

Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans*

Ana Carolina dos Santos Ré

Ribeirão Preto
2022

ANA CAROLINA DOS SANTOS RÉ

Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Patrícia Aires

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 13/05/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

RÉ, A.C.S.	Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de <i>Streptococcus mutans</i>		DOUTORADO FCFRPUSP 2022
------------	--	--	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ré, Ana Carolina dos Santos

Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans*. Ribeirão Preto, 2022.

48 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Aires, Carolina Patrícia.

1. Polissacarídeos. 2. Biofilme de *S. mutans*. 3. Parede bacteriana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Ana Carolina dos Santos Ré

Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Jeová Deus
pelo privilégio da vida, consolo, fé e resiliência
para completar mais essa jornada.

Ao meu marido Renan, pelo amor,
paciência, compreensão e boas risadas;

À minha querida amiga Carol Aires por
segurar a minha mão em todos os momentos
e a minha mãe Vera, pelo amor e incentivo.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, por proporcionar ricamente a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, minha casa durante anos, obrigada pelo abrigo, pelo suporte e por proporcionar a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Flavio da Silva Emery, pelo apoio institucional e científico.

Aos funcionários da secretária de Pós-Graduação, Rosana, Eleni e Henrique pelo apoio institucional.

À minha querida amiga e orientadora Prof.^a Dr.^a Carolina Patrícia Aires Garbellini pelos incríveis anos de rica convivência, valiosas experiências, por acreditar em mim e sempre ter uma palavra de consolo e esperança no tempo certo.

Ao Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho pela coorientação e pela contribuição científica.

À técnica de laboratório Ana Cristina Morseli Polizello, minha querida amiga, pelo grande carinho, amizade sincera, pelas boas conversas, pelo apoio técnico e pela ajuda valiosa na conclusão deste trabalho.

À técnica de laboratório Luciana Ângulo, Ana Elisa, Maíra, Alcides e Luciana Ceribelli pela rica convivência, paciência, ensinamentos, boas risadas e assistência técnica.

À Prof.^a Dr.^a Carem Gledes Vargas Rechia pela prontidão, sugestões, colaboração e auxílio nas análises de cromatografia líquida.

À Prof.^a Dr.^a Fhernanda Smiderle do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, por me socorrer no meu desespero e me acalmar com sua excelente didática.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki pela contribuição, colaboração e auxílio nas análises de ressonância magnética nuclear.

Ao Prof. Dr. Roberto Nascimento Silva da FMRP-USP e suas alunas pelo auxílio nas análises de cromatografia líquida.

À Prof.^a Dr.^a Renata Vianna e Prof. Dr.^a Taís Gratieri pelas oportunidades e colaborações científicas.

Ao Prof Dr Robert Quivey, Dr Andrew Bischer, Dr.^a Roberta Faustoferri e Dr.^a Marlise Inêz Klein Furlan pelo valioso auxílio científico, pela prontidão e por suas ricas sugestões e colaboração.

Aos amigos Michael Osungunna, Victor Bankole, Erika Kawakita, Nayanna Lacerda, Luciana Dalmolin, Sofia Viola, Bruna Penachin, Jéssica Bem, Maria Gerusa, Bruna, Letícia e Jéssica Ellen que estiveram comigo ao longo desta jornada. Gratidão pela amizade, pelos desabafos, pelas boas risadas e todo suporte.

Aos meus amigos da minha nova casa Allbiom, Willian, João Paulo, Jéssica, Mariana, Caio, Ana Luíza, Henrique, Bruno, Elizeu, Luís, Laura, Ricardo por compartilharem descobertas incríveis, experiências marcantes, boas risadas e grandes desafios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp (2016/24042-2 e 2018/14113-5) pelo apoio financeiro.

Ao CNPq (430922/2018-3 e 303352/2017-5), UFPR-Rede de Internacionalização em Bioprospecção, Biogeoquímica e Biotecnologia Ambiental (CAPES-Print 88887.311742/2018-00), FINEP e UFPR NMR Center.

Ao Portal de Periódicos CAPES por proporcionar acesso aos trabalhos científicos utilizados durante o doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

RESUMO

RÉ, A.C.S. **Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans***. 2022. 48f. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Streptococcus mutans é um dos microrganismos relacionados ao desenvolvimento da cárie dental, produzindo o biofilme, uma estrutura tridimensional complexa composta principalmente por polissacarídeos, que podem ser classificados como: *i*) polissacarídeos extracelulares, dispersos por toda a matriz, protegendo bactérias especialmente de compostos antimicrobianos; *ii*) polissacarídeos de parede celular contendo raminose (PRAM) ancorados ao peptidoglicano, essenciais para a virulência bacteriana e *iii*) polissacarídeos intracelulares (PIC), polímeros estocados no interior da célula, atuando como reserva energética. Em contraste com os polissacarídeos extracelulares, a determinação da estrutura química e o estabelecimento de um protocolo para a extração do PRAM e do PIC ainda é um desafio e não está estabelecida na literatura. Assim, considerando a importância biológica dos PRAM e dos PIC, o objetivo deste trabalho foi avaliar um protocolo de extração destes polímeros e suas características estruturais a partir de biofilme de *S. mutans*. Biofilmes de *S. mutans* UA159 foram formados em lâminas de vidro por 5 dias, sendo coletados e processados para a retirada da matriz microbiana, composta por polímeros extracelulares. As células bacterianas resultantes foram submetidas a parâmetro químico (extração alcalina a quente com NaOH 0,5M ou 1M por 5, 10 ou 15 minutos a 100 °C) ou físico (sonicação com 1 pulso de 15 s com potência de 5W ou 20W em água ou solução salina) para obtenção dos polissacarídeos de parede celular e dos polissacarídeos intracelulares. Após hidrólise ácida (ácido trifluoracético por 8 horas a 100 °C), a composição monossacarídica de todos os grupos experimentais foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de índice de refração, sendo o protocolo de extração com NaOH 1M a 100 °C por 15 minutos selecionado para a caracterização química das estruturas, utilizando-se ressonância magnética nuclear (RMN). Os resultados sugerem que enquanto o PIC é um polissacarídeo de glucanas com cadeia principal α -(1→4) ligado com cadeias laterais ramificadas α -(1→6), o PRAM é uma ramnoglucana com cadeia principal α -(1→2) e α -(1→3) de raminose e cadeias laterais de glucose ligadas por α -(1→2), sendo ambas as estruturas estudadas pela primeira vez em uma única fração. Assim, a partir de um único homogenato alcalino obtido de biofilme cariogênico foi possível esclarecer a estrutura química por RMN de duas moléculas: *i*) o polissacarídeo de parede celular, que pode ser a chave para o desenho de futuros alvos terapêuticos para antimicrobianos no futuro e *ii*) o polissacarídeo intracelular, que pode contribuir para um maior entendimento da rota metabólica de carboidratos em *S. mutans*.

Palavras-chave: glucanas, raminose, ressonância magnética nuclear, estrutura química; ramnoglucana.

ABSTRACT

RÉ, A.C.S. **Extraction protocols and chemical characterization of cell wall polysaccharide and intracellular polysaccharide from *Streptococcus mutans* biofilm.** 2022, 48f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Streptococcus mutans is one of the microorganisms related to the development of dental caries, producing a biofilm, a complex three-dimensional structure composed mainly of polysaccharides, which can be classified as: *i*) extracellular polysaccharides, dispersed throughout the biofilm matrix, protecting bacteria especially from antimicrobial compounds; *ii*) rhamnose-containing cell wall polysaccharides (RHAP) anchored to peptidoglycan, essential for bacterial virulence and *iii*) intracellular polysaccharides (IPS), polymers stored inside the cell, acting as an energy reserve. In contrast to extracellular polysaccharides, the chemical structure and the protocol for the extraction of RHAP and IPS is not established in the literature. Thus, considering the biological importance of RHAP and IPS, we aimed to evaluate a protocol for extraction of these polymers and study their structural characteristics in *S. mutans* biofilm. For this, *S. mutans* UA159 biofilms were formed on glass slides for 5 days, and were collected and processed to remove the extracellular microbial matrix. The resulting bacterial cells were submitted to chemical (hot alkaline extraction with 0.5 M or 1 M NaOH for 5, 10 or 15 min at 100 °C) or physical (sonication with 1 pulse of 15 s with potency of 5W or 20W in water or saline solution) parameters to obtain the RHAP and IPS. After acid hydrolysis (trifluoroacetic acid for 8 h at 100 °C), the monosaccharide composition of all experimental groups was determined by high performance liquid chromatography associated with a refractive index detector, and the extraction protocol with 1M NaOH, 15 min at 100 °C was selected for the chemical characterization of the structures using nuclear magnetic resonance (NMR). The results suggest that while IPS is a glucose polysaccharide with α -(1→4) main chain linked with α -(1→6) branched glucose side chains, RHAP is a rhamnoglucan with α -(1→2) and α -(1→3) rhamnose main chain and α -(1→2) glucose side chains. Both structures are being studied for the first time in a single fraction. Thus, a single alkaline homogenate obtained from cariogenic biofilm helped to clarify the chemical structure by NMR of two molecules: *i*) the cell wall polysaccharide, which may be key to the design of future therapeutic targets for antimicrobials and *ii*) the intracellular polysaccharide, which may contribute to a better understanding of the carbohydrate metabolic pathway in *S. mutans*.

Keywords: glucans, rhamnose, nuclear magnetic resonance, chemical structure, rhamnoglucans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biofilme de <i>S. mutans</i> UA159 de 5 dias formado em lâmina de vidro.....	18
Figura 2. Quantificação de carboidratos totais extraídos de acordo com diferentes protocolos de extração alcalina a quente.....	27
Figura 3. Quantificação dos polissacarídeos extraídos de acordo com diferentes protocolos de sonicação utilizando diferentes solventes.....	27
Figura 4. Cromatograma da separação da solução padrão de glucose e raminose 1 mg/mL.....	29
Figura 5. Cromatogramas dos polissacarídeos extraídos com NaOH 0,5 M por 5 (A), 10 (C) e 15 min (D) a 100 °C e com NaOH 1M por 5 (B), 10 (D) e 15 min (F) a 100°C.....	33
Figura 6. Cromatogramas dos polissacarídeos extraídos com sonicação em água com 5 W (A), 20W (B) e com sonicação em salina com 5W (C) e 20W (D).....	34
Figura 7: HSQC editado. R1: unidades de raminose α -(1→2) ligadas, R2: unidades de raminose α -(1→3) ligadas e G1: unidades de glucose de extremidades não redutoras terminais de PRAM e PIC. Os picos cruzados azuis pertencem aos grupos CH e CH ₃ e os verdes aos grupos CH ₂ de fase negativa. O padrão de glicogênio HSQC sobreposto é mostrado em picos cruzados vermelhos e magenta para grupos CH ₂ de fase negativa. Os principais sinais são representados nos espectros sobrepostos.....	35
Figura 8: TOCSY sobreposto (azul, tempo de mistura: 160 ms) COSY (vermelho) e NOESY (magenta, tempo de mistura: 200 ms). O sistema de spin R1-H6 e R2-H6 foi demonstrado, NOESY e COSY confirmaram que todos os prótons de raminose foram determinados e atribuídos pela abordagem de reversão de dupla verificação H1 - H6 – H1.....	37
Figura 9: Espectros 2D-NOESY (azul) e TOCSY (vermelho) sobrepostos de PRAM e PIC. Os principais sinais são representados nos espectros sobrepostos e nos contatos de NOE.....	38
Figura 10: TOCSY seletivo 1D sobreposto (tempo de mistura de 200 ms) de R1, R2, G1 e prótons de glicogênio, cada espectro concorda com o próton ¹ H completo da mistura de polissacarídeos (parte inferior).....	38
Figura 11: Espectros 2D-DOSY sobrepostos de padrão de glicogênio (azul), PRAM e PIC (preto). Projeção do espectro de RMN de ¹ H do glicogênio (topo). Os deslocamentos químicos são mostrados no eixo x e os valores do eixo y do log do coeficiente de difusão obtidos a 298 K, a projeção do Log D do glicogênio está em azul no eixo y.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de retenção (TR), fator de assimetria (As), número de pratos teóricos (N), resolução (Rs) e coeficiente de determinação (R^2) para coluna 1 (RCM-Monosaccharide Ca^{+2}) e coluna 2 (Aminex HPX 87 H) na separação da solução padrão de glucose e raminose.....	28
Tabela 2 – Quantificação de glucose, rendimento de hidrólise de glicogênio e quantificação de carboidratos totais obtidos para duas molaridades de ácido TFA e tempo de incubação a 100 °C.....	31
Tabela 3 – Quantificação de glucose e raminose dos polissacarídeos obtidos com o protocolo de extração alcalina a quente e com o protocolo de sonicação, tendo a água e a salina como solventes.....	32
Tabela 4: Deslocamentos químicos 1H e ^{13}C do PRAM e do PIC.....	35
Tabela 5 - Derivados metilados encontrados na amostra contendo os polissacarídeos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PECI	Polissacarídeos extracelulares insolúveis
PECS	Polissacarídeo extracelular solúvel
PRAM/PRAMs	Polissacarídeos que contém raminose
PIC/PICs	Polissacarídeos intracelulares
RMN	Ressonância magnética nuclear
ATCC	American Type Culture Collection
LMW	Meio de cultura de baixo peso molecular ultrapurificado
BHI	Brain Heart Infusion
CLAE-IR	Cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de índice de refração
TR	Tempo de Retenção
As	Fator de Assimetria
Rs	Resolução
N	Número de pratos teóricos
R ²	Coefficiente de determinação
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
COSY	Correlation Spectroscopy
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
DNA	Desoxyribonucleic acid
D ₂ O	Água deuterada

