

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

PRISCILA LOUISE MARCANTE

**ISOLAMENTO E BIOPROSPECÇÃO DE CEPAS FÚNGICAS DO
SUDOESTE DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2018**

PRISCILA LOUISE MARCANTE

**ISOLAMENTO E BIOPROSPECÇÃO DE CEPAS FÚNGICAS DO
SUDOESTE DO PARANÁ**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), câmpus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Coorientador: Michel da Silva Fonseca

Pato Branco – PR

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e pela força a mim concedida para sempre continuar o caminho e nunca desistir;

Agradeço a minha família pela educação e pelos princípios a mim repassados. Ao meu esposo Edson, agradeço pelo apoio e pelo suporte em meus momentos de alegria e de tristeza;

Ao meu orientador Mário, Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, agradeço infinitamente por contribuir na minha vida acadêmica, me concedendo o presente trabalho, e na minha vida pessoal, me ensinando a ter fé e bom animo em busca de bons resultados.

Ao meu coorientador Michel da Silva Fonseca, não apenas agradeço pelos ensinamentos a mim repassados, como também agradeço pela sua amizade e grande contribuição no presente trabalho.

Aos colegas de laboratório, por toda a ajuda, carinho e atenção, meu eterno agradecimento.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação, seja profissional ou pessoal.

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado Isolamento e bioprospecção de cepas fúngicas do sudoeste do Paraná foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.2.2018** de 2018.

Fizeram parte da banca os professores.

Mario A. A. da Cunha
Orientador

Edilson da Silva Ferreira
Membro da Banca

Vidiany A. Q. Santos
Membro da Banca

RESUMO

MARCANTE, Priscila Louise. Isolamento e bioprospecção de cepas fúngicas do sudoeste do Paraná. 2018. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

Polissacarídeos oriundos de organismos vivos apresentam estruturas diversificadas em relação a composição monomérica, grau de ramificação, tipos de ligações e comprimento das cadeias. Os exopolissacarídeos (EPS) ou polissacarídeos extracelulares, são biopolímeros produzidos e excretados para fora das células por alguns microrganismos. Muitos EPS podem atuar como agentes antioxidantes, hipocolesterolêmicos, antivirais, biorremediadores, entre outras funções. Em cultivos submersos, os exopolissacarídeos podem ser recuperados do meio de cultivo livre de células por processos simples como desidratação com etanol. O presente trabalho teve como principal objetivo o isolamento de fungos filamentosos e bioprospecção quanto a produção de EPS. Foram isoladas em placas de ágar Sabouraud com Cloranfenicol, vinte cepas de fungos filamentosos da região rural do município de Pato Branco e do câmpus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Os fungos selecionados como produtores de EPS foram avaliados quanto ao perfil cinético da produção de EPS e crescimento celular. Os ensaios cinéticos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo Meio Mínimo de Vogel, 20 g L⁻¹ de glicose, pH inicial de 5,5 e incubados em agitador orbital por 96h a 28 °C e 150 rpm. Os exopolissacarídeos produzidos foram submetidos a caracterização parcial por análises de infravermelho (IV-TF/RTA), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e solubilidade em água. Duas cepas de fungos filamentosos foram identificadas como promissoras produtoras de EPS. O isolado n.º 6 produziu 1,31 g L⁻¹ de EPS e 4,63 L⁻¹ de biomassa micelial, enquanto o isolado n.º 14 produziu 1,06 g L⁻¹ e 2,64 g L⁻¹ de EPS e biomassa micelial, respectivamente. Os espectros de infravermelho de ambos os EPS apresentaram bandas características de polissacarídeos, presença de anel de glicose e sugerem a presença de ligação glicosídica tipo β. Os difratogramas de raios X demonstraram que os EPS apresentam estrutura predominantemente amorfa com presença de regiões semicristalinas. A microscopia eletrônica de varredura mostrou a presença de estruturas fibrilares e filmes finos translúcidos com superfície irregular em ambas as amostras. Na amostra n.º 14 também foi observada a presença de estruturas particuladas com dimensões irregulares distribuídas ao longo da superfície. A amostra n.º 6 apresentou maior solubilidade (47,08 mg 100 mL⁻¹) do que a amostra n.º 14 (35,42 mg 100 mL⁻¹).

Palavras-chave: Biopolímeros. Exopolissacarídeos fúngicos. Seleção de fungos filamentosos.

ABSTRACT

MARCANTE, Priscila Louise. Isolation and bioprospection of fungal strains from southwestern Paraná. 2018. 48 S. Undergraduate final project – Bachelor of Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2018.

Polysaccharides from living organisms have different structures in relation to the monomeric composition, degree of branching, types of bonds and length of the chains. Exopolysaccharides (EPS) or extracellular polysaccharides, are biopolymers produced and excreted out of cells by some microorganisms. Many EPS can act as antioxidants, hypocholesterolemic, antivirals, bioremediation agents, among other functions. In submerged cultures, the exopolysaccharides can be recovered from the cell-free culture medium by simple processes such as dehydration with ethanol. The present work aimed the isolation of filamentous fungi and bioprospection as the production of EPS. Twenty strains of filamentous fungi were isolated from the rural region of Pato Branco and from the campus of the Federal Technological University of Paraná on Sabouraud-chloramphenicol agar plates. The fungi selected as producers of EPS were evaluated for the kinetic profile of EPS production and cell growth. The kinetic assays were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks, containing Minimal Vogel Medium, 20 g L⁻¹ glucose, initial pH 5.5 in orbital incubator for 96h at 28 °C and 150 rpm. The exopolysaccharides produced were subjected to partial characterization by analysis of Infra-Red (IV-FT/ATR), X-Ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and water solubility. Two strains of filamentous fungi were identified as promising EPS producers. The isolate no. 6 produced 1.31 g L⁻¹ of EPS and 4.63 L⁻¹ of mycelial biomass, while isolate no. 14 yielded 1.06 g L⁻¹ and 2.64 g L⁻¹ EPS and mycelial biomass, respectively. The infrared spectra of both EPS showed characteristic bands of polysaccharides, presence of glucose ring and suggest the presence of β type glycosidic binding. The X-Ray diffractograms showed that the EPS are predominantly amorphous, with semicrystalline regions. Scanning electron microscopy showed the presence of fibrillar structures and translucent thin films with irregular surface in both samples. Particulate structures with irregular dimensions distributed along the surface were also observed in sample no. 14. Sample no. 6 showed higher solubility (47.08 mg 100 mL⁻¹) than sample no 14 (35.42 mg 100 mL⁻¹).

Keywords: Biopolymers. Fungal exopolysaccharides. Selection of filamentous fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil de produção EPS, crescimento micelial e consumo de substrato ao longo de 96 h de cultivo do isolado nº 6.	32
Figura 2 - Perfil de produção EPS, crescimento micelial e consumo de substrato ao longo de 96 h de cultivo do isolado 14.	34
Figura 3 - Espectros de Infravermelho dos exopolissacarídeos produzidos pelos isolados 6 e 14.	36
Figura 4 - Difractogramas de Raios-X dos exopolissacarídeos produzidos pelos isolados 6 e 14.	37
Figura 5 - Micrografias com amplitudes de 100 X (B), 500 X (C), 800 X (D) e 2000 X (E), referentes aos exopolissacarídeos do isolados 6 (a esquerda) e 14 (a direita)..	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características macromorfológicas e avaliação do potencial de produção de exopolissacarídeos pelas cepas fúngicas isoladas.	28
Tabela 2 - Produção média de biomassa micelial e EPS, variação do pH do meio e percentual de consumo de substrato ao longo do cultivo com o isolado n.º 6.	32
Tabela 3 - Parâmetros fermentativos do processo de produção de exopolissacarídeo pelo isolado 6 em 96 h.	33
Tabela 4 - Produção média de biomassa micelial e EPS, variação do pH do meio e percentual de consumo de substrato ao longo do cultivo com o isolado n.º 14	34
Tabela 5 - Parâmetros fermentativos do processo de produção de exopolissacarídeo pelo isolado 14 em 96h.	35
Tabela 6 - Análise estatística da produção de exopolissacarídeos pelos isolados 6 e 14.	35
Tabela 7 - Determinação da Solubilidade dos exopolissacarídeos.	39

