



Análise espectroscópica de derivado insolúvel de levedura submetido a diferentes métodos de esterilização visando aplicação como imunobiológico rico em β -glucana

Rafael Marques^{1*} (PQ), Letícia L. de O. Arakaki² (PG), Thaís L. Oliveira³ (PG), Luiz F. C. de Oliveira³ (PQ), Marcelo P. Bemquerer¹ (PQ), Humberto de M. Brandão¹ (PQ)

¹ Laboratório de Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular, Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

*rafaelmarquesquimico@gmail.com

RESUMO

Três métodos de esterilização foram avaliados para um derivado insolúvel da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BGSC): calor úmido sob pressão (CP); exposição ao gás óxido de etileno (OE) em planta industrial; e irradiação gama (IG) a partir de uma fonte de cobalto-60. Análises por espectroscopia Raman, no infravermelho (FTIR) e de ressonância magnética nuclear (¹³C-RMN) no estado sólido indicaram que a β -glucana é o principal constituinte do BGSC, com pequenas quantidades de quitina e proteínas. Os espectros FTIR e Raman não apresentaram alterações significativas após os tratamentos. No entanto, o CP promoveu mudanças nos espectros de ¹³C-RMN nos deslocamentos químicos associados ao carbono C3 da glucana, sugerindo rearranjo conformacional. Este trabalho propõe que o tratamento com OE e IG são métodos de esterilização promissores para BGSC na elaboração de formulações contendo β -glucana, mas o CP pode comprometer a conformação de ordem superior desse polissacarídeo.

Palavras-chave: Beta-glucana, esterilização, calor úmido, irradiação gama, óxido de etileno

Introdução

A β -glucana de levedura é um polissacarídeo formado por unidades de D-glicose unidas principalmente por ligações β -1,3 e ramificações β -1,6, sendo um dos principais componentes estruturais da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*. Sua estrutura conformacional, frequentemente organizada como tripla-hélice, confere-lhe propriedades imunomoduladoras amplamente documentadas (1). Derivados insolúveis de levedura enriquecidos em β -glucana (BGSC) são promissores para uso como adjuvantes imunológicos, inclusive por via parenteral (2). No entanto, por serem materiais sólidos e insolúveis, exigem processos de esterilização alternativos à filtração, como CP, OE e IG (3). Estes podem afetar a estrutura química ou supramolecular da β -glucana, com impacto direto sobre sua bioatividade (4). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio de espectroscopias FTIR, Raman e ¹³C-RMN no estado sólido, os efeitos de três métodos de esterilização sobre a integridade estrutural de um BGSC comercial utilizado como suplemento para nutrição animal.

Experimental

Esterilização:

CP: 5 g de BGSC em béquer selado com papel pardo sob ciclos de 115°C ou 121°C durante 15 ou 30 min em autoclave laboratorial;

OE: 5 g de BGSC em frasco de poliestireno com tampa de membrana de 0,22 μ m, submetidos a 210 min de exposição ao gás (concentração: 450–1200 mg/L) em autoclave industrial (7,1–18,9 kg/ciclo);

IG: 1 g de BGSC em microtubos de 1,5 mL e exposição ao cobalto-60 com taxas de dose de 2,26 kGy/h para as doses de 1 kGy e 25 kGy e 7,71 kGy/h para a dose de 50 kGy.

Análises espectroscópicas:

FTIRaman: Bruker MultiRAM, detector de Ge resfriado a nitrogênio líquido, excitação com laser Nd:YAG de 1064 nm e 200 mW, resolução de 4 cm^{-1} e 512 varreduras;

FTIR: Bruker Vertex 70v com acessório de reflectância total atenuada (ATR) para análise *in situ*, resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras;

¹³C-RMN: Bruker Avance III HD (400 MHz), técnica de CP-MAS a 10 kHz, rotores de zircônia (4 mm), hexametilbenzeno como padrão (17,3 ppm).

Resultados e Discussão

A β -glucana é o principal componente do BGSC, com sinais típicos em FTIR e Raman (890 cm^{-1}), e sinais intensos da cadeia glicosídica em ¹³C-RMN contrastando com sinais discretos de quitina e proteínas (5).

Os espectros FTIR e Raman não mostraram alterações significativas no perfil de bandas na β -glucana após os tratamentos, indicando que sua estrutura primária permaneceu intacta (Figura 1). No entanto, o ^{13}C -RMN revelou mudanças após os tratamentos a 115°C e 121°C por 30 minutos, com alterações nos deslocamentos em 87 ppm e 76 ppm (Figura 2), atribuídos ao carbono C3 (ligado e hidroxil terminal, respectivamente) da estrutura glicosídica (6).

