



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



**PÂMALA ÉVELIN PIRES CEDRO**

**Caracterização e avaliação do potencial antioxidante e hipoglicemiante de  
polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***

**JEQUIÉ - BA**

**Abril – 2020**

**PÂMALA ÉVELIN PIRES CEDRO**

**Caracterização e avaliação do potencial antioxidante e hipoglicemiante de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus var. oligosporus***

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

**Orientador:** Gildomar Lima Valasques Júnior

**Co-orientadora:** Helena Bonciani Nader

**JEQUIÉ - BA**

**Abril – 2020**

C389c Cedro, Pâmala Évelin Pires.

Caracterização e avaliação do potencial antioxidante e hipoglicemiante de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus var. oligosporus*/ Pâmala Évelin Pires Cedro.- Jequié, 2020.  
80f.

(Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior e coorientação do Profa. Dra. Helena Bonciani Nader)

1.Polissacarídeos 2.Antioxidante 3.Hipoglicemiante 4.*Rhizopus* 5.Box- Behnken I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.

CDD – 612.01575



Governo do  
Estado da Bahia

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB  
Recredenciada pelo Decreto Estadual N°  
16.825, de 04.07.2016

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Caracterização e avaliação do potencial antioxidante e hipoglicemiante de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*”.

Autor (a): Pâmala Évelin Pires Cedro

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

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

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior – UESB/Jequié – BA.

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Júnior – UESB/Jequié – BA.

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra – UESB/Jequié – BA.

Data de realização: 08 de Abril de 2020.

*A minha tia Débora Lilian Lopes Pires (in memoriam) que em vida, sempre reconheceu meus esforços, se orgulhava e torcia pelo meu sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por ser meu refúgio e fortaleza, por me manter firme e perseverante em meio a tantas dificuldades e incertezas, mostrando-me que sou capaz.

À minha mãe e melhor amiga Váuria Pires, por acreditar no poder transformador da educação, me apoiando durante toda minha vida acadêmica, sem medir esforços para concretização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs Tâmara Pires e Sâmala Pires pelo laço de amor e irmandade, pelas palavras e pequenos gestos ao longo desse processo.

À toda minha família pelo amor e suporte de sempre.

À Murilo pelo companheirismo e paciência, por compreender a minha ausência enquanto me dedicava à este trabalho.

À minha amiga Lorena Lôbo, pelas palavras e gestos de estímulo e por toda preocupação e cuidado para comigo.

À Natália, Maísla e Larissa pelo companheirismo e acolhida.

À Tátilla Putumujú pelo apoio além da rotina de laboratório. Pela amizade construída e reconhecida que foi fundamental durante essa jornada.

A Alana Miranda pelo auxílio nas últimas etapas deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Farmacologia (LABQFAR) e a Romário Santana e Ivan Barreto, por compartilharem conhecimento e experiências que foram fundamentais para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Bruno Moreira pelo auxílio e disponibilidade constante.

Ao meu orientador, Dr. Gildomar Valasques, pelos ensinamentos, paciência, estímulos e por todo suporte para o desenvolvimento desse trabalho.

À co-orientadora Dra. Helena Nader pela atenção e disponibilidade.

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

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

## RESUMO

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

A descoberta de produtos de origem natural com propriedades terapêuticas têm estimulado pesquisadores à voltarem suas investigações para a busca por compostos com potencial inovador para a indústria farmacêutica, de alimentos, entre outras. Nesse contexto, os fungos filamentosos apresentam grande relevância por ser fonte para obtenção de biomoléculas tais como polissacarídeos, que possuem características químicas que funcionalmente têm resultado em atividades biológicas. Nesse sentido, compreender as peculiaridades dos polissacarídeos fúngicos se faz importante e por essa razão, este estudo buscou otimizar a extração de polissacarídeos da parede celular de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, caracterizá-los e avaliar possíveis potenciais antioxidante e hipoglicemiante *in vitro*. Para o alcance, processos para a otimização da extração de polissacarídeos foram empregados, como o desenho experimental de Box-Behnken e a metodologia de superfície de resposta, que revelaram como condições ótimas de extração: pH 13, temperatura de 120°C e tempo de 60 min. Os polissacarídeos obtidos foram submetidos à análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier que indicou sinais típicos de polissacarídeos. A ressonância magnética nuclear e a cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, indicaram que o polissacarídeo é, possivelmente um  $\beta(1,3)$   $\beta(1,6)$  glucogalactano. Ensaio antioxidantes *in vitro* revelaram o potencial dos polissacarídeos na eliminação do radical ABTS+ e na eliminação de radicais hidroxilas. Apresentaram também, capacidade de inibir *in vitro* a enzima  $\alpha$ -amilase, indicando possíveis propriedades hipoglicemiantes. Os resultados sugerem que polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus* podem ser promissores para prevenção ou tratamento de distúrbios que envolvam produção de radicais livres e hiperglicemia.

**Palavras-chave:** polissacarídeos. antioxidante. hipoglicemiante. *Rhizopus*. Box-Behnken.

## ABSTRACT

CEDRO, Pâmala Évelin Pires. **Characterization and evaluation of the antioxidant and hypoglycemic potential of polysaccharides obtained from *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***. 80f. 2019. Dissertation (Master's degree) – Multicentric Program in Biochemistry and Molecular Biology, PMBqBM, State University of Southwest Bahia, Jequié, 2020.

The discovery of products of natural source with therapeutics properties have stimulated researchers to direct your investigations to search compounds with potential of innovation for pharmaceutical and foods industries, among others. In this context, the filamentous fungi have a big relevance, because is a source obtainment to biomolecules such as polysaccharides, with chemical characteristic than functionally have results in biologic activities. In that, understand of particularly of the fungal polysaccharides is very important and because this cause, this study has as objective optimize the polysaccharides extraction in the cell wall of *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, with characterization and evaluation the possibility antioxidant and hypoglycemic potential *in vitro*. For reach, process to optimization of the polysaccharides extraction were employed, as Box-Behnken experimental design and Response Surface Methodology, that revealed optimums conditions of extraction: pH 13, temperature 120 °C and time 60 min. The polysaccharides were submitted for analysis in Fourier Transform Infrared Spectroscopy indicated polysaccharides typical signals. The Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometer indicated that polysaccharide is possible a  $\beta(1,3)$   $\beta(1,6)$  glucogalactane. Antioxidant assay *in vitro* showed the polysaccharides potential in ABTS+ radical elimination and hydroxyls radical elimination. They presented ability to inhibit the  $\alpha$ -amylase enzyme *in vitro*, indicated possibility hypoglycemic property. The results suggest that polysaccharides of *R. microsporus* var. *oligosporus* can be promising for prevention or treatment of disturbance with involvement from free radicals production and hyperglycemia.

**Keywords:** polysaccharides. antioxidant. hypoglycemic. *Rhizopus*. Box-Behnken.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>03</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>03</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>03</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>04</b>
<b>Referencial Teórico.....</b>	<b>04</b>
<b>1 Fungos.....</b>	<b>05</b>
<b>1.1 Aspectos Gerais.....</b>	<b>05</b>
<b>1.2 Biomassa e Parede Celular Fúngica .....</b>	<b>07</b>
<b>1.3 <i>Rhizopus</i> sp.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1 <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Polissacarídeos .....</b>	<b>12</b>
<b>3 Caracterização de polissacarídeos .....</b>	<b>13</b>
<b>4 Considerações gerais sobre o Diabetes Mellitus .....</b>	<b>15</b>
<b>5 Radicais livres e estresse oxidativo .....</b>	<b>16</b>
<b>6 Diabetes e estresse oxidativo .....</b>	<b>18</b>
<b>7 Atividades biológicas de polissacarídeos microbianos .....</b>	<b>19</b>
<b>7.1 Atividade hipoglicemiante .....</b>	<b>21</b>
<b>7.2 Atividade antioxidante .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>24</b>
<b>Otimização da extração e caracterização química de polissacarídeos obtidos de <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>25</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Microrganismo .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Condições de cultivo do microrganismo .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Extração dos Polissacarídeos .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Planejamento Experimental .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Determinação do teor de Proteínas Totais.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 Purificação de Polissacarídeos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.7 Determinação do Peso Molecular e Grau de Polimerização .....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 Análise por espectroscopia no Infravermelho (FT-IR) .....</b>	<b>28</b>

2.9 Composição Monossacarídica .....	29
2.10 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN) .....	29
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>29</b>
3.1 Otimização da extração de polissacarídeos de <i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> .....	29
3.2 Determinação do teor de proteínas .....	33
3.3 Purificação de Polissacarídeos .....	33
3.4 Análise por espectroscopia no FT-IR.....	35
3.5 Análise por CG-EM .....	36
3.6 Análise por RMN .....	37
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>39</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>40</b>
<b>Atividades antioxidante e hipoglicemiante de polissacarídeos obtidos de <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>41</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>41</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>42</b>
2.1 Microrganismo .....	42
2.2 Condições de cultivo.....	43
2.3 Extração dos Polissacarídeos .....	43
2.4 Atividade Antioxidante .....	43
2.4.1 Ensaio de eliminação do radical ABTS <sup>+</sup> .....	44
2.4.2 Ensaio de eliminação de radicais hidroxila .....	44
2.5 Atividade hipoglicemiante .....	44
2.5.1 Determinação da capacidade de inibição da $\alpha$ -amilase .....	44
2.6 Análises estatísticas.....	45
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>45</b>
3.1 Atividade Antioxidante .....	45
3.2 Capacidade de inibição da $\alpha$ -amilase .....	48
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>49</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>49</b>
<b>4 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Biomassa do fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* obtida por filtração após processo de fermentação. 7
- Figura 2.** Estrutura básica da parede celular fúngica. 8
- Figura 3.** Configuração dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  de glicose. 9
- Figura 4.** *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* crescido em Agar Batata Dextrose à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . 11
- Figura 5.** Molécula com um ou mais elétrons não pareados em sua camada externa (radical livre). 17
- Figura 6.** Estabilização do radical  $\text{ABTS}^+$  por um antioxidante. 23

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Relação entre valores observados e valores preditos obtidos na otimização da produção de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 30
- Figura 2.** Curvas de níveis para otimização da extração de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. (A): pH e Temperatura. (B): Tempo e Temperatura. (C): pH e Tempo. 31
- Figura 3.** Diagrama de Pareto mostrando significância das variáveis na extração de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 32
- Figura 4.** Separação do polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus* em Sephadex G-100. 35
- Figura 5.** Espectro de FT-IR de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 36
- Figura 6.** Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 37
- Figura 7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 38
- Figura 8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 38

**CAPÍTULO III**

**Figura 1.** Atividade antioxidante *in vitro* de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*

46

**Figura 2.** Capacidade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase por polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*

48

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Fungos com polissacarídeos de importância biológica relatados em literatura. 20

## CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Planejamento experimental Box-Benken aplicado na otimização da produção de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 30

**Tabela 2.** Análise de variância – ANOVA para o modelo quadrático obtida na otimização da extração de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 33

**Tabela 3.** Análise de variância – ANOVA para o modelo linear obtida na otimização da extração de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 33

**Tabela 4.** Tempos de retenção e composição monossacarídica da amostra de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

## CAPÍTULO III

**Tabela 1.** Valores de EC<sub>50</sub> para atividade antioxidante de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*. 47

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- ABTS:** Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
- ANOVA:** Análise de variância (*Analysis of variance*)
- BDA:** Ágar Batata Dextrose
- BOD:** Demanda bioquímica por oxigênio
- BSTFA:** N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
- CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CG-EM:** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência
- CMRVS:** Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
- CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- D<sub>2</sub>O:** Água deuterada
- DM I:** Diabetes mellitus tipo I
- DM II:** Diabetes mellitus tipo II
- DM:** Diabetes mellitus
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- DNS:** Ácido 3,5- 25 dinitrosalicílico
- DP:** Desvio padrão
- DP<sub>n</sub>:** Grau de polimerização (*Degree of polymerization*)
- DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilidrazil
- EC<sub>50</sub>:** Concentração na qual a substância induz uma resposta de 50%.
- ERC:** Espécies reativas de cloro
- ERN:** Espécies reativas de nitrogênio
- EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- FAPESB:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
- Fiocruz:** Fundação Oswaldo Cruz
- FRAP:** Ensaio do poder antioxidante pela redução férrica
- FT-IR:** Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrogênio
- IR:** Índice de refração
- IV:** Infravermelho
- LPIC:** Capacidade de inibição da peroxidação lipídica
- MSR:** Metodologia de superfície de resposta

**MWn:** Peso molecular médio (*Medium molecular weight*)

**NaOH:** Hidróxido de Sódio

**ORAC:** Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

**PMBqBM:** Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**TEAC:** Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

**TFA:** Ácido trifluoroacético

**TMCS:** Trimetilclorosilano

**TMS:** Tetrametilsilano

**TRAP:** Potencial reativo antioxidante total

**UESB:** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia esteve presente na vida do homem, mesmo antes dele a conhecer. Os fungos são seres fundamentais para a humanidade, por estarem envolvidos em importantes processos biotecnológicos. Os fungos filamentosos em especial, são detentores de moléculas que podem ser empregadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, alimentos, bebidas, entre outros (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018).

Os polissacarídeos estão entre os biopolímeros mais abundantes do planeta, podendo ser encontrados em plantas, animais e microrganismos, tais como bactérias e fungos. Polissacarídeos tem se destacado por apresentarem atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, anticoagulante, antinociceptiva, antimicrobiana, hipoglicemiante (ULLAH et al., 2019), dentre outras que, atreladas ao fato dos polissacarídeos serem compostos naturais, justificam o interesse de muitos pesquisadores em estudar as propriedades dessas biomoléculas.

Estudos que busquem investigar potenciais antioxidantes de polissacarídeos são importantes, tendo em vista que os radicais livres são moléculas capazes de provocar alterações celulares que culminam em uma série de condições patológicas como, inflamação, envelhecimento, câncer e diversas doenças com forte impacto à saúde humana (KIOKIAS; PROESTOS; OREOPOULOU, 2018). Nesse sentido, combater a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) é imprescindível para evitar o estresse oxidativo e consequentemente injúrias fisiológicas.

O estresse oxidativo pode ainda induzir ou agravar quadro de diabetes mellitus (DM). O DM é uma doença metabólica crônica que tem atingido um grande número de indivíduos, com perspectiva de aumento progressivo para as próximas décadas. Esse aumento é consequência principalmente de fatores dietéticos, hábitos de vida, obesidade, aumento de EROs e seus danos oxidativos, entre outros (ZHAO et al., 2018). O tratamento do DM demanda altos custos financeiro à saúde pública em diversos países e é causa predominante de mortalidade (SIRISIDTHI; KOSAI; JIRAUNGKOORSKUL, 2016). Por essa razão, é fundamental que esforços sejam tomados para mediar formas de tratamento e prevenção da DM.

Nesse sentido, pesquisas que envolvam a descoberta de compostos com potenciais hipoglicemiantes e antioxidantes precisam ser intensificadas. Os polissacarídeos obtidos de fungos estão tendo destaque nesse sentido, por além de demonstrarem atividades biológicas consideráveis, serem de fácil obtenção e apresentarem baixa toxicidade (LIU et al., 2015), sendo utilizados inclusive na culinária.

O *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* por exemplo, é um fungo filamentoso largamente empregado na produção de um alimento rico em nutrientes, o tempeh, ao secretar enzimas que auxiliam no processo de decomposição da soja. Tais enzimas, também são importantes em processos industriais e no tratamento de resíduos. Além disso, o *R. microsporus* var. *oligosporus* é capaz ainda de produzir compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de gram-positivos (VAN SAMBEEK, 2014).

As atividades biológicas dos polissacarídeos estão intimamente associadas com suas características químicas e estruturais, o que estimula estudos voltados à sua caracterização e também extração.

Ademais, a diversidade fúngica impulsiona o interesse em selecionar fungos para obter polissacarídeos e avaliar experimentalmente seus possíveis efeitos antioxidantes e hipoglicemiantes. Uma vez que, a descoberta de novas substâncias com potencial terapêutico, oriundas de fontes naturais contribui significativamente para o desenvolvimento tecnológico, científico e econômico do país.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Otimizar a extração e caracterizar os polissacarídeos obtidos da parede celular do fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e avaliar suas potenciais atividades biológicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a extração de polissacarídeos da parede celular de *R. microsporus* var. *oligosporus* por meio da Metodologia de Superfície de Resposta através da matriz Box-Behnken;
- Purificar o polissacarídeo por meio de Cromatografia de Exclusão molecular;
- Caracterizar o polissacarídeo por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*;
- Investigar a atividade hipoglicemiante *in vitro* de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus* pela avaliação da capacidade inibitória da  $\alpha$ -amilase.

**CAPÍTULO I**  
**Referencial Teórico**

# 1 Fungos

## 1.1 Aspectos gerais

Os fungos são organismos eucarióticos que pertencem a um dos maiores e mais diversificados reinos dentre os organismos vivos, o reino Fungi. Cerca de 120.000 espécies foram descritas atualmente, no entanto, as estimativas sugerem que existam entre 2.2 e 3.8 milhões de espécies em todo o mundo (SKELLAM, 2018; HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017).

Fungos são predominantemente multicelulares, formados por filamentos ramificados denominados de hifas, que unidas compõem o micélio, porém, também podem ser encontrados em formas unicelulares como as leveduras (DOERING; CUMMINGS; AEBI, 2017). Apresentam grande diversidade em suas estruturas e estratégias reprodutivas, com espécies que se reproduzem de maneira totalmente assexuadas ou sexuada e espécies que utilizam de ambas estratégias reprodutivas (NIEUWENHUIS; JAMES, 2016). A propagação e germinação dos esporos compreende o primeiro passo para o crescimento vegetativo fúngico. Um único esporo é capaz de gerar um micélio, com um emaranhado de hifas ramificadas. Trata-se de um material fibroso, formado principalmente por quitina, celulose, proteínas, etc. (LIN et al., 2015; HANEEF et al., 2017).

Os fungos exibem uma ampla variedade de ciclos de vida, morfogênese e metabolismo complexo o que os difere dos animais e das plantas. Além disso, são seres onipresentes, podendo ser encontrados em ambientes externos e internos, apresentando relação de mutualismo, parasitismo e comensalismo com muitos organismos (LEVETIN; HORNER; SCOTT, 2016; CHOI; KIM, 2017). Os fungos atingiram os mais elevados níveis de complexidade multicelular e desenvolveram estruturas que os tornam capazes de sobreviver de forma adaptativa aos mais diversos nichos ecológicos (NAGY et al., 2017).

Como artifício de sobrevivência, os fungos penetram seus substratos por pressão física e secreção enzimática, decompondo-os em nutrientes que são absorvidos. Ademais, utilizam seu metabolismo para consumir substratos e gerar produtos, importantes no ponto de vista industrial. As peculiaridades do substrato utilizado para nutrição do fungo, reflete em sua composição quanto à polissacarídeos, lipídeos, proteínas e quitina, além da morfologia. No entanto, é necessário equilibrar as necessidades entre secretar produtos e o investimento bioenergético para sua nutrição e crescimento (BAKER, 2018; HANEEF et al., 2017).