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIações

EPS	Exopolissacarídeo
IVTF-RTA	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DRX	Difratometria de Raios X
MMV	Meio Mínimo de Vogel
EUA	Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g L ⁻¹	Grama por Litro
%	Por cento
mL	Mililitro
rpm	Rotações por Minuto
mA	Mili Ampere
kV	Kilo Volt
min	Minuto
mg	Miligramma
Å	Angstrom
°	Graus
m v ⁻¹	Massa por Volume
µL	Microlitro
mm	Milímetro
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
cm ⁻¹	Centímetro
CuKα	Energia de raios X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 FUNGOS FILAMENTOSOS	15
3.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS.....	17
3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO CELULAR.....	20
4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO	20
4.2.1 Preparo do inóculo	20
4.2.2 Avaliação inicial do potencial de produção de exopolissacarídeos	21
4.2.3 Avaliação cinética.....	21
4.2.4 Recuperação e quantificação do EPS e da biomassa celular	21
4.2.5 Avaliação do conteúdo de carboidratos totais nos EPS	22
4.2.6 Determinação de parâmetros fermentativos.....	22
4.2.7 Análise estatística	25
4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS ISOLADOS.....	25
4.3.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier – Reflectância Total Atenuada (IV-TF/RTA).....	25
4.3.2 Análise por Difração de Raios-X (DRX).....	25
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	25
4.4 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE EXOPOLISSACARÍDEOS: ENSAIO DE BIOPRODUÇÃO.....	27
5.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS	35
5.2.1 Análise por espectroscopia na região do Infravermelho – Refletância Total Atenuada (IV-TF/RTA)	35
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
5.3 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	39
6 CONCLUSÃO	40

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
APÊNDICE E ANEXOS	47
APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE AÇÚCARES TOTAIS - CINÉTICA	47
ANEXO A – TABELA TESTE T DE STUDENT	48

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos constituem o grupo de macromoléculas mais abundantes da biosfera, estando presentes em todos os organismos vivos e apresentando diferentes propriedades e aplicações. São constituídas de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas e diferenciam-se entre si no tamanho da cadeia carbônica, nas configurações das ligações glicosídicas e no grau de ramificação (SOMENSI, 2014).

Atualmente, fungos, bactérias, microalgas e plantas vem sendo pesquisados como potenciais fontes de polissacarídeos. A possibilidade de utilização destas biomacromoléculas nos setores farmacológico, médico e alimentício tem estimulado diferentes grupos de pesquisa a estudar sua produção. São relatados na literatura científica diferentes funcionalidades biológicas atribuídas aos polissacarídeos, incluindo atividade anticoagulante, antitrombótica, antitumoral (VEVERKA, 2014), antioxidante, antiviral e imunomodulação (CALEGARI, 2016; KAGIMURA, 2015).

Polissacarídeos fúngicos podem ser isolados da parede celular do corpo de frutificação, do micélio, do esclerócio (estrutura formada por hifas entrelaçadas, resultando em um reservatório) e alguns fungos são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares, que podem ser facilmente produzidos em cultivos submersos e recuperados por processos relativamente simples e de baixo custo (CUNHA et al, 2012).

Neste contexto, a bioprospecção de fungos filamentosos quanto a produção de exopolissacarídeos é uma ferramenta importante e economicamente estratégica para aplicação industrial e tecnológica. Deste modo, no presente trabalho foi proposto a avaliação de novas cepas de fungos filamentosos produtores de polissacarídeos extracelulares, bem como a caracterização preliminar destas macromoléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar de novas cepas de fungos filamentosos com potencial para a produção de polissacarídeos extracelulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar cepas de fungos filamentosos a partir de amostras de biomassa lignocelulósica e solo, em placas de ágar Sabouraud dextrose com Cloranfenicol;
- Condução de cultivos submersos em frascos agitados para a seleção dos fungos produtores de EPS;
- Estudo cinético da produção de EPS e crescimento celular dos fungos selecionados;
- Caracterização parcial por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV-TF/RTA), análises de difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos polissacarídeos produzidos;
- Avaliação da solubilidade em água dos exopolissacarídeos produzidos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

Fungos são organismos de grande importância na manutenção da microbiota dos ecossistemas onde são encontrados, por serem heterotróficos e consumirem a matéria orgânica como fonte de energia. Pertencem ao reino fungi e muitas vezes são os principais causadores de doenças em animais e plantas, contudo, alguns possuem grande potencial na geração de metabólitos primários e especializados, fundamentais no desenvolvimento biotecnológico com aplicação em produtos farmacêuticos, agrícolas e alimentícios (PHILIPPINI, 2017).

De acordo com a classificação celular, os fungos podem ser unicelulares como as leveduras ou pluricelulares como os fungos filamentosos. Estes por sua vez formam filamentos denominados hifas, que em conjunto constituem o micélio fúngico, responsável por diversas funções como obtenção de energia e propagação da espécie (GUIMARÃES, 2015; MADIGAN et al., 2010). Os fungos filamentosos atuam como decompositores e biotransformadores de material celulósico e da lignina, presente na parede celular vegetal (BREITENBACH, 2016; MADIGAN et al., 2010).

Os fungos podem ser classificados como *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, os quais desempenham podendo desempenhar importante papel no ecossistema atuando como parasitas, saprófitas e simbiontes (MADIGAN et al., 2010). Os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, em sua grande maioria, são fungos que possuem habilidade em produzir polissacarídeos extracelulares ou os chamados exopolissacarídeos, com diferentes propriedades biotecnológicas e principalmente no que se refere a estrutura química (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Quanto aos parâmetros fisiológicos e nutritivos dos fungos temos o pH, fonte de carbono e nitrogênio, temperatura, disponibilidade de oxigênio e umidade como principais requisitos para o crescimento e reprodução dos mesmos (TORTORA et al., 2012).

A temperatura considerada ideal para o desenvolvimento dos fungos filamentosos está na faixa de 25 a 30 °C, havendo maior variação entre espécies de países tropicais e subtropicais. Quanto ao pH, o crescimento dos fungos pode ocorrer tanto em meios ácidos, quanto em meios alcalinos, sendo assim classificados como acidófilos, neutrófilos ou alcalófilos (TORTORA et al., 2012).

No cultivo de fungos filamentosos em sistemas submersos, comumente ocorre a formação de *pellets* suspensos no meio fermentativo, os quais variam de tamanho de acordo com as condições de cultivo e com as características próprias de cada fungo. Avaliar características como pH ótimo, fontes de carbono e nitrogênio e aeração é fundamental para determinação das condições de cultivo mais apropriadas para a obtenção de metabólitos de interesse biológico e tecnológico (AGUDELO-ESCOBAR, 2017; VEITER et al., 2018).

Dentre os metabólitos fúngicos com potenciais aplicações em produtos farmacêuticos e nutricionais, setor médico e tecnológico, destacam-se os polissacarídeos extracelulares. Os polissacarídeos extracelulares, também chamados de exopolissacarídeos, são macromoléculas excretadas para o meio de cultivo quando o fungo é cultivado em meio líquido (AGUDELO-ESCOBAR, 2017; PHILIPPINI, 2017).

Como os fungos são heterotróficos, comumente obtêm energia de fontes de carbono provenientes de material orgânico, porém nem todos os fungos conseguem obter energia dos mesmos tipos de substratos, uma vez que dependem de suas características fisiológicas para promover a hidrólise, principalmente de substratos complexos como a lignina (PEDRI et al., 2015).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na biosfera e possui estrutura linear, constituída por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$. A lignina, por sua vez, está presente na parede celular dos vegetais e tem função estrutural, conferindo resistência à célula (PEDRI et al., 2015). A hemicelulose encontra-se intercalada entre as microfibras da celulose, conferindo resistência e elasticidade, não permitindo que se toquem (BHAGIA et al., 2018).

A maioria dos fungos que obtêm energia a partir da lignina presente na madeira pertencem ao filo dos basidiomicetos (espécies de podridão branca), conhecidos por produzirem corpos de frutificação (cogumelos), e serem capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina. Fungos que degradam apenas celulose

são denominados fungos de podridão parda (MADIGAN et al., 2010; ALEXANDRE, 2015).

