

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

MICHEL DA SILVA FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO EXOPOLISSACARÍDEO
PRODUZIDO POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DE CASCA DE
PALMEIRA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO
2017

MICHEL DA SILVA FONSECA

CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DE CASCA DE PALMEIRA

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

Orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Coorientadora: Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado Caracterização de um Novo Exopolissacarídeo Produzido por Fungo Filamentoso Isolado de Casca de Palmeira foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **5.1.2017-B** de 2017.

Fizeram parte da banca os professores.

Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Dr^a. Patrícia Teixeira Marques

Gabrielle Cristina Calegari

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido meios para conseguir oportunidades;
Agradeço a minha família por toda educação dada e pela compreensão;
Agradeço a Gabriela Walsh, Felipe Lima e a família Hamound por todo apoio dado;

Agradeço ao Dr. Henry Schimidt e ao Dr. Adam Auerback por toda orientação dada;

Agradeço ao meu orientador Dr. Mário Antônio Alves da Cunha por ter contribuído grandiosamente em minha formação, tanto profissional quanto pessoal e, acima de tudo, por todas orientações e oportunidades concedidas na área da pesquisa;

Agradeço a minha coorientadora Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos por todas orientações dadas, pelo conhecimento teórico-prático repassado e auxílios;

Agradeço aos pesquisadores do grupo de pesquisa GTBio, Me. Jessica Tombini, Me. Natan Sechi, Thaís Theis, Gabrielle Calegari e Aline Savi por toda parceria e auxílio;

Agradeço a todos que participaram de minha educação direta e indiretamente.

“A vitória está reservada para aqueles que estão dispostos a pagar o preço.”

Sun Tzu.

RESUMO

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

Os exopolissacarídeos (EPS) são biomacromoléculas produzidas por alguns microrganismos e excretadas para o meio de cultivo. A produção de EPS tem despertado o interesse de pesquisadores em função de suas propriedades tecnológicas e bioativas, como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e imunestimuladora. Considerando a relevância tecnológica da identificação de novos biopolímeros, o presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de um novo EPS, bem como sua caracterização inicial. Metodologia de planejamento fatorial, por meio de um delineamento composto central rotacional (2^3) foi empregado para avaliar a influência das variáveis agitação, concentração de sacarose e concentração de peptona sobre a produção do EPS e biomassa micelial. O exopolissacarídeo produzido foi submetido a análise de solubilidade em água e análises por espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de carbono -13 , microscopia eletrônica de varredura e difratometria de raios-X. O potencial antioxidante do EPS foi avaliado por meio da habilidade de sequestro do radical hidroxila, remoção do peróxido de hidrogênio e potencial de redução. Também foi avaliado o potencial antimicrobiano pelo método de disco difusão. As variáveis estudadas não influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a produção do EPS nos níveis avaliados. A máxima produção de EPS obtida foi de 1,9 g/L quando empregadas concentrações de 27,5 g/L de sacarose, 1,5 g/L de peptona e agitação de 25 rpm. O EPS apresentou uma solubilidade de 68,55% (m/v). Os espectros de IV-ATR e RMN ^{13}C demonstraram regiões características de polissacarídeos com presença de anel de glicose em configuração β e moléculas de até 6 carbonos com presença de succinato e acetato. Micrografias obtidas por MEV indicaram que o EPS produzido apresenta estrutura morfológica na forma de filmes finos e translúcidos, com dobras ao longo de sua extensão, bem como estruturas granulares distribuídas irregularmente. A análise por difração de raios-X demonstrou que o exopolissacarídeo apresenta estrutura amorfa com regiões semicristalinas. O EPS apresentou poder redutor de 0,126, habilidade de remoção do radical hidroxila de 74,5% e 14,28% de capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio. Não foi verificada atividade antimicrobiana frente a *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*, *S. aureus*, *C. tropicalis* e *C. albicans* em concentrações de até 1,1 g/L. Os resultados encontrados sugerem que o EPS produzido demonstra ter potencial para aplicações biológicas devido a elevada solubilidade em água e habilidade antioxidante.

Palavras-chave: Bioatividade. Biopolímero. EPS fúngico.

ABSTRACT

FONSECA, Michel da Silva. New exopolysaccharide characterization produced by filamentous fungi isolated from palm husk. 2017. 53 S. Undergraduate final project – Bachelor of Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2017.

Exopolysaccharide (EPS) are biomacromolecules produced by some microorganisms and excreted to culture medium. EPS production has aroused researchers interest due to their technological and bioactive activity, antitumor, antioxidant, antiviral and immunoestimulatory properties. Considering technological relevance in the new biopolymers identification, the present study aimed to evaluate the new EPS production, as well as their initial characterization. Factorial planning methodology, by delineation composite central rotational (2^3) was employed to assess the influence of agitation, concentration of sucrose and concentration of peptone variables on the EPS production and biomass mycelial. The exopolysaccharide produced was subjected to analysis of water solubility, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance carbon-13, scanning electron microscope and diffractometry X-ray. EPS antioxidant potential was studied through the evaluation of kidnapping hydroxyl radical, removal of hydrogen peroxide and potential reducer. It was also evaluated the potential antimicrobial by disk diffusion method. The variables studied did not influence significantly ($p < 0.05$) in the production of the EPS at the levels evaluated. The maximum production of EPS obtained was 1.9 g/L when employed in sucrose (27.5 g/L) and peptone (1.5 g/L) concentration and agitation of 25 rpm. The EPS presented 68,55% (m/v) of water solubility. The spectra of FT-IR and NMR ^{13}C showed polysaccharides typical regions with the presence of glucose ring with configuration β and molecules of up to 6 carbons with the presence of succinate and acetate. Micrographs obtained by electron microscopy indicated that the EPS produced presented aspect heterogeneous with smooth regions and spirals containing granules with a diameter of 90 to 990 nm. Diffraction analysis x-ray showed that the EPS presented amorphous regions and semicrystalline structure. The EPS presented a power reducer 0,126, removal ability of hydroxyl radical (74,5%) and 14,28% of the removal of hydrogen peroxide capacity. It has not been verified antimicrobial activity against *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*, *S. aureus*, *C. tropicalis* and *C. albicans* at concentrations up to 1.1 g/L. The results suggest that the EPS produced has been shown to have potential for applications in biological due to the high water solubility and antioxidant ability.

Keywords: Bioactivity. Biopolymer. Fungal EPS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura da parede celular fúngica. | 18 |
| Figura 2 - Aspecto macroscópico das unidades formadoras de colônia de uma levedura do gênero <i>Saccharomyces</i> sp. (esquerda) e microscopia ótica evidenciando sua morfologia unicelular (direita). | 19 |
| Figura 3 - Aspecto macroscópico de um fungo filamentososo do gênero <i>Penicillium</i> sp. (esquerda) e microscopia ótica evidenciando as hifas, esporangios e esporos (direita). | 20 |
| Figura 4 - Representação estrutural de uma β -glucana obtida de parede celular de levedura..... | 21 |
| Figura 5 - Fungo mantido em meio ágar <i>Sabouraud</i> em tubo de ensaio (esquerda) e cultivado em placas de Petri (direita). | 26 |
| Figura 6 - Gráfico de pareto para produção de EPS. | 33 |
| Figura 7 - Gráfico de contorno referente a influência das concentrações de peptona e sacarose sobre a biossíntese de EPS..... | 34 |
| Figura 8 - Gráfico de contorno referente a influência da agitação e concentração de peptona (esquerda) e concentração de sacarose sobre a biossíntese de EPS (direita). | 34 |
| Figura 9 - Gráfico de pareto para crescimento micelial. | 35 |
| Figure 10 - Gráfico de contorno referente a influência da agitação e concentração de peptona (esquerda) e agitação e concentração de sacarose sobre crescimento micelial (direita). | 36 |
| Figura 11 - Teste de solubilidade do biopolímero em água. Sobrenadante contendo biopolímero dissolvido (esquerda) e tubo contendo <i>pellet</i> do biopolímero não dissolvido em água (direita)..... | 37 |
| Figura 12 - Espectro de infravermelho do biopolímero produzido. | 38 |
| Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C do biopolímero produzido. | 39 |
| Figura 14 - Micrografias (MEV) do biopolímero em amplitudes de 200 X (a), 400 X (B), 600 X (C), 1200 X (D), 1500 X (E) e 3000 X (F). | 40 |
| Figura 15 - Difratograma de raios - X do biopolímero produzido..... | 41 |
| Figura 16 - Poder redutor do biopolímero produzido..... | 42 |
| Figura 17 - Remoção de OH- do biopolímero produzido..... | 43 |

| | |
|---|----|
| Figura 18 - Remoção de H ₂ O ₂ do biopolímero produzido. | 43 |
| Figura 19 - Atividade antimicrobiana pelo teste de microdifusão do biopolímero produzido..... | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Espécies fúngicas produtoras de EPS em escala laboratorial | 22 |
| Tabela 2 - Delineamento composto central rotacional (2^3)..... | 27 |
| Tabela 3 - Matriz do delineamento composto central rotacional (2^3)..... | 27 |
| Tabela 4 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para avaliação da influência das variáveis concentração da fonte de carbono, concentração da fonte de nitrogênio e agitação na produção de biomassa micelial e EPS | 32 |
| Tabela 5 - Determinação do grau de solubilidade do EPS | 36 |
| Tabela 6 - Avaliação de potencial antimicrobiano pelo método de disco difusão | 44 |

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIações

| | |
|---------------------|---|
| EPS | Exopolissacarídeo |
| DCCR | Delineamento Composto Central Rotacional |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| FT-IR | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| RMN ¹³ C | Ressonância Magnética Nuclear |
| DRX | Difratometria de Raios X |
| UTFPR | Universidade Tecnológica Federal do Paraná |
| HPAEC-PED | High Performance Anion Exchange Chromatography Pulsed Electrochemical Detection |
| MCF-7 | Michigan Cancer Foundation - 7 |
| MSMV | Meio de Sais Minerais de Vogel |
| EUA | Estados Unidos da América |
| ATR | Attenuated Total Reflection |
| CLSI | The Clinical & Laboratory Standards Institute |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CMB | Concentração Mínima Bactericida |
| CMF | Concentração Mínima Fungicida |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| ^{13}C | Carbono 13 |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| g/L | Gramas por litro |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potássio monobásico |
| MgSO_4 | Sulfato de magnésio |
| % | Por cento |
| m/L | Mililitros |
| rpm | Rotações Por Minuto |
| VVM | Volume de ar por Volume de Meio |
| nm | Nanômetros |
| min | Minutos |
| mg | Miligramas |
| cm^{-1} | Centímetros |
| T | Tesla |
| $\text{CuK}\alpha$ | Energia de raios X |
| Å | Ångstrom |
| mA | Miliampere |
| kV | Kilovolt |
| ° | Graus |
| m/v | Massa por Volume |
| mM | Milimolar |
| M | Molar |
| OH | Hidroxila |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrogênio |
| H_2SO_4 | Ácido sulfúrico |
| KI | Iodeto de potássio |
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | Tiosulfato de sódio |
| \cong | Aproximadamente igual |
| μL | Microlitro |
| mm | Milímetros |

