



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA –
UESB



PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM

TÁTILLA PUTUMUJÚ SANTANA MENDES

POTENCIALIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DA PAREDE CELULAR DE *Pleurotus djamor* E *Aspergillus*
niger

JEQUIÉ - BA
MARÇO - 2023

TÁTILLA PUTUMUJÚ SANTANA MENDES

**POTENCIALIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DA PAREDE CELULAR DE *Pleurotus djamor* E *Aspergillus
niger***

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

Orientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques
Júnior

**JEQUIÉ - BA
MARÇO - 2023**

M538p Mendes, Tátilla Putumujú Santana.

Potencialidades biológicas de polissacarídeos obtidos da parede celular de pleurotus djamor e aspergillus niger / Tátilla Putumujú Santana Mendes.- Jequié, 2023.

100f.

(Tese apresentada 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)

1.Pleurotus djamor 2.Aspergillus niger 3.Antinocicepção 4.Inibidor de



Governo do
Estado da Bahia

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

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Potencialidades biológicas de polissacarídeos obtidos da parede celular de *Pleurotus djamor* e *Aspergillus niger*”.

Autora: **Tátilla Putumuju Santana Mendes**

Orientador: Professor Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior

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

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Baraquízio Braga do Nascimento Júnior

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Profa. Dra. Janaína Silva de Freitas

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. André Lacerda Teles

Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior

Universidade do Estado da Bahia

Data de realização: **01 de março de 2023.**

AGRADECIMENTOS

Felizmente não estive sozinha em minha caminhada. Até aqui, Deus, com sua indiscutível bondade, me sustentou, guiou e protegeu. Nos momentos difíceis Ele colocou anjos em meu caminho. Por isso, hoje, agradeço, primeiramente à Deus, pelo privilégio de receber tanto amor em minha vida.

À minha família, responsáveis por tudo que sou, meu lugar no mundo. De onde veio toda força, incentivo, apoio emocional e financeiro durante todos esses anos de vida acadêmica. Mãe e Pai, vocês são meu exemplo e minha base. Irmã, você é meu orgulho todinho. Obrigada por tanto! Amo vocês.

A todos os amigos e colegas que de uma maneira direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração deste trabalho, pela paciência, atenção e força que prestaram. Em especial às colegas de laboratório Pâmala e Alana que estiveram comigo vibrando a cada conquista e apoiando nos momentos menos fáceis. Vocês são as melhores!

Aos muitos amigos que fiz durante esses treze anos de UESB. Aos meninos das portarias, que sempre me recebem com alegria e atenção, fizeram toda diferença, principalmente nos tempos de pandemia. Às meninas da antiga cantina, que me acolhiam nos momentos em que precisava tomar um cafezinho e um fôlego para voltar aos experimentos. À todos servidores da UESB-Jequié que olham e reconhecem o outro como um ser humano, meu respeito e admiração pelo trabalho silencioso e não reconhecido que vocês fazem todos os dias.

Ao orientador Gildomar, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou para elaboração deste trabalho. Aqui lhe exprimo a minha gratidão por todos esses anos de parceria.

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

A todos vocês, quero demonstrar meu agradecimento, pois, sem a ajuda, confiança e compreensão de todos, este trabalho não teria se realizado. O meu sincero e profundo “Muito Obrigada!”.

RESUMO

MENDES, Tátilla Putumujú Santana. **Potencialidades biológicas de polissacarídeos obtidos da parede celular de *Pleurotus djamor* e *Aspergillus niger***. 100f. 2023. Tese (Doutorado) – Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2023.

Os polissacarídeos são objeto de diversos estudos, tendo em vista seu elevado potencial biotecnológico em diferentes setores, além de sua importância econômica. Na área farmacêutica, os polissacarídeos obtidos de fungos apresentam potenciais medicamentosos. Nessa perspectiva, esse trabalho teve como objetivo obter, caracterizar e avaliar a atividade imunomoduladora do polissacarídeo isolado da parede celular do fungo filamentoso *Pleurotus djamor* CCMB 366, bem como, investigar o potencial biotecnológico do (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano isolado da parede celular de *Aspergillus niger* ATCC 1004, referente ao potencial hipoglicemiante e imunomodulador *in vitro* e a atividade antinociceptiva *in vivo* utilizando modelo animal. As condições ótimas de extração de polissacarídeos de *P. djamor* foram determinadas estudando as variáveis pH, temperatura e tempo de extração aplicando o modelo experimental Box-Behnken aliado à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), tendo a resposta avaliada quanto ao rendimento em gramas de polissacarídeo. A aplicação de técnicas analíticas como a determinação de açúcares redutores e totais, proteínas totais, Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformata de Fourier (FT-IV) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permitiram afirmar que a amostra extraída se tratava de polissacarídeos. Os ensaios de atividade biológica realizados permitiram afirmar que tanto o polissacarídeo isolado de *P. djamor* CCMB 366 quanto o (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano isolado de *A. niger* ATCC 1004 apresentaram atividade imunomoduladora, com estimulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias em modelo de macrófagos isolados de murinos. Os ensaios de inibição da enzima α-amilase e o estudo de atividade antinociceptiva utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, permitiram afirmar que o (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano de *A. niger* possui potencial hipoglicemiante *in vitro* e antinociceptivo *in vivo*, respectivamente. Portanto, os polissacarídeos de parede celular dos fungos *P. djamor* CCMB 366 e *A. niger* ATCC 1004 estudados demonstraram ser promissores para aplicação farmacêutica relacionada às atividades biológicas imunoestimuladora, antinociceptiva e hipoglicemiante.

Palavras-chave: *Pleurotus djamor*. *Aspergillus niger*. Antinocicepção. Inibidor de α-amilase. Imunomodulador.

ABSTRACT

MENDES, Tátilla Putumujú Santana. **Biological potentialities of polysaccharides obtained from the cell wall of *Pleurotus djamor* and *Aspergillus niger***. 100 p. 2023. Thesis (PhD) – Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2023.

Polysaccharides are the subject of intense studies once it has high biotechnological potential in different sectors, in addition to their economic importance. In the pharmaceutical area, polysaccharides obtained from fungi have several applications. From this perspective, this work aimed to optimize the extraction, characterization and evaluation of immunomodulatory activity of the polysaccharide isolated from the cell wall of the filamentous fungus *Pleurotus djamor* CCMB 366. Furthermore, it also aimed to investigate the biotechnological potential of (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactan isolated from the *Aspergillus niger* ATCC 1004 cell wall, referring to the in vitro hypoglycemic and immunomodulatory potential, along with their antinociceptive activity in vivo using an animal model. The best conditions for extraction of polysaccharides from *P. djamor* were determined by studying the variables pH, temperature and extraction time, through the application of the Box-Behnken experimental matrix as a Response Surface Methodology (MSR) model. The responses were evaluated in terms of yield in grams of polysaccharide. The application of analytical methods such as the determination of reducing and total sugars, total proteins and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IV) show that the extracted sample was a polysaccharide. The biological activity assays carried out with the polysaccharides of the studied fungi indicate that both the polysaccharide isolated from *P. djamor* CCMB 366 and the (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactan isolated from *A. niger* ATCC 1004 exhibit immunomodulatory activity, with stimulation of pro-inflammatory cytokine secretion in a macrophage model isolated from mice. The α-amylase enzyme inhibition assays and the study of antinociceptive activity using the abdominal writhing model induced by acetic acid, validate that (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactan from *A. niger* has hypoglycemic potential in vitro and antinociceptive in vivo, respectively. Therefore, the cell wall polysaccharides of the studied fungi showed to be promising for application in several pharmaceutical areas.

Keywords: *Pleurotus djamor*. *Aspergillus niger*. Antinociception. α-amylase inhibitor. Immunomodulator.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO I	4
Referencial Teórico.....	4
1 Reino Fungi.....	5
2 Fungos basidiomicetos.....	10
2.1 Gênero <i>Pleurotus</i>	11
2.2 <i>Pleurotus djamor</i>	14
3 Fungos Ascomycota	15
3.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	16
3.1.1 <i>Aspergillus niger</i>	17
4 Parede celular dos fungos	18
5 Importância biotecnológica dos polissacarídeos fúngicos.....	21
6 Avaliação da atividade biológica de polissacarídeos fúngicos	22
6.1 Atividade Imunomoduladora	27
6.2 Atividade Antinociceptiva	29
6.3 Atividade Hipoglicemiante	31
6.4 Outras atividades biológicas	32
CAPÍTULO II.....	36
Otimização da extração, caracterização e atividade imunomoduladora do polissacarídeo de parede celular de <i>Pleurotus djamor</i> CCMB 366	36
RESUMO.....	37
1 Introdução	38
2 Materiais e Métodos	39
2.1 Condições de cultivo de <i>P. djamor</i> CCMB 366	39
2.2 Planejamento experimental da extração de polissacarídeo da parede celular de <i>P. djamor</i> CCMB 366	40
2.3 Caracterização química do polissacarídeo.....	40
2.3.1 Peso molecular médio (PM) e grau de polimerização (GP)	40
2.3.2 Determinação da proteína total na amostra	41

2.3.3	Análise de espectroscopia no infravermelho	41
2.3.4	Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	41
2.4	Bioensaio	41
2.4.1	Animais.....	41
2.4.2	Teste de Atividade Imunomoduladora	42
2.4.2.1	Isolamento de Macrófagos.....	42
2.4.2.2	Estimulação de macrófagos	42
2.4.2.3	Quantificação de citocinas por ELISA.....	42
2.5	Análise estatística.....	42
3	Resultados e Discussão.....	43
3.1.	Delineamento experimental Box-Behnken para extração de polissacarídeos de parede celular de <i>P. djamor</i> CCMB 366	43
3.2	Peso molecular médio (PM) e grau de polimerização (GP).....	47
3.3	Determinação da concentração de proteínas	47
3.4	Caracterização do polissacarídeo obtido de <i>P. djamor</i> CCMB 366	48
3.4.1	Análise de espectroscopia no infravermelho	48
3.4.2	Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	49
3.5	Atividade Imunomoduladora.....	50
4	Conclusão.....	52
CAPÍTULO III		53
Potencial hipoglicemiante, antinociceptiva e imunomoduladora do polissacarídeo de parede celular de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.....		53
RESUMO.....		54
1	Introdução	54
2	Materiais e métodos.....	56
2.1	Microrganismo.....	56
2.2	Condições de cultivo de <i>A. niger</i>	56
2.3	Extração de polissacarídeo de <i>A. niger</i>	56

2.5 Atividades biológicas	57
2.5.1 Avaliação da capacidade inibitória da α -amilase	57
2.5.2 Animais.....	57
2.5.3 Atividade Antinociceptiva.....	57
2.5.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	57
2.5.4 Imunomoduladora	58
2.5.4.1 Isolamento de Macrófagos.....	58
2.5.4.2 Estimulação de macrófagos	58
2.5.4.3 Quantificação de citocinas por ELISA.....	59
2.6 Análise estatística.....	59
3 Resultados e Discussão.....	59
3.1 Avaliação da capacidade inibitória da α -amilase.....	59
3.2 Avaliação da capacidade antinociceptiva.....	60
3.3 Avaliação da capacidade imunomoduladora	62
4 Conclusão.....	64
3. CONCLUSÃO GERAL	65
REFERÊNCIAS	66

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ANOVA	Análise de variância
BDA	Ágar batata dextrose
BSA	Albumina de soro bovino
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CCMB	Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia
CG-MS:	Cromatografia Gasosa Acolplada a Espectrômetro de Massas
CLR	Receptores de lectina tipo C
CR3	Receptor de complemento 3
DM	Diabetes mellitus
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazilo
EC₅₀	Concentração na qual a substância induz uma resposta de 50% após tempo especificado de exposição
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPS	Exopolissacarídeo
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
EV71	Enterovirus 71
FDA	Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (do inglês FDA)
FT-IR:	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
gl	Graus de liberdade
GP	Grau de Polimerização
GRAS	Geralmente reconhecido como Seguro (do inglês GRAS)
HUVECs	Células endoteliais da veia umbilical humana
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferons
IL-12	Interleucina 12

IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitogênio
MQ	Média quadrática
MSR	Metodologia de superfície de resposta
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF-κB	Fator nuclear κ B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Solução salina tampão fosfato
pH:	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
s.c.	Subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SQ	Soma quadrática
TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
v.o.	Via oral
v/v	Relação entre volume e volume

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Processo de germinação. -----	6
Figura 2. Modelo de crescimento de hifas fúngicas. -----	7
Figura 3. Diversidade morfológica dos fungos do filo Basidiomycota. -----	11
Figura 4. Diferentes espécies de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> . -----	12
Figura 5. (A) Basidiomas de <i>P. djamor</i> ; (B) Micélio de <i>P. djamor</i> em BDA.-----	14
Figura 6. Representação da diversidade morfológica do filo Ascomycota.-----	15
Figura 7. (A) Micélio de <i>Aspergillus niger</i> em BDA. (B) Morfologia microscópica de <i>Aspergillus niger</i> com presença de hifa hialina e de conídio preto.-----	18
Figura 8. A) Esquema da estrutura e biossíntese de uma parede celular típica de fungos. B) Estruturas químicas dos polissacarídeos quitina, α -glucana e β -(1,3)/(1,6)-D-glucana.-----	20

CAPÍTULO II

Figura 1. Relação entre valores observados e valores preditos obtidos na otimização da extração de polissacarídeo de <i>P. djamor</i> CCMB 366-----	44
Figura 2. Gráficos de superfície de resposta da otimização da extração de polissacarídeos de <i>P. djamor</i> CCMB 366. -----	46
Figura 3. Gráficos de Área da otimização da extração de polissacarídeos de parede celular de <i>P. djamor</i> CCMB 366. -----	46
Figura 4. Espectro FT-IR de polissacarídeo obtido da parede celular de <i>P. djamor</i> .-----	48
Figura 5. Espectro de RMN de polissacarídeo isolado de <i>Pleurotus djamor</i> CCMB 366 (A) RMN ¹³ C. (B) RMN ¹ H-----	49
Figura 6. Avaliação da secreção das citocinas IL-1 α e TNF- α usando o ensaio ELISA. 50	50

CAPÍTULO III

Figura 1. Capacidade de inibição da enzima α -amilase pelo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de <i>A. niger</i> . -----	60
Figura 2. Avaliação da atividade antinociceptiva de (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de <i>A. niger</i> através do teste de contorções induzidas por ácido acético	

em camundongos. -----	61
Figura 3. Avaliação da atividade imunomoduladora de (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano de parede celular de <i>A. niger</i> ATCC 1004 a partir das secreção de das citocinas IL-1α e TNF-α secretadas por macrófagos estimulados.-----	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Fontes, tipo de extração, composição e atividade biológica de polissacarídeos fúngicos-----	24
--	----

CAPÍTULO II

Tabela Planejamento Box-Behnken aplicado na otimização da extração de polissacarídeo de <i>P. djamor</i> CCMB 366.-----	44
Tabela 2. Análise de variâncias no modelo de regressão para otimização de polissacarídeos obtidos do <i>P. djamor</i> CCB 366. -----	45

1 INTRODUÇÃO

O reino Fungi compreende uma diversidade de espécies que variam desde leveduras unicelulares até grandes cogumelos (LI et al., 2021d; LIM et al., 2020). Os fungos são onipresentes na natureza e são utilizados desde os tempos antigos como fermentadores de alimentos (YADAV; NEGI, 2021).

Seres humanos saudáveis possuem relação benéfica com os fungos, uma vez que a sua presença fisiológica na pele e nas microbiotas confere o bom funcionamento do organismo (GOLDMAN; DELNESTE; PAPON, 2021). Além disso, os fungos são amplamente utilizados em processos biotecnológicos, tanto nas indústrias de alimentos e farmacêuticas quanto na agricultura, meio ambiente, medicina e estética, conservando, ainda, potencial a ser explorado em pesquisas futuras (LIM et al., 2020).

A busca por substâncias naturais que proporcionem maior eficácia e segurança em tratamentos farmacológicos impulsionam pesquisas em todo o mundo (WANG et al., 2021). Neste contexto, os fungos são excelentes candidatos, ao constituírem o grupo mais diverso e abundante do planeta e por apresentarem metabólitos bioativos (VIEIRA GOMES et al., 2019). Os polissacarídeos são biomoléculas que podem ser obtidas a partir do metabolismo primário de fungos e que demonstram potencial medicinal (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). A acarbose, por exemplo, é um fármaco utilizado como hipoglicemiante que é sintetizado a partir do metabolismo secundário de cepas dos gêneros *Actinoplanes* e *Streptomyces*. Estruturalmente, a acarbose consiste em duas porções: uma maltose e um pseudodissacarídeo acarviosina (WANG et al., 2011).

Os polissacarídeos são substâncias bióticas presentes em abundância na biosfera (SINDHU et al., 2021). São macromoléculas complexas que compreendem 10 ou mais monômeros unidos por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos são classificados em naturais e semi-sintéticos. Os naturais podem ser isolados de plantas, fungos, algas, animais e bactérias (WANG et al., 2021). A depender da fonte de obtenção e da variedade estrutural, os polissacarídeos apresentam diversas propriedades biológicas (ZHAO et al., 2021), como imunomoduladora (XIE et al., 2022), antinociceptiva (VALASQUES et al., 2014), antioxidante (MAITY et al., 2021a), antidiabética (LI et al., 2021c).

Em relação a sua localização celular, os polissacarídeos são divididos em exopolissacarídeos, intracelulares e da parede celular fúngica (OSI et al., 2020). Os polissacarídeos de parede celular exercem papel central na discussão da biologia e bioquímica dos fungos. A parede celular dos fungos é constituída principalmente por glucanos e quitina,

além de outros polissacarídeos e proteínas unidas por ligações intermoleculares, garantindo a estrutura compacta que a compõe (BARBOSA; CARVALHO JUNIOR, 2020).

A metodologia de superfície de resposta é um método estatístico utilizado para obtenção de uma resposta otimizada quando a variável resposta é influenciada por vários fatores (BOX; DRAPER, 1959). Em estudos conduzidos por Valasques et al. (2014), foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para obtenção, com maior rendimento, do polissacarídeo (1→3)- β -D-glucano da parede celular de *Rhodotorula mucilaginosa*. Este polissacarídeo demonstrou um efeito antinociceptivo periférico, possivelmente pela inibição de mediadores inflamatórios.

No contexto em que a diversidade biológica tem sido explorada para o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos, e de acordo com o potencial medicinal de polissacarídeos obtidos de fungos relatado na literatura, este trabalho visou a obtenção e estudos de atividade biológica de polissacarídeos de parede celular. Este estudo buscou a prospecção de polissacarídeos com potencial biotecnológico obtidos de parede celular de *Pleurotus djamor* CCMB 366 utilizando o delineamento experimental Box-Behnken, bem como realizar ensaios biológicos para avaliar a atividade imunomoduladora deste polissacarídeo. Ademais, o presente trabalho também pretendeu avançar nos estudos com polissacarídeos obtidos de parede celular do fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004 através das atividades biológicas da inibição da enzima α -amilase, antinociceptiva e imunomoduladora.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as potencialidades biológicas de polissacarídeos obtidos da parede celular dos fungos filamentosos *Pleurotus djamor* CCMB 366 e *Aspergillus niger* ATCC 1004.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a extração do polissacarídeo de *P. djamor* CCMB 366 através da análise multivariada de superfície de resposta;
- Caracterizar parcialmente a estrutura do polissacarídeo obtido de *P. djamor* CCMB 366;
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos das paredes celulares de *P. djamor* CCMB 366 e *A. niger* ATCC 1004;
- Realizar ensaios de inibição da atividade da enzima α -amilase por polissacarídeos de *A. niger* ATCC 1004;
- Avaliar o potencial antinociceptivo de polissacarídeos de *A. niger* ATCC 1004.

CAPÍTULO I
Referencial Teórico

1 Reino Fungi

O Reino Fungi é um dos mais diversos da árvore filogenética e inclui entre 2 a 5 milhões de espécies presentes nos ecossistemas terrestres e aquáticos (LI et al., 2021d). Os fungos são organismos eucarióticos, com parede celular quitinosa, que se reproduzem sexuada ou assexuadamente através de esporos, são osmo-heterotróficos e se nutrem por absorção de substâncias orgânicas dissolvidas no meio (MARGULIS; CHAPMAN, 2009). Possui espécies importantes como fontes de alimento, organismos simbiotes, patógenos, saprófitos na degradação de resíduos e fator biótico na estruturação e aeração do solo (MORTON, 2021). Os fungos possuem assim, um papel vital na vida e manutenção do planeta, participando dos ciclos naturais.

Os fungos possuem diferentes padrões de desenvolvimento, estilos de vida, capacidades funcionais e morfologias que variam desde leveduras unicelulares à fungos filamentosos. Os fungos filamentosos são organismos multicelulares formados por hifas e que apresentam aparência de bolor ou com corpos de frutificação, formando cogumelos (ERKMEN, 2021; LIM et al., 2020). As diferenças entre os representantes fúngicos é observada utilizando a taxonomia aliada à genética molecular (YANG, 2021). Existem mais de 200 ordens de fungos classificados em 12 filos (LI et al., 2021d), os dois filos mais estudados são os Basidiomycota e Ascomycota.

Fungos do filo Basidiomycota são tradicionalmente conhecidos no aspecto de: cogumelos, ferrugem ou carvão. Os basidiomicetos são terrestres, em sua maioria, e se formam por reprodução sexuada e assexuada, possuem basidiósporos como esporos sexuais e conídios como esporos assexuados (FAZENDA et al., 2008). Os Ascomycota são comumente apresentados nas formas de leveduras, cogumelos e trufas. A reprodução pode ser por esporos sexuais (ascósporos) ou por esporos assexuados, os artrósporos (DIJKSTERHUIS, 2019; FAZENDA et al., 2008). Os ascomicetos e basidiomicetos estão intimamente relacionados entre si, possivelmente, pela descendência de um ancestral comum (MARGULIS; CHAPMAN, 2009). Fungos Basidiomycotas e Ascomycotas compreendem o sub-reino Dikarya (fungos superiores) no reino Fungi (TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2015a).

Os esporos são estruturas que auxiliam na propagação dos fungos e são dispersos no ambiente através do vento, água ou transportados por animais ou insetos (DIJKSTERHUIS, 2019; SEONG et al., 2008). São resistentes e podem sobreviver por milhares de anos em condições diversas, resistindo a danos físicos e estresses ambientais, como em extremos de

temperatura, pressão e umidade (EL ENSHASY, 2022). Os esporos podem ser formados por reprodução sexuada ou assexuada. A reprodução sexuada é mais longa, porém apresenta como vantagem a introdução da variabilidade genética na população, por outro lado, a reprodução assexuada tem a vantagem de ser mais rápida, aumentando a velocidade em que os esporos se reproduzem e são disseminados no ambiente (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018). Os esporos são mantidos suspensos dentro de sacos sobre o filamento do fungo até serem liberados no ambiente e ficarem dispersos em estado de dormência até a germinação (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018). Em condições favoráveis, os esporos começam a germinar, assim o esporo deixa de ser um organismo biológico dormente e passa a ser um organismo vegetativo que é capaz de realizar reprodução sexuada e assexuada (ISAAC, 1998).

São necessários fatores ambientais e nutricionais como condições favoráveis para que o esporo se desenvolva e passe da fase dormente para a germinativa e posteriormente desenvolva a hifa (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018). De modo geral, o processo de germinação dos esporos ocorre nos seguintes estágios (**Figura 1**): crescimento isotrópico ou inchaço, polarização celular, emergência de hifas e alongamento de hifas (DIJKSTERHUIS, 2017). No crescimento isotrópico ocorre o intumescimento através da absorção de água, fazendo com que o esporo possa até triplicar de volume. Após atingir um tamanho crítico, o esporo entra na fase de polarização celular para que se inicie a formação do tubo germinativo e consequente o aparecimento da hifa. Durante esta fase da germinação inúmeras vias metabólicas, como a do metabolismo de carboidratos e síntese de proteínas, por exemplo, são ativadas (EL ENSHASY, 2022).