Fungos de podridão branca possuem a capacidade de degradar a lignina, devido a secreção de enzimas extracelulares como a lacase e manganês peroxidase, que além de atuarem na decomposição de material lignocelulósico presente na natureza, apresentam grande potencial biotecnológico (ALEXANDRE, 2015; MADIGAN, 2010).

Os basidiomicetos vem sendo intensamente estudados, devido à grande utilização das enzimas e exopolissacarídeos que são secretados para o meio de cultivo e que podem ser facilmente recuperados (ALEXANDRE, 2015).

3.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Polissacarídeos microbianos são macromoléculas provenientes de microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, que podem ser encontrados no citosol e na parede celular, (peptídeoglicanos e lipopolissacarídeos) e os que são excretados para o meio de cultivo (polissacarídeos extracelulares) (BASTIANI, 2014). A maioria dos polissacarídeos microbianos são constituintes da parede celular, entretanto mais recentemente tem sido destacado na literatura científica os polissacarídeos extracelulares, os quais podem ser isolados com maior facilidade que os EPS de parede celular (BREITENBACH, 2016). Comumente, os processos de recuperação de EPS de parede celular envolvem o uso de solventes orgânicos, ácidos e álcalis, enquanto que os EPS podem ser recuperados por processos de desidratação com etanol e purificação por diálise contra água (KAGIMURA et al., 2015, LUNA et al., 2018).

Quanto a estrutura, os polissacarídeos podem ser classificados como heteropolissacarídeos, os quais apresentam em sua composição mais de uma unidade monossacarídica em homopolissacarídeos, os quais possuem apenas uma unidade monossacarídica (ABDUL RAZACK et al., 2013).

A utilização desses biopolímeros vem sendo ampliada devido as suas propriedades reológicas e por possuírem atividades anti-inflamatória, antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, anticoagulante, antitrombótica, entre outras (SOMENSI, 2014; ABDUL RAZACK et al., 2013).

No setor industrial, os polissacarídeos fúngicos apresentam inúmeras

aplicações devido a capacidade emulsificante, estabilizante e geleificante, atuando também como biossurfactante, suspensor, formador de filmes e biosorvente. (ABDUL RAZACK et al., 2013).

Exemplos de polissacarídeos microbianos bastante conhecidos e que têm demonstrado sucesso na indústria alimentícia incluem as gomas xantana e a goma gelana. A goma xantana é produzida pela bactéria *Xantomonas campestris* e tem a capacidade de aumentar a viscosidade de soluções, sendo comumente utilizada para encorpar molhos, xaropes, coberturas e bebidas lácteas (BASTIANI, 2014; SILVA et al., 2017).

A goma gelana é um polímero produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, solúvel em água e altamente higroscópico, ideal para a produção de géis resistentes, os quais além de serem muito utilizados na indústria alimentícia, possuem uma série de aplicações farmacêuticas, incluindo sistemas de liberação de princípios ativos (COSTA, 2015).

Diferentes polissacarídeos extracelulares têm sido relatados na literatura científica. Dentre eles, Vasconcelos et al. (2008) relatou a produção de polissacarídeo extracelular (1→6)-β-D-glucana pelo Ascomisceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, utilizando glicose como fonte de carbono.

3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa é um tipo de cultivo composto por 90% de água com adição de nutrientes, que permite a inoculação do microrganismo na forma de esporos ou micélios (quando se trata de fungos) e possibilita maior controle das condições de cultivo (FLORENCIO et al., 2017).

A produção de exopolissacarídeos é comumente relatada através de cultivo submerso, o que facilita sua produção e recuperação, além de permitir a otimização do processo por meio da determinação das melhores condições de cultura (tempo de incubação, fontes de carbono e nitrogênio, pH, agitação e temperatura) (FRAGA et al., 2014; ZHOU et al., 2015; VEITER et al., 2018).

O emprego da fermentação submersa utilizando fungos filamentosos é um procedimento bastante utilizado na produção de exopolissacarídeos, e possibilita a inovação tecnológica quanto ao substrato, podendo utilizar como fontes de carbono,

resíduos agroindustriais como melaço de cana de açúcar, soja e vinhaças (SILVA et al., 2015; FLORENCIO et al., 2017).

Como desvantagens da utilização do cultivo submerso usando fungos filamentosos, podem ser mencionadas a possível limitação da assimilação do substrato e menor transferência de oxigênio às células, devido a elevada viscosidade do meio, comumente observada no processo (BETTIN et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO CELULAR

Amostras de biomassas lignocelulósicas (troncos, folhas e galhos) e de basidiomas foram coletadas na região rural do município de Pato Branco, Paraná e no câmpus da UTFPR. As amostras foram transportadas até o laboratório de biotecnologia e bioprocessos em sacos polietileno esterilizados e na sequência inoculado pequenos pedaços dos basidiomas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol para o isolamento das cepas fúngicas.

Para seleção das culturas isoladas e obtenção de culturas puras, foram realizados repiques sucessivos em meio ágar Sabouraud-cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 96h e então os aspectos morfológicos das culturas (cor e aspectos macroscópicos dos micélios, bordas e superfície da cultura) foram avaliados macroscopicamente.

As cepas fúngicas isoladas foram mantidas em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol sob refrigeração a 5 °C e repiques sucessivos para meio novo foram realizados a cada dois meses.

4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO

4.2.1 Preparo do inóculo

Uma alçada do micélio fúngico mantido sob refrigeração foi transferido assepticamente para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) e 10 g L⁻¹ de glicose. Os frascos foram encubados em agitador orbital a 28 °C, 150 rpm por 48h. O micélio crescido foi centrifugado, ressuspendido em água destilada e então triturado em mixer a fim de obter uma suspensão micelial padronizada (inóculo) com absorbância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (STELUTI et al., 2004).

4.2.2 Avaliação inicial do potencial de produção de exopolissacarídeos

Para a avaliação do potencial de produção de EPS das cepas isoladas em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, cultivos submersos (em triplicata) foram conduzidos em frascos Erlenmeyer, contendo 150 mL de meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), 10 g L⁻¹ de glicose e 10 mL de inóculo padronizado conforme item 4.2.1. Os frascos foram incubados em incubador orbital (*shaker*) a 28 °C, 150 rpm por 96h. O EPS e a biomassa foram recuperados conforme item 4.2.4.

4.2.3 Avaliação cinética

O perfil cinético da produção de EPS e crescimento celular das cepas selecionadas como produtoras de EPS foi avaliado. Cultivos submersos em triplicata foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), 20 g L⁻¹ de glicose e 10 mL de inóculo padronizado. Os frascos foram incubados em incubador orbital (*shaker*) a 28 °C, 150 rpm por 96h. O conteúdo de EPS e biomassa micelial foram quantificados a cada 24 horas e foram calculados os parâmetros encontrados no item 4.2.6: fator de conversão do substrato em exopolissacarídeo ($Y_{P/S}$), fator de conversão do substrato em biomassa celular ($Y_{X/S}$), fator de conversão de biomassa em exopolissacarídeo ($Y_{P/X}$), produtividade volumétrica em exopolissacarídeo (Q_P), produtividade volumétrica em biomassa (Q_X), taxa de consumo de substrato (Q_S) e percentual de consumo de substrato ($Y\%$).

4.2.4 Recuperação e quantificação do EPS e da biomassa celular

O caldo de cultivo foi separado da biomassa micelial por centrifugação (1500 x g, 30 min.). O EPS presente no caldo foi precipitado com 3 volumes de etanol 95%, por 24h sob refrigeração (5 °C) sendo posteriormente purificado por diálise contra água destilada sob refrigeração durante 7 dias e desidratado em estufa com circulação de ar a 50 °C.

A biomassa micelial foi lavada três vezes com água destilada a 60 °C, para retirar do EPS residual, sendo posteriormente desidratada a 70 °C em estufa até

massa constante. O EPS e a biomassa micelial foram quantificados gravimetricamente após secagem.

4.2.5 Avaliação do conteúdo de carboidratos totais nos EPS

O conteúdo de carboidratos totais das amostras de EPS desidratados foi quantificado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Curva de calibração de glicose (10-60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizada como padrão.

