



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



TÁTILLA PUTUMUJÚ SANTANA MENDES

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS
FILAMENTOSOS**

**JEQUIÉ-BA
AGOSTO-2018**

TÁTILLA PUTUMUJÚ SANTANA MENDES

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS
FILAMENTOSOS**

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

Orientador: Gildomar Lima Valasques Júnior

Co-orientador: Helena Bonciani Nader

**JEQUIÉ-BA
AGOSTO-2018**

M538c MENDES, Tátilla Putumujú Santana.

Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de polissacarídeos de fungos filamentosos / Tátilla Putumujú Santana Mendes.- Jequié, 2018.

99f.

(Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob orientação do Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior e co-orientadora Profa. Dra. Helena Bonciani Nader)

1.Penicillium camembertii 2.Penicillium roquefortii 3.Aspergillus niger

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO


TÁTILLA PUTUMUJÚ SANTANA MENDES

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

03 de AGOSTO de 2018.

Comissão Examinadora:



Dr. Gilsonar Lima Vasques Júnior
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



Dr. Marcos de Almeida Bezerra
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



Dr. José Roberto Meyer Fernandes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente Deus, sempre, pela graça da vida, e por ter ajudado a manter a fé nos momentos mais difíceis, em que a vontade era de desistir.

Aos meus pais e irmã, minha eterna gratidão, vocês são minha base.

À minha amiga e colega Gleiza Moreira, por ser minha grande incentivadora estando presente nesses últimos meses tão difíceis.

Aos companheiros de laboratório Romário, Gabriel e Maísla que participaram da execução dos experimentos e foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Gildomar Valasques, pela orientação, compreensão e incentivos constantes prestados durante toda essa caminhada desde a graduação. À professora Helena Nader pela atenção e disponibilidade.

Aos colegas Dani (*in memoriam*) e Moabe (*in memoriam*), que sempre serão lembrados com carinho, e que, com certeza, estavam presentes em pensamento durante toda essa jornada.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo suporte acadêmico e financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos vocês, dedico meu trabalho, pois sem a ajuda, confiança e compreensão de todos, este sonho não teria se realizado. Muito obrigada por tudo!

RESUMO

MENDES, Tátilla Putumujú Santana. **Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de polissacarídeos de fungos filamentosos.** 99 f. 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2018.

Os biopolímeros têm sido objeto de intensos estudos, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores, além de sua importância econômica. Polissacarídeos, especialmente os extraídos de fungos, vêm mostrando diversas bioatividades. Vários estudos têm evidenciado a propriedade biológica antioxidante desses polissacarídeos. Sendo assim, esse trabalho tem o propósito de extrair, purificar e caracterizar polissacarídeos de parede celular dos fungos *Penicillium camembertii* ATCC 4845, *Penicillium roquefortii* ATCC 10110 e *Aspergillus niger* ATCC 1004, e investigar seu potencial biotecnológico, no tocante à capacidade de redução de radicais livres e atividade antioxidante “*in vitro*”. As melhores condições de pH, temperatura e tempo de extração foram obtidas, aplicando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Os polissacarídeos extraídos desses três fungos foram submetidos à análise estrutural utilizando Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformata de Fourier (FT-IV), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Deste modo, os polissacarídeos foram adequadamente caracterizados, suas composições monoméricas identificadas e quantificadas, bem como os tipos de ligações glicosídicas. Os ensaios de atividade antioxidante demonstraram que os polissacarídeos extraídos da parede celular desses fungos tiveram potencial habilidade de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Assim, esses microrganismos mostraram ser uma fonte promissora para obtenção de polissacarídeos com potencial atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Penicillium camembertii*. *Penicillium roquefortii*. *Aspergillus niger*. metodologia de superfície resposta. radicais livres.

ABSTRACT

MENDES, Tátilla Putumujú Santana. **Characterization and evaluation of the antioxidant activity of filamentous fungi polysaccharides.** 99 f. 2018. Master's Thesis- Multicentric Program in Biochemistry and Molecular Biology, PMBqBM, State University of Southwest of Bahia, Jequié, 2018.

The biopolymers have intensively been studied, considering their potential of application in different areas and their economic importance. Polysaccharides, especially those extracted from fungi, have several bioactivities. Several studies have demonstrated the antioxidant properties of these polysaccharides. The aim of this work is to extract, purify and characterize the cell wall of polysaccharides from the fungi *Penicillium camembertii* ATCC 4845, *Penicillium roquefortii* ATCC 10110 and *Aspergillus niger* ATCC 1004, additionally, the studied aimed to investigate their biotechnological potential in relation to their ability in reducing free radicals than its antioxidant activities "in vitro". The best conditions of pH, temperature and time of extraction were obtained applying the Response Surface Methodology (RSM). The polysaccharides extracted from these three fungi were submitted to structural analysis using Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT_IR), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance (RMN). This way, the polysaccharides were properly characterized, their monomer compositions were identified and quantified, as well as their types of glycosidic bonds. The antioxidant activity assays demonstrated that the cell wall of the polysaccharides extracted from these fungi had a potential to free radical-scavenging assay of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6 (ABTS). Therefore, these microorganisms have shown to be a promising source to obtain polysaccharides capable with potential antioxidant activity.

Keywords: *Penicillium camembertii*. *Penicillium roquefortii*. *Aspergillus niger*. surface response methodology. free radicals.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
CAPITULO I.....	4
Referencial Teórico	4
1 Fungos.....	5
1.1 Biologia dos fungos.....	5
1.2 Parede Celular Fúngica	6
1.3 Fungos do gênero <i>Penicillium</i> : aspectos gerais.....	8
1.3.1 <i>Penicillium camemberti</i>	9
1.3.2 <i>Penicillium roqueforti</i>	10
1.4 Fungos do gênero <i>Aspergillus</i> : aspectos gerais.....	11
1.4.1 <i>Aspergillus niger</i>	12
2 Polissacarídeos: classificação e propriedades	14
3 Caracterização química de polissacarídeos.....	15
4. Atividade antioxidante	18
CAPITULO II.....	20
Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo de <i>Penicillium camembertii</i> ATCC 4845	20
RESUMO.....	21
1 Introdução	21
2 Materiais e Métodos.....	23
2.1 Microrganismo	23
2.2 Condições de cultura de <i>P. camembertii</i> ATCC 4845	23
2.3 Extração de polissacarídeo de <i>P. camembertii</i> ATCC 4845	23
2.4 Planejamento experimental	23
2.5 Determinação da proteína total na amostra	24
2.6 Purificação do polissacarídeo	24
2.7 Caracterização química do polissacarídeo	24
2.7.1 Análise de espectroscopia no infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear ...	24
2.7.2 O peso molecular médio (MWn) e grau de polimerização (DPn).....	24
2.7.2 Composição monomérica do polissacarídeo	25
2.8 Avaliação da atividade antioxidante	25
2.7 Análise estatística.....	26

3 Resultados e Discussão	26
3.1. Extração de polissacarídeos	26
3.2 Determinação da concentração de proteínas	29
3.3 Purificação do polissacarídeo	29
3.4 Caracterização do polissacarídeo obtido de <i>P. camembertii</i> ATCC 4845	30
3.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	30
3.4.2 Análise da composição monomérica	31
3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	33
3.5 Atividade Antioxidante	33
4 Conclusão	35
CAPITULO III	37
Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo de <i>Penicillium roquefortii</i> ATCC 10110	37
RESUMO	38
1 Introdução	38
2 Materiais e Métodos	40
2.1 Microrganismo	40
2.2 Condições de cultura de <i>P. roquefortii</i> ATCC 10110	40
2.3 Extração de polissacarídeo de <i>P. roquefortii</i> ATCC 10110	40
2.4 Planejamento experimental	41
2.5 Determinação da proteína total na amostra	41
2.6 Purificação do polissacarídeo	41
2.7 Caracterização química do polissacarídeo	41
2.7.1 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear	41
2.7.2 O peso molecular médio (MWn) e grau de polimerização (DPn)	42
2.7.2 Composição monomérica do polissacarídeo	42
2.8 Avaliação da atividade antioxidante	42
3 Resultados e Discussão	43
3.1. Extração de polissacarídeos	43
3.2 Determinação da concentração de proteína	46
3.3 Purificação do polissacarídeo	46
3.4 Caracterização do polissacarídeo de <i>P. roquefortii</i> ATCC 10110	47
3.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IV)	47
3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	49
3.5 Atividade Antioxidante	50

5 Conclusão.....	53
CAPITULO IV	54
RESUMO.....	55
1 Introdução	55
2 Materiais e métodos	57
2.1 Microrganismo	57
2.2 Condições de cultivo de <i>A. niger</i>	57
2.3 Extração de polissacarídeo de <i>A. niger</i>	57
2.4 Design experimental.....	57
2.5 O peso molecular médio (MWn) e grau de polimerização (DPn).....	58
2.6 Determinação da concentração de proteína.....	58
2.7 Purificação do polissacarídeo.....	58
2.8 Caracterização química do polissacarídeo	58
2.8.1 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	58
2.8.2 Composição monomérica do polissacarídeo	59
2.9 Avaliação da capacidade antioxidante	59
3 Resultados e Discussão	60
3.1. Extração de polissacarídeos	60
3.2 Determinação da concentração de proteína.....	62
3.3 Purificação do polissacarídeo.....	63
3.4 Caracterização química do polissacarídeo de <i>A. niger</i>	63
3.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IV)	63
3.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	65
3.4.3 Análise da composição monomérica.....	67
3.5 Atividade Antioxidante	68
4 Conclusão.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
4. CONCLUSÃO GERAL	85

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-sulfônico
pH:	Potencial hidrogeniônico
RMN:	Ressonância magnética nuclear
DPPH:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FT-IR:	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DP_n:	Grau de Polimerização
MW_n:	Peso molecular
TFA:	Ácido trifluoracético
EC₅₀	Concentração na qual a substância induz uma resposta de 50% após tempo especificado de exposição
EPS	Exopolissacarídeo
GRAS	Geralmente reconhecido como Seguro (do inglês GRAS)
FDA	Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (do inglês FDA)
ERO	Espécies reativas de oxigênio

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Micélios do fungo *Penicillium camemberti* ATCC 4845 crescido em Ágar batata glicose à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 9
- Figura 2.** Micélios do fungo *Penicillium roquefortii* ATCC 10110 crescido em Ágar batata glicose à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 10
- Figura 3.** Micélios do fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004 crescido em Ágar batata glicose à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 13

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Gráficos de superfície de resposta para otimização da extração de polissacarídeos de *P. camembertii* ATCC 4845. (A): Temperatura e pH. (B): Tempo e pH. (C): Tempo e Temperatura. 28
- Figura 2.** Perfil de eluição do polissacarídeo no Sephadex G-100 tampão fosfato citrato de sódio (pH 7,0). 30
- Figura 3.** Espectro FT-IR do polissacarídeo produzido pelo *P. camembertii* ATCC 4845. 31
- Figura 4.** Cromatograma HPLC-RI da composição monomérica de *P. camembertii* ATCC 4845. 32
- Figura 5.** Espectro HSQC de polissacarídeo do *P. camembertii* ATCC 4845. 33
- Figura 6.** Capacidade de sequestro do radical livre DPPH (%) de polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. camembertii* ATCC 4845. 34
- Figura 7.** Capacidade de sequestro do radical livre ABTS (%) de polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. camembertii* ATCC 4845. 34

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Gráficos de superfície de resposta para otimização da extração de polissacarídeos de *P. roquefortii* ATCC 10110. (A): Tempo e Temperatura. (B): pH e temperatura. (C): pH e tempo. 46

- Figura 2.** Perfil de eluição do polissacarídeo no Sephadex G-100 tampão fosfato citrato de sódio (pH 7,0). 45
- Figura 3.** Espectro FT-IR do polissacarídeo produzido a partir do *P. roquefortii* ATCC 10110. 48
- Figura 4.** Cromatograma CLAE-RI da composição monomérica de *P. roquefortii* ATCC 10110 49
- Figura 5.** Espectro HSQC de polissacarídeo do *P. roquefortii* ATCC 10110. 50
- Figura 6.** Atividade antioxidante do polissacarídeo isolado do fungo filamentoso *P. roquefortii* ATCC 10110 frente ao radical livre de DPPH (%). 51
- Figura 7.** Capacidade de eliminação do radical ABTS (%) por polissacarídeo isolado do fungo filamentoso *P. roquefortii* ATCC 10110. 52

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Influência do tempo e do pH na extração de polissacarídeos obtidos de *A. niger*. 61
- Figura 2.** Perfil de eluição do polissacarídeo no Sephadex G-100 tampão fosfato citrato de sódio (pH 7,0). 63
- Figura 3.** Espectro de polissacarídeo FT-IR produzido a partir de *A. niger*. 64
- Figura 4.** Espectros de RMN de ^1H de polissacarídeo de *A. niger*. 65
- Figura 5.** Espectros de RMN ^{13}C do polissacarídeo de *A. niger*. 66
- Figura 6.** Cromatograma CLAE-RI da composição monomérica de *A. niger* ATCC 1004. 67
- Figura 7.** Curva de atividade antioxidante de polissacarídeo obtido de *A. niger* usando DPPH e controle positivo com Vitamina C. 68
- Figura 8.** Curva de atividade antioxidante de polissacarídeo de *A. niger* usando ABTS e controle positivo com Vitamina C. 69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Planejamento Box-Behnken com valores de rendimento dos polissacarídeos(g). 26

Tabela 2. Análise de variâncias no modelo de regressão para otimização de polissacarídeos obtidos do *P. camembertii* ATCC 4845 27

Tabela 3. Valores de EC₅₀ para polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. camembertii* ATCC 4845 para propriedades antioxidantes. 35

CAPÍTULO III

Tabela 1. Delineamento Box-Behnken aplicado para otimização das condições de extração de polissacarídeos de *P. roquefortii* ATCC 10110 44

Tabela 2. Análise de variâncias no modelo de regressão para otimização de polissacarídeos obtidos do *P. roquefortii* ATCC 10110 45

Tabela 3. Valores de EC₅₀ para polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. roquefortii* ATCC 10110 em propriedades antioxidantes. 52

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Planejamento experimental de três fatoriais de três níveis aplicados na determinação do tempo ótimo e pH da extração de polissacarídeos de *A. niger*. 60

Tabela 2. Análise de Variância (ANOVA) aplicada à otimização de tempo e pH de polissacarídeos obtidos de *A. niger*. 62

Tabela 3. Valores de EC₅₀ para polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *A. niger* ATCC 1004 em propriedades antioxidantes. 70

1 INTRODUÇÃO

Com a grande tendência de introduzir substâncias naturais em terapias humanas, os fungos são importantes como fonte natural para obtenção de substâncias biologicamente ativas (VALASQUES JUNIOR et al., 2017). Podem ser encontrados em quase todos os lugares da natureza mostrando adaptação a uma variedade de ambientes diferentes (STÜBIGER et al., 2016), o que facilita sua obtenção e cultivo. A biomassa fúngica é explorada comercialmente com intuito de isolar componentes celulares de interesse biotecnológico, a exemplo de enzimas (invertases, glucosidases), nucleotídeos, lipídeos (fosfolipídeos e ergosterol), proteínas (manoproteínas) e polissacarídeos (glucanas, mananas e galactanas) (KAORI FUKUDA et al., 2009).

A aplicação de polímeros ganhou maior visibilidade nas últimas décadas em diversos setores (BORDENAVE, JANASWAMY & YAO, 2014). Polissacarídeos são biopolímeros formados a partir de várias unidades de monossacarídeos unidos através de ligações glicosídicas (MAHAPATRA & BANERJEE, 2013), amplamente encontrados em microrganismos, células animais e vegetais (WANG, et al., 2017). Nos microrganismos, os polissacarídeos podem ser obtidos de diferentes locais da célula (exopolissacarídeos, endopolissacarídeos e os de parede celular) (MAHAPATRA & BANERJEE, 2013). Possuem alto potencial de aplicação biotecnológica, o que tem impulsionado intensa pesquisa (VALASQUES JUNIOR, et al., 2014). No setor médico-farmacêutico essas macromoléculas demonstram várias bioatividades, incluindo atividade antitumoral (SHARMA, KHANNA & KAPOOR, 2016; YU et al., 2017), efeitos imunomoduladores (KAORI FUKUDA et al., 2009; SHARMA, KHANNA & KAPOOR., 2016), anti-inflamatória (CHENG et al., 2016; DU et al., 2015) e antioxidante (WANG et al., 2017; TIAN et al., 2016) com forte habilidade de redução de radicais livres. Assim, muitos polissacarídeos estão sendo explorados com objetivo no desenvolvimento de medicamentos eficazes e seguros (WANG et al., 2017).

O *Penicillium* é um gênero de fungos ascomicetos que possui grande potencial para uso em várias aplicações ambientais, biotecnológicas e industriais (YADAV et al., 2017). Chen et al. (2013) investigaram o polissacarídeo (Ps1-1) extracelular isolado de *Penicillium griseofulvum*, caracterizado como galactomanana contendo galactofuranose. Em outro estudo, três polissacarídeos do fungo *Penicillium* sp. foram isolados e caracterizados, sendo principalmente constituídos por manose e quantidades variáveis de glicose e galactose, e potencial propriedades antioxidantes (SUN et al., 2009).

Dentre os fungos pertencentes a este gênero, um destaque para duas espécies: *P. camemberti* e *P. roqueforti* que desempenham um papel fundamental no processo de maturação de alguns tipos de queijos. Na fabricação do queijo, estes fungos garantem uma rápida colonização, o que é crucial para a maturação, assegurando que não haja a contaminação por outros microrganismos. Além disso, certificam as características sensoriais do queijo, a exemplo do aroma (LE DRÉAN et al., 2010). Entretanto, até o momento, nenhum estudo foi relatado em relação à atividade antioxidante de polissacarídeos isolados dessas duas espécies do gênero *Penicillium*.

O gênero *Aspergillus* é um dos principais representantes dos fungos filamentosos. Em particular, *A. niger* é uma espécie conhecida de valor comercial substancial (BENOIT-GELBER et al., 2017). Encontrada em diversos ambientes em todos os continentes, tem um estilo de vida saprófito (SEGERS et al., 2016) além de crescer em uma ampla gama de pHs e temperaturas (KRIJGSHELD et al., 2013). Wang et al. (2013) em estudo com *Aspergillus terreus* obtiveram um polissacarídeo extracelular (YSS) composto principalmente de manose e galactose, com boa capacidade antioxidante, especialmente de eliminação de radicais de 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH).

Diante das perspectivas decorrentes da biotecnologia de microrganismos na busca de novas substâncias que possuam bioatividade para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, o presente estudo propôs avaliar a extração, purificação, caracterização química e atividade antioxidante de polissacarídeos da parede celular das espécies dos fungos filamentosos *P. camembertii* ATCC 4845, *P. roquefortii* ATCC 10110 e *A. niger* ATCC 1004. As otimizações das extrações foram realizadas utilizando o delineamento experimental Box-Behnken (BOX & BEHNKEN, 1960) para os fungos do gênero *Penicillium*, e o planejamento Fatorial de Três Níveis (BEZERRA et al., 2008) para o gênero *Aspergillus*. As purificações foram realizadas pelo método de cromatografia por exclusão molecular. Para a caracterização química foram realizados métodos de Espectroscopia no infravermelho (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de eliminação dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a extração, purificar, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante de polissacarídeos de parede celular isolados de fungos filamentosos *Penicillium camembertii* ATCC 4845, *Penicillium roquefortii* ATCC 10110 e *Aspergillus niger* ATCC 1004.

2.2 Objetivos Específicos

Produzir biomassa dos fungos *P. camembertii* ATCC 4845, *P. roquefortii* ATCC 10110 e *A. niger* ATCC 1004 contendo polissacarídeos em quantidades que permitam a realização das extrações aplicando condições definidas de temperatura, pH e tempo de extração e posterior análises químicas necessárias;

Realizar os estudos de extração dos polissacarídeos, pela utilização da ferramenta de Metodologia de Superfície de Resposta;

Purificação dos polissacarídeos utilizando Cromatografia de Exclusão Molecular;

Caracterizar os polissacarídeos extraídos dos fungos utilizando técnica de espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

Realizar ensaios “*in vitro*” para determinar o potencial antioxidante dos polissacarídeos obtidos desses fungos filamentosos através dos métodos de eliminação dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS).

CAPITULO I

Referencial Teórico

1 Fungos

1.1 Biologia dos fungos

Em termos taxonômicos, os fungos verdadeiros estão agrupados em um reino a parte, o Reino *Mycetae*, mais conhecido como Reino *Fungi* (RAGHUKUMAR, 2017). Representam um dos grupos mais abundantes em relação à sua onipresença, sua ecologia e suas múltiplas formas morfológicas, contribuindo amplamente na vida cotidiana (WANG, Zheng et al., 2017). Possuem fundamental importância para a sustentação da vida na Terra principalmente, por seu papel ecológico na atuação no ciclo do carbono nos solos além de facilitarem a nutrição mineral para plantas e de carbono para outros organismos (TEDERSOO et al., 2014). No entanto, também possuem impacto negativo, já que um número limitado de fungos é capaz de causar infecções oportunistas em plantas e em humanos, principalmente nos imunodeprimidos (PAULUSSEN et al., 2017).

São relativamente simples em termos de seus tipos de células e tecidos, juntamente com a alta diversidade genômica que acompanha sua ampla distribuição ecológica (WANG, Zheng et al., 2017). O desenvolvimento de fungos abrange uma grande variedade de complexidades, possuindo estrutura vegetativa podendo ser unicelular ou filamentosa, formada por hifas, que em conjunto formam o micélio. A parede celular fúngica é constituída principalmente por quitina, glucanas, mananas e glicoproteínas (TORTORA, CASE, & FUNKE, 2012; BOWMAN & FREE, 2006). Além disso, possuem nutrição osmo-heterotrófica, obtêm seus alimentos absorvendo pela superfície celular substâncias orgânicas dissolvidas (RAGHUKUMAR, 2017).

Na biotecnologia estão inseridos em diversas áreas: alimentos, medicina, meio ambiente, agricultura. Suas características básicas fazem destes organismos modelo para investigações genéticas. Já que, por possuírem natureza eucariótica mostram muitas das características das células humanas e, deste modo, podem ser usados como modelo mais útil para processos celulares do que bactérias (MORETTI & SARROCCO, 2015; BRANDL & ANDERSEN, 2017). Muitas espécies utilizadas como modelo para avanço de pesquisas compartilham de aspectos em comum: curto ciclo de vida, rápido crescimento, fácil manipulação em ambiente laboratorial e fácil identificação morfológica (WANG, Zhi-Jun et al., 2017).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão e vinho), utilizada como exemplo de modelo fúngico experimental bem estudado e de grande importância econômica, é uma ferramenta importante em genética molecular, amplamente utilizada em pesquisas das mais

diversas finalidades (COSTANZO et al., 2016). Qi et al. (2018) utilizou co-culturas de *S. cerevisiae* para melhorar a produção de solventes a partir de mandioca sem adição de enzimas amilolíticas, aumentando o rendimento e exibindo um grande potencial. Nuanpeng et al. (2018) usaram uma estirpe termotolerante de *S. cerevisiae* imobilizada em matriz de alginato para produção de etanol a partir de suco de sorgo, mostrando uma potencial aplicação industrial. Zhao et al. (2018) desenvolveram, por engenharia genética, uma nova via de biossíntese para melhorar a produção de ácido oleanólico em *S. cerevisiae*, apresentando um rendimento 7,6 vezes maior que a produção máxima já relatada.

Representantes de modelos experimentais de fungos filamentosos para biologia do desenvolvimento incluem as espécies ascomicetos *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* (WANG Zheng, et al., 2017). Em trabalho realizado com *A. nidulans* geneticamente modificada, foi investigada a redução na formação de melanina nos micélios fúngicos com a finalidade de aumentar o rendimento na produção da enzima álcool arílico oxidase (PARDO-PLANAS et al., 2017). Castrillo et al. (2017), fotoinduziram a biossíntese de carotenóides no micélio do *N. crassa* incubado a baixas temperaturas (8°C), mostrando melhores resultados quando comparados ao mesmo procedimento realizado em temperaturas mais altas (30°C).

A aplicação desses microrganismos nos diversos setores industriais está relacionada à exploração como fonte para obtenção natural de metabólitos primários e secundários que exibem, inclusive, ampla gama de atividades biológicas (MORETTI & SARROCCO, 2015). Espécies de gêneros como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, e *Neurospora*, por exemplo, já são amplamente utilizados na produção industrial de ácidos, enzimas, proteínas, dentre outros produtos (KULKARNI, NENE, & JOSHI, 2017).

Em seu metabolismo os microrganismos utilizam o carbono e substâncias de alto peso molecular para formar moléculas pequenas (aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos) que são precursores de macromoléculas (proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios) utilizadas para o crescimento microbiano (SANCHES & DEMAIN, 2002). Seu crescimento, sobrevivência e morfogênese, só é possível devido à parede celular, que é a responsável pela proteção contra condições ambientais adversas e outros microrganismos (FREE, 2013).