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
2.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	18
2.2.1 Preparo e crescimento do biofilme bacteriano	18
2.2.2 Coleta do biofilme.....	18
2.2.3 Obtenção das células bacterianas	19
2.2.4 Obtenção dos polissacarídeos por extração alcalina a quente	19
2.2.5 Obtenção dos polissacarídeos por sonicação	20
2.2.6 Quantificação dos polissacarídeos obtidos pelos diferentes protocolos de extração	20
2.3 PADRONIZAÇÕES PARA ESTUDOS DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS	21
2.3.1 Seleção da coluna cromatográfica	21
2.3.2 Condições de hidrólise dos polissacarídeos	22
2.4 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS	23
2.4.1 Estudo preliminar: diálise das amostras de polissacarídeos obtidos por extração alcalina a quente	23
2.4.2 Determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidos pelos diferentes protocolos de extração.....	24
2.5 ESTUDOS DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA	25
2.5.1 Determinação de PRAM e PIC por ¹ H qNMR	25
2.5.2 Análise de metilação	26

3. RESULTADOS	26
3.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	26
3.1.1 Quantificação dos polissacarídeos obtidos pelos diferentes protocolos de extração	26
3.2 PADRONIZAÇÕES PARA ESTUDOS DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS	28
3.2.1 Seleção da coluna cromatográfica	28
3.2.2 Condições de hidrólise dos polissacarídeos	30
3.3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	31
3.4 ESTUDOS DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA	34
4. DISCUSSÃO	407
5. CONCLUSÃO	41
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	41
7. BIBLIOGRAFIA	41

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma das doenças bucais mais comuns no mundo todo, sendo responsável por afetar pessoas de todas as faixas etárias (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Além de comprometer seriamente a qualidade de vida dos indivíduos pela presença de dor e perda dentária, a cárie também é considerada um dos fatores de risco para diversas doenças, como doenças cardíacas e doença periodontal (KIM et al., 2019; VALM, 2019). Avanços significativos tem sido realizado nos últimos anos com relação a etiologia da cárie dental, sendo o frequente consumo de carboidratos fermentáveis e a pobre higiene bucal apontados como os principais fatores relacionados a sua manifestação, o que a define como uma doença biofilme-açúcar dependente (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010; COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017; FEJERSKOV, 2004).

O biofilme dental é composto por várias espécies de microrganismos que normalmente coexistem em homeostase com o hospedeiro (PITTS et al., 2017; VALM, 2019). No entanto, a composição deste biofilme pode ser influenciada pela oferta de açúcares como a sacarose, considerado o mais cariogênico dos carboidratos (BOWEN et al., 2018; CURY et al., 2000). Uma vez exposta aos microrganismos, a sacarose é hidrolisada e pode ser metabolizada a ácidos que causam a desmineralização da estrutura dental. Além disso, a energia de hidrólise das ligações glicosídicas deste carboidrato é responsável pela síntese de polissacarídeos extracelulares (PAES LEME et al., 2006). Biofilmes formados na presença de sacarose apresentam maior quantidade de polissacarídeos extracelulares quando comparado aos biofilmes formados na presença de lactose (AIRES et al., 2002), amido (SOUZA et al., 2018), ou seus monômeros constituintes, glucose e frutose (COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017; CURY et al., 2000; TENUTA et al., 2006).

Os polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECI) produzidos por *Streptococcus mutans* são os maiores constituintes da matriz do biofilme dental cariogênico e apresentam relação bem estabelecida com a cárie dental (MATTOS-GRANER et al., 2000; NOBRE DOS SANTOS et al., 2002). Os PECI podem formar uma camada densa, espessa e porosa (DIBDIN; SHELLIS, 1988) sobre a superfície dental, o que favorece a presença de microambientes capazes de prolongar a exposição do dente aos ácidos produzidos pelas bactérias (KLEIN et al., 2015). Além dos PECI, o polissacarídeo extracelular solúvel (PECS), também disperso por toda a matriz do biofilme (COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017), é reconhecido

por seu papel na adesão primária das bactérias à superfície dental, sendo considerado um polímero importante no desenvolvimento inicial do biofilme (COSTA OLIVEIRA et al., 2020). Diferente do PECS, o polissacarídeo solúvel pode ser degradado e metabolizado pelos microrganismos orais (LEMOS et al., 2019), sendo utilizado como fonte extracelular de nutrientes, uma clara vantagem para a sobrevivência bacteriana.

Muito do conhecimento sobre a função destes carboidratos extracelulares está veiculada a definição de sua estrutura química, já estudada em biofilmes. Enquanto o PECS é uma α -glucana ramificada contendo ligações (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 3), o PECS é uma α -glucana ramificada com ligações semelhantes, mas com uma cadeia principal ligada a (1 \rightarrow 3) parcialmente substituída em O-6 por cadeias laterais de glucose (AIRES et al., 2011). Entretanto, há outros polímeros bacterianos de biofilmes que ainda não foram totalmente explorados em relação à sua estrutura química, como aqueles que remanescem após a extração dos polissacarídeos extracelulares: *i*) os polímeros de parede celular, como os polissacarídeos que contém raminose (PRAM) que são estruturas ancoradas ao peptidoglicano, essenciais na biogênese, patogênese e virulência bacteriana (MISTOU; SUTCLIFFE; VAN SORGE, 2016); e *ii*) os polímeros armazenados dentro da célula como polissacarídeos intracelulares (PICs), que podem ser usados como fonte de carboidratos para fermentação após esgotamento de nutrientes no meio extracelular (SPATAFORA et al., 1995).

A natureza imunoquímica do PRAM foi estabelecida com base em critérios sorológicos ou genéticos, apresentando uma estrutura principal de unidades de raminose ligadas a α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3) com cadeias laterais de glucose (NAKANO; OOSHIMA, 2009; SHIBATA et al., 2002). Este polissacarídeo demonstrou mediar a tolerância ao estresse ambiental, suscetibilidade a antibióticos, evasão imune do hospedeiro e virulência bacteriana (KOVACS et al., 2019). Além disso, a função biológica dos PRAMs está recebendo cada vez mais atenção, uma vez que os carboidratos da parede celular frequentemente servem como um receptor de fago (SHIBATA; YAMASHITA; VAN DER PLOEG, 2009). No entanto, faltam informações sobre sua estrutura química detalhada.

Em relação ao PIC, é relatado na literatura que *S. mutans* acumula polissacarídeo intracelular iodofílico do tipo glicogênio (BUSUIOC et al., 2009; ROGER et al., 2011; SEKAR et al., 2020). Por ser considerado um polímero de reserva energética, o PIC tem sido considerado responsável por manter a degradação de carboidratos durante os períodos de jejum do hospedeiro (entre refeições), sendo por

este motivo considerado um importante fator de virulência bacteriana (COSTA OLIVEIRA et al., 2020, 2021). No entanto, embora o caráter iodofílico dos grânulos dos polissacarídeos intracelulares tenham sido assumidos como glicogênio, originando o termo “polissacarídeo tipo glicogênio” (DIPERSIO et al., 1974), a estrutura química detalhada desta estrutura ainda não foi elucidada.

Embora as estruturas de PRAM ou PIC tenham sido deduzidas usando estudos genéticos, imunoquímicos ou citoquímicos, a estrutura química fina desses polissacarídeos permanece pouco estudada. Nesse contexto, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma importante ferramenta para a elucidação de moléculas biológicas, pois o detalhamento estrutural poderá auxiliar, a longo prazo, uma melhor compreensão da capacidade patogênica bacteriana. Além disso, o estudo de PRAM ou PIC utilizando-se técnicas de RMN permanece inédito na literatura. Assim, considerando a elucidação química como um aporte para um aprofundamento futuro da compreensão funcional dos polissacarídeos, o objetivo do trabalho foi investigar as características estruturais de PRAM e PIC extraídos de biofilmes de *S. mutans*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Biofilmes de *S. mutans* UA159 foram formados em lâminas de vidro por 5 dias, sendo coletados e processados para a retirada da matriz microbiana, composta por polímeros extracelulares. As células bacterianas resultantes foram submetidas a extração química (extração alcalina a quente com NaOH 0,5 M ou 1 M por 5, 10 ou 15 minutos a 100 °C) ou física (sonicação com 1 pulso de 15 s com potência de 5W ou 20W em água ou solução salina) para obtenção dos polissacarídeos de parede celular e dos polissacarídeos intracelulares. Após hidrólise ácida (TFA 2M por 8 horas a 100 °C), a composição monossacarídica de todos os grupos experimentais foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de índice de refração, sendo o protocolo de extração com NaOH 1M, 15 min a 100 °C selecionado para a caracterização química das estruturas, utilizando-se ressonância magnética nuclear.

2.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

2.2.1 Preparo e crescimento do biofilme bacteriano

Os polissacarídeos PRAM e PICs foram extraídos de biofilme de *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), sorotipo c (AJDIĆ et al., 2002; KOO et al., 2003). Para a formação do inóculo inicial, amostras de *S. mutans* armazenadas à -70 °C foram descongeladas, transferidas para meio de cultura de baixo peso molecular ultrapurificado (LMW) contendo glucose 1% (p/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e incubadas a 37 °C com 5% CO₂ durante 18 horas. Após este período, 10 µL deste inóculo foram transferidos para placas de BHI (*Brain Heart Infusion*) ágar (OXOID LTD, Basingstoke, Inglaterra), sendo incubadas nas mesmas condições descritas acima. Após 48 horas, 5 a 10 colônias bacterianas foram transferidas para tubos de 15 mL contendo meio de cultura LMW com glucose 1%, permanecendo por 18 horas incubadas a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, 100 µL deste inóculo foram transferidos para tubos de 50 mL contendo meio de cultura LMW, sacarose 1% e lâminas de vidro (76 x 26 mm, Kinittel Glass, Alemanha) para a formação do biofilme (n= 5). O conjunto foi incubado a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas e os meios de cultura foram trocados diariamente, até que se completassem 5 dias de formação do biofilme (Figura 1).



Figura 1: Biofilme de *S. mutans* UA159 de 5 dias formado em lâmina de vidro.

2.2.2 Coleta do biofilme

Após o último dia de crescimento do biofilme, as lâminas foram retiradas do meio de cultura e os biofilmes foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9%, Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA) para a remoção de bactérias não aderidas. Em seguida, os biofilmes aderidos às lâminas foram raspados e transferidos para um tubo de 50 mL com auxílio de uma espátula estéril. Este *pool* de biofilme foi então dividido

(n= 100) em alíquotas de 10 a 15 mg e distribuídos em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de solução salina, sendo cada amostra homogeneizada por sonicação (Sonic Dismembrator, Model FB 505, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) com 1 pulso de 15 segundos e amplitude 20% (5W) (AIRES et al., 2008). A suspensão de biofilme resultante foi utilizada para a obtenção das células bacterianas.

2.2.3 Obtenção das células bacterianas

Para a obtenção das células bacterianas que contém tanto os PRAM e os PICs, as suspensões de biofilme foram tratadas de acordo com o protocolo descrito por Aires et al., (2008) para remoção da matriz extracelular. Assim, as suspensões de biofilme foram centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes contendo polissacarídeos extracelulares solúveis foram descartados e NaOH 1 M foi adicionado aos precipitados. Após 15 minutos de agitação mecânica em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (10.000 g por 5 min a 4 °C) e os sobrenadantes contendo os polissacarídeos extracelulares insolúveis foram descartados. Os precipitados, contendo as células bacterianas, foram tratados de acordo com os protocolos descritos nos itens 2.2.4 e 2.2.5.

2.2.4 Obtenção dos polissacarídeos por extração alcalina a quente

Neste protocolo, a obtenção dos polissacarídeos (armazenados nas células bacterianas e em sua parede) foi realizada com extração alcalina a quente, utilizando-se variações de protocolo já estabelecido na literatura (AIRES et al., 2008), que preconiza a utilização de NaOH 1M por 15 minutos a 100 °C. Assim, os tubos contendo as células bacterianas obtidas previamente foram divididos em seis grupos experimentais (n= 4): *i*) incubação das amostras com NaOH 0,5 M por 5, 10 ou 15 minutos a 100 °C; *ii*) incubação das amostras com NaOH 1 M por 5, 10 ou 15 minutos a 100 °C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (10.000 g por 5 min a 4° C) e o sobrenadante foi transferido para outro tubo denominado "POLI". O precipitado foi lavado com NaOH 0,5 M ou 1 M e centrifugado, sendo o sobrenadante adicionado ao tubo "POLI". Ao sobrenadante foi adicionado etanol gelado (concentração final de etanol – 75%) (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) para precipitação dos polissacarídeos. Após serem mantidas por 30 min a -20 °C, as amostras foram centrifugadas e os precipitados foram lavados duas vezes com etanol gelado na concentração de 75%, sendo secos em temperatura ambiente

antes da quantificação de carboidratos totais (página 20, item 2.2.6). Os experimentos de obtenção dos polissacarídeos foram realizados três vezes.