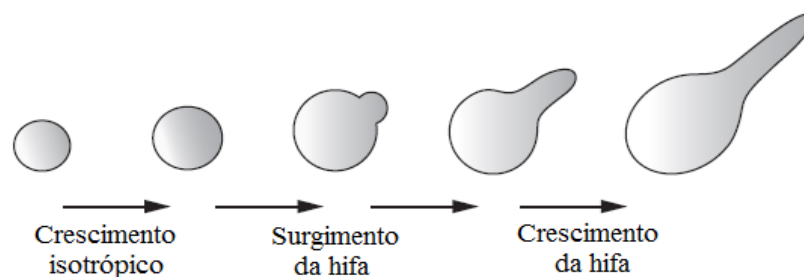


Figura 1. Processo de germinação. Os esporos em repouso iniciarão o crescimento isotrópico sob condições ideais para a germinação. Após o intumescimento, um tubo germinativo emerge originando a hifa fúngica, que cresce formando os filamentos. Fonte: SEPHTON-CLARK; VOELZ (2018) [Adaptado].

As leveduras são microrganismos unicelulares empregadas há séculos como fermentação na fabricação de alimentos como pão, vinho e cerveja. Tradicionalmente, leveduras do gênero *Saccharomyces* são as mais utilizadas, principalmente na indústria (KOT et al., 2021). Na área clínica, as leveduras são conhecidas por algumas patologias, a exemplo da candidíase, infecção causada pelo fungo dimórfico *Candida albicans*. Este fungo é observado na forma leveduriforme quando em colonização assintomática e na forma filamentosa quando associado à processos patológicos (GHARAGHANI et al., 2021).

A característica que define o fungo filamentoso é a sua capacidade de formar hifas tubulares alongadas que se propagam por exocitose polarizada no ápice (**Figura 2**), permitindo que o fungo alcance longas distâncias e invada diferentes tipos de substratos (STEINBERG et al., 2017). A depender da espécie do fungo, as hifas produzidas na germinação podem ser septadas ou asseptadas (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018). Um único esporo possui a capacidade de gerar várias hifas que formam uma rede conhecida como micélio. Os micélios se irradiam para fora do esporo de origem, de modo que as pontas das suas hifas adquirem do meio ambiente os nutrientes que serão transportados para regiões interiores do micélio para serem utilizados no crescimento e formação de novos esporos (HARRIS, 2019).

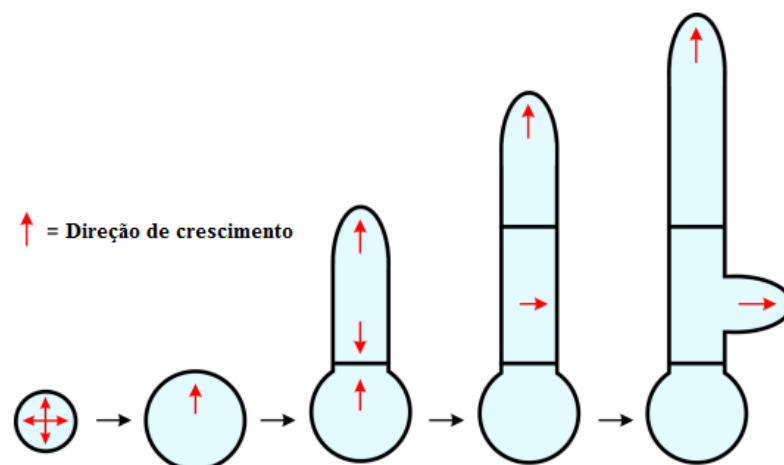


Figura 2. Modelo de crescimento de hifas fúngicas. O crescimento é isotrópico durante a germinação dos esporos. A formação de um eixo de polaridade resulta na formação de uma hifa que cresce continuamente na extremidade. Durante o crescimento da ponta, há formação de novos eixos de polaridade que permitem a formação de septos e ramos laterais. À medida que a formação do septo é transitória, a ramificação resulta na formação de uma hifa secundária que também continua a crescer na extremidade. As setas vermelhas indicam os eixos de polaridade. Fonte: STEINBERG et al., (2017) [Adaptado].

Bolores são conhecidos por atuarem na deterioração de diferentes tipos de alimentos (COUSIN, 2014). Porém, os fungos filamentosos podem ser benéficos e utilizados na indústria

de alimentos, a exemplo do fungo *Penicillium roquefortii* que é responsável por conferir sabor, aroma e textura aos famosos queijos azuis: Azul Dinamarquês, Gorgonzola e Roquefort (CARON et al., 2021). Na área médica, podem ser utilizados na fabricação de medicamentos, a exemplo dos fungos *Rhizopus nigricans* e *Curvularia luneta*, utilizados nas fermentações para fabricação de cortisona, hidrocortisona e prednisona, que são esteróides usados para o controle da inflamação (MARGULIS; CHAPMAN, 2009).

Os cogumelos são reconhecidos pela distinta estrutura do micélio e sua utilização na gastronomia. Os cogumelos são consumidos como uma iguaria, principalmente por possuírem aromas e texturas característicos (YADAV; NEGI, 2021). São cultivados na China desde 600 d.C., mas foi na França do século XVII que o cultivo de cogumelos em larga escala obteve sucesso (CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017). O consumo mundial de espécies comestíveis de cogumelos é crescente, principalmente como alimento funcional, devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022).

Cerca de 200 espécies de cogumelos são utilizadas como alimentos funcionais em todo o mundo, porém, apenas aproximadamente 35 espécies são cultivadas comercialmente (BELLETTINI et al., 2019). Os cogumelos são fonte de nutrientes como proteínas, minerais, vitaminas e lipídios (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022), mas o principal constituinte nutricional da matéria seca do cogumelo são os carboidratos, tanto os carboidratos digestíveis (trealose, glicogênio, manitol e glicose) quanto carboidratos não digestíveis, como os polissacarídeos quitina, mananas e β -glucana (YADAV; NEGI, 2021). O *Pleurotus*, popularmente conhecido como “cogumelo-ostra”, é um dos gêneros de cogumelos cultivados mais populares em todo o mundo, bem como os gêneros *Agaricus spp.* e *Lentinula spp.* (LOUZADA DOS SANTOS et al., 2021).

Inicialmente, os produtos derivados de cogumelos, na maioria dos casos, eram obtidos de seus corpos de frutificação e pouco era obtido de extrato de micélio. Porém, devido a mão de obra mais trabalhosa e o pouco espaço nos laboratórios, o cultivo realizado na fase vegetativa é mais requerido para a pesquisa (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JU, 2005). Deste modo, o cultivo submerso, em que o microrganismo é inoculado diretamente em meio nutriente líquido, é uma opção para a extração de biomoléculas. O cultivo submerso apresenta a vantagem de obtenção das biomoléculas em curto espaço de tempo, permitindo também o armazenamento de micélios por um longo período sem alterações genéticas, beneficiando a conservação da biodiversidade (BRUGNARI et al., 2016). Além disso, o cultivo submerso

permite maior homogeneidade e controle de variáveis como temperatura, pH, umidade, luminosidade e aeração, sendo também adequada para a produção de enzimas e bioconversão de resíduos (ARAÚJO et al., 2021; GMOSER et al., 2019).

Os fungos filamentosos possuem relevância biotecnológica e são importantes nos diversos segmentos demonstrando significativa participação na economia. Os metabólitos bioativos dos cogumelos (compostos fenólicos, terpenos, esteroides e polissacarídeos) são responsáveis pelas diversas atividades biológicas e podem ser prospectados para pesquisas nos setores industriais de alimentos e farmacêuticos, meio ambiente e medicina, por exemplo (BELLETTINI et al., 2019).

Diversas aplicações de biorremediação utilizando fungos filamentosos foram descritas. Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, por exemplo, demonstram que habilidades como bioindicadores de poluição (ROJAS-CHALLA et al., 2021). Cogumelos, a exemplo do *Pleurotus eryngi*, podem sobreviver e acumular uma quantidade considerável de elementos potencialmente tóxicos ao ambiente, como Cd, Cu, Cr, Pb, Hg e Zn, mesmo em áreas não poluídas (XU et al., 2021). Ji et al. (2021) utilizaram pellets miceliais de cepas modificadas de *Aspergillus niger*, que liberaram β -lactamases, para tratar águas do processo industrial farmacêutico contendo antibióticos β -lactâmicos.

A principal utilização de fungos filamentosos na indústria é na obtenção de enzimas que funcionam como biocatalisadores em processos industriais. Há estimativa de que o mercado global de enzimas industriais alcance US\$ 7,0 bilhões em 2023, com taxa de crescimento anual de 4,9% para o período de 2018–2023, impulsionando a pesquisa de obtenção de enzimas com propriedades mais específicas e de menor custo (ARAÚJO et al., 2021). O *Aspergillus niger*, por exemplo, além de apresentar metabólitos reconhecidos como seguros nas indústrias alimentícia e farmacêutica, é utilizado como principal produtor de inulinase comercial. Esta enzima faz a hidrólise da inulina, polímero de frutose encontrado como carboidrato de reserva em várias plantas (GERMEC; TURHAN, 2020).

Na área médica, os fungos filamentosos demonstram benefícios na promoção da saúde em razão da quantidade de compostos que apresentam atividade biológica: imunomoduladora (SINDHU et al., 2021), antioxidante (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021a), na função cognitiva (RANDHAWA et al., 2021), antibacteriana (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021b), anti-inflamatória (YADAV; NEGI, 2021), antitumoral (WANG et al., 2021), hepatoprotetora (LI et al., 2021b), hipoglicêmica (LI et al., 2021c), anticoagulante (LI et al., 2021a) e antinociceptiva (MAZUMDER et al., 2021), por exemplo.

Apesar de muitos estudos realizados, os fungos filamentosos ainda são uma fonte subexplorada de compostos potencialmente bioativos (YADAV; NEGI, 2021).

2 Fungos basidiomicetos

Os fungos do filo Basidiomycota são encontrados em diferentes biomas e podem ser divididos em três grupos relacionados ao modo de nutrição: sapróbicos, simbióticos ou parasitas/patogênicos (VIEIRA GOMES et al., 2019). Os fungos sapróbicos decompõem a matéria orgânica, os simbióticos formam uma relação mutualística com outro organismo e os patogênicos ou parasitas infectam plantas, insetos, animais e até outros fungos (SCHMIDT-DANNERT, 2016).

O filo Basidiomycota inclui ferrugens, carvões, fungos gelatinosos, cogumelos, chanterelles, fungos de prateleira, puffballs e stinkhorns (**Figura 3**). O basídio é a estrutura reprodutiva microscópica que distingue os basidiomicetos dos demais fungos de outros filios; e o basidioma (basidiocarpo), ou cogumelo, é o corpo produtor de esporos dos basidiomicetos (MARGULIS; CHAPMAN, 2009). Os basidiocarpos são ricos em carboidratos (polissacarídeos estruturais) e proteínas, o micélio é composto de hifas septadas, entretanto, a morfologia do septo não é uniformemente observada dentro do grupo (TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2015a). Na literatura antiga, os basidiomas eram chamados de “corpos frutíferos” ou “frutas” porque foram inicialmente descritos por botânicos (MARGULIS; CHAPMAN, 2009).

O filo Basidiomycota compreende três subfilos principais, Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina. O Agaricomycotina inclui a maioria dos Basidiomycota descritos, representado pelos cogumelos, fungos gelatinosos, leveduras basidiomicetas, decompositores e importantes patógenos de madeira, vegetais e humanos. A grande maioria das espécies em Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina são ferrugens (MAO; WANG, 2019).

Os corpos de frutificação de cogumelos basidiomicetos apresentam variedade de metabólitos secundários de interesse industrial, a exemplo de: terpenóides, compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides, ácidos orgânicos e esteroides (VIEIRA GOMES et al., 2019). Os fungos basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, por exemplo, compreende diversas espécies valorizadas por suas características gastronômicas e potencial biotecnológico (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022; STOFFEL et al., 2021).



