013). As amostras líquidas foram analisados em um Sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, equipado com injetor automático VRW HITACHI L-

2200 e detector de índice de refração (RI) VRW HITACHI L-2490 e forno VRW HITACHI L-2300, coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm i.d.) (9µm) (BIO-RAD, California, USA).

O volume de injeção foi de 12 µL e a fase móvel utilizada de forma isocrática constituída por água. O fluxo da fase móvel foi de 0,4 ml/min em temperatura ambiente. Tempo total de corrida de 16 min. Para a identificação do pico, padrões externos de glicose e manose foram utilizados. A determinação da composição monossacarídica foi feita em dois experimentos independentes com resultados consistentes.

2.8 Estudos farmacológicos.

A atividade antinociceptiva do EPS foi avaliada através de modelos experimentais utilizando camundongos Swiss (25-30 g) provenientes do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclos de claro/escuro 12-12 h, com acesso a água e ração *ad libitum*, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos. Os testes comportamentais eram iniciados às 8:00 e finalizados às 17:00 horas. Os procedimentos realizados com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os procedimentos para manejo, acondicionamento e uso dos animais foram realizados de acordo com as recomendações da IASP para o estudo da dor em animais de experimentação (ZIMMERMANN, 1983). A quantidade de animais utilizados nos modelos experimentais e a intensidade dos estímulos a que foram submetidos foram as mínimas necessárias para avaliar de forma consistente a atividade da droga testada.

2.8.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético.

Foram administradas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg do exopolissacarídeo, 10 mg/kg de indometacina (droga de referência) e solução salina (grupo controle) por via intraperitoneal (i.p.). As drogas foram injetadas 30 min antes da administração do ácido acético (0.8% v/v, 10 ml/kg). Os animais foram colocados em câmaras de observação para avaliação do comportamento nociceptivo. A intensidade de

nocicepção foi quantificada pela contagem do número de contorções desenvolvidas pelos camundongos em um período de 0 a 30 min após a administração do ácido acético (COLLIER et al.,1968). A resposta de contorção abdominal consiste em contração do músculo abdominal com o estiramento das patas traseiras.

2.8.2 Teste de formalina.

Para a realização desse experimento foi injetada na pata posterior direita dos camundongos 20 μ L de solução de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído em salina) por via subcutânea. Após a injeção, os animais foram colocados em uma câmara de observação. O comportamento nociceptivo dos animais foi observado até 30 minutos após a injeção. O teste de formalina consiste de 02 fases: A primeira fase (fase neurogênica) que compreende o intervalo de 0 a 5 minutos e a segunda fase (fase inflamatória) que compreende o intervalo de 15 a 30 minutos. A intensidade de nocicepção foi determinada por contagem do tempo em que os camundongos passavam lambendo e/ou mordendo a pata injetada com solução de formalina (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Foram administradas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg do exopolissacarídeo e solução salina (grupo controle) por via intraperitoneal (i.p.) e 5 mg/kg de morfina (droga de referência) por via subcutânea (s.c.) 30 min antes da injeção de formalina.

2.8.3 Teste de imersão da cauda (tail flick).

O teste de imersão da cauda em camundongos foi conduzido segundo Sewell e Spencer (1976) com pequenas alterações em sua metodologia. Os animais foram ambientados em câmaras de contenção durante quatro dias antes da realização desse experimento (20 min por dia). Durante o experimento, os animais foram colocados no sistema de contenção, a ponta da cauda (2 cm) foi imersa num banho de água a $48^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e o tempo para o reflexo de retirada da cauda foi mensurado. Cada camundongo foi testado inicialmente sem a administração de drogas. Os animais que não apresentaram o reflexo de retirada da cauda em 5s foram excluídos dos testes, os demais foram selecionados para compor os grupos experimentais: grupo controle negativo (salina, i.p.), 50, 100 e 200 mg/kg do

exopolissacarídeo e morfina (5 mg/kg, s.c.; droga de referência). A avaliação da nocicepção foi testada em 0,5, 1, 3 e 5 horas após a administração de das drogas. O tempo máximo de permanência da cauda foi 10 s para evitar danos nos tecidos da cauda.

2.8.4 Drogas e diluições.

As drogas foram adquiridas a partir dos laboratórios: Sigma®Chemical Co., St. Louis, MO, EUA (indometacina), Merck® (formaldeído e ácido acético) e Cristália® (morfina). A indometacina foi dissolvida em Tris-HCl 0.1 M pH 8,0 em solução salina fisiológica. Drogas restantes foram dissolvidas em solução salina fisiológica.

2.8.5 Análise estatística dos experimentos com animais.

Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) de 7-6 animais em cada grupo experimental. As comparações entre os grupos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes a $P < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Extração do exopolissacarídeos *Sporidiobolus ruineniae*.

A produção do extrato bruto (fração solúvel e insolúvel) do exopolissacarídeo obtido da levedura *Sporidiobolus ruineniae* foi de 4,66 g em 1000mL. O rendimento obtido na extração da fração álcali solúvel do EPS foi de 0,910g em 1g do extrato bruto em temperatura de 70°C durante 120 min.

Na otimização da extração dos exopolissacarídeos solúveis produzidos pela levedura *Sporidiobolus ruineniae*, os parâmetros tempo de extração de 120 min e temperatura a 60°C foram os que mais influenciaram no sistema, apresentando o rendimento de EPS de 0,274 g em 0,3 g do extrato bruto (tabela 1).

Tabela 1: Matriz experimental Doehlert usada para a otimização da extração do exopolissacarídeo solúvel em álcali obtido de *Sporidiobolus ruineniae*.

ENSAIO	TEMPERATURA(°C)	TEMPO (MIN)	EPS (g)
1	90	90	0,249
2	90	150	0,237
3	70	60	0,247
4C	70	120	0,271
5C	70	120	0,275
6C	70	120	0,273
7	70	180	0,248
8	50	90	0,254
9	50	150	0,250

De acordo com os resultados da análise de variância (tabela 2), o modelo experimental utilizado está adequado, apresentando o valor do coeficiente de determinação R^2 0,96, estando a regressão significativa ($P < 0,05$) com o valor de F de 14,13835 e a falta de ajuste não significativa ($P < 0,05$) com valor de 12,0425.

Tabela 2: ANOVA do modelo de regressão para a otimização de polissacarídeo EPS extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae*.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado	R-sqr
Regressão	0,0014138	5	0,000282767	14,13835	9,01	0,96
Resíduo	0,000056	3	0,00002			
Falta de ajuste	0,0000481	1	0,00004817	12,0425	18,5	
Puro erro	0,000008	2	0,000004			
SQ total	0,001470					

Pelo gráfico tridimensional de superfície de resposta ilustrado (figura 2) pode-se visualizar a área de maior rendimento do EPS no domínio experimental do processo de extração.

Figura 2: Gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito do tempo e temperatura na otimização da extração do EPS solúvel.

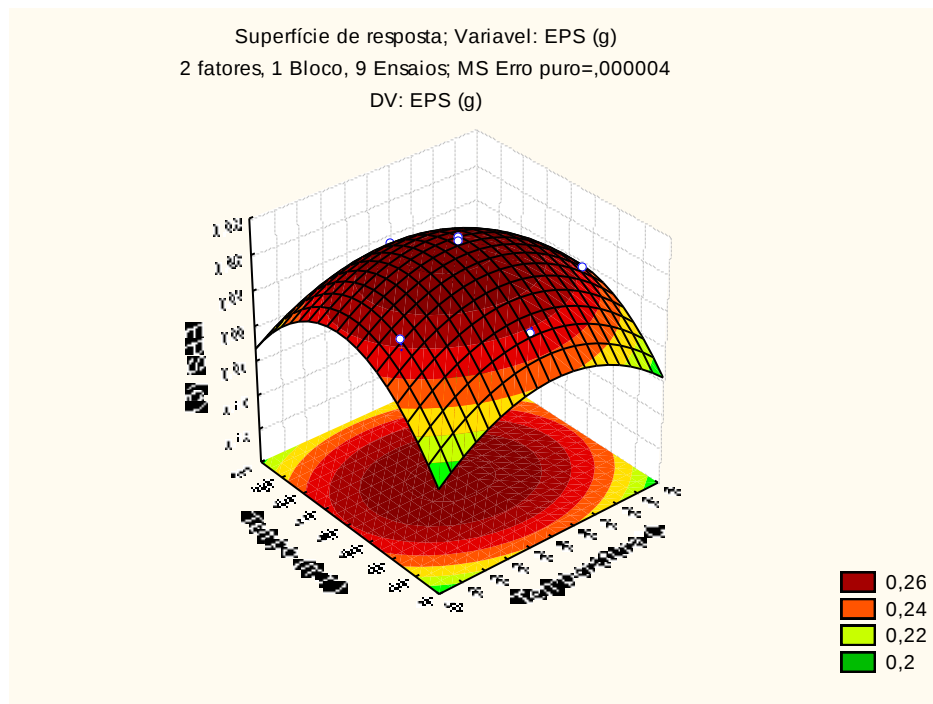
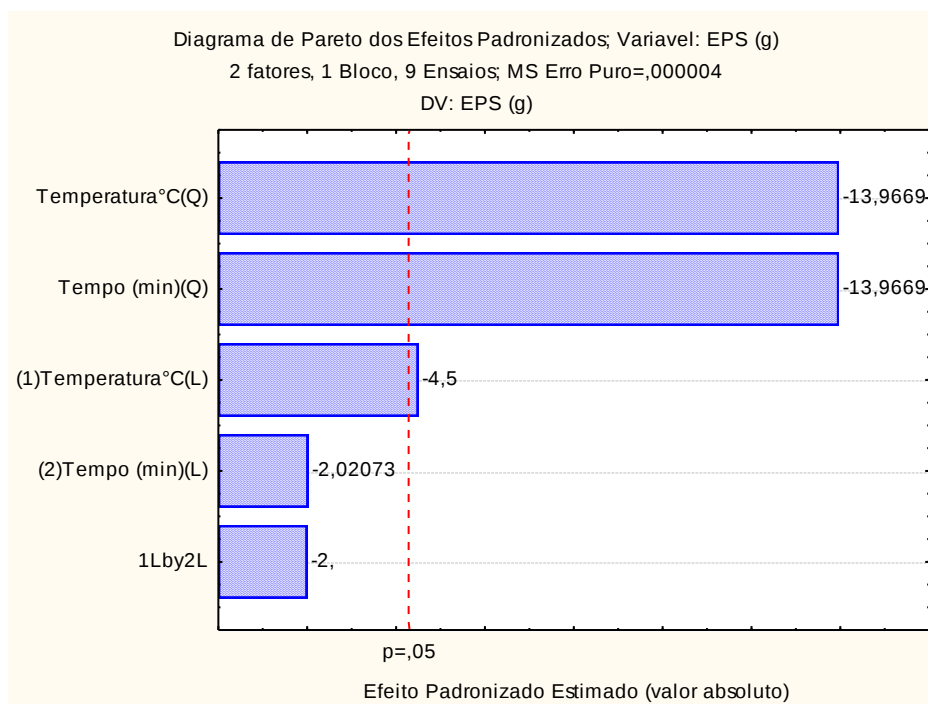