μg

Microgramas

UFC

Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 3.1 FUNGOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS | 18 |
| 3.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS: EXOPOLISSACARÍDEOS | 20 |
| 3.3 PARAMETROS QUE AFETAM A SÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS | 23 |
| 3.4 CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS | 25 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO | 26 |
| 4.1.1 Cepa fúngica | 26 |
| 4.1.2 Preparo do inóculo | 26 |
| 4.1.3 Avaliação do efeito da concentração da fonte de carbono, nitrogênio e agitação na produção de EPS | 27 |
| 4.2 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA..... | 28 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EPS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO – REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (IV-ATR) | 28 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EPS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³ C – RMN ¹³ C..... | 29 |
| 4.5 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 29 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX) | 29 |
| 4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 29 |
| 4.7.1 Poder redutor | 29 |
| 4.7.2 Sequestro do radical hidroxila (HO•) | 30 |
| 4.7.3 Remoção do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 30 |
| 4.8 POTENCIAL ANTIMICROBIANO | 30 |
| 4.8.1 Microrganismos | 30 |
| 4.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de discos de difusão | 31 |
| 5 RESULTADOS E DICUSSÃO | 32 |
| 5.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO, NITROGÊNIO E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EPS | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA..... | 36 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO – (IV-ATR) | 37 |
| 5.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO POR RMN ¹³ C..... | 38 |
| 5.5 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 39 |
| 5.6 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)..... | 40 |
| 5.7 POTENCIAL ANTIOXIDANTE..... | 41 |
| 5.7.1 Poder redutor | 41 |
| 5.7.2 Sequestro do radical hidroxila (HO•) | 42 |
| 5.7.3 Remoção do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 43 |
| 5.8 POTENCIAL ANTIMICROBIANO | 44 |
| 6 CONCLUSÃO | 46 |
| 7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS..... | 47 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 48 |

1 INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas extracelulares produzidas em cultivo submerso por algumas bactérias, leveduras e fungos filamentosos, a partir de meio de cultivo contendo fontes de carbono como glicose, frutose e sacarose (MAHAPATRA & BENERJEE, 2013).

A produção microbiana de exopolissacarídeo tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, devido à simplicidade do processo produtivo, bem como pelas propriedades bioativas que apresentam, as quais incluem potencial antioxidante e antimicrobiano, atividades imunomoduladora, hipocolesterolêmica, anti-idade, hipoglicêmica e anticarcinogênica. Devido a tais potencialidades biológicas, os EPS apresentam ampla aplicação comercial, principalmente nos setores de cosméticos e farmacêutico, podendo ainda serem utilizados em sistemas alimentares como espessantes e geleificantes.

Dependendo do microrganismo produtor e das condições de produção, tais como fontes de carbono e nitrogênio, pH de cultivo, aeração, suplementação com sais minerais, óleos e vitaminas, os EPS apresentam particularidades em relação a estrutura e propriedades químicas e físicas, o que influencia diretamente na sua bioatividade e propriedades tecnológicas.

Diante das inúmeras aplicações biotecnológicas dos exopolissacarídeos, além da relativa facilidade de obtenção em cultivos submersos, o presente estudo teve como objetivo a produção e caracterização parcial de um novo EPS produzido por fungo filamentoso isolado de casca de palmeira.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção e caracterização parcial de um novo exopolissacarídeo produzido por fungo filamentoso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do efeito da agitação e diferentes concentrações da fonte de carbono (sacarose) e nitrogênio (peptona) na produção EPS e biomassa micelial em cultivo submerso, utilizando metodologia de planejamento fatorial;
- Avaliação da solubilidade do EPS em água;
- Caracterização do EPS pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho – Reflectância total atenuada (IV-ATR), ressonância magnética nuclear do carbono 13 (RMN ^{13}C) e difratometria de raios-X (DRX);
- Avaliação da morfologia do EPS liofilizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliação da atividade antioxidante pelo métodos de poder redutor, remoção do radical hidroxila e remoção do peróxido de hidrogênio *in vitro* e do potencial antimicrobiano por disco difusão, do EPS contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*, *S. aureus*, *C. tropicalis* e *C. albicans*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os fungos são encontrados tanto em ambientes aquáticos (água doce e salgada) como terrestres, além de alguns serem encontrados como parasitas de outros organismos (MADIGAN et al., 2010).

Com cerca de cem mil espécies descobertas, os fungos constituem um grupo bastante heterogêneo de microrganismos, cuja a classificação filogenética mais aceita atualmente é a proposta por Alexopoulos et al. (1996). Tal classificação, separa os fungos em quatro grandes filos, os *Chytridiomycota*; *Zygomycota*; *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* são encontrados os principais produtores de polissacarídeos microbianos (MADIGAN et al., 2010).

Em relação a estrutura celular, os fungos apresentam constituição típica de células pertencentes ao domínio *Eukaria*, apresentando núcleo, organelas citoplasmáticas e membrana composta por bicamada fosfolipídica, além de parede celular composta majoritariamente pela quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, sob a forma de feixes microfibrilares (Pinheiro, 2015) como demonstrado na figura 1. Entretanto, em algumas espécies, açúcares como glucanas, mananas e galactosanas podem substituir a quitina em até 90 % (MADIGAN et al., 2010).

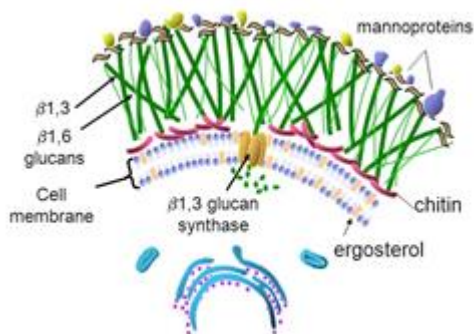


Figura 1 - Estrutura da parede celular fúngica.
Fonte: nammex (2017)

Os fungos são seres quimioheterótrofos, ou seja, necessitam de nutrientes disponíveis no meio para obtenção de energia. Se nutrem por absorção de nutrientes degradados por vias enzimáticas, possuindo a capacidade de metabolizar

principalmente proteínas e carboidratos (COELHO & SILVA, 2006; MADIGAN et al., 2010).

Estes microrganismos se desenvolvem em temperaturas ótimas entre 25 °C e 30 °C, porém existem espécies, como os termófilicos, que apresentam bom desenvolvimento a elevadas temperaturas (até 60 °C), sendo bastante explorados na produção de enzimas termoestáveis. Em relação ao pH ótimo de desenvolvimento, são classificados como acidófilos (pH ótimo entre 4 e 6), mas podem se desenvolver em uma ampla faixa de pH que varia de 2 até 9. Quanto à necessidade de oxigênio são classificados como aeróbios e algumas espécies de fungos unicelulares (leveduras) apresentam capacidade de realizar respiração anaeróbia (COELHO & SILVA, 2006; TORTORA et al., 2012).

Os fungos podem ser unicelulares como as leveduras ou pluricelulares como os filamentosos, conforme ilustrado nas figuras 2 e 3. Estes últimos são compostos pelo micélio, que inclui as hifas aéreas, onde estão localizados os esporos (estruturas de reprodução) e as hifas vegetativas, responsáveis pela absorção de nutrientes (TORTORA et al., 2012). Quanto à reprodução, esta pode ser assexuada (esporulação, fragmentação de hifas ou brotamento) e sexuada (conjugação ou fusão de hifas).



Figura 2 - Aspecto macroscópico das unidades formadoras de colônia de uma levedura do gênero *Saccharomyces* sp. (esquerda) e microscopia ótica evidenciando sua morfologia unicelular (direita).

Fonte: eureka brewing (2011); Photomacrography (2011)



**Figura 3 - Aspecto macroscópico de um fungo filamentosso do gênero *Penicillium* sp. (esquerda) e microscopia ótica evidenciando as hifas, esporangios e esporos (direita).
Fonte: pinterest (2017)**

O crescimento fúngico tanto em meio sólido, quanto em cultivos submersos, tem início com a adaptação das células às condições do meio, a chamada fase *lag*, seguida pela fase de crescimento exponencial (multiplicação), onde são sintetizados os metabólitos primários que estão associados ao crescimento do microrganismo e onde há a formação de compostos extracelulares (TORTORA et al., 2012). Na fase estacionária, podem ser sintetizados metabólitos especializados, como é o caso de alguns exopolissacarídeos, cuja biossíntese é dependente das condições de cultivo (PINHEIRO, 2015).

3.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS: EXOPOLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos microbianos podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos e seu processo de biossíntese podem variar conforme o microrganismo utilizado. Alguns polissacarídeos podem ser sintetizados como constituintes estruturais da parede celular, conferindo forma e resistência mecânica à célula, ou ainda, serem produzidos e excretados para o meio extracelular, denominados exopolissacarídeos (EPS). Estes últimos atuam como reserva de energia e proteção frente a condições adversas como desidratação, fagócitos e diferenças de pressão osmótica (CZACZYK; MYSZKA, 2007).

Conforme destacado por Mahapatra & Benerjee (2013), a formação dos EPS microbianos é dependente das condições físicas de processo (temperatura, aeração e agitação) e dos constituintes do meio de cultivo, especialmente da disponibilidade de carbono e nitrogênio. O processo segue três etapas básicas, que incluem a assimilação da fonte de carbono, seguida pela síntese de compostos intracelulares

terminando com a formação da cadeia monomérica e excreção do EPS formado para meio extracelular (LUNA, 2016).

Os EPS podem ser classificados em dois tipos, os homopolissacarídeos e os heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos contêm em sua estrutura apenas um tipo de unidade monomérica (monossacarídeo), como é o caso da goma levana (polímero de β -D-frutopiranosose). Tais polímeros normalmente são sintetizados com o emprego de fontes de carbono simples. Os heteropolissacarídeos, por sua vez, são compostos por mais de um tipo de unidade monomérica e são obtidos a partir de açúcares mais complexos. A goma xantana é um exemplo de heteropolissacarídeo, o qual é composto por monômeros de β -D-glicopiranosose, α -L-ramnose e ácido β -D-glucurônico (LUNA, 2016; DONOT et al., 2012).

As glucanas são um dos tipos mais comuns de homopolissacarídeos, as quais são formadas por unidades de glicose unidas por ligação glicosídicas, que se diferem uma das outras principalmente em relação a massa molecular, solubilidade, viscosidade e nas características biológicas, podendo ser lineares, ramificadas ou cíclicas (MCINTOSH et al., 2005). A figura 4, mostra a representação estrutural de uma β -glucana obtida da parede celular de leveduras, onde podem ser evidenciadas ramificações e ligações β -(1-3) e (1,6).