4.2.6 Determinação de parâmetros fermentativos

Ao término do ensaio cinético, foram determinados os parâmetros fermentativos relacionados a produção de exopolissacarídeo e biomassa micelial das cepas selecionadas como produtoras de EPS quanto a

- a) Rendimento em EPS – Fator de conversão do substrato em exopolissacarídeo ($Y_{P/S}$), calculado pela Equação 1:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (1)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = Fator de conversão de substrato em exopolissacarídeo (g g^{-1});

P_f = Produto final, conteúdo de exopolissacarídeo final (g L^{-1});

P_i = Produto inicial, conteúdo de exopolissacarídeo inicial (g L^{-1});

S_f = Substrato final, conteúdo de glicose no final do cultivo (g L^{-1});

S_i = Substrato inicial, conteúdo de glicose no inicia do cultivo (g L^{-1}).

- b) Rendimento em biomassa celular – Fator de conversão do substrato em biomassa celular ($Y_{X/S}$), calculado pela Equação 2:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (2)$$

Onde:

$Y_{x/s}$ = Fator de conversão de substrato em biomassa celular (g g^{-1});

X_f = Biomassa final (g L^{-1});

X_i = Biomassa inicial (g L^{-1});

S_f = Substrato final, conteúdo de glicose final do cultivo (g L^{-1});

S_i = Substrato inicial, conteúdo de glicose no início do cultivo (g L^{-1}).

- c) Rendimento específico – Fator de conversão de biomassa em exopolissacarídeo ($Y_{P/X}$), calculado pela Equação 3:

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_i}{X_f - X_i} \quad (3)$$

Onde:

$Y_{P/X}$ = Rendimento específico (g g^{-1});

P_f = Produto final, conteúdo de exopolissacarídeo final (g L^{-1});

P_i = Produto inicial, conteúdo de exopolissacarídeo inicial (g L^{-1});

X_f = Biomassa celular final (g L^{-1});

X_i = Biomassa celular inicial (g L^{-1}).

- d) Produtividade volumétrica em exopolissacarídeo (Q_P), calculado pela Equação 4:

$$Q_P = \frac{P_f - P_i}{\Delta t} \quad (4)$$

Onde:

Q_P = Produtividade volumétrica em produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$);

P_f = Produto final, conteúdo de exopolissacarídeo final (g L^{-1});

P_i = Produto inicial, conteúdo de exopolissacarídeo inicial (g L^{-1});

Δt = Tempo de cultivo (h).

- e) Produtividade volumétrica em biomassa celular (Q_x), calculado pela Equação 5:

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{\Delta t} \quad (5)$$

Onde:

Q_x = Produtividade volumétrica em biomassa celular ($\text{g L}^{-1} \text{H}^{-1}$);

X_f = Biomassa celular final (g L^{-1});

X_i = Biomassa celular inicial (g L^{-1});

Δt = Tempo de cultivo (h).

- f) Taxa de consumo de substrato (Q_s), calculado pela Equação 6:

$$Q_s = \frac{S_i - S_f}{\Delta t} \quad (6)$$

Onde:

Q_s = Taxa global de consumo de substrato – glicose ($\text{g L}^{-1} \text{H}^{-1}$);

S_f = Substrato final, conteúdo de glicose final do cultivo (g L^{-1});

S_i = Substrato inicial, conteúdo de glicose no início do cultivo (g L^{-1});

Δt = tempo de cultivo (h).

- g) Percentual de consumo de substrato ($Y\%$), calculado pela Equação 7:

$$Y\% = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$Y\%$ = Percentual de consumo de substrato (glicose);

S_f = Substrato final, conteúdo de glicose no final do cultivo (g L^{-1});

S_i = Substrato inicial, conteúdo de glicose no início do cultivo (g L^{-1});

4.2.7 Análise estatística

Dados referentes a produção de exopolissacarídeos pelos fungos filamentosos (isolados 6 e 14) foram submetidos a análise estatística. Foi utilizado para a análise estatística o *software* R (*Development Core Team*), onde foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk), homocedasticidade (teste de Levene) e o teste t de Student com variância homogênea. Todas análises foram realizadas com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS ISOLADOS

4.3.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier – Reflectância Total Atenuada (IV-TF/RTA)

Os espectros de infravermelho das amostras de exopolissacarídeos liofilizados foram obtidos em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer, EUA), na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e número de acumulações de 16 varreduras, utilizando o acessório de reflectância total atenuada (RTA).

4.3.2 Análise por Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X das amostras liofilizadas foram obtidos em difratômetro MiniFlax 600 (Rigaku, USA), usando fonte de radiação de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$), corrente de 15 mA, voltagem de 40 kV, faixa de varredura de 10° a 60°, velocidade de varredura de 5° min^{-1} e passo de 0,02° (2θ).

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para obtenção das micrografias foi utilizado microscópio eletrônico de varredura de bancada TM3000 (Hitachi, USA). As amostras liofilizadas foram dispersas em fita de carbono e cobre e as imagens foram obtidas em amplitudes de 100, 500, 800 e 2000 vezes.

4.4 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Para determinar a solubilidade dos exopolissacarídeos em água, foram suspensos 1,5 mg do polissacarídeo produzido em 10 mL de água destilada, sob agitação constante à temperatura ambiente. Após 24 horas de solubilização em água, as amostras foram submetidas a centrifugação (3500 x g, 15 minutos) e então o sobrenadante foi utilizado para a determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS,1956), utilizando glicose como padrão. Os resultados foram quantificados em porcentagem de massa solúvel, em gramas, para 100 mL de água (KAGIMURA et al, 2015).



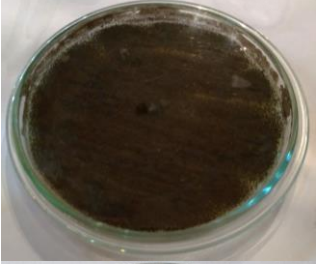









5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE EXOPOLISSACARÍDEOS: ENSAIO DE BIOPRODUÇÃO

Na Tabela 1, estão descritas as vinte cepas fungicas isolados e utilizados para o teste de avaliação da bioprodução de exopolissacarídeos. Dentre as cepas fúngicas isoladas, grande parte apresentou micélio aéreo pigmentado, de tamanho variável, textura algodonosa e por vezes pulverulenta, com relevos rugosos e crateriformes.

Os ensaios com fermentações submersas mostraram que dos vinte fungos filamentosos estudados, apenas duas cepas demonstraram potencial para a produção de exopolissacarídeos. Como pode ser visto na Tabela 1, os isolados n.º 6 e n.º 14 produziram exopolissacarídeos nas condições de fermentação submersa avaliada. Após a etapa de desidratação do caldo fermentado livre de células, foi possível verificar a formação de uma pequena camada gelatinosa sobre a superfície, indicando a separação de macromoléculas polissacarídicas. Observando as características das cepas produtoras de exopolissacarídeo, é possível notar semelhança quanto aos micélios aéreos de ambas, apresentando coloração branca, e ausência de pigmentação escura no meio de cultivo. Outro aspecto observado, foi a produção de algum tipo de pigmento pelo isolado denominado “cogumelo marrom 3”, o que pigmentou o caldo de cultivo com uma coloração verde-acinzentada.

Tabela 1 – Características macromorfológicas e avaliação do potencial de produção de exopolissacarídeos pelas cepas fúngicas isoladas.

