



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PMBqBM



ALDO BARBOSA CÔRTEZ FILHO

**Estudo *in silico* e *in vitro* do mecanismo de inibição da α -amilase e
atividade imunomoduladora de polissacarídeo de parede celular de
*Rhizopus microsporus var. oligosporus***

JEQUIÉ - BA

Junho – 2022

ALDO BARBOSA CÔRTEZ FILHO

Estudo *in silico* e *in vitro* do mecanismo de inibição da α -amilase e atividade imunomoduladora de polissacarídeo de parede celular de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Gildomar Lima Valasques Júnior

JEQUIÉ - BA

Junho – 2022

C857e

Côrtes Filho, Aldo Barbosa.

Estudo *in silico* e *in vitro* do mecanismo de inibição da α -amilase e atividade imunomoduladora de polissacarídeo de parede celular *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. / Aldo Barbosa Cortês Filho, 2022.

78f.; il. (algumas color.)

Orientador (a): Dr. Gildomar Lima Velasques Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBQBM, Vitória da Conquista, 2022.

Inclui referência F. 62 – 78.

1. Polissacarídeo - $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano. 2. *Docking* molecular. 3. Inibição enzimática. 4. Atividade imunomoduladora. I. Velasques Júnior, Gildomar Lima. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBQBM. T. III.

CDD: 574.192



Governo do
Estado da Bahia

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Estudo *in silico* e *in vitro* do mecanismo de inibição da α -amilase e atividade imunomoduladora de polissacarídeo de parede celular de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*.”.

Autor (a): **Aldo Barbosa Côrtes Filho**

Orientador (a): Professor Dr. Gildomar Lima Valasques Junior

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior

Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia

Profa. Dra. Luciana Amaral de Faria Silva

Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia

Prof. Dr. Nívio Batista Santana

Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia

Data de realização: 03 de junho de 2022.

A todos os meus avós (in memoriam) Abigail Barbosa Côrtes, Augusto Santos Oliveira e Helenita Santos Oliveira, e a minha tia Luzânia Côrtes (in memoriam) que sempre se orgulharam e torceram pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Helenildes Côrtes, pelo apoio e amor incondicional, sem ela essa realização não seria possível.

Ao meu pai, Aldo Côrtes, meu herói e maior exemplo.

Às minhas irmãs, Helen Côrtes e Alda Côrtes, por serem minhas maiores torcedoras.

À toda minha família e amigos, espero retribuir o orgulho que sentem por mim.

Ao meu grande amigo e irmão que a vida me deu, Kaio Novaes, por todo o suporte neste período.

À minha amiga, Thaís Couto, sem o seu esforço fraternal, não teria conseguido me inscrever no programa.

À irmã que a vida me presenteou, Renata Santos, pelo imenso apoio em toda a minha caminhada.

À minha amiga e parceira, Kalila Silva, pela conexão e que sempre esteve presente comigo.

À Vilisaimon Silva, meu grande amigo e colega dentro e fora da academia.

À Tátilla Putumujú, que me acolheu no laboratório e me ensinou a rotina com muita generosidade.

À Pâmala Cedro, que me auxiliou sempre com muita paciência e disposição.

À Alana Miranda pelo interesse em se dispor a ajudar sempre que foi preciso.

À Thamara Brito, minha colega de programa, pelo grande suporte durante todo este período.

À Ana Flávia, por compartilhar os desafios da caminhada acadêmica.

À Gabriela, pelo grande suporte psicológico durante todo o ano.

Ao meu orientador, Dr. Gildomar Valasques, pelos ensinamentos e todo o suporte necessário para a realização do trabalho.

Ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo suporte técnico e acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) por fornecer recursos fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

As fontes naturais de compostos bioativos, como os fungos filamentosos, têm sido aplicadas para desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos e farmacológicos. Os estudos *in silico* surgiram como uma estratégia acessível de avaliar estes compostos bioativos, antes de serem submetidos a testes *in vitro*. Foi avaliada *in silico* a capacidade inibitória do polissacarídeo extraído da parede celular de fungo *Rhizopus. microsporus var. oligosporus* através da análise do sítio ativo da enzima alvo, a α -amilase. Foi utilizada a acarbose, um inibidor de amilase conhecido para comparar os resultados através de estudos de *docking* molecular e análises de superfície de ligação, com o objetivo de avaliar o potencial inibitório *in silico* do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano. Os resultados do *docking* demonstraram, pelas energias de ligação, uma variação de no máximo -1.1 kcal/mol. Assim, seguiu-se o ensaio de inibição enzimática pelo polissacarídeo. Para isso, a atividade da α -amilase foi determinada pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) com 100 μ l da amostra de polissacarídeos em diferentes concentrações, e a partir das absorbâncias, calculou-se a taxa de inibição, e, realizou-se a curva de dose atividade enzima-substrato. O K_m e V_{max} sem a presença de inibidor se deu através da equação da reta gerada pelo gráfico de Lineweaver-Burk, nos quais os valores calculados foram iguais a 0,28mM e 1,22 μ mols/min, respectivamente. O potencial inibitório do polissacarídeo foi avaliado através de diferentes concentrações (0,4, 0,5, 1, 2 mg/mL), e foi notado que os valores de K_m aumentaram progressivamente (2,96, 3,62, 4,22, 6,83mM). O polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, extraído da parede celular do fungo *Rhizopus. microsporus var. oligosporus*, demonstrou potencial inibitório da enzima α -amilase de forma competitiva. Através do ensaio da atividade imunomoduladora *in vitro*, o polissacarídeo foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos, TNF- α e IL-1 α (em concentrações a partir de 50 e 100 μ g/mL de polissacarídeo, respectivamente).

Palavras-Chave: $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano. *Docking* molecular. Inibição enzimática. Atividade imunomoduladora.

ABSTRACT

Natural sources of bioactive compounds, such as filamentous fungi, have been applied to the development of new biotechnological and pharmacological products. *In silico* studies emerged as an accessible strategy to evaluate these bioactive compounds, before being subjected to *in vitro* tests. The inhibitory capacity of the polysaccharide extracted from the *Rhizopus microsporus var. oligosporus* fungus cell wall was evaluated *in silico*, by analyzing the active site of the target enzyme, α -amylase. Acarbose, a known amylase inhibitor, was used to compare the results through molecular docking studies and surface binding analyses, in order to evaluate the *in silico* inhibitory potential of the $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ polysaccharide) glucogalactan. The docking results showed, by the binding energies, a variation of at most -1.1 kcal/mol. Thus, the enzyme inhibition assay by the polysaccharide was followed. For this, the α -amylase activity was determined by the DNS method (3,5-dinitrosalicylic acid) with 100 μ l of the polysaccharide sample at different concentrations, and from the absorbances, the inhibition rate was calculated, and, the enzyme-substrate dose activity curve was performed. K_m and V_{max} without the presence of inhibitor were obtained through the equation of the line generated by the Lineweaver-Burk graph, in which the calculated values were equal to 0.28mM and 1.22 μ mol/min, respectively. The inhibitory potential of the polysaccharide was evaluated through different concentrations (0.4, 0.5, 1, 2 mg/mL), and it was noticed that the K_m values progressively increased (2.96, 3.62, 4.22, 6.83mM). The $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactan polysaccharide, extracted from the cell wall of the *Rhizopus. microsporus var. oligosporus*, showed competitive inhibitory potential of the α -amylase enzyme. Through the *in vitro* immunomodulatory activity assay, the polysaccharide was able to increase the expression of pro-inflammatory cytokines in murine macrophages, TNF- α and IL-1 α (in concentrations from 50 and 100 μ g/mL of polysaccharide, respectively).

Keywords: $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactan. Molecular *docking*. Enzyme Inhibition. Immunomodulatory activity.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 3 |
| CAPÍTULO I..... | 4 |
| Referencial Teórico..... | 4 |
| 1 Fungos..... | 5 |
| 1.1 Biologia dos Fungos..... | 5 |
| 1.2 Utilização dos polissacarídeos de fungos | 7 |
| 1.3 Parede Celular Fúngica..... | 6 |
| 1.4 Fungos do gênero <i>Rhizopus</i> : Aspectos Gerais | 8 |
| 1.4.1 <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> | 9 |
| 2 Polissacarídeos..... | 10 |
| 2.1 Conceitos gerais | 10 |
| 2.2 Aplicações farmacológicas | 11 |
| 2.3 Inibição de enzimas digestivas por polissacarídeos de parede celular de fungos | 11 |
| 2.4 Obtenção e Avaliação de Polissacarídeos de fungos..... | 12 |
| 3 α-amilase..... | 13 |
| 4 Estudo <i>in silico</i> de compostos bioativos..... | 14 |
| 4.1 <i>Docking</i> molecular | 16 |
| 5 Sistema Imunológico..... | 16 |
| 5.1 Conceito geral | 16 |
| 5.1.1 O sistema imunológico: Inato | 17 |
| 5.1.2 O sistema imunológico: Adaptativo | 17 |
| 6 Atividade Imunomoduladora | 19 |
| CAPÍTULO II..... | 21 |
| Avaliação <i>in silico</i> de inibição enzimática da α-amilase pelo polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano extraído da parede celular de <i>Rizophus. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> | 21 |
| RESUMO | 22 |
| 1 Introdução..... | 23 |
| 2 Materiais e Métodos..... | 24 |
| 2.1 Seleção da enzima α -amilase | 24 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 2.2 | Preparação da enzima α -amilase | 24 |
| 2.3 | Construção da unidade monomérica do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano | 24 |
| 2.4 | <i>Docking</i> e identificação de potenciais interações com a enzima α -amilase..... | 25 |
| 2.5 | Parâmetros de Lipinski e Veber | 25 |
| 3 | Resultados e Discussão | 25 |
| 3.1 | Definição das coordenadas espaciais do sítio de ligação da enzima | 25 |
| 3.2 | Cálculo das energias de ligação | 27 |
| 3.3 | Análise das ligações e resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio ativo..... | 28 |
| 3.4 | Parâmetros de Lipinski e Veber | 30 |
| 4 | Conclusões..... | 31 |
| CAPÍTULO III | | 33 |
| Ensaio da inibição da α-amilase pelo polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano extraído de <i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i> e avaliação da atividade imunomoduladora | | 33 |
| RESUMO | | 34 |
| 1 | Introdução..... | 35 |
| 2 | Materiais e Métodos..... | 35 |
| 2.1 | Obtenção do microrganismo | 35 |
| 2.2 | Cultivo do microrganismo | 36 |
| 2.3 | Extração do polissacarídeo | 36 |
| 2.4 | Estudo in vitro da inibição enzimática | 36 |
| 2.4.1 | Atividade de α -amilase na ausência do inibidor..... | 36 |
| 2.4.2 | Atividade de α -amilase na presença do inibidor | 37 |
| 2.4.3 | Determinação de K_m e V_{max} | 37 |
| 2.4.4 | Análises estatísticas | 38 |
| 2.5 | Avaliação da atividade imunomoduladora..... | 38 |
| 2.5.1 | Submissão do estudo ao Conselho de Ética Animal..... | 38 |
| 2.5.2 | Isolamento de macrófagos | 38 |
| 2.5.3 | Estimulação dos macrófagos por polissacarídeo extraído de <i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i> ou Lipopolissacarídeo (LPS) | 39 |
| 2.5.4 | Quantificação de citocinas por ELISA | 39 |
| 3 | Resultados e Discussão | 39 |
| 3.1 | Estudo in vitro da inibição enzimática | 39 |
| 3.2 | Avaliação da atividade imunomoduladora..... | 44 |
| 4 | Conclusões..... | 45 |
| Agradecimentos..... | | 46 |
| CONCLUSÃO GERAL | | 46 |

REFERÊNCIAS..... 47

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|--|---|
| Figura 1. Parede celular fúngica..... | 6 |
|--|---|

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura cristalográfica da enzima α -amilase humana | 26 |
| Figura 2. Estrutura bidimensional da acarbose | 26 |
| Figura 3. Estrutura bidimensional da unidade monomérica do do polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano..... | 27 |
| Figura 4. Interações intermoleculares dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da α -amilase e acarbose | 29 |
| Figura 5. Interações intermoleculares dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da α -amilase e $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano | 30 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| Figura 1. Gráfico de Lineweaver-Burk relacionando o $1/[S]$, onde S é a concentração do substrato (amido) e $1/V$, onde V é a velocidade da reação em micromols/min na ausência de inibidor (polissacarídeo)..... | 40 |
| Figura 2. Gráficos de Lineweaver-Burk relacionando o $1/[S]$, onde S é a concentração do substrato (amido) e $1/V$, onde V é a velocidade da reação na presença das concentrações de inibidor (polissacarídeo)..... | 42 |
| Figura 3. Expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com polissacarídeo de parede de <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> , em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 mg/mL). (A) Expressão de TNF- α . (B) Expressão de IL-1 α | 44 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Energias de ligação em kcal/mol | 28 |
| Tabela 2. Parâmetros para avaliação da biodisponibilidade oral do $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano | 31 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Valores de $1/[S]$ e $1/V$ usados para construção da curva de Lineweaver-Burk obtidos a partir do ensaio com variação da concentração do substrato na ausência do inibidor | 40 |
| Tabela 2. Valores de $[S]$ e V usados para construção da curva a partir do ensaio com variação da concentração do substrato na presença de inibidor (polissacarídeo). $[I]$ = concentração de inibidor | 41 |
| Tabela 3. Relação entre a concentração do inibidor (polissacarídeo) e o K_m da enzima α -amilase | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs: Anti-inflamatórios Não Esteroides

ARG: Arginina

ASP: Aspartato

BDA: Ágar Batata Dextrose

BOD: Demanda bioquímica por oxigênio

CMRVS: Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COVID-19: Corona Virus Disease 2019

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNS: Ácido 3,5-25 dinitrosalicílico

DP: Desvio padrão

FAPESB: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz

GES-1: Célula Epitelial Gástrica 1

GLN: Glutamina

GLU: Glutamato

GLUT4: Transportador de Glicose 4

GSK3: Glicogênio Sintase Quinase 3

GRO α : Oncogene alfa Regulado pelo Crescimento

HELA: Carcinoma Cervical Humano

HepG-2: Células de Carcinoma Hepatocelular Humano 2

HIS: Histidina

IgA: Imunoglobulina A

IgD: Imunoglobulina D

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-1: Interleucina-1

IL-2: Interleucina-2

IL-6: Interleucina-6

INF- γ : Interferon gama

JNK: Quinases N-terminal de Jun

ILE: Isoleucina

kDA: Quilodalton

LEU: Leucina

LPS: Lipopolissacarídeo

LYS: Lisina

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitogênio

MHC: Complexo de Histocompatibilidade de Classe

MIP1 α : Proteínas de Macrófagos Inflamatórios alfa-1

NaOH: Hidróxido de Sódio

NF- κ B: Fator Nuclear Kappa B

NMR: Ressonância Magnética Nuclear

PDB: Protein Data Bank

pH: Potencial Hidrogeniônico

PMBqBM: Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

RANTES: Regulado após Ativação, Célula T normal expressa e Secretada

SDF-1 α/β : Fator 1 Derivado de Célula do Estroma alfa/beta

SER: Serina

SPSs: Polissacarídeos Sulfatados

THR: Treonina

TLR2: Receptor Toll-like 2

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TRP: Triptofano

TYR: Tirosina

UESB: Universidade Estadual do Sudoeste da Ba

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos de parede celular de fungos são usados no processo de desenvolvimento de novos produtos com fins terapêuticos (MAUGERI FILHO; GOLDBECK, 2019). Essas biomacromoléculas são de interesse farmacológico (KAGIMURA et al., 2015). O uso de compostos de fontes naturais, como os polissacarídeos extraídos de fungos pode ser uma estratégia eficiente no controle da hiperglicemia pós-prandial, ao inibir a ação da enzima α -amilase (LI et al., 2021).

Estudos com polissacarídeos têm demonstrado atividades inibitórias de enzimas digestivas, como a α -amilase (LV et al., 2021). Esta enzima está presente na saliva e no intestino, e é responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas do amido, em oligossacarídeos e moléculas de glicose (NELSON & COX, 2017). O polissacarídeo extraído da parede celular do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* possuem atividades hipoglicemiantes (CEDRO, 2019). Este polissacarídeo pode ser utilizado em ensaios de desenvolvimento de um fármaco atuante na Diabetes Mellitus tipo 2.