2.2.5 Obtenção dos polissacarídeos por sonicação

Neste protocolo, a obtenção dos polissacarídeos foi realizada utilizando-se sonicação (Sonic Dismembrator, Model FB 505, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Assim, aos tubos contendo as células bacterianas obtidas previamente foram adicionados os solventes água ou NaCl 0,9%, sendo os grupos divididos em (n= 4) *i*) 1 pulso de 15 segundos e amplitude 20% (5W) e *ii*) pulso de 15 segundos e amplitude 40% (20W). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000 g por 5 min a 4 °C) e o sobrenadante foi adicionado ao tubo denominado "POL". Ao sobrenadante foram adicionados três volumes de etanol gelado (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) para precipitação dos polissacarídeos. Após serem mantidas por 30 min a -20 °C, as amostras foram centrifugadas e os precipitados foram lavados duas vezes com etanol gelado na concentração de 75%, sendo secos em temperatura ambiente antes da quantificação de carboidratos. Os experimentos de obtenção dos polissacarídeos foram realizados três vezes.

2.2.6 Quantificação dos polissacarídeos obtidos pelos diferentes protocolos de extração

Os polissacarídeos secos foram ressuspensos em NaOH 1 M e os carboidratos totais foram estimados pelo método fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) como padrão e leitura em 490 nm (Espectrofotômetro Cary 50 UV/Vis, Varian, Inc., Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Os resultados foram normalizados pelo peso úmido do biofilme. Resumidamente, os resultados (página 26, item 3.1.1) sugerem que todos os protocolos avaliados foram capazes de extrair carboidratos e que houve uma tendência numérica de aumento da quantidade de polissacarídeos extraídos de acordo com o tempo. No entanto, a quantificação de carboidratos totais não especifica o tipo de carboidrato extraído e por isso a próxima etapa consistiu na determinação da composição monossacarídica de todos os carboidratos obtidos pelos protocolos de extração.

2.3 PADRONIZAÇÕES PARA ESTUDOS DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS

A composição monossacarídica dos polissacarídeos foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a detector de índice de refração (CLAE-IR) após hidrólise dos polissacarídeos, condição elementar para utilização desta técnica. Para isso, houve necessidade de padronizar tanto as condições cromatográficas quanto as condições de hidrólise dos polissacarídeos, descritas a seguir.

2.3.1 Seleção da coluna cromatográfica

Para utilização da CLAE (cromatógrafo modelo UltiMate 3000, Thermo Scientific, EUA) associado a detector de índice de refração (modelo RefractoMax 521, Thermo Scientific, EUA), duas colunas cromatográficas foram avaliadas: RCM-Monosaccharide Ca^{+2} (Coluna 1) (Phenomenex, Allcrom, Brasil) e Aminex HPX 87 H (Coluna 2) (Bio-Rad Laboratories, EUA). Como a glucose e a raminose apresentam estruturas químicas similares, isto poderia influenciar a separação destes monossacarídeos. Assim, uma solução contendo a mistura de glucose e raminose, ambas 1 mg/mL, foi utilizada como padrão para as análises dos resultados de separação.

A coluna 1 apresentava dimensões de 300 x 7,8 mm, 9 μm de tamanho de partícula e 8% de *cross linkage*. As condições de separação para a coluna 1 envolviam a utilização de água ultrapurificada como fase móvel, modo isocrático, temperatura da coluna de 85 °C, vazão de 0,6 mL/min, 5 μL de volume de injeção, 40 °C de temperatura para o detector e 20 minutos de tempo de corrida. A coluna 2 também apresentava dimensões de 300 x 7,8 mm, 9 μm de tamanho de partícula e 8% de *cross linkage*. No entanto, as condições de separação para a coluna 2 envolviam a utilização de uma solução aquosa de H_2SO_4 5mM como fase móvel, modo isocrático, temperatura da coluna de 65 °C, vazão de 0,6 mL/min, 10 μL de volume de injeção, 40 °C de temperatura para o detector e 15 minutos de tempo de corrida. Os parâmetros de separação avaliados para cada coluna foram: tempo de retenção (TR), fator de assimetria (As), resolução entre os picos (Rs) e número de pratos teóricos (N). Também foi analisado o coeficiente de determinação (R^2) de cada curva analítica resultante da quantificação de soluções padrão contendo glucose e raminose (50, 200, 400, 800 and 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Em resumo, os resultados (página 27, item 3.2.1) sugerem que ambas as colunas apresentaram resultados satisfatórios de separação da glucose e da raminose. No entanto, a coluna 2 apresentou resultados superiores a coluna 1 e foi selecionada para os estudos de composição monossacarídica dos polissacarídeos.

2.3.2 Condições de hidrólise dos polissacarídeos

Para a hidrólise dos polissacarídeos (PRAM e PIC) é necessário incubá-los em condições ácidas em alta temperatura. Na literatura existem vários protocolos de hidrólise, sendo que a concentração do ácido a ser utilizada e o tempo de incubação a 100 °C depende do tipo de carboidrato (SASSAKI et al., 2008). Assim, este estudo foi realizado, com o objetivo de determinar se diferentes tempos de incubação com diferentes concentrações do ácido trifluoroacético (TFA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) poderiam influenciar na obtenção dos hidrolisados de polissacarídeo. Como a literatura sugere que o PIC é um polissacarídeo do tipo glicogênio, soluções de glicogênio (derivado de ostras, USB, Amersham Life Science, Japão) foram utilizadas para este estudo. Assim, soluções de glicogênio foram preparadas na concentração de 50 µg/mL e submetidas à hidrólise nas seguintes condições (1:1): i) 2 M TFA, 2 horas a 100 °C (concentração final de 1 M); ii) 4 M TFA, 2 horas a 100 °C (concentração final de 2 M); iii) 2 M TFA, 8 horas a 100 °C e iv) 4 M TFA, 8 horas a 100 °C (n=3). Após o período de hidrólise, as amostras foram secas com ar comprimido a temperatura ambiente e lavadas com água até a neutralização do pH (pH=7). Os hidrolisados foram ressuspensos em 0,3 mL de água para a filtração em membrana 0,45 µm. O filtrado foi analisado com coluna Aminex por CLAE-IR (seguindo as mesmas condições cromatográficas descritas na página 21, item 2.3.1) utilizando glucose (50 – 1000 µg/mL) como padrão para a construção da curva analítica. Os resultados foram expressos em µg/mL de glucose e a porcentagem de hidrólise foi calculada considerando 83,33 µg/mL a concentração esperada de glucose após a hidrólise (25 µg de glicogênio foram hidrolisados e ressuspensos em 0,3 mL de água, resultando na concentração final de 83,33 µg/mL). Além da quantificação de glucose por CLAE-IR, o conteúdo de carboidratos totais de cada hidrólise também foi estimado pelo método fenol sulfúrico.

Resumidamente, os resultados (página 30, item 3.2.2) sugerem que a melhor condição para hidrólise dos polissacarídeos é de 8 horas de incubação a 100 °C com

TFA na concentração final de 2 M, sendo este o parâmetro de hidrólise selecionado para o próximo estudo.

2.4 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS

2.4.1 Estudo preliminar: diálise das amostras de polissacarídeos obtidos por extração alcalina a quente

Com a definição das condições de análise por CLAE-IR e das condições de hidrólise dos polissacarídeos, novas amostras de células bacterianas foram obtidas e extraídas com o protocolo de extração alcalina a quente, como descrito previamente (página 19, item 2.2.4). Entretanto, os cromatogramas obtidos apresentaram picos com caudas posteriores, indicando problemas com a resolução da coluna e comprometimento da fase estacionária. De acordo com as informações fornecidas do fabricante da coluna, a quantidade de NaOH residual e seus derivados podem ter se ligado aos sítios ativos da fase estacionária, impedindo a interação dos analitos da amostra. Nesta etapa, foram desenvolvidas alternativas para a retirada do NaOH residual das amostras obtidas com extração alcalina a quente, sendo a diálise a metodologia mais eficiente para atender esta finalidade. De acordo com Imran et al., (2016), a diálise é capaz de eliminar mais de 60% desta base presente em resíduos industriais (IMRAN et al., 2016).

Assim, antes de iniciar o processo de diálise nas amostras obtidas do protocolo de extração alcalina a quente, um estudo preliminar foi realizado com uma solução de glicogênio 1 mg/mL em NaOH 1M. Como as amostras apresentavam volumes inferiores a 1 mL, o sistema de diálise foi confeccionado manualmente utilizando a parte superior do tubo de microcentrifuga (Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A parte superior deste tubo possui um reservatório que pode armazenar até 150 µL de líquido. Assim, a parte superior foi removida e a solução de glicogênio colocada no reservatório. A membrana selecionada para diálise foi a membrana Spectrum Spectra/Por 1 (Spectrum Chemical Mfg. Corp. New Brunswick, Nova Jersey, EUA), que possui limite de peso molecular na faixa de 6 a 8 kDa. Antes de fixar a membrana na parte superior do tubo, a mesma precisou passar por um tratamento de remoção de metais pesados. Para isso, a membrana foi submetida à fervura durante 1 hora com solução de EDTA 1 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguida de lavagens consecutivas com água purificada. Assim, a membrana foi fixada na parte superior do tubo e o mesmo foi fechado. Dessa forma, a amostra ficou armazenada no reservatório

e em contato com a membrana. O processo iniciou com 200 mL de água ultrapurificada mantida sobre agitação durante 6 horas. Após este período, a água foi removida e substituída por mais 200 mL de água ultrapurificada, durante 18 horas com agitação, sendo o pH monitorado nos dois casos. Em seguida, o dialisado foi removido e homogeneizado, o pH avaliado e o conteúdo quantificado pelo método de fenol sulfúrico. Os resultados sugerem que o glicogênio ficou retido na membrana (quantificação antes da diálise = $856,77 \pm 31,45$ µg/mL e depois da dialise = $868,18 \pm 35,85$) e que todo NaOH residual foi removido do dialisado (pH = 7,0). Assim, antes das análises de CLAE-IR, todas as amostras de PRAM e PICs obtidas pelo protocolo de extração alcalina a quente foram dialisadas nas condições descritas acima.

2.4.2 Determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidos pelos diferentes protocolos de extração

Com as condições cromatográficas e de hidrólise estabelecida (descritas no item 2.3, página 21), novas amostras dos polissacarídeos foram obtidos de acordo com cada protocolo de extração (extração alcalina a quente ou sonicação). Assim, após obtidas (n= 10), as amostras foram dialisadas (no caso dos polissacarídeos extraídos com base a quente), hidrolisadas e lavadas com água para atingir a neutralidade. Em seguida, os hidrolisados foram filtrados (membrana de 0,45 µm) e acondicionados em *inserts*, sendo inserido em *vials* específicos para CLAE-IR. As soluções padrões de glucose e raminose foram preparadas na faixa de concentração de 50 a 1000 µg/mL, sendo que as condições cromatográficas foram as mesmas descritas anteriormente (página 21, item 2.3.1). Os experimentos de extração e análise em CLAE-IR foram realizados duas vezes.

Os dados sugerem que a raminose é extraída juntamente com a glucose, independente do parâmetro químico (extração alcalina) ou físico (sonicação) (vide resultados página 31 item 3.3). De todos os parâmetros utilizados, apenas a extração alcalina a quente com NaOH 1M, 15 minutos de incubação a 100 °C não apresentou picos adicionais no cromatograma. Por este motivo, este protocolo de extração foi selecionado para os estudos com ressonância magnética nuclear.

2.5 ESTUDOS DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

Para a caracterização estrutural foi determinada por RMN os polissacarídeos (0,2 - 1,0 mg) foram dissolvidos em 0,5 mL de D₂O e os deslocamentos químicos referenciados com TMSP-d₄ (2,2,3,3-tetradeutério-3-trimetililsililpropionato, $\delta = 0$). As medições de RMN foram realizadas em ímã de 14,1 Tesla usando um espectrômetro Bruker AVANCE III 600 MHz TCI 5 mm N₂ Prodigy. Os deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D de ¹H e ¹³C foram determinados a 298 K e 343 K para observar todas as frequências de RMN. A correlação homonuclear foi determinada por COSY e TOCSY (tempo de mistura 160 ms), NOESY (tempo de mistura 200 ms) e DOSY foi usado para calcular a massa molecular dos polissacarídeos presentes na mistura, bem como os deslocamentos químicos de ¹H RMN sobrepostos. HSQC-NOESY heteronuclear 2D e HSQC editado foram realizados para completar a análise de ligação e o mapa de correlação ¹H/¹³C total. Experimentos de RMN 2D foram registrados para detecção de quadratura na dimensão indireta e adquiridos usando 8-64 varreduras por série de 1024x320 pontos de dados, sem preenchimento zero em F1 (1024) antes da transformação de Fourier.