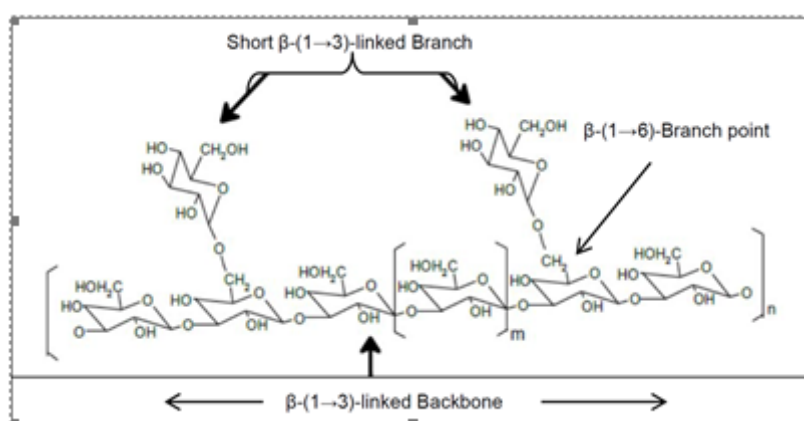


Figura 4 - Representação estrutural de uma β -glucana obtida de parede celular de levedura.
Fonte: intechopen (2017)

Dentre os microrganismos produtores de EPS, destacam-se os fungos filamentosos, os quais são capazes de metabolizar diferentes substratos como a glicose, sacarose, frutose, resíduos agroindustriais e hidrocarbonetos (JOO, et al., 2004). Os EPS produzidos por fungos possuem importante aplicação industrial, especialmente nos setores farmacêutico e alimentício pelo fato de apresentarem

inúmeras propriedades biológicas, que incluem, potencial antioxidante e antimicrobiano; atividade imunomoduladora, hipocolesterolêmica e hipoglicemiante; ação antitrombótica e anti-inflamatória, além de apresentar capacidade antiproliferativa frente a alguns tipos de células tumorais (CUNHA et al., 2017; KAGIMURA et al., 2015; SOMENSI, 2014; MAHAPATRA & BENERJEE, 2013).

Até o momento, existem mais de cem espécies fúngicas produtoras de exopolissacarídeos descritas na literatura científica, que incluem muitos gêneros de basidiomicetos, fungos filamentosos e leveduras. Alguns exemplos destes microrganismos estão apresentados na tabela 1, adaptada de Mahapatra & Benerjee (2013).

Tabela 1 – Espécies fúngicas produtoras de EPS em escala laboratorial

| Microrganismo | Referência |
|----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Agaricus xanthodermus</i> | Maziero et al. (1999) |
| <i>Alternaria solani</i> | Graber et al. (1988) |
| <i>Antrodia cinnamomea</i> | Lin, Sung (2006) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Sutherland (1996) |
| <i>Auricularia fuscosuccinea</i> | Maziero et al. (1999) |
| <i>Botryosphaeria rhodina</i> | Miranda et al. (2008) |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Graber et al. (1988) |
| <i>Candida boidinii</i> | Petersen et al. (1990) |
| <i>Cephalosporium stieheri</i> | Stasinopoulos et al. (1989) |
| <i>Cryptococcus elinorii</i> | Graber et al. (1988) |
| <i>Flamnulina velutipes</i> | Graber et al. (1988) |
| <i>Fusarium coccophilum</i> | Madla et al. (2005) |
| <i>Ganoderma applanatum</i> | Lee et al. (2007) |
| <i>Hansenula capsulate</i> | Petersen et al. (1990) |
| <i>Isaria farinose BO5 84</i> | Jiang et al. (2008) |
| <i>Lasiodiplodea theobromae</i> | Cunha et al. (2012) |
| <i>Lentinus edodes</i> | Feng et al. (2010) |
| <i>Mucor mucedo</i> | Graber et al. (1988) |
| <i>Oudemansiella canarii</i> | Maziero et al. (1999) |
| <i>Paecilomyces japonica</i> | Sinha et al. (2001) |
| <i>Penicillium luteum</i> | Birkinshaw et al. (1933) |
| <i>Pichia mucosa</i> | Sandford et al. (1979) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Paraspyridi et al. (2010) |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> | Ruiter et al. (1994) |
| <i>Sclerotium rolfsii</i> | Schmid; Meyer e Sieber (2011) |
| <i>Torulopsis pinus</i> | Sandford et al. (1979) |

| | |
|------------------------------|------------------------|
| <i>Tremella brasiliensis</i> | Sandford et al. (1979) |
| <i>Tuber sinense</i> | Tang et al. (2008) |
| <i>Zygosporium masonii</i> | Madla et al. (2005) |

Fonte: adaptado de Mahapatra & Benerjee (2013).

3.3 PARAMETROS QUE AFETAM A SÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS

A literatura científica destaca que além de considerar o microrganismo produtor, os parâmetros fermentativos também exercem grande influência na obtenção de exopolissacarídeos fúngicos. Dentre estes parâmetros, destacam-se a aeração e agitação do meio de cultivo, pH e temperatura, aditivos especiais como óleos e vitaminas, tempo de incubação, presença de microelementos e a concentração e tipo das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas (TANG et al., 2002; SUTHERLAND, 1996; DONOT, et al., 2012; BARBOSA, et al., 2004).

A seleção da melhor fonte de carbono é dependente da adaptação do microrganismo, isto é, da maneira como a cepa utilizada vai se comportar quando submetida ao processo fermentativo. A glicose e a sacarose são vastamente utilizadas na produção de exopolissacarídeos, porém, outros açúcares como maltose, sorbitol, manose, xilose e lactose, também foram utilizados com eficiência apesar de apresentarem maior custo de obtenção (SUDHAKARAN et al., 1998).

Cunha et al. (2012) avaliaram quatro diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose e sacarose) e nitrogênio (peptona, extrato de levedura, uréia e sulfato de amônia) para a produção de lasiodiplodina pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Estes autores verificaram máxima produção do EPS nos ensaios conduzidos com glicose ou maltose, como fontes de carbono e uréia ou sulfato de amônia, como fontes de nitrogênio.

Kumaran et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de sacarose (6,8 e 10%) na biossíntese de EPS pelo fungo *Syncephalastrum* sp. e verificaram máxima produção (1,2 g/100 mL) de EPS e biomassa (2,12 g/100 mL) nos ensaios conduzidos com 8% de sacarose.

Li et al. (2017) verificaram aumento na biossíntese de EPS (13,63 g/L) pelo fungo endofítico *Berkleasium* sp. Dzf12 nos experimentos conduzidos com as máximas concentrações de glicose (60 g/L) e peptona (20 g/L) avaliadas. Estes autores também observaram efeito positivo na produção de EPS pela

suplementação do meio de cultivo com os sais fosfato de potássio (0,5 g/L), sulfato de magnésio (2 g/L) e sulfato ferroso (0,05 g/L).

O tipo das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas é determinante para o bom desenvolvimento do microrganismo e maior rendimento do produto final, além de influenciar diretamente na composição do exopolissacarídeo produzido (CUNHA et al., 2012). Kim et al. (2005) destacam que a fonte de carbono utilizada pode influenciar de maneiras diferentes na biossíntese do EPS, ou seja, determinado tipo de fonte de carbono pode gerar elevado crescimento micelial, porém, inexpressiva produção de EPS.

A suplementação com fonte nitrogenada é outro fator determinante para a produção eficiente de EPS, destacando-se a peptona e o extrato de levedura entre as fontes orgânicas, e o sulfato de amônio e nitrato de potássio entre as inorgânicas (BAE et al., 2000; BARBOSA et al., 2004). Alguns estudos sugerem que a suplementação nitrogenada seja utilizada em condições limitantes, já que altas concentrações podem afetar a produção de EPS (BARBOSA et al., 2004).

Segundo Barbosa et al. (2004), a oxigenação do meio e a distribuição de nutrientes é melhorada com a otimização da agitação, destacando que a aeração do meio de cultivo pode afetar ou não a produção do EPS, dependendo do microrganismo utilizado. No caso de fungos filamentosos a aeração é indispensável para a viabilidade celular e biossíntese do EPS, uma vez que estes são aeróbios (TORTORA et al., 2012).

Kim et al. (2003) avaliaram o efeito da aeração e da agitação do meio de cultivo para a produção de EPS pelo fungo endofítico *Paecilomyces sinclairii* e observaram que estes dois parâmetros exerceram papel crítico na maior produção do biopolímero, bem como no desenvolvimento da biomassa micelial.

Por outro lado, Agudelo-Escobar (2017) verificaram que agitação e aeração acima de 120 rpm e 0,5 VVM não influenciaram significativamente na biossíntese de EPS pelo fungo filamentoso *Ganoderma lucidum*.

De Jesus et al. (2014) verificaram que a agitação e a aeração do meio de cultivo influenciaram significativamente a produção da goma xantana pela bactéria aeróbia *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, utilizando meio de cultura a base de glicerina bruta oriunda da produção de biodiesel.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Na literatura científica, os polissacarídeos microbianos são submetidos a métodos de caracterização química e biológica. Dentre os métodos de caracterização química mais utilizados, destacam-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR); ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C); microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raio-X (DRX).

Em relação às aplicações biológicas, estas podem variar em relação ao tipo de polímero avaliado, porém o potencial antioxidante e antimicrobiano é muito utilizado para avaliar a capacidade bioativa de EPS fúngicos.

Cunha et al. (2012) utilizaram cromatografia (HPAEC-PED) e espectrofotometria (FT-IR) para caracterizar a composição química do exopolissacarídeo lasiodiplodana (1-6)- β -D-glucana. Além disso, tais autores avaliaram a capacidade antiproliferativa em cultura de células tumorais MCF-7.

Exopolissacarídeo obtido de *Rhizobium tropici* também foi caracterizado por FT-IR e RMN ^{13}C , além da determinação da massa molecular e açúcares totais por métodos colorimétricos, Castellani et al. (2017). Tais autores também avaliaram a capacidade emulsificante e propriedades reológicas do EPS.

Zhang et al. (2015) caracterizaram polissacarídeo de *Cordyceps kyushuensis* utilizando cromatografia (HPAEC), FT-IR e RMN ^{13}C . A atividade biológica foi determinada pela avaliação da capacidade antioxidante utilizando os métodos de remoção do radical hidroxila, poder redutor e potencial de remoção do íon ferro.

Somensì (2014), caracterizaram o exopolissacarídeo produzido pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* e seu derivado carboximetilado pelas técnicas de FT-IR, RMN ^{13}C , difração de raios-X (DRX) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Luna (2016) ao analisar o potencial antioxidante do exopolissacarídeo sintetizado por *Lasiodiplodia theobromae*, utilizou protocolos de sequestro de radical hidroxila, sequestro do peróxido de hidrogênio e poder redutor férrico.

Osinska-Jaroszuk et al. (2014) observaram que exopolissacarídeos de *Ganoderma applanatum* apresentaram propriedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* e *Vibrio fischeri*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO

4.1.1 Cepa fúngica

Foi utilizado um fungo filamentososo isolado de casca de palmeira pertencente aos jardins do campus universitário da UTFPR, Pato Branco. O fungo foi mantido em meio ágar *Sabouraud* com cloranfenicol sob refrigeração a 5 °C. Repiques do micélio fúngico foram realizados periodicamente para a preservação da cultura.



Figura 5 - Fungo mantido em meio ágar *Sabouraud* em tubo de ensaio (esquerda) e cultivado em placas de Petri (direita).

Fonte: autoria própria

4.1.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, o micélio fúngico foi transferido assepticamente para placas de Petri contendo meio ágar *Sabouraud* com cloranfenicol, nas quais foram incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica a 28 °C. Em seguida, o micélio fúngico foi transferido para frascos *Erlenmeyer* contendo 100 mL de meio contendo 0,5 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de MgSO_4 , 0,5 g/L de peptona e 5 g/L de sacarose e então os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação (150 rpm) por 48 horas. Esta pré-cultura foi centrifugada de modo a recuperar o micélio fúngico, o qual foi ressuspenso em água destilada e triturado em mixer de modo a obter uma suspensão celular com absorbância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm. O inóculo padronizado foi utilizado para a produção do EPS, em meio contendo sacarose e peptona como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (SOMENSI, 2014).