Para a competição com outros microrganismos por nutrientes e para sua proteção, os fungos utilizam de mecanismos de defesa química, produzindo toxinas e metabólitos secundários como peptídeos e proteínas que prejudicam o antagonista e beneficiam sua sobrevivência (KÜNZLER, 2018). Sua atividade é regulada por fatores bióticos (plantas e animais) e abióticos (umidade, salinidade, pH, temperatura entre outros). São capazes de suportar à uma ampla faixa de pH e temperatura e por isso são encontrados em quase todos os ambientes (FRAC et al., 2018).

Diante de sua heterogeneidade e da transição morfológica que acomete muitas espécies frente à mudanças nas condições ambientais, a classificação dos fungos se torna difícil (YARZA et al., 2017). Porém, os principais filos reconhecidos são Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Blastocladiomycota e Chytridiomycota. Dentre eles, espécies que compõem os gêneros Ascomycotas e Basidiomycotas são mais investigados para aplicações farmacológicas, enquanto que os Zygomycotas são menos investigados (HAMEED et al., 2017).

Alguns fungos são capazes de causar infecções superficiais ou sistêmicas graves que acometem seres humanos (KANG et al., 2018). Por outro lado, apresentam grande potencial biotecnológico, desempenhando papel central em diversos campos de aplicação incluindo a indústria de alimentos e bebidas (RAVEENDRAN et al., 2018), rações (WANG et al., 2018a), farmacêutica (ZHAO et al., 2019), de papel e celulose (SRIDEVI; RAMANJANEYULU; DEVI, 2017), detergentes (SAHAY; CHOUHAN, 2018), têxteis (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017), em processos de biorremediação e biorecuperação (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; LIANG; GADD, 2017), no setor agrícola (FRAC et al., 2018), dentre outros. Nesse cenário, os fungos filamentosos são considerados os impulsionadores do sucesso da biotecnologia de fungos.

Os fungos filamentosos são pluricelulares e incluem uma quantidade elevada e com taxonomia diversificada de espécies de fungos. Crescem formando hifas simples que se diferenciam em estruturas morfológicas mais complexas e se estendem formando redes filamentosas. A ramificação das hifas pode ocorrer de maneira apical ou subapical (ramificação lateral) requerendo a inserção massiva da membrana e extensão da parede celular. Esse processo de formação dos micélios em fungos filamentosos é crítico para que alcancem e colonizem os substratos para seu crescimento (RIQUELME et al., 2018; HARRIS, 2019). Além disso, fungos Zygomycotas, Ascomycotas e Basidiomycotas podem crescer em formas de leveduras durante seus ciclos de vida.

Os fungos filamentosos são precursores de moléculas bioativas (produtos naturais) cruciais para seu desenvolvimento, como também para a geração de novos produtos de importância farmacêutica. São usados como fábricas para a obtenção de uma gama de enzimas, polissacarídeos, metabolitos primários e secundários tais como, pigmentos, enzimas, vitaminas, antibióticos, ácidos orgânicos, proteínas extracelulares e compostos aromatizantes. Apesar de representar um abundante arsenal, a riqueza de propriedades dos fungos filamentosos ainda é pouco explorada (KELLER, 2019; SERRANO-CARREÓN et al., 2015).

## 1.2 Biomassa e Parede Celular Fúngica

A ampla possibilidade de aplicação dos fungos filamentosos nos mais diversos setores é decorrente principalmente do material celular desses microrganismos como a biomassa (**Figura 1**) ou de suas moléculas isoladas.

Para a produção máxima de biomassa é necessário otimizar alguns parâmetros, são eles, pH, temperatura, tempo e a composição do meio nutritivo para o processo fermentativo. A análise de tais parâmetros é primordial para tornar o processo economicamente viável (AHMED et al., 2017), fornecendo a quantidade máxima possível de biomassa que servirá como ponto de partida para a geração de produtos de valor agregado no mercado e para a obtenção de substâncias bioativas. Dentre elas estão os polissacarídeos de parede celular dos fungos que podem apresentar atividades biológicas.

**Figura 1.** Biomassa do fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* obtida por filtração após processo de fermentação.

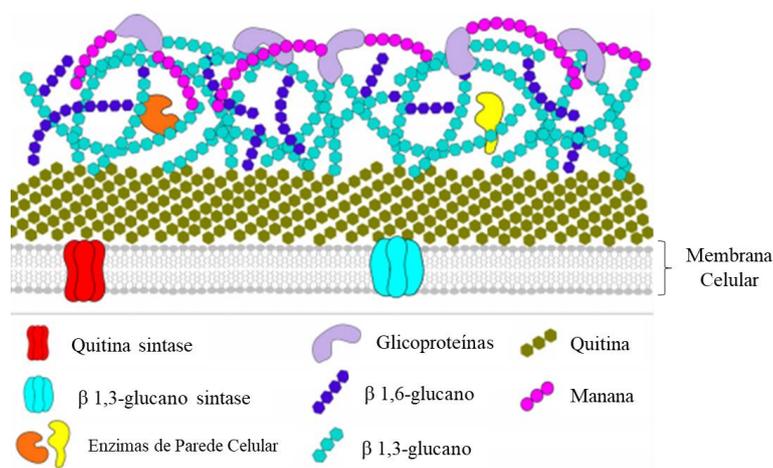


**Fonte:** Acervo de fotos da autora (2019).

A matriz extracelular dos fungos, a parede celular, compreende estruturas dinâmicas cuja composição molecular é essencial para biologia e ecologia dos fungos. A estrutura da parede celular afeta sua função e as interações com substratos e com o ambiente, sendo fundamental para a viabilidade celular, morfogênese e patogênese (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). É ainda, importante na definição da configuração e na proteção da célula contra estresses ambientais como, baixa disponibilidade de nutrientes, mudanças na osmolaridade, temperatura e pH. Ademais, as proteínas, lipídeos e polissacarídeos da parede são responsáveis por diversos tipos de interações das células fúngicas com o ambiente extracelular e contribuem para a estrutura, integridade, crescimento, diferenciação e sinalização (YOSHIMI; MIYAZAWA; ABE, 2017).

As paredes celulares são compostas por uma matriz complexa de polissacarídeos que incluem glucanas, manoproteínas (mananas) e quitina (**Figura 2**). A composição da parede celular dos fungos é complexa e varia entre as espécies, porém, estima-se que cerca de 80 a 90% da parede celular dos fungos seja composta por polissacarídeos. Tais polímeros, formam um esqueleto robusto e resistente à tração. A presença de proteínas e outros componentes superficiais tornam a parede celular uma estrutura mais forte, diversa e flexível. Apesar do aspecto rígido, a parede celular deve ser dinâmica para possibilitar o brotamento e crescimento fúngico. Essa plasticidade permite que a estrutura varie de acordo com as fases de crescimento, de forma que, quando recém-sintetizadas são finas e lisas e ao longo do tempo recebem camadas de material amorfo (ESHER et al., 2018; YOSHIMI; MIYAZAWA; ABE, 2017; VAN DEN BERG; MARUTHACHALAM, 2015).

**Figura 2.** Estrutura básica da parede celular fúngica.

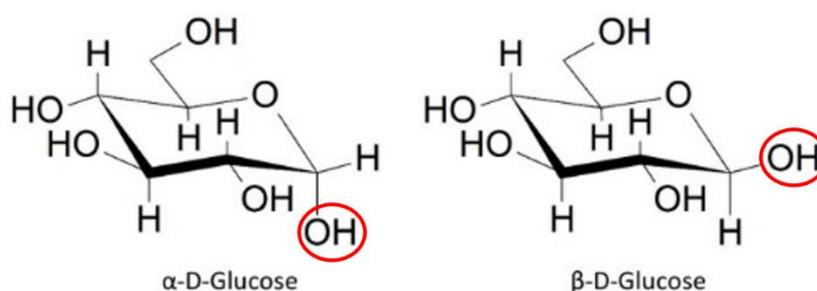


**Fonte:** GEOGHEGAN; STEINBERG; GURR (2017).

Polissacarídeos como quitina e glucanas são sintetizados na membrana plasmática para então serem estruturados na parede celular. Por outro lado, mananas e glicoconjugados são sintetizados no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde podem se conjugar à proteínas da parede celular e assim serem transportadas para a parede celular por intermédio de vesículas secretoras. As sintases que atuam nos processos, utilizam açúcares nucleotídeos-difosfato como substrato. Ao alcançarem a parede celular, os polissacarídeos podem se unir por ligações de hidrogênio ou se ramificarem por enzimas da própria parede (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

As glucanas são polímeros de glicose que diferem quanto ao seu peso molecular, tipos e proporções de ligações glicosídicas e configuração. São os polissacarídeos mais difundidos na natureza e apesar da sua composição monossacarídica simples, demonstram variabilidade estrutural, existindo nas formas  $\alpha$ -,  $\beta$ - lineares e ramificados, de acordo com a estrutura anomérica das unidades de glicose (**Figura 3**). As propriedades físico-químicas e a localização de cada componente dentro da parede celular resulta em funções particulares. A quitina e os  $\beta$ -glucanos por exemplo, estão envolvidos na resistência mecânica, enquanto que, homo e heteropolissacarídeos amorfos atuam como estruturas de fixação e estão normalmente ligadas a proteínas (SYNYTSYA; NOVAK, 2014; VAN DEN BERG; MARUTHACHALAM, 2015).

**Figura 3.** Configuração dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  de glicose



**Fonte:** RANZI; DEBIAGI; FRASSOLDATI (2017).

As glucanas e a quitina são os principais constituintes das paredes celulares de fungos, compondo 30-60% e 10-15% do peso seco total, respectivamente. Mananas compreendem entre 10-20% e glicoproteínas entre 10-40% da parede celular. Tais concentrações podem variar a depender da espécie fungica. Os Zigomicetos em especial, exibem maior proporção de quitina em comparação com as demais espécies, sendo este um componente estrutural vital em fungos (VAN DEN BERG; MARUTHACHALAM, 2015; DARWESH et al., 2018).

A parede celular é peça-chave na identidade dos fungos. Dessa forma, investigar a arquitetura das paredes celulares fúngicas é fundamental para compreender os mecanismos de patogenicidade como também, para uso de seus componentes na geração de produtos biotecnológicos.

### 1.3 *Rhizopus* sp.

O gênero *Rhizopus* pertence à classe Zygomycota, ordem Mucolales e Família Mucolaceae, são fungos filamentosos presentes em diversos lugares, principalmente em solos, excretas de animais e em vegetação em decomposição. A maioria das coleções de cultura e bancos de dados registram a existência de 11 espécies de *Rhizopus*. São elas, *R. oryzae* (*arrhizus*), *R. caespitosus*, *R. circinans*, *R. delemar*, *R. homothallicus*, *R. lyococcus*, *R. microsporus*, *R. niveus*, *R. schipperae*, *R. sexualis* e *R. stolonifer* (GRYGANSKYI et al., 2018).

De modo geral, os zigomicetos se destacam por seus dois gêneros *Mucor* e *Rhizopus* serem industrialmente importantes, atuando como biofermentadores e colaborando com a produção de uma série de metabólitos como enzimas, lipídeos, etanol, ácidos orgânicos, corantes, polímeros e proteínas. Espécies de *Rhizopus*, em especial, tem sido amplamente exploradas para a produção de ácido lático, ácido fumárico, amilases, lipases, pectinases, uréases e esteroides. Há um interesse crescente em utilizar a biomassa de zigomicetos como fonte de biocompostos microbianos de importância nutricional e farmacêutica, devido à sua grande capacidade de armazenar tais produtos em seu micélio (HAMEED et al., 2017).

Por longos anos, as espécies de *Rhizopus* foram empregadas na produção de fermentados como é o caso do tempeh, produto emergente na indústria alimentícia, comercializado normalmente nos países ocidentais, porém, amplamente utilizado na Ásia. Espécies incluindo *R. oryzae*, têm sido utilizadas na indústria alimentícia por promover alterações sensoriais em diferentes níveis em alimentos, a partir da fermentação de frutas, grãos, legumes e nozes, produzindo novos sabores, textura e aspectos visuais inéditos (CANTABRANA; PERISE; HERNÁNDEZ, 2015). El-Okki et al. (2017) ao estudarem o potencial enzimático dessa espécie, purificaram uma  $\alpha$ -amilase termoestável, para uso na panificação e encontraram resultados favoráveis à melhora na qualidade do pão, comparada à enzima comercial. Sugerindo que a  $\alpha$ -amilase recuperada é competente para futuras aplicações na indústria de panificação e na biotecnologia de alimentos.

Espécies desse gênero são importantes como patógenos de plantas e animais. Porém, os produtos do seu metabolismo podem indicar potenciais atividades biológicas.

Glicosíngolípídeos extraídos de *R. stolonifer* e *R. microsporus*, como as monohexosilceramidas que atuam no crescimento, diferenciação e transição morfológica dos fungos, foram avaliadas quanto ao seu potencial antimicrobiano por Vieira et al. (2018). As monohexosilceramidas demonstraram efeito bacteriostático contra *Bacillus terrae* e bactericida contra *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas stutzeri*. Além disso, as monohexosilceramidas de *R. microsporus* inibiram a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (VIEIRA et al., 2018). Esses resultados despertam interesse para investigações em torno de fungos do gênero *Rhizopus*, quanto às suas possíveis atividades biológicas e capacidade de gerar compostos naturais para a indústria de medicamentos.

### 1.3.1 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

O *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (**Figura 4**) era reconhecido somente como *R. oligosporus*. No entanto, sua nomenclatura foi alterada ao serem transferidos para o grupo dos *R. microsporus* por Schipper e Stalpers (1984).

**Figura 4.** *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* crescido em meio de cultivo Agar Batata Dextrose à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .



**Fonte:** Acervo de fotos da autora (2019).

Durante o crescimento, as colônias de *R. microsporus* var. *oligosporus* apresentam-se inicialmente com uma coloração branca e se tornam acinzentadas à medida que o micélio envelhece. Cobrem uma placa (9 cm de diâmetro) em torno de 3 a 4 dias à temperatura ambiente (HARTANTI; RAHAYU; HIDAYAT, 2015).

É um fungo filamentosamente empregado como cultura inicial para a produção do tempeh, um produto obtido da fermentação da soja pelo fungo, utilizado comumente na Indonésia. Durante o processo de produção do tempeh, as hifas do fungo crescem em torno da soja e secretam enzimas como lipases, proteases, pectinases e fitases que possibilitam a decomposição do material e metabolização dos nutrientes da soja. O fermentado resultante, apresenta maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres que a soja não fermentada. Representa ainda baixo risco do ponto de vista da segurança alimentar aos seres humanos e por essa razão, é consumido como um alimento rico em proteínas (VAN SAMBEEK, 2014).

Além da produção de tempeh, o *R. microsporus* var. *oligosporus* tem sido relatado quanto à capacidade de diminuir níveis de micotoxinas em alimentos, ser um potencial antimicrobiano contra microrganismos gram-positivos e ser empregado na produção de rações com alto valor agregado (VAN SAMBEEK, 2014).

## 2 Polissacarídeos

Os carboidratos são as biomoléculas mais numerosos na natureza e sua principal função está relacionada ao fornecimento de energia, porém, exercem ainda, papéis estruturais, de comunicação e metabólicos. São compostos orgânicos formados de modo geral por carbono, hidrogênio e oxigênio e, dependendo do número de açúcares simples a eles ligados são classificados como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (LUDWIG et al., 2018).

Os polissacarídeos compõem a maior fração de carboidratos presentes no planeta. São oriundos de diversas fontes. Celulose, amido, hemicelulose e pectina, originam-se principalmente de plantas, a quitosana é essencialmente extraída de conchas de crustáceos, o alginato é um componente importante das algas e um produto de certas bactérias e o glicogênio e a quitina estão presentes em fungos (LIU; EDGAR, 2015).

Trata-se de macromoléculas biológicas de ocorrência natural com alto peso molecular, compostas por longas cadeias (pelo menos dez) de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas com configurações  $\alpha$  e  $\beta$ . Variam em tamanho e podem ser ramificadas ou não. De acordo com sua composição química podem ser divididos em homopolissacarídeos (homoglicanos), quando apresentam somente um tipo de monossacarídeo e heteropolissacarídeos (heteroglicanos) quando possuem no mínimo dois tipos diferentes de monossacarídeos (LI et al., 2018; NAVARRO; ABELILLA; STEIN, 2019).

Além do armazenamento de energia, os polissacarídeos são elementos estruturais das paredes celulares, e exercem inúmeras funções relevantes em diversos processos biológicos incluindo, comunicação célula-célula, desenvolvimento embrionário, reconhecimento imunológico e mitogênese. Os polissacarídeos naturais, podem ser ainda, extraídos e utilizados com finalidades específicas, como para a produção de alimentos, reações, embalagens, produtos farmacêuticos, dentre outros (LIU et al., 2017).

Os polissacarídeos são abundantes na natureza em diferentes estruturas e sua ação está intimamente associada a esse fato. Além disso, possuem a particularidade de serem biodegradáveis e renováveis. Essas características, contribuem para que se enquadrem dentre as biomolécula mais importante em ciências da vida e se tornem objeto de estudo na busca por novas aplicações, sendo amplamente explorados após o desenvolvimento da biotecnologia (LI et al., 2018).

### **3 Caracterização de polissacarídeos**

Os polissacarídeos microbianos encontram-se normalmente na forma linear, porém podem também apresentar cadeias laterais em algumas estruturas. As diferentes ligações e composição monomérica permitem uma diversidade na arquitetura dos polissacarídeos (AHMAD; MUSTAFA; MAN, 2015).

O valor biotecnológico dos polissacarídeo é reflexo de suas possibilidades de aplicação, o que depende diretamente da sua estrutura química e da conformação molecular. Dessa forma, é necessário traçar mecanismos de elucidação da sua configuração, em termos de estrutura e composição, uma vez que, os aspectos funcionais dessas biomoléculas estão intimamente associadas a esses fatores.

Para que seja possível caracterizar quimicamente os polissacarídeos, é necessário compreender os processos de extração e purificação, cruciais para o sucesso da caracterização. O método de extração empregado têm forte efeito no rendimento, características e atividades dos polissacarídeos.

Metodologias baseadas no uso de solventes são comumente empregadas para a extração de polissacarídeos. As variáveis tempo, temperatura e pH utilizadas nos processos são críticas para as taxas de rendimento (VALASQUES JUNIOR et al., 2017). Para tanto, modelos de design experimental em conjunto com a metodologia de superfície de resposta (MSR), favorecem os processos de otimização das condições de extração, por permitirem avaliar os efeitos de diversos fatores e suas interações em uma ou mais variáveis de resposta. O método é

baseado na topografia da superfície de resposta, com o intuito de aproximar as variáveis de entrada e saída e reconhecer a região onde a melhor resposta se encontra, descrevendo as condições ótimas de operação de um determinado sistema (AYDAR, 2018).

Após obtenção dos polissacarídeos, a fim de alcançar a homogeneidade da amostra é necessário que ela seja purificada. A precipitação por etanol é um método simples e eficaz para separação de polissacarídeos (YAN, 2014). Porém, ao utilizar solventes é possível que se precipite outros substratos com grupos hidroxilas, além de polissacarídeos. Assim, para melhorar a pureza da amostra, métodos cromatográficos são requisitados pois permitem a purificação ágil e reproduzível de polissacarídeos e outras macromoléculas (CHOONG et al., 2018).