Figura 3. Diversidade morfológica dos fungos do filo Basidiomycota. (A) *Ustilago maydis* (carvão-do-milho). (B) Ferrugem do café causada por *Hemileia vastatrix*. (C) Fungo gelatinoso *Tremella* cf. *fuciformis*. (D) Cogumelo *Amanita muscaria*. (E) Chanterelle *Cantharellus cibarius*. (F) Fungo de pateleira *Laetiporus sulphureus*. (G) Puffball *Lycoperdon pyriforme*. (H) Stinkhorns *Clathrus crispus*. Fonte: As imagens estão disponíveis para o domínio público em <https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page> [Adaptado]. Acessado em 08/12/2021.

2.1 Gênero *Pleurotus*

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* (**Figura 4**) pertencem ao filo Basidiomycota, à ordem Agaricales e à família Pleurotaceae e são um dos mais cultivados comercialmente em todo o mundo (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022; GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021b). As espécies do gênero *Pleurotus* distribuem-se mundialmente, colonizando vários nichos ecológicos, preferencialmente árvores em decomposição, devido as suas características são conhecidos como fungos da podridão branca (RODRIGUES

BARBOSA et al., 2020). Consistem em mais de 200 espécies saprofíticas distribuídas principalmente em ambientes temperados e tropicais (CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017).



Figura 4. Diferentes espécies de fungos do gênero *Pleurotus*. (A) *Pleurotus citrinopileatus*, (B) *Pleurotus ostreatus*, (C) *Pleurotus eryngii*, (D) *Pleurotus tuber-regium*, (E) *Pleurotus pulmonarius*, (F) *Pleurotus nebrodensis*. Fonte: <<https://www.mycodb.fr/>> [Adaptado]. Acessado em 05/12/2021.

As espécies mais conhecidas do gênero *Pleurotus* são: *P. djamor* (ostra rosa), *P. ostreatus* (cogumelo ostra), *P. citrinopileatus* (ostra dourada), *P. eryngii* (ostra real), *P. tuber-regium* (ostra king tuber), *P. pulmonarius* (ostra fênix), *P. nebrodensis* (cogumelo férula branco), *P. cystidiosus* (cogumelo abalone), *P. cornucopiae* (cogumelo ostra ramificado) e *P. sajor-caju* (ostra cinza abalone) (BELLETTINI et al., 2019; CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017; XU et al., 2021).

Devido a diversidade do gênero *Pleurotus*, a identificação correta das espécies é dificultada (ZERVAKIS et al., 2019). Uma única espécie pode assumir diferentes características morfológicas a depender da mudança do ambiente, além disso, as condições de luminosidade ao qual o fungo será submetido pode influenciar em distintas colorações (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). Estudos com técnicas modernas de abordagem

bioquímica e molecular fornecem informações mais precisas quanto ao gênero e espécie (BRUGNARI et al., 2016).

As espécies de *Pleurotus ssp.* utilizam enzimas extracelulares (celulases, pectinases, xilanases, peroxidases e lacases) para degradar compostos da parede celular de plantas e é dessa maneira que os fungos extraem nutrientes de substratos lignocelulósicos para desenvolver seus corpos de frutificação (ARAÚJO et al., 2021). As características químicas, funcionais e sensoriais dos cogumelos são influenciadas pelos substratos utilizados em seu cultivo (BELLETTINI et al., 2019). *Pleurotus spp.* são reconhecidos por suas propriedades dietéticas, sendo fonte de proteína (9% –35%) e aminoácidos essenciais, fibras (12% –57%), vitaminas e minerais (ARAÚJO et al., 2021). Outro interesse na utilização de espécies de *Pleurotus ssp.* relaciona-se à suplementação de alimentos processados, visando aumentar o conteúdo e a qualidade de proteínas, como em pães e produtos lácteos (CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017).

Os representantes do gênero *Pleurotus ssp.* ocupam o segundo lugar no mercado mundial de cogumelos e é o mais popular na China (BELLETTINI et al., 2019). No Brasil, há um crescimento no consumo de cogumelos comestíveis nos últimos anos, principalmente de *P. eryngii*, conhecido como king shimeji, que representa um dos cogumelos mais cultivados, aproximando-se cada vez mais do cotidiano dos brasileiros (LOUZADA DOS SANTOS et al., 2021). A produção brasileira de cogumelos *Pleurotus ssp.* não possui dados precisos, no entanto, estima-se que sejam produzidas cerca de duas mil toneladas por ano (ARAÚJO et al., 2021).

O gênero *Pleurotus ssp.* é bastante estudado em razão da presença de importantes moléculas bioativas e seus diversos efeitos biológicos (BELLETTINI et al., 2019). Metabólitos primários e secundários presentes nos fungos deste gênero apresentam potencial terapêutico substancial. O primeiro relato de atividade hipotensiva de cogumelo *Pleurotus ssp.* em um modelo de camundongo foi em 1986 e desde então, vários pesquisadores demonstraram sua capacidade medicinal (BRUGNARI et al., 2016). Entre os representantes do gênero, os estudos com a espécie *P. djamor* apontam atividades biológicas de seus metabólitos e por essa razão essa espécie deve ser melhor explorada (LI et al., 2021b).

2.2 *Pleurotus djamor*

O *Pleurotus djamor* (**Figura 5**) é uma espécie caracterizada por ter basidioma que varia em cor de branco a salmão profundo (MENOLLI; BRETERNITZ; CAPELARI, 2014). Conhecido como cogumelo ostra rosa, é amplamente cultivado na China (LI et al., 2019), apresentando condições de crescimento em diferentes temperaturas ao longo do ano (SHARMA et al., 2021). A taxonomia das formas rosa de *Pleurotus* tem sido uma questão de discussão de muitos autores e inclui pelo menos cinco espécies consideradas sinônimas: *P. ëous* (Berk.) Sacc., *P. flabellatus*, Sacc., *P. ostreatoroseus*, *P. almoneostramineus* Lj.N.Vassiljeva e *P. djamor* (MENOLLI; BRETERNITZ; CAPELARI, 2014).

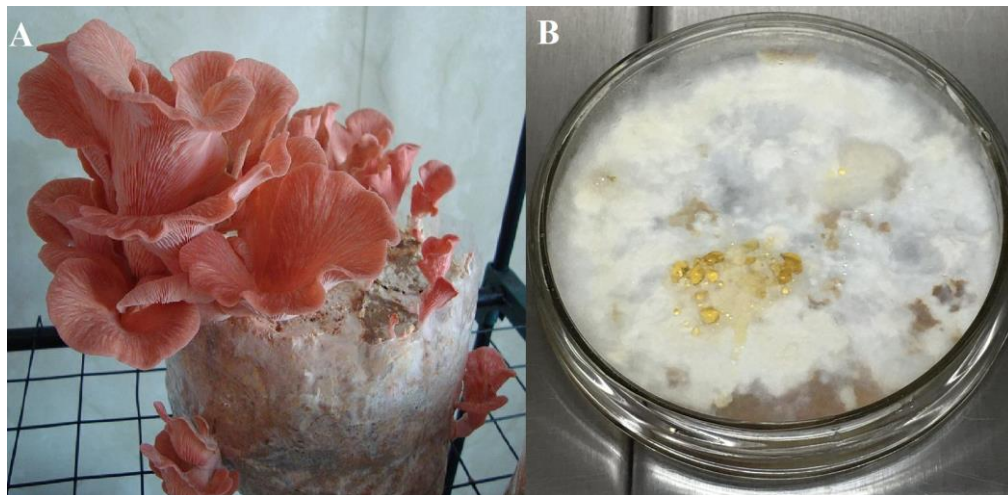


Figura 5. (A) Basidiomas de *P. djamor*; (B) Micélio de *P. djamor* em meio batata dextrose. Fonte: (A) Imagem disponível para o domínio público em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page> [Adaptado]. Acessado em 08/12/2021. (B) Própria da autora.

O *P. djamor* foi identificado como não tóxico naturalmente e é amplamente utilizado para fins alimentícios e medicinais, assim como algumas outras espécies comestíveis do gênero *Pleurotus* (*P. sajorcaju*, *P. florida*, *P. citrinopileatus* e *P. ostreatus*) (MAITY et al., 2019). Essa espécie de cogumelo possui variedade de atividades fisiológicas descritas na literatura: hepatoprotetora (LI et al., 2019), antitumoral (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021a), antioxidante, antimicrobiana, antiplaquetária (MAITY et al., 2021a). Inclusive, algumas atividades biológicas foram citadas em estudos utilizando polissacarídeos de *P. djamor* (LI et al., 2021b), reforçando a importância farmacológica deste metabólito primário.

3 Fungos Ascomycota

Os fungos do filo Ascomycota (**Figura 6**) incluem as leveduras de panificação e cerveja, o bolor azul-esverdeado (maturação de queijos) e preto, cogumelos, trufas, fungos de xícara e líquen, representando um grupo grande, diverso e economicamente importante (MARGULIS; CHAPMAN, 2009). Os Ascomycota possuem três subfilos: Taphrinomycotina (grupo pequeno que inclui algumas leveduras), Saccharomycotina (a maior parte das leveduras, incluindo as variedades de panificação e cerveja, e também *Candida albicans*) e Pezizomycotina (todos os outros ascomicetos) (TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2015b). A maioria dos fungos ascomicetos faz parte da classe Plectomycetes e ordem Eurotiales, enquanto a maior parte das leveduras estão na classe Hemiascomycetes e na ordem Endomycetales (COUSIN, 2014).



Figura 6. Representação da diversidade morfológica do filo Ascomycota. (A) Corpo de frutificação de *Morchella cônica*. (B) Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. (C) Micrografia de *Penicillium sp.* (D) Líquenes em galho de árvore. (E) Trufa branca *Tuber magnatum*. (F) Fungo de xícara *Sarcoscypha coccínea*. Fonte: As imagens estão disponíveis para o domínio público em <https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page> [Adaptado]. Acessado em 09/12/21.

Os ascomicetos são conhecidos pela formação de um asco, estrutura de parede fina, contendo ascósporos ou esporos sexuais, também produzem esporos assexuados, os conídios (FAZENDA et al., 2008). O asco está dentro de um corpo frutífero denominado ascoma ou

ascocarpo (TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2015b). Na maturidade, o asco se rompe liberando os ascósporos no meio ambiente. A maioria dos ascomicetos formam hifas, entretanto, as leveduras geralmente são exclusivamente unicelulares. As hifas dos ascomicetes são tubos longos, delgados e ramificados e o micélio é septado e ramificado, formando uma massa algodoadada (MARGULIS; CHAPMAN, 2009).

As características mais marcantes dos fungos pertencentes ao filo Ascomycota são: produção de ascósporos resistentes ao calor e crescimento em alimentos com baixa atividade de água. Essas características geram problemas na indústria de alimentos, por exemplo, permitindo que os ascósporos sobrevivam aos tratamentos térmicos de pasteurização, enlatamento ou processamento asséptico, resultando na deterioração de diferentes tipos de alimentos (COUSIN, 2014).

Os fungos ascomicetos são metabolicamente versáteis e desempenham papel crucial na indústria, onde são utilizados para produção de enzimas, pigmentos, antibióticos, ácidos orgânicos e alimentos humanos (FERREIRA et al., 2016). O *Aspergillus spp.*, por exemplo, é responsável pela maior parte da produção comercial de ácidos orgânicos, incluindo os ácidos cítrico, glucônico e itacônico, além de também possuir potencial como fonte de ácido málico e oxálico (YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017). Portanto, fungos Ascomycota podem ser explorados comercialmente tanto na indústria de alimentos quanto ao seu potencial farmacológico.

3.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* representa um grupo de fungos filamentosos encontrados em diversos habitats, resistentes a diferentes condições ambientais e com grande número de espécies: *A. terreus*, *A. tubingensis*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. aculeatus*, entre outras. Este gênero inclui cerca de 200 espécies de importância na saúde pública como contaminantes alimentares, produtores de toxinas, patógenos humanos e animais, bem como são úteis em processos biotecnológicos e utilizados como modelo para estudo de inúmeros processos celulares (SCAZZOCCHIO, 2019).