4.1.3 Avaliação do efeito da concentração da fonte de carbono, nitrogênio e agitação na produção de EPS

Planejamento fatorial foi empregado na avaliação da influência das variáveis concentração da fonte de carbono, concentração da fonte de nitrogênio e agitação na produção de exopolissacarídeo, conforme delineamento composto central rotacional (2^3), descrito nas Tabelas 2 e 3. Como respostas foram consideradas a produção do EPS e o crescimento micelial.

Tabela 2 - Delineamento composto central rotacional (2^3)

| Variáveis | Níveis de Variação | | | | |
|-----------|--------------------|-----|------|-----|-------|
| | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
| Sacarose | 5 | 14 | 27,5 | 4,1 | 50 |
| Peptona | 0,5 | 0,9 | 1,5 | 2,1 | 2,5 |
| Agitação | 25 | 71 | 138 | 205 | 250 |

Fonte: autoria própria

Tabela 3 - Matriz do delineamento composto central rotacional (2^3)

| Ensaio | Sacarose (g/L) | Peptona (g/L) | Agitação (rpm) |
|--------|----------------|---------------|----------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | +1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 |
| 4 | -1 | +1 | +1 |
| 5 | +1 | -1 | -1 |
| 6 | +1 | -1 | +1 |
| 7 | +1 | +1 | -1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 |
| 10 | +1,68 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 |
| 12 | 0 | +1,68 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 |
| 14 | 0 | 0 | +1,68 |
| 15C | 0 | 0 | 0 |
| 16C | 0 | 0 | 0 |

Fonte: autoria própria

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL. Foram utilizados 150 mL de meio contendo 27,5 g/L de sacarose, 1,5 g/L de peptona bacteriológica, 2 g/L de KH_2PO_4 e 2 g/L de MgSO_4 e 5 mL de inóculo padronizado conforme item 4.1.2. Os frascos foram incubados em agitador orbital (*shaker*) sob agitação de 25 rpm, a 28 °C, por 96 horas (CUNHA et al., 2012).

No final do bioprocesso, o caldo de cultivo foi separado da biomassa celular por centrifugação (1500 x g, 20 min.) e então o EPS produzido foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto a 4 °C, *overnight*. Em seguida o EPS precipitado foi submetido à intensa diálise contra água destilada por 72 horas e então o mesmo foi submetido a secagem por liofilização.

A biomassa micelial foi lavada três vezes com água a 60 °C e submetida a secagem em estufa com circulação de ar à 60 °C até massa constante.

4.2 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Para avaliar a solubilidade em água, 10 mg do EPS foram suspensos em 10 mL de água destilada sob agitação constante, durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 4000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi então coletado e submetido a determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Os resultados de açúcares totais foram relacionados com a quantidade de amostra solúvel (g) em 100 mL de água e a solubilidade foi expressa em porcentagem de massa solúvel % (KAGIMURA et al., 2015).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EPS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO – REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (IV-ATR)

Os espectros de infravermelho do EPS (previamente dialisado e liofilizado) foram obtidos em espectrômetro Vertex 70 da Bruker (EUA) na faixa espectral compreendida entre 400 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 2 cm^{-1} , número de acumulações igual a 16 varreduras para cada espectro, utilizando-se 1% de amostra em cristal de germânio (ATR).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EPS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C – RMN ^{13}C

Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos com o EPS no estado sólido em espectrômetro de ressonância nuclear Varian Inova 300 (7,1 T).

4.5 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia superficial do EPS. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi, modelo TM3000, EUA) a partir das amostras liofilizadas. As amostras foram dispostas no suporte do equipamento aderidas em fitas de carbono e imagens foram obtidas com amplitude de 200, 400, 600, 800, 1500 e 3000 vezes.

4.6 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Para obtenção dos padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras, foi utilizado difratômetro Shimadzu, modelo XDR-6000, com fonte de radiação de lâmpada de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$), corrente de 30 mA e tensão de 40 kV, velocidade de $0,5^\circ/\text{min}$ e passo de $0,02$ graus.

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Poder redutor

O poder redutor foi avaliado conforme metodologia descrita por Liu et al. (2010). Em tubos de ensaio foram adicionados 2,5 mL das diferentes concentrações do EPS (0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (1% m/v), os quais foram incubados a temperatura de 50°C por 20 minutos. Em seguida, a reação foi encerrada com a adição de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10% m/v), 5 mL de água destilada e 1 mL de cloreto férrico (0,1% m/v). Os resultados foram obtidos por meio de leituras espectrofotométricas em 700 nm, onde os maiores

valores de absorvância observados indicaram maior poder redutor da amostra avaliada.

4.7.2 Sequestro do radical hidroxila (HO•)

O sequestro do radical hidroxila (HO•) foi determinado conforme Liu et al. (2010) com adaptações. Volume de 1 mL da amostra do EPS, nas diferentes concentrações estudadas (0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL), foi adicionado a uma mistura reacional contendo 0,5 mL de FeSO₄ (1,5 mM), 0,35 mL de H₂O₂ (6 mM) e 0,15 mL de salicilato de sódio (20 mM). Em seguida, esta mistura foi incubada durante 1 hora a 37 °C e a absorvância do complexo salicilato-hidroxilado foi medida em 562 nm. A porcentagem de remoção foi calculada conforme equação abaixo:

$$\% \text{ de Remoção de HO} \bullet = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

4.7.3 Remoção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A atividade de remoção do peróxido de hidrogênio foi avaliada conforme metodologia descrita por Liu et al. (2010) com pequena adaptação. Inicialmente, 0,5 mL da amostra de EPS nas diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL), foi adicionado em frasco contendo 0,5 mL de H₂O₂ (0,1 mM), 0,05 mL de molibdato de amônio (3% m/v), 5 mL de H₂SO₄ (2 M) e 3,5 mL de KI (1,8 M). Em seguida, a mistura foi titulada com Na₂S₂O₃ (5 mM) até a coloração amarelada da solução sofrer viragem para incolor. A atividade de remoção foi calculada como:

$$\% \text{ Remoção de H}_2\text{O}_2 = \frac{(V_0 - V_1)}{V_0} \times 100 \quad (2)$$

4.8 POTENCIAL ANTIMICROBIANO

4.8.1 Microrganismos

Foram utilizadas duas bactérias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923 e *L. plantarum* (SACCO LPRA)) duas Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922 e *S. enterica* Thyphimurium) e duas leveduras (*C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. albicans* ATCC 18804).

4.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de discos de difusão

O protocolo de disco difusão em ágar foi realizado conforme descrito pelo *National Committee for clinical Laboratory Standard* (CLSI, 2009, 2012) com algumas modificações: Inicialmente, os microrganismos foram reativados em caldo Mueller-Hinton (bactérias) e *Sabouraud* com cloranfenicol (leveduras) para obter a concentração celular em fase exponencial de crescimento. Em seguida, os microrganismos foram padronizados em escala de MacFarland 0,5 ($\cong 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e 100 μ L foram inoculados com swabs esterilizados na superfície de placas de Petri contendo ágar *Mueller-Hinton*. Na sequência, discos de papel (5 mm) impregnados com solução de EPS (máxima concentração obtida após solubilização em água) foram distribuídos nas placas de Petri contendo ágar *Mueller-Hinton* e então as placas foram incubadas a 37 °C (bactérias) e 28 °C (leveduras) durante 24 horas e 48 horas, respectivamente. Após incubação, foram determinados o diâmetro dos halos de inibição e os resultados foram expressos em mm^{-1} . Os antimicrobianos tetraciclina (bactérias) e fluconazol (leveduras), todos em concentração de 5 mg/mL, foram usados como controle positivo. Água peptonada foi utilizada com controle negativo.

5 RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO, NITROGÊNIO E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EPS

Na tabela 4, estão descritos os valores reais das variáveis avaliadas, bem como os resultados da produção de EPS e biomassa micelial obtidos nos ensaios experimentais referente ao delineamento experimental DCCR 2³.

O fungo estudado produziu exopolissacarídeo em todas as condições experimentais estudadas no delineamento experimental. Os conteúdos de EPS produzido variaram bastante em relação as condições de cultivo.

No ensaio 9, onde foram empregadas concentrações de 5 g/L de sacarose e 1,5 g/L de peptona associadas a uma agitação de 138 rpm foram produzidas 0,16 g/L de EPS e 10,48 g/L de biomassa micelial. Já no ensaio 13, onde foram empregadas concentrações de 27,5 g/L de sacarose e 1,5 g/L de peptona associada a uma baixa condição de agitação (25 rpm), foram produzidos 1,9 g/L de EPS e 0,88 g/L de biomassa micelial.

Tabela 4 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para avaliação da influência das variáveis concentração da fonte de carbono, concentração da fonte de nitrogênio e agitação na produção de biomassa micelial e EPS

| Ensaio | Sacarose (g/L) | Peptona (g/L) | Agitação (rpm) | Biomassa (g/L) | EPS (g/L) |
|--------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 1 | 14,0 | 0,9 | 71 | 0,62 | 1,13 |
| 2 | 14,0 | 0,9 | 205 | 3,72 | 0,46 |
| 3 | 14,0 | 2,1 | 71 | 6,94 | 0,56 |
| 4 | 14,0 | 2,1 | 205 | 4,26 | 0,70 |
| 5 | 4,1 | 0,9 | 71 | 1,01 | 0,46 |
| 6 | 4,1 | 0,9 | 205 | 11,22 | 0,23 |
| 7 | 4,1 | 2,1 | 71 | 1,15 | 1,10 |
| 8 | 4,1 | 2,1 | 205 | 10,01 | 0,60 |
| 9 | 5,0 | 1,5 | 138 | 10,48 | 0,16 |
| 10 | 50,0 | 1,5 | 138 | 19,68 | 1,20 |
| 11 | 27,5 | 0,5 | 138 | 8,77 | 0,26 |
| 12 | 27,5 | 2,5 | 138 | 8,96 | 1,20 |
| 13 | 27,5 | 1,5 | 25 | 0,88 | 1,90 |
| 14 | 27,5 | 1,5 | 250 | 8,22 | 0,36 |

| | | | | | |
|-----|------|-----|-----|-------|------|
| 15C | 27,5 | 1,5 | 138 | 10,27 | 0,90 |
| 16C | 27,5 | 1,5 | 138 | 11,65 | 0,96 |

Fonte: autoria própria

Com relação a biossíntese do EPS, nenhuma das variáveis avaliadas demonstrou influência estatisticamente significativa considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Isto pode ser claramente verificado através do gráfico de Pareto ilustrado na Figura 6. Mesmo assim, foram construídos os gráficos de contorno referente a influência das variáveis estudadas sobre a resposta produção de EPS (Figuras 7 e 8).

Através de tais gráficos pode ser verificada tendência de maior produção de EPS quando são empregadas concentrações de peptona próximas a 1,5 g/L, associada a concentrações de sacarose próxima a 27,5 g/L.

Da mesma forma, com relação a agitação pode-se considerar haver uma tendência de maior produção de EPS em condições de processo com menores valores de agitação (Figura 8).