A inibição enzimática se dá por moléculas que reduzem a atividade de uma reação catalisada por enzima, as quais agem no sítio ativo da enzima de forma direta ou indireta (ROBINSON, 2015). Inibidores enzimáticos compuseram um terço das novas drogas introduzidas no mercado entre os quais entre os anos de 2006 e 2011 (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014).

Os polissacarídeos do grupo dos β -(1,3) glucanos produzidos e extraídos da parede celular de fungos, possuem potenciais imunomodulatórios (SAMUELSEN, SCHREZENMEIR & KNUTSEN, 2014). A atividade imunomoduladora dos polissacarídeos β -(1,3) glucanos têm sido evidenciada em estudos *in vitro* e *in vivo*, ao destacar sua capacidade em atuar em atividades anti-inflamatórias e antitumorais (DEL CORNÒ, GESSANI & CONTI, 2020). Estes polissacarídeos modulam a resposta imune, agindo como receptores de reconhecimento de antígenos invasores (DUMLUPINAR, 2021). Estes polissacarídeos podem estimular o sistema imunológico, dessa forma, o trabalho estuda a atividade imunomoduladora do polissacarídeo extraído do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus*.

O advento tecnológico proporcionou um avanço na triagem destes compostos. Os estudos *in silico* têm demonstrado uma estratégia viável devido a praticidade e baixo custo (SHITYAKOV; FOERSTER, 2014). A partir destes estudos, juntamente com os testes *in vitro* é possível fazer uma avaliação ampla dos compostos com potencial para novos

fármacos. Na perspectiva da busca de novos compostos de fontes naturais, este fungo pode ser estudado com a finalidade de obtenção do polissacarídeo extraído da sua parede celular, em relação à sua potencial atividade inibitória e imunomoduladora sobre a enzima α -amilase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a atividade inibitória de α -amilase e a atividade imunomoduladora do polissacarídeo isolado da parede celular de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* utilizando modelos experimentais *in silico*, *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o sítio de ligação da enzima α -amilase, através de um inibidor conhecido (acarbose).

Avaliar a capacidade inibitória *in silico* da enzima α -amilase pelo polissacarídeo por meio de comparações das energias de ligação e superfícies de ligação entre o mesmo e o padrão acarbose.

Avaliar a capacidade inibitória *in vitro* do polissacarídeo isolado da parede celular de *Rhizopus. microsporus var. oligosporus* sobre α -amilase.

Determinar o tipo de inibição da α -amilase pelo polissacarídeo isolado da parede celular de *Rhizopus. microsporus var. oligosporus* através de estudos de cinética enzimática.

Avaliar a atividade imunomoduladora do polissacarídeo isolado da parede celular de *Rhizopus. microsporus var. oligosporus*.

CAPÍTULO I
Referencial Teórico

1 Fungos

1.1 Biologia dos Fungos

Os fungos são organismos versáteis que vivem em diversos ambientes e podem possuir relação de mutualismo com outros organismos. Algumas espécies podem ser usadas como alimentos, outras espécies são elementos transformadores em processos de obtenção de alimentos e bebidas. Alguns fungos podem causar doenças, mas por produzirem metabólitos secundários, podem ser produtores de substâncias com atividades biológicas (KOUR et al., 2019).

Os fungos exibem uma ampla variedade de ciclos de vida, morfogênese e metabolismo complexo o que os difere dos animais e das plantas. Além disso, são seres que podem ser encontrados em ambientes externos e internos, apresentando relação de mutualismo, parasitismo e comensalismo com muitos organismos (LEVETIN; HORNER; SCOTT, 2016; CHOI; KIM, 2017).

Os fungos desenvolveram estruturas que os tornam capazes de sobreviver de forma adaptativa aos mais diversos nichos ecológicos (NAGY et al., 2017). A proliferação dos fungos é facilitada pelo crescimento de forma filamentosa, além da capacidade de secreção de proteínas e metabólitos primários e secundários (WOSTEN, 2019).

A constituição celular é eucariótica, geralmente compostos de células filamentosas, multicelulares e nutrição heterotrófica (ZABEL & MORRELL, 2020). Na filogenética, os fungos são considerados polifiléticos, e na taxonomia são pertencentes ao Reino *Mycetae*, ou Reino *Fungi* (RAGHUKUMAR, 2017). Os organismos se reproduzem principalmente por esporos formados pela fragmentação ou abstricção de seções de hifas, as quais coletivamente são denominadas de "micélio". (ZABEL & MORRELL, 2020).

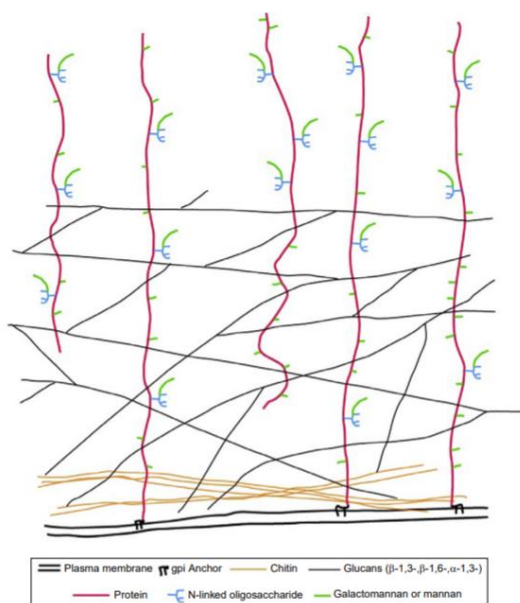
São amplamente utilizados em preparo de alimentos, por possuírem valor funcional (VALVERDE; HERNANDEZ-PEREZ & PAREDES-LOPEZ, 2015). Na biotecnologia é notável o uso de leveduras na produção de vinho, cerveja e panificação (MONEY, 2016). Um estudo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, avaliou o efeito da cultura da massa fermentada da levedura, juntamente com *Lactobacillus plantarum* e *brevisand*, no preparo de pão-cevada sem casca. Foi constatada a melhora da qualidade,

textura e volume do alimento, além de características sensoriais, como cor e odor (CAKIR; ARICI & DURAK, 2021).

1.2 Parede Celular Fúngica

A parede celular fúngica é uma estrutura fundamental para a viabilidade celular, morfogênese e patogenicidade. A sua composição é crítica para a biologia e ecologia de cada espécie. Compreender a constituição da parede principalmente com relação aos polissacarídeos presentes é relevante para sua função e emprego biotecnológico (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). A Figura 1 demonstra o esquema da parede celular fúngica e as estruturas presentes.

Figura 1. Parede celular fúngica



Fonte: FREE (2013)

As paredes são consistidas por 80-90% de polissacarídeos, além de lipídeos e proteínas. A sua estrutura é composta de quitina, glucanos e uma rede de microfibrilas, formada por quitosanas, as quais justapostas a uma matriz amorfa, formam o esqueleto da parede celular (ZABEL & MORRELL, 2020).

A quitina é um polímero de β -1,4 e N-acetilglucosamina e está presente nas paredes internas da maioria dos fungos septados e é o principal material do esqueleto (BOWMAN & FREE, 2006). É responsável por 1% da composição da parede celular de

leveduras e 15% da composição da parede celular de fungos filamentosos (FREE, 2013). Os polímeros de quitina podem participar de ligações de hidrogênio, e da montagem das microfibrilas (RUIZ-HERREA et al., 2006).

A quitosana é um polímero de resíduos de glucosamina, a qual em alguns fungos é formada através da quitina, através da enzima quitina desacetilase (FREE, 2013). A presença da quitonasa é um dos fatores que diferencia a parede celular dos fungos da parede celular das plantas (GOW et al., 2016).

Os polímeros de glucanos são responsáveis por 30 a 80% da parede celular (FREE, 2013). A principal ligação presente é a β -1,3-glucano, a qual está presente entre 65-90% dos glucanos, mas outras ligações foram observadas nas paredes celulares de fungos, como β -1,6, em meio a β -1,3 ou β -1,4, α -1,3 e glucanos misturados a α -1,4-glucano (BOWMAN & FREE, 2006; FREE, 2013).

Os polímeros beta glucanos podem ter ações farmacológicas, como no estudo de Van Loo (2004), no qual demonstra que as células epiteliais dos intestinos não são capazes de hidrolisar as ligações β -glicosídicas, sendo assim, conferidas uma potencial fonte prebiótica. Os beta glucanos modulam o microbioma intestinal, auxiliando na prevenção de doenças cardiovasculares, constituindo uma abordagem panacêutica na redução do risco dessa condição (WOUK et al., 2021).

Tantos os polissacarídeos de parede celular quanto aqueles excretados para o meio extracelular são biomoléculas complexas que exibem uma diversidade quanto a quantidade de unidades formadoras, a organização, conformação e extensão das cadeias, a disposição das ligações glicosídicas e a complexidade das ramificações e com pesos moléculas variados (MAJEE; AVLANI; BISWAS, 2017).

1.3 Utilização de macromoléculas de fungos

A utilização dos polissacarídeos oriundos dos fungos, tem sido aplicada na formulação de cosméticos (MINGYI et al., 2019). Yang e colaboradores (2021), avaliaram os efeitos dermatológicos de polissacarídeos extraídos do fungo *Tremella sp*, os componentes purificados do polissacarídeo de *Tremella* fermentado (FTPS) teve uma melhor capacidade de prevenir a perda de umidade e aumentou o teor de umidade na pele.

Há uma série de atividades farmacológicas de polissacarídeos extraídos de fungos. Em Castro e colaboradores (2014), polissacarídeos extraídos de *Caripia montagnei*, apresentaram uma atividade anti-edematosa superior aos anti-inflamatórios não

esteroidais (AINEs) indometacina e parecoxibe. Além de atividades antiangiogênica e inibição de radicais livres.

O polissacarídeo HDN-51 foi isolado do produto da fermentação do fungo filamentosso *Lecanicillium kalimantanense*, oriundos da marina antártica, demonstrou-se ter atividade antioxidante (MILLER, 2018). Através de ensaios em ratos, verificou-se atividade antidiabética de polissacarídeos oriundos de *Pleurotus ostreatus*, por meio da melhora a resistência à insulina e aumenta o armazenamento de glicogênio ao ativar a fosforilação de GSK3 e a translocação de transportador de glicose (GLUT4) (ZHANG et al., 2016).

Wang e colaboradores (2014), analisaram polissacarídeos extraídos do fungo *Pleurotus ferulae* na supressão de tumores do melanoma B16F10, no câncer gástrico humano BGC 823 e na linha celular epitelial gástrica humana GES-1 *in silico*. Foi verificada a supressão do crescimento de células tumorais, inibição da proliferação celular, interrupção das células nas fases G0/G1, além de não demonstrar toxicidade para as células não cancerosas.

Estes microrganismos são ricos em micromoléculas, como aminoácidos essenciais, alcaloides e vitaminas (ZHANG et al., 2021). Os fungos possuem macromoléculas, como proteínas, gorduras, carboidratos de pequenas cadeias e polissacarídeos em sua estrutura. Os polissacarídeos são os principais compostos bioativos de importância biotecnológica (VALVERDE; HERNANDEZ-PEREZ & PAREDES-LOPEZ, 2015). Estes polissacarídeos estão presentes nas paredes celulares dos fungos (RAGHUKUMAR, 2017).

1.4 Fungos do gênero *Rhizopus*: Aspectos Gerais

Os fungos do gênero *Rhizopus* são zigomicetos saprotróficos, ou seja, estão presentes no solo e se alimentam de matérias orgânicas em decomposição, como excrementos de animais e plantas (GRYGANSKYI et al., 2018). O gênero foi descrito por Ehrenberg em 1821, é pertence a ordem *Mucorales* e do filo *Zygomycota* (EHRENBERG, 1821).

Os fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus* são constituídos em partes por hifas asseptadas e por hifas septadas, em que os septos produzidos ocorrem entre as junções dos órgãos reprodutivos e micélio, ou ocasionalmente entre micélios envelhecidos (MA et al., 2009).

Na medicina, é o principal agente causador de todas as formas de murcomicose, no qual, o *Rhizopus oryzae* é responsável por 60-80% dos casos desta doença (IBRAHIM et al., 2008). A murcomicose é uma infecção fúngica angioinvasiva, comumente associada com alta morbidade e mortalidade (PRAKASH & CHAKRABARTI, 2019; SKIADA et al., 2018).

O contágio pode acontecer pela ingestão de alimentos contaminados ou inoculação na pele ou feridas, inalação de esporos nas narinas ou pulmões nos imunocomprometidos (REID et al., 2020). A forma rino-orbital murcomicose foi altamente reportada em pacientes com COVID-19 (Corona Virus Disease 2019) na Índia em 2021. Ambas doenças possuem fatores de risco em comum, imunocomprometimento e Diabetes Mellitus (SINGH A, SINGH R, JOSHI, & MISRA, 2021).

O gênero possui relevância econômica em diversas áreas. Na agricultura, são agentes causadores de deterioração de vegetais frescos, ao entrar no tecido vegetal por lesões mecânicas, causando doenças e perdas devastadoras (TOURNAS, 2005).

Na indústria, é utilizado como agente de fermentação de soja e ragi, devido ao rápido crescimento e produção de enzimas, como lipase e proteases, sobretudo na indústria alimentícia (ZHENG et al., 2007, DOLATABADI et al., 2016). Algumas cepas de *R.microsporus* têm sido estudadas por produzirem toxinas farmacologicamente ativas, com capacidade de sintetizar metabólitos (JENNESSEN et al., 2005).

1.4.1 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

A espécie *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* possui características que o diferencia de outros *Rhizopus* sp. A alta taxa de esporos grandes e irregulares, entre 10 a 31% afeta o veículo de distribuição nas cepas deste fungo (JENNESSEN et al., 2008).

Através de análises de Southern blot do DNA genômico total do *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, foi possível descrever duas quitinases e observar a sua importância morfológica no crescimento de hifas do fungo (YANAI et al., 1992). As quitinases hidrolisam as ligações β -1,4 no polímero de quitina, e podem desempenhar diversas funções nos fungos, como a digestão da parede celular e diferenciação dos esporos. Essas enzimas são usadas na produção de bioinseticidas (GOMES et al., 2010, BALDONI, 2016).

É amplamente utilizado na culinária asiática na produção de comidas fermentadas, como soja, devido sua capacidade amilolítica (DE BARROS et al., 2020). Na biotecnologia, tem sido estudada a produção de enzimas, como a fitase, através do fungo (JENNESSEN et al., 2005). Através de uma análise estrutural e física da fermentação de soja através do *Rhizopus microsporus var. oligosporus* foi possível notar produção de enzimas que hidrolisaram proteínas, lipídios e amido, ao fornecer substratos para o seu próprio desenvolvimento (HAN DOYO & MORITA, 2006).

2 Polissacarídeos

2.1 Conceitos gerais

O polissacarídeo é uma macromolécula polimérica natural, de alto peso molecular, composta por mais de dez monômeros, que são ligados por ligações glicosídicas em cadeias lineares ou ramificadas e suas propriedades são determinadas por estas características (XIE et al., 2016, XU et al., 2019). As principais características estruturais envolvem massa molecular, composição química, grau de ramificação, conformação tridimensional, tipo de ligação, polimerização e etc (GONG et al., 2020).

Para se analisar a estrutura de um polissacarídeo, é necessário determinar os tipos de resíduos monossacarídicos que constituem o composto biológico (YU et al., 2018). Estes polissacarídeos podem ser homopolissacarídeos, compostos por monômeros da mesma categoria, ou heteropolissacarídeos, os quais além de possuírem monômeros de diferentes categorias, possuem vários tipos de ligações glicosídicas na sua estrutura (RUTHES; SMIDERLE & IACOMINI, 2016, WANG et al., 2017).