1.2 Parede Celular Fúngica

A estrutura da parede celular fúngica desempenha papel multifuncional para a manutenção desses microrganismos, tais como: participação na reprodução de fungos, proteção contra

fatores deletérios, regulação da morfogênese, determinação das características antigênicas e adesivas, controle do dimorfismo e formação das células fungais dormentes, recepção de sinais externos e transferência para a membrana (MAGNELLI, CIPOLLO & ROBBINS, 2005).

As paredes são compostas de glucanos, quitina e quitosana, mananas e/ou galactomananas e glicoproteínas. Glucanos são polímeros constituídos de repetidos monossacarídeos de glicose podendo estar unidos por diferentes tipos de ligações químicas. A maior parte do glucano presente na parede celular é considerado β -1,3-glucano, mas outros glucanos, como ligações β -1,6, misturado a β -1,3 ou β -1,4, α -1,3 ou α -1,4-glucano também podem ser encontrados em paredes celulares fúngicas (BOWMAN & FREE, 2006).

O principal polissacarídeo da parede celular dos fungos é a quitina (poli-N-acetil-D-glucosamina) (FESEL & ZUCCARO, 2016). Esse polissacarídeo não ocorre em um estado puro na natureza, está ligado por ligações iônicas ou covalentes com outros compostos, que no caso dos fungos, é ligada aos glucanos (BOWMAN & FREE, 2006).

Nos vertebrados não há presença de quitina, mas contêm N-acetilglucosamina que faz parte dos mucopolissacarídeos (glicosaminoglicanos) do tecido conjuntivo, sendo esses, por exemplo, o ácido hialurônico, heparam sulfato, queratam sulfato e heparina, além de glicolípídeos e glicoproteínas, (FEOFILOVA, 2010).

A composição da parede celular está sujeita a sofrer alterações quanto à composição até mesmo em um mesmo isolado de fungos a depender das condições de crescimento e estágio de vida em que se encontra o fungo (BOWMAN & FREE, 2006).

Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* paredes celulares possuem principal constituição de β -(1 \rightarrow 3)-glucano ramificado de peso molecular elevado, e as cadeias laterais são do tipo β -(1 \rightarrow 6)-glucano (MANNERS; MASSON & PATTERSON, 1973).

Já a composição proteica da parede celular varia de acordo com as condições ambientais e o estágio de desenvolvimento do fungo, estando ligadas covalentemente ao polissacarídeo (DE GROOT, RAM & KLIS, 2005). Nos fungos filamentosos o correspondente a proteínas na parede está em torno de 20 a 30% da massa celular (BOWMAN et al., 2006).

Deste modo, a composição química da parede celular fúngica fornece proteção confiável para as células, particularmente se estão em estado de dormência ou expostos a

fatores deletérios como radiações, reagentes químicos, enzimas líticas, etc. Provavelmente a quitina seja a principal responsável por essa proteção (SOKOLOV et al., 2002). No entanto, a quitina não desempenha essa função em todos os fungos, já que em algumas leveduras de ascomicetos (*Hansenula polymorpha*) a resistência às funções ambientais é proporcionada por proteínas de parede celular especiais, com estas proteínas desempenhando um papel mais importante na formação da estrutura da parede do que os polissacarídeos (FEOFILOVA, 2010).

1.3 Fungos do gênero *Penicillium*: aspectos gerais

O *Penicillium* é um gênero de fungos ascomicetos composto por mais de 354 espécies que desempenham papel importante em vários processos naturais (NIELSEN et al., 2017). É um dos fungos mais comuns que ocorrem em vários ambientes, como solo, ar e ambientes extremos (temperatura, salinidade, deficiência de água e pH), além de estar associado com plantas e produtos alimentares específicos. Seu grande potencial para o uso de várias aplicações ambientais, biotecnológicas e industriais se dá devido à sua enorme diversidade e existência em ambientes extremos, podendo crescer a uma temperatura em torno de 0°C (MORETTI & SARROCCO, 2015; YADAV et al, 2017).

O interesse pelas espécies do *Penicillium* está associado a sua capacidade de produção de metabólitos bioativos, o que leva ao crescimento do interesse de estudo desse gênero para exploração biotecnológica, trazendo benefícios nas diversas áreas (NIELSEN et al., 2017). Na indústria farmacêutica, são utilizados na produção de antibióticos (SILVA et al, 2006), sendo que o mais relevante é o produtor industrial de penicilina, o *Penicillium rubens* (as vezes também identificado como *P. chrysogenum*) (DOMÍNGUEZ-SANTOS et al., 2017), porém outras espécies são usadas para a produção de outros metabólitos secundários de interesse farmacêuticos, como na fabricação de estatinas (BARRIOS-GONZÁLEZ & MIRANDA, 2010).

Na fabricação de produtos alimentares são utilizadas enzimas produzidas por diferentes estirpes de *Penicillium* para melhorar o sabor, a produção de álcool, sabor e clareza de vinho e cerveja (NIGAM, ASTHANA & KUMAR, 2017). Amplamente utilizado na indústria de laticínios devido a sua facilidade de adaptação aos substratos fornecidos por esta indústria. Diferentes estudos relataram grande potencial biotecnológico decorrente dos metabólitos produzidos por diferentes espécies desses fungos e que podem ser destinados a diferentes ramos industriais (RIZZELLO et al., 2017).

Entre os produtos de interesse obtidos desses fungos tem se observado uma crescente relação entre polissacarídeos obtidos dos representantes desse gênero atrelado a diversas atividades biológicas, sendo assim pesquisas estão sendo desenvolvidas para adequada caracterização de polissacarídeos com fins farmacêuticos (SUN, et al., 2009; CHEN et al., 2013; YAN et al., 2014).

1.3.1 *Penicillium camemberti*

O *Penicillium camemberti* (Figura 1) é um fungo filamentososo importante na indústria alimentar e é responsável, em grande parte, pelas propriedades organolépticas de queijos, como Camembert e Brie (GARCÍA-RICO et al., 2017). Acredita-se que seja uma forma domesticada de *P. commune*, e possui vários sinônimos para a espécie, incluindo *P. rogeri*, *P. candidum*, *P. album* e *P. caseicolum*. Este fungo é praticamente encontrado apenas no queijo ou no ambiente da fábrica de queijo e raramente é encontrado longe deste ambiente (ABBAS & DOBSON, 2011).

Figura 1. Micélios do fungo *Penicillium camemberti* crescido em Ágar batata glicose à $28 \pm 2^\circ\text{C}$.
Fonte própria



A esporulação assexuada, que é o modo reprodutivo generalizado nos fungos filamentosos, consiste em uma produção maciça de esporos, chamados conídios no caso de *Ascomycetes*. Cada conidium tem a capacidade de produzir um micélio jovem, sob condições ambientais favoráveis, e é esta propriedade que contribuiu para o uso de conídios de *P.camemberti* como cultura de iniciador de queijo. Sendo assim, os conídios são diretamente introduzidos no leite ou na sementeira por pulverização superficial, e assim, são responsáveis pela maturação e saborização de uma variedade de queijos franceses (KRASNIEWSKI et al., 2006).

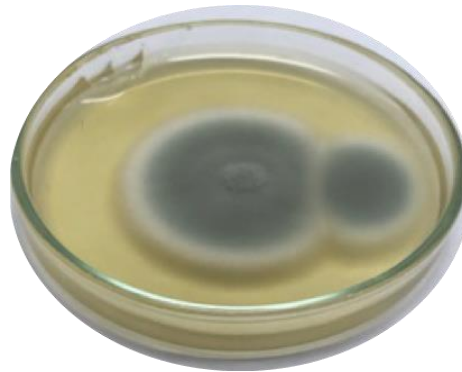
Durante a germinação dos esporos e o crescimento do micélio, as atividades de lipases e proteases estão envolvidas na degradação de lipídios e proteínas no queijo, com consequente

liberação de ácidos graxos e aminoácidos. Estes aminoácidos são transformados em importantes compostos de sabor e aroma, como amônia, metil-cetonas, álcoois primários e secundários, ésteres, aldeídos, lactonas e compostos de enxofre que contribuem para as qualidades organolépticas (GILLOT et al., 2016).

1.3.2 *Penicillium roqueforti*

O *Penicillium roqueforti* é um fungo filamentosamente utilizado no amadurecimento de vários tipos de queijo de veia azul, como Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Cabrales ou Danablu (HOUBRAKEN, FRISVAD & SAMSON, 2010; GILLOT et al., 2016). Trata-se de um fungo esporulante verde-azulado (Figura 2), ubíquo e saprófito que pode ser isolado do solo, decomposição de matéria orgânica e plantas. Também está associado à produção de diversos metabólitos secundários, incluindo compostos bioativos como o ácido micofenólico e a andrastina (GARCÍA-ESTRADA, 2016).

Figura 2. Micélios do fungo *Penicillium roqueforti* crescidos em Ágar batata glicose à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Fonte própria



O *P. roqueforti* tem algumas características favoráveis à fermentação, que incluem bom desenvolvimento em diferentes condições de pH e capacidade de usar uma variedade de compostos químicos como substrato, incluindo pentoses e hexoses, sendo assim, é amplamente utilizado na indústria de laticínios devido a sua facilidade de adaptação aos substratos fornecidos por esta indústria (MIOSO et al., 2015; RIZZELLO et al., 2017).

Vários dos metabólitos secundários produzidos e isolados do *P. roqueforti* são tóxicos, porém não parecem apresentar risco mesmo quando ingerido em grandes quantidades em queijos consumidos diariamente, isso porque algumas dessas micotoxinas são instáveis e são transformadas em não tóxicas no queijo. Além disso, esses metabólitos tóxicos são produzidos por diferentes cepas, sendo assim, há uma classificação e identificação das cepas

para que as mais apropriadas sejam utilizadas para produção de queijo, com culturas iniciais não contaminadas (BOYSEN et al., 1996).

1.4 Fungos do gênero *Aspergillus*: aspectos gerais

Aspergillus é um gênero amplo compreendendo mais de 350 espécies conhecidas de fungos filamentosos aeróbicos com estilo de vida e propriedades metabólicas variadas, que colonizam uma variedade de habitats (plantas, matéria orgânica em decomposição, solos, água doce e habitats marinhos) (MORETTI & SARROCCO, 2015; BRANDL & ANDERSEN, 2017). Produzem conídios assexuados que se tornam facilmente aéreos e são altamente tolerantes ao estresse, podendo produzir ascósporos sexuais resistentes (PAULUSSEN et al., 2017).

São fungos da vida cotidiana com grande impacto econômico, importante na indústria, particularmente na biotecnologia pela produção de metabolitos como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos ou enzimas, ou utilizados como agentes nas fermentações de muitos alimentos (SAMSON et al., 2014).

O *Aspergillus nidulans* tem sido utilizado como modelo genético para estudos em relação ao metabolismo, desenvolvimento celular e regulação, sendo provavelmente o mais conhecido desse gênero. Porém, outros membros desse gênero, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* são importantes componentes para a produção de alimentos sendo considerado pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos da América (EUA) como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS), muito utilizados na indústria como representantes fúngicos na produção de enzimas (BRANDL & ANDERSEN, 2017).

Apesar de muitas espécies apresentarem patogenicidade para humanos causando aspergilose em pacientes imunocomprometidos (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*) e plantas, estragando colheitas (*A. flavus* e *A. niger*) (PAULUSSEN et al., 2017), em escala industrial, nas quais as condições de produção são bem controladas e definidas, é possível obter um produto sem a presença de micotoxinas (BLUMENTHAL, 2004).

A ampla variedade e o sucesso dos membros do gênero *Aspergillus* como organismos dominantes em diversos habitats está atribuída à interação de vários fatores, resultando em uma ubiquidade global que contribui para sua importância econômica. Seu interesse em pesquisas tem tornado esse gênero, modelo em muitos estudos, particularmente, após várias espécies de *Aspergillus* terem seu genoma sequenciado, possibilitando caracterizar aspectos

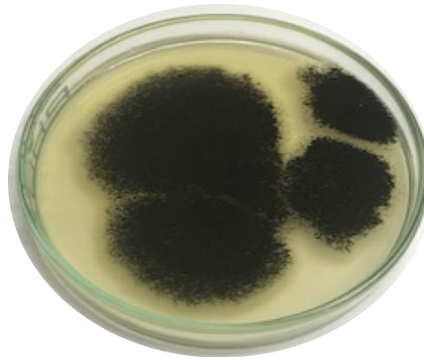
metabólicos do estresse, por exemplo, representando um ganho para a pesquisa e aplicação de várias tecnologias (BRANDL & ANDERSEN, 2017; PAULUSSEN et al., 2017).

1.4.1 *Aspergillus niger*

Pertencente ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, gênero *Aspergillus*, subgênero *Circumdati*, secção *Nigri* (SAMSON et al., 2014), trata-se de um dos fungos mais comuns do gênero podendo crescer em diferentes localidades associados a altos níveis de umidade e baixa intensidade de luz (GOFFREDO et al., 2017) bem como suportando locais secos e quentes sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 35-37°C, porém consegue se multiplicar em temperaturas entre os 6°C e os 47°C. O pH ótimo de crescimento é 6, mas podem crescer entre valores de pH variando entre 1.5 e 9.8 (KRIJGSHELD et al., 2013), mostrando grande capacidade de adaptação desse fungo.

Possui conídios relativamente grandes de coloração negra, popularmente conhecido como “mofo negro” (SANTOS, 2010) (Figura 3). Devido ao seu estilo de vida saprofítico, o *A. niger* é responsável pelo crescimento indesejado em alimentos, o que lhe proporciona uma interessante oportunidade biotecnológica, possibilitando a produção de grande variedade de enzimas degradantes na biomassa, devido à biotransformação de compostos (BRANDL & ANDERSEN, 2017), mas também permite a produção de uma diversidade de outros produtos de diferentes utilizações industriais e biomédicas significantes, como ácidos orgânicos de grande interesse econômico (PRAKASH & JHA, 2014).

Figura 3. Micélios do fungo *Aspergillus niger* crescidos em Ágar batata glicose à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Fonte própria



Entre as enzimas mais proeminentes produzidas pelo *A. niger* estão a glicose oxidase, comumente utilizada para a quantificação de açúcar no sangue e a amilase que é amplamente utilizada na indústria de alimentos para o processamento de amido (BRANDL & ANDERSEN, 2017). As celulases têm um potencial de conversão biotecnológico único, sendo utilizadas em diferentes indústrias, como agricultura, cervejarias e vinhos, bioetanol, têxtil, processamento de alimentos, papel e celulose, extração de azeite e também utilizadas em ciências farmacêuticas e médicas (SHARADA et al., 2014). Em estudo realizado por Ahmad & Khare (2017) a enzima celulase de *A. niger* foi imobilizada em nanotubos de carbono, o que proporciona a reutilização e melhor estabilidade enzimática.

Além de enzimas, o *A. niger* também é famoso por acumular ácidos orgânicos (málico, oxálico, glucônico e fumárico), porém com maior rendimento para o ácido cítrico. Alguns estudos são realizados com intuito de aumentar o rendimento de produção de ácidos orgânicos, através de modificação do genoma feita em sistemas biológicos, como método clássico de mutação por radiação ultravioleta (ADEOYE et al., 2015). Segundo investigação de Iyyappan et al. (2018) foi utilizado o glicerol bruto derivado do processo de transesterificação para produzir o ácido málico utilizando *Aspergillus niger* MTCC281 mutante. Em outro estudo, através de engenharia genética, Kuivanen et al. (2015) conseguiram que o *A. niger* fosse capaz de converter o ácido D-galacturônico em ácido L-ascórbico (vitamina C), com uma produção de 170 mg/L, utilizando a estirpe modificada.

Nos processos industriais, são várias as vantagens do uso desta espécie; sua fácil manipulação, capacidade de fermentação de várias matérias-primas de baixo custo e a produção de elevadas quantidades de produto (SANTOS, 2010). Além disso, como já citado

anteriormente, essa espécie é considerada GRAS e sua produção de ácido cítrico industrialmente é considerada segura pelo FDA desde 1994 (BLUMENTHAL, 2004).

2 Polissacarídeos: classificação e propriedades

Polissacarídeos são macromoléculas sintetizadas em diferentes estágios do ciclo de vida de todos os organismos vivos com diferentes finalidades (MAHAPATRA & BANERJEE, 2013). Geralmente são compostos de mais de dez unidades monoméricas (glicose, manose, galactose, xilose, arabinose etc) unidas através de ligações glicosídicas podendo ter distintas configurações anoméricas (α e β), pesos moleculares (número de monossacarídeo por molécula), conformações (linear, ramificada, helicoidal), posições das ligações, entre outras (ZHANG et al., 2018; WANG, LIU & QIN, 2017; GUO et al., 2013; LI & WANG, 2016; CHEN et al., 2013). Todas essas características juntas conferem aos polissacarídeos uma grande diversidade de estrutura, propriedades e funções, sendo necessária a caracterização química para direcionar a aplicação bem como os estudos de bioatividades (DING, HOU & HOU, 2012).

Entre as diversas fontes de obtenção de polissacarídeos (plantas fotossintéticas, fungos, algas, bactérias e assim por diante), a microbiológica é conhecida por sua capacidade de sintetize desses polímeros de diferentes complexidades estruturais (MAHAPATRA & BANERJEE, 2013). Polissacarídeos produzidos por microrganismos podem ser classificados em três grupos, que variam de acordo com sua localização na célula: polissacarídeos citosólicos, são responsáveis por fornecerem carbono como fonte de energia para a célula, os exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos que são excretados para o meio extracelular como cápsulas ou biofilme e os polissacarídeos que formam a parede da célula, incluindo peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (DONOT et al., 2012).

O crescente interesse na utilização de polissacarídeos bioativos em diversas terapias humanas está relacionado à segurança e baixa toxicidade que geralmente apresentam (YU et al., 2017). Sendo assim, cada vez mais estudos comprovam as atividades biológicas complexas de polissacarídeos com pesquisas avançando com foco em estrutura-atividade e mecanismos de ação desses polissacarídeos (SHI, 2016). Assim, polissacarídeos de fontes microbiológicas estão sendo utilizados como substratos para desenvolvimento de novas drogas e com enormes perspectivas de desenvolvimento (WANG et al., 2013), demonstrando uma ampla variedade de atividades farmacológicas, como antitumoral, imunomoduladora,

antioxidante hipoglicêmica, efeitos anti-inflamatórios entre outros (YU et al., 2017; CHEN et al., 2016).

Em estudo realizado por Nie et al. (2013), foram observadas as atividades imunomoduladora, antitumoral e antioxidante relacionadas aos polissacarídeos isolados de *Cordyceps sinensis*. Fan et al. (2012), estudaram três polissacarídeos (GLP-H, GLP-V e GLP-F) isolados de *Ganoderma lucidum*, que mostraram forte atividade de eliminação de radicais livres, exibindo suas atividades antioxidantes “*in vitro*”.

3 Caracterização química de polissacarídeos

A atividade biológica dos polissacarídeos está diretamente relacionada as suas características estruturais e propriedades físico-químicas (DING, HOU & HOU, 2012), incluindo solubilidade em água, peso molecular, composição monomérica, tipos de ligações glicosídicas da cadeia principal e das ramificações, etc. Sua atividade também pode relacionar-se à associação com outras macromoléculas, como por exemplo proteínas, (CHEN et al., 2016). Sendo assim, a caracterização química do polissacarídeo se faz necessária para continuidade dos diversos estudos.

Como os componentes da parede celular são todos reticulados entre si e as proteínas são fortemente glicosiladas, é difícil estudar a organização e os componentes da parede celular dos fungos, sendo que, uma camada de parede celular externa é rica em carboidratos e uma camada interna rica em proteínas. Para que haja liberação das proteínas de algumas paredes celulares fúngicas deve ser feito a extração por meio de tratamentos com HF-piridina ou álcali, e esses tratamentos são utilizados para liberar e estudar polissacarídeos e proteínas da parede celular (FREE, 2013).

Para a análise, vários são os métodos empregados. A quantidade total de açúcares é frequentemente determinada por teste colorimétrico como fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), antraceno-ácido sulfúrico (XU et al., 2015) e carbazol-ácido sulfúrico (CHEN et al., 2016). As proteínas são usualmente quantificadas por método descrito por Bradford (1976). Para purificação, métodos cromatográficos têm sido amplamente aplicados à análise composicional (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE) e estrutural de polissacarídeos quando combinados com outras técnicas analíticas estruturais, incluindo FT-IR (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier), RMN (Ressonância

Magnética Nuclear), CG-MS (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas), e assim por diante (CHEN et al., 2016; ZHANG et al., 2015; RUTHES et al., 2013).

A cromatografia é um dos métodos de purificação e análise mais efetivo, permitindo separar os polissacarídeos individuais do extrato com alta sensibilidade, seletividade e resolução de separação. Dentre os métodos cromatográficos mais utilizados para purificar polissacarídeos estão a cromatografia de permeação em gel e a cromatografia de troca iônica (CHEN et al., 2016). A cromatografia de permeação de gel é atualmente o método mais utilizado para purificação de polissacarídeos devido ao seu bom efeito de purificação e operação simples. Sendo assim, é possível pela cromatografia em coluna em gel filtração separar polissacarídeos de acordo com o tamanho e a forma das moléculas. Os géis comumente utilizados são dos tipos de Sephadex, Sepharose, Sephacryl, Superdex e etc. Como eluente são utilizadas concentrações de soluções de sal e tampões (SHI, 2016; ORLANDELLI et al., 2016).

Já a cromatografia de troca iônica possui a capacidade de separar polissacarídeos ácidos e neutros a partir das diferenças de carga. As moléculas se ligam covalentemente em sítios de carga oposta na fase estacionária insolúvel, sendo posteriormente eluídas gradativamente sob diferentes condições. Desta forma, os polissacarídeos podem ser separados e quantificados (CHEN et al., 2016). Além dessas, outras técnicas podem ser utilizadas para purificação de polissacarídeos, como ultracentrifugação, ultrafiltração (XU et al., 2016).

Sendo assim, a primeira etapa para a caracterização de um polissacarídeo é a determinação de sua pureza, que é refletida por sua composição química, inclui-se o conteúdo de açúcar total, açúcares redutores, proteínas, etc. A segunda etapa é a determinação da composição monossacarídica que informará os diferentes tipos, assim como o percentual relativo de cada um na macromolécula. Para essa determinação de composição monossacarídica emprega-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VALASQUES JUNIOR et al., 2017; CORRADI DA SILVA et al., 2005).

Zhang et al. (2018) demonstraram em seu trabalho que o polissacarídeo (TJ2), extraído e purificado da *Agaricus brasiliensis*, foi caracterizado e sua estrutura apresentou a composição de glicose, manose e galactose. Em estudo sobre o exopolissacarídeo (Os2-1)

obtido a partir de *Oidiodendron truncatum* GW foi determinada que sua estrutura é composta principalmente de glicose e pequenas quantidades de glucosamina (GUO et al., 2013).

Já para a análise do tamanho do anel, bem como a posição da ligação glicosídica nas unidades formadoras do polissacarídeo são realizadas as análises de metilação (CIUCANU & KERÉK, 1984). De modo resumido, realiza-se a metilação completa de um polissacarídeo, hidrólise a uma mistura de monossacarídeos parcialmente metilados, redução destes a alditóis, acetilação dos alditóis e identificação dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). Os tipos de ligações são deduzidos a partir da natureza dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (PAZUR, 1994).

As configurações das ligações glicosídicas (α e β) podem ser estabelecidos ensaios enzimáticos, oxidações seletivas ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN é a ferramenta físico-química mais poderosa e não destrutiva para determinar a estrutura polissacarídica (CUI, 2005). O princípio da espectroscopia de RMN é baseado nas propriedades magnéticas de alguns núcleos. Dependendo do número atômico e número de massa há um momento angular associado ao número do spin. Alguns núcleos possuem estados de spin $+1/2$ e $-1/2$ e essa propriedade permite que eles sejam estudados por RMN (BRUICE, 2006). Para os carboidratos os núcleos úteis são ^1H e ^{13}C . Geralmente os espectros de RMN contêm todas as informações estruturais sobre oligo e polissacarídeos. (SYNYTSYA & NOVAK, 2013).

Em estudo realizado para caracterização de polissacarídeo de *Oidiodendron truncatum* GW, após análises químicas e espectroscópicas, incluindo RMN, a cadeia principal do polissacarídeo foi caracterizada como formada por ligações (1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranoose com pequena quantidade de ramificações do tipo (1 \rightarrow 2)- α -D-glucopiranoose (GUO et al., 2013).

O método de análise estrutural pela Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IV) também se faz necessário já que é possível, por essa técnica observar os espectros vibratórios que mostram aplicações importantes para a identificação e análise de açúcares. Os carboidratos apresentam alta absorvância em regiões específicas, chamadas de região de impressão digital; sendo assim, nessa posição e a depender da intensidade das bandas que são específicas para todo polissacarídeo, permite-se a identificação deste (CERNA et al., 2003).

A banda forte em torno de $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao estiramento de O-H, principal grupo funcional dos polissacarídeos (ZHANG et al., 2018). O pico de absorção entre $2930-2970\text{ cm}^{-1}$ correspondente à vibração de C, incluindo CH, CH₂ e CH₃ (ZHANG et al., 2015). As bandas de estiramento na faixa de $950-1200\text{ cm}^{-1}$ de absorção característica dos polissacarídeos (AHMAD, 2010). Além disso, a banda de absorção em torno de $1040-1010\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de C-O-C ou C-O-H (YAN et al., 2014; VALASQUES JÚNIOR et al, 2017) que também pode explicar a existência de conformação de anel de polissacarídeos (LI & WANG, 2016).