2.5.1 Determinação de PRAM e PIC por ¹H qNMR

A análise quantitativa de RMN 1D foi realizada após otimização de pulso ¹H a 343 K da seguinte forma: RMN ¹H foi realizada após calibração de pulso de 90° (p1) variando de 8,27-12,23 us, para obter o espectro com uma largura de 12.000 Hz usando 16 varreduras para obter para o Sinal/Ruído de pelo menos 400/1 foi recomendado para análise quantitativa (SANTANA-FILHO et al., 2017). Para quantificar o teor de polissacarídeos, cada extrato foi dissolvido em 400 uL de D₂O centrifugado e transferido a tubos de RMN de 5 mm mais 200 uL de 0,01% de TMSP em D₂O foram adicionados para obter um volume final de 600 uL. Os tubos foram sonicados por 3 min antes das medições de RMN. Os espectros quantitativos de ¹H NMR foram adquiridos usando a sequência de pulso padrão Bruker ZGPR incrementado com os parâmetros otimizados, incluindo 64 K pontos de dados para provar melhor resolução para quantificação, um atraso de relaxamento de 4 segundos após o teste.

2.5.2 Análise de metilação

A per-O-metilação da mistura de polissacarídeos (0,5 mg) foi realizada usando NaOH-Me₂SO-Mel como descrito por Ciucanu e Kerek (1984) (CIUCANU; KEREK, 1984). Os derivados per-O-metilados foram hidrolisados por metanólise com 0,5 M HCl-MeOH (0,5 mL, v/v, 20 h, 80 °C) e secos a 20 °C seguido hidrólise total com 1M TFA (0,5 mL, v/v, 12 h, 100 °C). A solução foi evaporada até a secagem e reduzida com NaBD₄ (borodeutereto de sódio) e depois acetilada com Pyr:AC₂O (piridina: anidrido acético), 1:1 (0,1 ml, 20 min 100 °C), dando origem aos acetatos de alditol parcialmente O-metilados e analisados por GC-MS, utilizando um Shimadzu QP-2020NX equipado com autoinjeter AOC 20i e eluído na coluna capilar VF1ms da seguinte forma: injetor 250 °C, forno inicia em 100 °C (mantem 3 min) a 220 °C (10 °C min⁻¹, então mantida por 3 min), 250 °C (10 °C min⁻¹, então mantida por 3 min) e a 280 °C (10 °C min⁻¹, então mantida por 3 min). PRAMs foram identificados por seus tempos de retenção típicos e espectros de impacto de elétrons como descrito por Sasaki et al., 2005.

3. RESULTADOS

3.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.1.1 Quantificação dos polissacarídeos obtidos pelos diferentes protocolos de extração

Os valores de absorvância obtidos para as amostras foram convertidos em quantidade de polissacarídeos por meio da curva analítica ($y = 0,0224x - 0,0241$, $R^2 = 0,999$) e normalizados de acordo com peso úmido de biofilme. A Figura 2 contém os resultados de quantificação de carboidratos totais obtidos pela utilização do protocolo de extração alcalina a quente.

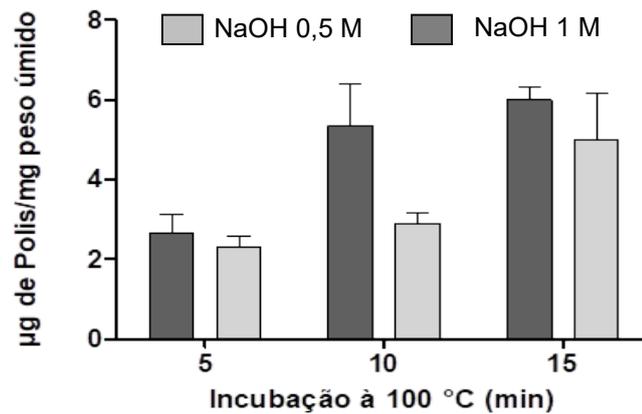


Figura 2: Quantificação de carboidratos totais extraídos de acordo com diferentes protocolos de extração alcalina a quente (n= 4, média seguida do desvio padrão).

Os resultados sugerem que todas as condições de extração alcalina a quente foram capazes de extrair carboidratos (Figura 2). Em ambos os grupos, parece haver uma tendência: quanto maior o tempo de incubação maior a quantidade de carboidratos obtidos. Possivelmente, 5 minutos não é suficiente para aquecer toda amostra de forma homogênea, e isso pode refletir na eficiência do processo de rompimento da parede bacteriana e conseqüentemente, na quantidade de carboidrato extraído. Porém, tanto na concentração da base, como no tempo de incubação a temperatura alta, não é possível afirmar o tipo de carboidrato que está sendo extraído.

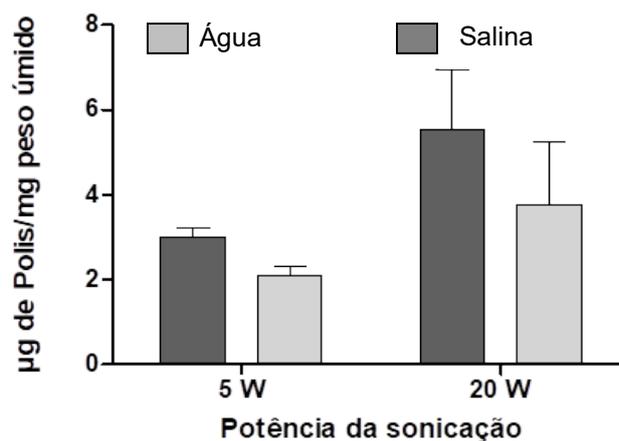


Figura 3: Quantificação dos polissacarídeos extraídos de acordo com diferentes protocolos de sonicação utilizando diferentes solventes (n= 4, média seguida do desvio padrão).

Em relação ao protocolo utilizando sonicação, os resultados também mostraram que todas as condições foram capazes de extrair carboidratos (Figura 3). Além disso, a utilização de salina como solvente parece influenciar a quantidade de carboidratos

presentes (Figura 3). Provavelmente, a presença de íons da solução salina influencia a força iônica que por sua vez, tem influência no processo de extração e/ou solubilização dos carboidratos (ZHANG et al., 2021).

3.2 PADRONIZAÇÕES PARA ESTUDOS DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.1 Seleção da coluna cromatográfica

A Tabela 1 contém os resultados de tempo de retenção (TR), fator de assimetria (As), número de pratos teóricos (N), resolução dos picos (Rs) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para as duas colunas avaliadas com relação a separação de uma solução padrão contendo glucose e raminose (1 mg/mL).

Tabela 1: Tempo de retenção (TR), fator de assimetria (As), número de pratos teóricos (N), resolução (Rs) e coeficiente de determinação (R^2) para coluna 1 (RCM-Monosaccharide Ca²⁺) e coluna 2 (Aminex HPX 87 H) na separação da solução padrão de glucose e raminose 1 mg/mL (média \pm desvio padrão).

Parâmetro	Coluna 1		Coluna 2	
	Glucose	Raminose	Glucose	Raminose
TR (min)	11,5 \pm 0,0	13,0 \pm 0,0	8,7 \pm 0,0	9,8 \pm 0,0
As	1,4 \pm 0,0	1,5 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0
N	3423,0 \pm 4,0	4875,7 \pm 3,2	8054,0 \pm 31,4	8715,0 \pm 100,8
Rs	2,0 \pm 0,0		2,9 \pm 0,0	
R^2	0,995	0,998	0,999	0,999

Como esperado, ambas as colunas apresentaram tempos de retenção diferentes para cada monossacarídeo e todas as amostras analisadas em triplicata apresentaram os mesmos tempos de retenção. O parâmetro As caracteriza a forma do pico e valores mais próximos de 1,0 indicam picos mais simétricos. Nesse caso, a coluna 2 apresentou os melhores resultados para As e a diferença fica evidente na Figura 4, que tem os cromatogramas para cada coluna nas separações de uma mistura de glucose e raminose (1 mg/mL).

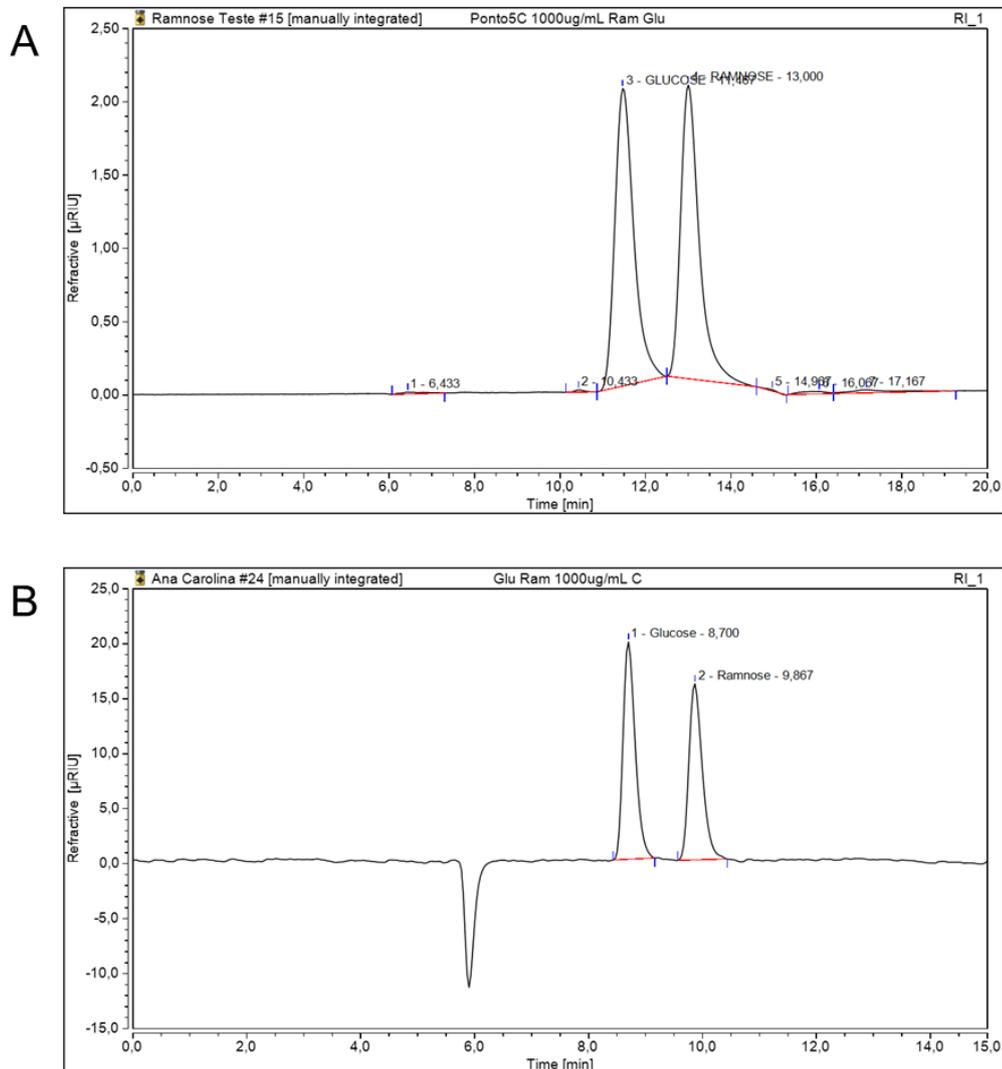


Figura 4: Cromatograma da separação da solução padrão de glucose e raminose 1 mg/mL, onde A) coluna 1 = RCM-Monosaccharide Ca^{+2} , tempo de retenção da glucose = 11,47 min e raminose 13,00 min; B) coluna 2 = Aminex HPX 87 H, tempo de retenção da glucose = 8,70 min e raminose 9,87 min.

O parâmetro N está relacionado à eficiência da coluna e quanto maior N mais finos são os picos (MEYER, 2005). Seguindo este raciocínio e com os resultados da Tabela 2, a coluna 2 apresenta maiores valores para o N e assim, picos cromatográficos mais finos. Já o parâmetro R_s indica uma medida quantitativa da capacidade da coluna de separar dois analitos. A Tabela 2 mostra que a coluna 2 é capaz de separar a glucose de raminose com resolução mais alta que a coluna 1 e os cromatogramas da Figura 4 também destacam esse resultado. R^2 é uma medida estatística de quão próximos os dados estão da linha de regressão ajustada. Ambas as

colunas apresentaram valores de R^2 superiores a 0,99 para cada monossacarídeo. Assim, considerando os resultados da Tabela 2 e os cromatogramas da Figura 4, a coluna 2 apresentou melhores parâmetros de separação para a mistura de glucose e raminose e foi escolhida para os estudos de composição monossacarídica.