Eles são produzidos por uma grande variedade de espécies, como plantas, algas, microrganismos e animais (CHAKRABORTY, 2019). Os polissacarídeos naturais são estudados em diversas áreas, como alimentos, fabricação de papel e medicina (LIU, WILLFOR, & XU, 2015). Polissacarídeos microbianos como xantana, dextrana, gelana, pululano e levana têm sido utilizados comercialmente em seu estado natural ou modificado (LATGÉ; BEAUVAIS; CHAMILOS, 2017), por conta das propriedades físicas e químicas, como excipientes em formulações com funções de espessante, gelificante, emulsificante, agente suspensor, estabilizador, invólucro de cápsula, formador de filme, aglutinante e agente de revestimento (KOJIĆ, et al., 2016).

Os polissacarídeos mais frequentemente encontrados nas paredes celulares fúngicas são quitina, glucanas e galactomananas. Além dos polissacarídeos de parede celular, existem também os exopolissacarídeos fúngicos, que são polissacarídeos extracelulares, encontrados na forma de limos e excretados para o meio extracelular. Esta característica é observada ao difundirem-se na fase líquida durante a fermentação e provocarem o aumento a viscosidade do meio (WANG et al., 2014, DU et al., 2017). Os grupos funcionais presentes nos polissacarídeos, como grupos hidroxilas, carboxila e amino, podem ser utilizados em modificações a fim de serem usados na biotecnologia para o desenvolvimento de medicamentos e vacinas (WEN & OH et al., 2014).

2.2 Aplicações farmacológicas

Os polissacarídeos têm atraído atenção como produtos bioativos com potenciais ações farmacológicas (YU et al., 2018). Estudos demonstram aplicações biotecnológicas e farmacológica de polissacarídeos extracelulares e de parede celular produzidos por fungos filamentosos, porém muitos polissacarídeos com diferentes funções biológicas ainda estão por serem estudados, dessa maneira essas biomacromoléculas são atraentes para a biotecnologia e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (KAGIMURA et al., 2015, DA CUNHA et al., 2017).

Na perspectiva de observar potenciais efeitos de polissacarídeos extraídos de fungos, Liu e colaboradores (2014) desenvolveram um estudo, caracterizando os polissacarídeos oriundos da *Russula vinosa*. Como resultado, foi observada uma atividade hepato protetora em camundongos por meio de mecanismos antioxidantes dos polissacarídeos solúveis em água e álcali. Polissacarídeos sulfatados (SPSs) foram isolados do fungo *Antrodia cinnamomea* e, através de ensaios *in vitro* observou-se a atividade inibitória do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), dessa forma infere-se atividade anti-inflamatória através dos SPSs (CHENG et al., 2016).

2.3 Inibição de enzimas digestivas por polissacarídeos de parede celular de fungos

Os polissacarídeos extraídos da parede celular do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* possuem atividades hipoglicemiantes (CEDRO, 2019). Dessa forma, é possível avaliar a atividade inibitória de enzimas digestivas. Polissacarídeos extraídos de fungos podem inibir a α -amilase, ao impedir a hidrólise de ligações glicosídicas de amido,

assim, reduzindo os níveis de glicemia, um importante mecanismo no controle da Diabetes Mellitus do tipo 2 (ZHAO et al., 2021).

Stojkovic e colaboradores (2019) utilizaram várias espécies de fungos para avaliar a atividade inibitória de compostos dos fungos sobre as enzimas digestivas, α -amilase e α -glicosidase. Foi verificada atividade inibitória da α -glicosidase de polissacarídeos extraídos da parede de *Cordyceps militaris*. Extratos de polissacarídeos de *Inonotus obliquus* e *Phellinus linteus* apresentaram atividade antidiabética.

Polissacarídeos extraídos de *pleurotus ostreatus* foram utilizados em ensaio de inibição enzimática de α -glicosidase e α -amilase, na qual a atividade de inibição da α -glicosidase atividade de inibição (IC50 variando de 0,0376 a 0,165 mg/mL) foi maior que do padrão acarbose (IC50 de 4,69 mg/mL). Houve inibição da enzima α -amilase (IC50 variando de 1,20 a 6,90 mg/mL), porém inferior ao padrão acarbose (IC50 de 0,039 mg/mL) (ZHU et al., 2014).

Foram isolados polissacarídeos do fungo *Trichoderma harzianum*, e identificado através de infravermelho por transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear o principal componente, α -d-glucopiranosose ligada a (α -1 \rightarrow 4). Este polissacarídeo apresentou maior atividade de eliminação de ABTS+ ($47,09 \pm 2,25\%$ e DPPH ($26,44 \pm 0,12\%$), bem como maior atividade de inibição de α -amilase ($69,30 \pm 1,28\%$) e α -glicosidase ($68,22 \pm 0,64\%$) (SARAVANAKUMAR et al., 2021).

2.4 Obtenção e avaliação de polissacarídeos

Os produtos comerciais derivados de polissacarídeos fúngicos ainda são limitados e os preços são onerosos, por consequência das dificuldades em separá-los e purificá-los. Por isso, o desenvolvimento de técnicas simples, rápidas e efetivas para a separação e purificação de polissacarídeos bioativos de fungos para alimentos e medicamentos funcionais tem atraído atenção (YAN et al., 2014).

Para melhores resultados das possibilidades de aplicação é necessário elucidar a composição e conformação molecular, pois os aspectos funcionais dessas biomoléculas estão associadas a esses fatores. Para caracterizar quimicamente os polissacarídeos, é necessário compreender os processos de extração e purificação. O método de extração tem efeito no rendimento, características e atividades dos polissacarídeos. A extração pode ser feita com água quente, por ultrassom, por enzimas, enzimática assistida e por solventes (DUAN et al., 2018).

Para tanto, modelos de design experimental em conjunto com a metodologia de superfície de resposta, favorecem os processos de otimização das condições de extração, por permitirem avaliar os efeitos de diversos fatores e suas interações em uma ou mais variáveis de resposta (VALASQUES JUNIOR et al., 2017).

Os métodos cromatográficos permitem a purificação de polissacarídeos e outras macromoléculas por separação (CHOONG et al., 2018). A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica, rápida, eficiente, com custos relativamente baixos, que se baseia na identificação de grupos funcionais de moléculas orgânicas, através dos espectros de vibração expressos em diferentes números de onda. Dessa forma, a existência ou não de grupos funcionais, seus estados de protonação e alterações na molécula podem ser percebidos por análise da posição e intensidade das bandas de absorção (OJEDA; DITTRICH, 2012).

Na caracterização de polissacarídeos, a ressonância magnética nuclear permite determinar a estrutura, mesmo quando em misturas com outros componentes. A técnica quantifica os diferentes grupos funcionais e detecta demais componentes e impurezas presentes na amostra. Sua alta resolução oferece informações minuciosas quanto ao tipo, número, configurações, posição da ligação e proporções de resíduos de açúcar em um polissacarídeos (CHENG; NEISS, 2012).

3 α -amilase

A α -amilase é uma enzima digestiva presente na saliva e no intestino, e é responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) do amido, produzindo oligossacarídeos e moléculas de glicose. O processo de hidrólise das ligações glicosídicas começa com as α -amilases salivares, e continua com as α -amilases pancreáticas no intestino delgado, onde serão produzidos maltose, maltotriose e dextrinas-limite ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (NELSON & COX, 2017).

A α -amilase humana possui o peso molecular de 57,6 kDA, apresenta cálcio na sua estrutura, que tem como função estabilizar a estrutura tridimensional e ativação alostérica. A proteína tem 512 aminoácidos em uma cadeia única de proteína, contendo três domínios principais: A, B e C, onde o cálcio está presente entre os domínios A e B (WHITCOMB & LOWE, 2007). Devido sua estrutura tridimensional e ação dos grupos catalíticos, a α -amilase tem a capacidade de fazer ligação ao substrato e promover a

hidrólise das ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) do amido (DE SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

As endoamilases rompem internamente as ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) de amilopectinas e alfa-amilose. As exoamilases clivam as ligações glicosídicas do tipo ($\alpha 1 \rightarrow 4$) ou ambas as ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$ e $\alpha 1 \rightarrow 6$), a partir da extremidade não redutora, produzindo glicose ou maltose (PINHO, 2004).

As principais vantagens da utilização da α -amilase microbiana estão relacionadas ao bom custo benefício pela produção, com a facilitada manipulação dos micro-organismos com uma maior produtividade em relação ao menor espaço utilizado e tempo reduzido (DEY et al., 2016). No trabalho de Santos e colaboradores (2020), foi utilizado o fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* para a produção e caracterização da amilase extraída do próprio micro-organismo, em condições favoráveis tanto de espaço e tempo.

É possível observar que as alterações dos índices de α -amilase plasmática possuem relações com diversas doenças (AZZOPARDI et al., 2016). Em um estudo com 9.340 pacientes diabéticos, 11,8% apresentaram aumento da α -amilase (STEINBERG et al., 2014). Realizou-se um estudo com 25 pacientes com Síndrome de Sjögren, no qual foi verificado que 24% apresentaram hiperamilasemia (HERNANDÉZ-MOLINA & MICHEL-PEREGRINA, 2011).

A α -amilase salivar tem sido estudada como biomarcador de estresse em avaliações psicológicas de síndrome de Burnout e em indivíduos com líquen plano bucal (DE FRANÇA, 2018; KATZ et al., 2016). Assim, a dosagem de α -amilase apresenta novas aplicações clínicas e diagnósticas de condições de saúde (AZZOPARDI et al., 2016).

4 Estudo *in silico* de compostos bioativos

Ferramentas computacionais de estudos *in silico* são usadas como estratégias produtivas, custo-efetivas e de rápida execução. Estas características são interessantes para reduzir o tempo da descoberta de novos fármacos e avaliar, segundo aspectos teóricos computacionais, a efetividade da molécula. Para o sucesso da triagem virtual, é essencial a seleção de substâncias que possuem maior probabilidade de interagir com seus

respectivos alvos proteicos e apresentarem atividade farmacológica (FERREIRA et al., 2015).

Tendo em vista o alto custo do desenvolvimento de medicamentos, as abordagens computacionais surgem como uma alternativa, que permite a triagem de um grande número de compostos e, ao selecionar um número restrito de potenciais fármacos, delimita-se os compostos bioativos a serem testados *in vitro* (KAZMI et al., 2019).

O processo de varredura virtual depende de bancos de dados com uma vasta diversidade molecular, que forneça os compostos para que sejam realizados os ensaios *in silico*. O principal banco de dados de estruturas de macromoléculas é o Protein Data Bank (PDB), um arquivo mundial onde estão publicadas milhões de moléculas cristalográficas determinadas por métodos de ressonância magnética nuclear (NMR) (BERMAN et al., 2000).

São duas as principais abordagens de triagem virtual baseadas em estrutura: aquelas baseadas em coordenadas de proteínas e aquelas com base nas coordenadas do ligante. O encaixe ligante-receptor pode ser dividido em duas partes: o posicionamento correto de um ligante, e seu reconhecimento (HAWKINS; SKILLMAN & NICHOLLS, 2007).

Foram realizados estudos *in silico* através de docagem molecular para avaliar as ligações de quatro compostos naturais oxiprenilados, previamente estudados *in vitro*, os quais apresentaram inibição enzimática de enzimas digestivas, α -amilase e α -glucosidase. O estudo *in silico* concluiu que os compostos possuem interações favoráveis à inibição das enzimas, corroborando com os testes *in vitro* (FARAONE et al., 2021).

Os compostos sintetizados através de derivados de dicianoanilina de piridina, tiofeno, furano e fenil foram submetidos a testes *in vitro* para avaliar o potencial de inibição enzimática das enzimas α -amilase e α -glucosidase. Os cinco compostos que apresentaram inibição superior ao padrão acarbose, foram submetidos aos estudos *in silico*, os quais apresentaram o envolvimento desses compostos com diversas ligações dentro do sítio alvo da enzima (SALEEM et al., 2022).

Para a avaliação do potencial anti-hiperglicêmico, foram sintetizados vinte novos derivados de magnolol do ácido cinâmico e avaliados *in vitro* e *in silico* a atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase. O composto 6j demonstrou o maior potencial inibitório para ambas as enzimas, e os estudos *in silico* demonstraram interações de ligações entre o composto e as enzimas digestivas (HU et al., 2021).

4.1 *Docking* molecular

A triagem virtual utiliza-se do acoplamento ou *docking* molecular, que identifica os compostos com características químicas e estruturais semelhantes de ligantes usuais, que façam interação com um determinado alvo molecular (RODRIGUES et al., 2012). O objetivo é prever as conformações ligadas e a afinidade de ligação (TROTT; OLSON, 2010). Dessa forma, possibilita a seleção de compostos bioativos que apresentam um conjunto de interações intermoleculares favoráveis.

O *docking* prevê a conformação mais favorável do ligante dentro do sítio alvo da proteína, através da avaliação da energia de ligação do ligante e da energia intermolecular do complexo ligante-receptor (MAGALHÃES; BARBOSA & DARDENNE, 2004). A partir da conformação espacial do ligante acoplado ao sítio ativo da proteína, são obtidas energias livres de ligação, em que a menor energia de entropia (ΔS) é a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN, 2004).

Os algoritmos de busca e uma função de pontuação de energia (scoring), que produz um valor de energia de ligação em kcal/mol, são as principais ferramentas para a realização do *docking*, ao classificar as melhores conformações de ligação do sítio ativo do receptor (ALONSO et al., 2006).

5 Sistema Imunológico

5.1 Conceito geral

Um sistema de defesa contra invasores está presente na maioria dos organismos vertebrados e invertebrados, porém o sistema imunológico complexo e sofisticado surgiu em espécies de mamíferos evoluídos (BEURA et al., 2016). O corpo humano representa um substrato com abundância de nutrientes, calor, proteção e residência para organismos crescerem e se reproduzirem (ACTOR, 2019). O sistema imunológico serve como uma rede de defesa do hospedeiro contra diversos tipos de invasores, como vírus, bactéria, fungos e parasitas, ao limitar e inibir a entrada destes organismos (HOWELL & SHEPHERD, 2018). O sistema imune é dividido em duas categorias principais: A imunidade inata e imunidade adaptativa (ANISMAN; HAYLEY & KUSNECOV, 2018).

5.1.1 O sistema imunológico: Inato

A imunidade inata abrange a primeira fase ou barreira de combate ao agente invasor ou lesão causada por agentes físicos ou químicos (MEDZHITOV, 2007). Esta rede defensiva inclui barreira física, como os mecanismos anatômicos (pele e membranas mucosas), mecanismos fisiológicos, como pH, temperatura e mediadores químicos, mecanismos fagocíticos e mecanismos inflamatórios (ACTOR, 2019).

A principal ação do sistema imune inato é recrutar células efetoras para o local invadido ou lesionado, para através de marcadores, remover o corpo estranho de forma eficaz e iniciar o processo de cicatrização e remodelação do tecido lesionado (KESELOWSKY; ACHARYA & LEWIS, 2020). Esta resposta se dá quando o patógeno ou lesão é detectada por Receptores de Reconhecimento de Padrões, do inglês (PRRs), os quais reconhecem padrões de estruturas ou metabolismo de micro-organismos, os denominados Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês (PAMPs), que ativam as células imunes inatas para que se obtenha a sinalização e resposta aos invasores (GOODMAN, 2021).

O sistema imunológico inato consiste em granulócitos (eosinófilos, basófilos, mas principalmente neutrófilos), células dendríticas, macrófagos, mastócitos, monócitos, células linfoides inatas (Interleucinas, células Natural Killers - NK), $\gamma\delta$ T células (DE MORAES-PINTO; SUANO-SOUZA & ARANDA, KESELOWSKY; ACHARYA & LEWIS, 2020, GOODMAN, 2021). Essas células estão imediatamente disponíveis para agir de forma eficiente em uma ampla gama de patógenos de forma inespecífica (DE MORAES-PINTO, SUANO-SOUZA & ARANDA, 2020).

5.1.2 O sistema imunológico: Adaptativo

A imunidade adaptativa determina a inflamação e o reparo do tecido de forma específica, desenvolvida após dias ou semanas em face do reconhecimento de antígenos (BLANCHARD; SALVIONI & ROBEY, 2020). Os antígenos podem ser proteínas, carboidratos, lipídios, ou outras moléculas menores, podendo ser de fonte externa ou do próprio hospedeiro, os chamados auto-antígenos. A imunidade adaptativa é caracterizada por um vasto repertório de moléculas receptoras oriundas de recombinação de genes somáticos e memória imunológica (KESELOWSKY; ACHARYA & LEWIS, 2020).