4. Atividade antioxidante

A oxidação é vital para muitos organismos, garantindo a produção de energia para alimentar processos biológicos, regulando o crescimento celular e inibindo vírus e bactérias (CHEN et al., 2016). Porém, a produção descontrolada de radicais livres está associada ao aparecimento de muitas patologias como câncer, aterosclerose e processos degenerativos com envelhecimento (DING et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são principalmente aniões superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila, que são originados quando as células produzem energia reduzindo oxigênio molecular em água (WEYDERT & CULLEN, 2010). Para muitos processos bioquímicos são essenciais que haja níveis baixos de ERO, a exemplo de mensagens intracelulares em diferenciação celular, apoptose e progressão celular, contudo níveis elevados de ERO podem resultar em estresse oxidativo, pelo ataque de tecidos e quebra da homeostase redox (YU et al, 2017).

As atividades protetoras antioxidantes podem ser exercidas em diferentes estágios do processo de oxidação e por mecanismos diferentes. Dois são os principais tipos de antioxidantes, os “primários” (captadores de radicais livres) e os “secundários” ou “preventivos” (desativando metais, a inibindo a lipoperoxidação de ácidos graxos e regenerando os antioxidantes "primários", extinguindo o oxigênio singlete) (KOLEVA et al., 2002).

No intuito de diminuir prejuízos ao corpo humano, antioxidantes são adicionados em alimentos processados no intuito de atenuar indiretamente o dano oxidativo de um tecido aumentando as defesas naturais das células e eliminando as espécies de radicais livres (SUN et al., 2009). Porém, a maioria dos antioxidantes sintéticos que são utilizados são suspeitos de

causar hepatotoxicidade e carcinogênese (QI et al., 2005). Estudos demonstram que extratos de fungos são fonte altamente promissora, já que possuem certas atividades biológicas importantes, como um potencial antioxidante em vários estágios do desenvolvimento dos fungos (SMITH, DOYLE & MURPHY, 2015).

Nos últimos anos maior atenção tem sido dada aos polissacarídeos, devido, dentre outras, a sua atividade antioxidante e pesquisas para produção de fármacos. Alguns estudos demonstraram que os polissacarídeos podem inibir a peroxidação lipídica, e assim melhorar a capacidade de eliminar radicais livres, atividade antienvhecimento, inibição de doença cerebrovascular e de doenças cardiovasculares (WANG, Zhi-Jun et al., 2017).

Ding et al. (2012) demonstraram em seu estudo que um polissacarídeo isolado de *Tricholoma matsutake* mostrou forte atividade antioxidante, atenuando significativamente o dano celular causado pelo peróxido de hidrogênio, em ensaios “in vitro”. Em outro estudo com polissacarídeo extracelular obtido de *Aspergillus terreus* também foi observada satisfatória atividade antioxidante, especialmente na habilidade de eliminação de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilididazol) (WANG et al, 2013). Em trabalho realizado por Sun et al. (2009) utilizando três polissacarídeos obtidos do fungo marinho *Penicillium sp* F23-2, também foi observado que os três possuíam boas propriedades antioxidantes, especialmente habilidades de eliminar radicais de superóxido e radicais de hidroxila.

Polissacarídeos obtidos de *Hohenbuehelia serotina* exibiram em testes antioxidantes “in vitro” capacidade de eliminação significativa de radicais livres ABTS e radicais hidroxílicos, no entanto mais estudos são necessários para entender a relação entre estrutura e atividades antioxidantes (LI & WANG, 2016). Dois polissacarídeos do estroma de *Cordyceps kyushuensis* mostraram propriedades antioxidantes de forma dose-dependente, especialmente habilidades de eliminação de radicais hidroxila, bem como capacidade clara e forte sobre o efeito protetor ao dano do DNA. Entretanto, são necessárias investigações “in vivo” adicionais sobre a atividade antioxidante e o imunomecanismo desses polissacarídeos (ZHANG et al., 2015).

A atividade antioxidante de polissacarídeo de *Paecilomyces hepiali* HN1 também demonstrou efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo induzido por D-galactose em camundongos, assegurado por atividades superiores de superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase, sugerindo que este polissacarídeo poderia ser explorado como promissor antioxidante natural (WU et al., 2016).

CAPITULO II

Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo de *Penicillium camembertii* ATCC 4845

Revista: Carbohydrate Polymers

<https://www.elsevier.com/journals/carbohydrate-polymers/0144-8617/guide-for-authors>

Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo de *Penicillium camembertii* ATCC 4845

Tátilla Putumujú S. Mendes¹, Gleiza M. Costa¹, Romário A. Santana¹, Edson Gabriel dos Santos¹, Baraquizio B. do Nascimento Junior¹, Helena B. Nader², Gildomar L. Valasques Junior¹

¹ Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brazil

² Laboratório de Biologia Molecular, INFAR, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio 100, São Paulo 04044-020, SP, Brazil

RESUMO

Este estudo investigou a influência das variáveis temperatura, pH e tempo de extração sobre o rendimento do polissacarídeo obtido de *Penicillium camembertii* ATCC 4845, a caracterização química do polissacarídeo e o potencial antioxidante “*in vitro*”. O delineamento estatístico Box-Behnken foi aplicado para determinar o melhor rendimento obtido após as condições ótimas de extração que tendem a 180 minutos, temperatura de 90°C e pH 13. A purificação foi realizada utilizando cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex-G100, onde foram observados dois picos (PCAM1 e PCAM2), que indicam que o polissacarídeo obtido apresenta-se em dois tamanhos moleculares diferentes, exibindo valores de grau de polimerização (DP_n) e tamanho molecular (MW_n) equivalentes a 107 e 17,47KDa para PCAM1 e de 42 e 6,87KDa para PCAM2, respectivamente. No método de espectroscopia infravermelho (FT-IR) o perfil dos sinais obtidos foi característico de polissacarídeos. Pela hidrólise seguida da aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi identificada a composição monossacarídica sendo sugestiva de maiores proporções de galactose e glicose. A atividade antioxidante do polissacarídeo foi realizada pelos testes de avaliação de sequestro de radicais livres de DPPH e ABTS, apresentando resultados EC₅₀ equivalente a 5,166 e 1,609 mg/mL, respectivamente. Os resultados apontam que o polissacarídeo produzido pelo fungo filamentosos *P. camembertii* ATCC 4845 possui potencial atividade antioxidante.

Palavras-chave: metodologia de superfície de resposta. radicais livres. DPPH. ABTS.

1 Introdução

Os fungos são microrganismos adaptados a quase todos os ambientes da natureza (Stübiger et al, 2016). Eles foram usados há milhares de anos em muitas sociedades por causa

de seus reconhecidos atributos nutricionais e, mais recentemente, foram vistos como uma fonte valiosa para produção de fármacos (Smith, Doyle & Richard Murphy, 2015; Evidente et al., 2014). Como produto de seu metabolismo primário e secundário, esses microrganismos produzem micro e macromoléculas (aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios) que são utilizadas tanto para o crescimento microbiano quanto exploradas comercialmente pelas indústrias dos diversos ramos (Moretti & Sarrocco, 2015; Sanches & Demain, 2002).

Sendo assim, como biopolímero derivado de interesse, os polissacarídeos podem apresentar várias atividades aplicadas na clínica (Xu et al., 2017): anti-inflamatória (Cheng et al., 2016; Du et al., 2015), imunomoduladora (Fukuda et al., 2009; Yu et al., 2017), antitumoral (Hussain, Rather & Suradkar, 2017), antinociceptiva (Valasques et al., 2014) e capacidade antioxidante (Wang et al., 2017; Tian et al., 2016) com habilidades de eliminação de radicais livres. Podendo portanto ser utilizados no desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes (Zhang, Lu, Fu, Wang e Zhang , 2011).

Penicillium camemberti, relevante na indústria alimentar, é um fungo filamentososo com grande importância organoléptica na fabricação de queijos famosos como Camembert e Brie. Suas propriedades biológicas são importantes para o processo de maturação desses queijos (Garcia-Rico et al, 2017). O revestimento branco destes queijos é composto principalmente de micélio do fungo *P.camemberti*, e sua rápida colonização na superfície é o que reduz o desenvolvimento e deterioração por outros microrganismos, garantindo assim uma boa progressão da maturação do queijo (Leclercq-Perlat et al, 2013).

O presente estudo teve por finalidade a otimização da obtenção, caracterização e avaliação da atividade antioxidante de um polissacarídeo da parede celular do fungo *P. camembertii* ATCC 4845. Para a caracterização estrutural foram utilizados métodos espectroscópicos, incluindo espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e ressonância magnética nuclear (RMN), além do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A propriedade antioxidante do polissacarídeo foi avaliada "*in vitro*" por ensaios de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS).

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo

O fungo *P. camembertii* ATCC 4845 foi obtido da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). O microrganismo foi mantido incubado em Ágar Batata Dextrose (BDA) à temperatura de 4°C até o início dos experimentos.

2.2 Condições de cultura de *P. camembertii* ATCC 4845

O *P. camembertii* ATCC 4845 foi incubado em meio de cultura BDA durante 5 dias à temperatura de 30°C (BOD SL200/90 Incubadora- SOLAB), para ativação do microrganismo. Foi realizada inóculoção em meio líquido utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de (g/L): D-glicose, 10; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5, pH 5,0, de acordo com a metodologia descrita por Manera et al. (2011) com algumas modificações. Os frascos foram inoculados com três discos de 2 cm de diâmetro contendo o microrganismo. A fermentação foi realizada a 150 rpm por 120 horas e 30°C em um agitador rotativo (Incubadora shaker SL 222, SOLAB). Após a fermentação, o meio de cultura líquido, no qual foi cultivado *P. camembertii* ATCC 4845, foi filtrado a vácuo (bomba de filtro de vácuo TE-0582, TECNAL), e os polissacarídeos foram extraídos da biomassa do microrganismo. (Dong et al., 2009).

2.3 Extração de polissacarídeo de *P. camembertii* ATCC 4845

O polissacarídeo foi obtido da biomassa seca (0,5g), pela extração com 50 mL de solução de hidróxido de sódio a diferentes valores de pH (11, 12 e 13), temperaturas (70, 80 e 90°C) e tempos de extração (60, 120 e 180min). A suspensão foi centrifugada (Modelo 206 BL-EXCELSA) a 8.000 g durante 15 min. Ao sobrenadante foram adicionados etanol absoluto (três vezes o volume inicial), agitado vigorosamente e mantido por 12 horas a 4°C. A suspensão hidroalcoólica obtida contendo os polissacarídeos foi centrifugada a 8.000 g durante 20 min. O precipitado contém o polissacarídeo e o sobrenadante foi descartado. O polissacarídeo bruto foi seco a 50°C até peso constante. O teor de polissacarídeo foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, et. 1956). O rendimento do produto foi medido ao % (p/p) de polissacarídeos por unidade de massa de biomassa.

2.4 Planejamento experimental

A influência da temperatura (°C), pH e tempo de extração (minutos) na extração de polissacarídeos foi estudada aplicando o planejamento experimental Box-Behnken (Box &

Behnken, 1960), como variáveis independentes. Foram realizadas três repetições do ponto central (C) para estimar o erro puro, e os tratamentos experimentais foram variados aleatoriamente para detectar a presença de possíveis erros sistemáticos, totalizando quinze ensaios experimentais. A temperatura foi estudada variando de 70 a 90°C, o tempo de 60 a 180 minutos e o pH foi estudado variando de 11 a 13. Todas as variáveis foram estudadas em 3 níveis. O tratamento estatístico foi realizado com auxílio do software Statistica® versão 10.0, incluindo a análise de variância (ANOVA). Como resultado, foi observado o rendimento em massa (gramas) de extração de polissacarídeo, para cada 0,5g de biomassa bruta, em cada um dos quinze ensaios.

2.5 Determinação da proteína total na amostra

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.6 Purificação do polissacarídeo

A amostra de polissacarídeo (15 mg/mL) foi aplicada em coluna Sephadex G-100 (Sigma, EUA) (30×1,0 cm), que foi previamente condicionada em tampão fosfato citrato de sódio (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), o qual também foi usado como fase móvel. As frações (1,5 mL) foram recolhidas e os polissacarídeos totais dosados pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956).

2.7 Caracterização química do polissacarídeo

2.7.1 Análise de espectroscopia no infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear

Os polissacarídeos foram caracterizados utilizando espectrômetro de Infravermelho (IR) com transformadas de Fourier (modelo Varian Inova 500). O polímero seco foi moído e pressionado em pellets para medição espectral FT-IR na faixa de frequência de 4000-500cm⁻¹, com 20 varreduras. Na análise espectroscópica de RMN, o espectro foi registrado a 300K em um espectrômetro Varian Inova 500, operando a 11,7 T, observando ¹³C em 125 MHz e usando sonda direta. As amostras foram dissolvidas em D₂O e transferidas para o tubo de RMN. O TMS foi utilizado como referência de mudança química (δ 0,0). D₂O (99,9%) foi adquirido por Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (EUA).

2.7.2 O peso molecular médio (MWn) e grau de polimerização (DPn)

O Peso Molecular (MWn) e Grau de Polimerização (DPn) dos polissacarídeos foram determinados pela medida do valor do açúcar redutor utilizando o método do ácido 3,5-

dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) e do açúcar total pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956), e aplicando a fórmula descrita por Vettori, Franchetti & Contiero (2012):

$$DPn = [(\text{carboidratos totais em } \mu\text{g de D-glicose}) / (\text{valor de redução em } \mu\text{g de maltose})] \times 1.9;$$

$$MWn = [(DPn) \times 162] + 18.$$

2.7.2 Composição monomérica do polissacarídeo

O polissacarídeo de *P. camembertii* ATCC 4845(20 mg) foi hidrolisado com ácido trifluoroacético 2M (TFA) a 90° C durante 8h, seguido de evaporação (Ruthes et al., 2013). O sólido hidrolisado obtido foi solubilizado em água ultrapura, a solução foi filtrada e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando a coluna Amines® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm i.d.) (9 µm) (BIO-RAD, Califórnia, EUA) e detecção de índice de refração; o volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi uma solução aquosa de H₂SO₄ 0,01N de forma isocrática a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida à 25°C. Para a identificação do pico, foram utilizados padrões de açúcares: glicose, rhamnose, galactose, manose, arabinose e xilose (Sigma, EUA), todos com tratamento de hidrólise idêntico ao recebido pelo polissacarídeo. A determinação da composição de monossacarídeos foi feita em dois experimentos independentes com resultados consistentes.

2.8 Avaliação da atividade antioxidante

As atividades antioxidantes das amostras de polissacarídeos de *P. camembertii* ATCC 4845 foram avaliadas utilizando os métodos de sequestro de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo) e do radical ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), descrito por Rufino et al., (2007), com algumas modificações.

No ensaio DPPH, 100µL da amostra (0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6 e 6,4 mg/mL) foi adicionada em 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,06 mM). Após 20 min a 25°C, a absorbância foi medida a 517 nm. No ensaio ABTS⁺, primeiro foi preparado o radical ABTS por reação da concentração de sal ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) e deixando a mistura ao abrigo de luz à temperatura ambiente durante 16 h antes da utilização. A solução ABTS⁺ em estoque foi diluída com etanol (absorbância de 0,7 ±0,005 nm) e incubada com 30µL (0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6 e 6,4 mg/mL) da amostra e 3,0mL da solução etanólica de ABTS. A absorbância foi medida a 734 nm após 6 minutos de incubação. Em ambos os experimentos, os valores foram expressos como a concentração de amostra necessária para reduzir 50% dos radicais livres (EC₅₀). Nos dois ensaios (DPPH e ABTS⁺), a atividade antioxidante foi medida usando Trolox como controle positivo.

2.7 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD) ou EC₅₀ com base nos experimentos independentes. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas por ANOVA e com pós-teste de Tukey usando GraphPad 4.00.

3 Resultados e Discussão

3.1. Extração de polissacarídeos

O delineamento experimental Box-Behnken com três variáveis e 15 experimentos, incluindo três repetições no ponto central, foi usado para montar uma superfície de resposta. A triplicata do ponto central foi utilizada para estimar o erro puro experimental. A variação da massa de polissacarídeo do *P. camembertii* ATCC 4845 obtida, a partir de 0,5g de biomassa bruta, sob diferentes condições de extração (pH, temperatura e tempo de extração) está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento Box-Behnken com valores de rendimento dos polissacarídeos(g).

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Massa (g)
1	11 (-1)	90 (+1)	120(0)	0,012
2	12 (0)	90 (+1)	180(+1)	0,025
3	12 (0)	90 (+1)	60(-1)	0,008
4	13 (+1)	90 (+1)	120(0)	0,077
5	11 (-1)	80 (0)	180(+1)	0,002
6	11 (-1)	80 (0)	60(-1)	0,006
7C	12 (0)	80 (0)	120(0)	0,017
8C	12 (0)	80 (0)	120(0)	0,016
9C	12 (0)	80 (0)	120(0)	0,018
10	13 (+1)	80 (0)	180(+1)	0,055
11	13 (+1)	80 (0)	60(-1)	0,017
12	11 (-1)	70 (-1)	120(0)	0,002
13	12 (0)	70 (-1)	180(+1)	0,006
14	12 (0)	70 (-1)	60(-1)	0,006
15	13 (+1)	70 (-1)	120(0)	0,043

(C): ponto central; Os valores codificados são apresentados em parênteses conforme descrito no modelo Box-Behnken.

A análise de variância (ANOVA), descrita na tabela 2, é uma ferramenta que permite avaliar o ajuste do modelo, e o quanto ele consegue explicar o comportamento das respostas em função das mudanças de níveis das variáveis.

Tabela 2. Análise de variâncias no modelo de regressão para otimização de polissacarídeos obtidos do *P. camembertii* ATCC 4845

Fonte de variação	SQ	GI	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	0,006179	9	0,000687	10,57	4,77	0,95
Resíduo	0,000325	5	6,49E-05			
Falta de ajuste	0,000323	3	0,000108	107,58	19,16	
Puro erro	0,000002	2	0,000001			
SQ total	0,003260	14				

SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática

A partir da análise da ANOVA, pode-se inferir que o modelo está bem ajustado, pois a regressão foi significativa, $F_{\text{calculado}} (10,57) > F_{\text{tabelado}} (4,77)$, com intervalo de confiança de 95%. O R^2 obtido foi equivalente a 0,95, o que significa que 95% dos resultados encontrados podem ser explicados pelo modelo experimental aplicado.

A partir dos resultados da Tabela 1, foram construídos gráficos tridimensionais, relacionando as variáveis em questão (Figura 1). As condições ideais para a extração de polissacarídeos podem ser obtidas a partir das tendências do modelo que vão em direção a 13, 90°C e 180min para pH, temperatura e tempo, respectivamente.

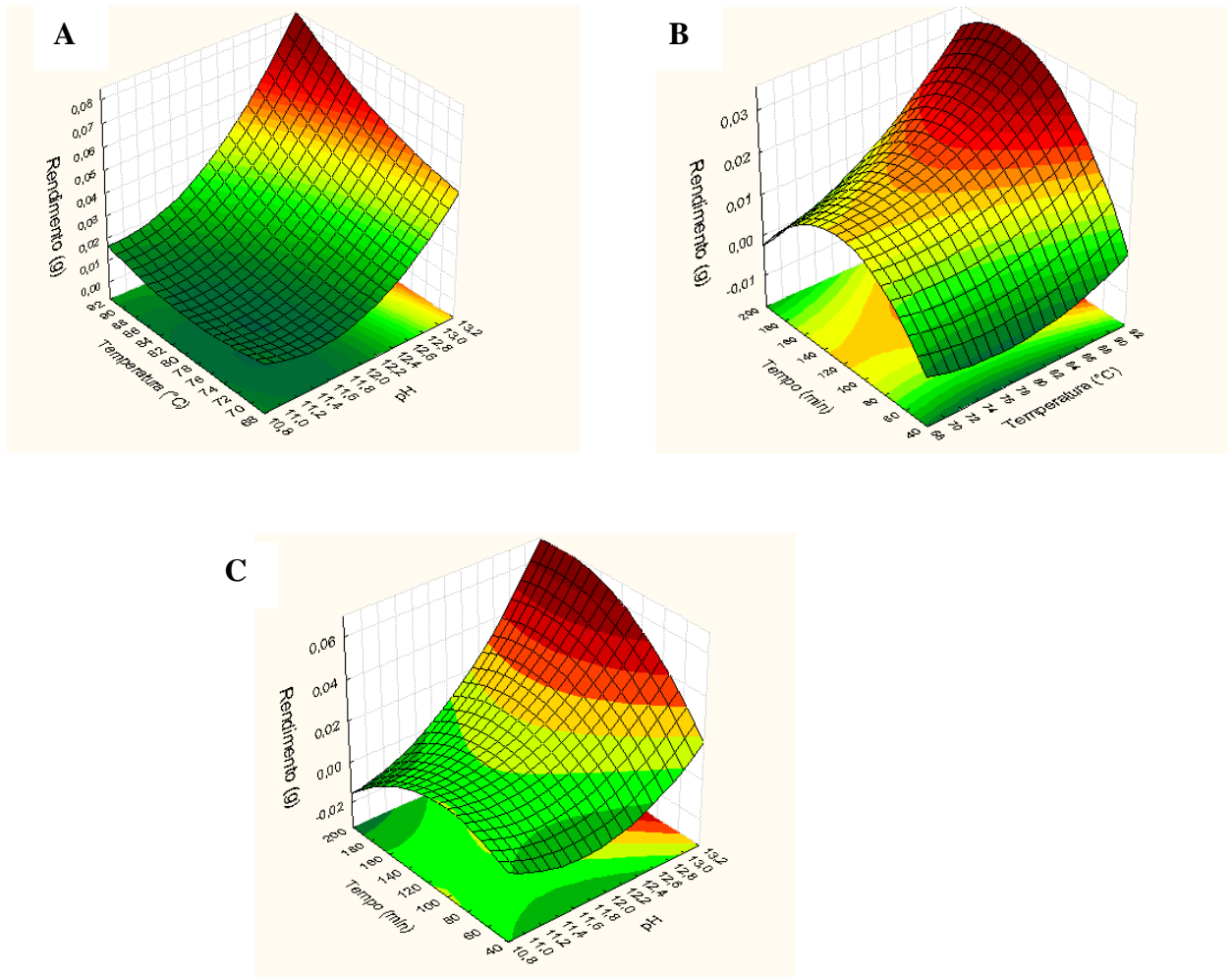


Figura 1. Gráficos de superfície de resposta para otimização da extração de polissacarídeos de *P. camembertii* ATCC 4845. (A): Temperatura e pH. (B): Tempo e Temperatura. (C): Tempo e pH.

A equação que descreve o comportamento da resposta do polissacarídeo extraído de *P. camembertii* ATCC 4845 em função das variáveis está descrita na Equação 1.

$$\text{Massa do Polissacarídeo (g)} = 2,608 - 0,0134(T) - 0,3507(\text{pH}) + 0,0126(\text{pH})^2 - 0,0019(\text{Tempo}) + 0,0006 (\text{pH})(T) + 0,0002(\text{pH})(\text{Tempo}) \quad (\text{Equação 1})$$

(T): Temperatura (°C)

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica matemática e estatística utilizada para auxiliar no planejamento de experimentos, construir modelos, investigar a melhor condição de fatores para obter as respostas desejadas e avaliar os efeitos desses fatores (Box & Behnken, 1960). O delineamento de Box-Behnken aplicado neste estudo descreveu o

comportamento bem ajustado das variáveis aplicadas na extração de polissacarídeos de *P. camemberti* ATCC 4845.

Os valores da ANOVA apontam para um tratamento estatístico representativo e assim os resultados obtidos são confiáveis e as condições otimizadas podem ser usadas para extração de polissacarídeos de *P. camemberti*.

As diferentes variáveis pH, temperatura e tempo de extração foram aplicados por outros autores na extração de polissacarídeos de fungos (Li, et al, 2012; Valasques et al., 2017). Estas variáveis foram utilizadas com base nos procedimentos utilizados na extração de polissacarídeo em geral. O rendimento máximo, utilizando as condições ótimas, foi equivalente a 14,6%. Este rendimento foi superior ao obtido por Li, et al, 2012 usando o fungo *Fusarium oxysporum* Dzf17, que obtiveram 10.86%.

3.2 Determinação da concentração de proteínas

A análise pelo método de Bradford (1976) para teor de proteína total mostrou que a amostra do polissacarídeo consistiu em 0,52% de proteína, indicando assim que é composta majoritariamente por polissacarídeo.

As proteínas podem estar ligadas aos polissacarídeos em diferentes locais e em diferentes tipos de ligações. Também pode desempenhar papel importante na modificação das propriedades de polissacarídeos, como propriedade térmica, fisicoquímica e sua bioatividade (Wang et al., 2017). No entanto, uma vez que a quantidade de proteína na amostra foi muito pequena, infere-se que esta proteína não deve influenciar significativamente a atividade antioxidante do polissacarídeo estudado.