Identificação	Cultivo em ágar Sabouraud-cloranfenicol	Ensaio de produção de EPS
FSA4		
Isolado Tronco de árvore		
Isolado Cogumelo		
Isolado Cogumelo M		
Isolado Cogumelo Marron 1		
Isolado Madeira		

Isolado
Cogumelo Preto 1



Isolado
Cogumelo Marrom 2



Isolado
Cogumelo Preto 2



Isolado
Cogumelo Marrom 2



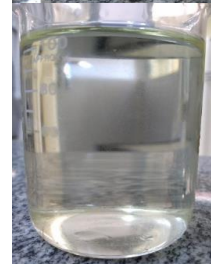
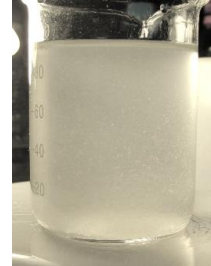
Isolado F1



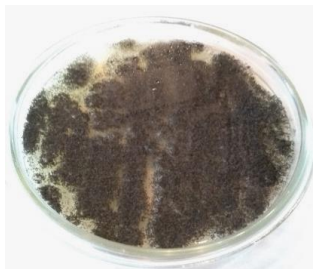
Isolado
árvore Verde



Isolado
Cogumelo Marrom 3



Isolado
cogumelo vermelho 1



Isolado
cogumelo vermelho 2



Isolado
orelha de pau 2



Isolado 1 Branco



Isolado 2 Branco



Isolado 14



Isolado 6



As cepas n.º 6 e 14 isoladas de basidiomas de fungos crescidos naturalmente nos gramados do *campus* Pato Branco da UTFPR, foram então selecionadas como produtoras de EPS e estudadas quanto a cinética de crescimento e produção de EPS em meio Mínimo de Vogel contendo glicose como fonte de carbono.

Os resultados da cinética dos cultivos submersos dos isolados 6 e 14 (tabelas 2 e 4) descreverem quantitativamente tanto a produção de exopolissacarídeo como de biomassa micelial ao longo do cultivo.

De acordo com a Tabela 2 e Figura 1, o isolado 6 foi bastante efetivo no consumo do substrato glicose, sendo observado um consumo de 73% ($14,60 \text{ g L}^{-1}$) nas primeiras 24h de cultivo. Neste mesmo período foi verificado uma produção de EPS (P_F) de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e produção de $0,95 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa micelial. Após 48h houve um aumento de 48% no conteúdo de EPS no caldo de cultivo ($0,37 \text{ g L}^{-1}$) e intenso crescimento micelial ($2,63 \text{ g L}^{-1}$). Maiores conteúdos de exopolissacarídeo foram encontrados após 72h de cultivo ($1,31 \text{ g L}^{-1}$), o que foi acompanhado por um consumo global de 78,8% do substrato ($18,01 \text{ g L}^{-1}$) e acúmulo de $4,63 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa micelial.

Em 96h de cultivo foi verificado uma redução do conteúdo de EPS ($0,60 \text{ g L}^{-1}$) no meio de cultivo em relação a 72h, embora o fungo tenha continuado a crescer e atingido um conteúdo 80% superior ($8,36 \text{ g L}^{-1}$) ao verificado em 72h. Essa redução no conteúdo de EPS possivelmente está associada a redução do conteúdo global do substrato glicose o que pode ter levado a um desbalanço energético e consequente hidrólise do EPS por hidrolases produzidas pelo próprio fungo. A redução do conteúdo de EPS em tempos prolongados de fermentação, já foi relatado por Cunha et al. (2012) em cultivos com o ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (produtor de (1→6)- β -D-glucana, lasiodiplodana) em meio a base de glicose. Tais autores correlacionaram a redução do conteúdo de EPS com a possível produção de β -glucanase no final do cultivo.

Com relação aos valores de pH, foi verificado uma pequena redução do pH inicial do meio (5,7) para 4,8 no final do cultivo.

Tabela 2 - Produção média de biomassa micelial e EPS, variação do pH do meio e percentual de consumo de substrato ao longo do cultivo com o isolado n.º 6.

Ensaio	Tempo (h)	pH	Biomassa* (g L ⁻¹) (P _X)	EPS# (g L ⁻¹) (P _F)	Consumo (%)
1	24	5,72	0,95 ± 0,08	0,25 ± 0,02	73,0
2	48	5,22	2,63 ± 0,05	0,37 ± 0,03	75,0
3	72	4,82	4,63 ± 0,01	1,31 ± 0,03	78,8
4	96	4,71	8,36 ± 0,03	0,60 ± 0,05	84,7

*Biomassa micelial, #exopolissacarídeo.

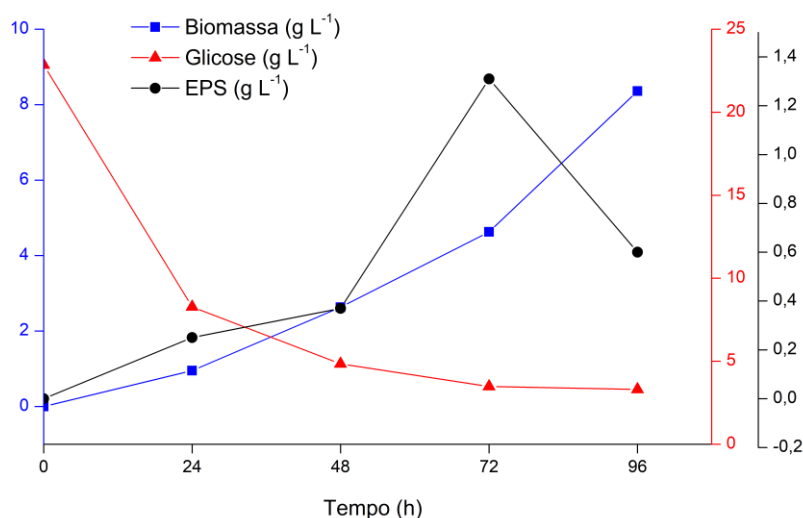


Figura 1 – Perfil de produção EPS, crescimento micelial e consumo de substrato ao longo de 96 h de cultivo do isolado nº 6.

Na Tabela 3 estão descritos os parâmetros fermentativos do cultivo submerso do isolado 6 em 72 horas de cultivo. Pode ser verificado que o fungo foi eficiente no consumo de substrato (Y_C), assimilando quase 85% do conteúdo de glicose do meio. Também foi bastante eficiente quando ao crescimento celular ($P_X = 4,63 \text{ g L}^{-1}$) e a produção de EPS ($P_P = 1,31 \text{ g L}^{-1}$). Os valores de rendimento em EPS ($Y_{P/S}$), biomassa celular ($Y_{X/S}$) e rendimento específico ($Y_{P/X}$) foram $0,08 \text{ g g}^{-1}$, $0,24 \text{ g g}^{-1}$ e $0,32 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente.

Os valores de produtividade volumétrica indicam que embora o fungo seja um produtor de exopolissacarídeo, ele apresenta uma maior capacidade de conversão do substrato em célula do que em exopolissacarídeo. A produtividade em biomassa

celular (Q_X) foi de $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto a produtividade em EPS (Q_P) foi de $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabela 3 - Parâmetros fermentativos do processo de produção de exopolissacarídeo pelo isolado 6 em 96 h.

Parâmetros fermentativos	Resultados
P_P (g L^{-1})	$1,31 \pm 0,03$
P_X (g L^{-1})	$4,63 \pm 0,01$
$Y_{P/S}$ (g g^{-1})	0,08
$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	0,24
$Y_{P/X}$ (g g^{-1})	0,32
Q_P ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,02
Q_X ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,06
Q_S ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,24
$Y\%$	84,77

P_P : Produção de exopolissacarídeo, P_X : produção de biomassa celular, $Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto, $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa, $Y_{P/X}$: produto formado por unidade de célula (rendimento específico), Q_P : produtividade volumétrica em produto, Q_X : produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S : taxa global de consumo de substrato e $Y\%$: percentual de consumo de substrato.

O crescimento micelial após 72 h de cultivo do isolado 14 ($2,64 \text{ g L}^{-1}$) foi 43% inferior ao verificado com o isolado n.º 6 ($4,63 \text{ g L}^{-1}$) (Tabelas 3 e 4). Da mesma forma, menores valores de rendimento em EPS ($Y_{P/S}$ $0,07 \text{ g g}^{-1}$), em biomassa ($Y_{X/S}$ $0,14 \text{ g g}^{-1}$) e produtividades volumétrica em EPS (Q_P $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e em biomassa (Q_X $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nos cultivos com o isolado 14. Por outro lado, é interessante notar que o cultivo com o isolado 14 apresentou um maior rendimento específico ($Y_{P/X}$ $0,50 \text{ g g}^{-1}$), o qual relaciona o quanto de EPS é produzido em relação ao conteúdo de células (Tabela 5).

O comportamento do pH foi similar em ambos os cultivos, com pequena acidificação do meio ao longo do processo.