3.2.2 Condições de hidrólise dos polissacarídeos

A curva analítica referente a quantificação de glucose foi obtida em 5 níveis de concentração ($y = 0,001x + 0,0114$ e $R^2 = 0,998$) e foi utilizada para a obtenção das quantificações de carboidratos totais. Os resultados descritos na Tabela 2 mostram baixas quantidades de glucose para todas as condições, nem mesmo 50% de rendimento foi obtido. Os maiores rendimentos de hidrólise pertencem ao grupo com 8 horas de incubação a 100 °C. Outros picos além da glucose apareceram no cromatograma de todos os grupos avaliados (dados não mostrados), o que pode explicar o baixo rendimento de hidrólise. Como glicogênio utilizado como padrão foi extraído de ostras, pode ser que outros componentes também tenham sido extraídos. Portanto, a quantificação de carboidratos totais foi utilizada para descobrir se os outros picos seriam carboidratos. Os resultados mostraram que existe uma alta probabilidade de que os picos remanescentes sejam carboidratos, uma vez que os valores de quantificação estão próximos da concentração esperada de glicogênio. Mesmo assim, considerando os resultados de quantificação para a glucose, a condição envolvendo a hidrólise com 8 horas de incubação a 100 °C apresentou melhores resultados de rendimento e para as próximas análises foi padronizada a hidrólise com TFA 2M e 8 horas de incubação a 100°C.

Tabela 2: Quantificação de glucose, rendimento de hidrólise de glicogênio e quantificação de carboidratos totais obtidos para duas molaridades de ácido TFA e tempo de incubação a 100 °C (média ± desvio padrão).

Condição de hidrólise		Quantificação com CLAE-IR			Carboidratos totais (µg/mL)
		Glucose			
Molaridade	Tempo a 100 °C (h)	Esperado (µg/mL)	Quantificado (µg/mL)	Rendimento (%)	
1 M	2	83,3	25,5 ± 6,9	30,6	78,7 ± 5,2
2 M			31,5 ± 8,8	37,8	82,6 ± 4,1
1 M	8	83,3	39,7 ± 0,8	47,8	78,2 ± 3,5
2 M			39,1 ± 0,4	46,9	75,4 ± 13,1

3.3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

As curvas analíticas obtidas para os padrões forneceram as seguintes equações de reta: $y = 0,02183x - 2,547$ ($R^2 = 0,995$) e $y = 0,1912x - 1,6611$ ($R^2 = 0,998$) para glucose e raminose, respectivamente. Com base nessas equações, os valores das amostras de ambos os protocolos de extração foram convertidos em concentração de glucose e raminose e os resultados estão expressos na Tabela 3. Considerando que o PRAM possui em sua composição monômeros de raminose e glucose e que o PIC é um polissacarídeo de glucose, a composição monossacarídica foi determinada com base nestes dois monossacarídeos (glucose e raminose).

A Tabela 3 também apresenta a quantidade de outros picos encontrados nos cromatogramas que não foram eluídos no mesmo tempo de retenção dos padrões. Curiosamente, com exceção da condição envolvendo NaOH 1M, 15 min a 100 °C, todas as outras condições apresentaram outros picos em seus respectivos cromatogramas (Tabela 3, Figura 5 e 6), incluindo os protocolos que utilizaram sonicação como meio de ruptura bacteriana. Pode ser que os picos adicionais encontrados também se refiram a porções de carboidratos presentes no DNA bacteriano. O estudo de de Bruin e Birnboim 2016 mostra que o DNA bacteriano não é hidrolisado na presença de base forte (DE BRUIN; BIRNBOIM, 2016). Outra possibilidade é que a hidrólise do PRAM não tenha sido completa, e os demais picos podem se referir à presença de dissacarídeos ou oligossacarídeos do PRAM.

Os resultados tanto da Tabela 3 como das Figuras 5 e 6, mostram a presença de raminose em todos os protocolos de extração, o que é uma forte evidência da presença dos PRAM.

Tabela 3: Quantificação de glucose e raminose dos polissacarídeos obtidos com o protocolo de extração alcalina a quente e com o protocolo de sonicação, tendo a água é a salina como solventes.

<i>Parâmetros</i>		<i>Quantificação por CLAE - IR</i>		
		<i>Glucose (%)</i>	<i>Raminose (%)</i>	<i>Quantidade de picos desconhecidos</i>
0,5M NaOH, 100 °C	5 min	84,4	15,5	6
	10 min	74,9	25,1	3
	15 min	75,4	24,6	3
1M NaOH, 100 °C	5 min	75,4	24,6	3
	10 min	67,5	32,5	4
	15 min	69,4	30,6	0
Sonicação com água	5W	87,4	12,6	1
	20W	87,3	12,7	5
Sonicação com salina	5W	87,4	12,6	4
	20W	91,7	8,3	5

Para os grupos extraídos com sonicação, os resultados da Tabela 3 sugerem outra observação interessante: mesmo que a potência seja quadruplicada, a porcentagem de ramnose extraída não sofre muitas alterações. A sonicação é costumeiramente empregada na lise de bactérias Gram – negativas, sendo que esse método rompe as células bacterianas com base no fenômeno da cavitação (GOGATE; SUTKAR; PANDIT, 2011). Na cavitação, microbolhas são formadas e colidem com a parede celular bacteriana ocasionando a ruptura celular (GOGATE; SUTKAR; PANDIT, 2011). Talvez a parede celular de peptidoglicano multicamadas presente nas bactérias Gram-positivas dificulte a colisão com as microbolhas (ÜSTÜN-AYTEKIN et al., 2016). Ao mesmo tempo, o aumento da potência pode favorecer a colisão das microbolhas com o PRAM e também causar a remoção da raminose, mesmo em menores porcentagens.

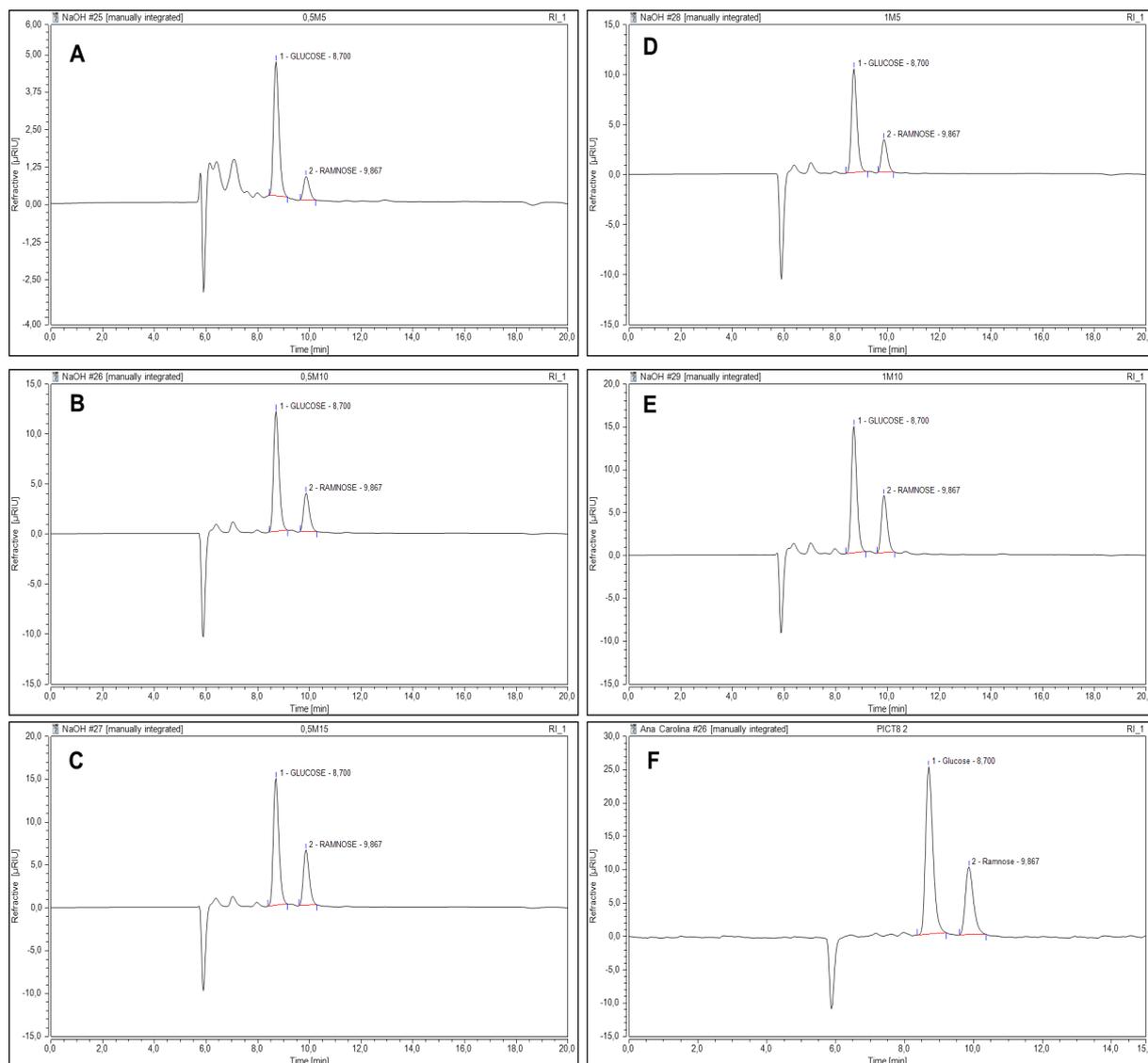


Figura 5: Cromatogramas dos polissacarídeos extraídos com NaOH 0,5 M por 5 (A), 10 (B) e 15 min (C) a 100 °C e com NaOH 1M por 5 (D), 10 (E) e 15 min (F) a 100 °C.

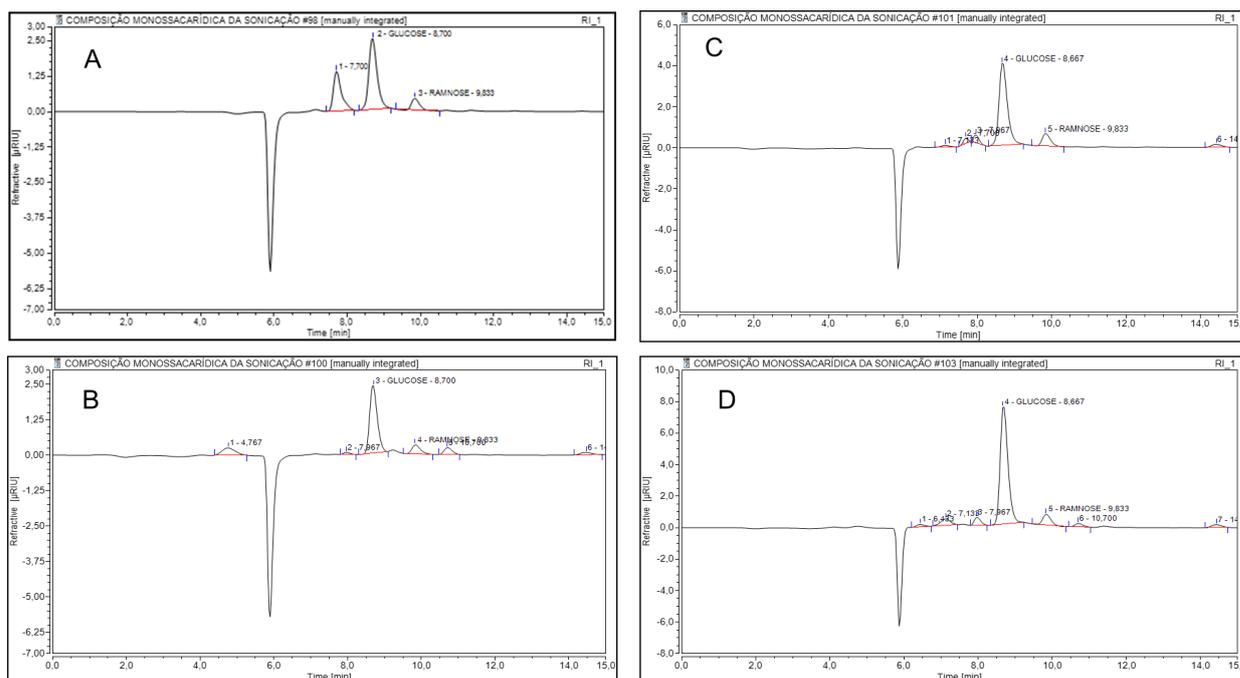


Figura 6: Cromatogramas dos polissacarídeos extraídos com sonicação em água com 5 W (A), 20W (B) e com sonicação em salina com 5W (C) e 20W (D).

3.4 ESTUDOS DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

Os extratos de polissacarídeos foram avaliados por RMN (Tabela 4) e a análise de ligações também foi confirmada por análise de GC-El-MS de acetatos de alditol parcialmente metilados (Tabela 5). Com base em estudos anteriores (LI-HSIN ZANG; HOWSEMAN; SHULMAN, 1991) e na composição de monossacarídeos, verificamos e validamos os sinais de RMN de glicogênio $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ por comparação direta com os mesmos parâmetros de RMN (Figura 7).