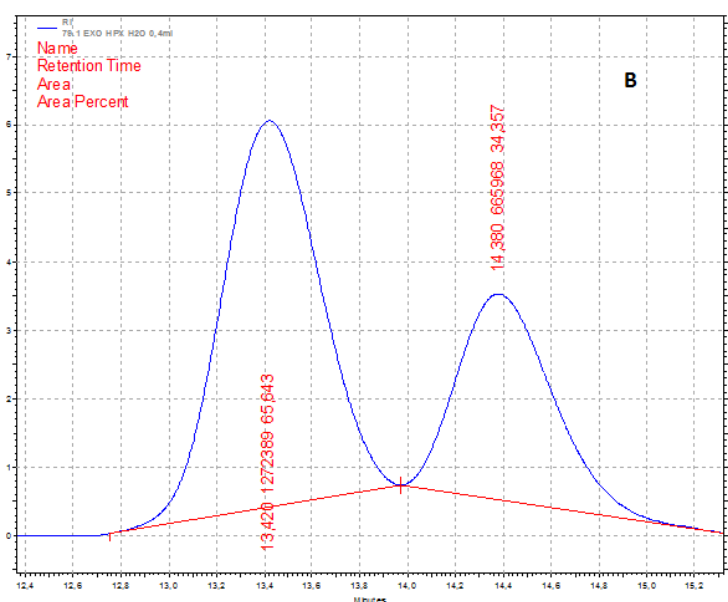
Figura 3: Diagrama de Pareto relativo aos efeitos do nível do tempo e temperatura na otimização da extração do EPS solúvel.



3.2 Caracterização do exopolissacarídeo por análise espectroscópica

A análise espectrofotométrica para a identificação da composição monossacarídica por HPLC do exopolissacarídeo produzido por *S. ruineniae* revelou a presença de açúcares neutros na proporção de 3: 2 para unidades de glicose e manose - EPS (figura 4). Os espectros de RMN (dados não mostrados) apresentaram baixa resolução e estudos posteriores serão realizados para completar a caracterização estrutural.

Figura 4: HPLC-RI cromatograma da composição de monossacarídeos de EPS produzidos por *S.ruineniae*.



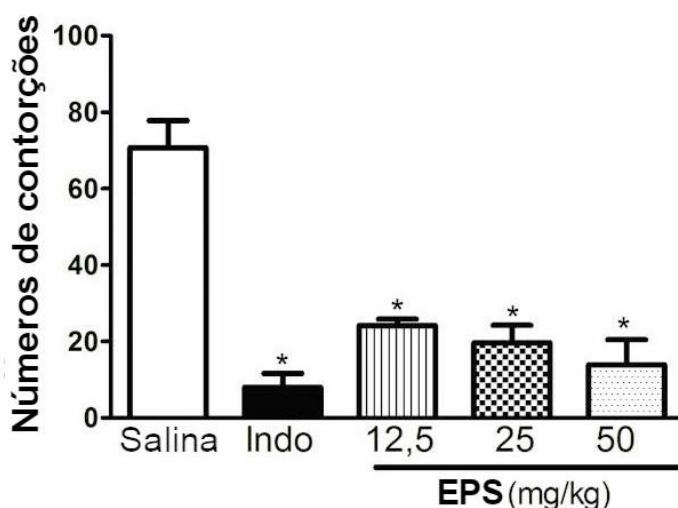
3.3 Estudos farmacológicos.

3.3.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético.

A atividade antinociceptiva do exopolissacarídeo produzido por *Sporidiobolus ruineniae* foi avaliada inicialmente, utilizando-se o modelo experimental de indução de contorções abdominais por injeção peritoneal de ácido acético (0,8% v/v, 10 ml/kg). O exopolissacarídeo, quando administrado nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg por via intraperitoneal, obteve uma inibição significativa do comportamento nociceptivo dos animais tratados em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). A indometacina (10 mg/kg), controle positivo administrado por via intraperitoneal

também produziu uma significativa inibição das contorções abdominais ($p < 0,05$) (figura 5).

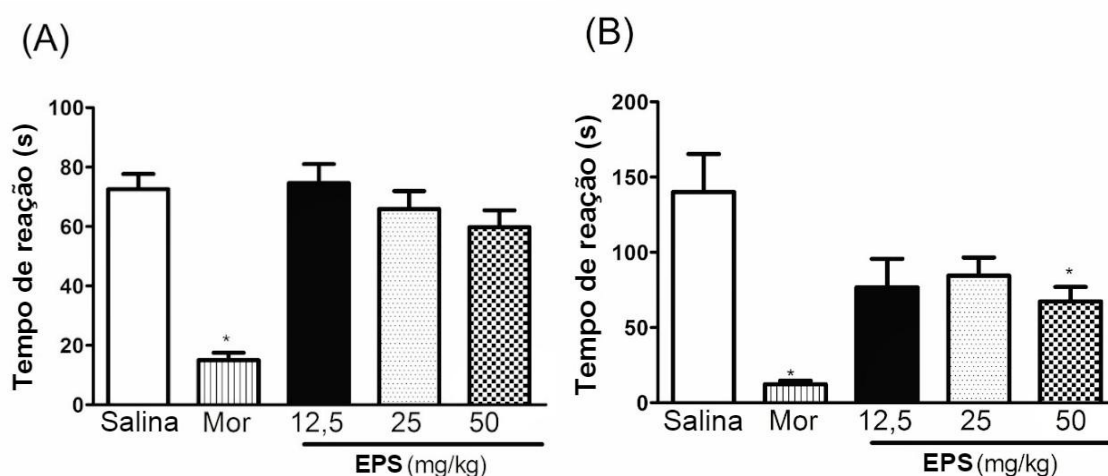
Figura 5: Avaliação da atividade antinociceptiva do EPS *Sporidiobolus ruineniae* no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O controle negativo (Salina), o EPS (12,5; 25 e 50 mg/kg) e indometacina (10mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) 30 antes do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A atividade antinociceptiva do EPS foi avaliada pela redução do número de contorções abdominais do animal quando comparado com o controle negativo. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n= 6 para cada grupo). *significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), determinado pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.



3.3.2 Teste de formalina.

O exopolissacarídeo (EPS *Sporidiobolus ruineniae*), administrado nas doses 12,5, 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.), não apresentou inibição da fase inicial (0-5 min) no comportamento nociceptivo dos animais observados, quando comparado ao controle negativo. Entretanto, a dose de 50 mg/kg do exopolissacarídeo (EPS *Sporidiobolus ruineniae*) foi capaz de inibir a fase inflamatória ou final (15-30min) do teste de formalina ($P < 0,05$). A morfina (5 mg / kg) foi utilizada como controle positivo ($P < 0,05$) (figura 6).

Figura 6: Avaliação da atividade antinociceptiva do EPS *Sporidiobolus ruineniae* no teste de formalina. O controle negativo (Salina), o EPS (12,5; 25 e 50 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) e a morfina (5mg/kg) por via subcutânea (s.c.). A figura representa a fase neurogênica (A) e a fase inflamatória (B). A atividade antinociceptiva do EPS foi avaliada pela redução do tempo de reação da pata injetada com a formalina quando comparado com o controle negativo. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n= 6 para cada grupo). *significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), determinado pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.