A imunidade inata se relaciona à imunidade adaptativa através da ativação das células dendríticas inatas e macrófagos via reconhecimento microbiano por PRRs, o qual aciona a indução de moléculas co-estimulatórias, que se ligam aos receptores co-estimuladores nas células T e ativar respostas imunes adaptativas (GOODMAN, 2021). Estes estimuladores são proteínas, quimiocinas e citocinas, que mediam as respostas das células imunes, sendo Proteínas de Macrófagos Inflamatórios alfa-1 ($MIP1\alpha$), Regulado após Ativação, Célula T normal expressa e Secretada (RANTES), Oncogene alfa Regulado pelo Crescimento ($GRO-\alpha$), Proteína Quimotática de Granulócitos 2 (GCP-2), e Fator 1 Derivado de Célula do Estroma alfa/beta ($SDF-1\alpha/\beta$), exemplos de quimiocinas, e a família IL-1, os interferons, a família TNF e a superfamília da hematopoietina, as citocinas (KESELOWSKY; ACHARYA & LEWIS, 2020, GOODMAN, 2021).

As respostas imunes adaptativas são mediadas por linfócitos, que subdividem-se em dois tipos principais: as células B, que produzem anticorpo; e as células T, que servem funções regulatórias e auxiliares, bem como funções de eliminação de células (ANISMAN; HAYLEY & KUSNECOV, 2018).

A imunidade adaptativa é dividida em celular e humoral (SUN et al., 2020). A imunidade humoral é mediada pelo reconhecimento de anticorpos (imunoglobulinas) de antígenos associados a patógenos (ACTOR, 2012). Essas imunoglobulinas são moléculas efectoras e estão divididas por cinco classes: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD (JANEWAY et al., 2002).

O reconhecimento de antígeno se dá de forma específica por linfócitos B, e ocorre através da ligação à membrana receptores, e desencadeia a proliferação e diferenciação em células plasmáticas produtoras de anticorpos. Essa ativação é mediada através de linfócitos auxiliares T CD4 (ACTOR, 2012). A imunidade celular envolve os linfócitos T, os quais secretam fatores de regulação imunológica após células apresentadoras de antígeno apresentarem o antígeno de organismos invasores aos linfócitos, que irão emitir uma resposta a nível celular (ACTOR, 2019).

Essa ativação celular dos linfócitos T citotóxicos CD8 se dá por meio da ligação entre o complexo de histocompatibilidade principal da classe I (MHC-I) associado ao peptídeo e o receptor clonal dos linfócitos T (TCR) e de moléculas co-estimulatórias. Os linfócitos auxiliares Th1, produzem a IL-2, que irão ativar e proliferar os linfócitos T CD8, e induzir a produção de perforinas e granzinas. Através da liberação de óxido nítrico e do complexo de histocompatibilidade de classe 2 (MHC-2) na membrana, os linfócitos

Th1 podem produzir a citocina INF- γ , que tem como função ativar os macrófagos e induzir a citotoxicidade (TIZARD, 1998).

6 Atividade Imunomoduladora

O sistema imunológico, quando invadido, produz uma resposta inflamatória que identifica e apresenta o invasor para os defensores. Através do sistema de memória imunológica, a resposta se torna mais específica e imediata. Se houver imprecisões na regulamentação do sistema, pode ocorrer uma série de doenças auto-imunes, em que o sistema imunológico reconhece células próprias como invasoras, causando doenças, por exemplo, alergias, asma e artrite reumatoide. Outras implicações podem ser acarretadas por desregulações do sistema imune, como rejeição a transplantes e vários tipos de câncer (KUMAR, 2021).

Os imunomoduladores são agentes capazes de atuar como modificadores da resposta biológica, ao aumentarem ou suprimirem as respostas imunológicas. Eles têm sido utilizados na clínica para tratar certos tipos de cânceres, infecções virais, doenças autoimunes e doenças de imunodeficiência (LEE, 2006). Com a descoberta dos imunomoduladores, foi possível manipular o sistema imune a fim de reduzir os efeitos associados às terapias que alteram a resposta imunológica, como quimioterapia e transplantes e restaurarem a resposta imune normal ao estimular a resposta imune de indivíduos susceptíveis a invasores específicos (DUTTA, 2002).

Nesta perspectiva, os polissacarídeos β -glucana e quitina obtidos da parede celular de fungos têm se mostrado promissores para a descobertas de novos fármacos que atuem na inumomodulação. A quitina e a quitosana presentes nas paredes celulares de fungos, são degradados em micropartículas quitinosas, e possuem efeitos imunomoduladores e são utilizados para tratar doenças inflamatórias, como asma alérgica e doença inflamatória intestinal (HOSEINI et al., 2020).

Jeurink e colaboradores (2008) analisaram cepas de oito fungos, quanto à atividade imunomoduladora das frações de proteínas isoladas e frações de polissacarídeos líquidos. Os resultados demonstraram que as proteínas dos fungos *V. volvacea* e *G. lucidum* mostraram atividade imunomoduladora, ao induzir a produção de IL-2, dessa forma podendo atuar no efeito direto nos monócitos, e indiretamente na ativação de células T e na produção de citocinas.

O polissacarídeo β -glucana, (1 \rightarrow 6)- β -d-glucopiranosil, extraído do fungo *Russula albonigra* foi submetido a testes *in vitro* para avaliar a atividade imunomoduladora. O polissacarídeo mostrou atividade imunoestimuladora pela ativação de macrófagos pela produção de óxido nítrico, bem como proliferação de esplenócitos e timócitos (NANDI et al., 2014).

Um polissacarídeo β - (1 \rightarrow 3)-d-glucano insolúvel em água, extraído do fungo *Ganoderma lucidum*, mostrou atividade anti-inflamatória no modelo de células Raw 264.7 induzidas por LPS, pelo bloqueio de NF- κ B e JNK MAPK (WANG; YUAN & YUE, 2014).

Foram extraídos polissacarídeos brutos de resíduo de soja fermentado com o fungo *Morchella esculenta*. Os resultados obtidos do estudo *in vitro* das atividades antitumorais da linha celular hepatocelular humana (HepG-2) e células de carcinoma cervical humano (Hela), demonstraram um ótimo potencial ao inibirem o crescimento mais alto em células HepG-2 de 68,01% e indução da apoptose, e nas células Hela ao interromper a progressão do ciclo celular na fase G0 / G1. Estas respostas imunomoduladoras podem ter uma importante ação antitumoral (LI et al., 2017).

O potencial imunomodulatório de polissacarídeos extraídos e isolados de fungos está apenas emergindo (WONG; LAI & CHEUNG, 2011). Assim como os estudos citados acima, estes polissacarídeos podem estimular o sistema imunológico, dessa forma, estudos são necessários para o desenvolvimento de novos fármacos com capacidade imunomoduladora.

CAPÍTULO II

Avaliação *in silico* de inibição enzimática da α -amilase pelo polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano extraído da parede celular de *Rizophus. microsporus var. oligosporus*

Avaliação *in silico* de inibição enzimática da α -amilase pelo polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano extraído da parede celular de *Rhizopus. microsporus var. oligosporus*

Aldo Barbosa Côrtes Filho^a, Gildomar Lima Valasques Junior^a

^a Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brasil

RESUMO

A triagem virtual de compostos bioativos é uma estratégia acessível para avaliação de seus potenciais biotecnológicos e farmacológicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade inibitória do polissacarídeo isolado da parede celular de *Rhizopus. microsporus var. oligosporus* sobre α -amilase, através de análises de interações do sítio ativo, em comparação com o padrão acarbose. A seleção da enzima α -amilase humana de código 3BAJ, se deu pelo banco de dados Protein Data Bank (PDB). O *docking* molecular foi realizado através do programa AutodockTools 1.5.6.rc3. O cálculo das energias de ligações foi realizado utilizando o programa Autodock Vina. A análise das ligações do sítio ativo com polissacarídeo e acarbose foi realizada pelo programa Discovery Studio 3.5. O cálculo de descritores foram realizados pelo programa MarvinSketch 21.14 para determinar se o polissacarídeo possui biodisponibilidade oral segundo os parâmetros de Lipinski e Veber. O cálculo das energias de ligação apresentou proximidade dos valores de energia livre entre a acarbose e a unidade monomérica do polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano, alcançando um valor máximo de -1,1 kcal/mol. As análises de superfícies de ligação de sítio ativo demonstraram ligações eletrostáticas e força van der Waals tanto com o padrão acarbose, quanto o polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano. O polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano não atendeu aos parâmetros estabelecidos de biodisponibilidade oral de Lipinski e Veber, o que é desejado, uma vez que, como inibidor da α -amilase, ele não deve ser absorvido no TGI.

Palavras-chave: triagem virtual. *docking* molecular. acarbose.

1 Introdução

As α -amilases são enzimas que degradam o amido e que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4-O-glicosídicas internas nos polissacarídeos com a retenção da configuração α -anomérica nos produtos (SINDHU; BINOD & PANDEY, 2017). As α -amilases degradam o carboidrato de cadeia longa até a produção de açúcares simples, como a maltose e a maltotriose (NELSON & COX, 2017).

A acarbose é um oligossacarídeo complexo administrado via oral, que tem como função inibir reversivelmente as enzimas α -glicosidase e α -amilase para reduzir a absorção da glicose (OBOH et al., 2016). Essas enzimas têm como função degradar ligações glicosídicas dos carboidratos da dieta em monossacarídeos. Assim, a acarbose retarda a hidrólise de carboidratos de cadeia longa, atenuando os picos hiperglicêmicos pós-prandiais ao reduzir a absorção da glicose (BALFOUR; MCTAVISH, 1993; FUJISAWA et al., 2005).

Os polissacarídeos do grupo dos β (1,3) glucanos produzidos e extraídos da parede celular de fungos possuem potenciais farmacológicos (SAMUELSEN, SCHREZENMEIR & KNUTSEN, 2014). Foram verificadas atividades hipoglicemiantes do polissacarídeo extraído da parede celular do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, sendo este um potencial composto para o desenvolvimento de um inibidor enzimático (CEDRO, 2019).

A triagem virtual utiliza-se do *docking* ou acoplamento molecular, que identifica os diferentes compostos com características químicas e estruturais semelhantes de ligantes para determinado alvo molecular. Assim, possibilita a seleção de moléculas que apresentam um conjunto de interações intermoleculares favoráveis (RODRIGUES et al., 2012). A triagem virtual ou *in silico*, é um excelente complemento para as técnicas experimentais demoradas e dispendiosas, pois prediz a viabilidade das moléculas por modelos computacionais (BERRY; FIELDING & GAMIELDIEN, 2015).

A análise de *docking* molecular tem sido uma das estratégias mais importantes para a descoberta de novos medicamentos (SHITYAKOV; FOERSTER, 2014). O *docking* molecular é composto por dois algoritmos, o de amostragem, no qual prevê as conformações tridimensionais que o ligante pode assumir dentro do sítio ativo, e o algoritmo de pontuação, que prevê as energias de ligação entre ligante e o receptor para cada conformação prevista (SILAKARI; SINGH, 2021).

Tendo em vista que não se têm trabalhos avaliando a inibição da enzima α -amilase humana por polissacarídeo da parede de *R. microsporus var. oligosporus*, $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, na literatura pesquisada, foi realizado o estudo através de triagem computacional para avaliar o potencial inibitório do polissacarídeo em relação a α -amilase ao comparar com o padrão acarbose.

2 Materiais e Métodos

2.1 Seleção da enzima α -amilase

A seleção da enzima se deu através da busca no banco de dados de estruturas 3D, Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al., 2000). Foi selecionada a estrutura cristalográfica da α -amilase humana de código PDB 3BAJ. O filtro de seleção foi o método experimental de difração de raio X, com resolução e valor de R maiores que 2,0 Å e 0,2. Considerou-se a presença de um ligante, acarbose, e dois ativadores nucleares na estrutura do receptor, os íons cálcio e nitrato.

2.2 Preparação da estrutura tridimensional da enzima α -amilase

O programa AutodockTools 1.5.6.rc3 foi utilizado para preparar a estrutura tridimensional do alvo molecular, a enzima α -amilase (SANNER, 1999). Neste processo, foram removidos os ligantes e solventes presentes na estrutura. Adicionou-se átomos de hidrogênio e cargas para adequação da estrutura química. O ligante acarbose foi convertido ao formato .pdbqt através do programa AutodockTools 1.5.6.rc3, para que fosse possível realizar o *docking* molecular (SANNER, 1999).

A determinação espacial do sítio alvo do receptor foi feita por meio da posição do ligante (acarbose) a interagir com o receptor (sítio ativo da enzima α -amilase). Para tal, o programa AutodockTools 1.5.6.rc3 também foi utilizado para determinar as coordenadas do espaço de procura do sítio ativo do receptor (SANNER, 1999). Através do *grid box* foi determinado o sítio ativo da enzima, por meio um conjunto tridimensional de pontos regularmente espaçados. As coordenadas do espaço de procura foram estabelecidas em um espaço de 1 Å.

2.3 Construção da unidade monomérica do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano

Através do programa MarvinSketch 21.14 (CHEMAXON, 2021) foi gerada a unidade molecular tridimensional do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, extraído da parede celular de *Rizophus. microsporus var. oligosporus* (CEDRO, 2019). A molécula foi convertida para o formato .pdbqt através do programa Autodock Tools 1.5.6.rc3 (SANNER, 1999).

2.4 Docking e identificação de potenciais interações com a enzima α -amilase

O *docking* molecular foi realizado utilizando o Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010), responsável por calcular a energia de ligação da interação do ligante acarbose com a enzima α -amilase, assim como a energia de ligação da interação da unidade monomérica do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano com a α -amilase. Os resultados foram observados pelo prompt de comando do computador. Juntamente com as energias de ligação tabeladas, as interações e as nuvens de energia foram analisadas pelo programa Discovery Studio 3.5 (BIOVIA, 2016).

2.5 Parâmetros de Lipinski e Veber

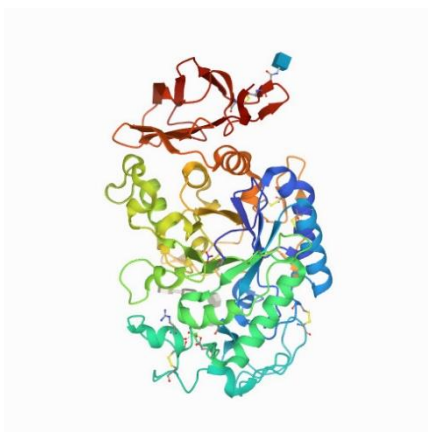
Os parâmetros de Lipinski e colaboradores (2001) e Veber e colaboradores (2002): Log P, número de grupos doadores de elétrons, número de grupos aceptores de elétrons, peso molecular, número de ligações rotacionais e a área de superfície polar foram calculados pelo programa MarvinSketch 21.14 (CHEMAXON, 2021) para prever a biodisponibilidade oral (absorção e permeabilidade) do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano.

3 Resultados e Discussão

3.1 Definição das coordenadas espaciais do sítio de ligação da enzima

A proteína selecionada no banco de dados PDB - Protein Data Bank foi a α -amilase humana, de código PDB 3BAJ, representada na Figura 1 pela sua estrutura cristalográfica em raio-X (BERMAN et al., 2000, MAURUS et al., 2008).

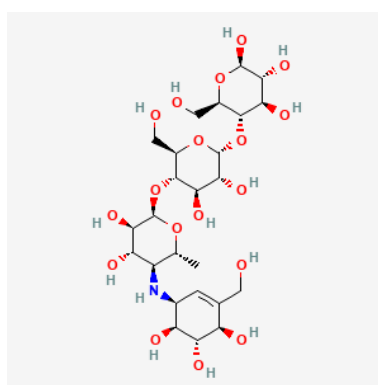
Figura 1. Estrutura cristalográfica da enzima α -amilase humana



Fonte: MAURUS et al., 2008.