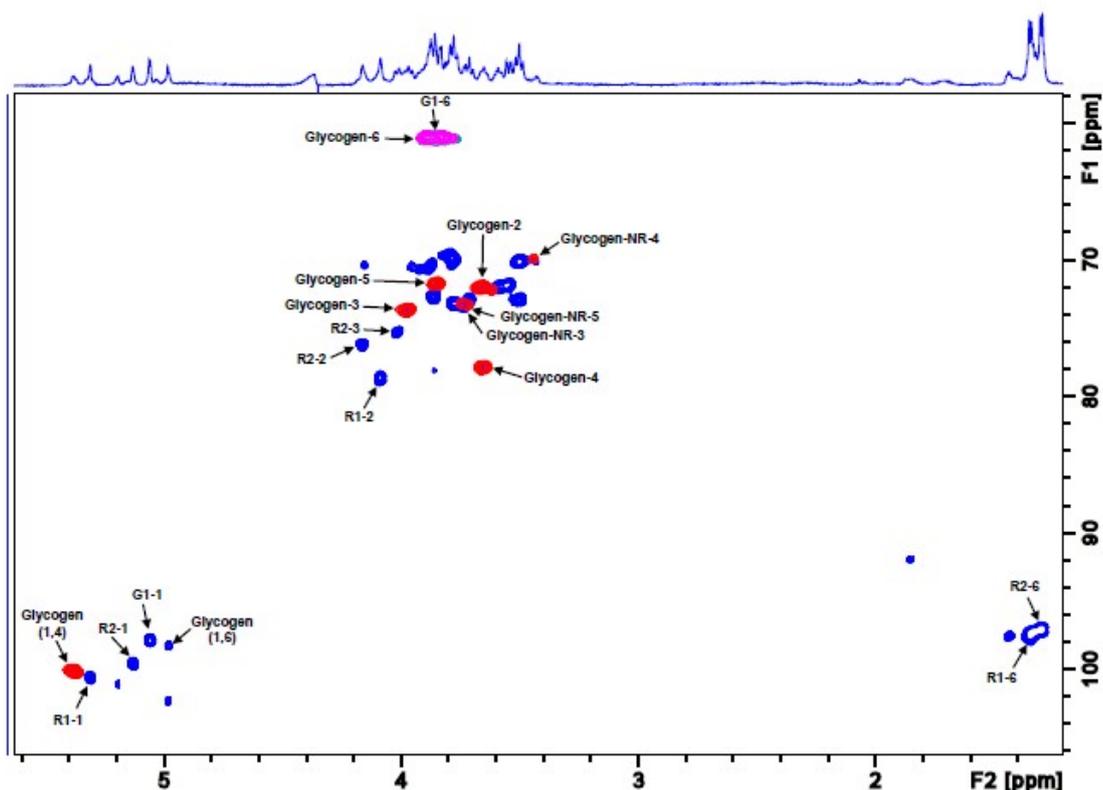


Figura 7: HSQC editado. R1: unidades de raminose α -(1 \rightarrow 2) ligadas, R2: unidades de raminose α -(1 \rightarrow 3) ligadas e G1: unidades de glicose de extremidades não redutoras terminais de PRAM e PIC. Os picos cruzados azuis pertencem aos grupos CH e CH₃ e os verdes aos grupos CH₂ de fase negativa. O padrão de glicogênio HSQC sobreposto é mostrado em picos cruzados vermelhos e magenta para grupos CH₂ de fase negativa. Os principais sinais são representados nos espectros sobrepostos.

Tabela 4: Deslocamentos químicos ¹H e ¹³C do PRAM e do PIC.

Fração	Resíduo	Deslocamento químico (¹ H/ ¹³ C ppm)					
		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
PRAM	\rightarrow 2)- α -L-Rhap (1 \rightarrow R1)	5,31/ 100,6	4,08/ 78,7	3,88/ 70,6	3,54/ 70,1	3,79/ 69,7	1,34/ 17,4
	\rightarrow 2,3)- α -L-Rhap (1 \rightarrow R2)	5,13/ 99,6	4,16/ 76,2	4,02/ 75,3	3,71/ 73,2	3,77/ 69,9	1,30/ 17,2
	\rightarrow 2)- α -D-Glcp (1 \rightarrow G1)	5,05/ 97,9	3,54/ 71,9	3,78/ 73,2	3,50/ 70,1	3,54/ 71,9	3,83/ 61,1
PIC	\rightarrow 4)- α -D-Glcp (1 \rightarrow Glicogênio (1,4)	5,38/ 100,2	3,65/ 72,2	3,97/ 73,7	3,65/ 78,0	3,84/ 71,9	3,88;3,82/ 61,1
	\rightarrow 6)- α -D-Glcp (1 \rightarrow Glicogênio (1,6)	4,98/ 98,6	nd	nd	nd	nd	nd
	α -D-Glcp (1 \rightarrow Glicogênio - NR)	nd	nd	nd	3,43/ 70,1	nd	nd

nd: Atribuições de RMN que não foram determinadas.

A Tabela 4 e a Figura 7 mostram que o HSQC do padrão de glicogênio (em vermelho) apresentou pelo menos seis pontos de sobreposição com os sinais da amostra de polissacarídeos (em azul), incluindo os sinais da cadeia principal do glicogênio α -(1,4) em $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ H1 5,378/100,2 ppm e H4 3,648/78,0 ppm e também os resíduos de glicosil não redutores α -(1,6) em $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ H1 4,98/98,6 ppm e H4 3,43/70,1 ppm. Os resultados da metilação descritos na Tabela 4 sugerem a presença de cinco derivados metilados, sendo três deles relacionados à glucana com ligações α -(1,4) e α -(1,6) e dois derivados da ramnoglucana, com ligações α -(1,2) e α -(1,3).

Tabela 5: Derivados metilados encontrados na amostra contendo os polissacarídeos.

Derivados metilados	Tipos de ligação ^a	% PK ^b
2,3,4,6-Glc	1→	10,7
2,3,6-Glc	1,4→	42,6
2,3-Glc	1,4,6→	4,7
3,4-Rham	1,2→	5,3
4-Rham	1,2,3→	4,6

^aPorcentagem relativa da área do pico em relação à área total

^bBaseado nos derivados acetilados parcialmente metilados

O PRAM foi determinado pela sequência de RMN clássica baseada em 2D COSY, TOCSY e NOESY, seguido por um mapa de correlação HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ editado (Tabela 4). O trabalho prévio de caracterização do PIC foi importante para isolar as sobreposições dos sinais cruzados seguidos de acoplamentos escalares homonucleares racionalizados e através de contatos espaciais NOE. O sinal $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ H1 5,31/100,6 ppm foi atribuído a R1, sendo que os experimentos de COSY e TOCSY forneceram a informação da sequência de prótons do anel (Tabela 4). A sequência de R2 foi determinada por RMN 2D e também por TOCSY 1D, sendo que o sinal $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ H1-5,13/99,6 ppm foi a base para conectar os acoplamentos escalares spin-spin. O resíduo R2 também mostrou os prótons H2 e H3 desprotegidos em 4,16 ppm e 4,02 ppm, respectivamente, sugerindo substituições em O-2 e O-3. Todos os resíduos R1 e R2 foram confirmados não só por H1 a H6 dos experimentos de COSY/NOESY/TOCSY 2D, mas também por acoplamentos escalares H6 e intranoe de cada resíduo de ramnose, uma vez que apresentaram picos cruzados limpos longe da região H1 (Figura 8).

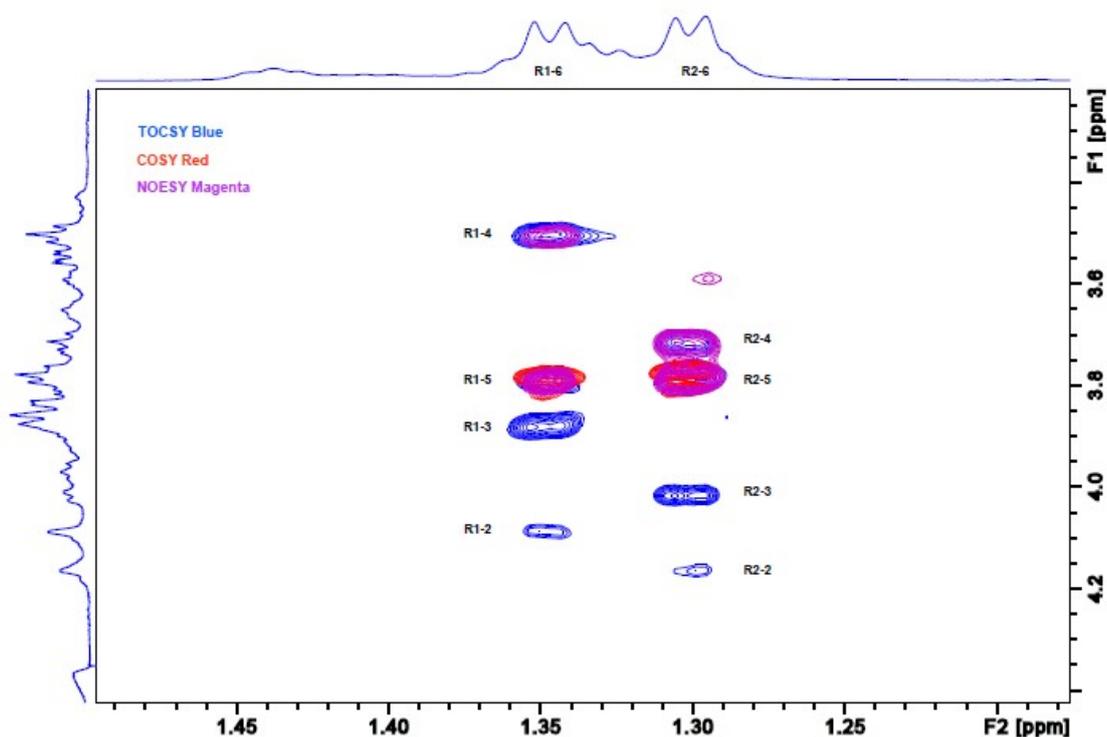


Figura 8: TOCSY sobreposto (azul, tempo de mistura: 160 ms) COSY (vermelho) e NOESY (magenta, tempo de mistura: 200 ms). O sistema de spin R1-H6 e R2-H6 foi demonstrado, NOESY e COSY confirmaram que todos os prótons de ramnose foram determinados e atribuídos pela abordagem de reversão de dupla verificação H1-H6-H1.

Os experimentos de NOESY em R1 mostraram forte correlação R1-H1/R2-H3 em 5,31/4,02 ppm, o que sugere a ligação de unidades R1 α -(1 \rightarrow 2) em O-3 de resíduos da ramnose de R2 α -(1 \rightarrow 3). Este último tem fortes correlações NOE em 5,13/4,16 ppm e 5,13/4,08 ppm, sendo que esses contatos são de substituição O-2 de R2 por extremidades não redutoras de glucose (G1 5,05/97,9 ppm) e de ligação O-2 a R1 α -(1 \rightarrow 3) (Figura 9). As atribuições de RMN das unidades de ramnose foram comparadas com os dados da literatura e estão de acordo com trabalhos anteriores de outras ramninas descritas para *Agrobacterium tumefaciens* (DE CASTRO et al., 2006) e *Lactococcus lactis* (SADOVSKAYA et al., 2017).

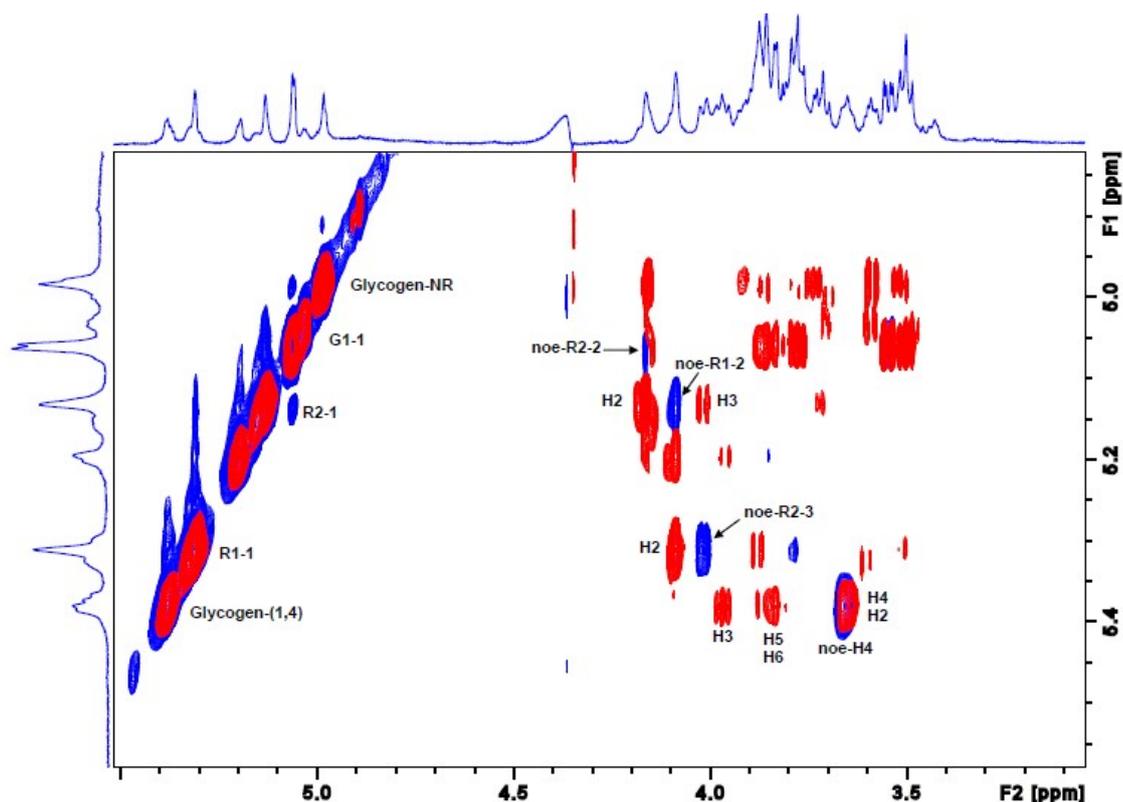


Figura 9: Espectros 2D-NOESY (azul) e TOCSY (vermelho) sobrepostos de PRAM e PIC. Os principais sinais são representados nos espectros sobrepostos e nos contatos de NOE.