3.3 Purificação do polissacarídeo

A cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-100 foi utilizada no processo de purificação e os resultados apontam a presença de dois picos simétricos (Figura 2). Sendo assim, a amostra é composta por um único tipo de polissacarídeo com tamanhos diferentes, os quais, foram denominados PCAM1 e PCAM2, e apresentaram diferentes valores de DP_n e MW_n equivalentes a 107 e 17,47KDa para PCAM1 e de 42 e 6,87KDa para PCAM2, respectivamente.

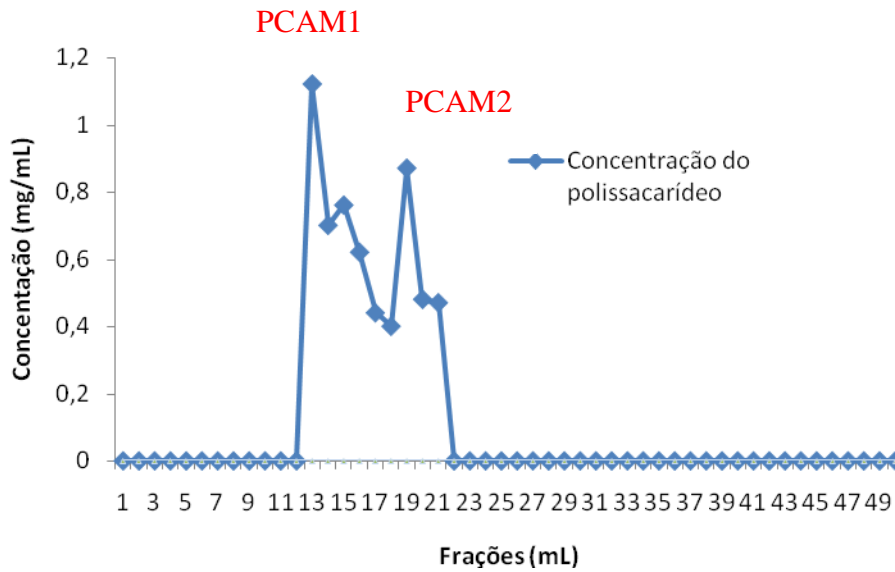


Figura 2. Perfil de eluição do polissacarídeo no Sephadex G-100 tampão fosfato citrato de sódio (pH 7,0).

Para a separação dos polissacarídeos entre si e de seus contaminantes recorre-se à diferentes tipos de técnicas cromatográficas. A cromatografia de filtração em gel é satisfatória para polissacarídeos neutros e aniônicos, separando estes biopolímeros consoante seu peso molecular e volume hidrodinâmico (Valasques Júnior et al., 2017).

3.4 Caracterização do polissacarídeo obtido de *P. camembertii* ATCC 4845

3.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

A análise do espectro de infravermelho do polissacarídeo obtido foi realizada para identificar os principais grupos funcionais que estão presentes na amostra do polímero. Como na Figura 3 é apresentado, estão presentes algumas bandas de absorção que são dignas de nota, a exemplo da banda em 3270 cm^{-1} atribuído ao estiramento de grupo hidroxila do polissacarídeo (Valasques Junior et al., 2017). A banda característica da presença de grupos -CH ($2870\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$) pode indicar a presença de anéis de carboidratos (Zhang et al., 2015). O sinal em aproximadamente 1642 cm^{-1} corresponde à água associada ao polissacarídeo (Valasques Junior et al., 2017; Zhang et al., 2018, Hussain, Rather & Suradkar, 2017). O sinal a 1540 cm^{-1} está atribuído à vibração de C-O (Zhang et al., 2015). O estiramento em 1217 cm^{-1} sugere que os monossacarídeos do polímero apresentam um anel de piranose e a curva 1369 cm^{-1} relaciona-se a vibração de estiramento do grupo CH_2 (Wang et al., 2017).

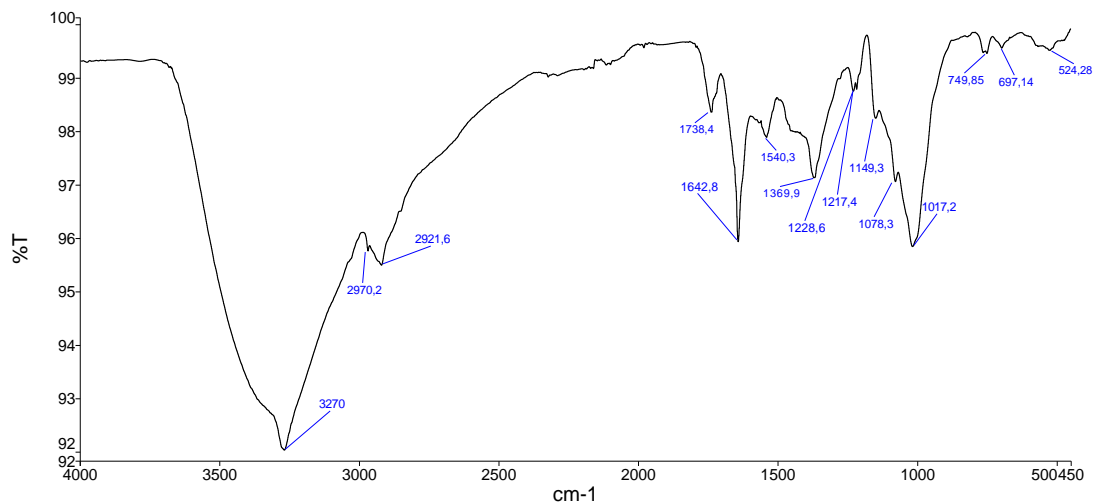


Figura 3. Espectro FT-IR do polissacarídeo produzido pelo *P. camembertii* ATCC 4845.

A banda a aproximadamente 1017 cm^{-1} foi atribuída às vibrações da ligação C-O-C e ligações glicosídicas (Valasques Junior et al., 2017, Zhang et al., 2018). Os espectros vibratórios mostraram aplicações importantes para a identificação e análise de açúcares. Os carboidratos apresentaram alta absorbância na região entre $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, a chamada região de impressão digital; em que a posição e intensidade das bandas são específicas para polissacarídeos (Ahmad et al., 2010). A absorção na região entre $1500\text{ e }1700\text{ cm}^{-1}$ está relacionada à presença de grupos funcionais correspondentes a proteínas (Ahmad et al., 2010; Limberger-Bayer et al., 2014). Essa presença de proteínas foi confirmada pela técnica descrita por Bradford (1976).

Sendo assim, o perfil do espectro apresentado está característico para polissacarídeos, muito semelhante ao perfil de espectros obtidos a partir de análise de polissacarídeos extraídos de outros fungos (Wang et al., 2013; Yan et al., 2014; Zhang et al., 2015), apresentando picos de absorção típicos para polissacarídeos presentes na amostra de polissacarídeo obtido de *P. camembertii* ATCC 4845.

3.4.2 Análise da composição monomérica

O polissacarídeo hidrolisado por Ácido Trifluoracético (TFA) foi analisado por CLAE e o perfil dos monossacarídeos avaliado como mostrado na Figura 4.

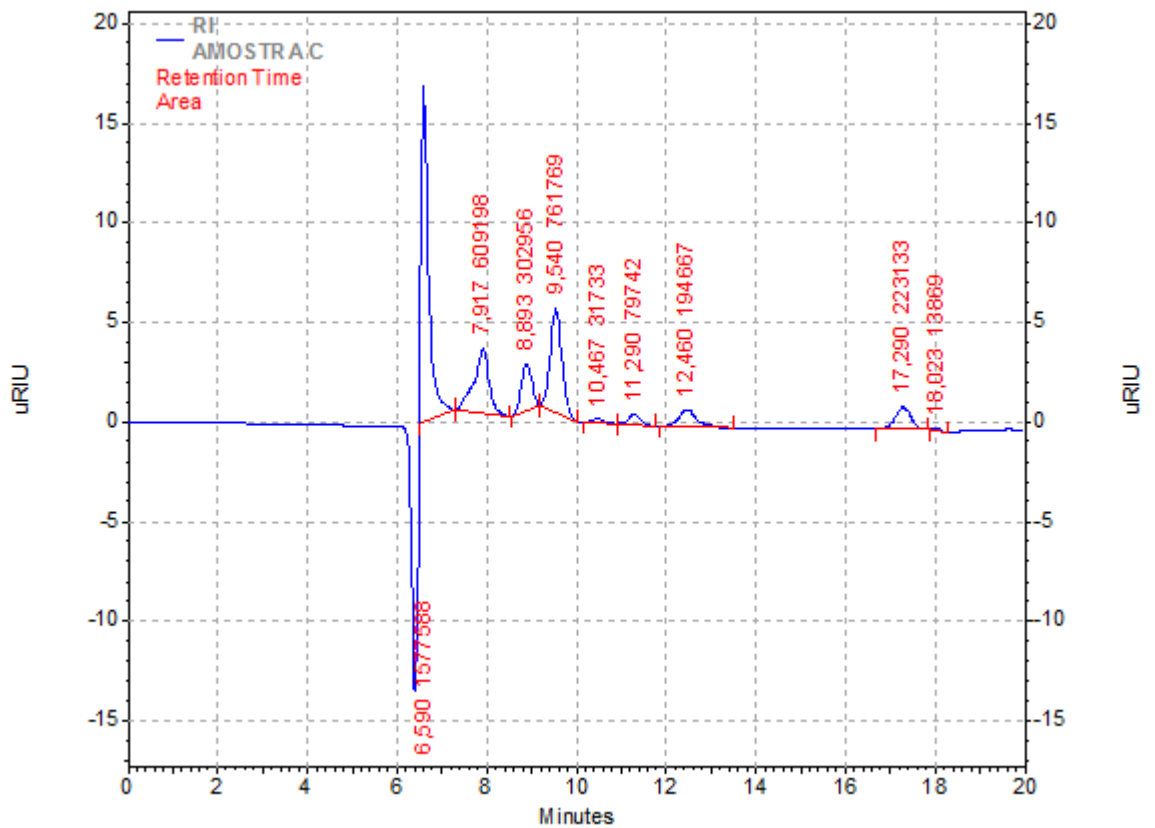


Figura 4. Cromatograma CLAE da composição monomérica de *P. camembertii* ATCC 4845.

O polissacarídeo após hidrolisado apresentou picos de tempos de retenção em seu cromatograma, que indicaram a sua composição. Através dos tempos de retenção dos padrões, comparados à amostra analisada pode-se sugerir a composição monomérica como sendo de galactose (6,59, 7,91 e 9,54 minutos) e glicose (8,89 minutos) eluídos respectivamente nessa ordem.

Estes resultados corroboram com os achados em polissacarídeo estudado por Wang, Liu & Qin (2017), em que foram encontrados arabinose, xilose, galactose, glicose e manose como composição monossacarídica. Wu et al. (2016) realizaram a extração, caracterização e atividade antioxidante de polissacarídeos de *Paecilomyces hepiali* HN1. Foram observados por CLAE a composição de manose, ribose, rhamnose, ácido glucurônico, ácido galacturônico, glicose, galactose, xilose e arabinose em diferentes proporções molares, demonstrando que os fungos são capazes de produzir inúmeros polissacarídeos com composições monoméricas diferentes, o que garante a variabilidade das atividades biológicas.

3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise do espectro de HSQC (figura 5) permitiu identificar a presença de carbono anoméricos na região (δ_C 104ppm). A presença de sinais em δ_C 83ppm indicam a ligação em C-3, como também, intensos sinais próximos de δ_C 74, δ_C 76, δ_C 71 e δ_C 62 ppm são atribuídos aos carbonos C-5, C-4, C-2 e C-6 da glicose respectivamente. O sinal em δ_C 67ppm indicam a presença de ligação em C-6 sinais próximos de δ_C 74, δ_C 77, δ_C 80 e δ_C 72 ppm são atribuídos aos carbonos C-5, C-4, C-3 e C-2 da galactose respectivamente.

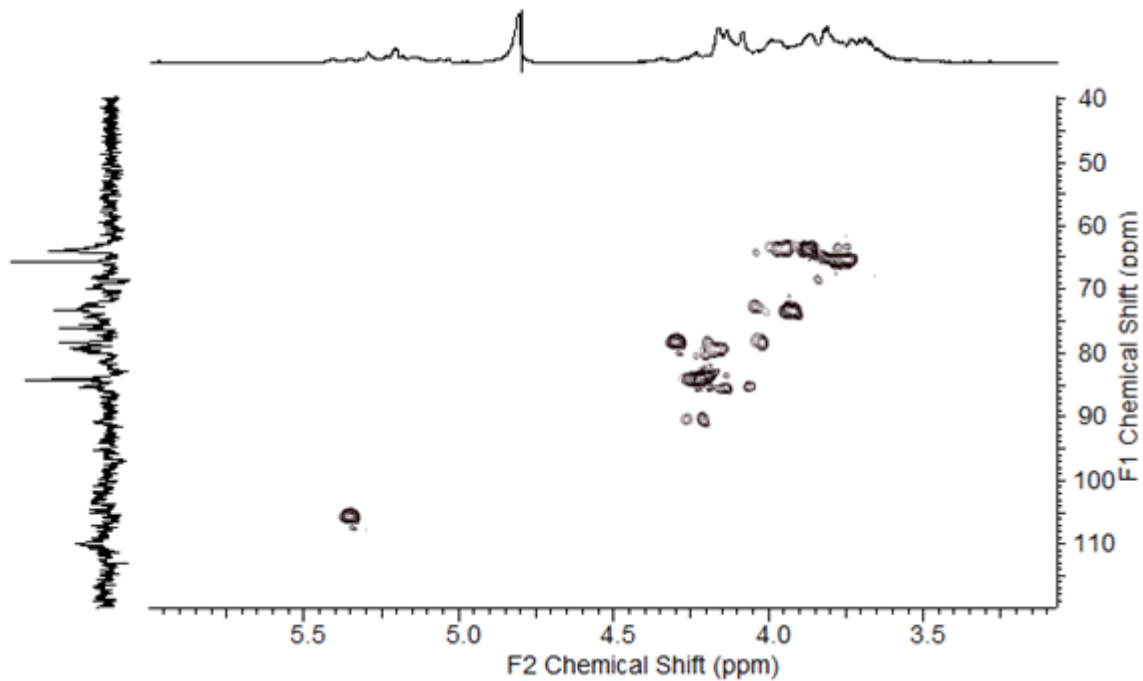


Figura 5. Espectro HSQC de polissacarídeo do *P. camembertii* ATCC 4845.

A análise do HSQC permite propor que o polissacarídeo apresenta um carbono anomérico com ligações β (δ_C 104ppm) e ligações 1 \rightarrow 6 e 1 \rightarrow 3 (δ_C 67ppm e δ_C 83ppm respectivamente). Esses sinais estão presentes em grande parte dos polissacarídeos obtidos de fungos (Li, et al, 2012; Valasques et al., 2017, Wang et al., 2017). Associado com os resultados da composição monomérica, podemos concluir que o polissacarídeo é composto por β (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) galactoglucan.

3.5 Atividade Antioxidante

A capacidade de sequestro de radical livre DPPH demonstrada pelo polissacarídeo isolado do fungo *P. camembertii* ATCC 4845 está apresentada na Figura 6. Na concentração de 0,8 mg/ml, o polissacarídeo apresentou habilidades de sequestro de 7,85% em DPPH. A

atividade máxima de 97,03% foi observada com a concentração de 6,4 mg/mL e o valor EC_{50} (Tabela 3) foi calculado e equivalente a 5,166 mg/mL.

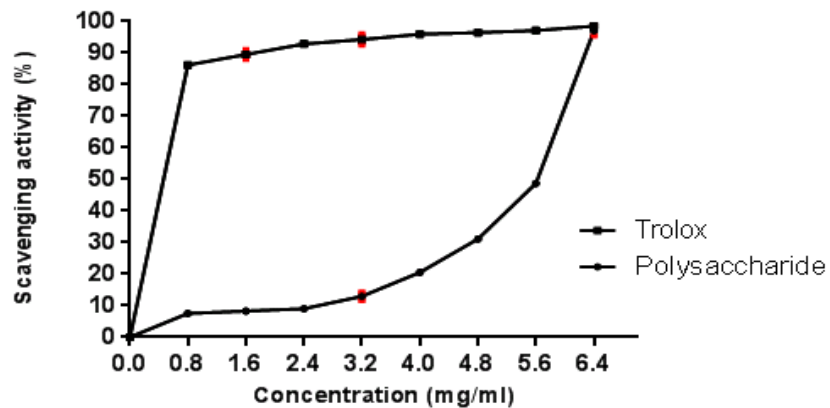


Figura 6. Capacidade de sequestro do radical livre DPPH (%) de polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. camembertii* ATCC 4845.

O polissacarídeo obtido mostrou bons resultados para atividade com DPPH como evidenciado a partir de seu valor EC_{50} (5,196 mg/mL). A capacidade de eliminação dos radicais DPPH de polissacarídeos parece estar próxima do valor encontrado em estudo de polissacarídeos PS1-1 e PS1-2 (EC_{50} na faixa de 4,56-6,81 mg/mL) do fungo marinho *Penicillium sp.* F23-2 (Sun et al., 2009).

O ensaio da capacidade de sequestro de radical livre ABTS foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante do polissacarídeo de *P. camembertii* ATCC 4845 (Figura 7).

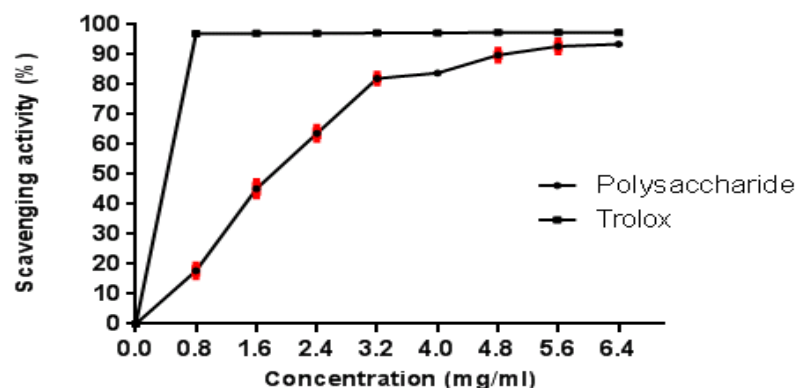


Figura 7. Capacidade de sequestro do radical livre ABTS (%) de polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. camembertii* ATCC 4845.

Na menor concentração (0,8 mg/mL), o polissacarídeo apresentou capacidade de eliminação de 22,11% em ABTS. O valor EC₅₀ (Tabela 3) do polissacarídeo foi de 1.609 mg/mL e uma atividade máxima de 93,54% foi observada na maior concentração, 6,8 mg/mL.

O resultado de EC₅₀ do polissacarídeo de 1.609 mg/mL, indicou importante capacidade de sequestro de radicais ABTS. A atividade de eliminação do radical ABTS foi consideravelmente melhor do que a do polissacarídeo (BSFP-1) isolada de *Boletus speciosus* Forst, relatada em estudo, mostrando um valor EC₅₀ de 5,02 mg/ml (Ding, Hou & Hou, 2012).

Tabela 3. Valores de EC₅₀ para polissacarídeos isolados do fungo filamentosso *P. camembertii* ATCC 4845 para propriedades antioxidantes.

Atividade antioxidante	EC ₅₀ ^a (mg/mL)
	Polissacarídeo
Capacidade de eliminação no radical DPPH	5.196 ± 0.20
Capacidade de eliminação no radical ABTS	1.609 ± 0.07

^a Valor de EC₅₀: a concentração efetiva em que os radicais DPPH e ABTS foram eliminados em 50%; O valor EC₅₀ foi obtido por interpolação a partir da análise de regressão linear.

O polissacarídeo apresenta naturalmente a presença de um grande número de grupos hidroxila, que são essenciais para a atividade antioxidante, já que são os responsáveis pela doação de elétrons para reduzir o radical a uma forma mais estável ou reagir com os radicais livres (Shen , Shi & Xu, 2013). O presente estudo sugere que os polissacarídeos isolados de *P. camembertii* ATCC 4845 podem ser utilizados para auxiliar no alívio de danos oxidativos em células induzidas por radicais de oxigênio e pode ser efetivamente explorado como potencial antioxidante na área médica-farmacêutica.

4 Conclusão

No presente estudo, as influências das variáveis temperatura, pH e tempo de extração foram investigadas e as condições ideais da produção de polissacarídeos por *P. camembertii* ATCC 4845 foram obtidas com sucesso pela MSR. O rendimento máximo de polissacarídeos pode ser obtido em condições que tendem a 90°C, 13 e 180 minutos para temperatura, pH e tempo de extração respectivamente. Os resultados da espectroscopia do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear mostram que o polímero isolado possui bandas de absorção e ligações β e α do tipo 1→3 e 1→6 compatíveis com a estrutura de polissacarídeos. Os

resultados do CLAE mostraram a presença de galactose e glicose, resultados compatíveis com a composição monomérica de polissacarídeos isolados de fungos em geral, tratando-se assim de um galactoglucan. Além disso, o polissacarídeo apresentou atividade antioxidante com capacidade de sequestro de radicais livres de DPPH e ABTS relevantes. Portanto, o polissacarídeo produzido por *P. camembertii* ATCC 4845 parece ser uma fonte promissora a ser explorada considerando sua possível ação em desordens bioquímicas associadas ao estresse oxidativo.

CAPITULO III

Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo de *Penicillium roquefortii* ATCC 10110

Revista: Carbohydrate Polymers

<https://www.elsevier.com/journals/carbohydrate-polymers/0144-8617/guide-for-authors>

Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo de *Penicillium roquefortii* ATCC 10110

Tátilla Putumujú S. Mendes¹, Gleiza M. Costa¹, Romário A. Santana¹, Edson Gabriel dos Santos¹, Baraquizio B. do Nascimento Junior¹, Helena B. Nader², Gildomar L. Valasques Junior¹

¹ Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brazil

² Laboratório de Biologia Molecular, INFAR, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio 100, São Paulo 04044-020, SP, Brazil

RESUMO

Neste estudo, os polissacarídeos obtidos do *Penicillium roquefortii* ATCC 10110 foram extraídos aplicando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) com a finalidade identificar as condições ótimas de extração usando o delineamento experimental Box-Behnken. As variáveis utilizadas neste estudo foram pH, temperatura e tempo de extração. O melhor rendimento foi obtido após 120 min de extração a uma temperatura de 86°C e pH 13. Os polissacarídeos foram caracterizados através dos métodos FT-IR, ¹H-RMN e ¹³C-RMN e CLAE, os quais permitiram identificar sinais característicos de polissacarídeos, além da composição monossacarídica sugerindo ser composto de galactose e glicose, tratando-se de um galactoglucano. O potencial de atividade antioxidante foi avaliado utilizando ensaios “*in vitro*” pela capacidade de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS, com EC₅₀ de 5.201 e 2.597 mg/mL, respectivamente, sendo superiores aos encontrados em outros estudos, mostrando que o polissacarídeo produzido por *Penicillium roquefortii* ATCC 10110 possui potencial para aplicação como auxiliar em doenças que o uso de antioxidante possa ser importante. Portanto, este estudo direciona para novas pesquisas e desenvolvimento racional da utilização do polissacarídeo produzido por *P. roquefortii* ATCC10110 em desordens bioquímicas associadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: polissacarídeo. *Penicillium roquefortii*. metodologia de superfície de resposta. atividade antioxidante.

1 Introdução

A oxidação é essencial para muitos organismos, garantindo a regulação dos processos biológicos, como na geração de energia, no crescimento das células e proteção do corpo dos invasores, a exemplo dos vírus e bactérias (Chen et al., 2016). No entanto, a geração

descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ERO's) é conhecida por resultar em processos degenerativos relacionados ao envelhecimento, bem como outros efeitos patológicos: carcinogênese, aterosclerose e danos ao DNA (Hu et al., 2010). No entanto, para evitar esse dano, o próprio organismo desenvolveu mecanismos de defesa capazes de reduzir e até restaurar os danos gerados pela superprodução dessas espécies reativas (Ding et al., 2010).

As moléculas intracelulares possuem ação antioxidante capaz de retardar ou mesmo prevenir danos aos componentes celulares. Esse efeito antioxidante pode ocorrer através da ação enzimática (enzima Superóxido Dismutase - SOD e enzima Glutathione Peroxidase). No entanto, em casos de estresse oxidativo severo, a ação protetora pode não ser suficiente, sendo necessário usar substâncias antioxidantes exógenas (Valko et al., 2006; Hu et al., 2010; Souza, et al., 2012).

A maioria dos antioxidantes encontrados no mercado são de origem sintética e estão relacionados a possíveis danos hepáticos e à carcinogênese (Sun et al., 2009). Assim, o desenvolvimento e o uso de antioxidantes, de origem natural, eficazes para proteger o organismo humano dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças são essenciais.

Os polissacarídeos são macromoléculas formados a partir de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas. São responsáveis por diversas funções biológicas importantes nos organismos de onde podem ser obtidos, como em plantas, algas e os microrganismos (Valasques et al., 2014; Ding, Hou & Hou, 2012).