O ligante acarbose (Figura 2) foi utilizado como modelo para relacionar com os resultados. A acarbose é utilizada como padrão para avaliação de potenciais inibidores da enzima α -amilase.

Figura 2. Estrutura bidimensional da acarbose



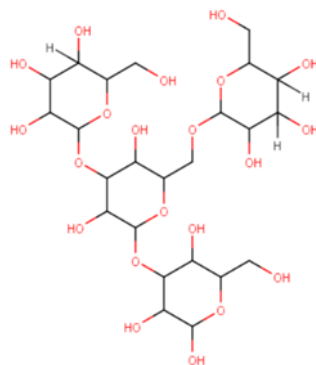
Fonte: Banco de dados Pubchem

O docking molecular foi realizado pelo programa AutoDock Tools 1.5.6.rc3. Através do *Grid Box*, foram determinadas as coordenadas espaciais do sítio ativo da enzima, por meio do encaixe da molécula de acarbose à α -amilase. A caixa de ancoragem apresentou coordenadas X, Y e Z de 8.897, 15.357, 39.865, respectivamente e dimensões de 22 x 14 x 16 Å.

A partir das coordenadas tridimensionais do sítio de ligação da enzima α -amilase, foi possível calcular as energias de ligação do inibidor da α -amilase, acarbose, e do polissacarídeo extraído da parede celular de *R. microsporus var. oligosporus*, $\beta(1,3)$

$\beta(1,6)$ glucogalactano (Figura 3). Dessa forma, verificou-se o potencial efeito inibitório da α -amilase pela unidade monomérica do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, através de análises comparativas com a acarbose.

Figura 3. Estrutura bidimensional da unidade monomérica do do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano



Fonte: MarvinSketch 21.14

O polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano faz parte do grupo dos $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucanos que possuem uma cadeia lateral ramificada, e está presente nas paredes celulares de fungos e leveduras (STONE, 2009). Os $\beta(1,3)$ glucanos exibem uma estrutura helicoidal tripla e se dissolvem em soluções alcalinas, podendo exibir atividades imunomoduladoras, devido a capacidade de ativar componentes celulares e humorais do sistema imunológico do hospedeiro (SONG; SHANG; RATNER, 2012).

3.2 Cálculo das energias de ligação

Através do programa AutoDock Vina realizou-se os cálculos das energias de ligação da acarbose e do $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, representados na Tabela 1. (TROTT; OLSON, 2010).

Tabela 1. Energias de ligação em kcal/mol

| Acarbose | $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano |
|-----------------|---|
| -8.9 | -7.8 |
| -7.9 | -7.7 |
| -7.7 | -7.1 |
| -7.5 | -7.1 |
| -7.4 | -7.1 |
| -7.2 | -7.1 |
| -7.0 | -7.1 |
| -7.0 | -7.1 |
| -6.8 | -7.1 |

A energia de ligação (ΔG) é a totalidade de energia atrelada a um sistema disponível para a realização de trabalho. A energia livre se dá em kcal/mol, na qual o complexo proteína-ligante passa por modificações estruturais em diferentes ângulos que ocorrem durante a interação.

Os valores de energia livre da acarbose e do polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano variaram em no máximo -1.1 kcal/mol, dessa forma indicando uma possível interação do polissacarídeo extraído da parede celular do fungo *R. microsporus var. oligosporus*, com o sítio de ligação da enzima α -amilase.

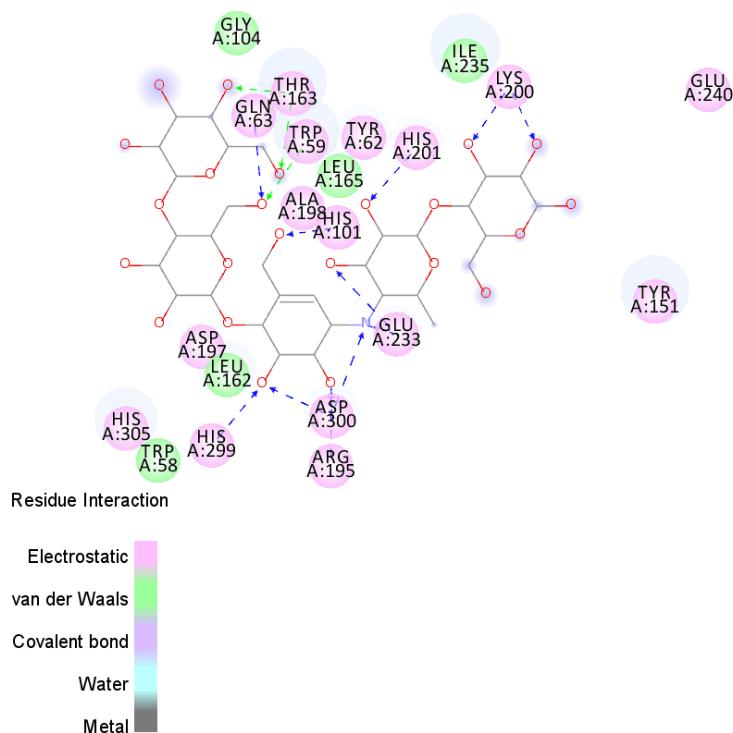
É importante salientar que a energia livre de Gibbs (ΔG), pode ser expressa pela fórmula $\Delta G = U - T\Delta S$. Sendo U a energia interna da molécula, T a temperatura absoluta do sistema e ΔS a entropia da molécula estudada (SMITH, 2007). Quanto menor a entropia do sistema, ou seja ΔS negativo, a desordem causada no sítio de ligação ligante-receptor é menor, e mais favorável é a reação.

3.3 Análise das ligações e resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio ativo

Mediante o programa Discovery Studio 3.5, foram realizadas as análises das ligações envolvidas no sítio de ligação, bem como os resíduos de aminoácidos

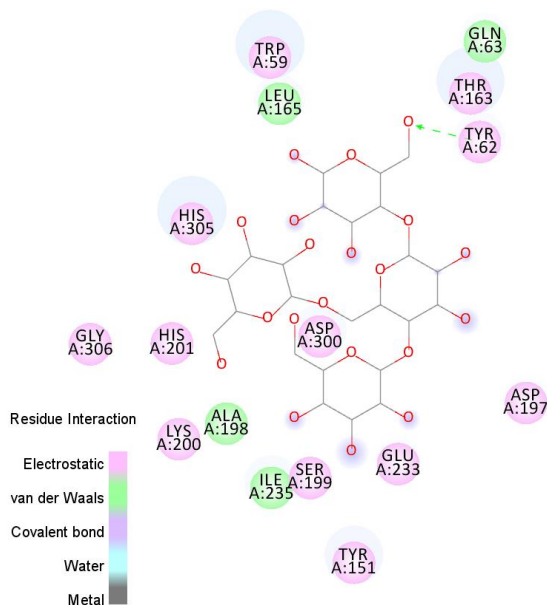
presentes nas ligações. Como parâmetro foi analisada a interação do ligante acarbose e do polissacarídeo com o sítio de ligação da enzima α -amilase (Figura 4 e 5).

Figura 4. Interações intermoleculares dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da α -amilase e acarbose



O acoplamento da acarbose com o sítio ativo da enzima α -amilase apresentado na Figura 4 exibiu ligações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos HIS A:299, ASP A:300, ARG A:195, GLN A:63, HIS A:101, ALA A:198, LYS A:200, HIS A:201, GLU A:233 e átomos de oxigênio da acarbose. Houve interação eletrostática entre os resíduos ASP A:300 e GLU A:233 com o nitrogênio do ligante. Foram observadas interações do tipo força de Van der Waals entre os resíduos THR A:163 e TRP A:59 com oxigênios da acarbose. Os resíduos GLY A:104, ILE A:235, LEU A:165, LEU A:162 e TRP A:58 apresentaram contatos próximos com o ligante acarbose através de interações de Van der Waals. Os resíduos TYR A:151, GLU A:240, HIS A:305, ASP A:197 e TYR A:62 apresentaram contatos próximos com o ligante acarbose através de ligações eletrostáticas.

Figura 5. Interações intermoleculares dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da α -amilase e $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano



O acoplamento do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano com o sítio ativo da enzima α -amilase apresentado na Figura 5 exibiu interação de Van der Waals entre o resíduo TYR A:62 e o oxigênio da estrutura do $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano. Notou-se outras interações de Van der Waals por contatos próximos entre os resíduos ALA A:198, ILE A:235, LEU A:165 e GLN A:63 com o $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano. Os resíduos TRP A:59, THR A:163, HIS A:305, GLU A:306, HIS A:201, GLU A:306, LYS A:200, ASP A:300, SER A:199, TYR A:151, GLU A:233 e ASP A:197 apresentaram contatos próximos com o $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano através de ligações eletrostáticas.

Dessa forma, os resíduos de aminoácidos coincidentes no sítio ativo de ligação da enzima com a acarbose e o polissacarídeo, bem como as mesmas interações de forças de ligação, inferem uma boa interação entre o sítio ativo da enzima α -amilase e o polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano.

3.4 Parâmetros de Lipinski e Veber

Na Tabela 2, estão os resultados dos cálculos dos descritores para a avaliação da biodisponibilidade oral do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano.

Tabela 2. Parâmetros para avaliação da biodisponibilidade oral do $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano

| Parâmetros | $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano | Valores de Referência* |
|--|---|------------------------|
| Número de doadores de elétrons | 14 | < 5 |
| Número de aceptores de elétrons | 21 | < 10 |
| Peso molecular (g.mol ⁻¹) | 666.579 | < 500 |
| LogP | -8.25 | < 5 |
| Número de ligações rotacionais | 10 | ≤ 10 |
| Área de superfície polar (Å ²) | 347,83 | ≤ 140 |

*Valores de referência de acordo com Lipinski e colaboradores (2001), Veber e colaboradores (2002).

Os valores de LogP e Números de ligações rotacionais estão dentro dos parâmetros de Lipinski e Veber, entretanto o $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano não atende todas as regras de biodisponibilidade oral. A “Regra dos 5” de Lipinski é amplamente utilizada na área da Química Medicinal, sendo usada nos protocolos de descoberta de fármacos.

O polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano não atende aos parâmetros estabelecidos de biodisponibilidade oral de Lipinski e Veber, o que é desejado para o desenvolvimento de um medicamento, uma vez que, como inibidor da α -amilase, ele não deve ser absorvido no trato gastrointestinal.

4 Conclusões

Através da preparação da enzima α -amilase humana, de código PDB 3BAJ, foi possível calcular as energias de ligação (ΔG) do ligante padrão inibidor Acarbose e comparar com as energias de ligação da unidade monomérica do polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano. A variação das energias de ligação foram de no máximo -1.1 kcal/mol, inferindo uma boa interação do $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano com o sítio ativo da enzima α -amilase.

A avaliação *in silico* do potencial inibitório também se deu pela análise das ligações e resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio ativo, onde o $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$

glucogalactano apresentou ligações compatíveis com as do padrão acarbose, sendo elas ligações eletrostáticas e força de van der Waals.

Por fim, foram calculados os parâmetros de Lipinski e Veber para biodisponibilidade oral do possível inibidor. O polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano não atendeu aos parâmetros estabelecidos de biodisponibilidade oral de Lipinski e Veber, sendo um resultado positivo para um futuro desenvolvimento do medicamento, já que como inibidor da enzima α -amilase, não deve ser absorvido no trato gastrointestinal.

CAPÍTULO III

Ensaio da inibição da α -amilase pelo polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano extraído de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* e avaliação da atividade imunomoduladora

Ensaio da inibição da α -amilase pelo polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano extraído de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* e avaliação da atividade imunomoduladora

Aldo Barbosa Côrtes Filho^a, Gildomar Lima Valasques Junior^a

^a Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brasil

RESUMO

A parede celular dos fungos filamentosos tem sido estudada na área de aplicações farmacológicas, sobretudo a extração de polissacarídeos, que podem ser utilizados na produção de novos fármacos. Este estudo avaliou a atividade inibitória do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano extraído da parede celular de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, em relação à enzima α -amilase, e sua atividade imunomoduladora. A atividade da α -amilase foi terminada pelo método de DNS (ácido dinitrosalicílico) utilizando amido como substrato e solução de α -amilase purificada. A partir dos valores de $1/[S]$ e $1/V$ obtidos das análises espectrofotométricas, foram construídos os gráficos de Lineweaver-Burk a fim de calcular os valores de K_m e V_{max} a partir da equação da reta. Posteriormente, foram calculados os K_m das reações com a presença do inibidor nas concentrações (0,4, 0,5, 1,2 mg/mL). O ensaio da atividade imunomoduladora foi realizado a partir da obtenção de macrófagos murinos, os quais foram estimulados ou pelo polissacarídeo extraído da parede celular de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* ou por Lipopolissacarídeo. As citocinas dosadas no estudo foram IL-1 α e TNF- α através de ensaio de imunofluorescência (ELISA). A partir da análise dos gráficos de Lineweaver-Burk com variação da concentração do substrato na ausência do inibidor, os valores de K_m e V_{max} foram calculados e iguais a 0,28mM e 1,22 μ mols/min. Os valores de K_m para as concentrações analisadas aumentaram progressivamente (2,96, 3,62, 4,22, 6,83mM). Dessa forma, é possível indicar que o polissacarídeo isolado de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, inibe competitivamente a enzima α -amilase. O polissacarídeo foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos estimulados por LPS, tais quais TNF- α (em concentrações a partir de 50 μ g/mL de polissacarídeo) e IL-1 α (em concentrações a partir de 100 μ g/mL de polissacarídeo).

Palavras-Chave: fungos filamentosos. atividade enzimática. avaliação TNF- α IL-1 α .

1 Introdução

A parede celular de fungos filamentosos, especialmente os polissacarídeos de parede, tem sido utilizadas em estudos de produção de novos fármacos. (TAKAHASI et al., 2017). As propriedades bioativas dos polissacarídeos extraídos da parede celular de fungos têm sido exploradas pela indústria farmacêutica pelos os efeitos antibacteriano, anticâncer e antiviral (OSINSKA-JAROSZUK et al., 2021). Os polissacarídeos extraídos da parede celular do *Rhizopus microsporus var. oligosporus* possuem propriedades antioxidante e hipoglicemiantes importantes para possíveis aplicações na farmacologia (CEDRO, 2019). Polissacarídeos extraídos de fungos podem inibir a α -amilase, ao impedir a hidrólise de amido em oligossacarídeos e moléculas de glicose, assim, reduzindo os níveis de glicemia (ZHAO et al., 2021).

A inibição enzimática é uma abordagem promissora para a proposição de novos medicamentos. Os inibidores de enzimas geralmente são semelhantes em estrutura molecular aos substratos, ou produtos da enzima (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014). Assim, as pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos podem ser direcionadas mediante a comparação de estruturas conhecidas, como a da acarbose.

Há evidências que o polissacarídeo β -1,3 glucano atua como potente imunomodulador tanto da imunidade inata, quanto adaptativa (SZE & CHAN, 2012). A ativação de macrófagos e o aumento da síntese de citocinas são os principais efeitos dos polissacarídeos na imunomodulação (DUTTAROY, 2021). Polissacarídeos extraídos do fungo *Agaricus blazei* foram avaliados *in vitro* através da estimulação de monócitos em células endoteliais humanas. Foi notado o aumento da produção de IL-8, TNF α , IL-1 β , IL-6 (BERNARDSHAW et al., 2005).

Este estudo buscou avaliar a inibição da enzima α -amilase pelo polissacarídeo β (1,3) β (1,6) glucogalactano extraído da parede celular do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* e sua atividade imunomoduladora.

2 Materiais e Métodos

2.1 Obtenção do microrganismo

O fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* foi cedido pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo

Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil), e foi mantido em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a 4°C.