Tabela 4 - Produção média de biomassa micelial e EPS, variação do pH do meio e percentual de consumo de substrato ao longo do cultivo com o isolado n.º 14

Ensaio	Tempo (h)	pH	Biomassa* (g L ⁻¹)	EPS# (g L ⁻¹)	Consumo (%)
1	24	5,79	0,44 ± 0,04	0,02 ± 0,01	65,0
2	48	4,76	2,19 ± 0,05	0,31 ± 0,01	72,2
3	72	4,63	2,64 ± 0,04	1,06 ± 0,17	75,1
4	96	4,56	3,60 ± 0,09	0,25 ± 0,02	82,2

*Biomassa micelial, #exopolissacarídeo.

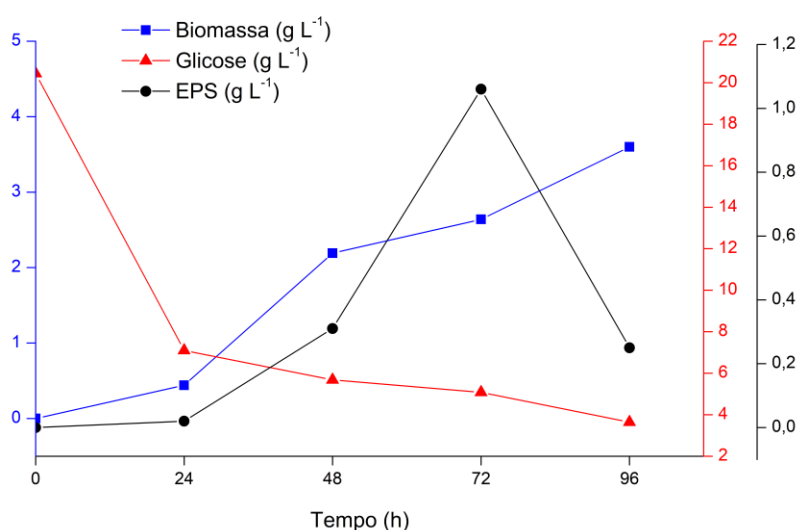


Figura 2 - Perfil de produção EPS, crescimento micelial e consumo de substrato ao longo de 96 h de cultivo do isolado 14.

Não foi observado diferença estatística significativa entre a produção de exopolissacarídeos pelo isolado 6 e isolado 14, após teste de hipótese de comparação entre duas médias empregando teste t para variâncias homogêneas (Tabela 6).

Conforme resultados expressos no *software* R, a estatística do teste t, de acordo com as médias das cepas produtoras, foi de 2,4612 e a conclusão do teste (p-valor) foi de 0,1254, confirmando assim a aceitação da hipótese H₀: $\mu_{\text{isolado 6}} = \mu_{\text{isolado 14}}$, ambos considerando nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Tabela 5 - Parâmetros fermentativos do processo de produção de exopolissacarídeo pelo isolado 14 em 72h.

Parâmetros fermentativos	Valores
P_P (g L ⁻¹)	1,06 ± 0,03
P_X (g L ⁻¹)	2,64 ± 0,04
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	0,07
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	0,14
$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	0,50
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,01
Q_X (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,03
Q_S (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,21
$Y\%$	75,10

P_P : Produção de exopolissacarídeo, P_X : produção de biomassa celular, $Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto, $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa, $Y_{P/X}$: produto formado por unidade de célula (rendimento específico), Q_P : produtividade volumétrica em produto, Q_X : produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S : taxa global de consumo de substrato e $Y\%$: percentual de consumo de substrato.

Tabela 6 - Análise estatística da produção de exopolissacarídeos pelos isolados 6 e 14.

Fungo filamentoso	EPS (g L ⁻¹)
Isolado 6	1,31 ± 0,03 ^a
Isolado 14	1,06 ± 0,03 ^a

^aLetras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias ($\alpha = 0,05$).

5.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

5.2.1 Análise por espectroscopia na região do Infravermelho – Refletância Total Atenuada (IV-TF/RTA)

Os espectros IV-TF/RTA dos EPS representados na Figura 3, demonstraram grande similaridade entre si, no que se refere a estrutura química. Bandas características de polissacarídeos, nas regiões de 4000 a 500 cm⁻¹ foram observadas (ALZORQI et al., 2016).

A banda de absorção entre 3500 e 3000 cm⁻¹, presentes em ambos os espectros, representa vibrações de estiramento O-H, a mesma relatada também por Fonseca (2017) em exopolissacarídeos produzido por um fungo filamentoso isolado

de casca de palmeira. Bandas de absorção características de vibrações de estiramento C-H em 2930 cm^{-1} também foram observadas, como já descrita por Calegari (2016) em lasiodiplodana ((1→6)- β -D-glucana) produzida pelo fungo *L. theobromae* MMPI.

Bandas de absorção na região de 1640 cm^{-1} foram observadas em ambos os EPS, e foram atribuídas as vibrações de anel de glicose (LUNA, 2018). Bandas de absorção nas regiões entre 1420 e 1200 cm^{-1} , características de deformação de C-H e O-H, bastante comum em carboidratos (ALZORQI et al, 2016) foram encontradas nas amostras de isolado 6 e 14. Banda de absorção forte em 1032 cm^{-1} foi atribuída a vibração de alongamento C-O. Banda de absorção em 862 cm^{-1} , observada em ambas as amostras, pode estar associada a presença de ligações β glicosídicas nos exopolissacarídeos (NETO, 2011; WANG et al, 2012)

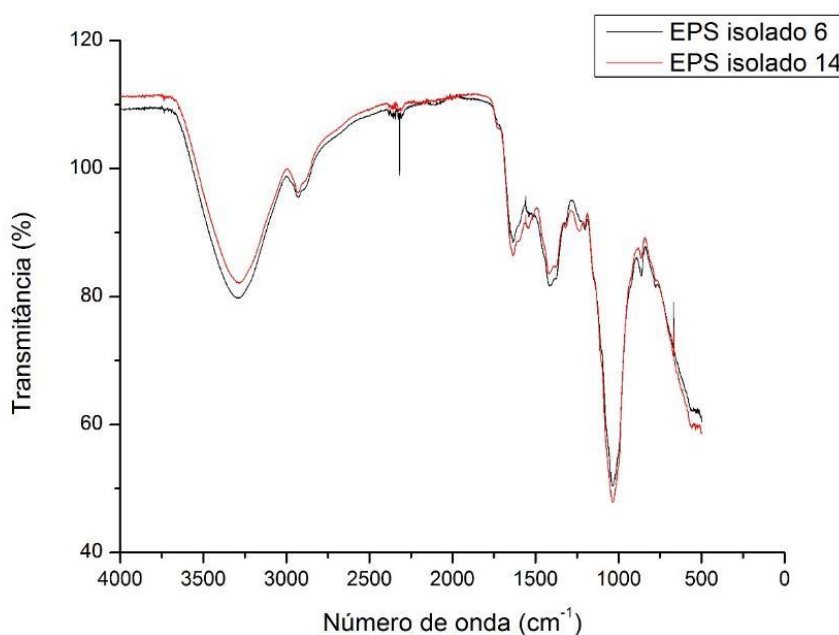


Figura 3 - Espectros de Infravermelho dos exopolissacarídeos produzidos pelos isolados 6 e 14.

5.2.2 Análise por Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas obtidos das amostras de exopolissacarídeos produzidos estão mostrados na Figura 4.

Comumente, polissacarídeos apresentam difratogramas com característica típica de uma matriz amorfa, com picos largos e de baixa intensidade (VEVERKA, 2014).

Perfil difratométrico semelhante entre os EPS produzidos (Figura 4) foram observados. Interessante notar, que foram verificados picos de difração afiados (estreitos) na região 21° (2θ) e 23° (2θ), indicando regiões de cristalinidade e organização molecular em ambos os exopolissacarídeos produzidos.

Os difratogramas dos EPS apresentaram diferenças (de baixa intensidade) apenas nos picos 38° , 39° e 41° (2θ), os quais são observados somente no EPS do isolado 14, revelando que este possui uma porção maior de regiões semicristalinas do que o EPS do isolado 6.

Calegari (2016), Luna (2016) e Sechi (2016) encontraram o mesmo perfil difratométrico, obtendo os mesmos picos em 21° , 23° e 39° (2θ) para a lasiodiplodana, (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana bruta, que apresentou regiões amorfas e outras semicristalinas.