Na agricultura, representantes do gênero *Aspergillus* são conhecidos por contaminar alimentos, principalmente grãos (trigo, milho, arroz, cevada, farelo de farinha, amendoim e soja armazenados) (GHAFORI; HABIBIPOUR; BAYAT, 2021). Este gênero também é responsável pela produção de metabólitos secundários, como aflatoxinas, que podem

contaminar alimentos e rações (KE et al., 2021). As aflatoxinas, um grupo de cumarinas altamente substituídas, secretadas pelos fungos quando crescem em alimentos armazenados, são extremamente tóxicas. Intoxicações com essa substância podem ser fatais, os principais responsáveis são as cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* (SCAZZOCCHIO, 2019).

Na indústria, o interesse de espécies de *Aspergillus* deve-se a sua capacidade de crescimento e cultivo em diferentes substratos, altos níveis de secreção e atividade enzimática, bem como à capacidade de degradação da paredes celulares (HEGDE, 2006; MA et al., 2021a). O *A. terreus* por exemplo, é um fungo de distribuição mundial de coloração marrom-amarelada a marrom-escura, que possui valor econômico em biotecnologia e tem sido empregado no campo industrial na produção de ácido itacônico e lovastatina (fármaco membro da classe das estatinas, usado para tratar a hipercolesterolemia) (HUANG et al., 2021). A depender das condições de cultivo, as cepas de *A. niger* são capazes de excretar uma série de ácidos orgânicos, como o cítrico, usado em indústrias de alimentos, bebidas e farmacêutica (SCAZZOCCHIO, 2019). Sendo assim, *Aspergillus spp.* são de considerável interesse para a pesquisa médica, aplicada e básica (MA et al., 2021b).

3.1.1 *Aspergillus niger*

O *A. niger* (**Figura 7**) é um ascomiceto filamentosos, saprotrófico e presente na natureza, principalmente em material vegetal morto ou em decomposição (XU et al., 2020). Caracterizado por ser um mofo de coloração preta (*Aspergillus* seção Nigri) é a espécie industrial mais comumente aplicada (MEIJER et al., 2011).

Apesar de desempenhar um papel importante nos ecossistemas naturais e na indústria, particularmente na produção de alimentos, medicina e biotecnologia, o *A. niger* também é, assim como as demais espécies do gênero, conhecido pela produção de micotoxinas (SCROCCARELLO et al., 2021). Considerado importante produtor da micotoxina ocratoxina A em alimentos, principalmente em uvas e produtos derivados (GIL-SERNA et al., 2019).

O *A. niger* é capaz de crescer em uma variedade de condições ambientais e é facilmente encontrado em todo o mundo. O seu crescimento, fisiologia, produção de enzimas e outros metabólitos estão relacionados às fontes de carbono e outros nutrientes disponíveis, bem como a temperatura e umidade submetidos durante a fase de crescimento (MEIJER et al., 2011).

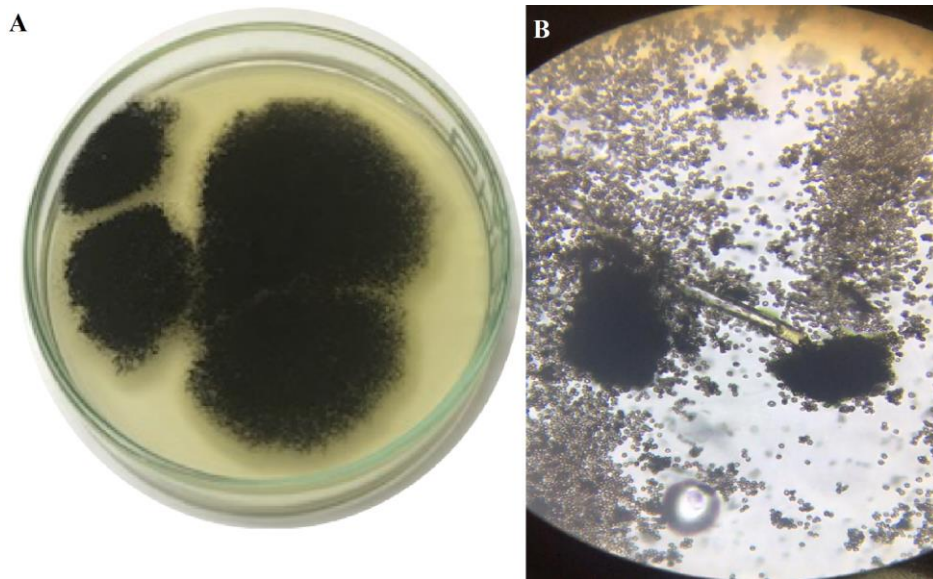


Figura 7. (A) Micélio de *Aspergillus niger* em meio batata dextrose. (B) Morfologia microscópica de *Aspergillus niger* com presença de hifa hialina e de conídio preto. Fonte: Própria da autora.

Diversos estudos utilizam o *A. niger* em busca da exploração máxima do seu potencial. Meng et al. (2022) em seu trabalho utilizaram mutantes de *A. niger*, criados a partir de engenharia metabólica, para a produção biotecnológica de xilitol a partir de substratos lignocelulósicos. Na área clínica, Abdel-Wahhab et al. (2020) identificaram compostos bioativos no extrato de *A. niger* SH2-EGY (fração de acetato de etila) e avaliaram seu papel protetor contra o estresse oxidativo induzido por aflatoxina B1 (AFB1), genotoxicidade e citotoxicidade em ratos, demonstrando que o extrato é seguro e promissor para as indústrias farmacêutica e alimentícia. Sendo assim, seja pelos benefícios industriais e na área farmacológica, quanto pelos prejuízos causados na agricultura, o *A. niger* é um fungo importante e economicamente significativo.

4 Parede celular dos fungos

A parede celular é uma matriz dinâmica que circunda as células fúngicas conferindo flexibilidade, rigidez e proteção contra condições ambientais extenuantes: lesões mecânica, toxinas, pressão osmótica e ataques de parasitas (TZELEPIS; KARLSSON, 2019). Portanto, a parede celular fúngica possui importante função em proporcionar propriedades aderentes que permitem a sua invasão nos tecidos do hospedeiro e a sua proteção contra a maquinaria de defesa do hospedeiro invadido (CORTÉS et al., 2019). A parede celular é altamente mutável e permite diversos processos morfogenéticos, como crescimento celular, citocinese e o

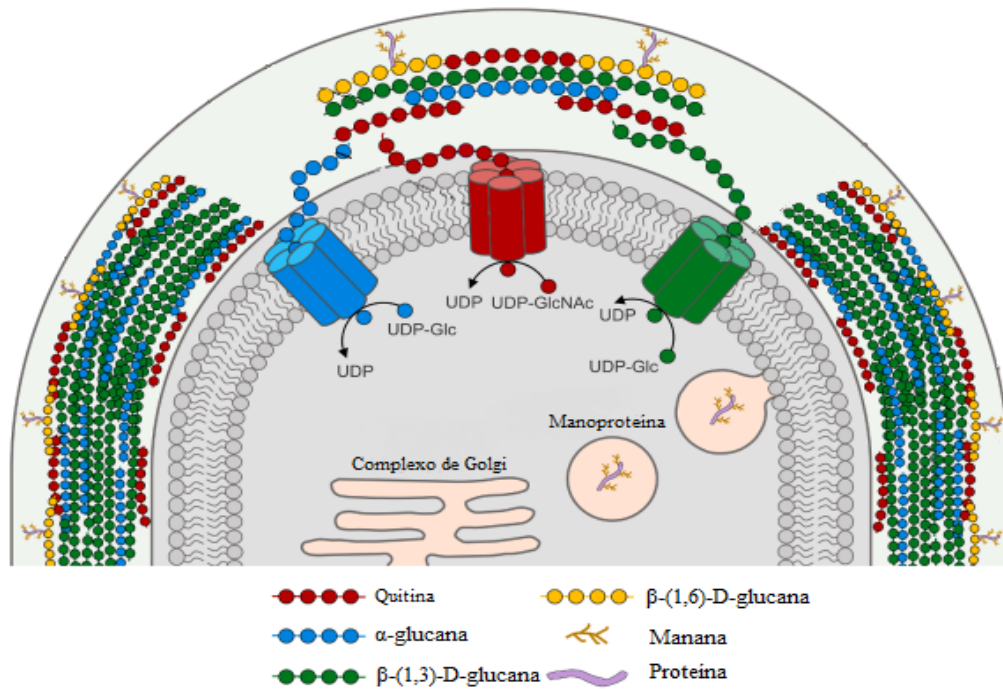
desenvolvimento de tipos especializados de células fúngicas (CORTÉS et al., 2019). A organização da parede celular fúngica varia entre as espécies e a depender do estágio de crescimento do fungo (COLOSIMO et al., 2021).

Embora a composição varie entre as diferentes espécies de fungos, a maioria das paredes celulares exibem uma estrutura semelhante que consiste na presença de polissacarídeos do tipo quitina, mananas, α -glucanas, β -1,3-D-glucanas, β -1,6-D-glucanas e de proteínas (**Figura 8**) (TZELEPIS; KARLSSON, 2019). A parede celular é construída a partir de componentes da matriz que estão incorporados e ligados à microfibras que compreendem longas cadeias de polissacarídeos (70-90% da parede celular) e proteínas glicosiladas (10-30% da parede celular) (CORTÉS et al., 2019; CURTO et al., 2021).

A parede celular fúngica é composta por duas camadas principais de polímeros conectados uns aos outros formando uma rede forte. A camada interna é hidrofóbica e rígida e composta, principalmente, por uma rede fibrilar de β -(1,3)-D-glucana e quitina, com algumas espécies apresentando ainda fibrilas de α -1,3-D-glucana (que contribuem para a integridade da parede celular) (CURTO et al., 2021). A camada externa varia de acordo com a espécie, mas de modo geral, é a camada mais heterogênea, hidratada, móvel e composta de glicoproteínas (manoproteínas responsáveis pelo reconhecimento e adesão ao hospedeiro), podendo também apresentar componentes como melanina, lipídios e poliuronídeos (COLOSIMO et al., 2021).

O principal glucano de parede celular fúngica é o β -(1,3)-D-glucano (65–90% do total dos β -glucanos da parede celular) (CORTÉS et al., 2019). Após sintetizado e ramificado por cadeias laterais de β -(1,6)-D-glucano, o β -(1,3)-D-glucano se conecta a outros glucanos, à quitina ou a manoproteínas, conferindo força mecânica à parede, essencial para manter a integridade da célula fúngica (CURTO et al., 2021). A quitina é um polímero estrutural de monômeros de N-acetilglucosamina ligados por ligações do tipo β -(1-4) e que tornam as microfibrilas estabilizadas por ligações de hidrogênio. A quitina é resistente à tração, proporcionando rigidez à parede celular fúngica (COLOSIMO et al., 2021). O β -(1-6)-D-glucano, por outro lado, atua como “cimento” dentro da rede, portanto, se interconecta covalentemente a β -(1-3)-D-glucano, quitina e glicoproteínas (CORTÉS et al., 2019).

A)



B)

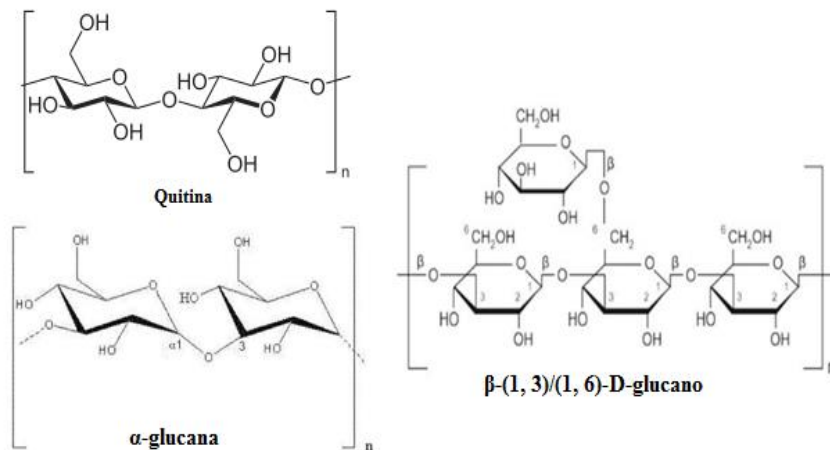


Figura 8. A) Esquema da estrutura e biossíntese de uma parede celular típica de fungos. B) Estruturas químicas dos polissacarídeos quitina, α-glucana e β-(1,3)/(1,6)-D-glucano. Os polissacarídeos β-(1,3)-D-glucana, quitina e α-glucana são sintetizados na membrana plasmática por enzimas transmembrana. A localização da síntese de β-(1,6)-D-glucana é desconhecida. As manoproteínas são transferidas do complexo de Golgi para a membrana plasmática através de vesículas e, em seguida, fixadas à camada externa da parede celular. Fonte: CURTO et al. (2021). [Adaptado].