Estudos recentes mostram potencial antioxidante na utilização de polissacarídeos, inclusive de fonte microbiológica. Wang et al. (2013), obtiveram um polissacarídeo extracelular a partir do fungo *Aspergillus terreus* em que se observou atividade antioxidante satisfatória, especialmente em relação à capacidade de eliminação em radicais de DPPH (1,1-difenil-2-picrilididazol). Em trabalho com polissacarídeos fúngicos de *Cordyceps kyushuensis*, as propriedades antioxidantes foram avaliadas por ensaios de vários sistemas antioxidantes *in vitro*, e dois polissacarídeos apresentavam boas propriedades antioxidantes de forma dependente da concentração utilizada (Zhang et al., 2015).

Este estudo relata uma estratégia de otimização para a obtenção de polissacarídeos de *P. roquefortii* ATCC 10110 através de experimentos estatísticos delineados. O desenho experimental de Box-Behnken foi utilizado para descrever a natureza da superfície de resposta na região experimental, investigar os valores ótimos das variáveis do meio de extração e assim maximizar o rendimento dos polissacarídeos. Após a obtenção, o

polissacarídeo foi quimicamente caracterizado e suas propriedades antioxidantes foram investigadas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo

O fungo *P. roquefortii* ATCC 10110 foi cedido pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Até o início dos experimentos foi mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA) à temperatura de 4°C.

2.2 Condições de cultura de *P. roquefortii* ATCC 10110

Para a sua ativação, o microrganismo foi incubado em meio de cultura BDA durante 5 dias à temperatura de 30°C (BOD SL200/90 Incubadora- SOLAB). O inóculo em meio líquido foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Manera et al. (2011) com algumas modificações e em balões de 250 mL contendo 125 mL de solução pH 5,0 de: 10g/L de D-glicose, 3g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte, 5g/L de peptona. O inóculo foi feito utilizando três discos de 2 cm de diâmetro contendo os microrganismos. A fermentação foi realizada a 150 rpm por 120 horas e 30°C em um agitador rotativo (Incubadora shaker SL 222, SOLAB). Após a fermentação, o meio de cultura líquido, foi filtrado à vácuo (bomba de filtro de vácuo TE-0582, TECNAL), e a biomassa do microrganismo utilizada para extrair os polissacarídeos (Dong et al., 2009).

2.3 Extração de polissacarídeo de *P. roquefortii* ATCC 10110

O polissacarídeo foi obtido a partir da biomassa seca (0,5g), extraído com 50mL de solução de hidróxido de sódio em diferentes pHs (11, 12 e 13), temperaturas (70, 80 e 90°C) e tempos de extração (60, 120 e 180min) seguindo o planejamento experimental Box-Behnken. A suspensão foi centrifugada (Modelo 206BL-EXCELSA) a 8.000 g durante 15 min. O precipitado foi descartado e foi adicionado ao sobrenadante três vezes do volume de etanol absoluto, a suspensão foi agitada e deixada em repouso por 12 horas a 4°C. Os polissacarídeos insolúveis na solução hidroalcolica foram isolados por centrifugação a 8.000g durante 20 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de polissacarídeos bruto foi seco a 50°C até peso constante, para posterior realização dos demais experimentos. Os conteúdos de polissacarídeos foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois, et al. (1956). O rendimento do produto foi determinado pela relação (p/p)% de polissacarídeos por unidade de massa de biomassa.

2.4 Planejamento experimental

O planejamento experimental Box-Behnken (Box & Behnken, 1960) foi utilizado para avaliar a influência da temperatura (°C), o pH e o tempo de extração (minutos) na extração do polissacarídeo. Foram realizadas três repetições do ponto central (C) com intuito de estimar o possível erro puro, e os tratamentos experimentais foram variados aleatoriamente para detectar a presença de possíveis erros sistemáticos, totalizando quinze ensaios experimentais. A temperatura foi estudada variando de 70 a 90°C, o tempo de 60 a 180 minutos e o pH foi estudado variando de 11 a 13, em que todas as variáveis foram estudadas em 3 níveis. O tratamento estatístico foi realizado com auxílio do software Statistica® versão 10.0, incluindo a análise de variância (ANOVA).

2.5 Determinação da proteína total na amostra

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para que a concentração de proteína fosse determinada, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.6 Purificação do polissacarídeo

Para a purificação, a amostra de polissacarídeo (15 mg/mL) foi aplicada em coluna Sephadex G-100 (Sigma, EUA) (30×1,0 cm), previamente equilibrada em tampão fosfato citrato de sódio (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), o qual também foi usado como fase móvel. Foram recolhidas frações (1,5 mL) e dosado polissacáridos totais pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956)

2.7 Caracterização química do polissacarídeo

2.7.1 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear

O método de espectroscopia de Infravermelho (IR) com transformada de Fourier (modelo Varian Inova 500) foi realizado com o polímero seco e moído e pressionado em pellets para medição espectral FT-IR na faixa de frequência de 4000 - 500 cm⁻¹, com 20 varreduras. Na análise espectroscópica de RMN, o espectro foi registrado a 300 K em um espectrômetro Varian Inova 500, operando a 11,7 T, observando ¹³C em 125 MHz e usando sonda direta. As amostras foram dissolvidas em D₂O e transferidas para o tubo de RMN. O TMS foi utilizado como referência de mudança química (δ 0,0). D₂O (99,9%) foi adquirido por Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (EUA).

2.7.2 O peso molecular médio (MW_n) e grau de polimerização (DP_n)

O Peso Molecular (MW_n) e Grau de Polimerização (DP_n) dos polissacarídeos foram determinados pela medida do valor do açúcar redutor utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) e do açúcar total utilizando o método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956), e aplicando a fórmula descrita por Vettori, Franchetti & Contiero (2012): $DP_n = [(\text{carboidratos totais em } \mu\text{g de D-glicose}) / (\text{valor de redução em } \mu\text{g de maltose})] \times 1.9$; $MW_n = [(DP_n) \times 162] + 18$.

2.7.2 Composição monomérica do polissacarídeo

Antes de submeter a amostra no aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) o polissacarídeo de *P. roquefortii* ATCC 10110 (20 mg) foi hidrolisado com ácido trifluoroacético 2M (TFA) a 90° C durante 8h, seguido de evaporação (Ruthes et al., 2013). O sólido hidrolisado obtido foi solubilizado em água ultrapura, a solução foi filtrada e analisada por CLAE usando a coluna Amines® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm i.d.) (9 µm) (BIO-RAD, Califórnia, EUA) e detecção de índice de refração; o volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi uma solução aquosa de H₂SO₄ 0,01N de forma isocrática a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida à 25°C. Para a identificação do pico, foram utilizados padrões de açúcares: glicose, rhamnose, galactose, manose, arabinose e xilose (Sigma, EUA), sendo que todos receberam tratamento de hidrólise previamente. A determinação da composição de monossacarídeos foi feita em dois experimentos independentes com resultados consistentes.

2.8 Avaliação da atividade antioxidante

As atividades antioxidantes das amostras de polissacarídeos de *P. roquefortii* ATCC 10110 foram avaliadas utilizando os métodos de sequestro de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo) e do radical ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), descrito por Rufino et al., (2007), com algumas modificações.

Para o ensaio de DPPH, 100µL da amostra (0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6 e 6,4 mg/mL) foi adicionada em 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,06 mM). Após 20 min a 25°C, a absorbância foi medida a 517 nm. No ensaio ABTS⁺, primeiro foi preparado o radical ABTS por reação da concentração de sal ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) e deixando a mistura ao abrigo de luz à temperatura ambiente durante 16 h antes da utilização. A solução ABTS⁺ em estoque foi diluída com etanol (absorbância de 0,700 ±0,005 nm) e incubada com 30µL (0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6 e 6,4 mg/mL) da amostra e

3,0mL da solução etanólica de ABTS. A absorvância foi medida a 734 nm após 6 minutos de incubação. Em ambos os experimentos, os valores foram expressos como a concentração de amostra necessária para reduzir 50% dos radicais livres (EC_{50}). Nos dois ensaios (DPPH e $ABTS^+$), a atividade antioxidante foi medida usando Trolox como controle positivo.

2.7 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD) ou EC_{50} com base nos experimentos independentes. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas por ANOVA e com pós-teste de Tukey usando GraphPad 7.00.

3 Resultados e Discussão

3.1. Extração de polissacarídeos

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma poderosa ferramenta estatística usada para otimizar processos complexos que são afetados por diferentes variáveis (Ji et al., 2012), a exemplo da extração de biocompostos. A vantagem desta metodologia é o número reduzido de experimentos necessários para otimização simultânea das múltiplas variáveis e a avaliação de suas inerações (Wang et al., 2017).

O delineamento experimental Box-Behnken foi realizado com três variáveis, o que totaliza 15 experimentos com replicata do ponto central. Os três ensaios do ponto central foram incluídos para estimar o erro experimental inerente dos experimentos. Os resultados da aplicação do modelo experimental para obtenção de polissacarídeo de *P. roquefortii* ATCC 10110 pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Delineamento Box-Behnken aplicado para otimização das condições de extração de polissacarídeos de *P. roquefortii* ATCC 10110

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Massa (g)
1	11 (-1)	90 (+1)	120 (0)	0,0005
2	12 (0)	90 (+1)	60 (-1)	0,0019
3	12 (0)	90 (+1)	180 (+1)	0,0017
4	13 (+1)	90 (+1)	120 (0)	0,0156
5	11 (-1)	80 (0)	60 (-1)	0,0004
6	11 (-1)	80 (0)	180 (+1)	0,0024
7C	12 (0)	80 (0)	120 (0)	0,0091
8C	12 (0)	80 (0)	120 (0)	0,0075
9C	12 (0)	80 (0)	120 (0)	0,0081
10	13 (+1)	80 (0)	60 (-1)	0,0092
11	13 (+1)	80 (0)	180 (+1)	0,0120
12	11 (-1)	70 (-1)	120 (0)	0,0017
13	12 (0)	70 (-1)	60 (-1)	0,0007
14	12 (0)	70 (-1)	180 (+1)	0,0011
15	13 (+1)	70 (-1)	60 (0)	0,0050

(C): ponto central; Os valores codificados são apresentados nos parênteses conforme descrito no modelo Box-Behnken.

A adequação do modelo foi verificada pela distribuição de Fisher (teste F) e pelo coeficiente de determinação R^2 (Tabela 2). A análise de variância mostrou que este modelo está bem ajustado, não apresentando falta de ajuste ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) demonstrando que os resultados obtidos não são de ordem aleatória. O teste F para regressão indicou que o mesmo foi significativo apresentando um $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} ($22,61 > 4,77$).

Tabela 2. Análise de variâncias no modelo de regressão para otimização de polissacarídeos obtidos do *P. roquefortii* ATCC 10110

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	0,000317	9	3,52E-05	22,61	4,77	0,976
Resíduo	0,000008	5	1,56E-06			
Falta de ajuste	0,000006	3	0,000002	3,30	19,16	
Puro erro	0,000001	2	0,000001			
SQ total	0,000325	14				

SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática

A adequação do modelo também foi confirmada por um coeficiente de determinação satisfatório (0,976). Esse resultado indica que 97,6% dos resultados encontrados podem ser explicados pelo modelo experimental aplicado.

A equação que descreve o comportamento da resposta do polissacarídeo extraído de *P. roquefortii* ATCC 10110 em função das variáveis está descrita na Equação 1.

$$\text{Massa do Polissacarídeo (g)} = 0,1410 + 0,0028(T) + 0,0488(\text{pH}) + 0,0016(\text{pH})^2 + 0,002(\text{Tempo}) + 0,0002(\text{pH})(T) \quad (\text{Equação 1})$$

(T): Temperatura (°C)

Através dos resultados da Tabela 1 e ajuste de uma função quadrática, obtiveram-se os gráficos de superfície que relacionam as variáveis estudadas e a resposta obtida (Figura 1). As condições ótimas para a extração de rendimentos mais altos de polissacarídeos podem ser obtidas a partir da observação da tendência do gráfico e dentro das regiões experimentais e seus valores foram 13, 86°C e 120min foram para pH, temperatura e tempo de extração, respectivamente. O rendimento máximo utilizando esse modelo foi equivalente a 17,1%, esse resultado é próximo ao obtido por outros autores, como Dong et al. (2009), que obtiveram um rendimento de 16,10% na extração de polissacarídeos do micélio cultivado de *Cordyceps sinensis*, utilizando outra metodologia de extração.

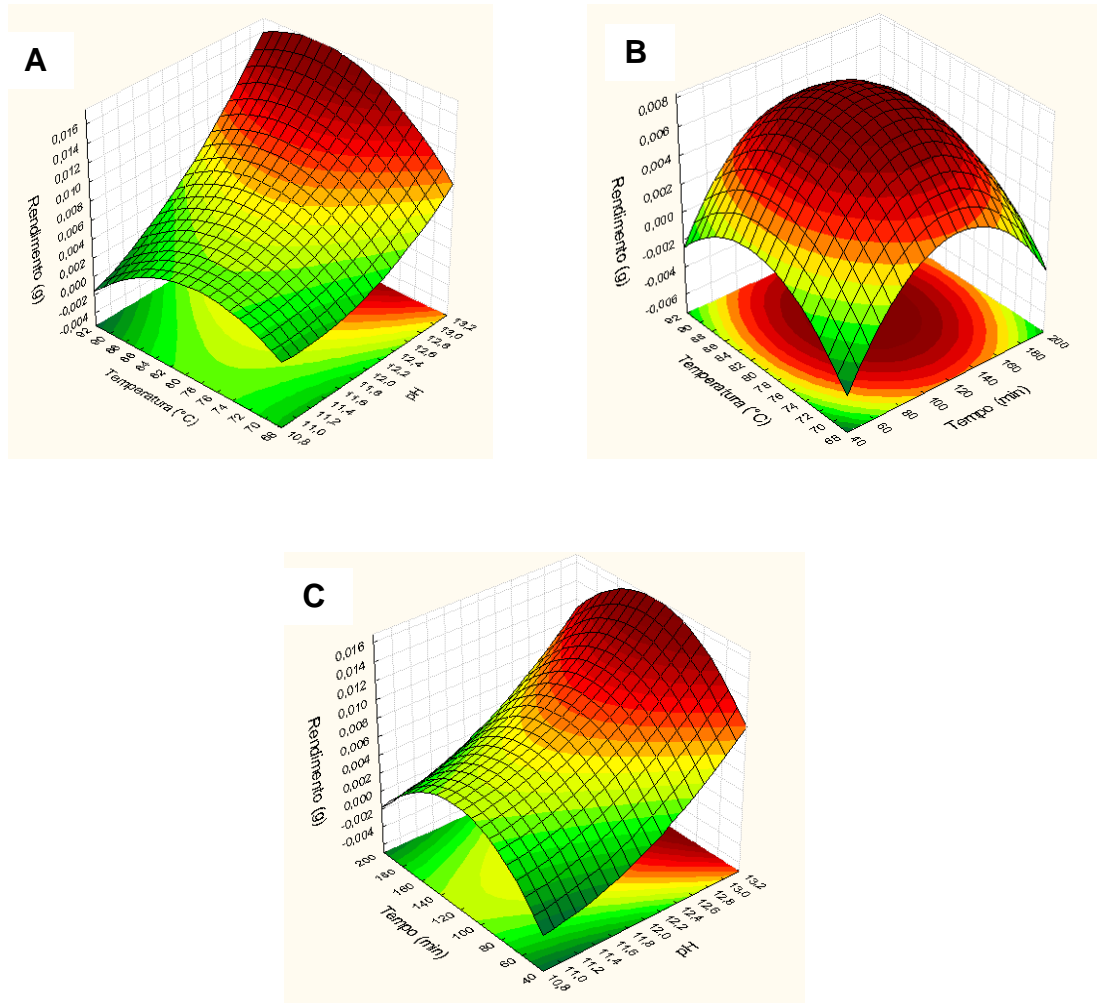


Figura 1. Gráficos de superfície de resposta para otimização da extração de polissacarídeos de *P. roquefortii* ATCC 10110. (A): pH e temperatura. (B): Temperatura e Tempo. (C): pH e tempo.

Os resultados foram consistentes de acordo com o rendimento do polissacarídeo, o que também implica que o modelo matemático é adequado para a simulação da produção de polissacarídeos no presente estudo.

3.2 Determinação da concentração de proteína

A aplicação do método descrito por Bradford (1976) indicou que a amostra de polissacarídeos de *P. roquefortii* é composto por apenas 0,25% do peso em proteína, indicando que a amostra é composta principalmente por polissacarídeos.

3.3 Purificação do polissacarídeo

A cromatografia em coluna Sephadex G-100 foi utilizada no processo de purificação e os resultados mostraram a presença de apenas um pico simétrico (Figura 2). Tais resultados indicaram a presença de apenas um tipo de polissacarídeos com peso molecular médio de 77 kDa e DPn de 475 avaliados pela aplicação do método descrito por Vettori, Franchetti & Contiero (2012).

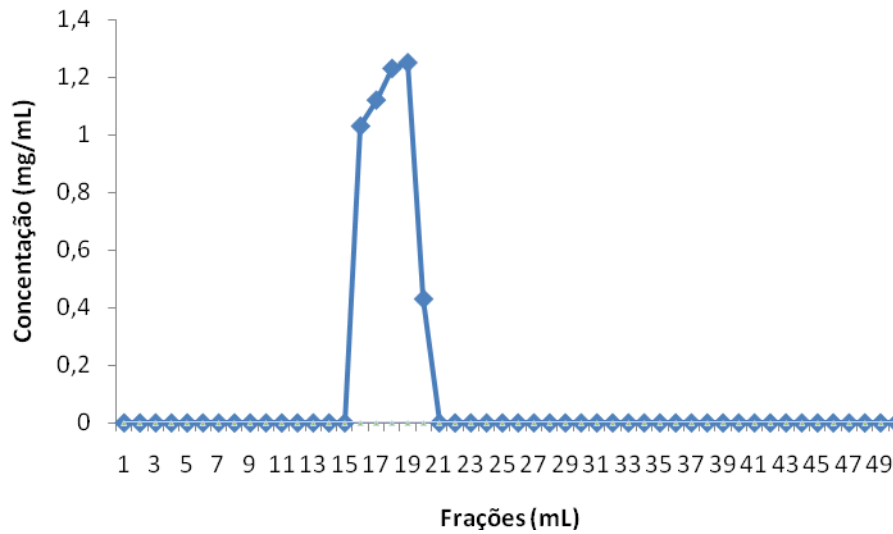


Figura 2. Perfil de eluição do polissacarídeo no Sephadex G-100 tampão fosfato citrato de sódio (pH 7,0).

3.4 Caracterização do polissacarídeo de *P. roquefortii* ATCC 10110

3.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IV)

A presença de um estiramento forte e largo em torno de 3276 cm^{-1} observada no espectro de FT-IR (Figura 3) está relacionada à vibração de estiramento O-H e outra banda de absorção de intensidade moderada a 2921 cm^{-1} trata-se de uma vibração de estiramento C-H. (Valasques et al., 2017; Zhang et al., 2018). A banda característica do estiramento e duplicação de C-H na região de $2870\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ pode indicar a presença de anéis de carboidratos (Zhang et al., 2015). A banda que aparece a 1643 cm^{-1} está relacionada a absorção característica da hidratação do açúcar (Valasques et al., 2017; Hussain, Rather & Suradkar, 2017; Zhang et al., 2018). O sinal em torno de 1546 cm^{-1} foi atribuído à vibração de C-O (Zhang et al., 2015).

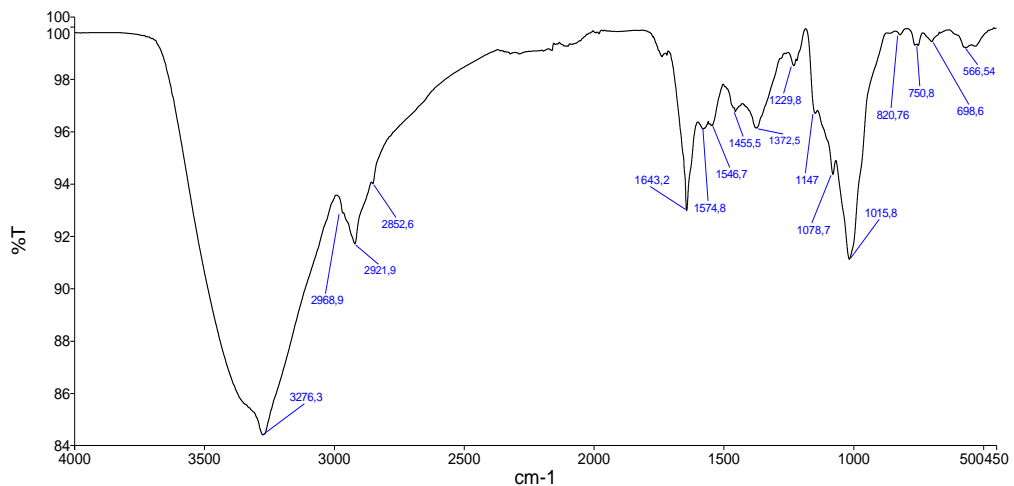


Figura 3: espectro FT-IR do polissacarídeo produzido a partir do *P. roquefortii* ATCC 10110.

Sinais na região de $1160\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (1147, 1078 e 1015) deve-se às ligações C-O-C e C-O-H de unidades típicas de açúcar na forma de piranose (Zhang et al., 2018). A chamada região de impressão digital, na qual os carboidratos possuem banda característica, está na apresentada na região em torno de $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$. Nesta região, a posição e intensidade das bandas são específicas para o polissacarídeo presente na parede celular e permite a identificação da presença de polissacarídeos (Valasques et al., 2017; Vettori, Franchetti & Contiero, 2012). A absorção na região entre $1700\text{ e }1500\text{ cm}^{-1}$ (1643, 1574 e 1546) está relacionada à presença de grupos funcionais correspondentes à presença de proteínas (Valasques et al., 2014; Ahmad et al., 2010; Limberger-Bayer et al., 2014; Hussain, Rather & Suradkar, 2017). Esta presença de proteínas foi confirmada pela técnica descrita por Bradford (1976).

Portanto, o perfil do gráfico e bandas de absorção apresentados no FT-IR foi característico para polissacarídeos assim como apresentado em outros estudos e estão presentes no polissacarídeo de *P. roquefortii* ATCC 10110 (Valasques et al., 2017; Zhang et al., 2018; Hussain, Rather & Suradkar, 2017).

3.4.2 Análise da composição monomérica

O polissacarídeo foi hidrolisado por Ácido Trifluoracético- TFA em unidades monoméricas e analisado por CLAE em que se revelou sua composição monomérica (Figura 4).

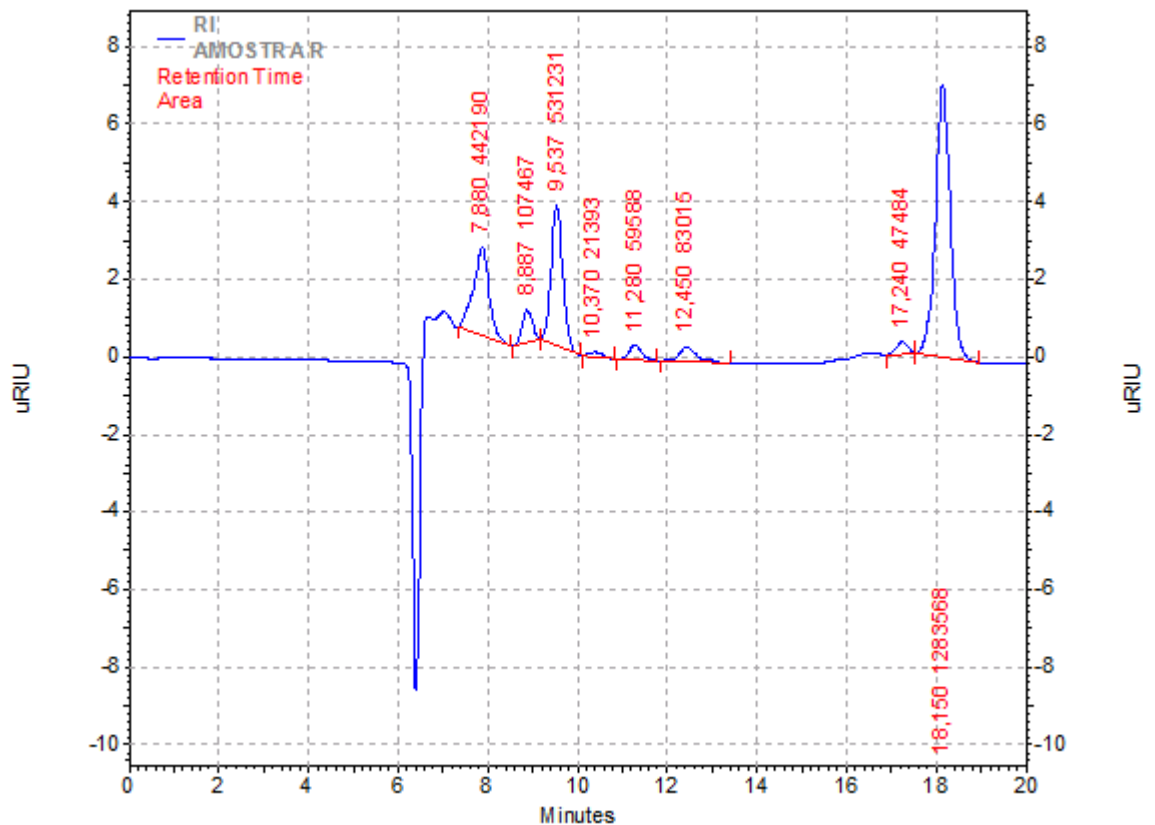


Figura 4. Cromatograma CLAE da composição monomérica de *P. roquefortii* ATCC 10110

Podem ser observados diferentes picos característicos de diferentes açúcares presentes na composição do biopolímero obtido do *P. roquefortii*. Ao avaliar os tempos de retenção dos padrões, comparados à amostra analisada pode-se sugerir que a composição monossacarídica trata-se de galactose (7,8 e 9,5 minutos) e glicose (8,8 minutos). O pico no tempo de 18,1 minutos foi característico tanto no padrão de galactose quanto de glicose.