2.2 Cultivo do microrganismo

O *R. microsporus var. oligosporus* foi cultivado em meio Ágar – batata-dextrose (BDA) por 5 dias à 30°C na estufa incubadora para demanda bioquímica por oxigênio (BOD SL200/90 Incubadora - SOLAB). Após o crescimento, o cultivo se deu de acordo com o método descrito por Chang et al., (2018) por uma solução contendo $1,0 \times 10^7$ esporos/mL em meio líquido, previamente esterilizado a 121°C por 15 min com 10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de extrato de malte diluídos em água destilada, e pH inicial 5,0. O cultivo ocorreu nas condições de 30°C por 120h em agitação constante a 150 rpm em shaker (Incubadora shaker SL 222, SOLAB). Após a filtração a vácuo por filtro, a biomassa foi secada em estufa a 50° e utilizada para extração do polissacarídeo da parede celular fungo foi obtida.

2.3 Extração do polissacarídeo $\beta(1,3)\beta(1,6)$ glucogalactano

O polissacarídeo foi extraído a partir de 1 g da biomassa seca em pó, utilizando 50 mL de hidróxido de sódio ($\text{NaOH } 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$) com pH 13, à temperatura de 120°C, durante 60 min. O volume obtido foi centrifugado (Modelo 206 BL80 EXCELSA) a 8.000 rpm durante 15 min. Após o procedimento, a biomassa foi descartada, e ao sobrenadante obtido foi adicionado álcool etílico absoluto (três vezes o volume inicial). A mistura foi agitada e mantida por 12 horas a 4°C. A suspensão dos polissacarídeos submetida à centrifugação (centrífuga Baby® I Modelo 206-BL FANEM) a 8.000 rpm por 20 min, e o depositado de polissacarídeos foi liofilizado (Liotop K105). O polissacarídeo de *R. microsporus var. oligosporus* foi caracterizado através de Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por Cedro (2019).

2.4 Estudo *in vitro* da inibição enzimática

2.4.1 Atividade de α -amilase na ausência do inibidor

Seguindo a metodologia de Gulati, Harding & Palombo (2012) com modificações, foi realizado o ensaio para a determinação da atividade da α -amilase. Foram utilizados

100 µl de solução de α -amilase pancreática porcina marca Sigma® (2 mg/mL) em tampão fosfato (pH 6,9) e 100 µl de solução de amido da marca Sigma® em diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 e 2 mg/mL). Essa combinação foi incubada por 10 minutos a 50° C, e interrompida, pela adição de 200 µl de reagente DNS (3,5-dinitrosalicílico). Após, a mistura foi incubada novamente por 5 minutos a 100° C. Foram adicionadas 2 mL de água destilada a fim de diluir a mistura reacional. A glicose foi empregada como padrão e a leitura das absorvâncias foi realizada pelo espectrofotômetro a 540 nm.

2.4.2 Atividade de α -amilase na presença do inibidor

Seguindo a metodologia de Gulati, Harding & Palombo (2012) com modificações, foi realizado o ensaio para a determinação da capacidade de inibição da α -amilase. Foram utilizados 100 µl de solução de amido da marca Sigma® nas concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 e 2 mg/mL), 100 µl de solução de α -amilase pancreática porcina marca Sigma® (2 mg/mL) em tampão fosfato (pH 6,9) e 100 µl da amostra de polissacarídeo em diferentes concentrações (0,4, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL). Essa combinação foi incubada por 10 minutos a 50° C, e interrompida, pela adição de 200 µl de reagente DNS (3,5-dinitrosalicílico). Após, a mistura foi incubada novamente por 5 minutos a 100° C. Foram adicionadas 2 mL de água destilada a fim de diluir a mistura reacional. A leitura das absorvâncias foi realizada pelo espectrofotômetro a 540 nm.

2.4.3 Determinação de K_m e V_{max}

A quantidade de enzima necessária para converter uma quantidade fixa de substrato em produto, é conceituada como atividade da enzima (JAIN; GOSWAMI & PANDEY, 2021). A velocidade (V) pode ser descrita pelo modelo Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

V_{max} é a taxa de reação máxima da enzima, [S] é a concentração de substrato, K_m é a constante de Michaelis-Menten onde a concentração de substrato é a metade do V_{max} , indicando a especificidade da enzima, também conhecida como meia-saturação (LIU et al., 2020). O K_m é usado para avaliar a afinidade de uma enzima por seu substrato. O K_m e V_{max} são indicadores importantes da atividade enzimática (ALISSON et al., 2010).

Com o ajuste do modelo de Michaelis-Menten para Lineweaver-Burk, através da inversão dos termos da equação, pôde-se transformar a equação de Michaelis-Menten em expressões do primeiro grau, através dos valores de $1/[S]$ e $1/V$. Dessa forma, por meio dos gráficos de duplo recíproco gerados, o V_{max} e K_m da enzima α -amilase foram obtidos após a medição das atividades enzimáticas na presença do inibidor, o polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano.

2.4.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados de absorbância foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). O Software Graphpad Prism 9.3 foi utilizado para gerar os gráficos de Lineweaver-Burk, o R^2 , bem como calcular a equação da reta.

2.5 Avaliação da atividade imunomoduladora

2.5.1 Submissão do estudo ao Conselho de Ética Animal

Para realização do estudo de atividade imunomoduladora, *in vitro*, com cultura de células obtidas de camundongos, foi obtida a aprovação pelo Conselho de Ética Animal do Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira – UFBA sob parecer nº 077/2019.

2.5.2 Isolamento de macrófagos

Foram injetados 2 mL de triglicolato a 3% no peritônio de camundongos para estimular a migração dos macrófagos. A eutanásia dos animais se deu após 72h, e a fim de obter os macrófagos, foram injetados 5 mL de meio RPMI na cavidade peritoneal. O fluido contendo os macrófagos foi removido através de uma seringa. Este fluido celular foi centrifugado por 8 minutos em 1500 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o pellet contendo as células foi centrifugado novamente por 8 minutos em 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo o antibiótico ciprofloxacino em 50 μ g/mL.

A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer, no qual se obteve uma densidade de 106 células por poço em placas de cultura celular de 24 poços. As culturas foram colocadas em estufa de CO_2 a 37°C por 3 horas. Após a incubação, foi removido o

meio de cultura e as células foram lavadas para eliminar as células não aderidas, como linfócitos e hemácias, permanecendo apenas os macrófagos aderidos. Posterior à lavagem, adicionou-se um novo meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (PBS), contendo o antibiótico ciprofloxacino em 50 µg/mL e as placas foram incubadas novamente em estufa de CO₂ a 37°C até o uso.

2.5.3 Estimulação dos macrófagos por polissacarídeo extraído de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* ou Lipopolissacarídeo (LPS)

Após uma hora de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de soluções de polissacarídeo extraído de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* (25; 50; 100; 200 µg/mL) ou com estimulante lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, que tem como função aumentar a produção de citocinas, como controle positivo sem adição do polissacarídeo. Para o controle negativo, as células foram tratadas com solução tampão fosfato-salino (PBS). O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C por 24 h.

2.5.4 Quantificação de citocinas por ELISA

A IL-1 α e TNF- α foram dosadas através de ensaio de imunofluorescência (ELISA) para detecção das citocinas, conforme protocolo do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, Estados Unidos da América). Os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico Anova-one way e pós teste de Bonferroni (software GraphPad Prism® versão 7.0). Como controle positivo utilizou-se o LPS e como controle negativo, o PBS. Foi considerado como nível de significância estatística o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3 Resultados e Discussão

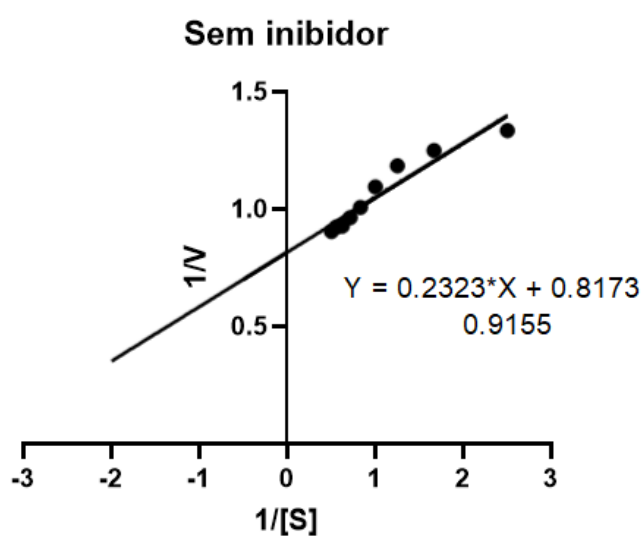
3.1 Estudo *in vitro* da inibição enzimática

A partir do experimento foram obtidas as absorbâncias, e pôde-se calcular os valores de $1/[S]$ e $1/V$, descritos na Tabela 1. Assim, foi construída a curva de Lineweaver-Burk (Figura 1) e conseqüentemente calcular os valores de K_m e V_{max} para a interação entre o amido (substrato) marca Sigma® e a α -amilase (1 mg/mL) marca Sigma®, sem a presença do inibidor (polissacarídeo).

Tabela 1. Valores de $1/[S]$ e $1/V$ usados para construção da curva de Lineweaver-Burk obtidos a partir do ensaio com variação da concentração do substrato na ausência do inibidor.

| Experimento | Substrato (mg/mL) | $1/[S]$ | $1/V$ |
|-------------|-------------------|---------|-------|
| 1 | 0,2 | 5 | ----- |
| 2 | 0,4 | 2,5 | 1,336 |
| 3 | 0,6 | 1,667 | 1,25 |
| 4 | 0,8 | 1,25 | 1,186 |
| 5 | 1 | 1 | 1,095 |
| 6 | 1,2 | 0,833 | 1,008 |
| 7 | 1,4 | 0,714 | 0,964 |
| 8 | 1,6 | 0,625 | 0,928 |
| 9 | 1,8 | 0,556 | 0,923 |
| 10 | 2 | 0,5 | 0,906 |

Figura 1. Gráfico de Lineweaver-Burk relacionando o $1/[S]$, onde S é a concentração do substrato (amido) e $1/V$, onde V é a velocidade da reação em micromols/min na ausência de inibidor (polissacarídeo)



A partir da equação da reta obtida da construção da curva de Lineweaver-Burk, os valores calculados de K_m e V_{max} foram iguais a 0,28mM e 1,22 μ mol/min,

respectivamente. O V_{max} é a maior velocidade de reação da enzima a uma determinada concentração enquanto a diferença no K_m reflete a afinidade de uma enzima por seu substrato (WALLENSTEIN et al., 2011; BAKER; ALLISON, 2017).

Para identificar o tipo de inibição, foi necessário avaliar os valores de K_m com a presença de inibidor, o $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, o qual foi previamente identificado através da extração do polissacarídeo do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, por Cedro (2019).

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos a partir o estudo de inibição enzimática usando polissacarídeo obtido de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, o $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano.

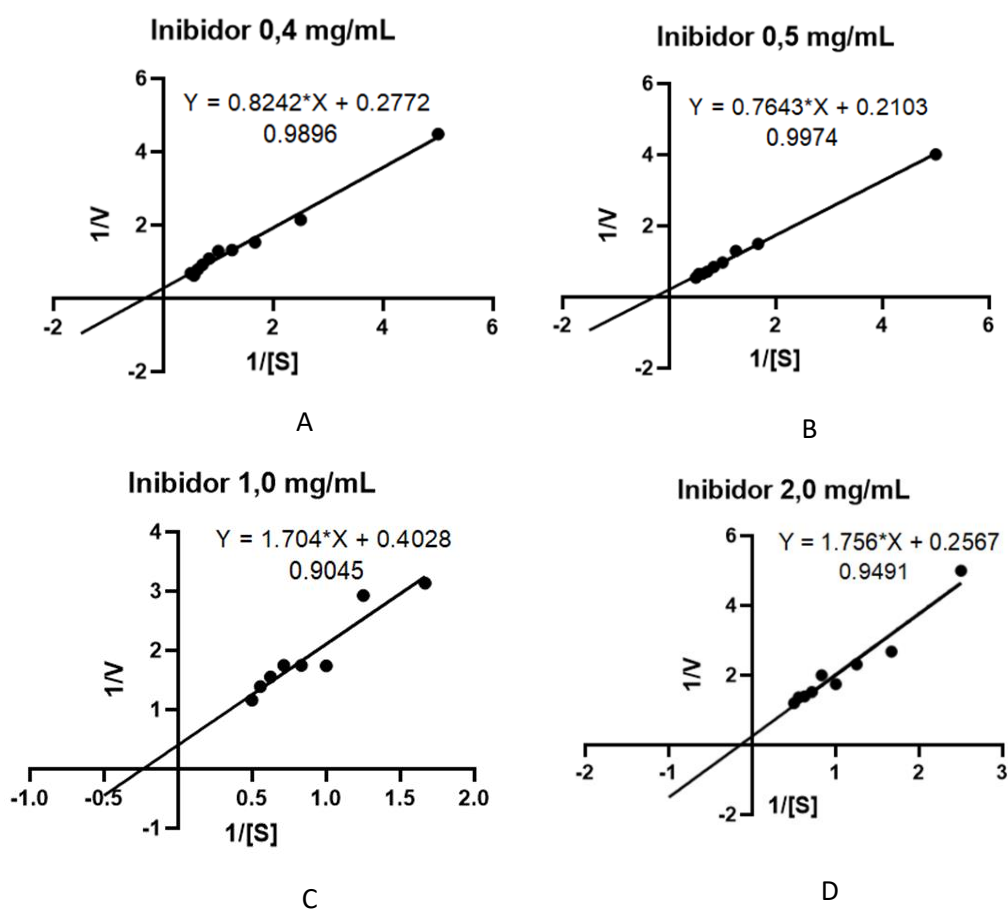
Tabela 2. Valores de [S] e V usados para construção da curva a partir do ensaio com variação da concentração do substrato na presença de inibidor (polissacarídeo). [I] = concentração de inibidor

| [I] 0,4mg/mL | | [I] 0,5mg/mL | | [I] 1,0mg/mL | | [I] 2,0mg/mL | |
|--------------|------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| S | V | S | V | S | V | S | V |
| 0,2 | 0,22 | 0,2 | 0,25 | 0,2 | ----- | 0,2 | ----- |
| 0,4 | 0,46 | 0,4 | ----- | 0,4 | ----- | 0,4 | 0,2 |
| 0,6 | 0,87 | 0,6 | 0,67 | 0,6 | 0,32 | 0,6 | 0,37 |
| 0,8 | 0,75 | 0,8 | 0,77 | 0,8 | 0,34 | 0,8 | 0,43 |
| 1 | 0,77 | 1 | 1,03 | 1 | 0,57 | 1 | 0,57 |
| 1,2 | 0,92 | 1,2 | 1,18 | 1,2 | 0,57 | 1,2 | 0,5 |
| 1,4 | 1,06 | 1,4 | 1,41 | 1,4 | 0,57 | 1,4 | 0,66 |
| 1,6 | 1,28 | 1,6 | 1,54 | 1,6 | 0,64 | 1,6 | 0,71 |
| 1,8 | 1,61 | 1,8 | 1,54 | 1,8 | 0,72 | 1,8 | 0,73 |
| 2,0 | 1,46 | 2,0 | 1,83 | 2,0 | 0,86 | 2,0 | 0,83 |

A partir dos resultados de [S] e V para cada experimento e a determinação da atividade enzimática. Assim, pode-se construir a curva de Michaelis-Menten e a partir dela, obteve-se os gráficos de duplo recíproco.

Utilizando os dados obtidos na Tabela 2, foi analisada a inibição do polissacarídeo extraído de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*. Assim, pôde construir os gráficos de Lineweaver-Burk com os valores de cada concentração de inibidor contido na Figura 2, e a partir dele, obter as equações da reta, as quais foram utilizadas para calcular os valores de K_m para posterior avaliação do tipo de inibição.

Figura 2. Gráficos de Lineweaver-Burk relacionando o $1/[S]$, onde S é a concentração do substrato (amido) e $1/V$, onde V é a velocidade da reação na presença das concentrações de inibidor (polissacarídeo)



Os valores de K_m de cada concentração de inibidor (polissacarídeo) foram calculados através de cada equação da reta gerada pelos gráficos de Lineweaver-Burk, e elaborados segundo a Tabela 3.