3.3.3 Teste de imersão da cauda (Tail flick).

O Exopolissacarídeo obtido de *Sporidiobolus ruineniae* foi administrado em doses de 50, 100 e 200 mg/kg para a avaliação da atividade antinociceptiva central. O tratamento com o EPS nas doses testadas não alterou o tempo de reação de retirada da cauda em relação ao controle negativo. A morfina, fármaco de referência, foi administrada na dose de 5mg/Kg, por via subcutânea (s.c.), 30 min antes do teste, a eficácia antinociceptiva desta droga foi comprovada por ocasionar um aumento significativo da resposta de retirada da cauda até 1 h após a administração (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da atividade antinociceptiva do EPS *Sporidiobolus ruineniae* no teste de imersão de cauda. O controle negativo (Salina), o EPS (50; 100 e 200 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) e a morfina (5mg/kg) por via subcutânea (s.c.) 30 antes do teste de imersão de cauda. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM de 6 animais para cada grupo, comparado ao grupo controle (salina). *significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), determinado pelo teste de ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni

	Dados	Basal	30 min	1h	3h	5h
CONTROLE NEGATIVO	Média	1,09	1,33	1,84	1,44	1,51
	E.P.M.	0,21	0,23	0,39	0,33	0,16
EPS 50 mg/kg	Média	1,69	1,88	2,27	1,92	2,07
	E.P.M.	0,42	0,32	0,31	0,27	0,47
EPS 100 mg/kg	Média	1,42	1,67	1,76	1,74	1,70
	E.P.M.	0,33	0,35	0,28	0,36	0,32
EPS 200 mg/kg	Média	1,88	2,09	1,75	1,98	2,06
	E.P.M.	0,28	0,37	0,27	0,35	0,44
MORFINA 5 mg/kg	Média	1,51	8,79*	7,76*	4,78	3,05
	E.P.M.	0,24	0,52	0,55	0,50	0,23

4 Discussão:

Nesse estudo, utilizou-se a levedura *Sporidiobolus ruineniae*, micro-organismo isolado da região do semiárido baiano, para a obtenção de polissacarídeo extracelular, caracterização estrutural e avaliação de seu potencial antinociceptivo.

O polissacarídeo foi separado em duas frações segundo sua solubilidade em álcali; uma insolúvel e outra solúvel. Pelo fato da fração álcali insolúvel ser de difícil administração medicamentosa, e a possibilidade de poder causar reações adversas, como formação de granulomas, microembulizações, inflamação, dor, entre outras (SANDULÁ et al., 1999) esta fração não foi utilizada nos testes biológicos, sendo utilizada para o prosseguimento do estudo a fração álcali solúvel, devido às vantagens que apresenta em administração medicamentosa e facilidade de absorção (BOHN; BEMILLE, 1995).

No processo de extração do polissacarídeo extracelular solúvel em álcali os resultados demonstraram que o tempo e a temperatura utilizados na extração do polissacarídeo exerceram igual influência (figura 3), sendo que o maior rendimento, 0,275g, ocorreu no intervalo de tempo de 120 min na temperatura de 70°C (tabela 1).

Os cálculos estatísticos foram realizados através da análise de variância (ANOVA). De acordo com esta análise, não foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos com relação à produção do EPS (tabela 2).

A caracterização molecular do exopolissacarídeo revelou que o EPS de *Sporidiobolus ruineniae* é um heteropolissacarídeo composto por unidades de glucose (60%) e de manose (40%) (figura 4). Pereira (2009) verificou em seu trabalho, que o EPS solúvel produzido por *Trametes versicolor* apresentou em sua composição monossacarídica 52% de glicose, 19% de manose, 15% galactose e os monossacarídeos fucose, xilose e ramnose, que somados compunham 14% do total do biopolímero.

A percepção dolorosa é um processo frequentemente desencadeado por um estímulo nocivo, que ao gerar sofrimento provoca reações de alteração do comportamento (KLAUMANN et al., 2008). A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada através da observação do comportamento nociceptivo de camundongos submetidos a três modelos experimentais de dor: Teste de contorção abdominal, Teste de formalina e Teste de imersão da cauda.

O teste de contorção abdominal induzida pela injeção do ácido acético na cavidade peritoneal é um modelo inespecífico por detectar drogas, tanto de ação central quanto de ação periférica. Este modelo é muito utilizado em triagens iniciais para avaliar a ação antinociceptiva de novas drogas. A resposta ao estímulo doloroso se dá através de contorções da região abdominal seguidas de rotação do tronco e extensão dos membros posteriores (COLLIER et al, 1968). Os resultados indicam que o EPS *Sporidiobolus ruineniae* possui uma significativa ação antinociceptiva em todas as doses testadas (12,5, 25 e 50 mg/kg).

O teste de formalina é um modelo experimental utilizado para avaliar a efetividade de agentes antinociceptivos através de lesão tecidual provocada pela injeção de formalina diluída na pata traseira de camundongos ou ratos (HUNSKAAR; HOLE, 1987; DUIBUISSON; DENNIS, 1997). Este modelo é composto por duas fases. A primeira fase (fase neurogênica) tem início imediatamente após a injeção de formalina, se estendendo por cinco minutos e esta fase está relacionada à estimulação direta de nociceptores. A segunda fase (fase inflamatória) ocorre entre quinze e trinta minutos após a injeção e está associada à liberação de mediadores pró-inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987). As doses testadas do EPS não foram capazes de inibir o comportamento nociceptivo da fase neurogênica, mas a dose de 50 mg/kg do EPS *Sporidiobolus ruineniae* apresentou inibição significativa na fase inflamatória, confirmando a ação antinociceptiva do EPS estudado.

O teste de imersão da cauda (Tail flick) consiste introdução da porção apical da cauda de camundongos ou ratos em água com temperatura acima de 40°C como estímulo nociceptivo, provocando movimento de retirada da cauda (OLIVEIRA et al, 2009). O aumento do tempo de retirada é considerado um parâmetro para avaliar a ação antinociceptiva central (FISCHER et al, 2008). O tratamento com EPS *Sporidiobolus ruineniae* não provocou aumento do tempo de reação reflexa de retirada da cauda, quando comparada ao grupo controle, demonstrando que este polissacarídeo não apresenta ação antinociceptiva central.

O uso de ensaios experimentais para avaliar a eficácia e segurança de um novo fármaco é de fundamental importância. Os modelos experimentais de nocicepção realizados neste trabalho representam o início de estudos necessários para avaliar a ação de substâncias com potencial farmacológico. Os resultados obtidos indicaram que o exopolissacarídeo extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae* possui ação antinociceptiva periférica. Esta ação ocorre, provavelmente, pela inibição de mediadores inflamatórios. Entretanto, são necessários mais estudos para determinação de sua estrutura química e da elucidação das vias de efeito antinociceptivo envolvidas.

Referências:

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

COLLEONI-SIRGHIE, M.; FULTON, D.B.; WHITE, P.J. Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- β -Dglucans from high- β -glucan and traditional oat lines. **Carbohydrate Polymers**, V. 54, n. 2, 2003, p. 237-249.

COLLIER, H.O.J.; L.C. DINNEEN; C.A. JOHNSON; C. SCHNEIDER. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, V. 32(2), 1968, p. 295-310.

DUBUISSON, D. & S.G. DENNIS. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, V. 4, 1977, p. 161-174.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. da; SILVA, F. de C. da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova** [online]., V. 32, n.3, 2009, p. 623-638.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F. DELLE MONACHE, G.; CECHINEL FILHO, G.; SOUZA, M. M.. Further Antinociceptive Properties of Extracts and Phenolic Compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) Leaves. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. V. 31(2), 2008, p. 235—239.

HUNSKAAR, S., & HOLE, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, V. 30, 1987. p. 103–114.

KAWAI, L. A.; PINOTTI, M. H.; P. C. CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de exopolissacarídeos pela cianobactéria *Nostoc sp* em diferentes concentrações de nitrogênio e glicose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 27, n. 1, jan./jun. 2006, p. 33 – 39.

KLAUMANN, P. R. 1; WOUK, A. F. P. F. 2 ; SILLAS, T. 1 Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, 2008, p. 1-12.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

MATRICARDI, P.; ONORATI, I.; COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F. Drug delivery matrices based on scleroglucan/alginate/borax gels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 316, 2006, p. 21–28.

MENDES, S.F.; SANTOS JR, O.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOSA, A.F.D.; ARANDA-SELVERIOA, G.; MONTEIRO, N.K.; DEKKERC, R.F.H.; PEREIRA, M.S.;

TOVARD, A.M.F.; MOURÃO, P.A.S.; SILVAM, .L.C. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 45, 2009, p. 305-309.