Durante as diferentes fases da morfogênese do ciclo de vida dos fungos, a parede celular será continuamente reconstruída, este processo inclui a ruptura de ligações e inserção de moléculas, bem como a biossíntese dos seus constituintes polissacarídeos (CURTO et al.,

2021). Os polissacarídeos quitina, β -(1-3)-D-glucano e α -(1-3)-D-glucano são sintetizados na membrana plasmática por enzimas transmembrana ou complexos enzimáticos (**Figura 8**). A localização da síntese de β -(1-6)-D-glucano é desconhecida e a glicoproteína (Manoproteína) tem sua síntese iniciada no retículo endoplasmático e é estendida para o complexo de Golgi e então exportada para a membrana plasmática e para a parede celular pela via secretora (CORTÉS et al., 2019).

A presença de polissacarídeos, principalmente a quitina, na parede celular dos cogumelos confere uma fonte de fibra alimentar com benefício para a saúde (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). Os fungos são fonte de fibra dietética e seus impactos na digestão e na saúde decorrem das características de sua parede celular, podendo, inclusive, de acordo ao estudo de Colosimo et al. (2021), melhorar a saúde através da redução dos riscos de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, e também aumentando a saciedade.

5 Importância biotecnológica dos polissacarídeos fúngicos

A maioria dos carboidratos presentes na natureza compreendem macromoléculas com peso molecular relativamente grande, os polissacarídeos (MAITY et al., 2021b). Polissacarídeos são carboidratos complexos e compostos por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas (SINDHU et al., 2021). Classificados como homopolissacarídeos, quando contém apenas um tipo de unidade monomérica, ou heteropolissacarídeos quando são compostos por dois ou mais tipos diferentes de monômeros em sua composição. Estruturalmente, os polissacarídeos, podem ser lineares ou possuir vários graus de ramificação (ABREU et al., 2021).

Os polissacarídeos são produzidos por diferentes espécies (microrganismos, algas, plantas e animais), possuem alta diversidade estrutural, o que lhes confere múltiplas funcionalidades e grande capacidade de transportar informações biológicas (CHAKRABORTY et al., 2019; GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021b). A configuração dos monossacarídeos e das ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos difere conforme a sua origem (SINDHU et al., 2021).

As diversas espécies de fungos apresentam diferenças em relação aos polissacarídeos, como a estrutura molecular, tamanho, peso molecular, composição monossacarídica, solubilidade, conformação, padrão de ramificação, grau de substituição e associação intra e

intermolecular das cadeias de polissacarídeos, estas diferenças são importantes nas aplicações e respostas biológicas características dos polissacarídeos (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021a; MAITY et al., 2021b). Além disso, é possível observar variações estruturais decorrentes de diferentes metodologias utilizadas para extração dos polissacarídeos fúngicos (ABREU et al., 2021).

Na purificação dos polissacarídeos, as impurezas do processo de extração, são eliminadas e a estabilidade do polissacarídeo é alcançada através do processo de precipitação. A realização da precipitação de polissacarídeos pode ser executada utilizando solventes orgânicos e álcoois, a partir de associação intermolecular. A redução na constante dielétrica dos polissacarídeos ocasiona as mudanças conformacionais que permitem a agregação e precipitação das moléculas (MUTHUSAMY; UDAYAKUMAR; NARALA, 2021).

Os polissacarídeos desempenham papéis essenciais, seja no ecossistema ou na utilização como matéria-prima industrial. São aplicados no ramo têxtil (corante/tinta), alimentício (gomas/aglutinantes) e farmacêutico (formulações de fármacos devido à sua solubilidade, permeabilidade e difusividade), além disso são utilizados como excipientes semissintéticos e naturais na forma de espessantes, ligantes, gelificantes, suspensões, emulsificantes e estabilizantes (SINDHU et al., 2021).

A utilização de polissacarídeos fúngicos em aplicações farmacêuticas ocorre devido principalmente a sua ausência ou baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e disponibilidade como material renovável (MAITY et al., 2021b). As atividades biológicas dos polissacarídeos estão relacionadas às variações estruturais dos diferentes polissacarídeos fúngicos, demonstrando efeitos antitumorais, imunomoduladores, antioxidantes, anti-inflamatórios, antivirais, antidiabéticos, hipotensivo, hepatoprotetor, hipolipidêmico, antitrombótico (SINDHU et al., 2021).

6 Avaliação da atividade biológica de polissacarídeos fúngicos

A diversidade de aplicações farmacológicas atribuídas aos polissacarídeos fúngicos impulsionam os estudos nessa área (SINDHU et al., 2021). As bioatividades dessas biomoléculas estão relacionadas as diferenças em aspectos como a sua estrutura molecular, composição monomérica, tipo de ligação glicosídica predominante, grau de substituição, grau de ramificação e na conformação estrutural das cadeias principais (DE ALMEIDA; DA SILVA, 2021).

A maioria dos polissacarídeos de fungos possuem de médio a alto peso molecular (> 20.000 Da) e estrutura composta de α - ou β -glucano, ou um α , β -glucano misto (MAITY et al., 2021b). A classificação desses homopolissacarídeos leva em consideração o peso molecular e a posição do carbono anomérico na ligação glicosídica (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020).

Os heteropolissacarídeos fúngicos são mais complexos que os homopolissacarídeos e também têm sido explorados quanto ao potencial biológico. Manoglucanos, galactomananos, heterogalactanos e manogalactanos são exemplos de heteropolissacarídeos obtidos a partir de cogumelos comestíveis e que apresentam atividades biológicas relatadas resultantes de experimentos *in vitro* e *in vivo* (ABREU et al., 2021).

Os glucanos fúngicos bioativos são versáteis quanto aos tipos de ligações glicosídicas apresentadas, sendo principalmente dos tipos (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 6)- β -D-glucanos, (1 \rightarrow 3)- α -D-glucanos e (1 \rightarrow 6)- β -D-glucano (MAITY et al., 2021b; RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). Entretanto, os β -D-glucanos são os mais estudados quanto estrutura química e efeitos medicinais (YAN et al., 2019). Os β -D-glucanos e alguns heteroglucanos atuam como modificadores da resposta biológica, possuindo a capacidade de aumentar e estimular o sistema imunológico entre outras bioatividades (CHAKRABORTY et al., 2019).

Os estudos com polissacarídeos têm se proposto a explorar a versatilidade estrutural, bem como confirmar relações estrutura-bioatividades. As fontes, tipo de extração, pesos moleculares, composições monossacarídicas e atividades biológicas de alguns polissacarídeos de fungos filamentosos foram resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fontes, tipo de extração, composição e atividade biológica de polissacarídeos fúngicos.

Fungo	Tipo de Extração	Peso molecular (Da)	Composição monossacarídica	Polissacarídeo	Atividade biológica	Referência
<i>Pleurotus djamor</i>	Alcalina	$9,16 \times 10^4$	Glicose	(1→3)- β -D-glucano	Efeito citotóxico contra células PA1 de carcinoma ovariano	(MAITY et al., 2019)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Água quente	$2,14 \times 10^4$	Galactose, manose, metil-galactose e glicose	Heterogalactano 3-O-metilado	Ativação de macrófagos	(YAN et al., 2019)
<i>Russula virescens</i>	Água quente	RVP-1: $1,48 \times 10^4$ RVP-2: $1,33 \times 10^4$	Galactose, glicose, manose e fucose	Heteroglucano de ligações glicosídicas dos tipos: 1,6 →, 1,2 →, 1 → e 1,3,6 →	Hipoglicêmica, anticâncer e imunomoduladora	(LI et al., 2021c)
<i>Pleurotus djamor</i>	Água quente	$1,61 \times 10^5$	Glicose e galactose	Galactoglucano	Antioxidante	(MAITY et al., 2021a)
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Água	$7,30 \times 10^5$	Arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e ácido glucurônico	Heteroglucano com ligações do tipo α e β	Atividade antitumoral	(WANG et al., 2021)
<i>Grifola frondosa</i>	Água quente	$1,55 \times 10^5$	Ramnose, xilose, manose, glicose	Heteroglucano	Atividade imunomoduladora	(MENG et al., 2017)
<i>Russula vinosa</i>	Água quente	RVLAP: $10,72 \times 10^4$ RVLWP: $8,71 \times 10^4$	RVLAP: glicose, galactose e arabinose; RVLWP: glicose e galactose	Heteroglucano	Atividade antioxidante e hepatoprotetora	(LIU et al., 2014)
<i>Grifola frondosa</i>	Água quente	$4,05 \times 10^4$	Glicose e fucose	Fucoglucano	Atividade antiviral	(ZHAO et al., 2016)

<i>Pholiota nameko</i>	Água quente	-	Glicose, manose e galactose	β -D-glucano	Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva	(ABREU et al., 2019)
<i>Cookeina tricholoma</i>	Alcalina	ICW-Ct: 4,3x10 ⁵ IHW-Ct: 3,7x10 ⁵ IK2-Ct: 8,2x10 ⁵	Glicose	β -D-glucano	Atividade antinociceptiva	(MORENO et al., 2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	-	3,03x10 ⁴	Manose	Manano	Atividade antitumoral	(LI et al., 2016)
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	7000	Glicose e manose	Manoglucano	Atividade antioxidante	(CHEN et al., 2012)
<i>Penicillium sp.</i>	-	PS1-1: 6,74x10 ⁴ PS1-2: 1,54x10 ⁴ PS2-1: 1,21x10 ⁴	Manose, glicose e galactose. Ácido glucorônico apenas no PS2-1	Heteroglucano	Atividade antioxidante	(SUN et al., 2009)
<i>Lentinus edodes</i>	-	2,27x10 ⁴	Manose, arabinose, galactose, xilose e ramnose	Heteropolissacarídeo	Atividade hipoglicemiante	(CAO et al., 2020)
<i>Boletus edulis</i>	Água quente	113,432	Glicose, galactose, ramnose e arabinose	Heteroglucano	Atividade antitumoral e imunomoduladora	(WANG et al., 2014)
<i>Agaricus bitorquis</i>	Água quente	-	Glicose, Galactose, Manose, Xilose, Arabinose e Rhamnose	Galactoglucomanano	Atividade imunomoduladora	(LIN et al., 2021)
<i>Agaricus bisporus</i>	Água quente	7,84x10 ⁵	Ribose, ramnose, arabinose, xilose, manose, glicose e galactose	Heteropolissacarídeo	Atividade imunomoduladora	(LIU et al., 2020)

<i>Ganoderma lucidum</i>	Água quente	$2,5 \times 10^4$	Arabinose, manose, glicose e galactose	Heteroglucano	Modulação da microbiota intestinal, função das células imunes para inibir a inflamação e a tumorigênese no cólon	(GUO et al., 2021)
<i>Inonotus obliquus</i>	Água	$1,0502 \times 10^5$	Ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glicose	Heteroglucano	Atividades antioxidante e inibidora da α -amilase e α -glicosidase	(WANG et al., 2018a)
<i>Agaricus spp.</i> (A. <i>brasilensis</i> (EPF-Ab) e A. <i>bisporus</i> var. <i>hortensis</i> (EPF-Ah))	Água	EPF-Ab: $19,4 \times 10^3$ EPF-Ah: $31,1 \times 10^3$	EPF-Ab: Fucose e galactose EPF-Ah: Fucose, galactose e 3-O-metil-galactose	Fucogalactanos	Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva	(KOMURA et al., 2010)

6.1 Atividade Imunomoduladora

Imunidade é a capacidade do corpo de reconhecer e fornecer uma resposta contra doenças ou microrganismos invasores pela atuação do sistema imunológico. A resposta imune do organismo pode ser do tipo inata ou do tipo adaptativa (SINDHU et al., 2021). A imunidade inata é um mecanismo de defesa inespecífico que tem início imediatamente após o reconhecimento de algum corpo estranho dentro da célula hospedeira (SINDHU et al., 2021). Macrófagos, células *Natural Killer* (NK), células dendríticas e mastócitos participam do sistema imunológico inato com o intuito de combater quaisquer invasores estranhos principalmente através da produção de citocinas: interleucinas (IL), interferons (IFN) e fator de necrose tumoral (TNF) (YADAV; NEGI, 2021).