Tabela 3. Relação entre a concentração do inibidor (polissacarídeo) e o K_m da enzima α -amilase

| Concentração do inibidor (mg/mL) | K_m (mM) |
|----------------------------------|------------|
| 0 | 0,28 |
| 0,4 | 2,96 |
| 0,5 | 3,62 |
| 1 | 4,22 |
| 2 | 6,83 |

A partir da análise da Tabela 3, pode-se concluir que o polissacarídeo de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano, inibe competitivamente a α -amilase, pois o K_m aumenta à medida que aumenta a concentração do inibidor, demonstrando uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato, devido à competição do sítio de ligação entre o inibidor e o substrato (SILVERSTEIN, 2019). Essa tendência é confirmada quando comparamos os valores de K_m na presença de inibidor em concentrações crescentes. Quando o K_m aumenta na presença do inibidor, podemos concluir que o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, caracterizando uma inibição competitiva.

A formação do complexo Enzima-Inibidor impede a ligação do substrato e, portanto, bloqueia a conversão catalítica do substrato em produto e permite a competição pelo sítio ativo de ligação com a enzima. Os compostos que possuem estruturas semelhantes às dos substratos ou produtos das enzimas alvo, são conhecidos como inibidores reversíveis competitivos. São as drogas inibidoras de enzimas mais comuns e geralmente estabelecem rapidamente os seus equilíbrios de ligação com a enzima. (SILVERMAN, HOLLADAY, 2014).

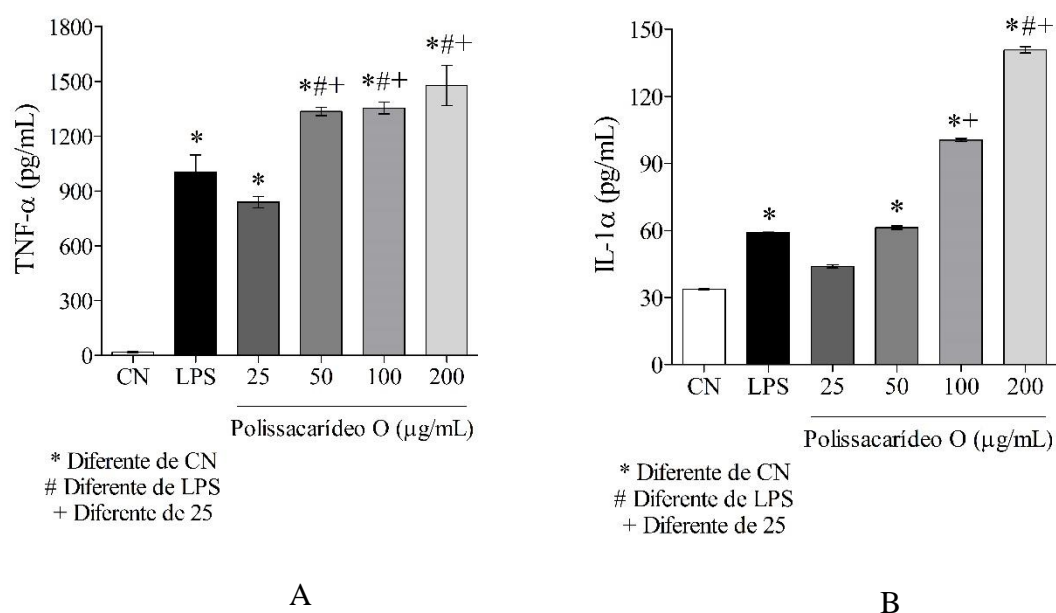
A acarbose é um medicamento utilizado no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2. Assim como o polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano, a acarbose é um inibidor competitivo de enzimas digestivas, como a α -amilase (MATOS; BRANCHTEIN, 2006). Dessa forma, o polissacarídeo inibidor pode ser estudado para o desenvolvimento de um fármaco com atuação sobre a enzima α -amilase.

3.2 Avaliação da atividade imunomoduladora

O polissacarídeo de parede celular de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* foi usado para avaliar o potencial de atividade imunomoduladora em macrófagos. Sob condições basais, os macrófagos produzem baixos níveis dessas citocinas, enquanto que a estimulação com lipopolissacarídeo induz uma alta produção de TNF- α e IL-1 α (TRAVIS et al., 2012). A expressão de citocinas foi alterada nos grupos tratados (Figura 3).

As concentrações a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$ do polissacarídeo de parede de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* foram capazes de aumentar a produção de TNF- α em macrófagos ($p < 0,05$). As concentrações a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ do polissacarídeo de parede de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* foram capazes de aumentar a produção de IL-1 α em macrófagos ($p < 0,05$). No entanto, a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ se igualou estatisticamente ao LPS, o controle positivo ($p > 0,05$).

Figura 3. Expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com polissacarídeo de parede de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). (A) Expressão de TNF- α . (B) Expressão de IL-1 α .



A IL-1 α é expressa em células epiteliais, endoteliais e estromais. Está ligada a processos inflamatórios devido a infecções, nas quais a IL-1 α causa a ativação de NF- κ B

e MAPK, assim aumentando a produção de mediadores pró-inflamatórios, como ciclooxigenase tipo-2 (COX-2), IL-6, e fator de necrose tumoral (TNF) (MALIK & KANNEGANTI, 2018). A IL-1 α é um pirogênio endógeno e suas manifestações fisiológicas envolvem febre e sensibilização a dor (GARLANDA & JAILLON, 2016). A estimulação de linhagens celulares de câncer, como o melanoma A375 com IL-1 α foi responsável por inibir a proliferação celular ao causar a parada do ciclo celular G0-G1 (BAKER; HOUSTON & BRINT, 2019). Dessa forma, a atividade imunomoduladora da citocina IL-1 α pode ser estudada sobre possíveis efeitos antitumorais.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é expressa principalmente por células T macrófagos/monócitos, células Natural Killer (BRIETZKE & KAPCZINSKI, 2008). É uma citocina pró-inflamatória supressora de tumor e promotora de apoptose, atuante na regulação positiva de moléculas de adesão intracelular na superfície de células endoteliais, ao potencializar a resposta Th1 nas reações inflamatórias (SHENG; LI; QIN, 2018, MEHLIS & GORDON, 2013). Em pacientes com disfunções imunológicas, o TNF- α pode atuar como um importante imunomodulador.

Assim, a concentração do polissacarídeo a ser utilizada em estudos deve ser avaliada em relação a citotoxicidade em relação ao aumento dos mediadores pró-inflamatórios, já que a exacerbação de citocinas está relacionado a processos inflamatórios crônicos e ao câncer (APTE et al., 2006).

4 Conclusões

O polissacarídeo extraído da parede celular do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano, inibe competitivamente a α -amilase, sendo demonstrado através dos cálculos das equações das retas geradas pelos gráficos de Lineweaver-Burk. Os valores de K_m aumentaram à medida que as concentrações do polissacarídeo inibidor também aumentaram, isso ocorre devido à competição entre o substrato e inibidor pelo sítio ativo da enzima, reduzindo a afinidade da enzima pelo seu substrato. O polissacarídeo $\beta(1,3)$ $\beta(1,6)$ glucogalactano possui um mecanismo de ação semelhante à acarbose, que é um medicamento utilizado no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2, atuando como inibidor competitivo da enzima α -amilase.

Dessa maneira, este estudo fornece uma base para ensaios de desenvolvimento de um fármaco com atuação na enzima α -amilase. De acordo com o ensaio de avaliação de atividade imunomoduladora *in vitro*, o polissacarídeo é capaz de aumentar a expressão de

citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos, tais quais TNF- α (em concentrações a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polissacarídeo) e IL-1 α (em concentrações a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polissacarídeo). É necessário que se avalie a citotoxicidade destas citocinas.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi conduzida mediante apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e do Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular da UESB (PMBqBM-UESB), que forneceram apoio institucional e financeiro.

CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, foi realizado o ensaio *in silico* para analisar a ligação do polissacarídeo extraído da parede celular do fungo *Rhizopus. microsporus var. oligosporus*, ao sítio ativo da enzima α -amilase. Foi utilizado um inibidor padrão, a acarbose, para comparar as ligações presentes no sítio ativo da enzima, bem como as energias de ligação com o polissacarídeo. Os resultados indicaram semelhanças importantes entre os compostos, viabilizando assim, os estudos *in vitro*.

O ensaio da inibição enzimática do polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano, demonstrou o potencial inibitório do composto sobre a enzima α -amilase. O tipo de inibição encontrada através dos valores de K_m foi competitiva. Os resultados se mostram promissores para testes posteriores.

O polissacarídeo $\beta(1,3) \beta(1,6)$ glucogalactano demonstrou capacidade de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 α e TNF- α em macrófagos murinos, através do ensaio da atividade imunomoduladora do polissacarídeo estudado.

REFERÊNCIAS

ACTOR, J. K. Humoral Immunity. **Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology**, p. 17–24, 2013.

ACTOR, J. K. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. **Introductory Immunology**, p. 1–16, 2019.

ALLISON, S. D.; WALLENSTEIN, M. D., BRADFORD, M. A. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. **Nature Geoscience**, v. 3, p. 336-340, 2010.

ALONSO, H; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, E. JILL. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

ANISMAN, H; HAYLEY, S; KUSNECOV, A. The Immune System. **The Immune System and Mental Health**, p. 37–75, 2018.

APTE, et al The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer metastasis reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2006.

AZZOPARDI, E; LLOYD, C; TEIXEIRA, S. R; CONLAN, R. S; WHITAKER, I. S. Clinical applications of amylase: Novel perspectives. **Surgery**, v. 160, n. 1, p. 26–37, 2016.

BAKER, K. J.; HOUSTON, A; BRINT, E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. **Front. Immunol**, v. 10, 2019.

BALDONI, D. B. **Prospection of chitinolytic fungi and chitinase production in solid state fermentation**. 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

BALFOUR, J. A.; McTAVISH, D. An Update of its Pharmacology and Therapeutic Use in Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 46, p. 1025–1054, 1993.

BAKER, N. R.; ALLISON, S. D. Extracellular enzyme kinetics and thermodynamics along a climate gradient in southern California. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 114, p. 82-92, 2017.

BERMAN, H. M., et al. "The Protein Data Bank." **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERNARDSHAW, S.; HETLAND, G.; ELLERTSEN, L. K.; TRYGGESTAD, A.M.; JOHNSON, E. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells in vitro. **Inflammation**, v. 29, p. 147–153, 2005.

BERRY, M.; FIELDING, B.; GAMIELDIEN, J. Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Docking. **Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology**, p. 487–502, 2015.

BEURA, L. K. et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. **Nature**, v. 532 n. 7600, p. 512–516, 2016.

BIOVIA Dassault Systèmes, **Discovery Studio Modeling Environment**, 2016.

BLANCHARD, N; SALVIONI, A; ROBEY, E. A. Adaptive immunity. **Toxoplasma Gondii**, p.1107–1146, 2020.

BOWMAN, S. M; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

BRIAN, M. Structure and Antioxidant Activity of Extracellular Polysaccharides from Antarctic Marine Filamentous Fungi. **CCAMLR Science**, v. 25, n. 1, p. 49, 2018.

BRIETZKE, E.; KAPCZINSKI, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v.32, p. 1355-1361, 2008.

CAKIR, E; ARICI, M; DURAK, M. Z. Effect of starter culture sourdough prepared with *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* on the quality of hull-less barley-wheat bread, **LWT**, v. 152, n. 112230, 2021.

CASTRO, A. J. G et al. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 121–129, 2014.

CEDRO, Pâmala Évelin Pires. Caracterização e avaliação do potencial antioxidante e hipoglicemiante de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. 80f. 2020. **Dissertação (Mestrado) – Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Jequié, 2019.

CHAKRABORTY, I; SEN, I. K; MONDAL, S; ROUT, D; BHANJA, S. K; MAITY, G. N; MAITY, P. Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 101425, 2010.

CHANG, Y.-H.; CHANG, K. S.; CHEN, C. Y.; HSU, C. L.; CHANG, T. C.; JANG, H. D. Enhancement of the Efficiency of Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* via Gradually Batch-Wise and Fed-Batch Increasing the Glucose Concentration. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 45, 2018.

CHENG, H. N; NEISS, T. G. Solution NMR Spectroscopy of Food Polysaccharides. **Polymer Reviews**, v. 52, n. 2, p. 81–114, 2012.

CHENG, J.J; CHAO, C.H; CHANG, P.C; LU, M.K. Studies on anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from cultivated fungi *Antrodia cinnamomea*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 37–45, 2016.

CHOI, J.; KIM, S.H. A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 35, p. 9391–9396, 2017.

CHOONG, Y.K.; ELLAN, K.; CHEN, X.D.; MOHAMAD, S.A. Extraction and Fractionation of Polysaccharides from a Selected Mushroom Species, *Ganoderma lucidum*: **A Critical Review**. In: Fractionation. [s.l.] IntechOpen, 2018.

DE BARROS, R. et al. Ethanol from rice byproduct using amylases secreted by *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. Enzyme partial purification and characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 266, n. 110591, 2020.

DA CUNHA; M.A.A., ALBORNOZ, S.L.; QUEIROZ SANTOS, V.A.; SÁNCHEZ, W.N.; BARBOSA-DEKKER, A.M.; DEKKER, R.F.H. Structure and Biological Functions of d -Glucans and Their Applications. **Studies in Natural Products Chemistry**, p.309–337, 2017.

DE FRANÇA, Monique Lira. AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO DE BAIXO CUSTO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALFA-AMILASE SALIVAR E ESTRESSE EM INDIVÍDUOS COM LÍQUEN PLANO BUCAL. **Anais dos Seminários de Iniciação Científica**, n. 22, 2018.

DEL CORNÒ, M.; GESSANI, S.; CONTI, L. Shaping the Innate Immune Response by Dietary Glucans: Any Role in the Control of Cancer?. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 155, 2020.

DE MORAES-PINTO, M. I.; SUANO-SOUZA, F.; ARANDA, C. S. Immune system: Development and acquisition of immunological competence. **Jornal de Pediatria**, v. 97, p. 59-66, 2020.

DEY, T. B.; KUMAR, A.; BANERJEE, R.; CHANDNA, P.; KUHAD, R. C. Improvement of microbial α -amylase stability: Strategic approaches. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1380–1390, 2016.

DOLATABADI, S., et al. Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue, **Fungal Biology**, v. 120, n. 3, p. 393–401, 2016.

DU, B.; YANG Y.; BIAN Z.; XU, B. Characterization and Anti-Inflammatory Potential of an Exopolysaccharide from Submerged Mycelial Culture of *Schizophyllum commune*. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 252, 2017.

DUAN, M.; Shang, H.; CHEN, S.; LI, R.; WU, H. Physicochemical properties and activities of comfrey polysaccharides extracted by different techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 876–882, 2018.

DUMLUPINAR, B. Chapter 11 - Immunomodulatory and antiinflammatory activities of terrestrial fungal polysaccharides: A review. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 69, p. 417-440, 2021.

DUTTA, R.C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, p. 1-9, 2002.

DUTTARROY, A. K. Chapter 11 - Polysaccharides and immune function, **Evidence-Based Nutrition and Clinical Evidence of Bioactive Foods in Human Health and Disease**, p. 155-167, 2021.

EHRENBERG. Nova Acta Phys- **Med Acad Caes Leop Carol Nat Cur**, v. 10, n. 198, 1821.

FARAONE, I., et al. Screening of in vitro and in silico α -amylase, α -glucosidase, and lipase inhibitory activity of oxyprenylated natural compounds and semisynthetic derivatives. **Phytochemistry**, v. 187, p. 112781, 2021.

FERREIRA, L.G.; SANTOS, R.N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**. v. 20, n. 7, p.13384-13421, 2015.

FUJISAWA, T.; IKEGAMI, H.; INOUE, K.; KAWABATA, Y.; OGIHARA, T. Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms, **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54, n. 3, p. 387–390, 2005.

FREE S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Adv Genet**, v. 81, p. 33-82, 2013.

GOMES, L. P. et al. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera* L. cv Red Globe) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.

GONG, P. et al (2020). Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. **Carbohydrate Research**, n. 108037, 2020.

GOODMAN, S.R. Cell Biology of the Immune System. **Goodman's Medical Cell Biology**, p. 337–360, 2021.

GOW, N.A.R.; LATGE, J.P.; MUNRO, C.A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiologyspectrum**, 2017.