Fonseca (2017) observou perfil difratométrico semelhante em um EPS produzido por um novo fungo filamentosso isolado de casca de palmeira, onde picos de difração em 21° , 23° e 39° em 2θ foram encontrados, que indicam estrutura amorfa com regiões semicristalinas.

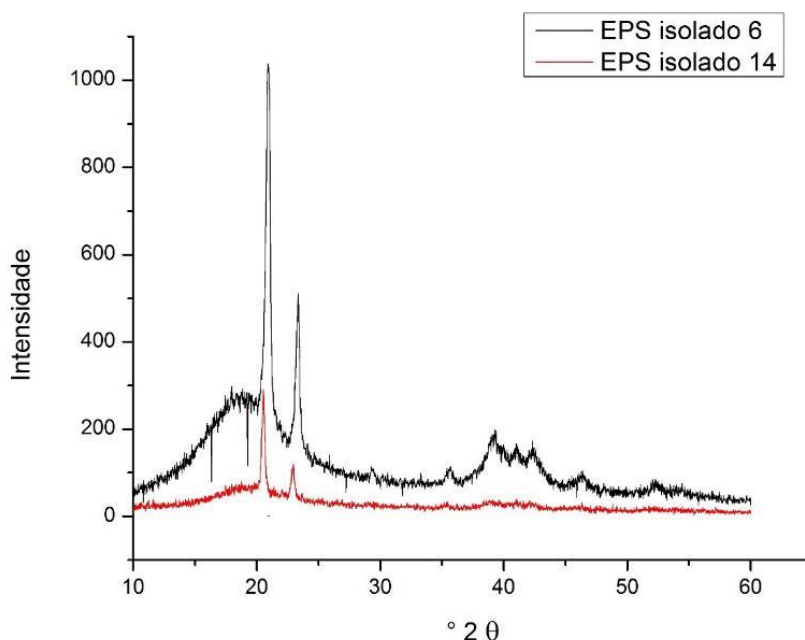


Figura 4 - Difratogramas de Raios-X dos exopolissacarídeos produzidos pelos isolados 6 e 14.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura da superfície das amostras de EPS (amostra 6 e 14) apresentaram similaridades entre si, especialmente quanto a presença de fibras ao longo da área superficial.

Nas amplitudes de 100 X e 500 X é possível verificar, em ambas as amostras, a presença de um filme fino e translúcido que parece envolver as fibras ao longo da área superficial. Um aspecto que parece diferenciar um pouco as duas amostras é presença de partículas com tamanhos e formas diferentes, entre as quais parecem estar dispersas sobre a superfície do EPS produzido pelo isolado 14.

5.3 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA

A solubilidade é um parâmetro de grande importância para determinar o potencial de aplicação de exopolissacarídeos, pois moléculas hidrossolúveis apresentam maior facilidade na obtenção de produtos homogêneos, ideais para aplicações biotecnológicas.

Tabela 7 - Determinação da Solubilidade dos exopolissacarídeos.

EPS	Massa Inicial (mg)	Volume de água (mL)	Massa Dissolvida (mg mL ⁻¹)	Solubilidade (%)
Isolado 6	1,5	10	0,071 ± 0,002	47,08
Isolado 14	1,5	10	0,053 ± 0,002	35,42

De acordo com a Tabela 7, os exopolissacarídeos obtidos dos Isolados 6 e 14 apresentaram solubilidade de 47,08% e 35,42%, respectivamente. Valores relativamente mais baixos (2,80% e 0,42%) foram encontrados recentemente por Calegari (2016) ao determinar a solubilidade da lasiodiplodana (1→6)-β-D-glucana bruta e modificada por sulfonação (respectivamente), produzida pelo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Kagimura (2016), após determinar a solubilidade para a lasiodiplodana (1→6)-β-D-glucana modificada por carboximetilação encontrou valor de 63%, valor alto, quando comparado com os polissacarídeos fúngicos aqui estudados.

Fonseca (2017) ao avaliar a solubilidade de um novo exopolissacarídeo produzido por um fungo filamentoso ainda não identificado, encontrou elevada solubilidade (68,5%), frente aos estudos anteriormente relatados.

6 CONCLUSÃO

Vinte cepas de fungos filamentosos foram isoladas de diferentes matrizes e duas cepas demonstraram potencial para a produção de exopolissacarídeos em meio mínimo de Vogel com glicose como fonte de carbono. O isolado n.º 6 produziu 1,31 g L⁻¹ e o isolado n.º 14, 1,06 g L⁻¹ de EPS após 72 h de cultivo submerso.

O isolado n.º 6 demonstrou maior potencial de crescimento micelial e melhores rendimentos em EPS e Biomassa, bem como maior assimilação do substrato.

Os espectros de infravermelho indicaram que as amostras apresentam bandas características de polissacarídeos e que possivelmente apresentem estruturas químicas bastante similares entre si.

A análise por Difractometria de Raios-X (DRX) mostrou que ambos exopolissacarídeos possuem estrutura predominantemente amorfa, com presença de algumas regiões semicristalinas.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou uma estrutura superficial contendo várias fibras ao longo de toda a superfície, em ambas as amostras de EPS. O EPS produzido pelo isolado n.º 14 apresentou estruturas partículas com formas e tamanhos irregulares distribuídas ao longo de toda a área superficial.

Ambos os EPS produzidos demonstraram ter apreciável solubilidade em água (42,08% e 35,42%) comparados a outros EPS produzidos por fungos filamentosos.

O presente estudo permitiu a seleção de novas cepas fúngicas produtores de exopolissacarídeos, os quais são macromoléculas de grande interesse industrial. Estudos futuros são necessários para a determinação da estrutura química de tais macromoléculas, identificação molecular dos isolados fúngicos, bem como a avaliação do potencial biológico e funcional dos exopolissacarídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL RAZACK, S.; VELAYUTHAM, V.; THANGAVELU, V.; Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. **Turkish Journal of Biology**. v. 37, n. 3, p. 280–288, 2013.

AGUDELO-ESCOBAR, L. M., GUTIÉRREZ-LÓPEZ, Y., URREGO-RESTREPO; Effects of aeration, agitation and pH on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide from the filamentous fungus *Ganoderma lucidum*. **DYNA**, v. 84, n. 200, p. 72-79, 2017.

ALEXANDRE, Samara Marrye Aguiar; Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*: extração, purificação e atividade biológica. 105 f. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2015.

ALZORQI, I.; SUDHEER, S.; SUDHEER, S.; LU, T. J.; MANICKAM, S.; Ultrasonically extracted β - d - glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 3–5, 2016.

BASTIANI, M. β - glucanas de *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: avaliação da atividade imunomoduladora e como filme transportador de fármaco. 79 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2014.

BENGOA, Ana A.; LLAMAS, Goretti M.; IRAPORDA, Carolina; DUENAS, Teresa M.; ABRAHAM, Analía G.; GARROTE, Graciela L.; Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. **Food Microbiology**. p. 212-218. 2018.

BETTIN, F.; COUSSEAU, F.; MARTINS, K.; Crescimento fúngico e produção de lacases de *Pleurotus Sajor-Caju* PS-2001 em diferentes configurações de biorreatores sob efeito do pH. In: Congresso Brasileiro De Engenharia Química,

Florianópolis, 2014. Anais. Florianópolis: **Sociedade Brasileira de Engenharia Química**, p. 19-22. 2014.

BHAGIA, Samarthya; PU, Yunqiao; EVANS, Barbara R.; DAVISON, Brian H.; RAGAUSKAS, Arthur J.; Hemicellulose characterization of deuterated switchgrass. **bioresource technology**. v. 269, p. 567-570. 2018.

BRADFORD, Marion. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BREITENBACH, Romy; TOEPEL, Jörg; DEMENTYEVA, Polina; KNABE, Nicole; GORBUSHINA, Anna.; Snaps shots of fungal extra celular matrices. **The perfect slime - microbial extracellular polymeric substances (EPS)**. London. p. 269-299. 2016.