A cromatografia é uma técnica que permite a quantificação, separação, identificação e purificação de uma mistura. A purificação ocorre com base nas características da amostra, incluindo diferenças entre tamanho e pesos moleculares, carga, grupos hidrofóbicos e capacidade de ligação à fase estacionária do sistema. As diferenças entre os componentes da mistura, fazem com que algumas substâncias permaneçam mais tempo na fase estacionária, movendo-se lentamente, enquanto outras deixam mais rápido o sistema. A interação entre a fase estacionária, a fase móvel e as substâncias da mistura é a base fundamental para que a separação seja efetivada (COSKUN, 2016).

A caracterização química de polissacarídeos revela também o teor de açúcares totais e redutores, teor de proteínas, peso molecular e grau de polimerização, composição monomérica, dentre outros parâmetros (VALASQUES JUNIOR et al., 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser empregada para análise de carboidratos. Porém, para analisar o conteúdo de carboidratos, uma série de etapas são necessárias que incluem, extração da amostra, purificação, hidrólise e derivatização, com vistas à uma identificação mais sensível e seletiva. A detecção por índice de refração (IR) é um método universal, utilizado para o reconhecimento de carboidratos em análises por CLAE. O princípio do método é medir a alteração no IR do efluente em relação à fase móvel. Quanto maior a diferença do IR entre o efluente e a fase móvel, maior será o sinal. Se o efluente e a fase móvel apresentarem o mesmo IR, o carboidrato não será detectável (YAN, 2014).

A caracterização de polissacarídeos requer análise da composição de monossacarídeos. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é útil para essa finalidade. A análise em CG-EM permite a identificação das diferentes unidades de açúcar através de seus tempos de migração e/ou espectro de massa. A aplicação em CG-EM para

detecção de polissacarídeos requer que a amostra de interesse passe por tratamento prévio como hidrólise, seguida de derivatização (POINSOT; CARPENE; COUDERC, 2012).

A espectroscopia do infravermelho (IV) é uma técnica analítica, rápida, eficiente, com custos relativamente baixos para manutenção. Baseia-se na identificação de grupos funcionais de moléculas orgânicas, através dos espectros de vibração expressos em diferentes números de onda. Dessa forma, a existência ou não de grupos funcionais, seus estados de protonação e alterações na molécula podem ser percebidos por análise da posição e intensidade das bandas de absorção do IV (OJEDA; DITTRICH, 2012). Tais espectros são importantes na identificação da estrutura, propriedades e interações de carboidratos. Os polissacarídeos podem ser reconhecidos a partir da posição e intensidade de bandas específicas, encontradas na região compreendida como região da impressão digital (ČERNÁ et al., 2003).

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

A união dessas e de outras técnicas possibilita a elucidação da estrutura dos polissacarídeos, contribuindo conseqüentemente para o direcionamento de suas aplicações industriais. Inúmeras atividades biológicas apresentadas pelos polissacarídeos estão envolvidas com a sua estrutura química e conformação espacial. Dessa forma, elucidar a estrutura química eleva a compreensão sobre seu mecanismo de ação.

#### **4 Considerações gerais sobre o Diabetes Mellitus**

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico configurado por hiperglicemia, um aumento dos níveis de glicose no sangue e por deficiência na secreção ou ação da insulina produzida pelas células  $\beta$ -pancreáticas (TELAGARI; HULLATTI, 2015).

Os dois tipos mais prevalentes de diabetes são a diabetes mellitus tipo I (DM I) e a tipo II (DM II). A DM I (dependente de insulina) ocorre devido à uma deficiência na insulina, por conta da destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas, enquanto que a DM II (não dependente de insulina) é recorrente da resistência à insulina, que provoca hiperglicemia. Existe ainda, outros tipos de diabetes menos comuns como a diabetes idiopática que é a DM I sem

etiologia conhecida e a diabetes mellitus gestacional, uma hiperglicemia que pode ser adquirida durante a gravidez (SCHMIDT, 2018; ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

A DM I é mais comum em crianças e adolescentes e está relacionada geralmente com predisposição genética, porém, fatores ambientais também podem ter alguma associação com a etiologia da doença. Os sintomas mais comuns são polidipsia, poliúria, enurese, cansaço, polifagia, perda de peso, dificuldades de cicatrização, infecções recorrentes, visão turva, desidratação e cetoacidose. Além disso, os pacientes se tornam ainda mais susceptíveis a outros distúrbios autoimunes. A DM II, por outro lado, tem maior prevalência em adultos e é consequente da baixa qualidade nos hábitos de vida como sedentarismo, consumo de alimentos menos saudáveis e a obesidade que é grande responsável pela resistência de indivíduos à insulina na DM II (KHARROUBI, 2015).

As complicações do DM acometem inúmeros tecidos do corpo e é a principal causa de morbimortalidade cardiovascular, cegueira, insuficiência renal e amputações no mundo. A intervenção clínica é baseada no controle glicêmico, porém, muitas vezes, essa clínica pode conduzir o paciente à hipoglicemia, ou seja, à uma baixa muito intensa nos níveis de glicose. De modo geral, os sintomas podem ser inespecíficos e a intensidade diminui com o aumento da idade do indivíduo, os mais frequentes são tontura, fraqueza e sonolência (SHRIRAAM et al., 2015).

O tratamento principal do DM constitui o uso de insulina e sensibilizadores, porém, outra linha de terapia é o uso de inibidores (acarbose, miglitol) de enzimas hidrolisantes de carboidratos, como a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glicosidase, que buscam diminuir a hiperglicemia pós-prandial. No entanto, efeitos secundários indesejáveis após o uso de inibidores são relatados como diarreia, tontura, infarto do miocárdio, entre outros (TELAGARI; HULLATTI, 2015). Dessa forma, pesquisas que busquem por novas substâncias eficazes e com menos efeitos colaterais, precisam ser estimuladas, com o intuito de sanar os problemas que envolvem o quadro de DM.

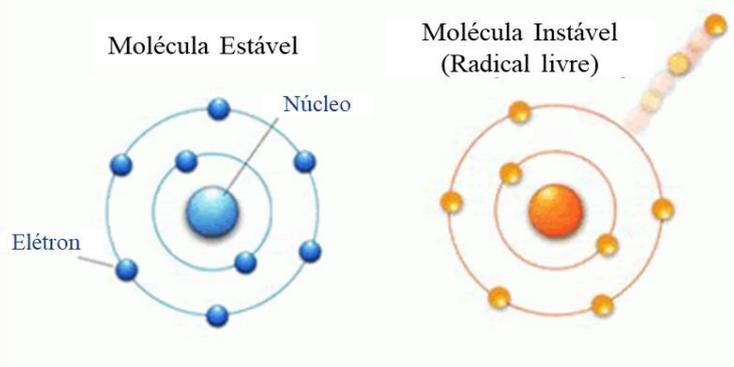
Além da hiperglicemia, a hiperlipidemia e estresse oxidativo, também são importantes na patogênese da diabetes e merecem atenção, tendo em vista, que podem ocasionar a alto risco de complicações (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

## **5 Radicais livres e estresse oxidativo**

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas e instáveis com elétrons não pareados em sua camada de valência ou na órbita externa (**Figura 5**). A sua alta reatividade

os tornam capazes de sequestrar elétrons de outras moléculas buscando sua estabilidade. Dessa forma, as moléculas atingidas perdem seus elétrons e se tornam um radical livre, iniciando uma série de reações que podem danificar as células e culminar em distúrbios patológicos (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

**Figura 5.** Molécula estável e molécula com um ou mais elétrons não pareados (radical livre).



**Fonte:** BIO-OXYGEN AUSTRALIA (2016).

Os radicais livres podem ser classificados em três tipos: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de cloro (ERC) (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). Exemplos de EROs incluem os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio singlete. Proteínas, lipídios e DNA são os principais alvos dessas espécies reativas (PIZZINO et al., 2017).

O organismo é exposto constantemente à inúmeros estímulos reativos de fontes exógenas e endógenas. Exemplos de fontes exógenas são: exposição ao oxigênio, radiação, poluição, álcool, drogas, metais pesados, bactérias, vírus e certos alimentos. A produção endógena ocorre a partir de processos como, ativação de células imunológicas, inflamação, isquemia, infecções, doenças, exercícios extenuantes, estresse e envelhecimento (SIMIONI et al., 2018; PIZZINO et al., 2017).

Além disso, outras importantes vias de geração de radicais livres no organismos são as mitocôndrias, em que o oxigênio parcialmente reduzido na cadeia transportadora de elétrons é um radical superóxido que pode gerar peróxido de hidrogênio, a auto-oxidação de flavina, tióis, hidroquinona e catecolaminas, via do ácido araquidônico, o retículo endoplasmático, sistemas de transporte de elétrons na membrana, peroxissomos, células fagocíticas e substâncias como metais de transição, ferro e cobre que geram radicais hidroxilas, etc. Todavia, o nosso organismo usa mecanismos de defesa antioxidantes para se proteger dos efeitos dos radicais livres. É o caso de enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e

glutathione S-transferase, que convertem os radicais livres em compostos menos reativos. Compostos de baixo peso molecular como algumas vitaminas, ácido úrico e a glutathione também inibem os radicais livres e promove uma defesa natural antioxidante (SRIVASTAVA; KUMAR, 2015).

A deficiência de compostos antioxidantes pode provocar uma condição de estresse oxidativo. Tal condição, caracteriza-se por um desequilíbrio entre os compostos pró e antioxidantes que pode provocar danos a nível celular e molecular e ser responsável pela patogênese de diversas doenças. Doenças renais, cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, problemas pulmonares, diabetes e o processo de envelhecimento, por exemplo, podem ter relação com o estresse oxidativo (LIGUORI et al., 2018).

Por outro lado, os radicais livres desempenham papéis importantes na ativação de diferentes vias de sinalização celular, fosforilação de proteínas, apoptose, na adesão de leucócitos, angiogênese, transcrição gênica, transdução e regulação de atividades celulares. Fagócitos liberam ainda radicais livres para destruição de invasores como mecanismo de defesa do organismo à doenças. Por essa razão, a presença desses radicais precisam ser mantidas dentro da célula em níveis basais, sendo vitais à saúde humana (PIZZINO et al., 2017; ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

## **6 Diabetes e estresse oxidativo**

O estresse oxidativo implica no desenvolvimento, patogênese e nas complicações da DM. O mecanismo exato ainda não é bem definido, porém, é de conhecimento que o aumento da glicose intracelular, conduz à produção de EROs em quantidades maiores que a demanda antioxidante celular. O estresse oxidativo consequente pode provocar complicações vasculares durante o diabetes, em especial o diabetes tipo 2, principalmente reações pró-trombóticas, que acarreta complicações cardiovasculares (LIGUORI et al., 2018).

A formação de EROs em indivíduos diabéticos é proveniente de processos que envolvem fosforilação oxidativa, auto-oxidação da glicose, NADPH oxidase, lipoxigenase, citocromo P<sub>450</sub>, monoxigenases e óxido nítrico sintase (SRIVASTAVA; KUMAR, 2015). A principal fonte de estresse oxidativo na DM são as mitocôndrias. Durante o metabolismo oxidativo, o oxigênio é reduzido a água e o oxigênio remanescente é convertido em radical livre de oxigênio. O aumento da glicose sanguínea característico da diabetes, provoca maior geração de piruvato a partir da glicólise, elevando assim os potenciais da membrana mitocondrial, elevando as EROs. Esse aumento pode inclusive causar lesões renais em indivíduos diabéticos.

Nesse contexto, os antioxidantes demonstram ser prospectivos para o controle do diabetes (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016; FAKHRUDDIN; ALANAZI; JACKSON, 2017).

Evidências clínicas indicam que o estresse oxidativo está fortemente correlacionado com a prevalência de DM2. A elevação dos níveis de biomarcadores de danos nos tecidos induzidos por estresse oxidativo de pacientes diabéticos tipo 2 e evidências de diminuição do status antioxidante total, como níveis reduzidos de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase) e de componentes não enzimáticos (vitamina C e E), são exemplos. Além disso, os níveis de peróxidos e outros biomarcadores do estresse oxidativo aumentam significativamente o que corrobora com a noção de que o estresse oxidativo está intimamente associado com a patogênese do DM2 (REHMAN; AKASH, 2017).

A DM é uma doença complexa com uma série de fatores envolvidos. Sua prevenção e controle são primordiais para a qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, estudos que priorizem o diagnóstico e tratamento precoce do diabetes são imprescindíveis.

## **7 Atividades biológicas de polissacarídeos microbianos**

Os polissacarídeos podem ser extraídos de fonte animal e vegetal, porém os microrganismos são a fonte mais promissora de polissacarídeos bioativos. Ademais, os organismos microbianos incluindo fungos, leveduras e algas apresentam a vantagem da facilidade em seu cultivo, podendo ser sintetizados em larga escala a nível industrial, em biorreatores com condições controladas durante processos de fermentação (SÁNCHEZ; MONTOYA; VARGAS, 2014).

Além desse fato, o interesse em pesquisas com polissacarídeos de microrganismos tem aumentando, por razão das recentes descobertas que revelam suas propriedades terapêuticas, apresentando atividades biológicas como ação anti-inflamatória, antitumoral, hipoglicemiante, imunomoduladora, antimicrobianas, antioxidante, dentre outras.

A **Tabela 1** expõe uma série de fungos que apresentam polissacarídeos com atividades biológicas relatados em literatura.

**Tabela 1.** Fungos com polissacarídeos de importância biológica relatados em literatura.

<b>Nome do fungo</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência</b>
<i>Grifola frondosa</i> , <i>Pleurotus</i> sp. <i>Monascus</i> <i>purpureus</i> , <i>Lentinula</i> <i>edodes</i> e <i>Trametes</i> <i>versicolor</i>	Antioxidante.	(SMITH; DOYLE; MURPHY, 2015).
<i>Tylopilus ballouii</i>	Anti-inflamatórias e antioxidantes.	(LIMA et al., 2016)
<i>Ganoderma lucidum</i> ; <i>Inonotus obliquus</i>	Antidiabetes	(XIAO et al., 2017; WANG et al., 2017).
<i>Lachnum</i> sp.	Antifadiga, hipoglicemiante e hipolicemiante.	(SURHIO et al., 2017; WANG et al., 2017).
<i>Cordyceps sinensis</i> e <i>Ganoderma atrum</i>	Efeitos hepatoprotetores (atividades antioxidante hepática, anti-apoptótica e anti-inflamatória) e efeito protetor na disfunção imune do cólon.	(FAN et al., 2018a; FAN et al., 2018b)
<i>Flammulina velutipes</i>	Imunomodulador	(WANG et al., 2018).
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Atividade antimicrobiana	(DARWESH et al., 2018).
<i>Fusarium</i> sp.; <i>Cordyceps</i> <i>militaris</i>	Antitumoral	(SALEHI et al., 2018; LIU et al., 2019).
<i>Polyporus umbellatus</i>	Efeito renoprotetor	(LI et al., 2019)
<i>Trichoderma kangansensis</i>	Anticâncer e antioxidante	(LU et al., 2019)

As características físico-químicas, solubilidade, estrutura e o baixo custo, fazem com que os polissacarídeos microbianos se sobressaiam industrialmente, competindo com polissacarídeos obtidos de algas marinhas e os de origem vegetal. Além disso, possuem características reológicas importantes que estão atribuídas à sua alta pureza e estrutura. São biodegradáveis, não tóxicos e suportam condições extremas, permanecendo ativos quando expostos à temperaturas, pH e salinidade variáveis (JINDAL; KHATTAR, 2018).

A indústria farmacêutica têm produzido inúmeros medicamentos com base em polissacarídeos. No entanto, os produtos comerciais derivados ainda são limitados, por

consequência das dificuldades em separá-los e purificá-los. Em contrapartida, técnicas simples, rápidas e efetivas para a separação e purificação de polissacarídeos de fungos para aplicação em alimentos e medicamentos funcionais tem sido desenvolvidas (YAN et al., 2014).

### 7.1 Atividade hipoglicemiante

O controle das taxas de glicose no sangue é indispensável para retardar ou prevenir o diabetes mellitus tipo 2, uma vez que, a hiperglicemia é um fator que propicia o seu desenvolvimento. Compostos capazes de retardar a produção ou absorção de glicose tendo enzimas como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase como alvo, são requisitadas nesse contexto (TELAGARI; HULLATTI, 2015).

Os carboidratos só podem ser absorvidos e entrar no sistema circulatório na forma de monossacarídeos. Os polissacarídeos ao serem ingeridos são degradados à oligossacarídeos ou dissacarídeos por ação da amilase salivar ou pancreática. A  $\alpha$ -amilase é uma enzima que hidrolisa as ligações  $\alpha$  de polissacarídeos. Os oligossacarídeos são hidrolisados em monossacarídeos (glicose e frutose) no intestino delgado por ação de  $\alpha$ -glicosidases, secretadas pelas células epiteliais do intestino. Essa é a etapa final do processo de digestão dos carboidratos (TENG; CHEN, 2017; OBOH et al., 2014). Fármacos inibidores dessas enzimas podem suprimir a hiperglicemia pós-prandial por dificultar a absorção de carboidratos, o que é interessante no tratamento de diabetes e obesidade (TENG; CHEN, 2017).

Muitos esforços tem se concentrado na busca por inibidores de fontes naturais, por razão dos efeitos colaterais desagradáveis dos inibidores presentes atualmente no mercado. A acarbose é um inibidor consolidado no mercado, no entanto, está associado com efeitos colaterais como diarreia, distensão abdominal, flatulência, dor abdominal e outras dores, não sendo muito apreciado pelos pacientes (TELAGARI; HULLATTI, 2015).

Kumar et al. (2018) encontraram atividade hipoglicemiante considerável em polissacarídeos extraídos de cogumelos *Agaricus bisporus*, ao realizar ensaios *in vitro* de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. Polissacarídeos obtidos de fungos também apresentam capacidade de inibir a  $\alpha$ -glicosidase. Liu et al. (2018) demonstraram o potencial de dois polissacarídeos extraídos de *Inonotus obliquus* sob a inibição da  $\alpha$ -glicosidase.

As pesquisas indicam que polissacarídeos podem representar uma fonte promissora de compostos naturais com propriedades hipoglicemiantes com benefícios à saúde e melhora na qualidade de vida dos pacientes. Visto que, inibidores de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase de origem natural, geralmente não apresentam efeitos colaterais (TENG; CHEN, 2017).

## 7.2 Atividade antioxidante

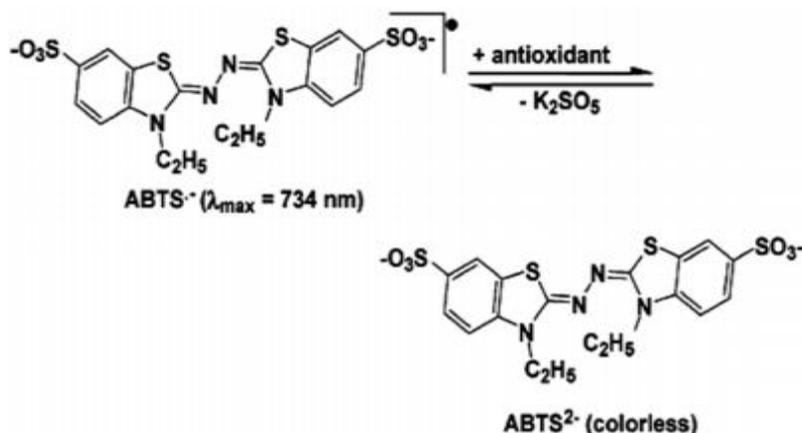
Os antioxidantes são quaisquer compostos capazes de impedir a oxidação ou neutralizar os radicais livres. São capazes de reduzir os efeitos das EROs, com conseqüente diminuição da ocorrência de doenças relacionadas. Para isso, os sistemas de defesa antioxidante agem impedindo a ocorrência de EROs ou capturando e bloqueando os radicais que são formados (PISOSCHI; POP, 2015).