OLIVEIRA,.R. R. O.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, R. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, V. 19(3), Jul./Set. 2009, p. 672-676,

PEREIRA, S. R. S. **Produção, isolamento e caracterização química do exopolissacarídeo do fungo da podridão branca da madeira *Trametes versicolor***. Dissertação. Aveiro, 2009. Departamento de Química. Universidade de Aveiro.

RUTHES, A. C.; RATTMANNA,Y. D.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; CARBONERO, E.R.; CÓRDOVA, M.M.; BAGGIO,C.H. **Agaricus bisporus fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches**. *Carbohydrate Polymers*, V. 92, 2013, p. 184–191.

SANDULÁ, J.; KOGAN, G.; KACURAKOVÁ, M.; MACHOVÁ, E. Microbial (1 → 3)-b-d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, V.38, 1999, p. 247.

SEWELL, R. D. E.; SPENCER, P.S.J. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. **Neuropharmacology**, V. 15, 1976, p.683-688.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006, p. 85-92.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n. 4, out./dez. 2004, p. 331-340.

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

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, 1983, p.109-110.

CAPÍTULO 3

**Extração, caracterização e avaliação antinociceptiva de
polissacarídeo estrutural de parede celular obtidos de
*Sporidiobolus ruineniae***

Resumo

A dor é uma experiência sensorial e emocional associada a uma lesão real ou potencial, que age como um sistema de alerta protetor do organismo, a fim de evitar grande injúria ou dano tecidual. A nocicepção, por sua vez, representa o componente fisiológico da dor, sendo ocasionada pela ativação dos nociceptores através de estímulos variados. As drogas analgésicas disponíveis no mercado podem desenvolver reações adversas aos seus consumidores. Assim, o desenvolvimento de substâncias naturais que possam tratar de forma eficaz os estados dolorosos tem sido um importante desafio. Estudos desenvolvidos com polissacarídeos estruturais de parede celular de leveduras têm demonstrado que estes biopolímeros apresentam diversas atividades biológicas vinculadas à estrutura química de suas moléculas. Neste trabalho foram estudadas a extração, caracterização estrutural e a avaliação da atividade antinociceptiva do polissacarídeo estrutural de parede celular (PEPC) extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae*, uma levedura isolada da região do semi-árido baiano. Os procedimentos de extração do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* possibilitaram a obtenção de sua fração solúvel com o rendimento de 20,75% do total do extrato bruto. A estrutura molecular do *Sporidiobolus ruineniae* foi caracterizada por espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (AsciiPeds PE IR Spectrum 1.60, Spectrum One FT-IR Spectrometer). Essa análise revelou sua composição monossacarídica contendo 80% de unidades glucose e 20% de manose. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear revelou sinal característico de β -glucana (δ C 104,4), também foram observados sinais δ 169,8 e δ 52,8, que foram atribuídos a carbonos C-6 e metil das unidades esterificadas do ácido galacturônico (GalUA), respectivamente. Para otimização da produção foi utilizada a matriz experimental Doehlert com duas variáveis independentes (concentração de NaOH e temperatura). A extração com concentração de hidróxido de sódio a 5% e temperatura a 60 °C obteve rendimento de 0,1125g, sendo este o maior obtido nos ensaios realizados. A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada através da realização de três modelos experimentais de nocicepção (teste de contorção abdominal, teste de formalina e teste de imersão de cauda). Os testes evidenciaram que o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* possui ação antinociceptiva periférica.

Palavras-chave:

Micro-organismos, polissacarídeo, atividade farmacológica.

Abstract

Pain is a sensory and emotional experience associated with actual or potential injury, which acts as a warning system protector of the organism in order to avoid major injury or tissue damage. Nociception represents the physiological component of pain, being caused by activation of nociceptors by various stimuli. The analgesic drugs available in the market may develop adverse reactions to their consumers. Thus, the development of natural substances that can effectively treat the painful states has been a major challenge. Studies developed with structural polysaccharides of yeast cell wall have shown that these biopolymers have various biological activities related to the chemical structure of its molecules. This paper studied the extraction, structural characterization and evaluation of antinociceptive activity of the cell wall structural polysaccharide (PEPC) extracted from *Sporidiobolus ruineniae* yeast, an isolated yeast of Bahia's semi-arid region. Extraction procedures of PEPC *Sporidiobolus ruineniae* allowed obtaining their soluble fraction with the yield of 20.75% of the total crude extract. The molecular structure of *Sporidiobolus ruineniae* was characterized by IR Fourier Transform spectrophotometer (PE AsciiPeds 1.60 IR Spectrum, Spectrum One FT-IR Spectrometer). This analysis revealed a monosaccharide composition containing 80% glucose units and 20% mannose. The nuclear magnetic resonance spectroscopy revealed a characteristic sign of β -glucan (δ C 104.4) and signs δ 169.8 and δ 52.8, which were attributed to carbon C-6 and to the methyl esterified galacturonic acid units (GalUa), respectively. For the production optimization, Doehlert experimental matrix with two independent variables (NaOH concentration and temperature) was used. The extraction with sodium hydroxide concentration of 5% and temperature of 60 ° C obtained 0,1125g yield, this being the maximum obtained in the tests. The evaluation of the antinociceptive activity was achieved by the conduction of three experimental models of nociception (abdominal writhing test, the formalin test and tail-immersion test). The tests showed that the PEPC *Sporidiobolus ruineniae* has peripheral antinociceptive action.

Key words:

Microorganisms, polysaccharide, antinociceptive activity.

1 Introdução

Segundo a Associação Para o Estudo da Dor (IASP, 1994), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial ou emocional desagradável vinculada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. A dor ocorre, geralmente, em resposta a estímulo nocivo ou potencialmente nocivo, sendo uma experiência complexa por possuir componentes cognitivos, motivacionais e afetivos, que podem alterar respostas e comportamentos (TAMBELI, 2014). O componente fisiológico da dor é denominado de nocicepção, este compreende os processos de transdução, transmissão e modulação de estímulos que ativam receptores sensoriais especializados, os nociceptores (KLAUMANN et al, 2008; FEIN, 2014). O organismo, ao sofrer um dano tecidual, desenvolve primeiramente uma defesa que envolve etapas integradas e constituídas por diferentes componentes do sistema imunológico (CRUVINEL et al, 2010).

Polissacarídeos são biopolímeros amplamente encontrados em vegetais, fungos, bactérias, algas e animais (MELO, 2010). Nos últimos anos, os polissacarídeos isolados de micro-organismos têm atraído muita atenção por exercerem papel importante na comunicação entre células, na adesão celular e no reconhecimento molecular do micro-organismo pelo sistema imunológico do hospedeiro (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Moléculas que compõem a superfície de micro-organismos, como glucanas, lipopolissacarídeos, resíduos de manose, entre outros, constituem os chamados Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs). Estas moléculas ativam a resposta imune por interagirem com Receptores de Reconhecimento Padrão (RRP) presentes em células específicas do hospedeiro (CRUVINEL et al, 2010).

A parede celular dos micro-organismos é uma estrutura altamente complexa composta basicamente por quitina, glucanas e/ou mananas (FUKUDA et al, 2009). Trata-se de uma organela que recobre a superfície celular sendo responsável pela proteção, manutenção da morfologia da célula e a modulação da adesão celular ao substrato. A composição e estrutura da parede celular das leveduras podem variar com a espécie e condições de cultura e tais mudanças podem influenciar em suas funções fisiológicas (KIM; YUN, 2005; VOLMAN et al, 2008). Os biopolímeros

estruturais da parede celular de leveduras têm sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores da indústria (BARBOSA et al, 2004).

A parede celular de muitas leveduras pode ser constituída por heteropolissacarídeos, polímeros responsáveis pela manutenção da rigidez e integridade da parede celular. (SEVIOUR et al, 1992; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Estes biopolímeros são constituídos por β -glucanas intrincadas com resíduos de manose, glucose, galactose e/ou ramnose, unidas por ligações glicosídicas que se diferenciam pelo grau de ramificações, tipos de ligações, conformação espacial e peso molecular de suas cadeias, podendo apresentar assim, diferentes composições e funções (TONG et al, 2009).

A glucomanana é um heteropolissacarídeo composto por unidades de glucose e manose. Estudos recentes têm revelado propriedades farmacológicas deste biopolímero, sendo associado a uma série de aplicações na saúde devido a sua atividade imunomoduladora (TESTER; AL-GHAZZEWI, 2013).

Conhecendo-se a necessidade de se obterem novos produtos naturais com potencial atividade biológica, este trabalho teve por objetivo a extração, a caracterização estrutural e avaliação da atividade antinociceptiva do polissacarídeo estrutural de parede celular (PEPC) extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae*.

2 Materiais e métodos

2.1 Procedência do micro-organismo

Este estudo foi realizado utilizando-se a levedura *Sporidiobolus ruineniae* obtida do banco de micro-organismos do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana.

2.2 Plaqueamento

Inicialmente foi realizado um inóculo da levedura *Sporidiobolus ruineniae* em solução salina estéril a 0,85% contendo 1 de absorbância em 540 nm. Em seguida foram feitas diluições seriadas. Três diluições foram selecionadas e 0,1 mL de cada

uma delas foi inoculada em triplicatas na superfície de placas de Agar YM. O inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido. As placas foram incubadas em temperatura de 35°C por 48 horas. Foram selecionadas placas com 20 a 250 colônias típicas de *Sporidiobolus ruineniae* para contagem das colônias.