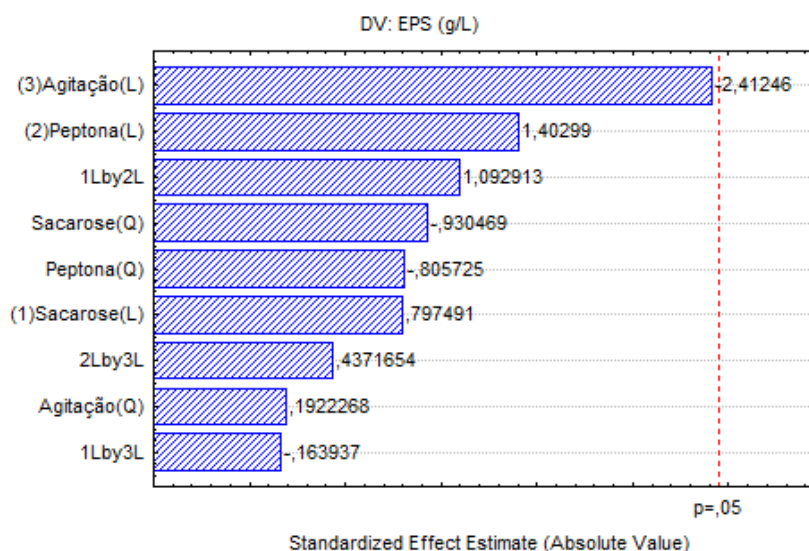


Figura 6 - Gráfico de pareto para produção de EPS.

Fonte: autoria própria

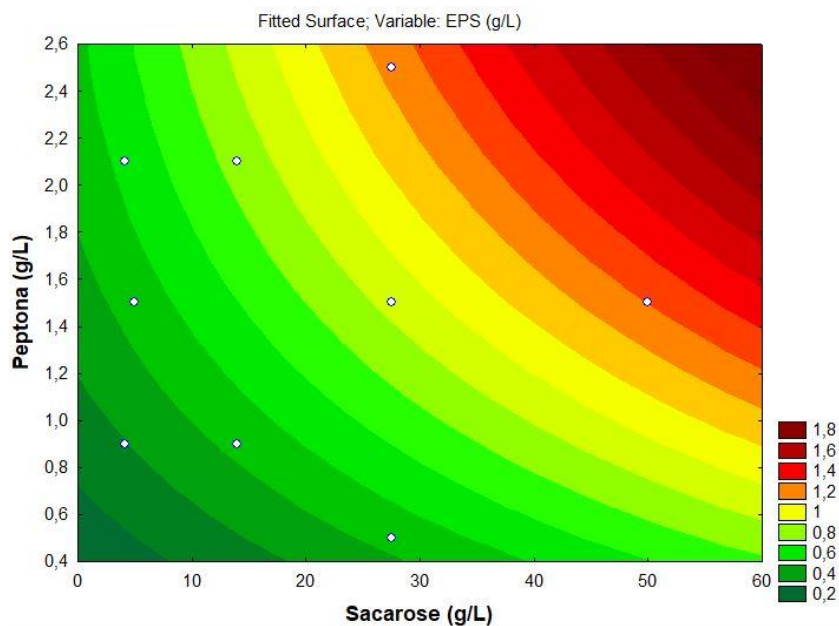


Figura 7 - Gráfico de contorno referente a influência das concentrações de peptona e sacarose sobre a biossíntese de EPS.

Fonte: autoria própria

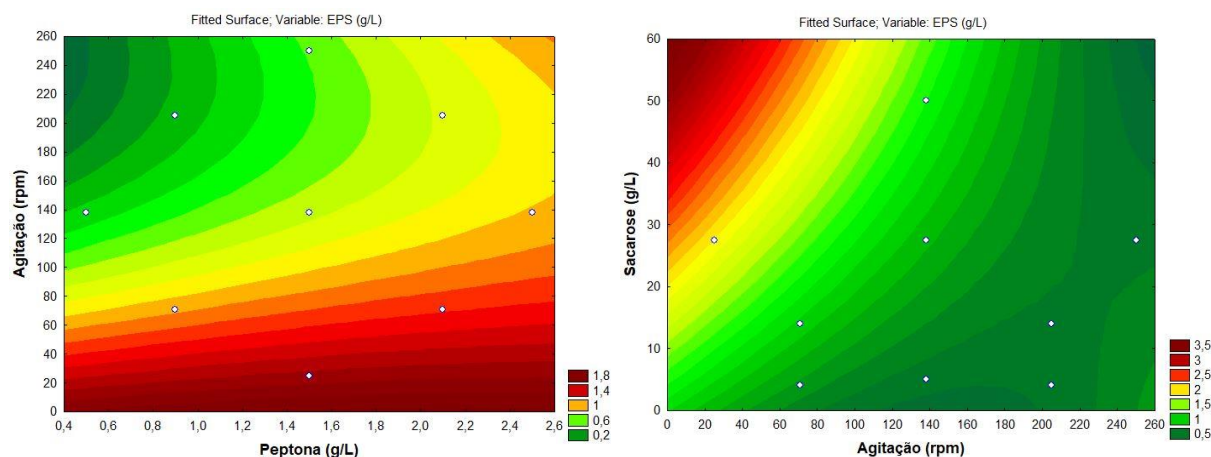


Figura 8 - Gráfico de contorno referente a influência da agitação e concentração de peptona (esquerda) e concentração de sacarose sobre a biossíntese de EPS (direita).

Fonte: autoria própria

Similarmente ao verificado com a produção de EPS, os conteúdos de biomassa fúngica produzidos nos ensaios fermentativos também variaram bastante em função das condições experimentais empregadas. No ensaio 1, onde foi utilizada 14 g/L de sacarose, 0,9 g/L de peptona e uma agitação de 71 rpm foi produzido um conteúdo de 0,62 g/L. Por outro lado, no ensaio 10, onde foram empregadas concentrações de 50 g/L e 1,5 g/L, respectivamente de sacarose e peptona,

associado a uma agitação de 138 rpm foi produzido um conteúdo 31 vezes superior (19,6 g/L).

Conforme demonstrado no gráfico de pareto (Figura 9), apenas a agitação demonstrou efeito estatisticamente significativo ($p > 0,05$) sobre o crescimento micelial. Através dos gráficos de contorno de respostas (Figura 10), pode ser verificado que o crescimento micelial é favorecido em condições de agitação entre 138 rpm (ponto central do planejamento) e 205 rpm (nível +1). Ou seja, maiores valores de agitação contribuem para maior crescimento do fungo. Tal comportamento possivelmente está associado ao estímulo da atividade respiratória em função de uma maior disponibilidade de oxigênio promovida pela agitação do meio.

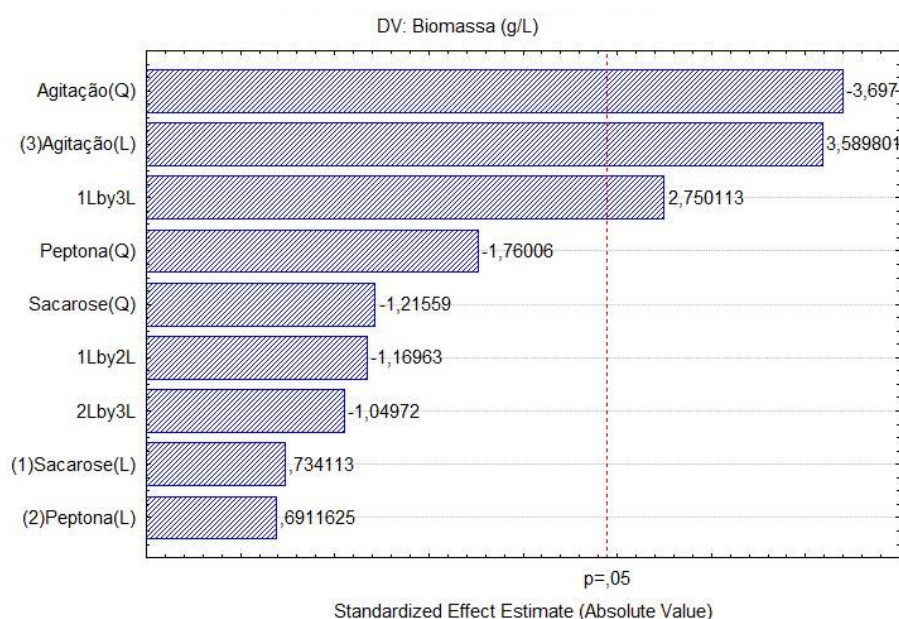
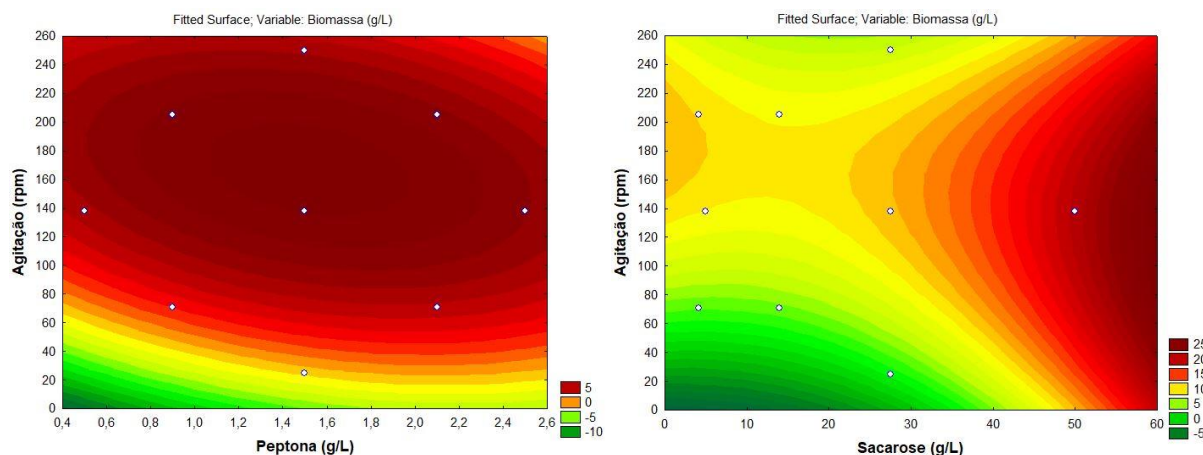


Figura 9 - Gráfico de pareto para crescimento micelial.
Fonte: autoria própria



**Figure 10 - Gráfico de contorno referente a influência da agitação e concentração de peptona (esquerda) e agitação e concentração de sacarose sobre crescimento micelial (direita).
Fonte: autoria própria**

5.2 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA

A avaliação da solubilidade em água é um parâmetro que está diretamente associado as potencialidades de aplicação de moléculas bioativas. Macromoléculas com maior solubilidade em água comumente apresentam maiores funcionalidades biológicas e maior campo de aplicações em sistemas biológicos.

O exopolissacarídeo produzido pelo fungo apresentou elevada solubilidade em água (68,55%), conforme demonstrado na Tabela 5 e Figura 11 A e B. De fato, tal solubilidade é 20 vezes superior aos percentuais (2,8 a 3%) encontrados por Calegari (2016) e Kagimura et al. (2015) em lasiodiplodana, uma (1→6)-β-D-glucana extracelular produzida pelo fungo *L. theobromae*.