Em estudo realizado por Zhang et al, (2018) em que a estrutura de um polissacarídeo também foi caracterizada, foram encontrados em um mesmo polissacarídeo os monossacarídeos: galactose, glicose e manose caracterizando-o como sendo galactomannoglucan. Ao ser identificado 2 açúcares (galactose e glicose) no presente trabalho, podemos caracterizar o polissacarídeo isolado como sendo, provavelmente, um galactoglucan.

3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise do espectro de HSQC (Figura 5) permitiu propor os tipos de ligação do polissacarídeo obtido.

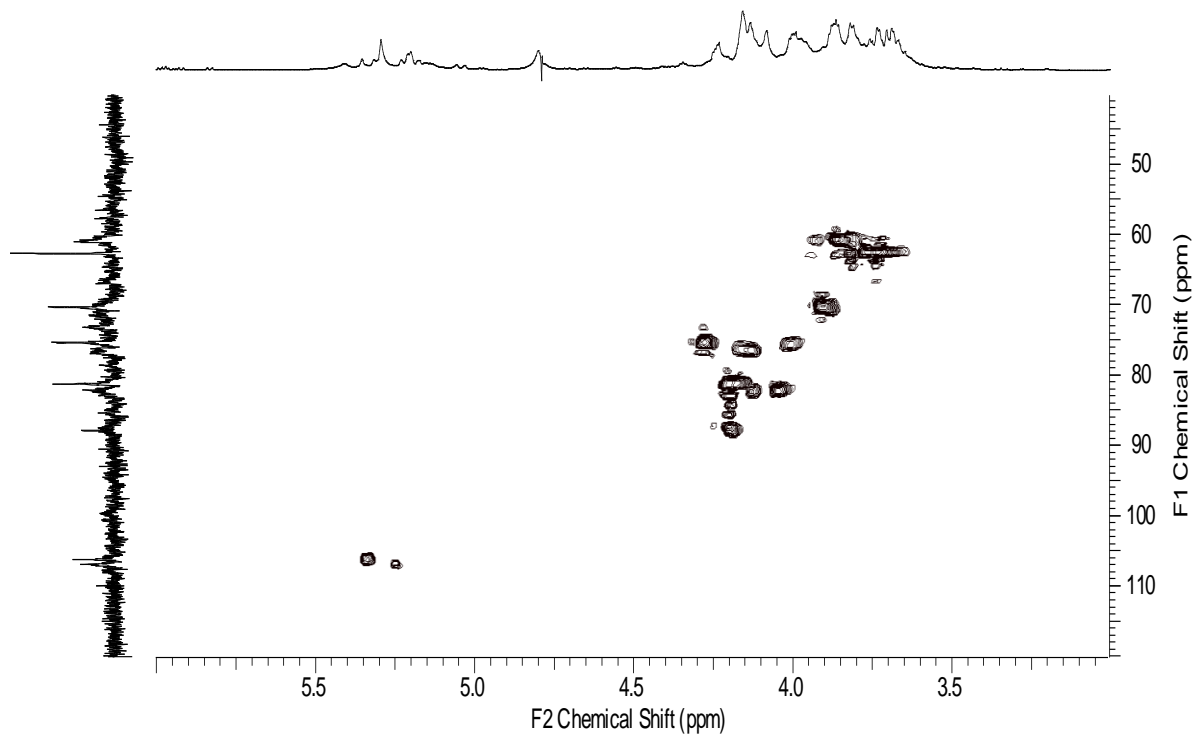


Figura 5. Espectro HSQC de polissacarídeo do *P. roquefortii* ATCC 10110.

A análise do HSQC permite identificar dois sinais correspondentes a carbonos anomérico C-1 δ_C 106 ppm e 104 ppm correspondentes à glicose e galactose respectivamente. A presença de sinais em δ_C 83 ppm indicam a ligação em C-3, como também, intensos sinais próximos de δ_C 75, δ_C 76, δ_C 72 e δ_C 61 ppm são atribuídos aos carbonos C-5, C-4, C-2 e C-6 da glicose respectivamente. O sinal em δ_C 86 ppm indicam a presença de ligação em C-3 sinais próximos de δ_C 75, δ_C 76, δ_C 71 e δ_C 63 ppm são atribuídos aos carbonos C-5, C-4, C-2 e C-6 da galactose respectivamente. Sendo assim, os sinais presentes no HSQC associados aos resultados da CLAE e a Cromatografia de Exclusão Molecular permitem afirmar que a amostra consiste de β -(1 \rightarrow 3)-galactoglucan (Li, et al, 2012; Valasques et al., 2017, Wang et al., 2017).

3.5 Atividade Antioxidante

O teste de eliminação de radicais livres DPPH é tipicamente utilizado para avaliar as atividades de neutralização de radicais livres de compostos puros ou em mistura (Figura 6).

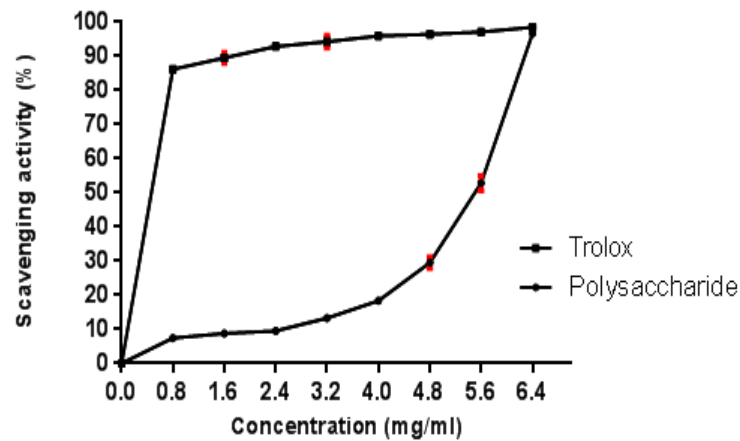


Figura 6. Atividade antioxidante do polissacarídeo isolado do fungo filamentoso *P. roquefortii* ATCC 10110 frente ao radical livre de DPPH (%).

O polissacarídeo de *P. roquefortii* demonstrou uma atividade de eliminação de radical dependente da concentração, na faixa de concentrações testadas. Na concentração de 6,4 mg/mL, as habilidades de eliminação aumentaram até atingir um valor máximo de 96,71%. O valor EC_{50} calculado (Tabela 3) foi de 5,201 mg/mL. Além disso, esse valor encontrado na maior concentração (96,71%) para atividade de eliminação de radicais DPPH a 6,4 mg/mL foi compatível com a referência de Trolox (98,51%).

Em estudo em que a propriedade antioxidante dos polissacarídeos obtidos de *Penicillium sp.* F23-2 (Sun et al, 2009) foi avaliada, a atividade de sequestro de radicais livres DPPH foram semelhantes às de *P. roquefortii* ATCC 10110 no presente estudo, utilizando em ambos os trabalhos as mesmas concentrações de polissacarídeo. Já em relação ao valor de EC_{50} , para os polissacarídeos de *Penicillium sp.* F23-2, os valores variaram entre 2.53-6.81mg/mL, sendo que o polissacarídeo estudado apresentou valor dentro dessa mesma faixa.

Em trabalho realizado por Ding, Hou & Hou (2012) em que foi avaliada a atividade antioxidante de polissacarídeo isolado de *Boletus speciosus*, foi encontrado um valor EC_{50} de 7,4 mg/mL para o teste DPPH e 5,02 mg/mL para o sequestro dos radicais livres ABTS. Portanto, o *P. roquefortii* ATCC 10110 mostrou atividade de eliminação superior de radicais DPPH e ABTS, quando comparados os valores de EC_{50} .

Conforme mostrado na Figura 7, a capacidade do polissacarídeo estudado na eliminação de radicais ABTS foi também foi concentração dependente. Na maior concentração (6,4 mg/mL) foi observada a maior capacidade de eliminação do radical ABTS (90,78%), próximo ao valor encontrado para a referência Trolox (97,48%). O valor EC_{50} como mostrado na Tabela 3 foi de 2,597 mg/mL.

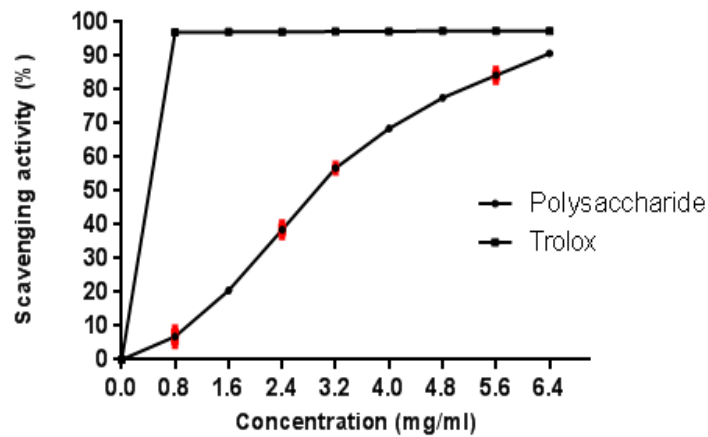


Figura 7. Capacidade de eliminação do radical ABTS (%) por polissacarídeo isolado do fungo filamentoso *P. roquefortii* ATCC 10110.

O ensaio de sequestro de radical livre ABTS é um modelo amplamente utilizado para o ensaio de atividade antioxidante de compostos naturais, por sua viabilidade e eficiência (Wang et al., 2017; Ding, Hou & Hou, 2012). A atividade de sequestro de radical livre ABTS foi consideravelmente melhor do que em polissacarídeos relatados em outros estudos. Como no trabalho realizado por Li & Wang (2016), por exemplo, em que foi avaliada a atividade antioxidante do polissacarídeo obtido de *H. serotina*, apresentou um valor de EC₅₀ de 19,32 mg/mL, foi muito superior ao encontrado no presente estudo (2,597mg/mL), o que aponta a possível superioridade do polissacarídeo de *P. roquefortii* ATCC 10110 em relação a eliminação de radicais livres ABTS.

Tabela 3. Valores de EC₅₀ para polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *P. roquefortii* ATCC 10110 em propriedades antioxidantes.

Atividade antioxidante	EC ₅₀ ^a (mg/mL)
	Polissacarídeo
Capacidade de eliminação no radical DPPH	5.201±0.22
Capacidade de eliminação no radical ABTS	2.597±0.09

^a Valor de EC₅₀: a concentração efetiva em que os radicais DPPH e ABTS foram eliminados em 50%; O valor EC₅₀ foi obtido por interpolação a partir da análise de regressão linear.

Em geral, para ambos os testes de atividade antioxidante foi observado que o polissacarídeo exibiu um grau variável de atividade antioxidante de uma maneira dependente da concentração.

Ao comparar os dois ensaios antioxidantes, os resultados indicaram que o polissacarídeo exerceu maior capacidade de sequestro de radical livre ABTS. A presença de um grande número de grupos hidroxila no polissacarídeo é essencial para a atividade antioxidante, o que permite doar elétrons para reduzir o radical a uma forma mais estável ou reagir com os radicais livres para neutralizá-lo através da transferência de um átomo de hidrogênio (Oliveira, 2015; Shen, Shi e Xu, 2013). Estes resultados demonstraram que o polissacarídeo estudado apresentou um efeito notável, podendo ser explorado como uma alternativa natural como antioxidante.

5 Conclusão

De acordo com os resultados expostos de caracterização, verificou-se que o polissacarídeo obtido de *P. roquefortii* ATCC 10110 trata-se de um polissacarídeo com ligações β do tipo 1 \rightarrow 3 composto de glicose e galactose, ou seja, uma β -(1 \rightarrow 3)-galactoglucan. Também foi possível avaliar a influência da temperatura, pH e tempo de extração dos polissacarídeos obtidos através da Metodologia da Superfície de Resposta, sendo 86°C, 13 e 120min para temperatura, pH e tempo respectivamente, as condições que foram observados maior rendimento. Os testes antioxidantes "*in vitro*" demonstraram que o polissacarídeo obtido de *P. roquefortii* ATCC 10110 possui atividade de sequestro de radicais livres superiores a outros polissacarídeos, tendo o Trolox como controle positivo. Novos estudos em curso nos permitirão compreender os mecanismos precisos de ação da atividade antioxidante do polissacarídeo isolado, como também, avaliação "*in vivo*" dessa atividade utilizando testes em camundongos.

CAPITULO IV

Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo obtido de *Aspergillus niger*

ATCC 1004

Revista: Carbohydrate Polymers

<https://www.elsevier.com/journals/carbohydrate-polymers/0144-8617/guide-for-authors>

**Extração, caracterização e atividade antioxidante do polissacarídeo obtido de
Aspergillus niger ATCC 1004**

Tátilla Putumujú S. Mendes¹, Gleiza M. Costa¹, Romário A. Santana¹, Edson Gabriel dos Santos¹, Baraquizio B. do Nascimento Junior¹, Helena B. Nader², Gildomar L. Valasques Junior¹

¹ Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brasil

² Laboratório de Biologia Molecular, INFAR, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio 100, São Paulo 04044-020, SP, Brasil

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo otimizar a extração, caracterização química e avaliação da capacidade antioxidante de polissacarídeos da parede celular obtidos de *Aspergillus niger* ATCC 1004. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada para otimizar a extração através do planejamento experimental fatorial de três níveis, em que foram encontrados para as variáveis o resultado de 13 para pH e 180 minutos para o tempo de extração ótimos. Os grupos funcionais e os tipos de ligações presentes no polissacarídeo foram identificados utilizando a espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) o que permitiram prever que o polissacarídeo em estudo é, possivelmente, um β-(1→3)-α-(1→6)-galactoglucan, muito semelhantes aos perfis de espectros obtidos a partir da análise de outros fungos. A atividade antioxidante da amostra foi avaliada através de dois testes “*in vitro*”, que avaliam a capacidade de eliminação de radicais livres do 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH), e do 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico ácido) diamônio (ABTS⁺). Como resultado para o sequestro desses radicais, o valor de EC₅₀ observado foi de 4,632mg/mL e 3,765 mg/mL para DPPH e ABTS, respectivamente. Assim, o polissacarídeo obtido de *Aspergillus niger* é uma fonte promissora na aplicação como antioxidante.

Palavras-chave: polissacarídeo. *Aspergillus niger*. Caracterização química. metodologia de superfície de resposta. atividade antioxidante.

1 Introdução

Os fungos são heterotróficos, eucariontes, geralmente filamentosos e multicelulares

(Slivinski, 2007). Os fungos filamentosos, também conhecidos como bolores, são seres que possuem parede celular rígida, sua reprodução é sexual e/ou assexuada e sua estrutura morfológica fundamental é a hifa. Podem se apresentar como seres unicelulares, na forma de leveduras, ou multicelulares formadas por micélio (Tortora, 2012). São de grande interesse industrial, possuindo vasta oferta de produtos metabólicos, entre eles: ácidos, álcoois, esteróis, enzimas, antibióticos, corantes, pigmentos e polissacarídeos (Rocha, 2010).

Aspergillus niger é composto de filamentos celulares longos. Faz parte de um grupo de microrganismos aeróbicos fisiologicamente diversos, que vem sendo utilizados na biotecnologia há muitos anos, possuem em sua parede celular vários polissacarídeos e, portanto, podem ser uma boa fonte de obtenção desse composto (Koneman, 2012; Miyaoka, 2012; Rocha, 2010).

O polissacarídeo é um tipo de polímero natural, geralmente composto de mais de 10 monossacarídeos que estão unidos por ligações glicosídicas em cadeias lineares ou ramificadas com alto peso molecular (Yu, Shen, Song & Xie, 2017). Apresentam-se principalmente nas formas de glucana, manana e galactana (Kaori Fukuda, 2009).

Os polissacarídeos são amplamente distribuídos na natureza e são classificados de acordo com o tipo de ligação glicosídica [α , β] da cadeia principal. Nos fungos, essas moléculas participam como componentes do citosol, da parede celular e como polissacarídeos excretados no meio. As β -glucanas são as formas predominantes encontradas nos fungos (Feofilova, 2010; Da Silva et al., 2006).

A aplicação mais recente e promissora dos polissacarídeos está relacionada a utilizações médico-farmacêuticas e pode apresentar interesse na clínica médica associada a possíveis aplicações em diferentes patologias, podendo atuar como: anti-inflamatório (Cheng et al., 2016; Du et al., 2015), antitumoral (Hussain, Rather & Suradkar, 2017), potencial imunomodulador (Kaori Fukuda et al., 2009; Yu et al., 2017) e antioxidante (Qu et al., 2016; Chen et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar a extração, caracterizar e avaliar a capacidade antioxidante do polissacarídeo da parede celular do fungo *Aspergillus niger*, com a finalidade de investigar seu potencial frente a alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo.

2 Materiais e métodos

2.1 Microrganismo

O fungo *A. niger* ATCC 1004 foi obtido da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). O microrganismo foi mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA) à temperatura de 4°C até o início dos experimentos.

2.2 Condições de cultivo de *A. niger*

O fungo foi incubado em um meio de cultura de BDA para ativação durante 5 dias a 30°C (BOD SL200 / 90 Incubadora - SOLAB). Para o cultivo, o inóculo foi feito em meio líquido utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultura pH 5,0 contendo: 10 g/L de D-glicose, 3 g/L de extrato de levedura em pó, 3 g/L de extrato de malte e 5g/L de peptona, seguindo a metodologia descrita por Manera et al. (2011) com algumas modificações. Para o inóculo foram utilizados três discos de 2 cm de diâmetro contendo o microrganismo. A fermentação foi realizada a 150 rpm por 120 horas e temperatura de 30°C em agitador rotativo (Incubadora shaker SL 222, SOLAB). Após a fermentação, o meio de cultura líquido inoculado foi filtrado a vácuo (bomba de filtro de vácuo TE-0582, TECNAL), e a biomassa do microrganismo foi seca em estufa à 50°C e seguida da extração dos biopolímeros (Dong et al., 2009).

2.3 Extração de polissacarídeo de *A. niger*

À biomassa seca e triturada (0,5g) foi adicionado 50 mL de solução de hidróxido de sódio em diferentes valores de pH (11, 12 e 13) e tempos de extração (60, 120 e 180 minutos) e temperatura de 90°C. A suspensão foi centrifugada (Modelo 206BL-EXCELSA) a 8.000 g durante 15 min. O precipitado foi descartado e foi adicionado ao sobrenadante três vezes do volume de etanol absoluto, agitou vigorosamente e foi deixado por 12 horas a 4°C. Os polissacarídeos precipitados foram isolados através de uma centrifugação a 8.000g durante 20 min e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O precipitado de polissacarídeos bruto obtido foi seco a 50°C até que fosse observado o peso constante. Os polissacarídeos totais foram determinados pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois, et. 1956). O rendimento final foi avaliado com (p/p)% de polissacarídeos por unidade de massa de biomassa seca.

2.4 Design experimental

Foi aplicado o delineamento fatorial de 3 níveis da metodologia de superfície de resposta com duas variáveis independentes (pH e tempo de extração), que foi estudado em 3 níveis de variação, tendo como ponto central o valor de 12 para pH e 120 minutos para o

tempo de extração (Matiazi, 2006). Todos os cálculos e gráficos neste trabalho foram realizados usando o software Statistica® versão 10.0, e incluindo a análise de variância (ANOVA).

2.5 O peso molecular médio (MWn) e grau de polimerização (DPn)

O MWn e DPn dos polissacarídeos foram determinados pela medida do valor do açúcar redutor utilizando o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) e a dosagem dos carboidratos totais utilizando o método também colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956); $DPn = [(\text{carboidratos totais em } \mu\text{g de D-glicose}) / (\text{valor de redução em } \mu\text{g de maltose})] \times 1.9$; $MWn = [(DPn) \times 162] + 18$ (Vettori, Franchetti & Contiero, 2012).

2.6 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína total foi determinada através do método de Bradford (1976) em que foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.7 Purificação do polissacarídeo

A amostra de polissacarídeo (15 mg/mL) foi aplicada em coluna Sephadex G-100 (Sigma, EUA) (30×1,0 cm), que foi previamente equilibrada em tampão fosfato citrato de sódio (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), o qual também foi usado como fase móvel. As frações (1,5 mL) foram colhidas e dosado polissacarídeos totais em cada fração utilizando o método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956).

2.8 Caracterização química do polissacarídeo

2.8.1 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os polissacarídeos foram caracterizados utilizando o método de espectroscopia de Infravermelho (IR) com transformadas de Fourier (modelo Varian Inova 500). O polímero após seco foi moído e pressionado em pellets para medição espectral FT-IR na faixa de frequência de 4000 - 500 cm⁻¹, com 20 varreduras. Já na análise espectroscópica de RMN, todos os espectros foram registrados a 343 K em um espectrômetro Varian Inova 500 que opera a 11,7 T, observando ¹H a 500 MHz e ¹³C a 125 MHz e usando sonda direta. As amostras foram dissolvidas em D₂O/DMSO (6:1) e transferidas para o tubo de RMN. O DMSO foi usado como referência de mudança química. D₂O (99,9%) e DMSO (99,9%) eram de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (EUA).

2.8.2 Composição monomérica do polissacarídeo

O polissacarídeo de *A. niger* ATCC 1004 (20 mg) foi hidrolisado com ácido trifluoroacético 2M (TFA) a 90°C durante 8h, seguido de evaporação (Ruthes et al., 2013). Depois de realizada a hidrólise, a amostra obtida foi solubilizada em água ultrapura, a solução foi filtrada e analisada por CLAE usando a coluna Amines® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm i.d.) (9 µm) (BIO-RAD, Califórnia, EUA) e detecção de índice de refração; o volume de injeção foi de 20 µL. Para fase móvel, foi utilizada uma solução aquosa de H₂SO₄ 0,01N de forma isocrática a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida à 25°C. Foram utilizados padrões de açúcares: glicose, rhamnose, manose, galactose, arabinose e xilose (Sigma, EUA), todos com tratamento de hidrólise idêntico ao recebido pelo polissacarídeo, para a identificação dos picos de retenção. Para a determinação da composição monossacarídica foi realizada em dois experimentos independentes com resultados consistentes.

2.9 Avaliação da capacidade antioxidante

A atividade antioxidante das amostras de polissacarídeos de *A. niger* ATCC 1004 foram avaliadas utilizando os métodos de sequestro de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo) e do radical ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), descrito por Rufino et al., (2007), com modificações. Nos dois ensaios foram utilizadas amostras nas concentrações (0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6 e 6,4 mg/mL). Para o de ensaio DPPH, 100µL de cada concentração da amostra foi adicionada em 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,06 mM). A absorbância foi medida à 517 nm depois de 20 min à 25°C. No ensaio de ABTS⁺, inicialmente foi preparado o radical ABTS por reação da concentração de sal ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) e a mistura foi colocada ao abrigo de luz à temperatura ambiente durante 16 h antes da utilização. Já a solução de ABTS⁺ em estoque foi diluída com etanol (absorbância de 0,7 ±0,005 nm) e incubada com 30µL da amostra nas referidas concentrações e 3,0mL da solução etanólica de ABTS. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 734 nm após 6 minutos de incubação. Nos dois experimentos os valores foram expressos como a concentração de amostra necessária para reduzir 50% dos radicais livres (EC₅₀). Nos dois ensaios (DPPH e ABTS⁺), a atividade antioxidante foi observada utilizando o Trolox como controle positivo.

2.10 Análise estatística

Os dados foram expostos como média \pm desvio padrão (SD) ou EC₅₀ com base nos experimentos independentes. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas por ANOVA e com pós-teste de Tukey usando GraphPad 7.00.

3 Resultados e Discussão

3.1. Extração de polissacarídeos

O planejamento fatorial de três níveis foi aplicado para determinar as melhores condições para a extração de polissacarídeos do fungo *A. niger*. Os experimentos foram realizados em diferentes níveis, fornecendo informações importantes para obter as condições ideais de extração dos polissacarídeos, garantindo assim o maior rendimento. Os resultados experimentais são apresentados na Tabela 1.