A substituição de glucopiranosil terminal é confirmada pela correlação de contato NOE em 5,05/4,16 ppm (H1-G1/H2-R2). Para isolar todos os prótons R1, R2, G1 e os prótons do glicogênio e confirmar o conjunto de dados 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, séries de TOCSY 1D foram realizadas usando 200 ms de tempo de mistura (Figura 10), sendo que cada espectro concorda e define a RMN completa de próton ^1H da mistura de polissacarídeos.

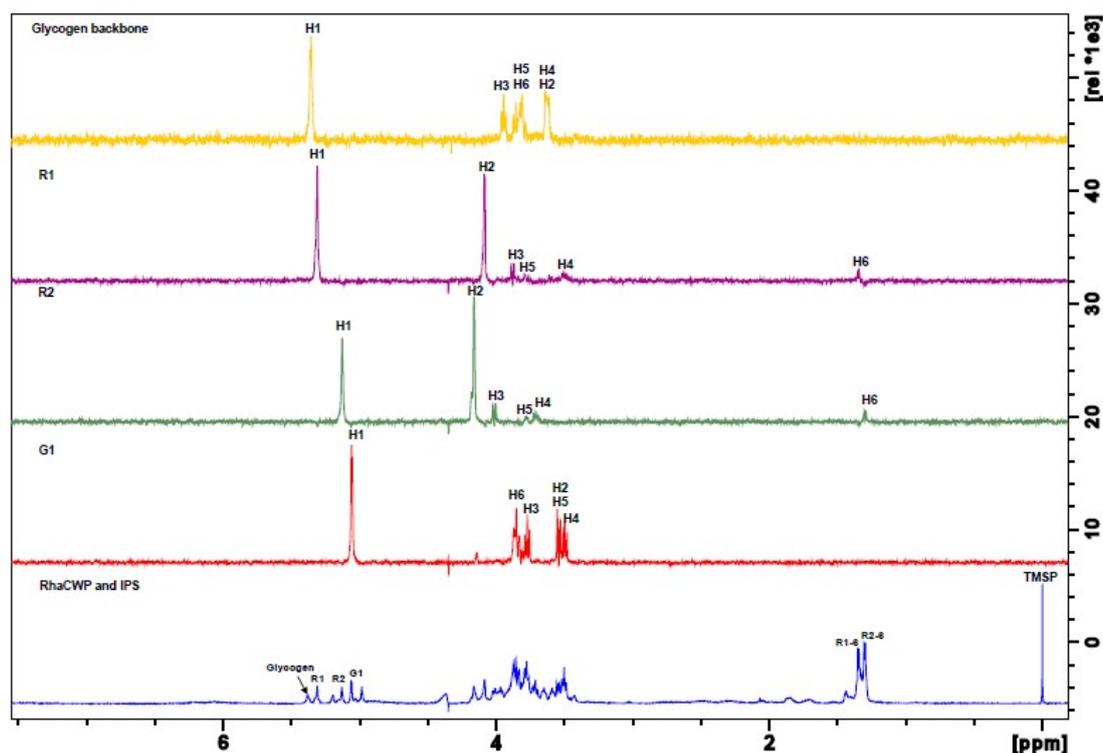


Figura 10: TOCSY seletivo 1D sobreposto (tempo de mistura de 200 ms) de R1, R2, G1 e prótons de glicogênio, cada espectro concorda com o próton ^1H completo da mistura de polissacarídeos (parte inferior).

A fim de determinar a massa molecular dos polissacarídeos na amostra, o experimento de DOSY foi realizado e a massa molecular foi determinada com base na constante de difusão (D). Utilizando os campos de gradiente calibrados de 2% a 98% e, conhecendo os padrões de massa molecular, a massa molecular de PIC foi estimada em 11298 Da (Figura 11), que é ~ 7 vezes menor que o padrão de glicogênio (80330 Da). Para o PRAM, o valor de $\text{Log}D$ -10,527, deu origem a uma massa molecular de 11298 Da, que é semelhante ao PIC (Figura 11). A projeção do $\text{Log}D$ do padrão de glicogênio também demonstra maior polidispersidade com variação de -10,635 a -10,403, o que representa 123.954 Da a 48.549 Da. No caso de PRAM, a polidispersidade é menor com $\text{Log}D$ nítido -10,068 a -10,052.

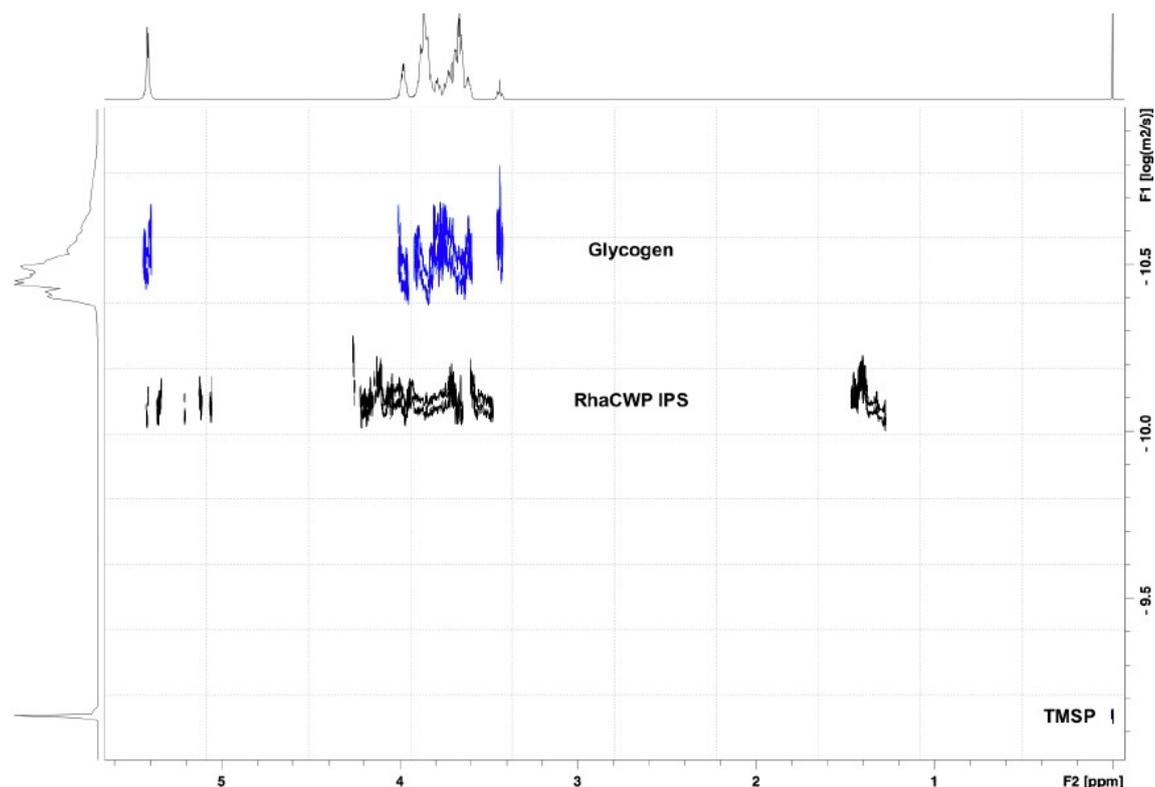


Figura 11: Espectros 2D-DOSY sobrepostos de padrão de glicogênio (azul), PRAM e PIC (preto). Projeção do espectro de RMN de ^1H do glicogênio (topo). Os deslocamentos químicos são mostrados no eixo x e os valores do eixo y do log do coeficiente de difusão obtidos a 298 K, a projeção do Log D do glicogênio está em azul no eixo y.

4. DISCUSSÃO

A importância do PRAM e do PIC para a sobrevivência bacteriana é bem estabelecida na literatura, mas a caracterização química de suas estruturas pode ajudar a entender melhor as funções destes polissacarídeos, sendo uma importante ferramenta para o esclarecimento de suas propriedades biológicas. Ou seja, a função dos polissacarídeos pode ser melhor compreendida a partir de estudos sobre sua conformação química detalhada, impactando em um maior entendimento futuro do papel da parede celular e do armazenamento energético em estreptococos. Neste trabalho, diversos protocolos de extração de polissacarídeos foram analisados, sendo um deles selecionado para o isolamento de uma fração contendo PRAM e PIC, os quais foram resolvidos estruturalmente.

Em muitas bactérias, a parede celular consiste de várias camadas de peptidoglicano covalentemente ligado a polissacarídeos contendo raminose, que compreendem cerca de 40% a 60% da parede celular em peso (MISTOU; SUTCLIFFE; VAN SORGE, 2016). Estudos genéticos confirmaram a importância estrutural desta

molécula para bactérias do grupo estreptococos: a ausência dos polissacarídeos contendo ramnose resultou em anormalidades graves de crescimento e divisão celular (VAN DER BEEK et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a cepa defeituosa de PRAM foi mais sensível à canamicina, espectinomicina, bacitracina, ampicilina e nisina do que a cepa selvagem (TSUDA et al., 2002), sugerindo que este polissacarídeo pode atuar como uma barreira que impede que alguns antibióticos atinjam suas moléculas-alvo. Apesar de sua importância, até o momento há uma clara ausência de estrutura química detalhada do PRAM por análise estrutural, o que traria uma compreensão mais detalhada sobre a parede celular de *S. mutans*.

Em *S. mutans*, os polissacarídeos de armazenamento representam uma classe criticamente importante de polímeros, pois possibilitam que a produção de ácido bacteriano possa ocorrer mesmo na ausência de carboidratos da dieta (BUSUIOC et al., 2009). A estrutura química exata desta poliglucana em *S. mutans* não é tão clara quanto em células animais, mas vários estudos mostraram que o glicogênio bacteriano é formado de glucoses em ligações α -(1 \rightarrow 4) em sua estrutura principal e α -(1 \rightarrow 6) nos pontos de ramificação (WILSON et al., 2010). No entanto, as α -glucanas bacterianas podem diferir em suas propriedades estruturais, principalmente devido aos tipos de atividades e às dinâmicas dos biofilmes. Di Persio et al., (1974) assumiram que o PIC é um polissacarídeo semelhante ao glicogênio com base na observação de grânulos iodofílicos e utilizando outros estudos em *Streptococcus mitis* (BERMAN; GIBBONS; NALBANDIAN, 1967) e *Escherichia coli* (CEDERGREN; HOLME, 1959) como referência. Em outro estudo, um polissacarídeo intracelular iodofílico produzido por uma cepa de *Streptococcus mitis* (GIBBONS; KAPSIMALIS, 1963) foi sugerido como sendo um polissacarídeo do tipo glicogênio-amilopectina. No entanto, resultados falso-positivos são possíveis para a coloração com iodo, uma vez que esse método não é estritamente específico para glicogênio, pois outros polissacarídeos contendo cadeia helicoidal podem produzir complexos coloridos e interferir na interpretação dos resultados (BRUST; ORZECOWSKI; FETTKE, 2020).