2.3 Condições de cultura de *Sporidiobolus ruineniae*.

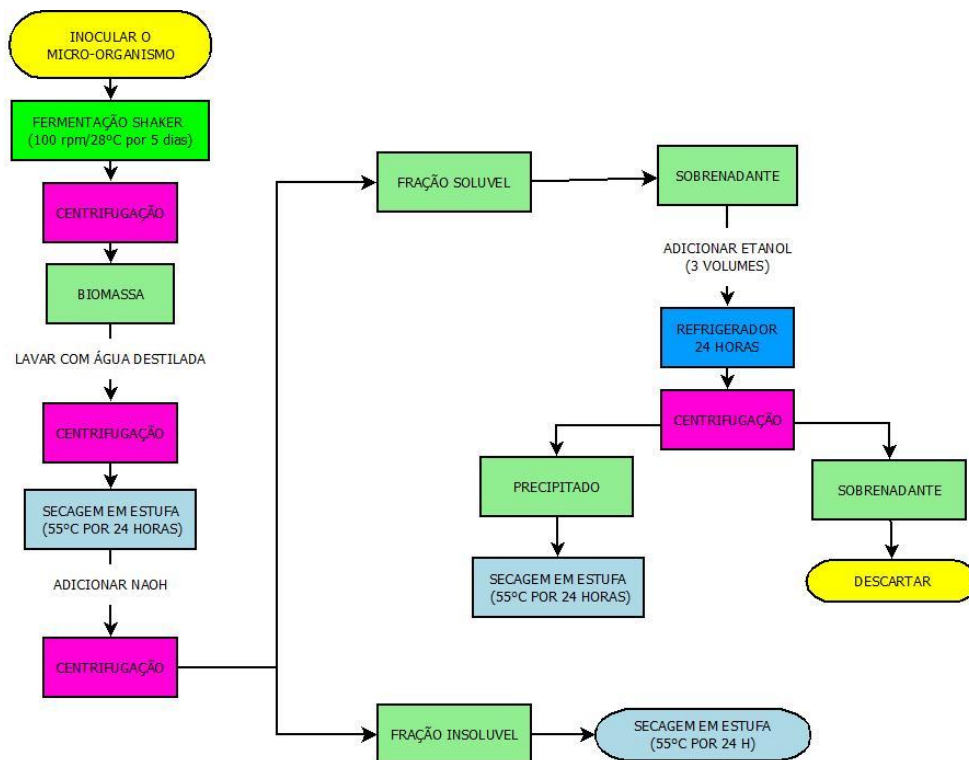
A levedura estudada foi inoculada em solução salina e acondicionada em frasco de 250 mL Erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultura YM (g/L): Extrato de levedura, 3,2, Extrato de malte, 3,0, Peptona de carne, 5,0, Glicose, 10,0, K₂HPO₄, 2,0, MgSO₄ 2,7, KH₂PO₄ 13,62. Realizou-se a padronização do inóculo em solução salina estéril a 0,45% contendo em média $3,28 \times 10^{-7}$ UFC de *Sporidiobolus ruineniae*. A fermentação foi realizada a 100 rpm por 5 dias em um agitador rotativo à temperatura de 28°C. Posteriormente, o caldo fermentativo foi centrifugado (Centrífuga 5804R -Eppendorf, São Paulo, Brasil), em 10000 rpm por 15 min a 4°C. O material precipitado contendo as células de *Sporidiobolus ruineniae* foi utilizado para extração do polissacarídeo.

2.4 Extração do polissacarídeo estrutural de parede celular (PEPC *Sporidiobolus ruineniae*).

A biomassa celular obtida após a centrifugação do caldo fermentativo (2,33g para 1000mL de caldo fermentativo) foi colocado em estufa a 55°C para secagem até peso constante e em seguida foram adicionados 10 volumes de NaOH 1 M à biomassa seca. Essa suspensão foi colocada em banho-maria em temperatura de 70°C por 120 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto na proporção 1:3 (sobrenadante/etanol), levado ao refrigerador por 12 horas (overnight) e, depois deste período foi centrifugado a 10000 rpm durante 15 min. O precipitado foi colocado em estufa à temperatura de 55°C até peso constante. Após a secagem o

material foi pesado e acondicionado em recipiente em temperatura ambiente (figura 1).

Figura 1: Fluxograma de extração do polissacarídeo estrutural de parede celular solúvel da levedura *Sporidiobolus ruineniae*.



2.5 Modelo experimental para otimização da produção do PEPC *Sporidiobolus ruineniae*.

A otimização da produção foi realizada utilizando-se três diferentes temperaturas (50°C, 60°C e 70°C) e cinco concentrações de NaOH (1%, 2%, 3%, 4% e 5%). Os diferentes níveis de temperatura e concentração foram relacionados segundo o modelo experimental Doehlert para o desenvolvimento de nove ensaios experimentais (contendo cada ensaio 0,5 g do extrato bruto), sendo que três destes foram repetições do ponto central. Para a análise estatística deste trabalho foi utilizado o software statistica®version 7.0.

2.6 Identificação estrutural do PEPC *Sporidiobolus ruineniae*.

A caracterização estrutural do polissacarídeo estudado foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (AsciiPeds PE IR Spectrum 1.60, Spectrum One FT-IR Spectrometer). O polímero seco foi moído com brometo de potássio (KBr) em pó e prensados em peletes por medição espectral FT-IR na gama de 1500-4000 cm^{-1} . Na análise por espectroscopia de RMN, todos os espectros foram registrados a 300 K em um espectrômetro Varian Inova 500 operando a 11,7 t, observando- ^1H a 500 MHz e ^{13}C a 125 MHz e usando Sonda de detecção direta de 5 mm. A amostra foi dissolvida em D $_2$ O / DMSO (6: 1) e transferida para um tubo de RMN. Utilizou-se TMS como uma referência de desvio químico (δ 0.0). O D $_2$ O (99,9%) e DMSO (99,9%) utilizados foram de procedência da Cambridge Isotope Laboratories, EUA.

2.7 Composição monossacarídica do PEPC *Sporidiobolus ruineniae*.

O polissacarídeo (20 mg) foi hidrolisado com ácido trifluoracético (TFA) em 100°C durante 8 h, seguida de evaporação (RUTHES *et al*, 2013). As amostras líquidas foram analisados em um Sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, equipado com injetor automático VRW HITACHI L-2200 e detector de índice de refração (RI) VRW HITACHI L-2490 e forno VRW HITACHI L-2300, coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm i.d.) (9 μm) (BIO-RAD, California, USA).

O volume de injeção foi de 12 μL e a fase móvel utilizada de forma isocrática constituída por água. O fluxo da fase móvel foi de 0,4 ml/min em temperatura ambiente. Tempo total de corrida de 16 min. Para a identificação do pico, padrões externos de glicose e manose foram usados. A determinação da composição monossacarídica foi feita em dois experimentos independentes com resultados consistentes.

2.8 Estudos farmacológicos

Foram realizados três modelos experimentais de dor utilizando camundongos Swiss (25-30 g) com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva dos polissacarídeos estruturais de parede celular (PEPC *Sporidiobolus ruineniae*). Os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclos de claro/escuro 12-12 h, com acesso a água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram iniciados às 8:00 e finalizados às 17:00. As recomendações da IASP para o estudo da dor em animais de experimentação foram seguidas para o manejo, condicionamento e experimentos com animais (ZIMMERMANN, 1983). A quantidade de animais utilizados nos modelos experimentais e a intensidade dos estímulos a que foram submetidos foram as mínimas necessárias para avaliar de forma consistente a atividade da droga testada. Os procedimentos realizados com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Feira de Santana.

2.8.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

Para o teste de contorção abdominal foram administradas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg da amostra, 10 mg/kg de indometacina (droga de referencia) e solução salina (grupo controle) por via intraperitoneal (i.p.). As drogas foram injetadas 30 min antes da administração do ácido acético (0.8% v/v, 10 ml/kg). Após a injeção do ácido acético (i.p.) os camundongos foram colocados em câmaras de observação para avaliação do comportamento nociceptivo. Este comportamento consiste em contorções, contrações do músculo abdominal em conjunto com o alongamento dos membros posteriores, que foram quantificadas em um período de 0 a 30 min para avaliar a intensidade de nocicepção (COLLIER et al., 1968).

2.8.2 Teste de formalina

Os camundongos receberam injeção intraplantar de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído em salina) na pata posterior direita. A intensidade de nocicepção foi determinada por contagem do tempo em que os animais passavam lambendo e/ou mordendo a pata injetada, durante a primeira fase (0-5 min) e a segunda fase (15-30 min) do teste (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Foram administradas doses de 12,5,

25 e 50 mg/kg do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* e solução salina (grupo controle) por via intraperitoneal (i.p.) e 5 mg/kg de morfina (s.c.; droga de referência) 30 min antes da injeção de formalina.