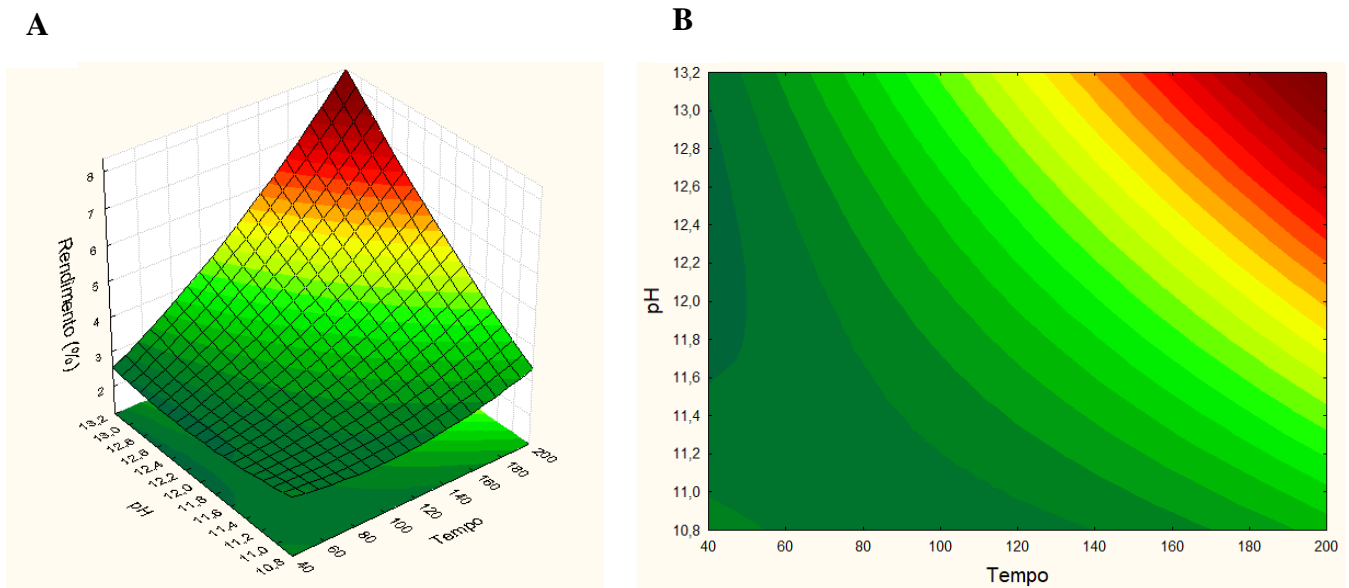
Tabela 1. Planejamento experimental de fatorial de três níveis aplicado na determinação do tempo ótimo e pH da extração de polissacarídeos de *A. niger*.

Experimento	Tempo (minutos)	pH	Rendimento Encontrado (%)	Rendimento Esperado (%)
1	180 (+1)	11 (-1)	3,48	3,37
2	180 (+1)	12 (0)	4,56	4,98
3	180 (+1)	13(+1)	7,30	6,98
4	120 (0)	11 (-1)	2,94	2,76
5C	120 (0)	12 (0)	3,60	3,54
5C	120 (0)	12 (0)	3,40	3,54
5C	120 (0)	12 (0)	3,70	3,54
6	120 (0)	13(+1)	4,48	4,72
7	60 (-1)	11 (-1)	2,38	2,65
8	60 (-1)	12 (0)	2,96	2,60
9	60 (-1)	13(+1)	2,88	2,95

(C): ponto central; Os valores codificados são apresentados nos parênteses conforme descrito na metodologia do modelo Box-Behnken.

A partir dos resultados obtidos com a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta, com duas variáveis independentes (pH e tempo de extração) em 3 níveis de

variação, totalizando 11 experimentos, foi possível construir os gráficos de superfície e de área apresentados na Figura 1.



(A) Gráfico de superfície de resposta (B) Gráfico de área

Figura 1. Influência do tempo e do pH na extração de polissacarídeos obtidos de *A. niger*.

Após a análise do gráfico de superfície de resposta (Figura 1A), foi possível determinar que o ponto de extração ideal na região experimental foi de 180 minutos e 13 para tempo e pH, respectivamente, obtendo um rendimento máximo de polissacarídeos na faixa de 7,3%. Um estudo realizado por Wu *et al.* (2016) com polissacarídeos isolados de *Paecilomyces hepiali* foi observado um rendimento de 11,08% durante a extração com as condições de 92°C para temperatura e 190 minutos para tempo, utilizando água como solvente. Os resultados são próximos aos dados encontrados no presente estudo, com os polissacarídeos de *Aspergillus niger*, entretanto, as condições de extração foram diferentes em relação ao solvente, o que pode justificar a diferença encontrada.

No gráfico de área (Figura 1B), foi possível observar que com a redução de tempo e pH, o rendimento de polissacarídeo diminuiu. Esta diminuição ocorre porque a estrutura molecular de um polissacarídeo possui uma quantidade expressiva de hidroxilas. Estas hidroxilas têm maior afinidade para o ambiente básico de pH e, portanto, a interação com o meio e quanto maior o tempo de contato, maior a interação e solubilização (Sampaio, 2014.)

A função quadrática obtida com a aplicação do planejamento Fatorial de 3 níveis que descreve o comportamento das variáveis, pH e tempo, com relação ao rendimento total obtido está descrita na Equação 1:

Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = 39,09 - 0,163(T) - 5,47(\text{pH}) + 0,199(\text{pH})^2 + 0,138(T)(\text{pH})$$

T: Temperatura em °C

A Tabela 2 mostra a Análise de Variância (ANOVA), obtida a partir da avaliação do tempo e pH na extração de polissacarídeos obtidos de *A. niger*.

Tabela 2. Análise de Variância (ANOVA) aplicada à otimização de tempo e pH de polissacarídeos obtidos de *A. niger*.

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	17,27857	5	3,455714	27,4	5,50	0,96
Resíduo	0,630519	5	0,126104			
Falta de ajuste	0,58385	3	0,194618	8,34	19,16	
Puro erro	0,04667	2	0,023333			
SQ total	17,9091	10				

SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática

A partir da análise da tabela 2, deduz-se que o modelo está bem ajustado, obtendo uma F_{calculado} maior do que F_{tabelado} para regressão (27,4 > 5,5), com um intervalo de confiança de 95%. O R² obtido foi equivalente a 0,96, o que significa que 96% dos resultados encontrados podem ser explicados pelo modelo experimental aplicado. O modelo não mostrou falta de ajuste, com F_{calculado} menor que o F_{tabelado} (8,34 < 19,16). Portanto, os resultados apontam para um tratamento estatístico representativo, os resultados obtidos são confiáveis e as condições otimizadas podem ser utilizadas para extração de polissacarídeos de *A. niger* com maior rendimento.

3.2 Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford (1976) indicou que a amostra de polissacarídeos de *A. niger* possui cerca de 1% de proteína, indicando assim que a amostra é composta, em quase sua totalidade, por polissacarídeos.

3.3 Purificação do polissacarídeo

A cromatografia em coluna Sephadex G-100 foi utilizada no processo de purificação e os resultados mostraram a presença de apenas um pico simétrico (Figura 2). Tais resultados indicaram a presença de apenas um tipo de polissacarídeos, com grau de polimerização e a peso molecular, estimados em 23 e 375×10^7 Da, respectivamente de acordo com a aplicação do método descrito por Vettori, Franchetti & Contiero (2012).

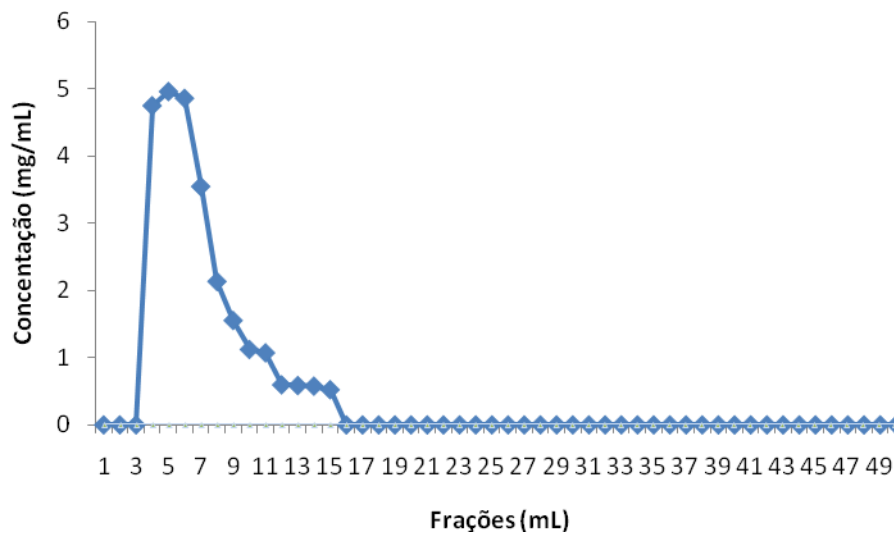


Figura 2. Perfil de eluição do polissacarídeo no Sephadex G-100 tampão fosfato citrato de sódio (pH 7,0).

Diferentes tipos de técnicas cromatográficas são utilizadas com o propósito de separar os polissacarídeos um do outro e/ou de contaminantes que não são carboidratos. A cromatografia de filtração em gel é um método para purificação de polissacarídeos neutros e aniônicos, amplamente utilizada e de resposta satisfatória. A separação dos biopolímeros ocorre de acordo ao seu peso molecular e volume hidrodinâmico (Valasques Junior et al., 2017).

3.4 Caracterização química do polissacarídeo de *A. niger*

3.4.1 Espectroscopia no infravermelho (FT-IV)

A Figura 3 mostra testes espectroscópicos na região do infravermelho que permitiram a identificação dos grupos funcionais característicos de polissacarídeos.

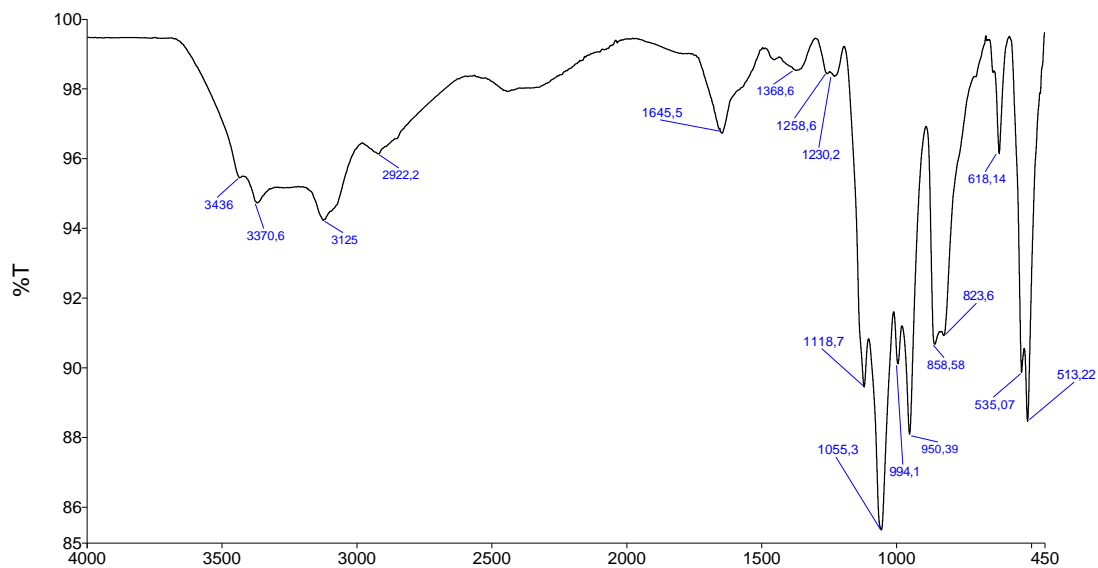


Figura 3. Espectro de polissacarídeo FT-IR produzido a partir de *A. niger*.

Na análise do polissacarídeo obtido a partir da parede celular do fungo *A. niger*, através da espectroscopia no infravermelho (FT-IR), bandas na região entre 3436 cm^{-1} e 3125 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento axial O-H (Valasques Junior et al 2017); banda na região de $2922,2\text{ cm}^{-1}$ está relacionada ao estiramento axial C-H e o sinal na região de $1645,5\text{ cm}^{-1}$ atribuído às vibrações de dobramento H-O-H (Guo et al, 2013); a banda na região de $1368,3\text{ cm}^{-1}$ relaciona-se a vibração de flexão do grupo CH_2 (Wang et al., 2017) e a banda na região de $1055,3\text{ cm}^{-1}$ pode ser descrita como uma vibração de deformação axial de grupos de C-O-C presentes em um anel de seis átomos de carbono, característicos dos polissacarídeos (Valasques Junior et al., 2017; Zhang et al., 2018). A banda na região de 858 cm^{-1} é indicativa da presença de ligação β -glicosídica (Valasques et al., 2014).

A partir da análise feita pelo infravermelho, foi evidenciado que as substância presente na amostra tratam-se de polissacarídeo, já que, contêm bandas características além de uma absorção na região de $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, que está atribuídos à carboidratos presentes em parede celular, apresentando estiramento de vibrações de moléculas de C-O-C presentes em vários oligossacarídeos e polissacarídeos (De Melo Barbosa *et al.*, 2004), corroborando com os resultados encontrados nas amostras de polissacarídeo de parede celular de *A. niger*.

Valasques Juniores *et al.* (2014) produziram e caracterizaram a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em que foi observada uma banda na região próxima de 883 cm^{-1} , cujo pico é

indicativo de ligação β -glicosídica, isso também foi evidenciado na amostra de polissacarídeo de parede celular de *A. niger*, com pico de absorção na região próxima de 858,8.

3.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise dos espectros de RMN¹H e ¹³C do polissacarídeo de parede celular de *A. niger* foram avaliados para determinar os sinais característicos de hidrogênio (¹H) e carbono (¹³C) presente na amostra de polissacarídeo (Figuras 4 e 5).

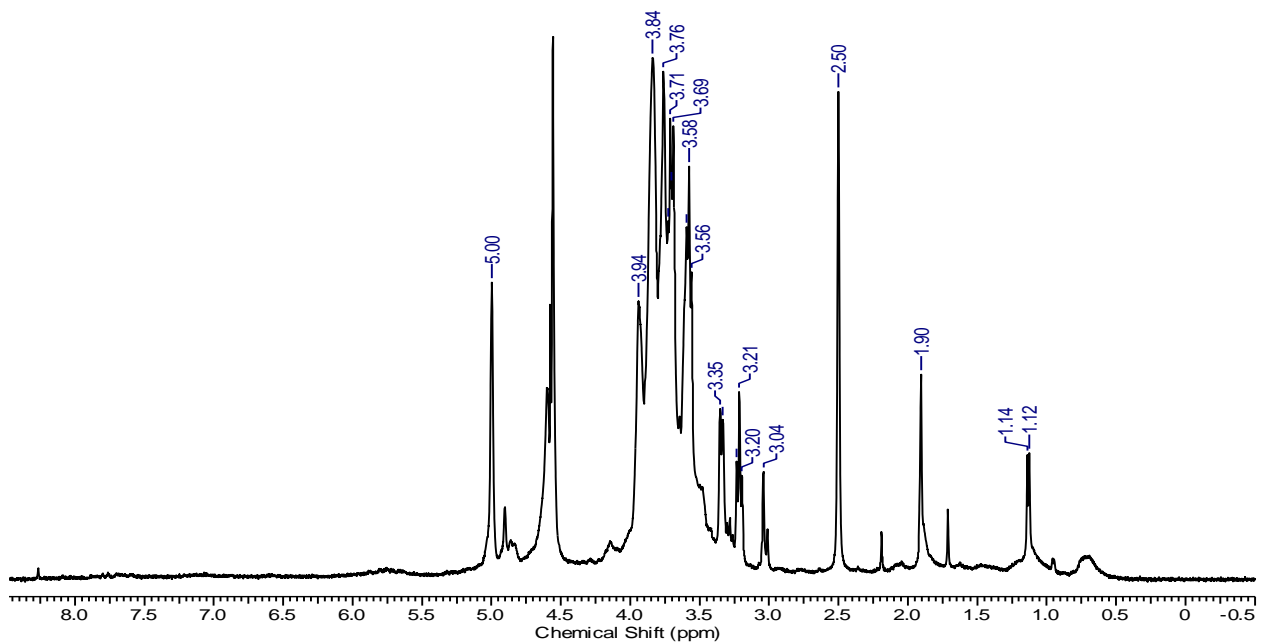


Figura 4. Espectros de RMN de ¹H de polissacarídeo de *A. niger*.

De acordo com a figura 4, dois sinais são evidentes, o pico mais alto atribuído ao carbono α anomérico (5,00 ppm) e um sinal próximo a 4,7 ppm provavelmente relacionado ao carbono β .

Sampaio (2014) ao estudar o polissacarídeo produzido a partir de *L. fermentum* observou um sinal em δ 4,96 ppm que ele atribuiu a α anômeros, semelhante aos encontrados na amostra analisada. Já em estudo realizado por Gerwig *et al.* (2013), em que se produziu o polímero de *L. fermentum* TDS 030603, foram encontrados quatro sinais (¹H) em δ 5,674; δ 5,325 e δ 4,985; sugestivos de α anômeros, enquanto outro sinal em δ 4,731 sugestivo de β anômero, confirmando dessa forma que na amostra estuda o sinal em 5,00 e outro próximo de 4,9 se trata de um α anômeros e na região próximo de 4,7 um β anômero. Sendo assim, através do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de (¹H) de *Aspergillus niger*, foi possível observar semelhança entre os resultados encontrados com os obtidos por Fukuda *et al.* (2010), demonstrando cinco sinais, dentre eles dois sinais em 4,978 e 5,314 sugestivos de α -anômero e dois sinais em δ 4,510 e δ 4,725 sugestivos de β anômeros.

Para a análise de ^{13}C -RMN, 12 sinais foram encontrados (Figura 5).

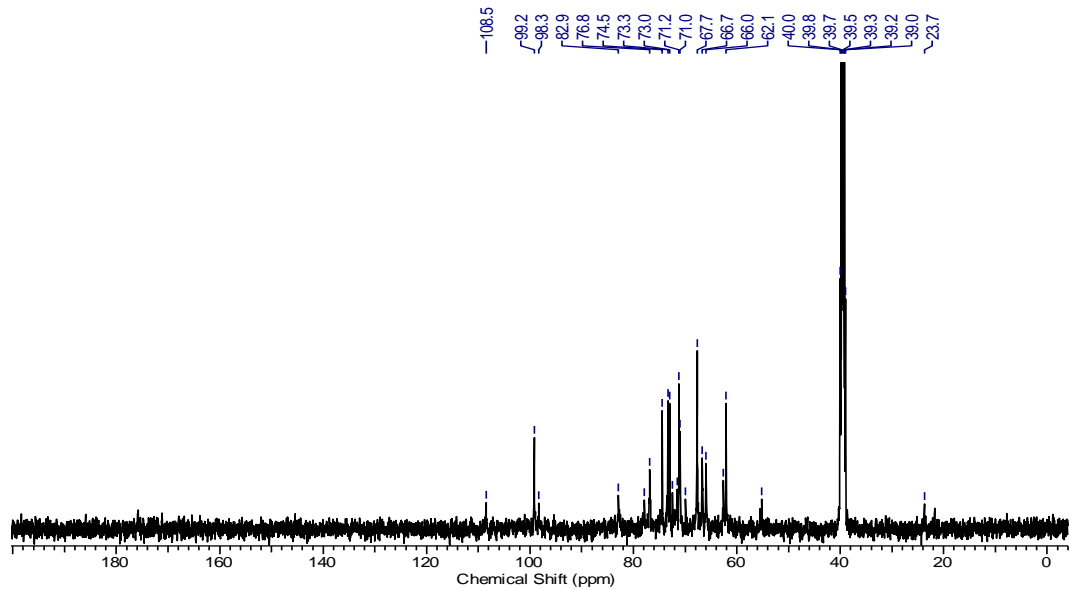


Figura 5. Espectros de RMN ^{13}C do polissacarídeo de *A. niger*.

Segundo os dados do RMN ^{13}C , o polímero isolado possui em sua cadeia um carbono anomérico α representado pelo sinal intenso em 99.2 ppm ligado a um carbono C6 em 66,0 ppm, assim como possui um carbono anomérico β em 108 ppm ligado a um carbono C3 em 82,9 ppm, sendo caracterizado provavelmente como um polissacarídeo de ligações α e β do tipo 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 6.

Através da ampliação do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C) de *Aspergillus niger*, foi demonstrado, assim como em estudo realizado por Sampaio (2014), a ocorrência de um único tipo de carbono (97,66 ppm), no qual atribui ao carbono anomérico alfa. Nos trabalho realizado por Da silva *et al.* (2008), ao isolar uma glucana microparticulada insolúvel em água da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrou um sinal em 102,60 ppm, sugerindo que a amostra pode se tratar de uma β -glucanas (1 \rightarrow 3), o que corrobora com os resultados encontrados na amostra de *Aspergillus niger*.

Em outro estudo, Vasconcelos (2009) demonstrou que um único sinal na região de carbono anomérico caracteriza a molécula como um polímero linear e o próximo de 102,9 ppm indica que as unidades glucopiranosídicas estão em configuração β . Kaori Fukuda *et al.* (2009) apresentou um polissacarídeo ácido isolado da parede celular de *Cylindrocladium*, cujos valores de RMN do ^{13}C mostrou apenas dois sinais na região anomérica, δ 107,1 ppm e

176,2ppm, atribuídos, respectivamente, aos resíduos β -galactofuranosídicos, confirmando que o sinal (108ppm) encontrado no polímero extraído se trata realmente de um carbono β -anomérico.

Da Silva *et al.* (2006) também apresentou um polissacarídeo insolúvel em água que foi obtido do extrato alcalino do corpo de frutificação do fungo *Amanita muscaria* cujosinal encontrado em 99,62 ppm no espectro de RMN ^{13}C foi atribuído aos átomos do carbono anomérico de unidades α -D-glucopiranosídicas (1 \rightarrow 3) substituídas, confirmando dessa forma o sinal em 99,2ppm encontrado na amostra de *Aspergillus niger* referente ao carbono α ao carbono C3 em 82,9ppm.

3.4.3 Análise da composição monomérica

O polissacarídeo foi hidrolisado por Ácido Trifluoracético- TFA em unidades monoméricas e analisado por CLAE em que se revelou sua composição monomérica (Figura 4).

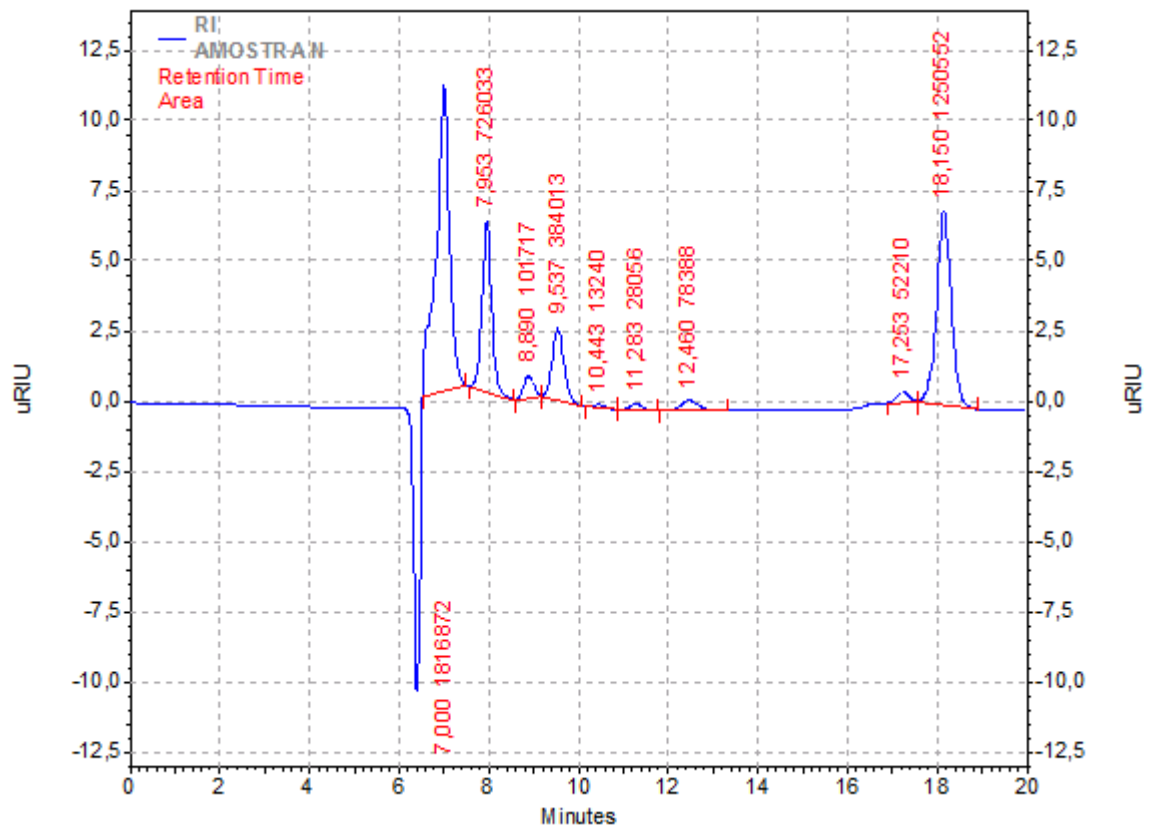


Figura 6. Cromatograma CLAE da composição monomérica de *A. niger* ATCC 1004.

Observaram-se diferentes picos de retenção característicos de diferentes açúcares presentes na composição do biopolímero obtido do *A .niger*. Ao comparar com os tempos de retenção dos padrões à amostra de polissacarídeo, sugere-se que sua composição monomérica seja de galactose (7,0, 7,9 e 9,5 minutos) e glicose (8,8 minutos). O pico no tempo de retenção 18,1 minutos foi característico tanto no padrão de galactose quanto de glicose.