Antioxidantes oriundos de produtos naturais são de interesse da indústria de alimentos e farmacêutica. Ensaios *in vitro* são úteis para avaliar os potenciais antioxidantes desses compostos. Apesar de haver inúmeras pesquisas com antioxidantes, ainda se carece de métodos padronizados para identificar, por razão da complexidade dos sistemas biológicos.

Dentre os métodos recorrentes em publicações para analisar potenciais antioxidantes, são descritos os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio como o ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio), LPIC (Capacidade de inibição da peroxidação lipídica), TRAP (potencial reativo antioxidante total), inibição do radical óxido nítrico, atividade de eliminação de radicais hidroxila, eliminação de radicais de peróxido de hidrogênio, eliminação do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), eliminação da formação de radicais superóxidos, etc. Há também métodos baseados na transferências de elétrons para reduzir algum composto como TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), FRAP (ensaio do poder antioxidante pela redução férrica), eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), capacidade de redução do Cobre (II), etc. (BADARINATH et al., 2010).

O método do radical ABTS<sup>+</sup> consiste em um ensaio de descoloração que mensura a atividade de um antioxidante a partir da sua capacidade de estabilizar o radical ABTS<sup>+</sup>. O radical é preparado inicialmente a partir de uma solução de ABTS e uma solução de persulfato de potássio, formando um composto de cor verde escura. Na presença de um antioxidante, doador de hidrogênio, o cátion é reduzido, havendo descoloração do meio reacional (**Figura 6**), que é proporcional à atividade antioxidante, mensurada a partir da leitura em espectrofotômetro à 734 nm (RE et al., 1999).

**Figura 6.** Estabilização do radical  $ABTS^{\cdot+}$  por um antioxidante.



**Fonte:** SHALABY; SHANAB (2013)

Para determinar a capacidade de compostos agirem como antioxidantes na eliminação de radicais hidroxilas, o princípio da reação de Fenton (**Equação 1**) pode ser utilizado, para simular a geração de radicais hidroxilas. Trata-se de um método colorimétrico baseado numa reação redox, na qual o  $Fe^{2+}$  é oxidado a  $Fe^{3+}$  pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que por sua vez, é reduzido ao íon hidroxila e ao radical hidroxila (BRANDS et al., 2019).

### Equação 1.



O peróxido de hidrogênio não é muito reativo, porém, é capaz de penetrar membranas biológicas e dar origem a radicais hidroxilas, que por sua vez, são capazes de atacar substratos orgânicos e causar injúrias celulares (SASIKUMAR; KALAISEZHIAN, 2014). Compostos antioxidantes, são importantes doadores de elétrons e capazes de eliminar os radicais hidroxilas, defendendo o organismo de danos oxidativo.

Compostos como polissacarídeos, flavonoides, polifenóis entre outros, são relatados como fontes promissoras de antioxidantes (WANG et al., 2016), instigando pesquisadores a investigarem as propriedades e características dessas moléculas naturais.

## **CAPÍTULO II**

### **Otimização da extração e caracterização química de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***

Revista: Carbohydrate Polymers

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

1 **Otimização da extração e caracterização química de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus***  
2 ***microsporus var. oligosporus***

3  
4 Pâmala Évelin Pires Cedro<sup>a</sup>, Tátilla Putumujú Santana Mendes<sup>a</sup>, Romário Alves Santana<sup>a</sup>,  
5 Alana Caise dos Anjos Miranda<sup>a</sup>, Baraquizio Braga do Nascimento Junior<sup>a</sup>, Helena Bonciani  
6 Nader<sup>b</sup>, Gildomar Lima Valasques Junior<sup>a\*</sup>

7 <sup>a</sup> Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
8 (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brasil.

9 <sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular, INFAR, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de  
10 Maio 100, São Paulo 04044-020, SP, Brasil.

11  
12 **RESUMO**

13  
14 Fungos filamentosos apresentam peculiaridades que os tornam imprescindíveis em diversos  
15 processos industriais. Polissacarídeos obtidos da parede celular de fungos filamentosos podem  
16 apresentar propriedades terapêuticas importantes para a área da saúde. Este estudo buscou  
17 otimizar as condições de extração e caracterizar polissacarídeos obtidos da parede celular de  
18 *Rhizopus microsporus var. oligosporus*. Utilizando a metodologia de superfície de resposta,  
19 através do delineamento experimental Box-Behnken, foram encontradas como condições  
20 ótimas de extração pH 13, temperatura de 120°C e tempo de 60 min, com rendimento máximo  
21 em torno de 18,5%. A cromatografia de exclusão molecular apontou um pico que indica que o  
22 polissacarídeo apresenta peso molecular médio de 120 kDa e DPn de 741. Sinais típicos de  
23 polissacarídeos foram encontrados nas análises de espectroscopia do infravermelho. As análises  
24 por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e por ressonância magnética  
25 nuclear sugerem um  $\beta(1,3) \beta(1,6)$  glucogalactano. Tais investigações permitem compreender  
26 as características dos polissacarídeos que conduzem à atividades biológicas e outras aplicações.

27 **Palavras-chave:** Biomassa. Polissacarídeos. *Rhizopus* sp. Parede celular.

28  
29 **1. Introdução**

30  
31 Por muitos séculos os fungos foram empregados em práticas rudimentares de  
32 biotecnologia, sem que houvesse o conhecimento dos mecanismos que os conduziam à

33 fermentação de amido, grãos e frutas que se concretizava na produção de pães, cerveja, vinhos  
34 e outras bebidas (Cairns, Nai, & Meyer, 2018). Com o advento da biotecnologia dos fungos foi  
35 possível compreender os processos que os levam a produzir compostos de grande utilidade para  
36 a humanidade e otimizá-los.

37 Os fungos filamentosos atraem um interesse comercial considerável por atuarem como  
38 fábricas para uma gama de produtos. O *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* é um fungo  
39 filamentoso de importância econômica na Indonésia, por ser empregado como inóculo para a  
40 produção do tempeh. O tempeh é um alimento rico em proteínas, obtido a partir da fermentação  
41 da soja por espécies de *Rhizopus* sp. (Hartanti, Rahayu, & Hidayat, 2015). A natureza e  
42 características estruturais da biologia fúngica estimulam sua exploração no ponto de vista  
43 econômico.

44 A parede celular fúngica apresenta estruturas como proteínas, lipídeos e polissacarídeos  
45 que desempenham papéis fundamentais para sobrevivência do fungo. Os polissacarídeos da  
46 parede celular tem demonstrado potencial para aplicação na área da saúde, com atividades  
47 antioxidantes, hipoglicemiantes, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, dentre outras  
48 (He et al., 2017). Essas propriedades estão relacionadas principalmente com suas características  
49 químicas. Dessa forma, estudos que envolvam métodos para otimizar a extração e  
50 caracterização de polissacarídeos devem ser encorajados.

51 Este estudo buscou otimizar a extração de polissacarídeos da parede celular de *R.*  
52 *microsporus* var. *oligosporus* e caracterizá-los quimicamente.

53

## 54 **2. Material e Métodos**

55

### 56 *2.1 Microrganismo*

57

58 O fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* foi concebido da Coleção de  
59 Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz  
60 (Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil) e mantido em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a 4°C.

61

### 62 *2.2 Condições de cultivo do microrganismo*

63

64 O *R. microsporus* var. *oligosporus* foi inicialmente inoculado em meio BDA por 5 dias  
65 à 30°C em estufa incubadora para demanda bioquímica por oxigênio (BOD SL200/90  
66 Incubadora - SOLAB). Após o crescimento, uma solução de esporos contendo

67 aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  esporos/mL foi cultivada em meio líquido contendo 10 g/L de  
68 glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de extrato de malte diluídos em  
69 água destilada (Chang et al., 2018), com pH inicial 5,0. A fermentação submersa foi realizada  
70 em agitação constante a 150 rpm em *shaker* (Incubadora *shaker* SL 222, SOLAB), a 30°C por  
71 120 h. A biomassa foi obtida a partir de filtração a vácuo e utilizada para extração dos  
72 polissacarídeos da parede celular do fungo.

73

### 74 2.3 Extração dos Polissacarídeos

75

76 A partir da biomassa seca em pó (1 g), os polissacarídeos foram extraídos utilizando 50  
77 mL hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em diferentes valores de pH (11, 12 e 13), temperatura  
78 (80, 100 e 120°C) e períodos de tempo (20, 40 e 60 min) de extração, seguindo o planejamento  
79 Box-Behnken. Após os tratamentos, o volume obtido foi centrifugado (Modelo 206 BL-  
80 EXCELSA) a 8.000 g por 15 min. Após centrifugação, a biomassa foi descartada e o  
81 sobrenadante foi medido e três vezes do volume obtido, foi adicionado de álcool etílico  
82 absoluto. A mistura foi agitada e mantida por 12 horas a 4°C. Os polissacarídeos foram  
83 coletados após centrifugação (centrífuga Baby® I Modelo 206-BL FANEM) a 8.000 g por 20  
84 min. O precipitado contendo os polissacarídeos brutos foi seco a frio utilizando liofilizador  
85 (Liotop K105). O teor de polissacarídeos no extrato bruto foi determinado pelo método do  
86 fenol-ácido sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956) e o rendimento do produto foi medido  
87 em porcentagem de polissacarídeos por unidade de biomassa fúngica.

88

### 89 2.4 Planejamento Experimental

90

91 O planejamento Box-Behnken (Box & Behnken, 1960) foi empregado para analisar a  
92 influência dos parâmetros de temperatura (°C), pH e tempo (min) na extração dos  
93 polissacarídeos, com triplicata do ponto central (C) que estimaram o erro puro, totalizando 15  
94 experimentos. Os tratamentos foram efetuados aleatoriamente e a significância dos parâmetros  
95 no desempenho da extração foi otimizada usando a metodologia da superfície de resposta  
96 (MSR). As variáveis foram estudadas em três níveis, temperaturas de 80, 100 e 120°C, pH 11,  
97 12 e 13 e tempo de 20, 40 e 60 min. Os resultados corresponderam ao rendimento de  
98 polissacarídeos em gramas a cada 1 g de biomassa fúngica. O software Statistica® versão 10.0  
99 e a análise de variância (ANOVA) foram utilizados para análise dos dados.

100

## 101 2.5 Determinação do teor de Proteínas Totais

102

103 O conteúdo de proteínas foi estimado seguindo a metodologia de Bradford (1976), que  
104 consiste na ligação do corante Azul de Coomassie às proteínas. A ligação causa uma mudança  
105 na absorção máxima do corante de 465 para 595 nm, a mudança é monitorada e proporcional  
106 ao teor de proteínas. A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

107

## 108 2.6 Purificação de Polissacarídeos

109

110 A cromatografia de exclusão (filtração em gel) foi utilizada para separar a mistura de  
111 polissacarídeos. A amostra contendo polissacarídeos bruto (10 mg/mL) foi adicionada à coluna,  
112 preenchida inicialmente com Sephadex-G100 (Sigma, EUA) e condicionada com tampão  
113 Citrato-Fosfato (0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7) correspondendo à fase móvel, em fluxo constante. Frações  
114 de 2 mL foram coletadas e submetidas à determinação do teor de polissacarídeos totais pelo  
115 método do fenol-ácido sulfúrico, que se baseia na desidratação dos polissacarídeos pelo ácido  
116 sulfúrico, seguido de complexação entre os produtos formados e o fenol, um composto com cor  
117 é gerado e a mudança da cor é proporcional à quantidade de açúcares presentes (Dubois et al.,  
118 1956).

119

## 120 2.7 Determinação do Peso Molecular e Grau de Polimerização

121

122 O teor de açúcares redutores e açúcares totais dos polissacarídeos foram utilizados para  
123 estimar o peso molecular médio (MWn) e o grau de polimerização (DPn). Para isso, foi  
124 empregado o método do DNS (3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1956) e do fenol-ácido sulfúrico  
125 (Dubois et al., 1956), respectivamente. O DNS reage com o açúcar redutor e forma o ácido 3-  
126 amino-5-nitrosalicílico, que possui cor avermelhada que é absorvida a 540 nm. Os valores  
127 foram aplicados à fórmula:  $DPn = [(\text{carboidratos totais em } \mu\text{g de D-glicose}) / \text{Valor de redução em } \mu\text{g de maltose}] \times 1.9$ ;  $MWn = [(DPn) \times 162] + 18$  (Vettori, Franchetti, & Contiero, 2012).

129

## 130 2.8 Análise por espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

131

132 A identificação de grupamentos químicos peculiares de polissacarídeos foi realizada  
133 utilizando espectrofotômetro de infravermelho com transformadas de Fourier (Spectrometer  
134 FT-IR / Varian Inova 500) englobando a região de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>, com 20 varreduras.

135

136 *2.9 Composição Monossacarídica*

137

138 Para análise de composição monossacarídica por cromatografia em fase gasosa  
139 acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) a amostra de polissacarídeos foi hidrolisada,  
140 utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 3 mol/L e exposta à temperatura de 120°C por 1h  
141 seguindo a metodologia de Yan et al. (2019) com adaptações. A amostra foi submetida à  
142 derivatização por sililação, a partir de uma mistura reacional de N,O-Bis(trimetilsilil)  
143 trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma- 41  
144 Aldrich®) e piridina. A mistura foi aquecida a 70 °C por 30 min (Sjöstrom & Alén, 2013) e  
145 posteriormente injetada no CG-EM (GCMS-QP2010 SE). A temperatura do injetor iniciou em  
146 80°C e permaneceu por 5 min, aumentando para 290°C na razão de 4°C/min. Após a injeção da  
147 amostra (290°C) a corrida ocorreu no período de 1h e 30 min, nos últimos 40 min da corrida o  
148 aparelho oscilou 5°C a menos. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi  
149 de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e  
150 varredura de massas no intervalo de 30 a 600 Da. A identificação dos açúcares foi realizada por  
151 comparação dos espectros das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho.

152

153 *2.10 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)*

154

155 A amostra foi dissolvida em água deuterada (D<sub>2</sub>O) e inserida em espectrômetro (Varian  
156 Inova 500) operando em 11,7 T. As análises foram realizadas observando o <sup>1</sup>H a 500 MHz e o  
157 <sup>13</sup>C a 125 MHz com sonda de detecção direta. Os espectros foram registrados a 340 K.  
158 Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como referência de desvio químico.

159

160 **3. Resultados e discussão**

161

162 *3.1 Otimização da extração de polissacarídeos de R. microsporus var. oligosporus*

163

164 A parede celular é uma estrutura dinâmica, composta majoritariamente por  
165 polissacarídeos. As aplicações de polissacarídeos na área da saúde e nos mais diversos setores  
166 industriais estão associados à sua estrutura e propriedades químicas, atraindo interesse à estudos  
167 que desvendem tais aspectos.

168 O planejamento experimental de Box-Behnken permitiu otimizar as condições de  
 169 extração de polissacarídeos da parede celular de *R. microsporus* var. *oligosporus* a partir de 1  
 170 g de biomassa fúngica, empregando três variáveis em 15 experimentos, incluindo a triplicata  
 171 no ponto central. Os resultados de rendimento dos polissacarídeos estão expressos na **Tabela**  
 172 **1**. O contraste entre os valores observados e preditos, demonstram que a variância residual é  
 173 suficientemente pequena com o modelo aplicado (**Figura 1**).

174

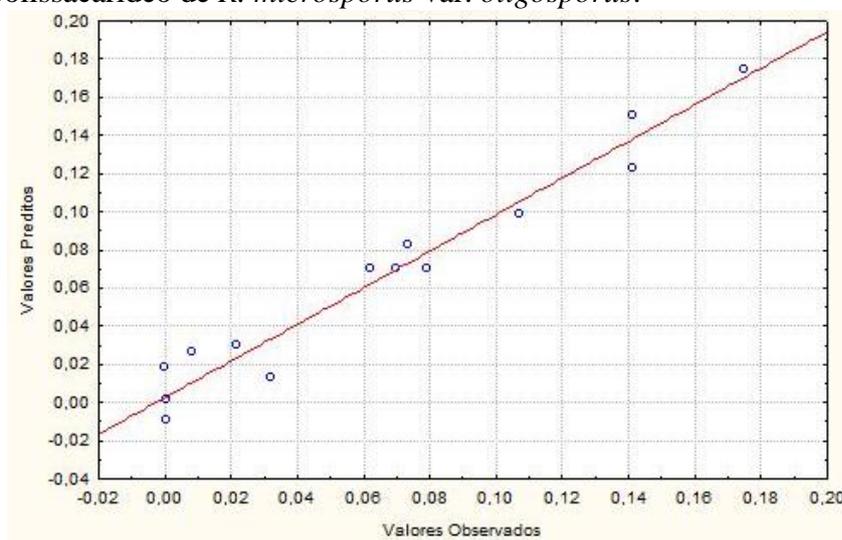
175 **Tabela 1.** Planejamento experimental Box-Benken aplicado na otimização da produção de  
 176 polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Valores observados Massa obtida (g)	Valores preditos (g)
<b>1</b>	13 (+1)	80 (-1)	40 (0)	0,1413	0,1233
<b>2</b>	13 (+1)	100 (0)	20 (-1)	0,0737	0,0829
<b>3</b>	13 (+1)	100 (0)	60 (+1)	0,1749	0,1744
<b>4</b>	13 (+1)	120 (1)	40 (0)	0,1415	0,1508
<b>5</b>	12 (0)	80 (-1)	20 (-1)	0,0218	0,0306
<b>6</b>	12 (0)	80 (-1)	60 (+1)	0,0084	0,0269
<b>7C</b>	12 (0)	100 (0)	40 (0)	0,0698	0,0703
<b>7C</b>	12 (0)	100 (0)	40 (0)	0,0623	0,0703
<b>7C</b>	12 (0)	100 (0)	40 (0)	0,0789	0,0703
<b>8</b>	12 (0)	120 (1)	20 (-1)	0,0320	0,0135
<b>9</b>	12 (0)	120 (1)	60 (+1)	0,1073	0,0985
<b>10</b>	11 (-1)	80 (-1)	40 (0)	0,0003	0,0000
<b>11</b>	11 (-1)	100 (0)	20 (-1)	0,0007	0,0012
<b>12</b>	11 (-1)	100 (0)	60 (+1)	0,0003	0,0000
<b>13</b>	11 (-1)	120 (1)	40 (0)	0,0002	0,0182

177 (C): ponto central; Os valores codificados são apresentados em parênteses.

178

179 **Figura 1.** Relação entre valores observados e valores preditos obtidos na otimização da  
 180 produção de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*.