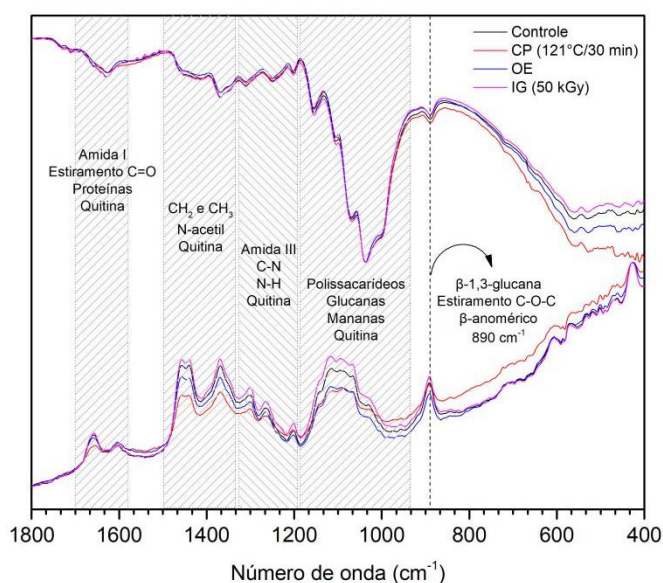


Figura 1. Espectros FTIR (superior) e Raman (inferior) de amostras de BGSC submetidas a diferentes tratamentos (para simplificação, alguns tratamentos foram omitidos devido à semelhança dos espectros).

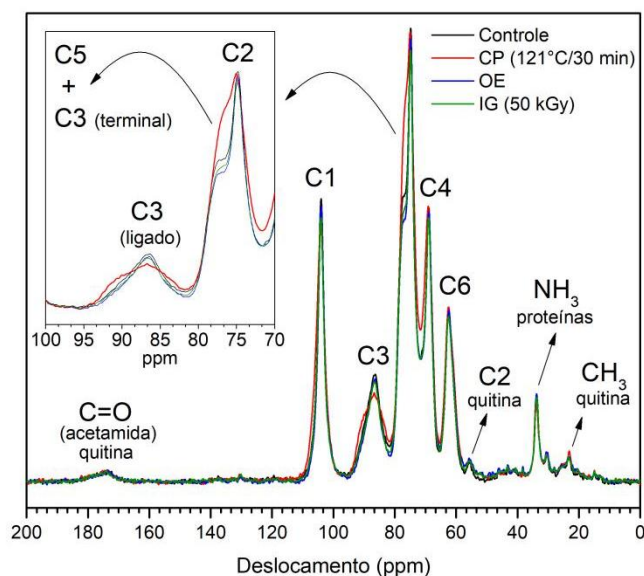


Figura 2. Espectros ^{13}C -RMN de BGSC submetido a diferentes tratamentos, com destaque para região de C3.

Houve redução da intensidade do sinal em 87 ppm, com incremento nos sinais vizinhos sobrepostos, indicando mudança do ambiente químico em torno de C3. O pico em 76 ppm sofreu aumento de intensidade, o que poderia indicar quebra de ligação $\beta(1,3)$ -glicosídica, com aumento da quantidade de C3-OH terminal, porém não houve alteração do sinal para C1 (104 ppm).

Os dados indicam uma reorganização conformacional da β -glucana após aquecimento prolongado, possivelmente devido à desestabilização da tripla-hélice e alterações nas ligações de hidrogênio, expondo C3 a um ambiente químico heterogêneo (7).

Conclusões

Este trabalho propõe que OE e IG são métodos adequados para esterilização do BGSC, preservando a integridade estrutural da β -glucana. Em contrapartida, o CP por 30 min promove alterações conformacionais perceptíveis por ^{13}C -RMN, que podem impactar a eficácia imunobiológica. Ensaio biológicos complementares são recomendados para confirmar a manutenção da atividade imunomoduladora após os tratamentos.

Agradecimentos

O presente trabalho teve suporte financeiro e apoio do CNPq e da FAPEMIG no âmbito do processo BPD-00408-22. Os autores agradecem à Oxieto Esterilização Industrial Ltda e ao Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear por compartilharem suas estruturas e apoio técnico nas etapas de esterilização por OE e IG, respectivamente.

Referências

1. X. Guo, J. Kang, Z. Xu, Q. Guo, L. Zhang, H. Ning, S. W. Cui, *Carbohydr. Polym.* **2021**, 262, 117962.
2. M. A. Chowdhury; M. T. Islam; M. R. Alom; M. S. Hossain; M. M. Rahman, *Carbohydr. Polym.* **2024**, 332, 121904.
3. T. Van Cauwenbergh; S. Vanden Broeck; K. De Schryver; S. Van Vlierberghe; A. Ludwig, *J. Pharm. Sci.* **2022**, 111, 2011-2017.
4. J. Wang; X. Hu; D. Meng; F. Li; *Molecules*, **2017**, 22, 257.
5. A. Martínez; E. Fernández; C. García-Astrain; L. Burzio; J. Sarasua; N. Gabilondo; A. Eceiza, *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87, 2223-2229.
6. H. Saito; R. Tariya; Y. Yoshioka; C. Hara; T. Kino; S. Ukai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 4267-4272.
7. L. Zhang; X. Li; Q. Zhou; X. Zhang; R. Chen, *Polym. J.* **2002**, 34, 443-449.