Tabela 5 - Determinação do grau de solubilidade do EPS

| Massa inicial EPS (mg) | Volume de água (mL) | Massa dissolvida (mg/mL) | Solubilidade % |
|------------------------|---------------------|--------------------------|----------------|
| 10 | 10 | 0,68 ± 0,02 | 68,55 ± 1 |

Fonte: autoria própria



Figura 11 - Teste de solubilidade do biopolímero em água. Sobrenadante contendo biopolímero dissolvido (esquerda) e tubo contendo *pellet* do biopolímero não dissolvido em água (direita). Fonte: autoria própria

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO – (IV-ATR)

O espectro IV-ATR do biopolímero bruto produzido (Figura 12) demonstrou apresentar bandas de absorção típicas de polissacarídeos nas regiões de 4000 – 400 cm^{-1} . Bandas na região de 3337 cm^{-1} indicam estiramento OH (ALZORQI et al., 2016; VASCONCELOS, 2008). Bandas na região de 1640 cm^{-1} indicam vibração de estiramento do anel de glicose (XU, 2009). Bandas na região de 1068 cm^{-1} e 886 cm^{-1} indicam ligação C-O característico do anel de piranose e configuração β presente na molécula do biopolímero, respectivamente (WANG et al., 2009; XU, 2009).

Li et al. (2017) também verificaram banda de estiramento OH na região entre 3000 – 3500 cm^{-1} , banda típica de C=O em 1640 cm^{-1} e ligação β glicosídica na região de 890 cm^{-1} em exopolissacarídeo produzido por fermentação submersa do fungo *Morchella esculenta*. Kagimura et al. (2015) verificaram comportamento similar ao observado no presente estudo para exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. Tais autores observaram banda típica de estiramento OH na região de 3311-3424 cm^{-1} e banda característica de vibração de anel de glicose em 1640 cm^{-1} .

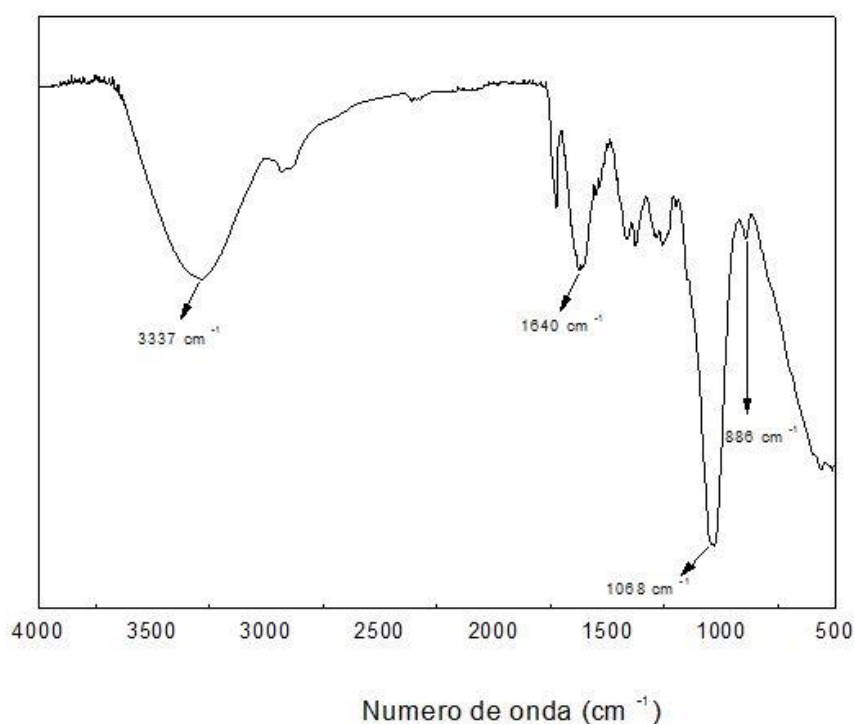


Figura 12 - Espectro de infravermelho do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO POR RMN ^{13}C

A Figura 13 apresenta o espectro de RMN ^{13}C para o EPS produzido pelo fungo estudado. Os picos (1 e 2) nas regiões de 175 e 170 ppm tem sido atribuído ligação éster $\text{C}=\text{O}$ ou a grupo carboxílico COOH (CASTELLANE et al., 2017). A região de 105 ppm, indicada no pico 3, representa um carbono ($\text{C}1$) ligado a dois átomos de oxigênio. O sinal em 75,3 ppm indica a presença dos carbonos $\text{C}2$, $\text{C}3$ e $\text{C}5$ (pico número 4) e o pico 5 (62,4 ppm) representa o carbono $\text{C}6$. O pico 6 (43,9 ppm) indica carbonos $\text{C}2$ e $\text{C}3$ de succinato e a região de 22,9 ppm (pico 7) representa o grupo metila do acetato (CASTELLANE et al., 2017; PAVIA, 2010).

Castellane et al., (2017) descreveram espectros de RMN de ^{13}C semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Tais autores em um estudo de caracterização de exopolissacarídeo produzido por *Rhizobium tropici*, verificaram picos em 175 e 105 ppm os quais foram atribuídos a $\text{C}=\text{O}$ e presença de carbono $\text{C}1$. Além disso, observaram presença dos carbonos $\text{C}2$, $\text{C}3$, $\text{C}5$ e $\text{C}6$ na região entre 60 – 80 ppm.

Li et al., (2017) também verificaram em exopolissacarídeo de *Morchella esculenta* pico na região de 105,6 ppm que propõe a presença de carbono

anomérico unido a ligações α 1,4 e α 1,6. Por outro lado, CHEN et al., (2014) citaram a região de 105,9 ppm para indicar a presença de carbono C1 de (1-3,1-6)- β -D-glicopiranozil em EPS obtido de cogumelos medicinais.

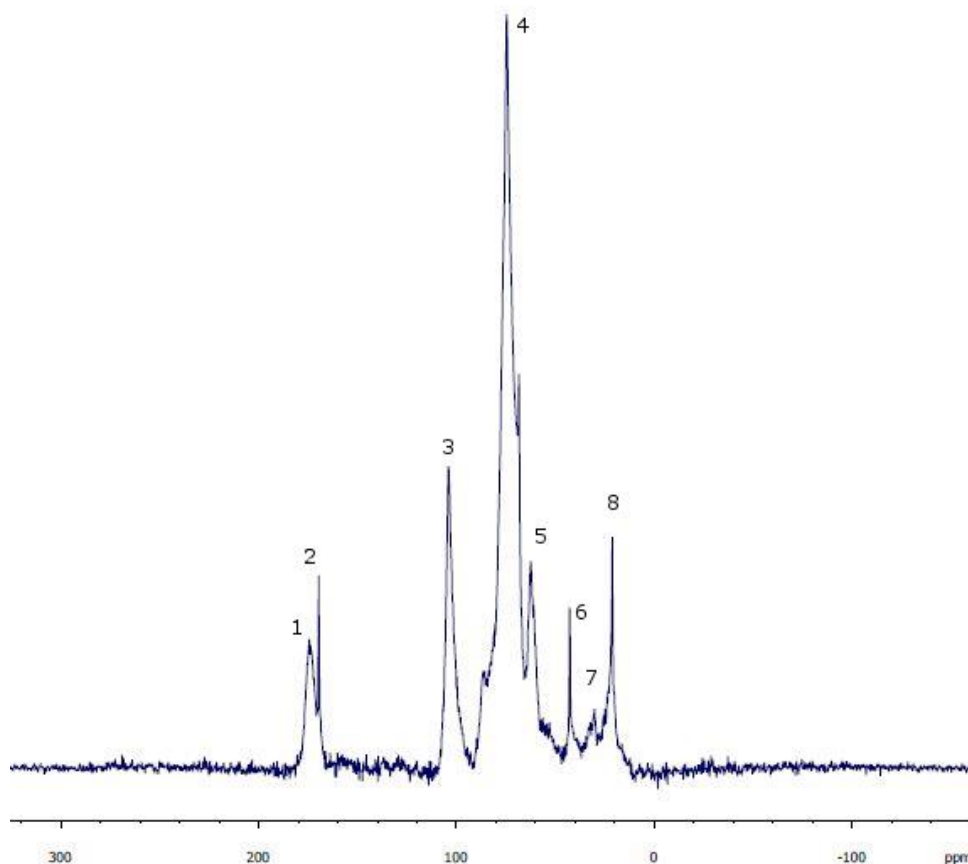


Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias do EPS estão representadas na Figura 14, com amplitudes de 200 X (A), 400 X (B), 600 X (C), 1200 X (D), 1500 X (E) e 3000 X (F).

O biopolímero apresenta superfície na forma de filmes finos com aspecto translúcido, contendo regiões lisas e outras com dobras ao longo de sua extensão (Figura 14 A, B, C e D). Também é verificada estruturas granulares distribuídas de forma irregular ao longo da superfície do biopolímero. Tais grânulos apresentaram ampla heterogeneidade em relação ao tamanho com variação do diâmetro de 90 nm a 990 nm (Figura 14 F).

Kagimura et al., (2015) verificaram presença de estruturas granulares distribuídas sobre placas irregulares em micrografias do exopolissacarídeo lasiodiplodana.

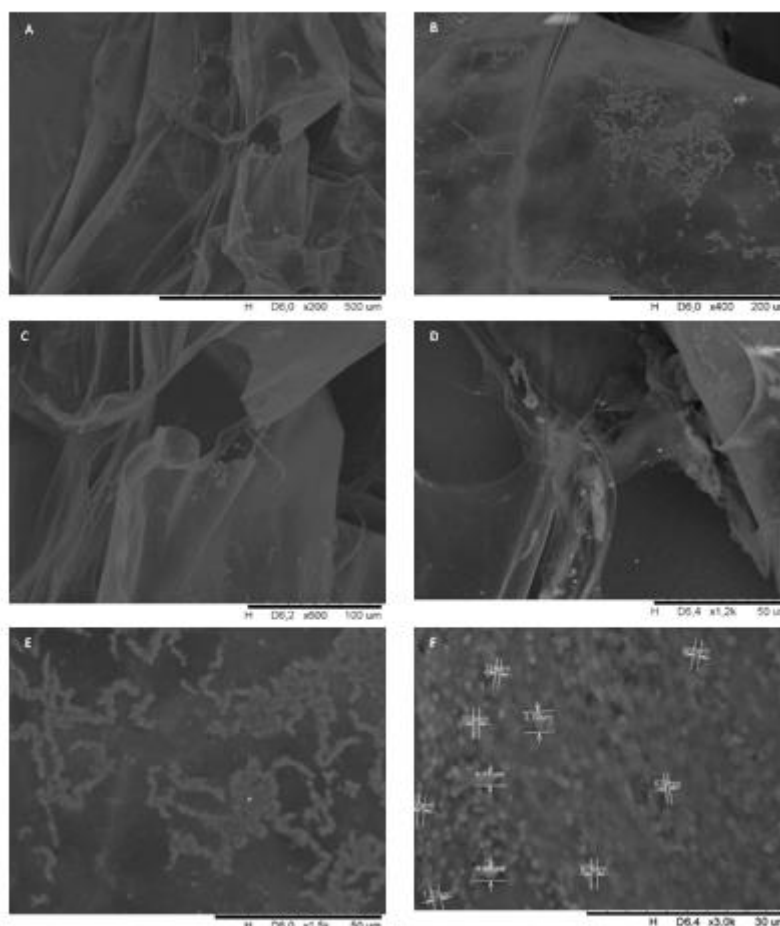


Figura 14 - Micrografias (MEV) do biopolímero em amplitudes de 200 X (a), 400 X (B), 600 X (C), 1200 X (D), 1500 X (E) e 3000 X (F).