CALEGARI, Gabrielle C.; Lasiodiplodana (1→6)-β-D-Glucana: bioprodução, obtenção de moléculas derivatizadas por sulfonação e caracterização. Monografia (Bacharelado em Química Industrial). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco. p. 34. 2016.

COSTA, Ana L. R.; Produção de microgéis de goma gelana em dispositivos de microfluídica. Dissertação (Mestrado). 2015. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2015.

CUNHA, M. A. A.; TÚRMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, E. N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179-1188, 2012.

DEKKER, Robert F.H.; MALFATTI, Carlos Ricardo M. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FONSECA, Michel da Silva; Caracterização de um novo exopolissacarídeo produzido por fungo filamentosso isolado de casca de palmeira. 2017. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2017.

FLORENCIO, Camila; BADINOB, Alberto C.; FARINASA, Cristiane S., Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**. vol. 40. 2017.

FRAGA, I., COUTINHO, J., BEZERRA, R. M., DIAS, A. A., MARQUES, G., NUNES, F. M. (2014). Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. **Carbohydrate Polymers**, 111: 936–946. 2014.

GUIMARÃES, João C. Pereira. Produção e caracterização de micoproteína obtida por cultivo submerso de fungos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar). Universidade de Trás-Os-Monte e Alto Dourado, Vila Real. p. 66 2015.

KAGIMURA, F. Y; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA A. M.; DEKKER, R. F. H. MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p. 588-598, 2015.

KAGIMURA, F. Y., CUNHA, M. A. A., THEIS, T. V., MALFATTI, C. R. M., DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M., TEIXEIRA, S. D., SALOMÉ, K.; Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015.

LUNA, William N. Sanchez; SANTOS, Vidianny A. Q.; TEIXEIRA, Sirlei D.; DEKKER, Aneli M. Barbosa; DEKKER, Robert F. H.; CUNHA, Mário A. A. da; O-acetylated

(1→6)-β-d-glucan (lasiodiplodan): chemical derivatization, characterization and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 6 (2018), 320-332. 2018.

LUNA, W.N.S. Acetilação do exopolissacarídeo (1→6)-β-D-Glucana (Lasiodiplodana): derivatização química e caracterização. 2016. 79 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12.ed., Porto Alegre: Artmed, 1160 p, 2010.

MAHAPATRA, M.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology Insights**. v. 6, p. 1–16, 2013.

NETO, E. de Moura; S. MACIEL, J.; et al. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1953–1960, 2011.

PEDRIA Z. C; LOZANO, L. M. S; HERMANN, K. L; HELM, C. V; PERALTA, R. M; TAVARES L. B. B. Influence of nitrogen sources on the enzymatic activity and growth of *Lentinula edodes* in biomass *Eucalyptus benthamii*. **Braz. J. Biol.**, 2015, vol. 75, no. 4, pp. 940-947. 2015.

PHILIPPINI, Rafael Rodrigues; Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas. 133 p. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada. Universidade de São Paulo, Lorena. 2017.

SECHI, N. S. M., SANTOS, V.A.Q., THEIS, T.V., CALEGARI, G.C., LUNA, W.N.L., FONSECA, M.S., MARQUES, P.T., CUNHA, M.A.A. Novos biopolímeros derivados de lasiodiplodana: caracterização química e morfológica preliminar. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência de Materiais**, p. 1–3, 2016.

SILVA, Roberta Ribeiro; ASSUMPÇÃO, Monique; FERNANDES, Patrícia Mello; FELICIANO Tamires Almeida; VIEIRA, Camilla Ribeiro; LOMEU, Fernanda Laurides Ribeiro de Oliveira. Efeito da utilização de gomas na viscosidade e nas características sensoriais de shake à base de farinha de banana verde. **Braz. J. Food Technol.**, v. 21. 2017.

SILVA, L.M.; SILVA, A.E.; OLIVEIRA, M.T. Avaliação inicial do potencial de *Pleurotus eryngii* na biorremediação de vinhaça. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, 10: 14-20, 2015.

SOMENSI, F. Y. K. Bioprodução de β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucana e Obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

STELUTI R. M., GIESE E.C., PIGGATO M. M.; Comparison of botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of basic Microbiology**, v.44, p. 480-486, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R; CASE, C.L . Microbiologia . 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p. 2012.

VASCONCELOS, Ana Flora D.; MONTEIRO, Nilson K.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M.; CARBONERO, Elaine R; SILVEIRA, Joana L. M.; SASSAKI, Guilherme L.; SILVA, Roberto da, SILVA Maria de Lourdes Corradi da; Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**. 343. 2481–2485. 2008.

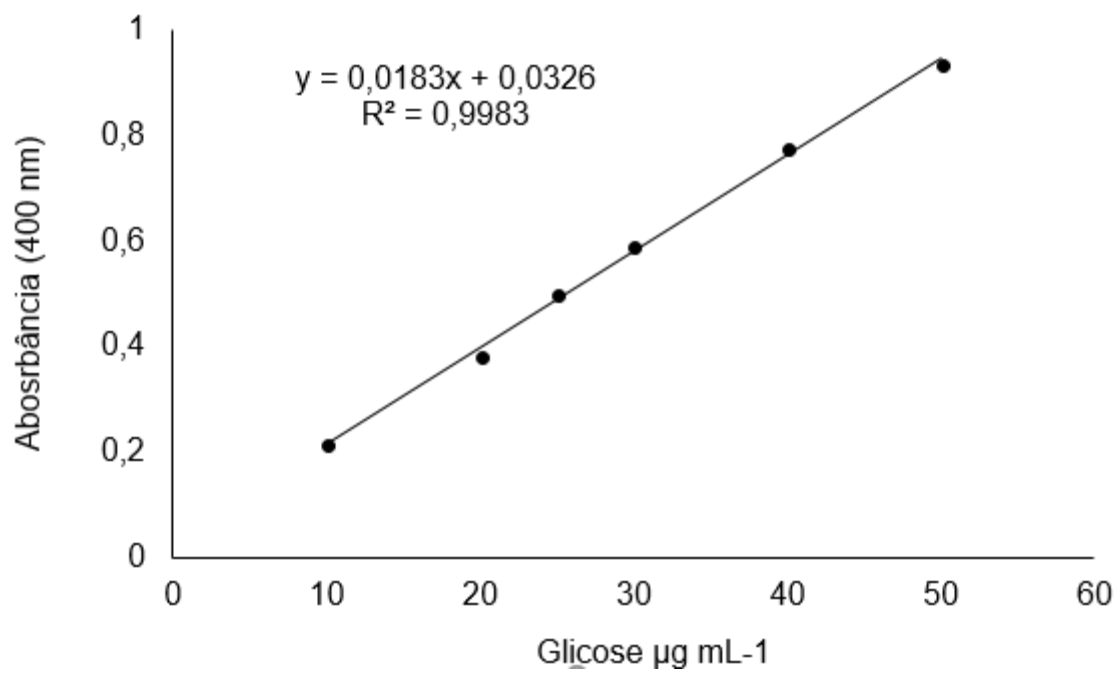
VEITER, Lukas; RAJAMANICKAM, Vignesh; HERWIG, Christoph. **Microbiology and Biotechnology** 102:2997–3006. 2018.

VEVERKA, M.; DUBAJ, T.; et al. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: synthesis, characterization, and stability. **Journal of Functional Foods**. v. 8, n. 1, p. 309–318, 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

WANG, Y.; MO, Q.; et al. Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1052–1056, 2012.

ZHOU, Qianling; YANG, Wei; LIN, Jun-Fang; GUO, Li-Qiong. Optimization of medium pH, growth media compositions and analysis of nutritional components of *ganoderma lucidum* in submerged culture fermentation. **European Journal of Medicinal Plants**. 6(1). p. 17-25, 2015.

APÊNDICE E ANEXOS**APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE AÇÚCARES TOTAIS – CINÉTICA**

ANEXO A – TABELA TESTE T DE STUDENT

<i>gl</i>	α Bilateral:	0,40	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01
	α Unilateral:	0,20	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005
1		1,376	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656
2		1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3		0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4		0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5		0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6		0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7		0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8		0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9		0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10		0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11		0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12		0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13		0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14		0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15		0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16		0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17		0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18		0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19		0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861

Fonte: Universidade Federal do Mato Grosso.