A imunidade adaptativa, também conhecida como adquirida ou específica, ocorre ao longo da vida, sendo ativada após o contato com diferentes antígenos imunogênicos, tornando o organismo capaz de reconhecer e se defender de invasores patogênicos (MAITY et al., 2021b). Os sistemas imunes adaptativos são compostos de células T CD4+, células T CD8+, células B, etc. As células B produzem anticorpos para arbitrar a imunidade humoral, enquanto as células T ativam a imunidade mediada por células (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). As células dendríticas derivadas de monócitos também estão envolvidas na resposta imune adaptativa, apresentando antígenos às células T e assim, ativando o sistema imunológico (MAITY et al., 2021b).

Para acelerar ou desacelerar a resposta imunológica o organismo pode contar com compostos imunomoduladores, a exemplo dos polissacarídeos, que são capazes de gerar respostas imunes inatas e adaptativas contra células invasoras (YAN et al., 2019). Os polissacarídeos, portanto, são considerados modificadores da resposta biológica. Os β -glucanos fúngicos, por exemplo, podem mediar a imunidade através da reprogramação funcional das células imunes inatas, permitindo respostas adaptativas após exposições secundárias a patógenos (BRIARD et al., 2021).

Os β -glucanos ativam o sistema imunológico aumentando a função fagocítica dos macrófagos, ou aprimorando outras funções dos macrófagos, como a produção de óxido nítrico, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e aumentando a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) (DUMLUPINAR, 2021; LIN et al., 2021; RODRIGUES BARBOSA et al., 2020).

Os polissacarídeos ativam o sistema imunológico com a mediação de receptores de parede celular que realizam o reconhecimento bioquímico e determinam o tipo de resposta celular (YIN et al., 2021b). Estes receptores são proteínas chamadas de receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors* ou PRRs) que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos. Mananas e β -glucanas, são os principais Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) fúngicos na ativação de PRRs, incluindo receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores tipo Dectina-1 e Receptores *Toll-Like* (TLR-2 e TLR-4) e receptor de complemento 3 (CR3) (BRIARD et al., 2021). Vários desses PRRs, participam na transmissão de sinal e ativação de macrófagos (YAN et al., 2019).

Os principais PRRs encontrados na membrana celular são os TLRs e são responsáveis pela associação das imunidades inata e adaptativa (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). Os TLRs são os canais de sinalização primários envolvidos na ativação de macrófagos, incluindo a via do fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) (YIN et al., 2021a). Estudos têm demonstrado que a ativação de macrófagos através de polissacarídeos naturais pode ocorrer por intermédio da ligação ao receptor TLR2 (YAN et al., 2019).

Além dos β -glucanos, outros heteroglucanos, principalmente obtidos de cogumelos, apresentam atividade imunoestimulatória (YAN et al., 2019). De acordo com os estudos apresentados na Tabela 1, heteroglucanos possuem potencial imunomodulador. Ao que se refere ao peso molecular destes polissacarídeos, a atividade imunomoduladora é observada em polissacarídeos de tamanhos diversos, a exemplo do polissacarídeo da parede celular de *Russula virescens* com peso molecular de 13,301 Da (LI et al., 2021c) até moléculas de $7,84 \times 10^5$ Da obtidas da parede celular de *Agaricus bisporus* (LIU et al., 2020).

Um galactoglucomanano (ABSP) obtido de *Agaricus bitorquis* (QuéL.) Sacc. Chaidam, foi avaliado quanto a seu efeito imunomodulador utilizando as células RAW264.7 e foi capaz de promover a viabilidade e a capacidade fagocítica, além de aumentar a produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e níveis de TNF- α , provando que ABSP é competente para a imunorregulação em RAW264,7. O ABSP ativou significativamente as células RAW264.7 pela via de sinalização dependente de fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) mediada por receptor TLR4 (ativador da resposta imune inata) para induzir a liberação de citocinas biológicas. O MyD88 é uma molécula adaptadora essencial para sinalização através dos TLRs resultando na transdução de sinais e na produção de citocinas

pró-inflamatórias (LIN et al., 2021). Outro polissacarídeo, obtido do corpo de frutificação de *Grifola Frondosa*, também demonstrou no ensaio de proliferação celular e através de observações morfológicas, que pode melhorar significativamente a atividade de proliferação de células RAW264.7 (MENG et al., 2017).

Em estudos conduzidos por Liu et al. (2020) um heteropolissacarídeo (ABP) obtido do fungo *Agaricus bisporus*, demonstrou atividade imunomoduladora a partir da proliferação de esplenócitos, indicando que este polissacarídeo pode aumentar o potencial de ativação das células T e B e aumentar a imunidade humoral e a imunidade mediada por células (LIU et al., 2020). Um heterogalactano 3-O-metilado extraído do corpo de frutificação de *P. eryngii* aumentou a captação fagocítica de macrófagos, secreção do óxido nítrico e produção de marcadores pró-inflamatórios: TNF- α e IL-6 e IL-1 β . Estudos mecanísticos demonstram que este heteroglucano se liga ao receptor TLR2 na superfície celular e, assim, ativa as vias de sinalização de MAPKs e do NF- κ B (YAN et al., 2019).

6.2 Atividade Antinociceptiva

A dor pode ser provocada por distintos mecanismos, podendo ser categorizada como dor fisiológica e/ou inflamatória e neuropática. Diversos eventos patológicos deletérios endógenos e exógenos podem resultar na estimulação de cascatas bioquímicas desencadeando o processo de inflamação e início da dor: danos teciduais, reações autoimunes e infecções, por exemplo (GAO et al., 2021). Quando induzida por um estímulo agressivo transitório, a dor é do tipo aguda e serve como alerta fisiológico essencial para a sobrevivência (DE SOUZA SAMPAIO et al., 2020). Quando não tratada, a dor aguda pode levar ao desenvolvimento de dor crônica, comprometendo a qualidade de vida do paciente (GAO et al., 2021).

A lesão do tecido causa a dor que se resolve rapidamente assim que a lesão é curada ou os estímulos são suprimidos. Porém, uma vez que a sinalização nociceptiva continua sem que haja o estímulo sensorial, a dor não mais se torna benéfica para o organismo (MEHANNA et al., 2018). Em algumas condições como na inflamação ou lesão nervosa, a dor pode durar até anos, sendo referida como dor crônica e dor neuropática (GORDON; LOVE, 2004). O manejo farmacológico da dor baseia-se em inibir a sensibilização do nociceptor pela inibição das ciclooxigenases, como no caso do uso de anti-inflamatórios não esteroidais, ou pela supressão da sinalização contínua da dor utilizando opioides e doadores de óxido nítrico (MEHANNA et al., 2018).

Apesar da eficácia dos medicamentos disponíveis para o manejo da dor, muitas vezes há efeitos adversos relacionados, o que reflete na necessidade de busca de novas substâncias com menos efeitos colaterais indesejáveis (DE SOUZA SAMPAIO et al., 2020), a exemplo da utilização de produtos naturais como polissacarídeos, que são reconhecidos por sua atividade antinociceptiva (MAZUMDER et al., 2021; MORENO et al., 2016; SINDHU et al., 2021). O efeito antinociceptivo dos polissacarídeos pode ser atribuído à inibição de prostaglandinas e leucotrienos nas vias centrais e periféricas da dor, reduzindo a dor aguda e crônica sem distúrbios na atividade locomotora (CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNASALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017).

Fucogalactans de *A. brasiliensis* (EPF-Ab) e *A. bisporus* var. *hortensis* (EPF-Ah) de peso molecular próximos foram comparados quanto às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Apesar de ambos apresentarem os monossacarídeos fucose e galactose, o EPF-Ah também possui 3-O-metil-galactose em sua estrutura. Os resultados em camundongos, demonstram que o EPF-Ab apresentou 39% de inibição antinociceptiva, mas não apresentou atividade anti-inflamatória, enquanto que EPF-Ah além de apresentar uma inibição semelhante, em torno de 39%, também inibiu em 61% a migração celular total e em 32% a permeabilidade capilar peritoneal, que estão relacionadas ao efeito anti-inflamatório. Dessa forma, pequenas diferenças na cadeia principal desses polissacarídeos, como a presença de grupos O-metil, são capazes de modificar suas atividades biológicas (KOMURA et al., 2010).

Diferentes β -D-glucanos (ICW-Ct, IHW-Ct e IK2-Ct) foram isolados do cogumelo *Cookeina tricholoma*. Os polissacarídeos ICW-Ct e IHW-Ct ($4,3 \times 10^5$ e $3,7 \times 10^5$ Da, respectivamente) mostraram inibição significativa da dor neurogênica, na concentração de 10 mg/kg, no modelo de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina, enquanto o IK2-Ct ($8,2 \times 10^5$ Da) não mostrou efeitos antinociceptivos ao teste. A diferença na resposta antinociceptiva parece estar relacionada ao maior peso molecular do IK2-Ct quando comparado às outras frações de menor peso molecular que apresentaram atividade (MORENO et al., 2016). Um β -D-glucano obtido de corpos de frutificação de *Pholiota nameko* exibiu potencial resposta a dor inflamatória induzida por formalina, na qual com a maior concentração de polissacarídeo (3,0mg/kg) a atividade inibitória da dor foi de 82,3% (ABREU et al., 2019).

6.3 Atividade Hipoglicemiante

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças crônicas nas quais os pacientes sofrem de hiperglicemia como consequência da produção desequilibrada de insulina e/ou insensibilidade ao efeito desse hormônio na transdução de sinal de receptores celulares (STOJKOVIC et al., 2019). Consequentemente, o DM pode desencadear distúrbios metabólicos de longo prazo que resultam em uma série de complicações, incluindo cegueira, insuficiência renal, problemas circulatórios, acidente vascular cerebral e morte (YADAV; NEGI, 2021).

O DM pode ser dos tipos mais conhecidos: diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2) e diabetes gestacional, sendo que o DM2 é mais prevalente, porquanto é predominante em 90% dos pacientes diabéticos (MENEGUIN et al., 2021). O DM2 relaciona-se às disfunções hormonais e metabólicas geradas por fatores genéticos e ambientais: disbiose intestinal, tabagismo, envelhecimento, ingestão de álcool, obesidade e inflamação que leva à resistência insulínica (KHURSHEED et al., 2020). O indivíduo portador do DM2 possui defeitos nos níveis de insulina em seu organismo (devido à liberação ou ação anormal da insulina), sendo que os fatores envolvidos na sua etiopatologia são: resistência insulínica periférica, insensibilidade à insulina, redução da função ou falência das células beta pancreáticas (MENEGUIN et al., 2021).

Os polissacarídeos fúngicos podem exibir potencial hipoglicêmico regulando os níveis séricos de glicose (CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017; YADAV; NEGI, 2021). Uma das estratégias utilizadas para o controle da diabetes e da obesidade é limitar a absorção da glicose ao utilizar polissacarídeos na inibição das enzimas α -amilase e da α -glucosidase, responsáveis pela hidrólise de açúcares complexos na boca e no intestino (STOJKOVIC et al., 2019). Além disso, polissacarídeos podem modular a microbiota intestinal, promovendo o crescimento de bactérias benéficas. O metabolismo destas bactérias produz substâncias importantes que melhoram a disfunção da barreira intestinal, reduzindo a inflamação, regulando o metabolismo de lipídios e controlando os níveis de açúcar do sangue (LIANG et al., 2021).