Em relação aos protocolos de obtenção dos polissacarídeos, os resultados dos grupos sonificados sugerem que o aumento da amplitude promove uma maior recuperação de carboidratos, sendo que os maiores valores foram obtidos para a amplitude de 20%. Provavelmente, com o aumento da amplitude, há o aumento da formação das microbolhas originadas pela ponta do sonificador, o que pode influenciar diretamente no rompimento da parede celular da bactéria (PITT; HUSSEINI; STAPLES,

2004). Além disso, comparando-se os resultados com relação aos solventes, a solução salina parece contribuir para extração de maior quantidade de carboidrato, o que pode ser justificado pela alteração da força iônica no meio (CHIBA et al., 2015). Estes autores utilizaram cloreto de sódio na extração de polissacarídeos extracelulares de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e observaram uma maior extração dos polissacarídeos se comparados ao grupo tratado na ausência dos íons. Já os resultados de quantificação dos polissacarídeos obtidos pelo método de extração alcalina a quente mostram que a maior concentração de NaOH e o maior tempo de incubação favoreceram a extração de maior quantidade de carboidratos. A utilização de base forte e temperatura alta têm sido utilizadas para o estudo de PICs há muito tempo. DiPersio et al., (1974) extraíram o PIC de células planctônicas de *S. mutans* (incubação das amostras com KOH por 90 min a 100 °C) e utilizaram uma reação com iodo para complexação com polissacarídeos tipo glicogênio, quantificando os carboidratos por espectrofotometria a 520 nm (DIPERSIO et al., 1974). Entretanto, este ensaio colorimétrico não diferencia tipos de polissacarídeo. No presente trabalho, o recurso CLAE-IR nos auxiliou na tomada de decisão para a seleção do melhor protocolo de extração: dos grupos tratados com as diferentes concentrações de base e tempos de incubação, apenas aqueles submetidos ao parâmetro NaOH 1M a quente por 15 minutos não apresentaram picos adicionais no cromatograma, sugerindo que com este tratamento não houve fragmentação da molécula de estudo. Entretanto, apesar de justificarmos nossa escolha por este parâmetro para análise qualitativa dos carboidratos de parede e intracelular, estudos futuros devem validar este protocolo para estudos quantitativos dos mesmos polímeros.

Métodos químicos (base forte) e físicos (sonicação) têm sido utilizados para hidrolisar paredes celulares de microrganismos (SHEHADUL ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017), liberando seu conteúdo intracelular para posterior quantificação de carboidratos. A coloração com iodo (DIPERSIO et al., 1974), por exemplo, é uma técnica bastante utilizada como um procedimento qualitativo ou quantitativo de carboidratos intracelulares. No entanto, estudos dessa natureza carecem de uma metodologia para determinar a estrutura do polissacarídeo liberado durante o processo de hidrólise da parede celular. Assim, tanto o estudo dos métodos de hidrólise de parede celular quanto o estudo do conteúdo intracelular devem considerar a diferenciação química de homopolímeros obtidos durante o processo de extração. Gibbons (1964) observou que outros carboidratos celulares, presumivelmente

originados da parede celular, estavam presentes em preparações contendo polímeros intracelulares (GIBBONS, 1964). Assim, a extração de polissacarídeos proposta continha outro polímero além daquele do tipo glicogênio. Assim, considerando que a obtenção do homogenato é uma etapa crítica para estudar PRAM e PIC, é essencial desenvolver técnicas de extração que minimizem esses problemas e que possam caracterizar os diversos componentes de uma mistura. Neste contexto, as análises de RMN podem ser uma abordagem viável para estudar frações dessa natureza, uma vez que este método permite rápida identificação, atribuição e caracterização estrutural dos componentes em misturas.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma ferramenta muito poderosa em química. Esta técnica baseia-se no fato de que os núcleos possuem uma propriedade intrínseca chamada spin. Quando uma molécula é colocada em um campo magnético forte, uma pequena fração de todos os spins se alinham com o campo, resultando em um leve alinhamento líquido paralelo a ele. No campo magnético, a energia dos estados de spin será diferente e quando esses níveis de energia são perturbados, um sinal se torna detectável e dá origem a informações sobre átomos individuais em uma molécula e seu ambiente (RHODES, 2017). As análises por RMN não se limitam ao estudo de uma molécula purificada, mas têm sido aplicadas à análise quantitativa de misturas de polissacarídeos em sistemas complexos (YAO et al., 2021; YUAN et al., 2021).

O conhecimento sobre a estrutura, conformação e dinâmica dos carboidratos são importantes para compreensão de como funcionam os carboidratos em sistemas biológicos. A ressonância magnética nuclear, uma ferramenta bem estabelecida para a caracterização estrutural de polissacarídeos extracelulares de *S. mutans* (AIRES et al., 2011, 2016), foi usada aqui para determinar as estruturas de PRAM e PIC. Além disso, até onde sabemos, nenhuma das duas estruturas foram previamente resolvidas por espectroscopia de RMN. A estrutura do PRAM foi prevista por Shibata e colegas usando um sistema de expressão heterólogo dos vários genes de *S. mutans* em *Escherichia coli* (SHIBATA et al., 2002). No entanto, embora os autores tenham sugerido a possibilidade de semelhanças nas regiões de ligação dos sorotipos de *S. mutans* e (PRITCHARD et al., 1986) e *f* (PRITCHARD et al., 1987) polissacarídeos, este é o primeiro relato sobre a composição química de PRAM de *S. mutans* sorotipo *c*. Além disso, foi descrita a estrutura química do PIC, que ajudará a promover a aplicação

da RMN em mistura de polissacarídeos de interesse biológico, além de fornecer informações valiosas sobre polímeros de bactérias patogênicas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, a partir de um protocolo de extração alcalina foi possível obter e caracterizar estruturalmente dois polissacarídeos bacterianos em uma única fração: um polissacarídeo de parede bacteriana, determinado como uma ramnoglucana (contendo ligações do tipo α -(1,2) e α -(1,3) na sua cadeia principal de raminose e pontos de ramificação de glucose) e um polissacarídeo de reserva bacteriana, uma glucana (com ligações do tipo α -(1,4) na sua cadeia principal de glucose e pontos de ramificação de glucose com ligações do tipo α -(1,6)) com estrutura química semelhante ao glicogênio.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho propusemos um protocolo de extração para estudo qualitativo de polissacarídeo de parede celular e de polissacarídeo intracelular de *Streptococcus mutans* utilizando ressonância magnética nuclear (RMN). Para a continuidade deste trabalho, uma sugestão pertinente é propor que este protocolo seja validado para análises quantitativas dos polissacarídeos intracelulares por RMN. A validação se daria pela dose-resposta a antimicrobianos, o que potencializaria o estudo de substâncias com potencial anticárie, além de contribuir com um maior entendimento dos polímeros de reserva intracelular na rota metabólica de *S. mutans*.

Outra alternativa relevante para a continuidade deste estudo seria avaliar se a estrutura química dos polissacarídeos de parede celular pode ser alterada na presença de diferentes moléculas. Esta pode ser a chave para desenho de futuros alvos terapêuticos para antimicrobianos, além de ampliar o espectro de entendimento sobre o mecanismo de ação de diversos antibióticos.

7. BIBLIOGRAFIA

AIRES, C. et al. Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1215–1220, 2011.

AIRES, C. P. et al. Effect of a lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ. **Caries Research**, v. 36, n. 3, p. 167–169, 2002.

AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380–386, 2008.

- AIRES, C. P. et al. *Baccharis dracunculifolia*-based mouthrinse alters the exopolysaccharide structure in cariogenic biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 301–307, 2016.
- AJDIĆ, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14434–14439, 2002.
- BERMAN, K. S.; GIBBONS, R. J.; NALBANDIAN, J. Localization of intracellular polysaccharide granules in *Streptococcus mitis*. **Archives of Oral Biology**, v. 12, n. 10, p. 1133–1138, 1967.
- BOWEN, W. H. et al. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 229–242, 2018.
- BRUST, H.; ORZECOWSKI, S.; FETTKE, J. Starch and glycogen analyses: methods and techniques. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 1020, 2020.
- BUSUIOC, M. et al. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7315–7322, 2009.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 2, p. 135–141, 2010.
- CEDERGREN, B.; HOLME, T. On the glycogen in *Escherichia coli* B; electron microscopy of ultrathin sections of cells. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 3, p. 70–73, 1959.
- CHIBA, A. et al. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 392–403, 2015.
- COSTA OLIVEIRA, B. E. et al. Polysaccharides in bacterial biofilm. In: OLIVEIRA, J. M.; RADHOUANI, H.; REIS, R. L. (Eds.). **Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–26.
- COSTA OLIVEIRA, B. E. et al. The route of sucrose utilization by *Streptococcus mutans* affects intracellular polysaccharide metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 636684, 2021.
- COSTA OLIVEIRA, B. E.; CURY, J. A.; RICOMINI FILHO, A. P. Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181168, 2017.
- CURY, J. A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p. 491–497, 2000.
- DE BRUIN, O. M.; BIRNBOIM, H. C. A method for assessing efficiency of bacterial cell disruption and DNA release. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 197, 2016.

- DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **Journal of Dental Research**, v. 67, n. 6, p. 890–895, 1988.
- DIPERSIO, J. R. et al. Measurement of intracellular iodophilic polysaccharide in two cariogenic strains of *Streptococcus mutans* by cytochemical and chemical methods. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 597–604, 1974.
- DUBOIS, MICHEL. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 182–191, 2004.
- GIBBONS, R. J. Metabolism of intracellular polysaccharide by *Streptococcus mitis* and its relation to inducible enzyme formation. **Journal of Bacteriology**, v. 87, p. 1512–1520, 1964.
- GIBBONS, R. J.; KAPSIMALIS, B. Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. **Archives of Oral Biology**, v. 8, p. 319–329, 1963.
- GOGATE, P. R.; SUTKAR, V. S.; PANDIT, A. B. Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 166, n. 3, p. 1066–1082, 2011.
- IMRAN, B. et al. Removal and recovery of sodium hydroxide (NaOH) from industrial wastewater by two-stage diffusion dialysis (DD) and electrodialysis (ED) processes. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 17, p. 7926–7932, 2016
- KIM, K. et al. Severity of dental caries and risk of coronary heart disease in middle-aged men and women: a population-based cohort study of Korean adults, 2002-2013. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10491, 2019.
- KLEIN, M. I. et al. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 10, 2015.
- KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782–789, 2003.
- KOVACS, C. J. et al. *Streptococcus mutans* requires mature rhamnase-glucose polysaccharides for proper pathophysiology, morphogenesis and cellular division. **Molecular Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 944–959, 2019.
- LEMOS, J. A. et al. The biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, 2019.
- MATTOS-GRANER, R. O. et al. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1371–1377, 2000.

MEYER, V. R. CHROMATOGRAPHY | Principles. In: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 98–105.

MISTOU, M.-Y.; SUTCLIFFE, I. C.; VAN SORGE, N. M. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 464–479, 2016.

NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 891–902, 2009.

NOBRE DOS SANTOS, M. et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Research**, v. 36, n. 5, p. 347–352, 2002.

PAES LEME, A. F. et al. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 878–887, 2006.

PITT, W. G.; HUSSEINI, G. A.; STAPLES, B. J. Ultrasonic drug delivery--a general review. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 37–56, 2004.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 3, p. 17030, 25 2017.

PRITCHARD, D. G. et al. Characterization of the serotype e polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. **Molecular Immunology**, v. 23, n. 2, p. 141–145, 1986.

PRITCHARD, D. G. et al. Structure of the serotype f polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. **Carbohydrate Research**, v. 166, n. 1, p. 123–131, 1987.

RHODES, C. J. Magnetic resonance spectroscopy. **Science Progress**, v. 100, n. 3, p. 241–292, 2017.

ROGER, P. et al. Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 631–641, 2011.

SASSAKI, G. L. et al. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1, p. 215–222, 2008.

SEKAR, K. et al. Bacterial glycogen provides short-term benefits in changing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 9, p. e00049-20, 2020.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet (London, England)**, v. 369, n. 9555, p. 51–59, 2007.

SHEHADUL ISLAM, M.; ARYASOMAYAJULA, A.; SELVAGANAPATHY, P. R. A Review on macroscale and microscale cell lysis methods. **Micromachines**, v. 8, n. 3, p. 83, 2017.

- SHIBATA, Y. et al. Expression and characterization of streptococcal *rgp* genes required for rhamnan synthesis in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2891–2898, 2002.
- SHIBATA, Y.; YAMASHITA, Y.; VAN DER PLOEG, J. R. The serotype-specific glucose side chain of rhamnose-glucose polysaccharides is essential for adsorption of bacteriophage M102 to *Streptococcus mutans*. **FEMS microbiology letters**, v. 294, n. 1, p. 68–73, 2009.
- SOUZA, S. E. et al. Starch combined with sucrose provokes greater root dentine demineralization than sucrose alone. **Caries Research**, v. 52, n. 4, p. 323–330, 2018.
- SPATAFORA, G. et al. A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2556–2563, 1995.
- TENUTA, L. M. A. et al. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Research**, v. 40, n. 6, p. 546–549, 2006.
- TSUDA, H. et al. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3756–3764, 2002.
- ÜSTÜN-AYTEKIN, Ö. et al. Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 163–171, 2016.
- VALM, A. M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 2957–2969, 2019.
- VAN DER BEEK, S. L. et al. GacA is essential for Group A Streptococcus and defines a new class of monomeric dTDP-4-dehydrorhamnose reductases (RmlD). **Molecular Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 946–962, 2015.
- WILSON, W. A. et al. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 6, p. 952–985, 2010.
- YAO, H.-Y.-Y. et al. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 143, p. 110290, 2021.
- YUAN, B. et al. NMR for mixture analysis: concentration-ordered spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 28, p. 9697–9703, 2021.
- ZHANG, Q. et al. Effect of sodium chloride on the thermodynamic, rheological, and microstructural properties of field pea protein isolate/chitosan complex coacervates. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128569, 2021.