GRYGANSKYI, A. P. et al. Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus* Species, **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 8, n. 6, p. 2007–2018, 2018.

GULATI, V.; HARDING, I. H.; PALOMBO, E. A. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: Potential application in the management of hyperglycemia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1130, 2012.

HAN, B.Z.; NOUT, M. J. R. Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempeh fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 853–858, 2000.

HANDOYO, T.; MORITA, N. Structural and Functional Properties of Fermented Soybean (Tempeh) by Using *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 2, p. 347–355, 2006.

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of ShapeMatching and Docking as Virtual Screening Tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74–82, 2007.

HERNANDEZ-MOLINA G.; MICHEL-PEREGRINA M. Sjogren's syndrome and pancreatic affection. **Reumatol Clin**, v. 7, p. 130-134, 2011.

HOSEINI, M. H. M et al. Chapter 19 - Immunomodulatory activities of chitin and chitosan microparticles. **Handbook of Chitin and Chitosan**, p. 609-639, 2020.

HOWELL, M.; SHEPHERD, M. The immune system. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.19, n. 10, p. 575-578, 2018.

HU, C-M., et al. Novel cinnamic acid magnolol derivatives as potent α -glucosidase and α -amylase inhibitors: Synthesis, in vitro and in silico studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 116, p. 105291, 2021.

IBRAHIM, A.S et al. Bacterial Endosymbiosis Is Widely Present among Zygomycetes but Does Not Contribute to the Pathogenesis of Mucormycosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, 1, p. 1083–1090, 2008.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **IMUNOBIOLOGIA: o sistema imune na saúde e na doença**. Artmed editora, São Paulo, 5a. edição, 2002.

JANG et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. **Int. J. Mol. Sci**, v. 22, n. 5, p. 2719, 2021.

JENNESSEN, J. et al. Morphological characteristics of sporangiospores of the temperate fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. **Mycological Research**, v. 112, n. 5, p. 547–563, 2008.

JENNESSEN, J. et al. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1833–1840, 2005.

JEUKINK, P. V.; NOGUERA, C. L.; SAVELKOUL, H. F.; WICHERS, H. J. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 8, p. 1124–1133, 2008.

KAGIMURA, A.F.Y.; CUNHAA, 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.

KARIMI, A. et al. Bioactive compounds from by-products of eggplant: Functional properties, potential applications and advances in valorization methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 518–531, 2021.

KATZ, D. A.; GREENBERG, M. T.; JENNINGS, P. A.; Klein, L. C. Associations between the awakening responses of salivary α -amylase and cortisol with self-report indicators of health and wellbeing among educators. **Teaching and Teacher Education**, v. 54, p. 98–106, 2016.

KAZMI, S. R., JUN, R., YU, M. S., JUNG, C., NA, D. In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. **Computers in Biology and Medicine**, v. 106, p. 54–64, 2019.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KOJIĆ, J.R.S.; VRVIĆ, M.M.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.D.; BEŠKOSKI, V.P.; JAKOVLJEVIĆ, D.M. Microbial polysaccharides: Between oil wells, food and drugs. Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. **Food Engineering Series**, p. 313-327, 2016.

KOUR, D. et al. Agriculturally and Industrially Important Fungi: Current Developments and Potential Biotechnological Applications. In: **Data Quality and Trust in Big Data**, p.1–64, 2019.

KESELOWSKY, B. G.; ACHARYA, A.; LEWIS, J. S. Innate and Adaptive Immunity. **Biomaterials Science**, p. 747–776, 2020.

KUMAR, A. 3 - Host immunity and immunomodulation, Developments in Immunology, Visceral Leishmaniasis, **Academic Press**, p. 25-33, 2021.

LATGÉ, J.P.; BEAUVAIS, A.; CHAMILOS, G. The cellwall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, organization, immune response, and virulence. **Annualreview of microbiology**, v. 71, n. 1, 2017.

LEE, C. K. Immunomodulatory activity. **New Perspectives on Aloe**. Springer, Boston, MA, 2006.

LEVETIN, E.; HORNER, W. E.; SCOTT, J. A. Taxonomy of Allergenic Fungi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 3, p. 375-385, 2016.

LI, S. et al. 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.

LI, X.; BAI, Y., JIN, Z.; SVENSSON, B. Food-derived non-phenolic α -amylase and α -glucosidase inhibitors for controlling starch digestion rate and guiding diabetes-friendly recipes, **LWT**, v. 153, n. 112455, 2021.

LIPINSKI, C. A., et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, Q. et al. Characterization of Polysaccharides with Antioxidant and Hepatoprotective Activities from the Wild Edible Mushroom *Russula vinosa* Lindblad. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 35, p. 8858–8866, 2014.

LIU, J.; WILLFOR, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 31–61, 2015.

LIU, W. et al. Nonlinear responses of the V and K of hydrolytic and polyphenol oxidative enzymes to nitrogen enrichment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 141, n. 107656, 2020.

LV, Q. Q.; CAO, J. J.; LIU, R.; CHEN, H. Q. Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from wheat bran. **Food chemistry**, v. 341, Pt. 1, n. 128218, 2021.

MA, L. J. et al. Genomic Analysis of the Basal Lineage Fungus *Rhizopus oryzae* Reveals a Whole-Genome Duplication. **PLoS Genet**, v. 5, n. 7, e1000549, 2009.

MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 605-610, 2004.

MAJEE, S.B.; AVLANI, D.; BISWAS, G.R. Rheological Behavior and Pharmaceutical Applications of Bacterial Exopolysaccharides. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 9, p. 224-232, 2017.

MALIK, A.; KANNEGANTI, T. D. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 124–137, 2018.

MATOS, M. C. G; BRANCHTEIN, L. O uso de antidiabéticos orais no paciente com diabetes mellitus e doença cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n. 08, p. 1-4, 2006.

MAUGERI FILHO, F.; GOLDBECK, R. Produção de polissacarídeos. **Biotechnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 219, 2019.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819-826, 2007.

MEHLIS, S.; GORDON, K. B. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors. **Biological Therapeutics**, v. 3, p. 307-318, 2013.

MENG, J.; MAKELA, M. R.; DE VRIES, R. P. Molecular engineering to improve lignocellulosic biomass based applications using filamentous fungi. **Advances in applied microbiology**, v. 114, p. 73–109, 2021.

MINGYI, Y. et al. Trends of utilizing mushroom polysaccharides (MPs) as potent nutraceutical components in food and medicine: A comprehensive review, **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 94-110, 2019.

MONEY, P.M. Chapter 12 - Fungi and Biotechnology, *The Fungi* (Third Edition), **Academic Press**, p. 401-424, 2016.

NAGY, L.; TÓTH, R.; KISS, E.; SLOT, J.; GÁCSEK, A. Six Key Traits of Fungi: Their Evolutionary Origins and Genetic Bases. **The Fungal Kingdom**, p. 35-56, 2017.

NANDI, A. K. et al. Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 774–782, 2014.

NEDOVIC, V. et al. **Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food**, p.313–327, 2016.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Six edition. **W.H. Freeman and Co. Ltd.** p. 1271, 2017.

OBOH, G., et al. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 627–634, 2016.

OJEDA, J.J.; DITTRICH, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. In: *Microbial Systems Biology*. **Humana Press**, p. 187-211, 2012.

OSINSKA-JAROSZUK, M.; SULEJ, J.; JASZEK, M.; JAROSZUK-SCIESEL, J. Applications of Fungal Polysaccharides. **Encyclopedia of Mycology**, v.2, p. 623-628, 2021.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PINHO, J.M Rodrigues. **TESE - Mapeamento dos subsídios de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis pv. citri* envolvidos na interação com o substrato**. São Paulo, p. 107, 2004.

PRAKASH, H.; CHAKRABARTI, A. Global Epidemiology of Mucormycosis. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 26, 2019.

RAGHUKUMAR, S. Fungi: Characteristics and Classification. **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems**, p. 1–15, 2017.

RAJAGOPALAN, G., KRISHNAN, C. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044–3050, 2008.

REID, G.; LYNCH, J. P.; FISHBEIN, M. C.; CLARK, N. M. Mucormycosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 41, n. 1, p. 99–114, 2020.

REDDY, N. S et al. An overview of the microbial $\hat{\pm}$ -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 645-648, 2003.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.

RODRIGUES, R. P., et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-736, 2012.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R., IACOMINI, M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 358–375, 2016.

RUIZ-HERRERA, J.; ELORZA, M. V.; VALENTIN, E.; SENTANDRELEU, R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 14–29, 2006.

SALEEM, F., et al. Dicyanoanilines as potential and dual inhibitors of α -amylase and α -glucosidase enzymes: Synthesis, characterization, in vitro, in silico, and kinetics studies. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 103651, 2022.

SAMUELSEN, A. B.; SCHREZENMEIER, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. *Molecular nutrition & food research*, v. 58, n. 1, p. 183–193, 2014.

SANTOS, I. R., et al. Production and characterization of amylase obtained from *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-13, 2020.

SANNER, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **J Mol Graphics Mod**, v. 17, p. 57-61, 1999.

SARAVANAKUMAR, K., et al. Isolation of Polysaccharides from *Trichoderma harzianum* with Antioxidant, Anticancer, and Enzyme Inhibition Properties. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1372, 2021.

SHENG, Y.; LI, F.; QIN, Z. TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. 1170, p. 1-9, 2018.

SHITYAKOV, S.; FOERSTER, C. In silico structure-based screening of versatile P-glycoprotein inhibitors using polynomial empirical scoring functions. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, p. 1-9, 2014.

SILAKARI, O.; SINGH, P. K. Chapter 6 - Molecular docking analysis: Basic technique to predict drug-receptor interactions. Concepts and Experimental Protocols of Modelling and Informatics in Drug Design, **Academic Press**, p. 131-155, 2021.

SILVA, H. C. G. Triagem virtual de compostos provenientes de plantas da biodiversidade brasileira, com potencial atividade inibitória das enzimas alfa-amilase, alfa-glicosidase humanas. 2017. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2017.

SILVERMAN, R. B.; HOLLDADAY, W. W. Enzyme Inhibition and Inactivation. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**, p. 207–274, 2014.

SILVERSTEIN, T. P. When both K_m and V_{max} are altered, Is the enzyme inhibited or activated? **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 47, n. 4, p. 446-449, 2019.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α -Amylases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 3–24, 2017.

SINGH, A. K.; SINGH, R.; JOSHI, S. R.; MISRA, A. Mucormycosis in COVID-19: A systematic review of cases reported worldwide and in India. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 15, n. 4, p. 102146, 2021.

SKIADA, A. et al. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis, **Medical Mycology**, v. 56, p. 93–101, 2018.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química, **Editora LTC**, 2007.

SONG, E. H.; SHANG, J.; RATNER, D. M. Polysaccharides. **Polymer Science: A Comprehensive Reference**, p. 137–155, 2012.

SOUZA, P. M. M.; de OLIVEIRA, P. Application of microbial α -amylase in industry - A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

STOJKOVIC, D., et al. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 100-103, 2019.

STONE, B. A. Chemistry of β -Glucans. Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides, **Academic Press**, p. 5–46, 2009.

SUN, L. et al. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. **Redox Biology**, v. 37, p. 101759, 2020.

STEINBERG, W. et al. LEADER 3-lipase and amylase activity in subjects with type 2 diabetes. **Pancreas**; v. 43, p. 1223-1231, 2014.

SZE, D. M.; CHAN, G. F. Effects of Beta-Glucans on Different Immune Cell Populations and Cancers. **Advances in Botanical Research**, V. 62, p-179-196, 2012.

TAKAHASHI, J. A., et al. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAVARES, L. C.; QSAR: a abordagem de hansch, **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TIZARD, I. R. Imunologia básica – uma introdução. **Roca Ltda**, São Paulo, 5^o edição, 147-159, 1998.

TRAVÉS, P.G. et al. Relevance of the MEK/ERK Signaling Pathway in the Metabolism of Activated Macrophages: A Metabolomic Approach. **J. Immunol.**, v. 188, p. 1402-1410, 2012.

TROTT, O., OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TOURNAS, V. H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Crit. Rev. Microbiol**, v. 31, p. 33–44, 2005.

VALASQUES JUNIOR, G. L. et al. The extraction and characterisation of a polysaccharide from *Moniliophthora perniciosa* CCMB 0257. **Natural Product Research**, v. 31, n. 14, p. 1647-1654, 2017.

VALVERDE, M. E.; HERNANDEZ-PEREZ, T.; PAREDES-LOPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem**, v. 45, n. 12, p. 2615 – 2623, 2002.

WALLENSTEIN, et al M. D. Controls on the temperature sensitivity of soil enzymes: A key driver of In Situ enzyme activity rates. **Soil Biology, Springer, Berlin, Heidelberg**, v. 22, p. 245-258, 2011.

WANG, J.; YUAN, Y.; YUE, T. Immunostimulatory activities of β -d-glucan from Ganoderma Lucidum. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 47–54, 2014.

WANG, T.; LI, C.Q.; ZHANG, H.; LI, J.W. Response surface optimized extraction of 1-deoxynojirimycin from mulberry leaves (*Morus alba* L.) and preparative separation with resins. **Molecules**, v. 19, n. 7040, 2014.

WANG, W. et al. Suppression of Tumor Growth by *Pleurotus ferulae* Ethanol Extract through Induction of Cell Apoptosis, and Inhibition of Cell Proliferation and Migration. **PLOS ONE**, v. 9, n., e102673, 2014.

WANG, Q.; WANG, F.; XU, Z.; DING, Z. Bioactive Mushroom Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 955, 2017.

WANG, Z. Q.; ZHU, C. X.; DAI, A. R.; CHEN, L.; YOU, C. P.; ZHANG, B. B. Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Cell Wall Polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* mycelia. **Food Bioscience**, n. 41, p. 100932, 2021.

WEN, Y.; OH, J. K. Recent strategies to develop polysaccharide-based nanomaterials for biomedical applications. **Macromol. Rapid Commun**, v. 35, p. 1819–1832, 2014.

WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human Pancreatic Digestive Enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 1, p. 1–17, 2007.

WONG, K. H.; LAI, C. K. M.; CHEUNG, P. C. K. Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides. **Food hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 150-158, 2011.

WOSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, p. 65–70, 2019.

WOUK, J. et al. β -Glucans as a panacea for a healthy heart? Their roles in preventing and treating cardiovascular diseases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 176-203, 2021.

XIE, J. H., JIN, M. L., MORRIS, G. A., ZHA, X. Q., CHEN, H. Q., YI, Y., et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. S60–S84, 2016.

XU, Y. et al. Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 970-977, 2019.

YAN, J. K.; MA, H. L.; PEI, J. J.; WANG, Z. B.; WU, J. Y. Facile and effective separation of polysaccharides and proteins from *Cordyceps sinensis* mycelia by ionic liquid aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 135, p. 278-284, 2014.

YANAI, K. et al. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 22, p. 7398-7406, 1992.

YANG, M et al. Study on the structure characterization and moisturizing effect of Tremella polysaccharide fermented from GCMCC5.39. **Food Science and Human Wellness**, v. 10, n. 4, p. 471–479, 2021.

YU, Y.; SHEN, M.; SONG, Q.; XIE, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, n. 183, p. 91-101, 2018.

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. The characteristics and classification of fungi and bacteria. **Wood Microbiology**, p. 55–98, 2020.

ZHANG, Y. et al. Antidiabetic effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 126–132, 2016.

ZHANG, Y. et al. Healthy function and high valued utilization of edible fungi. **Food Science and Human Wellness**, v. 10, n. 4, p. 408-420, 2021.

ZHAO, M. et al. Characterization of selenized polysaccharides from *Ribes nigrum* L. and its inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase. **Carbohydrate Polymers**, v. 259, n. 117729, 2021.

ZHENG, R. Y.; CHEN, G. Q.; HUANG, H; LIU, X. Y. **A Monograph of *Rhizopus* – *Sydowia***. Chinese Academy of Sciences, v. 59, n. 2, p. 273-372, 2007.

ZHU, Z.Y., et al. Comparative evaluation of polysaccharides isolated from Astragalus, oyster mushroom, and yacon as inhibitors of α -glucosidase. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 4, p. 290–293, 2014.