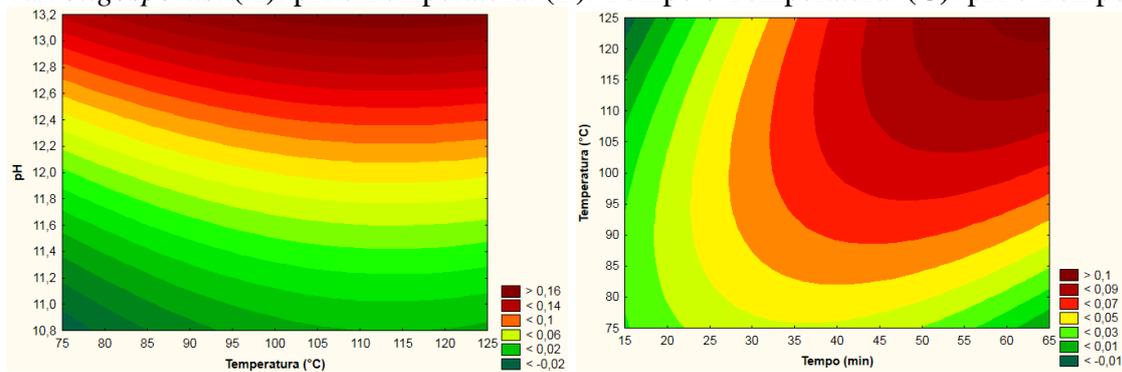
181

182 A inspeção da MSR (**Figura 2**) revelou que as condições ideais para maior rendimento  
 183 de polissacarídeos dentro da região experimental estudada tendem à valores mais altos  
 184 incluindo pH 13, temperatura de 120°C e tempo de 60 min. Durante os processos de extração  
 185 de polissacarídeos, as propriedades do solvente, o tamanho das partículas da biomassa, a  
 186 temperatura e o tempo afetam diretamente a eficiência da extração, melhorando o rendimento.  
 187 A extração em meio alcalino deve-se à grande quantidade de hidroxilas presentes nos  
 188 polissacarídeos que interagem com o meio. A temperatura influencia tanto aumentando a  
 189 solubilidade ao facilitar a agitação das moléculas, quanto proporcionando a lise térmica da  
 190 parede celular. Tempos mais longos de extração podem aumentar o rendimento final de  
 191 polissacarídeos (Zhang, Lin, & Ye, 2018; Miao et al., 2018).

192

193 **Figura 2.** Curvas de níveis para otimização da extração de polissacarídeo de *R. microsporus*  
 194 var. *oligosporus*. (A): pH e Temperatura. (B): Tempo e Temperatura. (C): pH e Tempo.

195



196

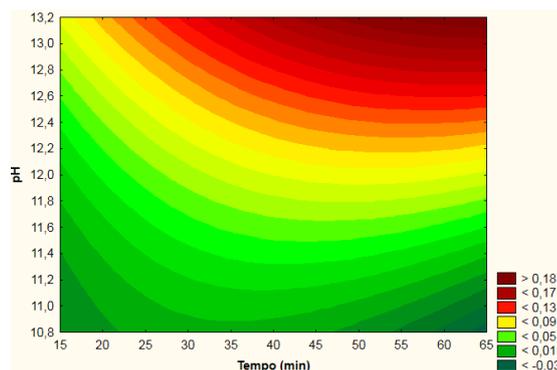
(A)

(B)

197

198

199



(C)

200 O rendimento máximo de polissacarídeos nas condições ótimas de extração foi de  
 201 aproximadamente 18,5%, com massa de 0,1848 g. Temperaturas maiores de extração foram  
 202 empregadas em estudos conduzidos por Yang et al. (2013), com temperatura equivalente à  
 203 210°C por 43,6 min para extrair polissacarídeos de *Grifola frondosa* e obtiveram rendimento  
 204 de 25,1%. Rendimento de 17,28% foi obtido por Chen et al. (2014) a partir das condições

205 ótimas de NaOH a 0,3 M, temperatura de 80°C por 4 h. Os estudos revelam a influência das  
 206 variáveis no processo de extração.

207 A **Equação 1** representa o comportamento da resposta da extração de polissacarídeos  
 208 de *R. microsporus var. oligosporus* sob influência das variáveis.

209

210 **Eq 1.**

211 Massa do Polissacarídeo (g)=  $1,1626 (\pm 0,6955) + 0,0033(T) (\pm 0,0033) - 0,00002(T)^2 (\pm$   
 212  $0,00001) - 0,2311(pH) (\pm 0,1062) + 0,0103(pH)^2 (\pm 0,0043) - 0,01613(t) (0,0028) - 0,00004(t)^2$   
 213  $(\pm 0,00001) + 0,000004(T)(pH) (\pm 0,0002) + 0,00005(T)(t) (\pm 0,00001) + 0,001267 (pH)(t) (\pm$   
 214  $0,0002).$

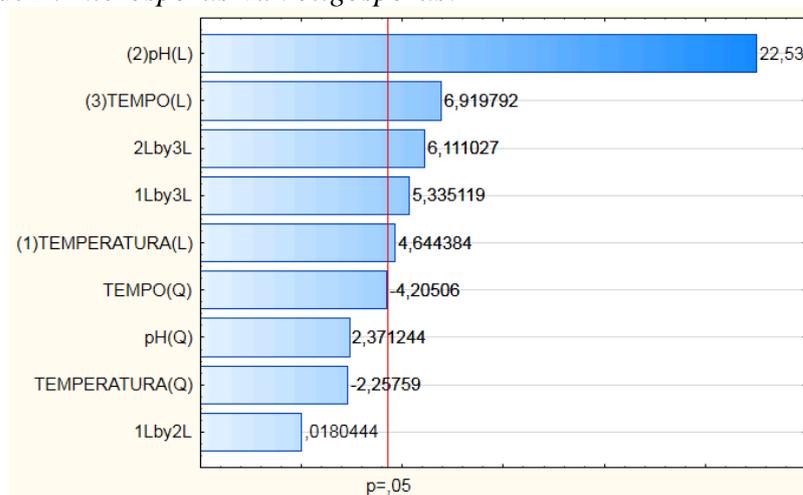
215 Onde, (T)= Temperatura °C e (t)= Tempo em minutos.

216

217 A análise do diagrama de Pareto (**Figura 3**) revela que linearmente (L) as variáveis pH,  
 218 tempo e temperatura foram significativas para a extração dos polissacarídeos, bem como a  
 219 relação entre as variáveis pH e tempo e temperatura e tempo. Quadraticamente (Q) a relação  
 220 entre as variáveis não tiveram um valor de p maior que 0,05.

221

222 **Figura 3.** Diagrama de Pareto mostrando significância das variáveis na extração de  
 223 polissacarídeo de *R. microsporus var. oligosporus*.



224

225

226 A análise de variância (ANOVA) (**Tabela 2**), permitiu avaliar o modelo quadrático  
 227 quanto a sua capacidade de explicar o comportamento das variáveis e as influências no resultado  
 228 obtido, descartando erros aleatórios.

229

230

231

232

233

234 **Tabela 2.** Análise de variância – ANOVA para o modelo quadrático obtida na otimização da  
 235 extração de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MS</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>
<b>Regressão</b>	0,046489	9	0,005165	13,16	4,77
<b>Resíduo</b>	0,001963	5	0,000393		
<b>Falta de ajuste</b>	0,001825	3	0,000608	8,80	19,16
<b>Erro puro</b>	0,000138	2	0,000069		
<b>Total SS</b>	0,048452	14			

236 SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática. R<sup>2</sup> 0,96.

237

238 O valor do R<sup>2</sup> de 0,96 encontrado para o modelo quadrático, infere que 96% dos  
 239 resultados encontrados são explicados pelo modelo experimental proposto, com intervalo de  
 240 confiança de 95%. Para avaliar a significância estatística da regressão é preciso considerar a  
 241 distribuição de Fisher, de forma que o F calculado quando maior que o F tabelado, indica que  
 242 a regressão foi significativa (Bezerra et al., 2008). Para falta de ajuste, o valor de F calculado é  
 243 menor que o F tabelado, indicando que o modelo foi satisfatório e não há falta de ajuste. Os  
 244 resultados mostram que a região estudada pode ser aplicada para a extração de polissacarídeos  
 245 da parede celular de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

246 Em comparação, a **Tabela 3** apresenta o resultado da ANOVA para o modelo linear na  
 247 otimização da extração de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*. Apesar de a  
 248 análise do modelo linear indicar uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa,  
 249 o modelo quadrático melhor representa o comportamento das variáveis, quando observamos o  
 250 valor do R<sup>2</sup>.

251

252 **Tabela 3.** Análise de variância – ANOVA para o modelo linear obtida na otimização da  
 253 extração de polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MS</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>
<b>Regressão</b>	0,044446	6	0,007408	14,79	3,58
<b>Resíduo</b>	0,004006	8	0,000501		
<b>Falta de ajuste</b>	0,003867	6	0,000645	9,33	19,33
<b>Erro puro</b>	0,000138	2	0,000069		
<b>Total SS</b>	0,048452	14			

254 SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática. R<sup>2</sup> 0,91.

255

### 256 3.2 Determinação do teor de proteínas

257

258 Os polissacarídeos podem existir sozinhos ou conjugados à proteínas exprimindo  
 259 diversas atividades biológicas (Scarpari et al., 2017). O teor de proteínas encontrados na

260 amostra foi de 0,21%, como determinado pelo método de Bradford (1976), indicando que a  
261 amostra é composta majoritariamente por polissacarídeos.

262

### 263 3.3 Purificação de Polissacarídeos

264

265 Para obtenção de polissacarídeos de fontes naturais, inúmeras técnicas de isolamento e  
266 purificação podem ser empregadas. A precipitação por solventes orgânicos é um método de  
267 purificação preliminar que apresenta como ponto negativo a possibilidade de precipitação de  
268 impurezas além dos polissacarídeos de interesse (Krawczyk et al., 2018). A separação por  
269 cromatografia de exclusão propiciou a separação da fração particular do polissacarídeo de *R.*  
270 *microsporus* var. *oligosporus* e foi possível identificar (**Figura 4**) a presença de um pico  
271 simétrico. O peso molecular médio encontrado para o pico majoritário foi em torno de 120 kDa  
272 e DPn de 741 de acordo com a equação de Vettori, Franchetti e Contiero (2012).

273 Os pesos moleculares estão diretamente envolvidos com as atividades biológicas de  
274 polissacarídeos (Soltani et al. 2013). Huang et al. (2016) ressaltam que polissacarídeos com  
275 tamanhos maiores que 100 kDa, geralmente apresentam propriedades biológicas.

276 Além disso, o peso molecular de um polissacarídeo exerce relação sob sua solubilidade.  
277 Quanto maior o peso molecular, menor a solubilidade em água. Os grupos –OH em  
278 polissacarídeo permitem a interação com as moléculas de água. Porém, isso também leva à uma  
279 interação entre os polissacarídeos por ligação de hidrogênio. Assim, a solubilidade depende do  
280 equilíbrio entre a interação molécula-água e a interação entre molécula-molécula. Para  
281 polissacarídeos solúveis em água, a solubilidade é favorecida por uma camada de solvatação ao  
282 redor da molécula que mantém as moléculas de polissacarídeos afastadas umas das outras. Em  
283 polissacarídeos com baixa solubilidade em água, as interações entre os polímeros (molécula-  
284 molécula) conduz à sua agregação e precipitação (Guo et al., 2017).

285

286

287

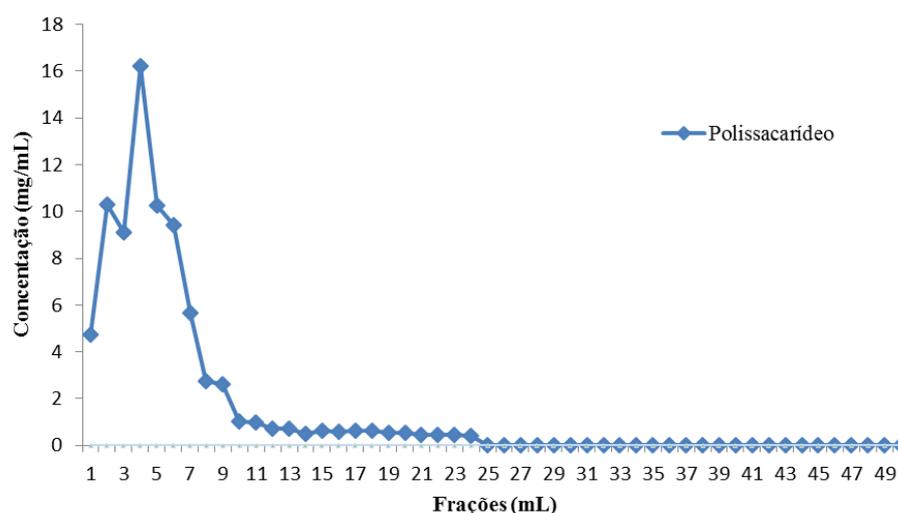
288

289

290

291

292 **Figura 4.** Separação do polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus* em Sephadex G-  
 293 100.



294  
 295

#### 296 3.4 Análise por espectroscopia no FT-IR

297

298 A espectroscopia FT-IR é um instrumento altamente sensível na análise estrutural de  
 299 polissacarídeos. O método foi utilizado para identificar os principais grupos funcionais  
 300 presentes na amostra. A **Figura 5** apresenta as bandas de absorção que representam a vibração  
 301 das ligações químicas. O sinal na posição  $3241\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento dos  
 302 OH, ligados aos anéis dos monossacarídeos, enquanto que, os sinais  $2926,2\text{ cm}^{-1}$  e  $2854,6\text{ cm}^{-1}$   
 303 equivalem à ligações entre hidrogênios e carbonos dos anéis dos açúcares (CH). A banda em  
 304  $1434\text{ cm}^{-1}$  e  $1405\text{ cm}^{-1}$  podem ser equivalentes à vibração de flexão  $\text{CH}_2$  e presença de  
 305 compostos carbonílicos (Venkatesan et al., 2012). A absorção no banda  $1025\text{ cm}^{-1}$  pode indicar  
 306 o esqueleto do anel de piranose (Hu et al, 2017). As bandas  $865$ ,  $683$  e  $554\text{ cm}^{-1}$  também são  
 307 características de carboidratos, principalmente glucanos (Mateus et al., 2017; Synytsya &  
 308 Novak, 2014). Os carboidratos exibem forte absorção na região  $1200 - 950\text{ cm}^{-1}$ , conhecida  
 309 como região de impressão digital. Nessa posição, a intensidade das bandas são típicas de  
 310 polissacarídeos, permitindo sua identificação (Moghannem et al., 2018). A análise do estudo  
 311 indica fragmentos compatíveis à estrutura de polissacarídeos.

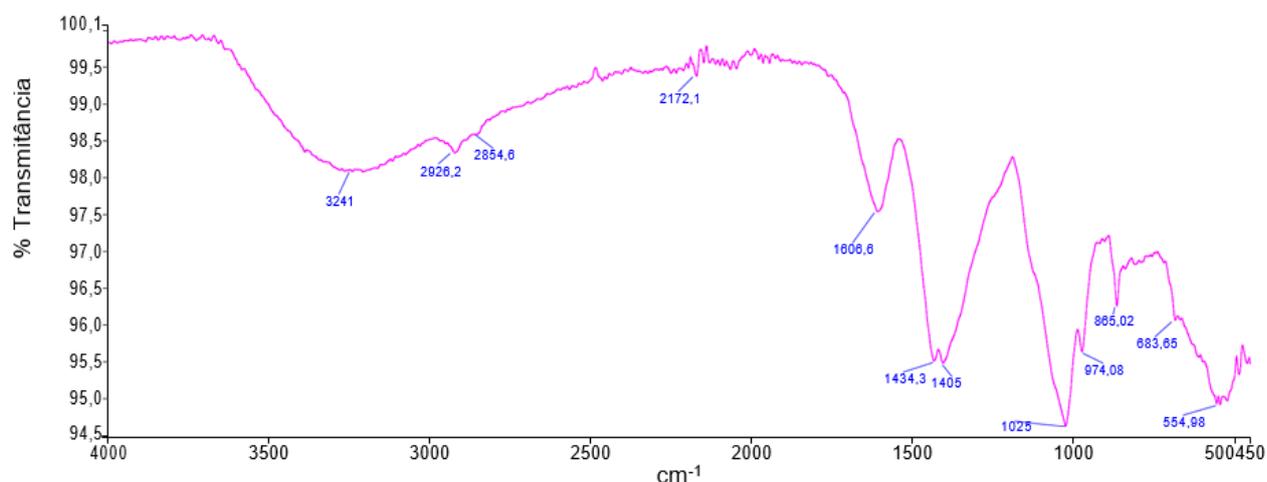
312

313

314

315

316

317 **Figura 5.** Espectro de FT-IR de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

318

319

320 **3.5 Análise por CG-EM**

321

322 O polissacarídeo hidrolisado de *R. microsporus* var. *oligosporus* foi analisado por CG-  
 323 EM para determinação da composição monossacarídica. A **Figura 6** exibe o cromatograma  
 324 obtido, no qual foram encontradas 7 substâncias que foram identificadas por comparação com  
 325 os registros da biblioteca. O tempo de retenção e grau de similaridade de cada substância são  
 326 apresentados na **Tabela 4**. Foi possível detectar a presença de glicose (96% de similaridade) e  
 327 galactose (90% de similaridade) na amostra, as demais substâncias apontadas são produtos do  
 328 processo de derivatização. Khatua & Acharya, (2018) também detectaram glicose e galactose  
 329 em polissacarídeos de *Russula seneci*, além de xilose, ramnose e manose em menores  
 330 proporções. A derivatização por sililação permitiu a substituição do hidrogênio de grupos  
 331 polares como o OH, por grupos sililo, contribuindo significativamente com a volatilização da  
 332 amostra necessária para o CG-EM (Su et al. 2017).

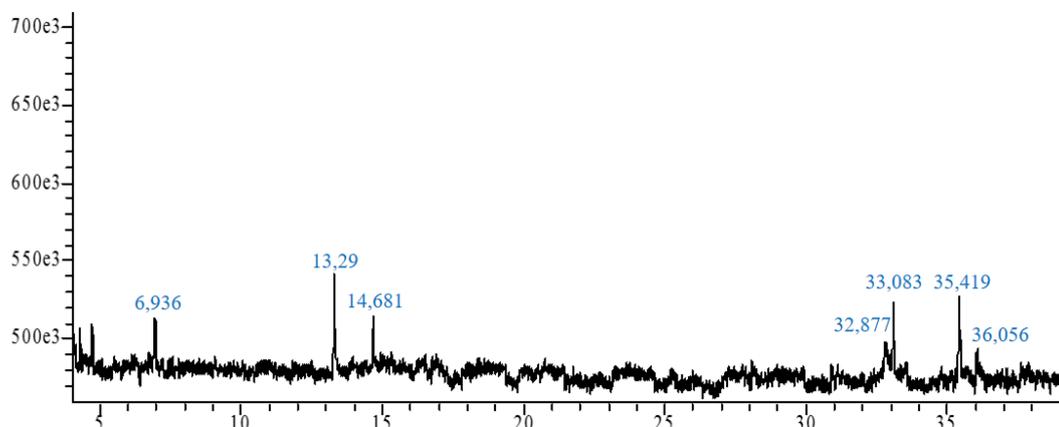
333

334 **Tabela 4.** Tempos de retenção e composição monossacarídica da amostra de polissacarídeo de  
 335 *R. microsporus* var. *oligosporus*.