2.8.3 Teste de imersão da cauda (Tail flick)

Este teste consiste na imersão da ponta da cauda do camundongo (2 cm) numa temperatura em torno de 48°C (SEWELL; SPENCER, 1976). Os animais foram ambientados em câmaras de contenção durante quatro dias antes da realização desse experimento (20 min por dia). O estímulo gerado provoca uma reação de retirada da cauda dos animais. O aumento do tempo de retirada da cauda é interpretado como uma ação analgésica (FARMER et al., 1986). O tempo para o reflexo de retirada da cauda foi medido. Cada camundongo foi testado inicialmente sem a administração de drogas e os animais que não apresentaram o reflexo de retirada da cauda em 5 s foram excluídos dos testes, os demais foram selecionados para compor os grupos experimentais: grupo controle negativo (salina, i.p.), grupos administrados com doses de 50, 100mg/kg do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* e morfina (5 mg / kg, s.c.; droga de referência). A avaliação da nocicepção foi testada em 0, 5, 1, 3 e 5 horas após a administração de das drogas. O tempo máximo de permanência da cauda foi 10 s para evitar danos nos tecidos da cauda.

2.8.4 Drogas e diluições

As drogas foram adquiridas a partir dos laboratórios: Sigma®Chemical Co., St. Louis, MO, EUA (indometacina), Merck® (formaldeído e ácido acético) e Cristália® (morfina). A indometacina foi dissolvida em Tris-HCl 0.1 M pH 8,0 e solução salina fisiológica. Drogas restantes foram dissolvidas em solução salina fisiológica.

2.8.5 Análise estatística dos experimentos com animais

Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) de 6-7 animais em cada grupo experimental. As comparações entre os grupos foram

avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes a $P < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Otimização do processo de extração do polissacarídeo estrutural de parede celular (PEPC *Sporidiobolus ruineniae*).

O rendimento do extrato bruto (fração solúvel e insolúvel) do polissacarídeo estrutural de parede celular obtido da levedura *Sporidiobolus ruineniae* foi de 2,33g em 1000mL. A extração da fração álcali solúvel do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* obteve rendimento de 0,181g em 1g do extrato bruto, correspondendo a 20,75% do extrato bruto.

O delineamento experimental segundo o modelo Doehlert foi aplicado com a finalidade de otimizar a extração dos exopolissacarídeos solúveis produzidos pela levedura *Sporidiobolus ruineniae*, os parâmetros concentração de hidróxido de sódio a 5% e temperatura a 60°C foram os que mais influenciaram no sistema, apresentando o rendimento de PEPC de 0,1125g em 0,5g do extrato bruto. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 Matriz experimental Doehlert usada para a otimização da extração do polissacarídeo estrutural de parede celular obtido de *Sporidiobolus ruenie*.

ENSAIO	TEMPERATURA(°C)	NaOH	PEPC (g)
1	60 (0)	5% (1)	0,1125
2	70 (-0,866)	4%(0,5)	0,0649
3	50 (0,866)	4%(0,5)	0,0988
4C	60 (0)	3%(0)	0,0900
5C	60 (0)	3%(0)	0,0870
6C	60 (0)	3%(0)	0,0951
7	70 (-0,866)	2%(-0,5)	0,0714
8	50 (0)	1%(-1)	0,0195
9	60 (0,866)	2%(-0,5)	0,0276

Os resultados da análise de variância (tabela 2) demonstraram que o modelo experimental utilizado está adequado, apresentando o valor do coeficiente de determinação R^2 0,98, com regressão significativa ($P < 0,05$) apresentando o valor de F de 28,7892 e a falta de ajuste não significativa ($P < 0,05$) com valor de 7,823.

Tabela 2: Análise de variância do modelo de regressão para a otimização de polissacarídeo PEPC extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae*.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado	R-sqr
Regressão	0,008013	5	0,0016026	28,7892	9,01	0,98
Resíduo	0,000167	3	5,5666			
Falta de ajuste	0,000133	1	0,000133	7,8235	18,51	
Puro erro	0,000034	2	0,000017			
SQ total	0,008180	8				

Um gráfico tridimensional de superfície de resposta foi gerado utilizando-se os dados dos tratamentos nos diferentes níveis dos fatores concentração de NaOH e temperatura (figura 2) e através dele pode-se observar a área de maior rendimento do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* no domínio experimental do processo de extração.

Figura 2: Superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de NaOH e temperatura na otimização da extração do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* solúvel.

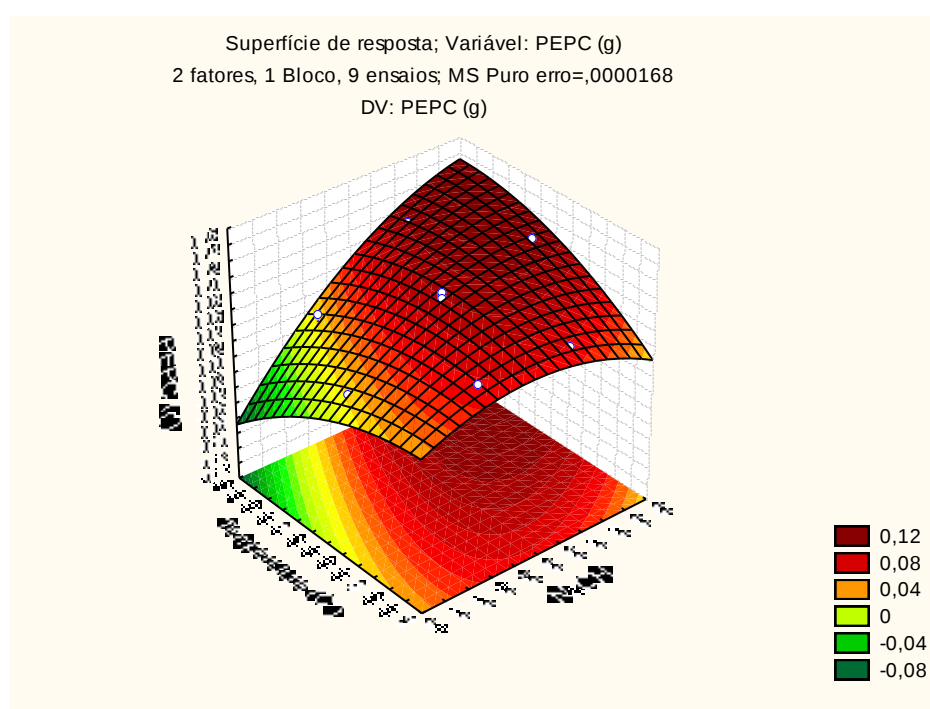
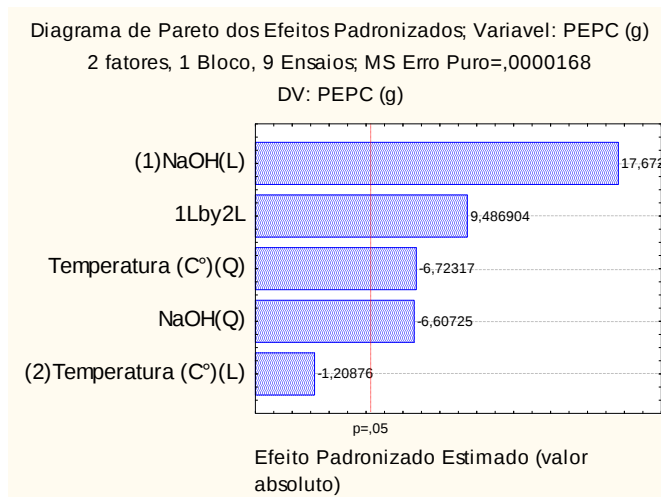


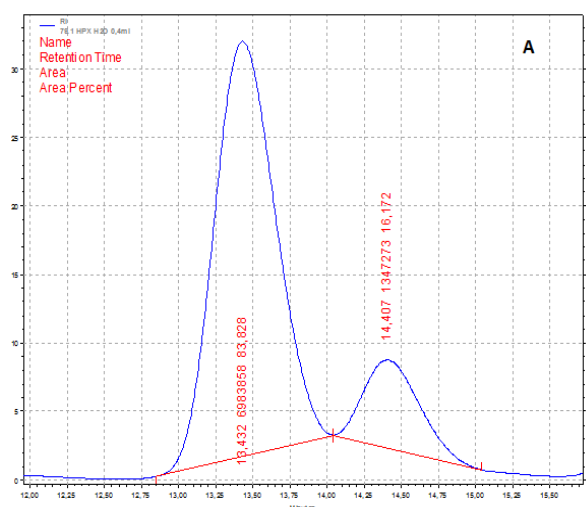
Figura 3: Diagrama de Pareto relativo aos efeitos do nível do tempo e temperatura na otimização da extração do PEPC solúvel.



3.2 Caracterização do polissacarídeo por análise espectroscópica

A análise espectrofotométrica para a identificação da composição monossacarídica por HPLC do polissacarídeo estrutural de parede celular extraído de *S. ruineniae* revelou a presença de açúcares neutros na proporção de 4: 1 para unidades de glicose e manose.