Fonte: autoria própria

5.6 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Na Figura 15 está representado o perfil difratométrico do biopolímero produzido. Picos de alta intensidade foram observados em 21° , 23° e 39° em 2θ , indicando estrutura amorfa com regiões semicristalinas.

Resultados semelhantes ao observado no presente estudo foram mencionados por Luna (2016), Sechi et al., (2016) e Calegari (2016). Tais autores verificaram difratograma para lasiodiplodana nativa com regiões predominantemente amorfas e com presença de pequenas regiões cristalinas.

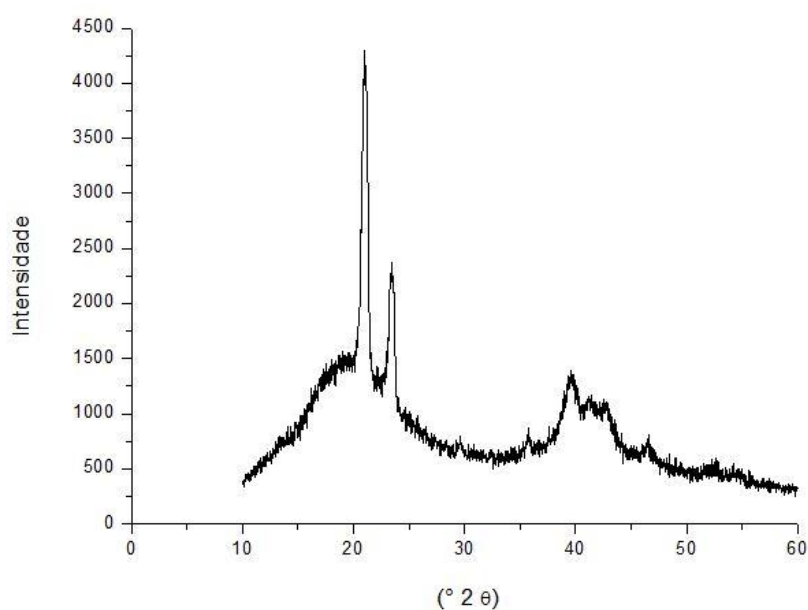


Figura 15 - Difratoograma de raios - X do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

5.7 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

5.7.1 Poder redutor

Este método baseia-se na capacidade da amostra (solução de EPS) em doar elétrons para o reativo ferricianeto de potássio, reduzindo-o a ferrocianeto de potássio. Tal reação produz coloração azul da Prússia, que por sua vez é medida por espectrofotometria (Luna, 2016). Conforme apresentado na Figura 16, o antioxidante padrão ácido ascórbico demonstrou ter poder redutor de 1,12 a 700 nm enquanto que o EPS produzido pelo fungo apresentou 0,126 e a glicose (controle negativo) demonstrou apenas 0,014.

Resultados inferiores (em torno de 0,05 em 700 nm) foram observados por Giese et al. (2015) avaliando a mesma concentração (1 g/L) dos exopolissacarídeos botriosferana, lasiodiplodana, curdulana e lamarina. Por outro lado, Luna (2016) verificou elevada capacidade antioxidante (em torno de 0,4) para o exopolissacarídeo lasiodiplodana.

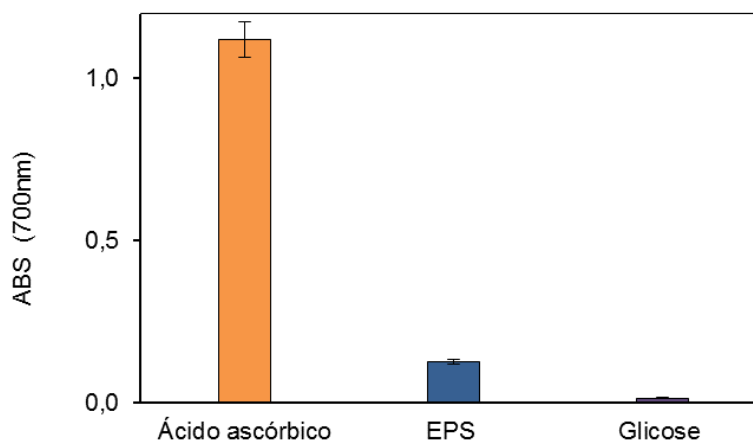


Figura 16 - Poder redutor do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

5.7.2 Sequestro do radical hidroxila (HO•)

O resultado relativo da capacidade de remoção do radical hidroxila está descrito na Figura 17. O exopolissacarídeo produzido demonstrou elevada capacidade de remoção do radical OH em 1,1 mg/mL (74,5%). Tal resultado é interessante considerando aplicações práticas desta macromolécula, uma vez que seu emprego como princípio ativo ou como ingrediente em uma infinidade de produtos, possivelmente poderia exercer elevado poder antioxidante, mesmo em baixas concentrações.

Castro et al. (2014), avaliaram o potencial antioxidante de polissacarídeos extraídos da parede celular do fungo *Caripia montagnei*, em concentração entre 0,2 e 2 mg/mL. Similarmente ao observado no presente estudo, verificaram que em concentrações superiores a 1 mg/mL houve redução na atividade antioxidante, sendo verificado máximo valor de remoção de OH• (37,6%) na concentração de 1 mg/mL. Resultados inferiores foram observados por Maity et al. (2015), os quais obtiveram percentual de remoção de 50% com estudo de EPS extraído da parede celular de *Entoloma lividoalbum* e observaram relação entre que o percentual de remoção do radical hidroxila e concentração de EPS.

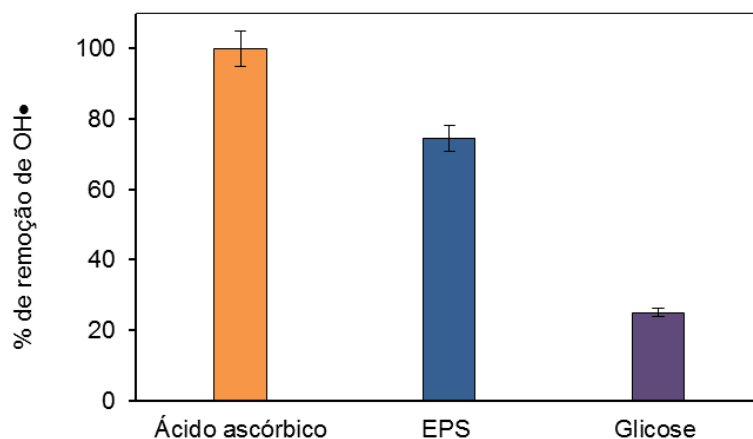


Figura 17 - Remoção de OH• do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

5.7.3 Remoção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A atividade de remoção do H₂O₂ foi observada na concentração de 1,1 mg/mL (14,28%) na Figura 18. Cabe salientar que a capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio está relacionada com a concentração do polissacarídeo e que o mecanismo de remoção de cada radical ou molécula tem sua especificidade. Portanto, não necessariamente segue o mesmo padrão. Liu et al. (2010), ao avaliarem polissacarídeos extraídos de *Ganoderma lucidum*, observaram aumento de 30% no percentual de remoção de H₂O₂ quando a concentração do polissacarídeo foi aumentada de 1 mg/mL para 8 mg/mL.

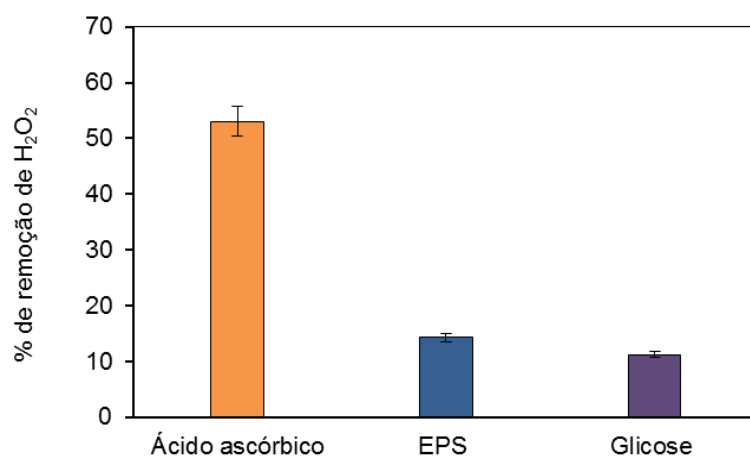


Figura 18 - Remoção de H₂O₂ do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

Em todos os ensaios, a capacidade antioxidante do polissacarídeo estudado foi menor que o composto antioxidante padrão ácido ascórbico, empregado como controle. Tal resultado é esperado considerando que de maneira geral os polissacarídeos apresentam uma atividade antioxidante moderada ou fraca em função de sua estrutura química (CARVALHO et al., 2013).

5.8 POTENCIAL ANTIMICROBIANO

A literatura científica (Chowdhury et al., 2015; Heleno et al., 2015; Casaril et al., 2011; Carvalho et al., 2007 e Hasegawa, 2005) menciona que fungos filamentosos, especialmente os cogumelos comestíveis, são capazes de metabolizar compostos com potencial antimicrobiano frente a inúmeros microrganismos de importância médica e alimentar. Entretanto, no presente estudo, não foi observado efeito inibidor frente a nenhum dos microrganismos testados, conforme pode ser observado na Tabela 6 e Figura 19. Esta ausência de atividade antimicrobiana pode ter sido ocasionada pela reduzida concentração do EPS avaliado, que foi de 1,1 g/L. Os antimicrobianos padrões avaliados, tetraciclina e fluconazol, por sua vez, apresentaram efeito inibitório frente as cepas testadas, demonstrando a confiabilidade do teste realizado.

Tabela 6 - Avaliação de potencial antimicrobiano pelo método de disco difusão

| Microrganismos | EPS | TT | FL |
|---|------------|-----------|-----------|
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | A.I | 18,0 | N.A. |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 0028) | A.I | 30,0 | N.A. |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> (SACCO LPRA) | A.I | 40,3 | N.A. |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) | A.I | 43,0 | 21.66 |
| <i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803) | A.I | N.A | 31,3 |
| <i>C. albicans</i> (ATCC 18804) | A.I | N.A | 150 |

TT: Tetraciclina (5 mg/mL); FL: Fluconazol (5 mg/mL). A.I: ausência de inibição; N.A: não avaliado.

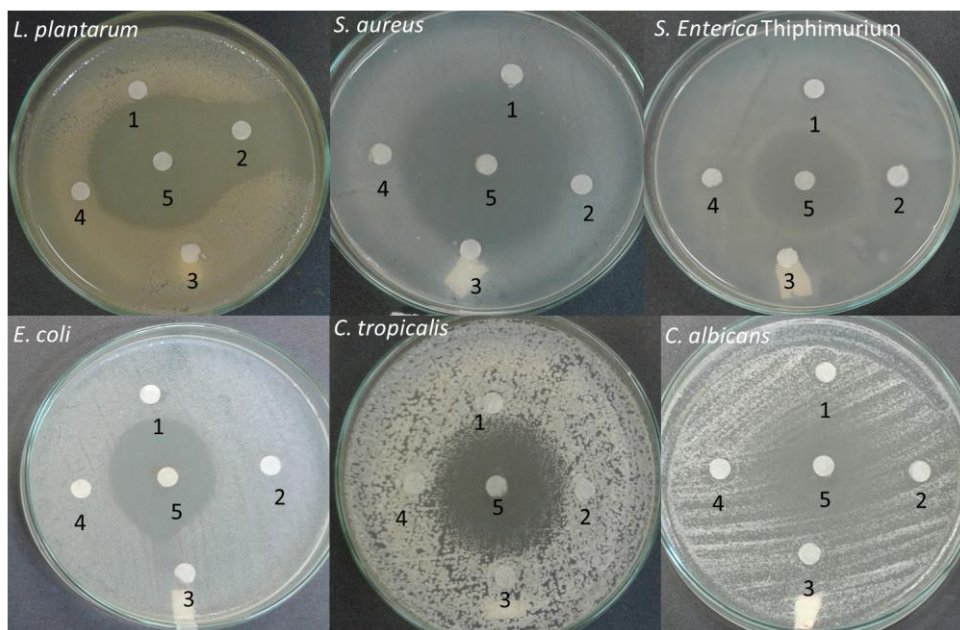


Figura 19 - Atividade antimicrobiana pelo teste de microdifusão do biopolímero produzido.
Fonte: autoria própria

6 CONCLUSÃO

O planejamento fatorial composto central rotacional (2^3) indicou que não houve influência significativa na produção de EPS considerando as variáveis agitação, concentração da fonte de carbono (sacarose) e concentração da fonte de nitrogênio (peptona).