Tempo de Retenção (min)	Substância identificada	Similaridade (%)
6,936	Ácido propanóico	95
13,29	Éster trimetilsilílico	94
14,681	Silanol	85
32,877	D-glicose/D-manose	35
33,083	D-galactose	90
35,419	D- glicose/ Glucopiranoose	96
36,056	Ácido palmítico	88

336

337 **Figura 6.** Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de polissacarídeo de *R. microsporus*  
 338 *var. oligosporus*.



339

340

### 341 3.6 Análise por RMN

342

343 Análises por RMN são empregadas para caracterização de polissacarídeos, pois  
 344 fornecem informações estruturais, incluindo as configurações anoméricas. Sinais de carbono  
 345 ( $^{13}\text{C}$ ) são frequentemente mais nítidos que os sinais de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ). Os sinais mais finos no  
 346 perfil de RMN 1D resultam em picos mais bem resolvidos e, com menos sobreposições.  
 347 Configurações do tipo  $\beta$  aparecem principalmente na região de 101 a 105 ppm no espectro do  
 348 RMN (Lin & Yang, 2019; Pomin, 2012). Com isso, podemos inferir que os sinais  $\delta$  105,19 e  
 349 105,69 no espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 7**) correspondentes ao carbono anômérico (C1) de dois  
 350 carboidratos aparentes, apresentam configurações do tipo  $\beta$ . Os prótons que aparecem na região  
 351 entre 4-5 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  (**Figura 8**) são indicativos de prótons ligados ao carbono  $\beta$ -  
 352 anomérico. Carbonos C2-C5 e prótons H2-H6 são geralmente identificados entre 65-87ppm e  
 353 3,2-4,5 ppm, respectivamente, enquanto que C6 são geralmente apontados entre 55,7-64,7 ppm  
 354 (Lin & Yang, 2019). Neste estudo o  $\delta$  74,56 foi compreendido como o C6 ligado de um dos  
 355 açúcares, enquanto que o  $\delta$  63,76 está associado ao C6 não ligado de outro açúcar.

356

357

358

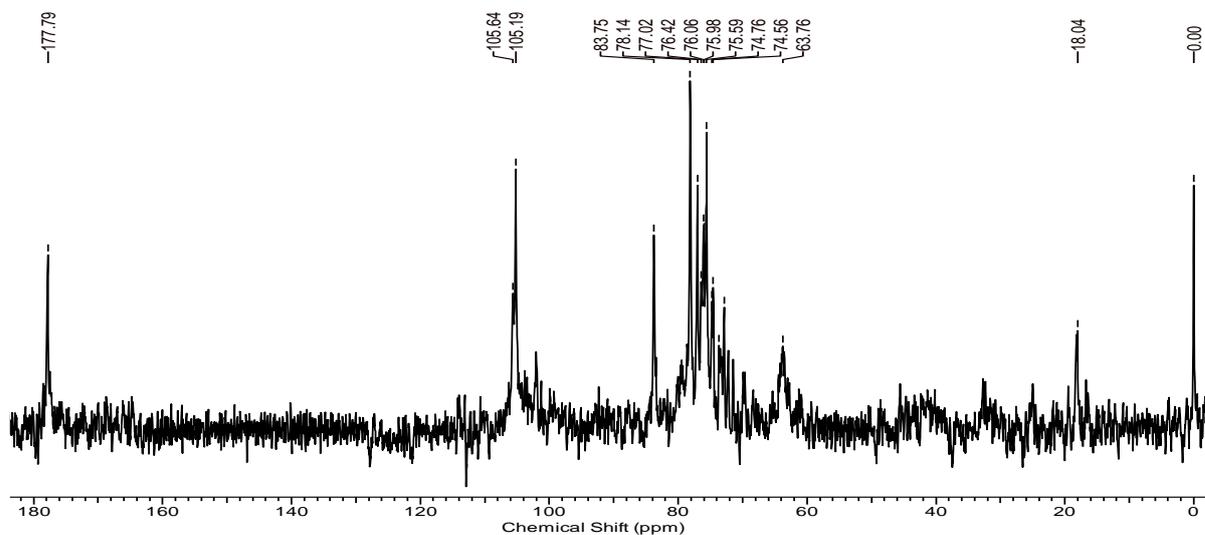
359

360

361

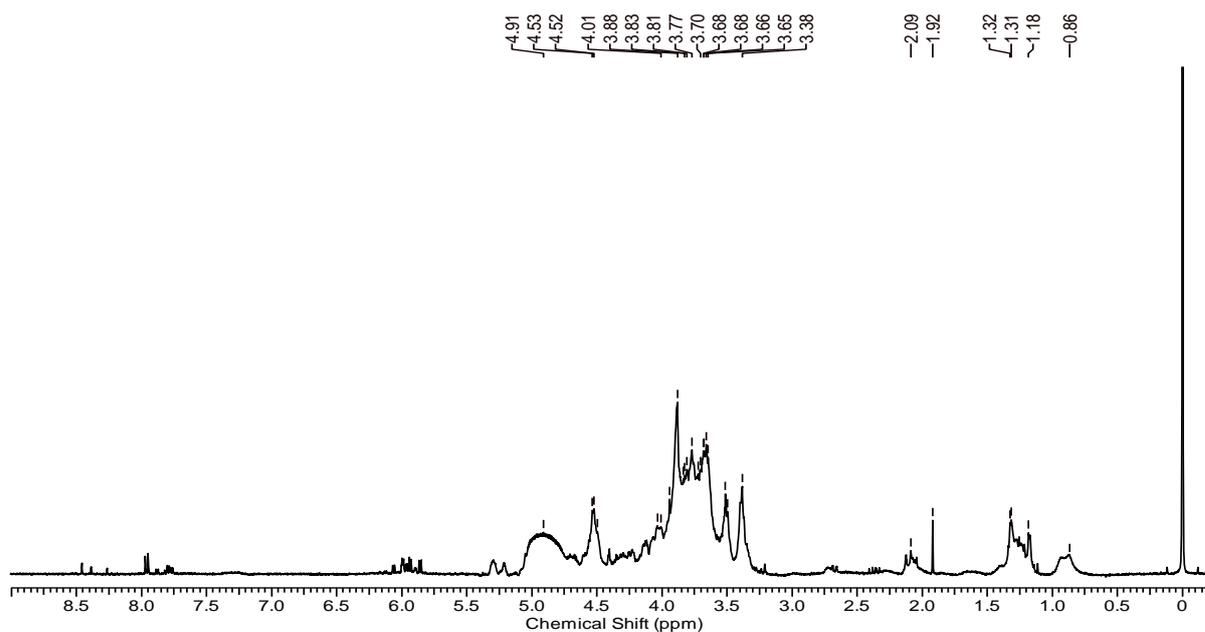
362

363

364 **Figura 7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

365

366

367 **Figura 8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus*.

368

369

370 Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apontaram sinais característicos de polissacarídeos que indicam  
 371 ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) com ramificações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6). Os sinais apresentados no CG-EM e no RMN  
 372 indicam que possivelmente o polissacarídeo é um  $\beta$ (1,3)  $\beta$ (1,6) glucogalactano.

373 Fungos filamentosos são fontes para obtenção de biomoléculas, como polissacarídeos  
 374 que possuem características químicas que funcionalmente tem resultado em atividades  
 375 biológicas. Polissacarídeos glucogalactanos obtido de *Agaricus bisporus* por exemplo, foram  
 376 relatados com atividades antioxidante e neuroprotetoras (Hassan, Ghoneim & Ibrahim, 2015).  
 377 Nesse contexto, conhecer a estrutura química dos polissacarídeos da parede celular fúngica é

378 importante tanto para compreender mecanismos de processo infeccioso, quanto para obter  
379 novas moléculas que podem ser empregadas na promoção de saúde.

380

#### 381 **4. Conclusões**

382

383 Explorar as características de moléculas como polissacarídeos fúngicos são primordiais  
384 para compreender suas possibilidades de aplicações nas mais diversas áreas.

385 A análise em FT-IR indicou fragmentos característicos de polissacarídeos,  
386 demonstrando que as condições de extração empregadas (temperatura 120°C, tempo de 60 min  
387 e pH 13) e otimizadas por MSR resultaram na extração de polissacarídeos da parede celular de  
388 *R. microsporus* var. *oligosporus*. O CG-ME e a RMN indicaram que o polissacarídeo obtido é  
389 possivelmente um  $\beta(1,3)$   $\beta(1,6)$  glucogalactano. Aspectos como estruturas químicas, pesos  
390 moleculares e conformações dos polissacarídeos estão intimamente associadas com as  
391 atividades biológicas de polissacarídeos. Até o momento, não há relatos disponíveis em  
392 literatura sobre as conformações de polissacarídeos de parede celular de *Rhizopus microsporus*  
393 var. *oligosporus* e sua associação com propriedades biológicas.

394

#### 395 **Agradecimentos**

396

397 Agradecemos à UESB (Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia), CAPES  
398 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional  
399 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do  
400 Estado da Bahia) e ao Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular da UESB  
401 (PMBqBM-UESB).

### CAPÍTULO III

#### **Atividades antioxidante e hipoglicemiante de polissacarídeos obtidos de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***

Revista: Carbohydrate Polymers

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

1 **Polissacarídeo de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* como um potencial antioxidante**  
2 **e hipoglicemiante**

3  
4 Pâmala Évelin Pires Cedro<sup>a</sup>, Tátilla Putumujú Santana Mendes<sup>a</sup>, Romário Alves Santana<sup>a</sup>,  
5 Alana Caise dos Anjos Miranda<sup>a</sup>, Baraquizio Braga do Nascimento Junior<sup>a</sup>, Helena Bonciani  
6 Nader<sup>b</sup>, Gildomar Lima Valasques Junior<sup>a\*</sup>

7 <sup>a</sup> Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
8 (UESB), Avenida José Moreira Sobrinho, Jequié 45208-091, BA, Brasil.

9 <sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular, INFAR, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de  
10 Maio 100, São Paulo 04044-020, SP, Brasil.

11  
12 **RESUMO**

13  
14 Polissacarídeos tem demonstrado propriedades biológicas, que os tornam importantes para a  
15 prevenção e tratamento de diversos distúrbios. Neste estudo, os polissacarídeos obtidos da  
16 parede celular de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* foram investigados quanto à  
17 capacidade antioxidante e hipoglicemiante. Foram conduzidos ensaios *in vitro* de eliminação  
18 do radical ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazoline-6-ácido sulfônico)) e de eliminação de  
19 radicais hidroxilas para determinação do poder antioxidante e o ensaio de inibição da enzima  
20  $\alpha$ -amilase para capacidade hipoglicemiante. Valores de EC<sub>50</sub> para sequestro dos radicais livres  
21 foi de 7,69 e 17,8 mg/mL, para ABTS<sup>+</sup> e hidroxilas, respectivamente. Os polissacarídeos  
22 apresentaram potencial quanto à inibição da  $\alpha$ -amilase com EC<sub>50</sub> de 1,66 mg/mL. Os resultados  
23 sugerem que polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus* são promissores para a  
24 terapêutica de distúrbios associados ao estresse oxidativo e hiperglicemia.

25 **Palavras-chave:** radicais livres.  $\alpha$ -amilase. *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*.  
26 Polissacarídeos.

27  
28 **1. Introdução**

29  
30 O emprego de compostos naturais oriundos de uma variedade de fontes, têm sido  
31 amplamente investigado quanto sua aplicação na prevenção de diversas doenças e manutenção  
32 da saúde. Inúmeras moléculas sintetizadas por fungos são bioativas, esses compostos são

33 encontrados principalmente nos corpos frutíferos, no micélio cultivado e no caldo do meio de  
34 cultura. São elas, polissacarídeos, proteínas, lipídeos, flavonoides, tocoferóis, fenólicos,  
35 carotenoides, enzimas, dentre outros (Valverde, Hernández-Pérez, & Paredes-López, 2015).

36 Os polissacarídeos estão entre os compostos mais importantes do ponto de vista  
37 medicinal, por apresentarem um vasto espectro de atividades biológicas. Tais como  
38 antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e hipoglicemiante  
39 (Ullah et al., 2019).

40 O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica que atinge milhares de  
41 pessoas em todo o mundo. O número de indivíduos com diabetes em 2019 foi estimado em 463  
42 milhões e, para 2045 estima-se que o valor aumente para cerca de 700 milhões de diabéticos  
43 (Saeedi et al., 2019). Esse aumento progressivo, é consequência principalmente de fatores  
44 dietéticos, hábitos de vida, obesidade, aumento de espécies reativas de oxigênio e seus danos  
45 oxidativos, etc. (Zhao et al. 2018). O tratamento do diabetes mellitus demanda altos custos  
46 financeiro em inúmeros países (Sirisidthi, Kosai, & Jiraungkoorskul, 2016) e é causa  
47 predominante de mortalidade.

48 O estresse oxidativo está intimamente associado com a patogênese e progressão do  
49 diabetes. O aumento na geração de radicais livres atrelado à baixa da defesa antioxidante, pode  
50 conduzir à peroxidação lipídica e ao desenvolvimento de resistência à insulina. Os  
51 hipoglicemiantes orais disponíveis no mercado, apresentam efeitos colaterais como desconforto  
52 gastrointestinal, vômitos, diarreia, ganho de peso e disfunção hepática. Dessa forma, pesquisas  
53 que envolva a descoberta de novos agentes potenciais com ação antioxidante e hipoglicemiante  
54 são necessários para prevenir e tratar o DM (Choi et al., 2016; Luo et al., 2019).

55 Polissacarídeos são úteis nesse sentido, por serem abundantes na natureza e  
56 apresentarem baixa ou nenhuma toxicidade *in vivo* (Swierczewska et al., 2016). Neste estudo,  
57 a capacidade hipoglicemiante e antioxidante de polissacarídeos obtidos da parede celular de  
58 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* foram investigadas.

59

## 60 **2. Materiais e Métodos**

61

### 62 *2.1 Microrganismo*

63

64 O fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* foi obtido da Coleção de  
65 Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz

66 (Rio de Janeiro, Brasil) e preservado em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a 4°C até início  
67 dos experimentos.

68

## 69 2.2 Condições de cultivo

70

71 O microrganismo foi ativado em meio BDA a 30°C durante 5 dias em incubadora com  
72 demanda bioquímica por oxigênio (BOD SL200/90 Incubadora - SOLAB). Após ativação,  
73 aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  esporos/mL foram inoculados em meio líquido previamente  
74 esterilizado a 121°C por 15 min, contendo glicose (10 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura  
75 (3 g/L) e extrato de malte (3 g/L) em água destilada, com pH final 5 (Chang et al., 2018). O  
76 cultivo ocorreu sob agitação constante a 150 rpm em incubadora *shaker* (SL 222, SOLAB) em  
77 temperatura de 30°C por 120 h. A partir da biomassa resultante da fermentação do *R.*  
78 *microsporus* var. *oligosporus* ocorreu a extração dos polissacarídeos.

79

## 80 2.3 Extração dos Polissacarídeos

81

82 A biomassa seca foi triturada para facilitar a extração dos polissacarídeos que ocorreu  
83 utilizando 50 mL (a cada 1 g de biomassa) de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1  
84 mol L<sup>-1</sup>) com pH 13, à temperatura de 120°C, durante 60 min. Posteriormente, a mistura foi  
85 centrifugada (centrífuga Baby® I Modelo 206-BL FANEM) a 8.000 g por 15 min, para  
86 obtenção do sobrenadante. Ao sobrenadante foram adicionados álcool etílico absoluto 3 vezes  
87 do seu volume e deixado a 4°C por 12 h. A suspensão foi centrifugada a 8.000 g por 20 min e  
88 o depositado de polissacarídeos foi liofilizado (Liotop K105) e reservados para os ensaios  
89 experimentais.

90

## 91 2.4 Atividade Antioxidante

92

93 A atividade antioxidante dos polissacarídeos foi avaliada seguindo o método de Re et  
94 al. (1999) para habilidade de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azinobis-3-  
95 etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e o ensaio de eliminação de radicais hidroxila de Jing et al.  
96 (2018).

97

98

99

#### 100 2.4.1 Ensaio de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup>

101

102 No ensaio de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup> (Re et al., 1999) 30µl da amostra de  
103 polissacarídeos em diferentes concentrações (0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/mL) e 3  
104 mL da solução de ABTS<sup>+</sup> (7 mM) foram colocados para reagir por 5 minutos ao abrigo de luz.  
105 A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Marte spectro 560) a 734 nm. O ácido ascórbico  
106 foi utilizado como padrão.

107 As taxas de atividade antioxidante foram expressas em porcentagem:

$$108 \text{ Taxa de eliminação (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

109

110 Onde A<sub>1</sub> é a absorbância da amostra e A<sub>0</sub> é a absorbância do controle.

111

#### 112 2.4.2 Ensaio de eliminação de radicais hidroxila (OH•)

113

114 Para o ensaio de eliminação de radicais hidroxila a reação ocorreu utilizando uma  
115 mistura contendo 1 mL de sulfato ferroso (9 mmol/L), 1 mL de ácido salicílico (9 mmol/L)  
116 diluído em etanol absoluto, 1 mL das amostras nas diferentes concentrações (0,5, 1, 2, 4, 8, 10,  
117 20, 30, 40, 50 e 60 mg/mL) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (8,8 mmol/L) (Jing et al. (2018)).  
118 A mistura reacional foi incubada a 37°C por 30 min e a leitura realizada a 510 nm. Ácido  
119 ascórbico foi empregado como padrão.

120 A atividade antioxidante foi expressa como:

$$121 \text{ Taxa de eliminação (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

122

123 A<sub>1</sub> é a absorbância da amostra e A<sub>0</sub> é a absorbância do controle.

124 Os valores encontrados nos ensaios de eliminação de radicais ABTS<sup>+</sup> e OH• foram  
125 interpretados como a concentração de amostra que foi capaz de provocar a redução de 50% dos  
126 radicais livres (EC<sub>50</sub>).

127

#### 128 2.5 Atividade hipoglicemiante

129

##### 130 2.5.1 Determinação da capacidade de inibição da α-amilase

131

132 O ensaio para determinação da capacidade de inibição da α-amilase foi realizado  
133 seguindo metodologia de Gulati, Harding & Palombo (2012) com modificações. Foram

134 utilizados 100 µl de solução de  $\alpha$ -amilase pancreática porcina (2 mg/mL) em tampão fosfato  
135 (pH 6,9), 100 µl da amostra de polissacarídeos em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,2, 0,3,  
136 0,4, 0,5, 1 e 2 mg/mL) e 100 µl de solução de amido (1%). A mistura foi incubada a 50°C por  
137 10 min e após esse período foi interrompida com a adição de 200 µl de reagente DNS (3,5-  
138 dinitrosalicílico) e incubada a 100°C por 5 min. 2 mL de água destilada foram adicionadas para  
139 diluir a mistura reacional. A leitura foi realizada a 540 nm. Acarbose foi empregada como  
140 padrão.

141 A atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase foi expressa como:

$$142 \text{ Taxa de inibição (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

143

144 Onde  $A_1$  é a absorbância da amostra e  $A_0$  é a absorbância do controle.

145

## 146 2.6 Análises estatísticas

147

148 Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como  
149 média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou  $EC_{50}$ . As comparações estatísticas foram realizadas utilizando  
150 teste de Mann Whitney, com um nível de significância de  $p \leq 0,01$  usando o *Software* Graphpad  
151 Prism 5.0.