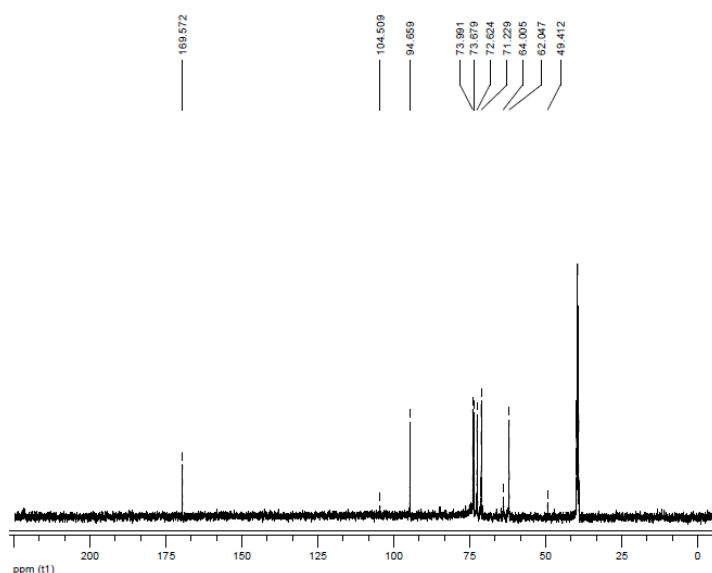
Figura 4: HPLC-RI cromatograma da composição de monossacarídeos de PEPC *Sporidiobolus ruineniae* produzidos por *S.ruineniae*.



O Espectro de RMN ^{13}C realizada em amostra de PEPC de *S. ruineniae* (figura 5) revela sinal característico da glucana. No entanto, algumas

impurezas, tais como o ácido glucurônico estão presentes. O sinal δ_C 104,4 é característico de β -glucano (WU et al, 2004; MAJUMDER et al, 2009; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013) o que está de acordo com os resultados obtidos na análise por HPLC. Os sinais δ 169,8 e δ 52,8 podem ser atribuídos a carbonos C-6 e metil das unidades esterificadas do ácido galacturônico (GalUA), respectivamente.

Figura 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C de PEPC de *S. ruineniae*.

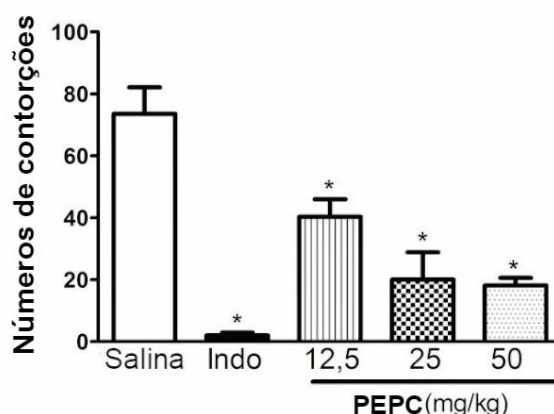


3.3 Estudos farmacológicos.

3.3.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético.

A atividade antinociceptiva do polissacarídeo estrutural de parede celular extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae* foi inicialmente avaliada utilizando o teste de contorções abdominais por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0.8% v/v, 10 ml/kg) em camundongos. A administração intraperitoneal do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* (12,5, 25 e 50 mg/kg), 30 minutos antes da injeção de ácido acético, produziu uma inibição significativa do número de contorções nos camundongos em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). A indometacina (10 mg/kg), controle positivo administrado por via intraperitoneal, também produziu uma significativa inibição das contorções abdominais ($p < 0,05$) (figura 6).

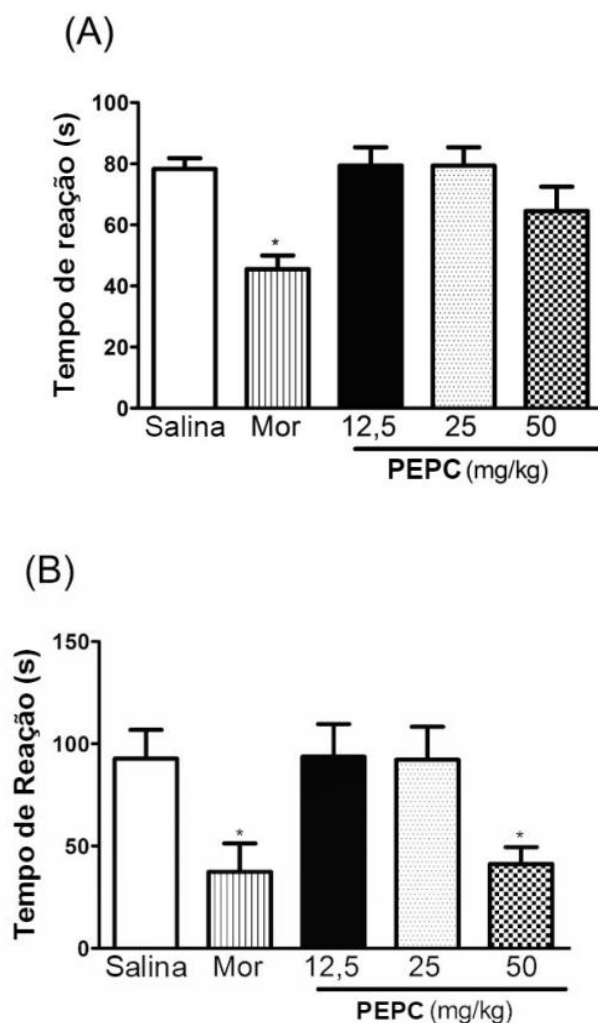
Figura 6: Avaliação da atividade antinociceptiva do PEPC no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O controle negativo (Salina), o PEPC (12,5; 25 e 50 mg/kg) e indometacina (10mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) 30 antes do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A atividade antinociceptiva do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* foi avaliada pela redução do número de contorções abdominais do animal quando comparado com o controle negativo. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n= 6 para cada grupo). *significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$), determinado pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.



3.3.2 Teste de formalina

A figura 6 mostra o efeito do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* no modelo de nocicepção induzido por formalina em camundongos. Imediatamente após a injeção de formalina os animais apresentaram comportamento nociceptivo. O PEPC *Sporidiobolus ruineniae*, administrado nas doses 12,5, 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.), não apresentou inibição da fase inicial (0-5 min) no comportamento nociceptivo dos animais tratados, quando comparado ao controle negativo. Entretanto, a dose de 50 mg/kg do polissacarídeo foi capaz de inibir a fase inflamatória ou final (15-30min) do teste de formalina ($P<0,05$). A morfina (5 mg/kg), droga utilizada como controle positivo, apresentou antinociceptivos significantes nas duas fases do teste de formalina ($P <0,05$) (figura 7).

Figura 7: Avaliação da atividade antinociceptiva do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* no teste de formalina. O controle negativo (Salina), o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* (12,5; 25 e 50 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) e a morfina (5 mg/kg) por via subcutânea (s.c.). A figura representa a fase neurogênica (A) e a fase inflamatória (B). A atividade antinociceptiva do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* foi avaliada pela redução do tempo de reação da pata injetada com a formalina quando comparado com o controle negativo. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n= 6 para cada grupo). *significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), determinado pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.



3.3.3 Teste de imersão de cauda (Tail flick)

A atividade antinociceptiva do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* foi também analisada no teste de imersão de cauda em camundongos. Este teste é ideal para indicar analgésicos de ação central, como é o caso da morfina e seus derivados. O resultado apresentado na tabela 3 mostra que o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* (50, 100mg/kg) não foi capaz de alterar o tempo de resposta ao estímulo nocivo. A

morfina, fármaco de referência, aumentou significativamente o tempo de retirada da cauda 30 min e 1h após a administração ($p < 0,05$).

Tabela 3: Avaliação da atividade antinociceptiva do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* no teste de imersão de cauda. O controle negativo (Salina), o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* (50; 100 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) e a morfina (5mg/kg) por via subcutânea (s.c.) 30 antes do teste de imersão de cauda. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM de 6 animais para cada grupo, comparado ao grupo controle (salina). *significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), determinado pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni

	Dados	Basal	30 min	1h	3h	5h
CONTROLE NEGATIVO	Média	1,31	1,27	1,53	1,34	1,35
	E.P.M.	0,17	0,08	0,14	0,14	0,20
PEPC 50 mg/kg	Média	1,18	1,28	2,45	1,35	1,22
	E.P.M.	0,14	0,14	0,38	0,21	0,08
PEPC 100 mg/kg	Média	1,27	1,33	1,56	1,79	1,19
	E.P.M.	0,12	0,13	0,13	0,17	0,04
MORFINA 5 mg/kg	Média	1,51	9,14*	8,72*	2,18	1,21
	E.P.M.	0,31	0,35	0,65	0,11	0,10

4 Discussão:

Na presente pesquisa foi estudado o polissacarídeo estrutural de parede celular extraído da levedura *Sporidiobolus ruineniae*. A parede celular da levedura *Sporidiobolus ruineniae*, micro-organismo isolado da região do semiárido baiano, foi submetida à processos de extração de seu polissacarídeo estrutural para a caracterização da sua estrutura molecular e avaliação do seu potencial antinociceptivo .