Em estudo realizado por Lu et al., (2017) em que a estrutura de um polissacarídeo sulfatado do fungo *Antrodia cinnamomea* foi caracterizado, foram encontrados igualmente no presente estudo, a predominância dos monossacarídeos galactose e glicose, tratando-se se um galactoglucan.

3.5 Atividade Antioxidante

O DPPH trata-se de uma radical livre relativamente instável e pode aceitar um átomo de hidrogênio ou elétrons para formar uma molécula estável. Sendo assim, é um radical amplamente utilizado na avaliação da atividade de eliminação de radicais livres (Qu et al., 2016).

A partir da análise da Figura 7, foi possível observar que a atividade de eliminação de radicais DPPH foi dependente da concentração. Na maior concentração aplicada (6,4mg/ml), a atividade de eliminação de radicais DPPH do polissacarídeo e do trolox foi de 82,12% e 98,51%, respectivamente. O valor EC_{50} calculado (Tabela 3) foi de 4,632mg/mL. Estes resultados indicam que o polissacarídeo em estudo tem o potencial antioxidante em sequestrar radical livre DPPH, confirmando assim, sua atividade antioxidante.

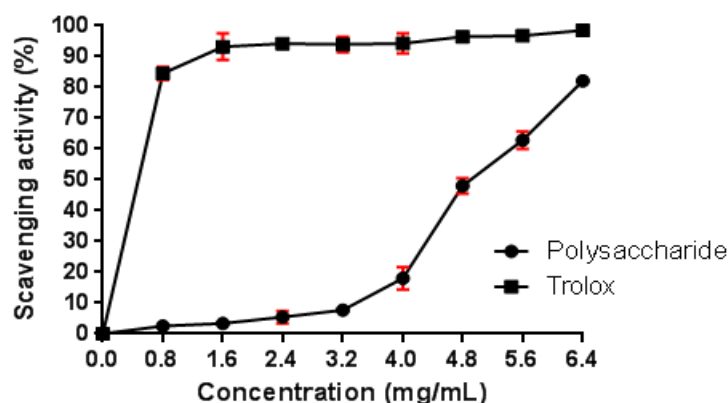


Figura 7. Atividade antioxidante do polissacarídeo isolado do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 frente ao radical livre de DPPH (%).

Qu *et al.* (2016) obteve em seu estudo com polissacarídeos extraídos de *Bletilla striata*, uma atividade de eliminação de radicais DPPH de aproximadamente 40% na concentração de 5mg/mL, enquanto que o polissacarídeo obtido no presente estudo mostrou na concentração de 4,8mg/mL uma atividade próxima a 50%, mostrando atividade superior em torno dessa concentração quando comparados. Já, para Wang *et al.* (2013), os dados com polissacarídeos obtidos de *Aspergillus terreus*, mostraram atividade de sequestro do radical livre DPPH igual a 79,1% na concentração de 6,0mg/mL, valor de atividade bem próximo ao encontrado para o polissacarídeo de *A. niger* em concentração próxima.

O radical ABTS é vastamente aplicado na avaliação da atividade antioxidante de extratos naturais (Ye *et al.*, 2016). A partir da análise do gráfico abaixo (Figura 8), foi possível observar que a capacidade de sequestrar radical livre ABTS também foi dependente da concentração do polissacarídeo. A atividade máxima de eliminação do radical ABTS foi observada na concentração de 6,4mg/mL, onde atingiu 75,94% de atividade, e o valor de EC₅₀ calculado, mostrado na Tabela 3, foi de 3,765 mg/mL.

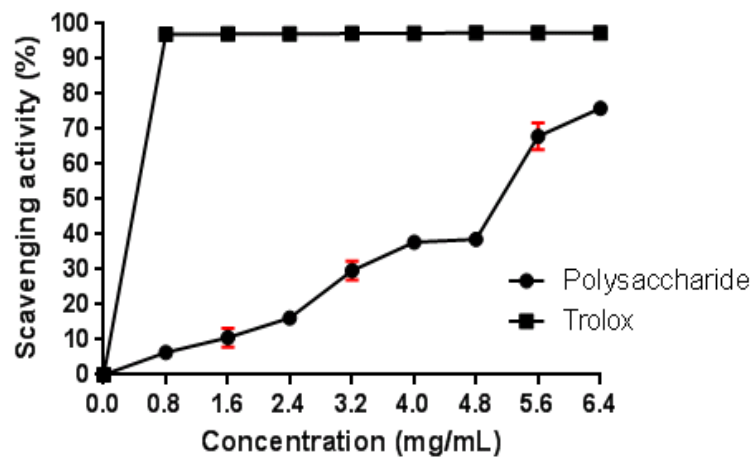


Figura 8. Capacidade de eliminação do radical ABTS (%) por polissacarídeo isolado do fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 1004.

Em um estudo desenvolvido por Li & Wang (2016), com polissacarídeos obtidos de *Hohenbuehelia serotina*, mostraram atividade de sequestro de radicais livres ABTS de no máximo, 50% na concentração de 6,0mg/mL, sendo que o de *A. niger* apresentou atividade próxima a 70% nessa mesma concentração, evidenciando um possível maior potencial antioxidante.

Tabela 3. Valores de EC₅₀ para polissacarídeos isolados do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 em propriedades antioxidantes.

Atividade antioxidante	EC ₅₀ ^a (mg/mL)
	Polissacarídeo
Capacidade de eliminação no radical DPPH	4,632±0.21
Capacidade de eliminação no radical ABTS	3,765±0.06

^a Valor de EC₅₀: a concentração efetiva em que os radicais DPPH e ABTS foram eliminados em 50%; O valor EC₅₀ foi obtido por interpolação a partir da análise de regressão linear.

Portanto, foi observado que o polissacarídeo exibiu um grau variável de atividade de eliminação de radicais livres de maneira dependente da concentração para ambos os testes de atividade antioxidante, e mostrou ser promissor quanto à sua utilização como antioxidante, podendo ser explorado com esse propósito.

4 Conclusão

Através da aplicação do planejamento fatorial de três níveis e modelagem matemática foram observadas as condições ótimas de extração, sendo 180 minutos para o tempo e 13 para pH. A partir da caracterização química utilizando os métodos de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência sugeriram que a amostra extraída da parede celular do fungo *Aspergillus niger* se trata de um galactoglucan com ligações α e β ligadas no carbono 1→3 e 1→6, com tamanho molecular igual a 375×10^7 Da. O polissacarídeo apresentou potencial em sequestro de radicais livres DPPH e ABTS, entretanto, não foi encontrada a capacidade máxima de atividade antioxidante, provavelmente alcançada com concentrações superiores de polissacarídeos. Neste contexto, o polissacarídeo produzido por *Aspergillus niger* ATTC 1004 demonstrou ser um produto com possível aplicação biológica no que tange a ação em desordens bioquímicas associadas ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; DOBSON, A. D. W. Yeasts and Molds| *Penicillium camemberti*. 2011.
- ADEOYE, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 568-574, 2015.
- AHMAD, Asif et al. Extraction and characterization of β -d-glucan from oat for industrial utilization. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 304-309, 2010.
- AHMAD, Razi; KHARE, Sunil Kumar. Immobilization of *Aspergillus niger* Cellulase on Multiwall carbon nanotubes for cellulose hydrolysis. **Bioresource technology**, 2017.
- ALTEMIMI, Ammar et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0148758, 2016.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, Javier; MIRANDA, Roxana U. Biotechnological production and applications of statins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 869-883, 2010.
- BENOIT-GELBER, I. et al. Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. **Fungal Genetics and Biology**, v. 102, p. 31-37, 2017.
- BEZERRA, Marcos Almeida et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BLUMENTHAL, Cynthia Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 214-228, 2004.
- BORDENAVE, Nicolas; JANASWAMY, Srinivas; YAO, Yuan. Influence of glucan structure on the swelling and leaching properties of starch microparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 234-243, 2014.
- BOWMAN, Shaun M. et al. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis

and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 3, p. 587-600, 2006.

BOWMAN, Shaun M.; FREE, Stephen J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BOX, George EP; BEHNKEN, Donald W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BOYSEN, Marianne et al. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. **Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 541-549, 1996.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDL, Julian; ANDERSEN, Mikael R. Aspergilli: Models for Systems Biology in Filamentous Fungi. **Current Opinion in Systems Biology**, 2017.

BRUICE, P.Y. Espectroscopia de RMN, In Bruice, P.Y., Química Orgânica. **São Paulo: Pearson Education do Brasil**, 2006, p.524-590.

CASTRILLO, Marta et al. Transcriptional basis of enhanced photoinduction of carotenoid biosynthesis at low temperature in the fungus *Neurospora crassa*. **Research in microbiology**, 2017.

ČERNÁ, Marcela et al. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 4, p. 383-389, 2003.

CHEN, Yin et al. Preparation and characterization of an extracellular polysaccharide produced by the deep-sea fungus *Penicillium griseofulvum*. **Bioresource technology**, v. 132, p. 178-181, 2013.

CHEN, Yun et al. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1705, 2016.

CHENG, Jing-Jy et al. Studies on anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from cultivated fungi *Antrodia cinnamomea*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 37-45, 2016.

CIUCANU, Ionel; KEREK, Francisc. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate research**, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

CORRADI DA SILVA, M. de L. et al. Purification and structural characterisation of (1 to 3; 1 to 6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate polymers**, 2005.

COSTANZO, Michael et al. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. **Science**, v. 353, n. 6306, p. aaf1420, 2016.

CUI, Steve W. Structural analysis of polysaccharides. **Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications**, v. 1, 2005.

DA SILVA, Maria de Lourdes Corradi et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, p. 85-92, 2006.

DA SILVA, Maria de Lourdes Corradi et al. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 4, p. 793-798, 2008.

DE GROOT, Piet WJ; RAM, Arthur F.; KLIS, Frans M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 657-675, 2005.

DE MELO BARBOSA, Aneli et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

DE OLIVEIRA, Fabíola Cristina et al. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the maillard reaction: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 7, p. 1108-1125, 2016.

DING, Xiang et al. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake*. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 271-275, 2010.

DING, Xiang; HOU, Yi-ling; HOU, Wan-ru. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Boletus speciosus* Forst. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 613-618, 2012.

- DOMÍNGUEZ-SANTOS, Rebeca et al. Casein phosphopeptides and CaCl₂ increase penicillin production and cause an increment in microbody/peroxisome proteins in *Penicillium chrysogenum*. **Journal of proteomics**, v. 156, p. 52-62, 2017.
- DONG, C.-H. et al. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. **Food and bioproducts processing**, v. 87, n. 2, p. 139-144, 2009.
- DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.
- DU, Bin et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 49-59, 2015.
- DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- EVIDENTE, Antonio et al. Fungal metabolites with anticancer activity. **Natural product reports**, v. 31, n. 5, p. 617-627, 2014.
- FAN, Liuping et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1849-1854, 2012.
- FEOFILOVA, E. P. The fungal cell wall: modern concepts of its composition and biological function. **Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 711-720, 2010.
- FESEL, Philipp H.; ZUCCARO, Alga. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53-60, 2016.
- FREE, Stephen J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **In: Advances in genetics. Academic Press**, 2013. p. 33-82.
- FRISVAD, Jens C.; LARSEN, Thomas O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7859-7877, 2015.
- FUKUDA, Kenji et al. Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1040-1045, 2010.

- GARCÍA-ESTRADA, Carlos; MARTÍN, Juan-Francisco. Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 19, p. 8303-8313, 2016.
- GARCÍA-RICO, Ramón O. et al. Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. **Fungal biology**, v. 121, n. 9, p. 754-762, 2017.
- GERWIG, Gerrit J. et al. Structure determination of the exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* TDS030603—A revision. **Carbohydrate research**, v. 378, p. 84-90, 2013.
- GILLOT, Guillaume et al. 1-Octanol, a self-inhibitor of spore germination in *Penicillium camemberti*. **Food microbiology**, v. 57, p. 1-7, 2016.
- GOFFREDO, Giovanni Battista et al. Nanotechnology on wood: The effect of photocatalytic nanocoatings against *Aspergillus niger*. **Journal of Cultural Heritage**, v. 27, p. 125-136, 2017.
- GUO, Shoudong et al. Preparation, structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Oidiodendron truncatum* GW. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 539-544, 2013.
- HILLMAN, Ethan T.; READNOUR, Logan R.; SOLOMON, Kevin V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated-omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 5, p. 50-56, 2017.
- HOUBRAKEN, Jos; FRISVAD, Jens C.; SAMSON, Robert A. sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. **IMA fungus**, v. 1, n. 2, p. 171-180, 2010.
- HU, Tingting et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 193-198, 2010.
- HUSSAIN, Peerzada R.; RATHER, Sarver A.; SURADKAR, Prashant P. Structural characterization and evaluation of antioxidant, anticancer and hypoglycemic activity of radiation degraded oat (*Avena sativa*) β -glucan. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 144, p. 218-230, 2018.
- IYYAPPAN, J. et al. Malic acid production by chemically induced *Aspergillus niger* MTCC 281 mutant from crude glycerol. **Bioresource technology**, v. 251, p. 264-267, 2018.

- JI, Yu-Bin et al. Optimizing the extraction of anti-tumor polysaccharides from the fruit of *Capparis spionosa* L. by response surface methodology. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 7323-7335, 2012.
- JUNIOR, Gildomar L. Valasques et al. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)- β -d-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate polymers**, v. 105, p. 293-299, 2014.
- KAGIMURA, Francini Yumi et al. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015.
- KAORI FUKUDA, Eliane et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, 2009.
- KELLER, Nancy P.; TURNER, Geoffrey; BENNETT, Joan W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937, 2005.
- KOLEVA, Irina I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical analysis**, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.
- KRASNIEWSKI, Isabelle et al. Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1318-1324, 2006.
- KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.
- KUIVANEN, Joosu; PENTTILÄ, Merja; RICHARD, Peter. Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 2, 2015.
- KULKARNI, Shraddha; NENE, Sanjay; JOSHI, Kalpana. Production of Hydrophobins from fungi. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 1-11, 2017.
- LAI, Jixiang et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*Glycine max* var) sprouts using response surface methodology. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1101-1110, 2013.

- LE DRÉAN, Gwenola et al. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International journal of food microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 100-107, 2010.
- LECLERCQ-PERLAT, Marie-Noëlle et al. Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 6, p. 4031-4040, 2013.
- LI, Peiqin et al. Extraction optimization of water-extracted mycelial polysaccharide from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Dzf17 by response surface methodology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5441-5453, 2012.
- LI, Shuhong 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, Xiaoyu; WANG, Lu. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides. **International journal of biological macromolecules**, v. 83, p. 270-276, 2016.
- LIMBERGER-BAYER, Valéria M. et al. Barley β -glucans extraction and partial characterization. **Food chemistry**, v. 154, p. 84-89, 2014.
- LU, Mei-Kuang et al. Characterization of a sulfated galactoglucan from *Antrodia cinnamomea* and its anticancer mechanism via TGF β /FAK/Slug axis suppression. **Carbohydrate polymers**, v. 167, p. 229-239, 2017.
- MAGNELLI, P. E. CIPOLLO. JF; ROBBINS, PW Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, p. 202-212, 2005.
- MAHAPATRA, Subhadip; BANERJEE, Debdulal. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology insights**, v. 6, p. MBI. S10957, 2013.
- MANERA, Ana Paula et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. 2011.
- MATIAZI, H. J. **Otimização da extração de glucanas insolúveis da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sua ação hipocolesterolêmica e os efeitos na clastogenicidade**

e teratogenicidade causadas pela exposição aguda à ciclofosfamida em camundongos. 2006. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado]–Londrina, PR. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIOSO, R.; TOLEDO MARANTE, F. J.; HERRERA BRAVO DE LAGUNA, I. Penicillium roqueforti: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 4, p. 781-791, 2015.

MORETTI, Antônio; SARROCCO, Sabrina. Fungi. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 162-168, 2015.

NAGAI, Takeshi et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

NIE, Shaoping et al. Bioactive polysaccharides from Cordyceps sinensis: Isolation, structure features and bioactivities. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 1, n. 1, p. 38-52, 2013.

NIELSEN, Jens Christian et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in Penicillium species. **Nature microbiology**, v. 2, n. 6, p. 17044, 2017.

NIGAM, Darshika; ASTHANA, Monika; KUMAR, Avnish. Penicillium: A Fungus in the Wine and Beer Industries. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. 2017. p. 187-200.

NUANPENG, Sunan et al. Ethanol production from sweet sorghum by Saccharomyces cerevisiae DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: preliminary characterization of crude exopolysaccharide produced by

submerged culture of *Diaporthe* sp. JF766998 under different cultivation time. **Biochimie Open**, v. 2, p. 33-40, 2016.

PARDO-PLANAS, Oscar et al. Prevention of melanin formation during aryl alcohol oxidase production under growth-limited conditions using an *Aspergillus nidulans* cell factory. **Bioresource technology**, v. 243, p. 874-882, 2017.

PAULUSSEN, Caroline et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.

PAZUR, JOHN. H. Neutral polysaccharides. **Carbohydrate analysis: a practical approach**. 2th ed. Oxford, U K: Oxford University Press, p.181, 1994.

PRAKASH, R.; JHA, S. N. Basics of the genus *Aspergillus*. **International Journal of Research in Botany**, v. 4, n. 2, p. 26-30, 2014.

QI, Gaoxiang et al. Solvents production from cassava by co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 128-133, 2018.

QI, Huimin et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005.

QU, Yan et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. **Carbohydrate polymers**, v. 148, p. 345-353, 2016.

RAGHUKUMAR, Seshagiri. Fungi: Characteristics and Classification. In: **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems**. Springer, Cham, 2017. p. 1-15.

RIZZELLO, Carlo Giuseppe et al. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. **Food microbiology**, v. 64, p. 72-82, 2017.

ROCHA, Christiane Pereira. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido** [dissertação]. Uberlândia: Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, 2010.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

RUTHES, Andrea Caroline et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 761-769, 2013.

SAMPAIO, Mariana Gomes Vidal. **Produção e caracterização de um polissacarídeo bacteriano com vistas a seu potencial biotecnológico** [dissertação]. Recife: Pós Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANCHEZ, Sergio; DEMAIN, Arnold L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 895-906, 2002.

SANTOS, R.R.M. Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. 2010.83p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2010.

SEGERS, Frank JJ et al. The indoor fungus *cladosporium halotolerans* survives humidity dynamics markedly better than *aspergillus niger* and *penicillium rubens* despite less growth at lowered steady-state water activity. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5089-5098, 2016.

SHARADA, R. et al. APPLICATIONS OF CELLULASES-REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 4, n. 2, 2014.

SHARMA, Shivani; KHANNA, P. K.; KAPOOR, S. Optimised isolation of polysaccharides from *Lentinula edodes* strain NCBI JX915793 using response surface methodology and their antibacterial activities. **Natural product research**, v. 30, n. 5, p. 616-621, 2016.

SHEN, Jin-Wen; SHI, Chao-Wen; XU, Chun-Ping. Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius*: Fermentation optimization, characterization and antioxidant activity. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 520, 2013.

SHI, Lei. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 37-48, 2016.

SILVA, Maria de Lourdes Corradi da et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, p. 85-92, 2006.

SLIVINSKI, Christiane Trevisan. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Brasil, 2007.

SMITH, Helen; DOYLE, Sean; MURPHY, Richard. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food chemistry**, v. 185, p. 389-397, 2015.

SOKOLOV, S. S. et al. Comparative Analysis of the Structural Role of Proteins and Polysaccharides in Cell Walls of the Yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Doklady Biochemistry and Biophysics**. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2002. p. 172-175.

SOUZA, Bartolomeu WS et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.

STATSOFT, I. N. C. STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 10 (Tulsa, Oklahoma, USA, Stat-Soft Inc.). 2011.

STÜBIGER, Gerald et al. Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. **Journal of microbiological methods**, v. 130, p. 27-37, 2016.

SUN, Hai-Hong et al. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. **Carbohydrate polymers**, v. 78, n. 1, p. 117-124, 2009.

SYNYTSYA, Andriy; NOVÁK, Miroslav. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 792-809, 2013.

TEDERSOO, Leho et al. Global diversity and geography of soil fungi. **science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 2014.

TIAN, Suyang et al. Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 4, p. 766-775, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, 10ª edição. **Editora Artmed, Porto**, 2012.

VALASQUES JUNIOR, Gildomar L. et al. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)- β -d-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate polymers**, v. 105, p. 293-299, 2014.

VALASQUES JUNIOR, Gildomar L. et al. The extraction and characterisation of a polysaccharide from *Moniliophthora pernicios* CCMB 0257. **Natural product research**, v. 31, n. 14, p. 1647-1654, 2017.

VALKO, Marian et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, Ana Flora Dalberto. **β -glucanas de isolados fúngicos do gênero Botryosphaeria: produção, caracterização química e atividade anticoagulante** [tese]. Rio Claro: Pós Graduação Em Ciências Biológicas, 2009.

VETTORI, Mary Helen Palmuti Braga; FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; CONTIERO, Jonas. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextransucrase. **Carbohydrate polymers**, v. 88, n. 4, p. 1440-1444, 2012.

WANG, Chunyan et al. Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1395-1401, 2013.

WANG, Junqiao et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a glucan from natural *Cordyceps sinensis*. **Food hydrocolloids**, v. 67, p. 139-147, 2017.

WANG, Li; LIU, Hua-Min; QIN, Guang-Yong. Structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from Chinese quince seed meal. **Food chemistry**, v. 234, p. 314-322, 2017.

- WANG, Xin et al. Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 1173-1184, 2017.
- WANG, Zheng et al. Using evolutionary genomics, transcriptomics, and systems biology to reveal gene networks underlying fungal development. **Fungal Biology Reviews**, 2018.50-56, 2017.
- WANG, Zhi-Jun et al. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food & function**, v. 8, n. 3, p. 915-926, 2017.
- WEYDERT, Christine J.; CULLEN, Joseph J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 51, 2010.
- WU, Zhongwei et al. Extraction, characterization and antioxidant activity of mycelial polysaccharides from *Paecilomyces hepiali* HN1. **Carbohydrate polymers**, v. 137, p. 541-548, 2016.
- XU, Xiongbo et al. Purification and characterization of a glucan from *Bacillus Calmette Guerin* and the antitumor activity of its sulfated derivative. **Carbohydrate polymers**, v. 128, p. 138-146, 2015.
- XU, Yaqin et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits. **Food chemistry**, v. 243, p. 26-35, 2018.
- XU, Zhou et al. Characteristics and bioactivities of different molecular weight polysaccharides from camellia seed cake. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 1025-1032, 2016.
- YADAV, Ajar N. et al. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. 2017. p. 3-18.
- YAN, Mengxia et al. Structural elucidation of the exopolysaccharide produced by the mangrove fungus *Penicillium solitum*. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 485-491, 2014.
- YE, Zipeng et al. Box–Behnken design for extraction optimization, characterization and in vitro antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides. **Carbohydrate polymers**, v. 147, p. 354-364, 2016.

YI, Juanjuan et al. Optimization of purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *Pinus koraiensis* pinecones. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10450-10467, 2015.

YU, Yue et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

YU, Yue et al. Sulfated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* enhances the immunomodulatory activity of macrophages. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 669-676, 2017.

ZHANG, Guoying et al. Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 485-491, 2015.

ZHANG, Xiao-Yu et al. Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during *Aspergillus niger* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 375-381, 2017.

ZHANG, Yanqing et al. A galactomannoglucan derived from *Agaricus brasiliensis*: Purification, characterization and macrophage activation via MAPK and I κ B/NF κ B pathways. **Food chemistry**, v. 239, p. 603-611, 2018.

ZHANG, Yali et al. Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. **Food chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1084-1090, 2011.

ZHANG, Yanqing et al. A galactomannoglucan derived from *Agaricus brasiliensis*: Purification, characterization and macrophage activation via MAPK and I κ B/NF κ B pathways. **Food chemistry**, v. 239, p. 603-611, 2018.

ZHAO, Yujia et al. Enhancing oleanolic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, 2018.

4. CONCLUSÃO GERAL

Os fungos *P. camembertii* ATCC 4845, *P. roquefortii* ATCC 10110 e *Aspergillus niger* ATCC 1004 demonstraram ser promissores na produção de biomoléculas com potencial aplicação na área médico-farmacêutica. Sendo assim, estes fungos filamentosos foram estudados com o propósito de otimizar as condições de obtenção de polissacarídeos, e identificar o potencial biotecnológico, no tocante a suas atividades antioxidantes. Portanto, em relação à atividade antioxidante, foi constatado que as amostras de polissacarídeos dos diferentes fungos possuem a capacidade de sequestrar radicais livres, em que foram observados baixos valores de EC₅₀ com potência superior aos polissacarídeos isolados de outras fontes.

Desse modo, pode-se inferir que os fungos filamentosos utilizados nesse estudo, possuem potencial biotecnológico na aplicação como possível agente terapêutico relacionado a desordens metabólicas ligadas ao estresse oxidativo. Entretanto, além de sua adequada caracterização, estudos toxicológicos e farmacotécnicos devem ser realizados com finalidade de verificar sua segurança para propor uma possível utilização em humanos.