152

## 153 3. Resultados e Discussão

154

### 155 3.1 Atividade antioxidante

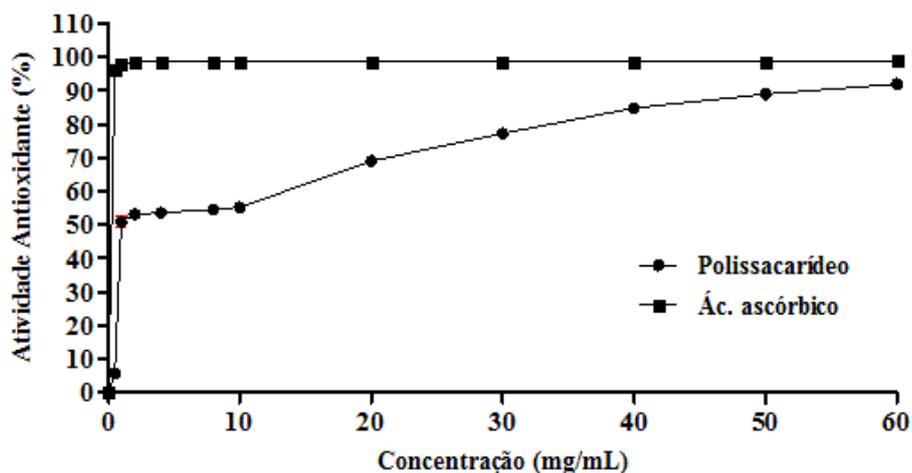
156

157 Os radicais livres exercem benefícios ao organismo, por estarem envolvidos em  
158 inúmeros processos fisiológicos, tais como ativação de vias de sinalização celular e defesa do  
159 organismo à invasores. No entanto, o excesso de radicais livres e oxidantes causam estresse  
160 oxidativo, fenômeno prejudicial à várias estruturas celulares e que uma vez não controlado é  
161 responsável pela indução de diversas processos patológicos, tal como o desenvolvimento de  
162 complicações no diabetes (Pizzino et al., 2017; Liguori et al., 2018). A capacidade antioxidante  
163 de polissacarídeos obtidos de *R. microsporus* var. *oligosporus* foi determinada neste estudo  
164 através da sua capacidade de eliminação dos radicais livres  $ABTS^+$  e  $OH^*$  (**Figura 1**).

165

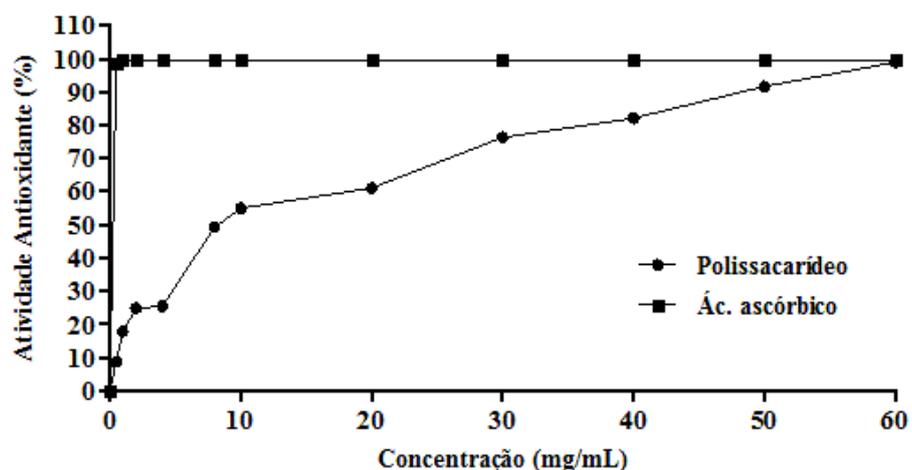
166

167 **Figura 1.** Atividade antioxidante *in vitro* de polissacarídeos de *R. microsporus* var.  
 168 *oligosporus*. (A) efeito da eliminação de radicais ABTS<sup>+</sup>; (B) efeito da eliminação de radicais  
 169 OH<sup>•</sup>. Os resultados são expressos como média ± DP (n = 3).



170  
171

(A)



172  
173  
174

(B)

175 O ABTS<sup>+</sup> é um radical livre amplamente aplicado em ensaios de determinação de  
 176 atividade antioxidante (Hu et al., 2017), inclusive de amostras como polissacarídeos. De acordo  
 177 com os resultados encontrados, o efeito sequestrante do padrão sobre o radical ABTS<sup>+</sup> atingiu  
 178 um platô logo nas primeiras concentrações, com atividades antioxidantes superiores à 98%. Em  
 179 contrapartida, a capacidade do polissacarídeo bruto de eliminação foi dependente da  
 180 concentração. Na maior concentração avaliada (60 mg/mL) a atividade sequestradora foi  
 181 equivalente à 92 ± 0,41%, enquanto que na concentração de 1 mg/mL a capacidade antioxidante  
 182 foi de 50,85 ± 0,74% (**Figura 1(A)**). Yuan et al. (2017) ao investigarem o potencial de  
 183 eliminação do ABTS<sup>+</sup> por polissacarídeos de *Russula griseocarnosa* em concentração de 1  
 184 mg/mL encontrou atividade inferior (aproximadamente 10%) ao relatado em nosso estudo.  
 185 Compostos antioxidantes agem capturando o cátion ABTS<sup>+</sup>, promovendo a estabilidade da

186 molécula. Os grupos hidroxilas dos polissacarídeos são fortemente associados com as  
187 atividades antioxidantes relatadas (Hu et al., 2017).

188 Os resultados do ensaio de eliminação de radicais hidroxila, indicaram que a atividade  
189 antioxidante do polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus* é dose dependente, com  
190 aumento da atividade concomitante ao aumento da concentração da amostra. Partindo de  $17,8$   
191  $\pm 0,06\%$  de atividade sequestradora a  $1$  mg/mL e alcançando  $98,8 \pm 0,03\%$  na concentração de  
192  $60$  mg/mL. O ácido ascórbico (padrão) permaneceu com um platô em todas as concentração  
193 avaliadas, com atividade antioxidante em torno de  $99\%$  (**Figura 1 (B)**). Li et al. (2015)  
194 observaram valores próximos de atividade de eliminação de radicais OH<sup>•</sup> aos encontrados neste  
195 estudo para polissacarídeos de *Agaricus bisporus* (Lange), quando comparados à concentração  
196 de  $8$  mg/mL. O radical hidroxila têm sido considerado o maior responsável por dano oxidativo  
197 à maioria das biomoléculas, podendo interagir com DNA, proteínas, lipídeos, aminoácidos e  
198 açúcares, principalmente devido a sua alta reatividade (Pisoschi & Pop, 2015). Com isso, a  
199 eliminação de radicais hidroxila é importante para a proteção de sistemas vivos, uma vez que,  
200 quando não controlados podem ocasionar inúmeras patologias.

201 O EC<sub>50</sub> foi calculado traçando a porcentagem de inibição contra as diferentes  
202 concentrações da amostra antioxidante (**Tabela 1**). Os valores de EC<sub>50</sub> indicam a concentração  
203 da amostra a qual leva à redução de  $50\%$  da concentração inicial do radical. Para o ensaio de  
204 eliminação do ABTS<sup>+</sup> o EC<sub>50</sub> calculado foi de  $7,69$  mg/mL. Essa atividade é próxima à de três  
205 frações de polissacarídeos de *Poria cocos sclerotium*: PCP-1, PCP-2 e PCP-3, com EC<sub>50</sub> de  
206  $5,39$ ,  $8,51$  e  $9,52$  mg/mL, respectivamente (Tang et al., 2014). O EC<sub>50</sub> encontrado para  
207 polissacarídeo de *R. microsporus* var. *oligosporus* no ensaio de eliminação de radicais hidroxila  
208 foi de  $17,8$  mg/mL. Valores próximos foram relatados para polissacarídeos extraídos de  
209 *Ganoderma sinense*, com EC<sub>50</sub> de  $17,2$  mg/mL (Zeng et al. 2010). Valores baixos, indicam alta  
210 atividade antioxidante (Olugbami, Gradegesin, & Odunola, 2015).

211

212 **Tabela 1.** Valores de EC<sub>50</sub> para atividade antioxidante de polissacarídeos de *R. microsporus*  
213 var. *oligosporus*.

Ensaio antioxidante	EC <sub>50</sub> (mg/mL) ± DP*
Eliminação do radical ABTS <sup>+</sup>	$7,69 \pm 0,2$
Eliminação de Radicais Hidroxila	$17,8 \pm 0,06$

214 \*Os resultados são expressos como média ± DP (n=3).

215

216 A atividade de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup> e do radical hidroxila por polissacarídeos  
217 de *R. microsporus* var. *oligosporus* diferiram ( $p < 0,01$ ) dos grupos controles.

218

219 3.2 Capacidade de inibição da  $\alpha$ -amilase

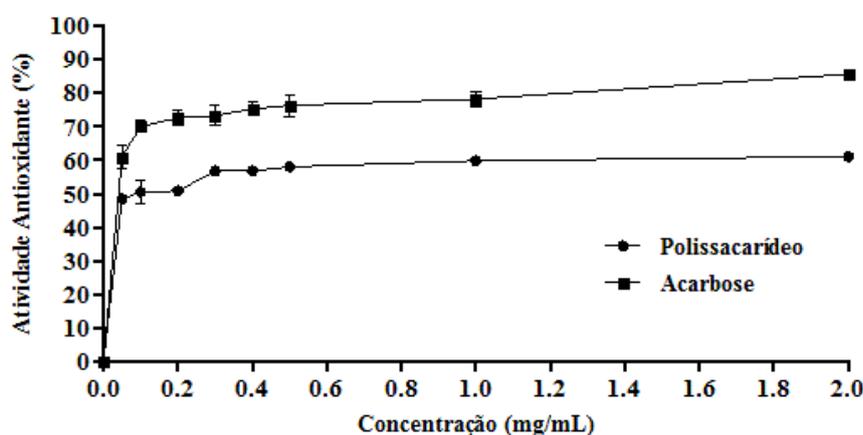
220

221 O DM é caracterizado por aumento nos níveis de açúcar no sangue, que pode ocasionar  
 222 inúmeras complicações ao indivíduo. As abordagens terapêuticas, buscam principalmente  
 223 reduzir as flutuações nos níveis de açúcares. Para retardar a absorção de glicose e diminuir a  
 224 hiperglicemia pós-prandial o uso de inibidores de enzimas hidrolisantes de carboidratos, tal  
 225 como a  $\alpha$ -amilase, são requisitados (Thilagam et al., 2013).

226 Polissacarídeos da parede celular de *R. microsporus* var. *oligosporus* apresentaram uma  
 227 capacidade de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase equivalente à  $48,5 \pm 0,07\%$  na concentração de 0,05  
 228 mg/mL alcançando  $61,1 \pm 0,37\%$  na maior concentração avaliada no estudo (2 mg/mL). O  $EC_{50}$   
 229 calculado foi de  $1,66 \pm 0,35$  mg/mL. A acarbose, utilizada como padrão indicou atividade  
 230 hipoglicemiante superior ao polissacarídeo com taxa de  $85,69 \pm 0,38\%$  na concentração de 2  
 231 mg/mL (**Figura 2**), havendo diferença estatística ( $p < 0,01$ ) entre os grupos que compõe a  
 232 amostra e o padrão. A capacidade dos polissacarídeos de *R. microsporus* var. *oligosporus* em  
 233 inibir a  $\alpha$ -amilase foi superior à de polissacarídeos de *Inonotus obliquos* (UIOPS) que  
 234 apresentou aproximadamente 30% e próximo a do seu complexo cromo (III) (UIOPC) com  
 235 cerca de 60% de taxa de inibição em concentração de 2,5 mg/mL (Wang et al., 2018).

236

237 **Figura 2.** Capacidade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase por polissacarídeos de *R. microsporus*  
 238 var. *oligosporus*. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 3).



239

240 A inibição da  $\alpha$ -amilase, colabora para a diminuição da absorção de glicose e por essa  
 241 razão é considerada uma estratégia eficaz para o controle do DM. No entanto, a possibilidade  
 242 de ocorrência de resistência, somado aos efeitos colaterais adversos dos inibidores atuais,  
 243 permeia a necessidade de busca por novos inibidores eficazes e com menos efeitos secundários  
 244 indesejáveis.

245 Polissacarídeos de fungos filamentosos têm atraído atenção considerável nos últimos  
246 anos por apresentarem possibilidades terapêuticas que favorecem a promoção de saúde.  
247 Polissacarídeos com potenciais antioxidantes e hipoglicemiantes podem atuar no controle e  
248 prevenção de uma das doenças que mais afetam os indivíduos nos últimos tempos, a DM.

249

### 250 **Conclusões**

251

252 Os polissacarídeos obtidos da parede celular de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*  
253 demonstraram potencial em sequestrar radicais livres ABTS<sup>+</sup> e hidroxilas, com atividade  
254 antioxidante dependente da concentração. Apresentaram também potencial como inibidor da  $\alpha$ -  
255 amilase, uma enzima importante em processos de digestão de carboidratos. Este estudo fornece  
256 base teórica para o desenvolvimento de novos produtos voltados à prevenção e tratamento de  
257 distúrbios bioquímicos como o diabetes e para o controle dos radicais livres.

258

### 259 **Agradecimentos**

260

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

## CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, a otimização da extração de polissacarídeos da parede celular do fungo filamentosso *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* possibilitou identificar as condições ideais que conduzem a um maior rendimento em massa. Os resultados indicaram que o polissacarídeo obtido pode se tratar de um  $\beta(1,3)$   $\beta(1,6)$  glucogalactano. O glucogalactano identificado apresentou atividades antioxidantes, pela capacidade de eliminar radicais livres *in vitro* e hipoglicemiantes ao apresentar a capacidade de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase.

Os resultados obtidos até o momento, fornecem evidências de que polissacarídeos obtidos de *R. microsporus* var. *oligosporus* podem ser promissores para o tratamento ou prevenção de distúrbios associados ao estresse oxidativo, tal como o diabetes.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, N. H.; MUSTAFA, S.; MAN, Y. B. C. Microbial polysaccharides and their modification approaches: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 2, p. 332–347, 2015.

AHMED, S.; MUSTAFA, G.; ARSHAD, M.; RAJOKA, M. I. Fungal Biomass Protein Production from *Trichoderma harzianum* Using Rice Polishing **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

AYDAR, A. Y. Utilization of Response Surface Methodology in Optimization of Extraction of Plant Materials. In: **Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes**. [s.l.] InTech, p. 157-169, 2018.

BADARINATH, A. V.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S. T. V. S. R.; RAJAN, T. V. S.; GNANAPRAKASH, K. A. Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 6, p. 1276–1277, 2010.

BAKER, S. E. Protein hyperproduction in fungi by design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8621–8628, 2018.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BIO-OXYGEN AUSTRALIA. Disponível em: <<https://www.bio-oxygen.com.au/free-radicals-and-oh-radicals/>>. Acesso em 20 de Fev. de 2020.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455, nov. 1960.

BRADFORD, M. M. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDS, S.; SCHEIN, P.; CASTRO-OCHOA, K. F.; GALINSKI, E. A. Hydroxyl radical

scavenging of the compatible solute ectoine generates two N-acetimides. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 674, p. 108097, 2019.

CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2018.

CANTABRANA, I.; PERISE, R.; HERNÁNDEZ, I. Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 2, n. 2, p. 103–111, 2015.

ČERNÁ, M.; BARROS, A. S.; NUNES, A.; ROCHA, S. M.; DELGADILLO, I.; ČOPÍKOVÁ, J.; COIMBRA, M. A. 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.

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

CHEN, Y.; YIN, L.; ZHANG, X.; WANG, Y.; CHEN, Q.; JIN, C.; HU, Y.; WANG, J. Optimization of alkaline extraction and bioactivities of polysaccharides from rhizome of *Polygonatum odoratum*. **BioMed research international**. v. 2014, 2014.

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

CHOI, D., PIAO, Y., YU, S. J., LEE, Y. W., LIM, D. H., CHANG, Y. C., PARK, S. S.; LEE, M. K.; CHA, W. S.; YOU, D. S.; CHO, H. Antihyperglycemic and antioxidant activities of polysaccharide produced from *Pleurotus ferulae* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 6, p. 1872–1882, 2016.

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

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

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156-160, 2016.

DARWESH, O. M.; SULTANB, Y. Y.; SEIFB, M. M.; MARREZB, D. A. Bio-evaluation of crustacean and fungal nano-chitosan for applying as food ingredient. **Toxicology Reports**, v. 5, n. February, p. 348–356, 2018.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247–264, 2016.

DOERING, T. L.; CUMMINGS, R. D.; AEBI, M. Chapter 23 Fungi. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; STANLEY, P.; HART, G. W.; AEBI, M.; DARVILL, A. G.; KINOSHITA, T.; PACKER, N. H.; PRESTEGARD, J. H.; SCHNAAR, R. L. **Essentials of Glycobiology**. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EL-OKKI, A. A. K. E.-H.; GAGAOUA, M.; BOUREKOUA, H.; HAFID, K.; BENNAMOUN, L.; DJEKRIFF-DAKHMOCHE, S.; EL-OKKI, M. E.-H.; MERAIHI, Z. Improving Bread Quality with the Application of a Newly Purified Thermostable  $\alpha$ -Amylase from *Rhizopus oryzae* FSIS4. **Foods**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

ESHER, S. K.; OST, K. S.; KOHLBRENNER, M. A.; PIANALTO, K. M.; TELZROW, C. L.; CAMPUZANO, A.; NICHOLS, C. B.; MUNRO, C.; WORMLEY JR, F. L.; ALSPAUGH, J. A. Defects in intracellular trafficking of fungal cell wall synthases lead to aberrant host immune recognition. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007126, 2018.

FAKHRUDDIN, S.; ALANAZI, W.; JACKSON, K. E. Diabetes-induced reactive oxygen species: mechanism of their generation and role in renal injury. **Journal of diabetes research**, v. 2017, 2017.

FAN, S.; HUANG, X.; WANG, S.; LI, C.; ZHANG, Z.; XIE, M.; NIE, S. Combinatorial usage of fungal polysaccharides from *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma atrum* ameliorate drug-induced liver injury in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, n. March, p. 66–72, 2018a.

FAN, S.; NIE, S. P.; HUANG, X. J.; WANG, S.; HU, J. L.; XIE, J. H.; NIE, Q. X.; XIE, M. Y. Protective properties of combined fungal polysaccharides from *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma atrum* on colon immune dysfunction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1049–1055, 2018b.

FRAC, M.; HANNULA, S. E.; BEŁKA, M.; JEĐRYCZKA, M. Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–9, 2018.

GEOGHEGAN, I.; STEINBERG, G.; GURR, S. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 12, p. 957-967, 2017.

GOW, N. A. R.; LATGE, J.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 1-25, 2017.

GRYGANSKYI, A. P.; GOLAN, J.; DOLATABADI, S.; MONDO, S.; ROBB, S.; IDNURM, A. et al. Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus* Species. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 6, p. 2007-2018, 2018.

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

GUO, M. Q.; HU, X.; WANG, C.; AI, L. Polysaccharides: Structure and Solubility. **Solubility of polysaccharides**, p. 7-21, 2017.

HAMEED, A.; HUSSAIN, S. A.; YANG, J.; IJAZ, M. U.; LIU, Q.; SULERIA, H. A. R.; SONG, Y. Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1101, 2017.