O EPS produzido apresentou elevada solubilidade (68,55%) em relação a outros exopolissacarídeos descritos na literatura.

A análise por espectroscopia de infravermelho – reflectância total atenuada (IV-ATR) indicou bandas típicas de polissacarídeo com presença de anel glicopiranozídico com configuração do tipo β .

O espectro de RMN ^{13}C demonstrou que o EPS produzido é composto por moléculas de até 6 carbonos e que há presença de succinato e acetato.

A microscopia eletrônica de varredura indicou que o EPS produzido apresenta superfície na forma de filmes finos com aspecto translúcido e dobras ao longo de sua extensão. Indicou também a presença de estruturas granulares distribuídas de forma irregular ao longo da superfície.

A análise por difração de raios-X revelou que o EPS apresenta uma estrutura predominantemente amorfa, porém apresentando regiões com certa cristalinidade (regiões semicristalinas).

A avaliação da atividade antioxidante do EPS indicou que este apresenta um potencial moderado quanto aos protocolos testados (poder redutor, habilidade de sequestro do radical hidroxila e de remoção do peróxido de hidrogênio).

Não foi verificado potencial antimicrobiano do EPS em concentração de 1,1 g/L frente aos microrganismos *S. aureus* ATCC 25923, *L. plantarum*, *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* Thyphimurium, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. albicans* ATCC 18804.

7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Definir as melhores condições para a produção de EPS em biorreator e realizar experimentos de aumento de escala;
- Realizar a caracterização morfológica, fisiológica e genética da cepa do fungo filamentoso isolado;
- Avaliar substratos alternativos visando seu aproveitamento biotecnológico e agregação de valor;
- Realizar a caracterização química do EPS produzido utilizando as técnicas analíticas de ^1H RMN, TG, Raman, peso molecular, entre outros;

8 REFERÊNCIAS

AGUDELO-ESCOBAR, L.M., GUTIÉRREZ-LÓPEZ, Y., URREGO-RESTREPO, S. 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.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p, 1996.

ALZORQI, I., SUDHEER, S., LU, T. J., MANICKAM, S. Ultrasonically extracted β - D - glucan from artificially cultivated mushroom , characteristic properties and antioxidant activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 531–540, 2017.

BAE, J.T., SINHA, J., PARK, J.P., SONG, C.H. AND YUN, J.W. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p.482-487, 2000.

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

CALEGARI, G.C. **Lasiodiplodana (1→6)- β -D-glucana: Obtenção e caracterização de moléculas derivadas por sulfonação**. 2016. 32 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

CARVALHO, J.C.T.; PERAZZO, F.F.; MACHADO, L.; BEREAU, D. Biologic activity and biotechnological development of natural products. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

CARVALHO, M.P., SAND, S.T.V., ROSA, E.A.R., GERMANI, J.C. ISHIKAWA, N.K. Investigation of the antibacterial activity of basidiomicetes *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes*. **Biociências**, v. 15, n. 2, p. 173-179, 2007.

CASARIL, K.B.P.B.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.C.D. Antimicrobial Activity and Mineral Composition of *Shiitake* Mushrooms Cultivated on Agricultural Waste. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 991–1002, 2011.

CASTELLANE, T.C.L., CAMPANHARO, J.C., COLNAGO, L.A., COUTINHO, I. D., LOPES, E.M., LEMOS, M.V.F., MACEDO LEMOS, E.G. Characterization of new

exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361–369, 2017.

CASTRO, A.J.G.; WILL CASTRO, L.S.E.P.; SANTOS, M.S.N.; FAUSTINO, M.G.C.; PINHEIRO, T.S.; DORE, C.M.P.G.; BASEIA, I.G.; LEITE, E.L. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v.4, 121–129, 2014.

CHEN, X., SIU, K.C., CHEUNG, Y.C., WU, J.Y. Structure and properties of a (1-3)- β -D-glucan from ultrasound-degraded exopolysaccharides of a medicinal fungus. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 270–275, 2014.

CHOWDHURY, M.M.H.; KUBRA, K.; AHMED, S.R. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1075–1085, 2015.

CLSI. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts - Document M44-A2**, 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - document M02-A11**, 2012.

COELHO, G.D.; SILVA, R.R. Fungos Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas. **INSTITUTO DE BOTÂNICA – IBt**, p. 20, 2006.

CUNHA, M.A.A., ALBORNOZ, S.L., SANTOS, V.A.Q., SANCHEZ, W.N.L., BARBOSA-DEKKER, A.M., DEKKER, R.F.H. Structure and Biological Functions of D-Glucans and Their Applications. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. p. 309–337, 2017.

CUNHA, M.A.A., TURMINA, J.A., IVANOV, R.C., BARROSO, R.R., MARQUES, P.T., FONSECA, E.A., FORTES, Z.B., DEKKER, R.F.H., BARBOSA, A.M. Lasiodiplodan, an exocellular (1 \rightarrow 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.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 6, p. 799–806, 2007.

DE JESUS ASSIS, D., BRANDÃO, L.V., COSTA, L.A.S., FIGUEIREDO, T.V.B., SOUSA, L.S., PADILHA, F.F., DRUZIAN, J.I. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2769–2785, 2014.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

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.

EUREKA BREWING, Unidades formadoras de colônias. Disponível em: <https://eurekabrewing.wordpress.com/2012/08/24/yeast-banking-2-agar-plates/> Acesso em: 05 de maio de 2017.

GIESE, E.C., GASCONA, J., GIANLUCA, A., BARBOSA, A.M., CUNHA, M.A.A., DEKKER, R.F.H. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 125–30, 2015.

HASSEGAWA, R.H.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.C.D. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 212–217, 2005.

HELENO, S.A., BARROS, L., MARTINS, A., MORALES, P., FERNANDEZ-RUIZ, V., GLAMOCLIJA, J., SOKOVIC, M., FERREIRA, I.C.F.R. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 799–806, 2015.

INTECHOPEN, Estrutura da β -glucana. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/spent-brewer-s-yeast-and-beta-glucans-isolated-from-them-as-diet-components-modifying-blood-lipid-me> Acesso em: 17 de maio de 2017.

JOO, K.M.; CHUNG, Y.H.; KIM, M.K.; NAM, R.H.; LEE, B.L.; LEE, K.H.; CHA, C.I. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 476, n. 4, p. 388–413, 2004.

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.

KIM, S.W., HWANG, H.J., XU, C.P., CHOI, J.W., YUN, J.W. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 321–326, 2003.

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

KUMARAN, S.; KURUNGUDI, A.T., RAMAPRASANNA, D., MURUGAYAN, K. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from mangrove filamentous fungus, *Syncephalastrum* sp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 21, p. 2155–2161, 2014.

LI, S., GAO, A., DONG, S., CHEN, Y., SUN, S., LEI, Z., ZHANG, Z. Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 26–34, 2017.

LIU, W.; WANG, H.; PANG, X.; YAO, W.; GAO, X. Characterization and antioxidant activity of two lowmolecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 451–7, 2010.

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, 2010. 1160 p.

MAHAPATRA, M.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, Microbiology Insights, v. 6, p. 1–16, 2013.

MCINTOSH, M.; STONE, B.A.; STANISICH, V.A. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -d-glucans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 163–173, 2005.

MAITY, P.; SEN, I.K.; POLAI, M.S.; DEVI, K.S.P.; ACHARYA, K.; MAITI, T.K.; ISLAM, S.S. Structural, immunological, and antioxidant studies of β -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 350–358, 2015.

NAMEX, Estrutura da parede celular fúngica. Disponível em: <http://www.nammex.com/redefining-medicinal-mushrooms/> Acesso em: 04 de abril de 2017.

OSIŃSKA-JAROSZUK, M., JASZEK, M., MIZERSKA-DUDKA, M., BACHOWICZ, A.B., REJCZAK, T.P., JANUSZ, G., WYDRYCH, J., POLAK, J., BAZKA, A.J.W., SZERSZE, M.K. Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVAN, J. **Espectroscopia no infravermelho**. Introdução à Espectroscopia. Tradução de ed., p.15–98, 2010. São Paulo-SP: Cengage Learning.

PINTEREST, Aspecto do fungo filamentosos. Disponível em: <<https://br.pinterest.com/architectgirl87/yeast-and-mold-yay-for-fungus/?lp=true>> Acesso em: 22 de abril de 2017.

PHOTOMACROGRAPHY, Morfologia unicelular. Disponível em:<<http://www.photomacrography.net/forum/viewtopic.php?t=15442&sid=978743646cc6a999992a0f99edabea63>> Acesso em: 06 de maio de 2017.

PINHEIRO, J.B. **Prospecção de fungos filamentosos e meios de cultura alternativos para a produção de exopolissacarídeos**. 2015. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de São João Del-Rei, Minas Gerais, 2015.

SECHI, N. S. M., SANTOS, V.A.Q., THEIS, T.V., CALEGARI, G.C., LUNA, W.N.L.,

FOMSECA, 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.

SOMENSI, F.Y.K. **Bioprodução de β -(1→6)-D-Glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica. 2014. 97p.** Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

SUDHAKARAN, V.K.; SHEWALE, J.G. Exopolysaccharide production by *Nigrospora oryzae* var. *glucanicum*. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 10, n. 9, p. 547-551, 1988.

SUTHERLAND I.W. Extracellular polysaccharides. In: Rhem HJ, Reed G, editors. **Biotechnology**. VCH; Weinheim, v. 6.p. 615–57, 1996.

TANG Y.J, ZHONG J.J. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor. **Biotechnology Letters**. V. 24, n. 12, p. 1023–6, 2002.

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

VASCONCELOS, A.F.D., MONTEIRO, N.K., DEKKER, R.F.H., BARBOSA, A.M., CARBONERO, E.R., SILVEIRA, J.L.M., SASSAKI, G.L, SILVA, R.D., CORRADI DA SILVA, M.L. Three exopolysaccharides of the β -(1-6)-D-glucan type and a β -(1-3;1-6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 14, p. 2481–2485, 2008.

XU, J., LIU, W., YAO, W., PANG, X., YIN, D., GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 227–234, 2009.

WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 105–112, 2009.

ZHANG, G., YIN, Q., HAN, T., ZHAO, Y., SU, J., LI, M., LING, J. Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 485–491, 2015.