A metodologia de extração utilizada permite a separação de duas frações do polissacarídeo, sendo elas fração álcali solúvel e fração álcali insolúvel. Devido aos benefícios que a fração álcali solúvel apresenta na administração medicamentosa e facilidade de absorção, esta foi selecionada para o prosseguimento do estudo (WANG et al, 2009). A extração da fração álcali solúvel do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* obteve um rendimento de 20,75% do extrato bruto. Em seu estudo com

extração de β -glucana da parede celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, Valasques e colaboradores (2014), obteve o rendimento de 25% a partir da sua metodologia de extração.

O estudo da otimização do processo de extração foi realizado com a finalidade de se conhecer as melhores condições para uma extração com maior rendimento do produto obtido. Os resultados demonstraram que as duas variáveis (concentração de NaOH e temperatura) exercem significância na produção do polissacarídeo, sendo que o maior rendimento, 0,1125 g, ocorreu na concentração de hidróxido de sódio a 5 % e temperatura a 60 °C. Os cálculos estatísticos foram realizados através da análise de variância (ANOVA). De acordo com esta análise, não foram encontradas evidências de diferenças significantes, ao nível de 5% de probabilidade, entre os tratamentos com relação à produção do PEPC *Sporidiobolus ruineniae*.

A caracterização molecular do polissacarídeo revelou que o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* é um heteropolissacarídeo composto por unidades de glucose (80%) e de manose (20%). A espectroscopia por ressonância magnética nuclear revelou sinal característico de beta-glucano (δ C 104,4) (WU et al, 2004; MAJUMDER et al, 2009; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Também foram observados sinais δ 169,8 e δ 52,8, que foram atribuídos a carbonos C-6 e metil das unidades esterificadas do ácido galacturônico (GalUA), respectivamente.

A administração do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* produziu efeitos antinociceptivos consistentes em diferentes modelos experimentais. O teste de contorções abdominais tem sido utilizado em triagens iniciais com a finalidade de avaliar a ação antinociceptiva de substâncias novas (COLLIER et al, 1968). A atividade antinociceptiva do *Sporidiobolus ruineniae*, quando avaliada no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético, foi verificada em todas as doses testadas (12,5, 25 e 50 mg/kg).

Devido à baixa especificidade do teste de contorções abdominais, foram realizados outros testes para avaliar melhor a ação antinociceptiva do polissacarídeo estudado. O teste de formalina é considerado um modelo experimental de

nocicepção com duas fases distintas. A fase inicial, também chamada de fase neurogênica, ocorre pela estimulação direta dos nociceptores e tem mediação central. A fase final (fase inflamatória) é causada por inflamação local (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Este teste demonstrou que a administração do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* inibiu o comportamento nociceptivo dos animais testados somente na fase final do teste na dose de 50 mg/kg.

O teste de imersão da cauda é um modelo experimental de nocicepção realizado com a imersão da cauda de ratos ou camundongos em água à temperatura acima de 40 °C, este estímulo gera comportamento nociceptivo de retirada da cauda do animal (CARSTENS; WILSON, 1993). O teste de imersão de cauda foi utilizado para avaliar a ação nociceptiva central do PEPC *Sporidiobolus ruineniae*. A administração intraperitoneal do polissacarídeo nas doses testadas (50 e 100 mg/kg) não aumentou o tempo de resposta, quando comparada ao grupo controle. Com este resultado podemos inferir que o PEPC *Sporidiobolus ruineniae* não bloqueia a transmissão neural de dor.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que o tratamento com PEPC *Sporidiobolus ruineniae* apresentou atividade antinociceptiva periférica e esta ação ocorre, provavelmente, pela inibição de mediadores inflamatórios. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para a compreensão dos mecanismos de ação deste biopolímero.

Referências:

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. da. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, 2004, p. 29-42.

CARSTENS E.; WILSON C.G. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine, and habituation. **Journal Neurophysiology**, 1993, V. 70, p. 630–639.

COLLIER, H.O.J.; L.C. DINNEEN; C.A. JOHNSON; C. SCHNEIDER. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, V. 32(2), 1968, p. 295-310.

CRUVINEL, W. de M.; Júnior, D. M., Araújo, J. A. P. Catelan, T. T. Souza, A. W. S. de , Silva, N. P. da , Andrade, L. E. C.. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 2010, V.50(4), p.434-6.

DUBUISSON, D.; S.G. DENNIS. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morfine, merepidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. 1977, V. 4, p. 161-174.

FARMER, O.B.; BERGE, O.G., TVEITEN, L.; HOLE, K. Changes in nociception after hydroxydopamine lesion of descendind catecholaminergic pathways in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.24, n.5, 1986, p. 1441-1444.

FEIN, A. **Nociceptors and the perception of pain**. University of Connecticut Health Center, 2014.

FUKUDA,E. K. ; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C. ; BARBOSA, A. M. ; DEKKER, R.F.H. ; DA SILVA, M.L.C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, jan./mar. 2009, p. 117-134.

HUNSKAAR, S., & HOLE, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, V. 30, 1987. p. 103–114.

IASP. Classification of chronic pain: **descriptors of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. 2. ed. Seattle: IASP Press, 1994.

KIM, H. O.; YUN , J. W. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 4, 2005, p. 728-738.

KLAUMANN, P. R. 1 ; WOUK, A. F. P. F. 2 ; SILLAS, T. 1 Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, 2008, p. 1-12.

MAGNANI, M., CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, jul./set. 2008, p. 631-650.

MAJUMDER, A., SINGH, A., & GOYAL A. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. **Carbohydrate Polymers**. V. 75, 2009, p. 150-156.

MELO, G. R. de. **Production of cellulases and xylanases by thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in different lignocellulosic substrates**. Goiânia, 2010. Dissertação - Universidade Federal de Goiás.

RUTHES, A. C.; RATTMANNA, Y. D.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; CARBONERO, E.R.; CORDOVA, M.M.; BAGGIO, C.H. Agaricus bisporus fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, V. 92, 2013, p. 184–191.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; GIBBS, P. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.12, 1992, p.279-298.

SEWELL, R.D.E.; SPENCER, P.S.J. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. **Neuropharmac**. V. 15, 1976, p. 683-688.

SYNYTSYA, A., & NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, V. 92, 2013, p.792–809.

TAMBELI, C. H. **Fisiologia oral**. Artes Médicas. São Paulo. 2014 p. 39-52.

TESTER, R. F. AL-GHAZZEWI, F. H. Mannans and health, with a special focus on glucomannans. **Food Research International**. V. 50, 2013, p. 384–391.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**. V. 100(4), 2009, p. 1682–1686.

VALASQUES JUNIOR, G. L.; LIMA, F. O. BOFFO, E. F.; SANTOS, J. D. G.; SILVA, B.; Assis, S. A. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)- β -D-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate Polymers**. V. 105, 2014, p.293–299.

VOLMAN, J.J.; RAMAKERS, J.D.; PLAT, J. Dietary Modulation of Immune Function by B-Glucans. **Physiology & Behavior**, V.94, 2008, p. 276-384.

WANG, Q.; ZHANG, J.; WANG, A. Preparation and characterization of a novel pH-sensitive chitosan-g-poly (acrylic acid)/attapulgate/sodium alginate composite hydrogel bead for controlled release of diclofenac sodium. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, 2009, p. 731-737.

WU, J. Z.; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry**, V. 85, 2004, p.101-105.

ZIMMERMANN, M. "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." **Pain** , V. 16, 1983, p. 109-10.

Conclusão

A extração dos polissacarídeos produzidos por *Sporidiobolus ruineniae* possibilitou a obtenção de duas amostras solúveis, o exopolissacarídeo *Sporidiobolus ruineniae* e o polissacarídeo estrutural de parede celular *Sporidiobolus ruineniae*, as quais apresentam como composição monossacarídicas unidades de glucose e manose nas proporções de 3:2 e 4:1, respectivamente. A análise dos espectros de RMN.-13C do PEPC *Sporidiobolus ruineniae* indicou a presença de β -glucana em sua composição.

A otimização da extração dos polissacarídeos demonstrou que o exopolissacarídeo foi obtido em maior rendimento utilizando-se o tempo para extração de 120 minutos na temperatura de 70°C. O maior rendimento do polissacarídeo estrutural de parede celular foi obtido realizando-se a extração com concentração de hidróxido de sódio a 5% e temperatura a 60 °C.

Os polissacarídeos estudados apresentaram atividade biológica demonstrada pelo seu efeito antinociceptivo periférico nos modelos experimentais teste de contorção abdominal induzida por ácido acético e teste de formalina (fase inflamatória), já os testes de formalina (fase neurogênica) e de imersão de cauda demonstraram que os polissacarídeos não possuem ação antinociceptiva central. Dessa forma, o EPS *Sporidiobolus ruineniae* e o PEPC *Sporidiobolus ruineniae*, representam possíveis fontes potenciais para a exploração da indústria farmacêutica. Entretanto são necessários estudos mais aprofundados sobre a caracterização estrutural e a atividade antinociceptiva destes polímeros.