HANEEF, M.; CESERACCIU, L.; CANALE, C.; BAYER, I. S.; HEREDIA-GUERRERO, J. A.; ATHANASSIOU, A. Advanced Materials from Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1-11, 2017.

HARRIS, S. D. Hyphal branching in filamentous fungi. **Developmental Biology**, 2019.

HARTANTI, A. T.; RAHAYU, G.; HIDAYAT, I. *Rhizopus* Species from Fresh Tempeh Collected from Several Regions in Indonesia. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 3, p. 136-142, 2015.

HASSAN, A. I.; GHONEIM, M. A. M.; IBRAHIM, R. Y. M. Therapeutic role of glucogalactan polysaccharide extracted from *Agaricus bisporus* on trimethyltin chloride induced neuropathy in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 24, p. 2052-2065, 2015.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **The Fungal Kingdom**, v. 5, p. 79-95, 2017.

HE, X.; WANG, X.; FANG, J.; CHANG, Y.; NING, N.; GUO, H.; HUANG, L.; HUANG, X.; ZHAO, Z. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 228-237, abr. 2017.

HU, S.; ZHAO, G; ZHENG, Y.; QU, M.; JIN, Q.; TONG, C.; LI, W. Effect of drying procedures on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Crassostrea gigas*. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0188536, 2017.

HUANG, K.; LI, Y.; TAO, S.; WEI, G.; HUANG, Y.; CHEN, D.; WU, C. Purification, characterization and biological activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale*. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 701, 2016.

JINDAL, N.; KHATTAR, J. S. Microbial polysaccharides in food industry. In: **Biopolymers for Food Design**. Academic Press, p. 95-123, 2018.

JING, H.; ZHANG, Q.; LIU, M.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; LI, S.; REN, Z.; GAO, Z.; LIU, X.; JIA, L. Polysaccharides with Antioxidative and Antiaging Activities from Enzymatic-Extractable Mycelium by *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1-11, 2018.

KANG, X.; KIRUI, A.; MUSZYŃSKI, A.; WIDANAGE, M. C. D.; CHEN, A.; AZADI, P.; WANG, P.; MENTINK-VIGIER, F.; WANG, T. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 167-180, 2019.

KHARROUBI, A. T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850, 2015.

KHATUA, S.; ACHARYA, K. Water soluble Antioxidative crude polysaccharide from *Russula senecis* elicits TLR modulated NF- $\kappa$ B signaling pathway and pro-inflammatory response in murine macrophages. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 985, 2018.

KIOKIAS, S.; PROESTOS, C.; OREOPOULOU, V. Effect of Natural Food Antioxidants

against LDL and DNA Oxidative Changes. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, p. 133, 2018.

KRAWCZYK, T.; ZALEWSKI, M.; JANETA, A.; HODUREK, P. SEC Separation of Polysaccharides Using Macroporous Spherical Silica Gel as a Stationary Phase. **Chromatographia**, v. 81, n. 10, p. 1365-1372, 2018.

KUMAR, P. M. R.; KUMAR, M. S.; MANIVEL, A.; MOHAN, S. C. Structural Characterization and Anti-Diabetic Activity of Polysaccharides from *Agaricus bisporus* Mushroom. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 12, n. 1, p. 14-20, 2018.

KÜNZLER, M. How fungi defend themselves against microbial competitors and animal predators. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. e1007184, 2018.

LEVETIN, E.; HORNER, W. E.; SCOTT, J. A. Taxonomy of Allergenic Fungi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 3, p. 375-385.e1, 2016.

LI, H. J.; CHEN, H. Y.; FAN, L. L.; JIAO, Z. H.; CHEN, Q. H.; JIAO, Y. C. *In vitro* antioxidant activities and *in vivo* anti-hypoxic activity of the edible mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. **Chaidam. Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17775-17788, 2015.

LI, Q.; NIU, Y.; XING, P.; WANG, C. Bioactive polysaccharides from natural resources including Chinese medicinal herbs on tissue repair. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2018.

LIANG, X.; GADD, G. M. Metal and metalloid biorecovery using fungi. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1199-1205, 2017.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.; GARGIULO, G.; TESTA, G.; CACCIATORE, F.; BONADUCE, D.; ABETE, P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757-772, 2018.

LIMA, A. T. M.; SANTOS, M. N.; DE SOUZA, L. A. R.; PINHEIRO, T. S.; PAIVA, A. A. O.; DORE, C. M. P. G.; COSTA, M. S. S. P.; SANTOS, N. D.; BASEIA, Y. G.; ARAUJO, R. M.; LEITE, E. L. Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from *Tylopilus ballouii* mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 400-409, 2016.

LIN, X.; ALSPAUGH, J. A.; LIU, H.; HARRIS, S. Fungal morphogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 2, p. 1-25, 2015.

LIN, Z.; YANG, B. (Ed.). *Ganoderma and Health: Biology, Chemistry and Industry*. Springer Nature, 2019.

LIU, P.; XUE, J.; TONG, S.; DONG, W.; WU, P. Structure Characterization and Hypoglycaemic Activities of Two Polysaccharides from *Inonotus obliquus*. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1948, 2018.

LIU, Q.; DUAN, B.; XU, X.; ZHANG, L. Progress in rigid polysaccharide-based nanocomposites with therapeutic functions. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 29, p. 5690-5713, 2017.

LIU, S. H.; SUN, S. W.; TIAN, Z. F.; WU, J. Y.; LI, X. L.; XU, C. P. Antioxidant and hypoglycemic activities of exopolysaccharide by submerged culture of *inocutus hispidus*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 3, p. 361-365, 2015.

LIU, S.; EDGAR, K. J. Staudinger reactions for selective functionalization of polysaccharides: A review. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 2556-2571, 2015.

LIU, X. C.; ZHU, Z. Y.; LIU, Y. L.; SUN, H. Q. Comparisons of the anti-tumor activity of polysaccharides from fermented mycelia and cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris* *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 307-314, 2019.

LU, Y.; XU, L.; CONG, Y.; SONG, G.; HAN, J.; WANG, G.; ZHANG, P.; CHEN, K. Structural characteristics and anticancer/antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Trichoderma kangansenis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 63-71, 2019.

LUDWIG, D. S.; HU, F. B.; TAPPY, L.; BRAND-MILLER, J. Dietary carbohydrates: Role of quality and quantity in chronic disease. **BMJ (Online)**, v. 361, p. k2340, 2018.

LUO, Y.; PENG, B.; WEI, W.; TIAN, X.; WU, Z. Antioxidant and Anti-Diabetic Activities of Polysaccharides from *Guava Leaves*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1343, 2019.

MATEUS, M; VENTURA, P; REGO, ANDREIA; MOTA, CARLA; CASTANHEIRA, I; BORDADO, J. S. R. Acid liquefaction of potato (*Solanum tuberosum*) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars peels – pre-screening of antioxidant activity/ total phenolic and sugar contents. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 1463-1478, 2017.

MIAO, T.; WANG, J.; ZENG, Y.; LIU, G.; CHEN, X. Polysaccharide-Based Controlled Release Systems for Therapeutics Delivery and Tissue Engineering: From Bench to Bedside.

**Advanced Science**, v. 5, n. 4, 2018.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1956.

MOGHANNEM, S. A. M.; FARAG, M. M.; SHEHAB, A. M.; AZAB, M. S. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 452-462, 2018.

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

NARSING RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1-13, 2017.

NAVARRO, D. M. D. L.; ABELILLA, J. J.; STEIN, H. H. Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.

NIEUWENHUIS, B. P. S.; JAMES, T. Y. The frequency of sex in fungi. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1706, p. 20150540, 2016.

OBOH, G.; ISAAC, A. T.; AKINYEMI, A. J.; AJANI, R. A. Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rats' pancreas by phenolic extracts of avocado pear leaves and fruit. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 10, n. 3, p. 208-216, 2014.

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

OLUGBAMI, J. O.; GBADEGESIN, M. A.; ODUNOLA, O. A. In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 1, p. 49, 2015.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 8416763, 2017.

POINSOT, V.; CARPENE, M. A.; COUDERC, F. Coupled Mass Spectrometric Strategies for the Determination of Carbohydrates at Very Low Concentrations: The Case of Polysaccharides Involved in the Molecular Dialogue Between Plants and Rhizobia. In: KARUNARATNE, Desiree Nedra. **The complex world of polysaccharides**, p. 215-226, 2012.

POMIN, V. H. Unravelling glycobiology by NMR spectroscopy. **London: IntechOpen**, 2012.

RANZI, E.; DEBIAGI, P. E. A.; FRASSOLDATI, A. Mathematical modeling of fast biomass pyrolysis and bio-oil formation. Note I: Kinetic mechanism of biomass pyrolysis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 4, p. 2867-2881, 2017.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, 2018.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231-1237, 1999.

REHMAN, K.; AKASH, M. S. H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. **Journal of cellular biochemistry**, v. 118, n. 11, p. 3577-3585, 2017.

RIQUELME, M.; AGUIRRE, J.; BARTNICKI-GARCÍA, S.; BRAUS, G. H.; FELDBRÜGGE, M.; FLEIG, U.; HANSBERG, W.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KÄMPPER, J.; KÜCK, U.; MOURIÑO-PÉREZ, R. R.; TAKESHITA, N. FISCHER, R. Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and

Infection Structures. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 2, p. 1-47, 2018.

SAEEDI, P.; PETERSOHN, I.; SALPEA, P.; MALANDA, B.; KARURANGA, S.; UNWIN, N. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. **Diabetes research and clinical practice**, v. 157, p. 107843, 2019.

SAHAY, S.; CHOUHAN, D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 319-325, 2018.

SALEHI, B.; BAYAT, M.; DEZFULIAN, M.; SABOKBAR, A.; TABARAIE, B. The assessment of anti-tumoral activity of polysaccharide extracted from terrestrial filamentous fungus. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 1236-1241, 2018.

SÁNCHEZ, Ó. J.; MONTOYA, S.; VARGAS, L. M. Polysaccharide production by submerged fermentation. **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, p. 1-19, 2014.

SASIKUMAR, V.; KALAISEZHIAN, P. Evaluation of Free Radical Scavenging Activity of Various Leaf Extracts from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 3, n. 2, p. 1, 2014.

SCARPARI, M.; REVERBERI, M.; PARRONI, A.; SCALA, V.; FANELLI, C.; PIETRICOLA, C.; ZJALIC, S.; MARESCA, V.; TAFURI, A.; RICCIARDI, M. R.; LICCHETTA, R.; MIRABILII, S.; SVERONIS, A.; CESCUTTI, P.; RIZZO, R. Tramesan, a novel polysaccharide from *Trametes versicolor*. Structural characterization and biological effects. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0171412, 2017.

SCHIPPER, M. A. A.; STALPERS, J. A. Revision of the genus *Rhizopus*. The *Rhizopus microsporus*-group. **Studies in Mycology**, v. 25, p. 1-34, 1984.

SCHMIDT, A. M. Highlighting Diabetes Mellitus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 1, p. 477-491, 2018.

SERRANO-CARREÓN, L.; GALINDO, E.; ROCHA-VALADÉZ, J. A.; HOLGUÍN-SALAS, A.; CORKIDI, G. Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. In: **Filaments in Bioprocesses**. Springer, Cham, p. 55-90, 2015.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African journal of pharmacy and pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528-539,

2013.

SHRIRAAM, V.; MAHADEVAN, S.; ANITHARANI, M.; JAGADEESH, N. S.; KURUP, S. B.; VIDYA, T. A.; SESHADRI, K. G. Knowledge of hypoglycemia and its associated factors among type 2 diabetes mellitus patients in a Tertiary Care Hospital in South India. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 378, 2015.

SIMIONI, C.; ZAULI, G.; MARTELLI, A. M.; VITALE, M.; SACCHETTI, G.; GONELLI, A.; NERI, L. M. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 17181-17198, 2018.

SIRISIDTHI, K.; KOSAI, P.; JIRAUNGKOORSKUL, W. Antidiabetic activity of the lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*: A review. **South African pharmaceutical journal**, v. 83, n. 8, p. 45-47, 2016.

SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. (Ed.). Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. **Springer Science & Business Media**, 2013.

SKELLAM, E. Strategies for Engineering Natural Product Biosynthesis in Fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 416-427, 2018.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 185, p. 389–397, 2015.

SOLTANI, M.; KAMYAB, H.; EL-ENSHASY, H. A. Molecular weight (Mw) and Monosaccharide composition (MC): Two major factors affecting the therapeutic action of polysaccharides extracted from *Cordyceps sinensis*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 1601-1613, 2013.

SRIDEVI, A.; RAMANJANEYULU, G.; DEVI, P. Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 1-9, 2017.

SRIVASTAVA, K. K.; KUMAR, R. Stress, Oxidative Injury and Disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 3-10, 2015.

SU, Y.; XIA, S.; WANG, R.; XIAO, L. Phytohormonal quantification based on biological principles. **Hormone Metabolism and Signaling in Plants**, 431–470, 2017.

SURHIO, M. M.; WANG, Y.; FANG, S.; LI, J.; YE, M. Anti-fatigue activity of a *Lachnum*

polysaccharide and its carboxymethylated derivative in mice. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 20, p. 4777-4780, 2017.

SWIERCZEWSKA, M.; HAN, H. S.; KIM, K.; PARK, J. H.; LEE, S. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, n. 24, p. 70-84, 2016.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, 2014.

TANG, J.; NIE, J.; LI, D.; ZHU, W.; ZHANG, S.; MA, F.; SUN, Q.; SONG, J.; ZHENG, Y.; CHEN, P. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Poria cocos sclerotium*. **Carbohydrate polymers**, v. 105, p. 121-126, 2014.

TELAGARI, M.; HULLATTI, K. *In-vitro*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 425, 2015.

TENG, H.; CHEN, L.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3438-3448, 2017.

THILAGAM, E.; PARIMALADEVI, B.; KUMARAPPAN, C.; MANDAL, S. C.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2013.

ULLAH, S.; KHALIL, A. A.; SHAUKAT, F.; SONG, Y. Sources, Extraction and Biomedical Properties of Polysaccharides. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 304, 2019.

VALASQUES JUNIOR, G. L.; BOFFO, E. F.; SANTOS, J. D. G.; BRANDÃO, H. N.; MASCARENHAS, A. J.; CRUZ, F. T.; ASSIS, S. A. The extraction and characterisation of a polysaccharide from *Moniliophthora pernicioso* CCMB 0257. **Natural Product Research**, v. 31, n. 14, p. 1647-1654, 2017.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, n. Table 1, p. 1-14, 2015.

VAN DEN BERG, M. A.; MARUTHACHALAM, K. **Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2**. Springer, New York, NY, 2015.

VAN SAMBEEK, D. M. Evaluation of novel *Rhizopus microsporus* fungal biomass and its impact on growth performance, and nutrient digestibility in the diet of nursery pigs. **ProQuest Dissertations and Theses**, p. 121, 2014.

VENKATESAN, S.; PUGAZHENDY, K.; SANGEETHA, D.; VASANTHARAJA, C.; PRABAKARAN, S.; MEENAMBAL, M. Fourier Transform Infrared ( FT-IR ) Spectroscopic Analysis of *Spirulina*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 3, n. 4, p. 969-972, 2012.

VETTORI, M. H. P. B.; FRANCHETTI, S. M. M.; CONTIERO, J. 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.

VIEIRA, E. R.; XISTO, M.; PELE, M.; ALVIANO, D.; ALVIANO, C.; BARRETO-BERGTER, E.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. Monohexosylceramides from *rhizopus* species isolated from Brazilian caatinga: Chemical characterization and evaluation of their anti-biofilm and antibacterial activities. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018.

WANG, C.; GAO, X., SANTHANAM, R. K.; CHEN, Z.; CHEN, Y.; XU, L.; WANG, C.; FERRI, N.; CHEN, H. Effects of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and its chromium (III) complex on advanced glycation end-products formation,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in hepatic L02 cells. **Food and chemical toxicology**, v. 116, p. 335-345, 2018.

WANG, J.; CAO, F.; SU, E.; ZHAO, L.; QIN, W. Improvement of animal feed additives of ginkgo leaves through solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 7, p. 736–747, 2018a.

WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on Mechanisms of *In Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

WANG, J.; HU, W.; LI, L.; HUANG, X.; LIU, Y.; WANG, D.; TENG, L. Antidiabetic activities of polysaccharides separated from *Inonotus obliquus* via the modulation of oxidative stress in mice with streptozotocin-induced diabetes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1-19, 2017.

WANG, W. H.; ZHANG, J. S.; FENG, T.; DENG, J.; LIN, C. C.; FAN, H.; YU, W. J.; BAO, H. Y.; JIA, W. Structural elucidation of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* and its immunomodulation activities on mouse B lymphocytes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-

13, 2018.

WANG, Y.; SU, N.; HOU, G.; LI, J.; YE, M. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a polysaccharide from *Lachnum* YM240 and its derivatives in mice, induced by a high fat diet and low dose STZ. **MedChemComm**, v. 8, n. 5, p. 964-974, 2017.

XIAO, C.; WU, Q.; ZHANG, J.; XIE, Y.; CAI, W.; TAN, J. Antidiabetic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 down-regulated hepatic glucose regulatory enzymes in diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, n. November 2016, p. 47-57, 2017.

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

YAN, X. High performance liquid chromatography for carbohydrate analysis. In: ZHUO, Y. (Ed.). **High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures**. NY, USA: Nova Science Publishers: Hauppauge, p. 1-8, 2014.

YANG, L.; QU, H.; MAO, G.; ZHAO, T.; LI, F.; ZHU, B.; ZHANG, B.; WU, X. Optimization of subcritical water extraction of polysaccharides from *Grifola frondosa* using response surface methodology. **Pharmacognosy magazine**, v. 9, n. 34, p. 120, 2013.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PANZER, K.; GLÖCKNER, F. O.; REICH, M. A phylogenetic framework for the kingdom Fungi based on 18S rRNA gene sequences. **Marine Genomics**, v. 36, p. 33-39, 2017.

YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; ABE, K. Function and Biosynthesis of Cell Wall  $\alpha$ -1,3-Glucan in Fungi. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 63, 2017.

YUAN, Y.; LIU, Y.; LIU, M.; CHEN, Q.; JIAO, Y.; LIU, Y.; MENG, Z. Optimization extraction and bioactivities of polysaccharide from wild *Russula griseocarnosa*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 4, p. 523-530, 2017.

ZENG, R. Y.; HE, R. T.; WEI, W.; XU, X. Y.; ZHANG, X. P.; LUO, X.; ZHENG, L. Y. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma sinense* by different cultivations. **Food science and technology research**, 16(2), 143-148, 2010.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1-

26, 2018.

ZHAO, H.; LAI, Q.; ZHANG, J.; HUANG, C.; JIA, L. Antioxidant and Hypoglycemic Effects of Acidic-Extractable Polysaccharides from *Cordyceps militaris* on Type 2 Diabetes Mice. **Hindawi**, v. 2018, p. 15, 2018.

ZHAO, P.; XUE, Y.; LI, X.; LI, J.; ZHAO, Z.; QUAN, C.; GAO, W.; ZU, X.; BAI, X.; FENG, S. Fungi-derived lipopeptide antibiotics developed since 2000. **Peptides**, v. 113, p. 52-65, 2019.