Polissacarídeos de *Lentinus edodes* foram estudados quanto a atividade de inibição da α -glucosidase, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e danos induzidos por glicose elevada às células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). Os resultados revelaram que o polissacarídeo atua via inibição reversível do tipo mista da atividade da enzima α -glucosidase. Na concentração 2,7 mM, a taxa de inibição foi de 34,38%. Além

disso, o estudo mostrou que o polissacarídeo apresentou atividade anti-glicação e inibição da toxicidade da glicose em HUVECs (CAO et al., 2020).

Em outro estudo, foram investigados os impactos da digestão gastrointestinal do polissacarídeo de *Inonotus obliquus* (UIOPS-1) *in vitro* correlacionando com suas atividades biológicas. Os resultados mostraram que, após a digestão gastrointestinal simulada (fase salivar, fase gástrica e fase intestinal), o polissacarídeo foi degradado, possivelmente devido à ruptura de agregados e quebra de ligações glicosídias, modificando a sua estrutura e a atividade de UIOPS-1. Após a digestão gástrica de UIOPS-1 houve aumento significativo das atividades antioxidantes e inibitórias das enzimas α -amilase e α -glucosidase, indicando um controle da hiperglicemia pós-prandial (WANG et al., 2018a).

6.4 Outras atividades biológicas

Polissacarídeos são amplamente estudados quanto ao poder de eliminação de radicais livres e consequente atividade antioxidante (MAITY et al., 2021b). As células do corpo sofrem estresse diário sendo constantemente expostas às espécies reativas de oxigênio (ERO's) e espécies reativas de nitrogênio (ERN's), conhecidas como radicais livres, que são formadas como subprodutos de processos biológicos. Quando em equilíbrio, os radicais livres apresentam papéis benéficos para o organismo ao participar da homeostase celular (LI et al., 2021b). A presença excessiva desses radicais, incluindo hidroxilas e ânions peróxidos, está diretamente relacionada ao desenvolvimento de várias patologias, como alzheimer, isquemia cerebral, diabetes, aterosclerose, inflamação e câncer (CHEN et al., 2012; MAITY et al., 2021b). Em organismos saudáveis há a capacidade de reparo maior do dano oxidativo causado pelos radicais livres, com a ação de antioxidantes endógenos (YADAV; NEGI, 2021).

A deterioração dos alimentos também está relacionada aos danos causados pelos radicais livres, processo conhecido como oxidação, que reduz a vida útil dos produtos alimentares e é um problema comum na indústria de alimentos (NIRMALA et al., 2018). A utilização de antioxidantes sintéticos possui potencial risco para a saúde humana. A utilização de polissacarídeos como sequestradores de radicais livres tem se mostrado uma alternativa viável para solucionar esse problema. A capacidade aprimorada de doar hidrogênio está diretamente relacionada ao alto teor de ácido urônico não metilado e aos grupos hidroxila presentes nos polissacarídeos (DE ALMEIDA; DA SILVA, 2021).

O polissacarídeo PS2-1 do fungo *Penicillium sp.* F23-2, apresentou propriedade antioxidante superior, em relação às outras frações polissacarídicas obtidas deste fungo, sugerindo-se relação entre a maior atividade e ao seu peso molecular relativamente baixo e a presença de ácido glucurônico. O potencial antioxidante possivelmente relaciona-se à capacidade do polissacarídeo em doar hidrogênio dos seus grupamentos hidroxilas, estabilizando o radical da reação (SUN et al., 2009). Um manoglucano de *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4, peso molecular de cerca de 7000 Da, demonstrou potencial antioxidante ao se ligar aos radicais hidroxila, 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) e superóxido encerrando a reação em cadeia destes radicais (CHEN et al., 2012).

As atividades antioxidantes e hepatoprotetoras de dois polissacarídeos (RVLWP e RVLAP) obtidos de *Russula vinosa* foram relatadas. O estudo baseou-se na utilização dos polissacarídeos para limitar a lesão oxidativa do tecido e, portanto, prevenir a progressão da doença hepática através do emprego de defesa antioxidante. O potencial antioxidante *in vitro* demonstrou a capacidade dos polissacarídeos em atuar como doadores de hidrogênio capaz de estabilizar e interromper as reações em cadeia dos radicais livres. Na atividade hepatoprotetora *in vivo*, a administração dos polissacarídeos preveniu a elevação da atividade de marcadores hepáticos, sugerindo que RVLWP e RVLAP protegem o fígado de danos hepáticos induzidos através de mecanismos antioxidantes (LIU et al., 2014). Um galactoglucano solúvel em água isolado de *P. djamor* também foi relatado por apresentar potencial antioxidante, a partir da doação de elétrons para os radicais livres reativos, convertendo-os em espécies não reativas mais estáveis e encerrando a reação em cadeia destes radicais livres (MAITY et al., 2021a).

O câncer é uma das doenças que mais afeta a expectativa de vida humana, e as opções terapêuticas (quimioterapia e imunoterapia), quando associadas, podem gerar resultados positivos para o paciente (DE ALMEIDA; DA SILVA, 2021). A literatura tem demonstrado a utilização promissora de polissacarídeos nessa perspectiva, devido a sua capacidade antitumoral (MAITY et al., 2021b). O potencial antitumoral dos polissacarídeos pode ser mediado por citotoxicidade direta, aumento da imunidade e efeitos sinérgicos no tratamento combinado com drogas anticâncer convencionais (WANG et al., 2021). A injeção peritoneal de lentinano, um polissacarídeo isolado do cogumelo shiitake, por exemplo, é utilizada no Japão desde 1985, como auxiliar no tratamento para câncer. Ensaios clínicos demonstraram que este polissacarídeo reduz os efeitos colaterais da quimioterapia e melhora a sobrevida e a qualidade de vida em pacientes com câncer (DUMLUPINAR, 2021).

Na maioria dos estudos, a atividade antitumoral dos polissacarídeos ocorre de forma indireta, através do desencadeamento da resposta imune defensiva do organismo hospedeiro e não pelo ataque direto às células cancerosas (CHAKRABORTY et al., 2019; WANG et al., 2021). Tais efeitos antitumorais são gerados a partir do acionamento do sistema imunológico, via estimulação de células NK, células T, células B e células imunes (MAITY et al., 2021b).

O (1→3)-β-D-glucano de *P. djamor* demonstrou efeito citotóxico específico, contra células PA1 de carcinoma de ovário, destruindo quase todas as células PA1 na concentração de 250 µg/mL e com atividade antiproliferativa significativa contra o carcinoma de ovário, além disso, não demonstrou toxicidade contra células saudáveis do tipo HEK293 (MAITY et al., 2019). O polissacarídeo de *Boletus edulis* (BEP), ao ser administrado em camundongos portadores de tumor Renca, inibiu o crescimento da massa tumoral, estimulou a proliferação de esplenócitos, aumentou as atividades das células NK no baço e promoveu a secreção das citocinas IL-2 e TNF-α, demonstrando atividades antitumoral e imunomoduladora no câncer renal em camundongos (WANG et al., 2014).

A atividade antitumoral *in vivo* de um heteroglucano extraído de *P. citrinopileatus* foi avaliada e na concentração de 300mg/kg demonstrou uma taxa de inibição tumoral de 61,30% do crescimento de células de hepatoma H22, com a indução da apoptose. Além disso, os camundongos portadores do tumor H22, que foram tratados com o polissacarídeo, apresentaram aumento de imunidade (WANG et al., 2021). O polissacarídeo extracelular de *Aspergillus terreus* (AP2A) apresentou potencial antiproliferativo *in vitro* em células HeLa e MCF-7 de maneira dose e tempo dependentes. O polissacarídeo agiu a partir da interrupção do ciclo celular na fase G2/M das células HeLa. Além disso, o estudo também indicou que o AP2A induz a apoptose de células HeLa (LI et al., 2016).

Dois heteropolissacarídeos hidrossolúveis (RVP-1 e RVP-2) obtidos de *R. virescens* suprimiram a proliferação de células cancerosas HepG-2, A549 e MCF-7 e ativaram células de macrófago RAW 264.7 aumentando a capacidade das células imunes de fagocitar moléculas grandes e secretar óxido nítrico e citocinas, mediando assim a resposta imune celular (LI et al., 2021c). O polissacarídeo de *Ganoderma lucidum* (GLP) mostrou atividade contra a inflamação em camundongos ao diminuir a colite induzida e diminuiu ainda, a tumorigênese manifestada por uma redução significativa do índice de atividade da doença, número total e tamanho dos tumores. Além disso, o GLP melhorou a disbiose da microbiota, indicando ser um prebiótico promissor, auxiliando no tratamento do câncer colorretal (GUO et al., 2021).

No que se refere à atividade antiviral, um heteropolissacarídeo obtido de micélios de *G. frondosa* foi estudado quanto ao seu potencial. Os resultados demonstraram que este polissacarídeo é eficaz na inibição da replicação do Enterovirus 71 (EV71) em células infectadas (ZHAO et al., 2016). Polissacarídeos fúngicos não digeríveis funcionam como prebiótico (YADAV; NEGI, 2021), regulando a microbiota intestinal, aumentando o crescimento de bactérias benéficas e, conseqüentemente, podendo evitar a infecção viral (KUMAR; AUROSHREE; MISHRA, 2016).

CAPÍTULO II

Otimização da extração, caracterização e atividade imunomoduladora do polissacarídeo de parede celular de *Pleurotus djamor* CCMB 366

Revista: Carbohydrate Polymers

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

Otimização da extração, caracterização e atividade imunomoduladora do polissacarídeo de parede celular de *Pleurotus djamor* CCMB 366

Tátilla Putumujú Santana Mendes¹, Pâmala Évelin Pires Cedro¹, Alana Caise dos Anjos Miranda¹, Lorena Lôbo Brito Morbeck², Gildomar Lima Valasques Junior¹

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

² Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Rio de Contas, Vitória da Conquista 45029-094, BA, Brazil

RESUMO

Os polissacarídeos estão entre os principais constituintes da parede celular dos cogumelos. O potencial farmacológico dessas biomoléculas conduz a busca pela compreensão de suas estruturas. O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de polissacarídeo da parede celular de *Pleurotus djamor* CCMB 366, caracterizar e investigar sua atividade imunomoduladora. Para otimizar a extração foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta, utilizando o delineamento de Box-Behnken, no qual foi observado maior rendimento de polissacarídeo quando a extração ocorreu sob temperatura, tempo de extração e pH equivalentes à 90°C, 180 minutos e 13, respectivamente. Para a análise de atividade imunomoduladora do polissacarídeo, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos ativados por lipopolissacarídeos ou pelo polissacarídeo em estudo, e a quantificação das citocinas TNF- α e IL-1 α foi determinada através de ensaios de ELISA. Os resultados demonstraram que o polissacarídeo isolado de *Pleurotus djamor* CCMB 366 é capaz de estimular os macrófagos ao aumentar a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 α . Portanto, o polissacarídeo de parede celular de *P. djamor* CCMB 366 possui propriedade imunoestimulante, tendo um potencial a ser aplicado como coadjuvante em tratamentos de doenças que requerem estimulação do sistema imunológico, como por exemplo, infecções que não repondem aos antimicrobianos tradicionais, como também alguns tipos de células tumorais.

Palavras-chave: Metodologia de Superfície de Resposta; Interleucinas; Macrófagos.

1 Introdução

Os cogumelos do gênero *Pleurotus spp.* estão entre os mais consumidos no mundo (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021b). Esse gênero é representado por mais de 200 espécies, algumas destas são valorizadas por suas propriedades gastronômicas, como sabor, odor e valor nutracêutico, a exemplo do cogumelo ostra (*P. ostreatus*) (CARRASCO-GONZÁLEZ; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017).

Além de seu valor na gastronomia, algumas espécies de *Pleurotus spp.* possuem propriedades antidiabéticas, hepatoprotetoras, anticolesterolêmicas, antioxidantes, antimicrobianas e imunomoduladoras (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022; YIN et al., 2021b). O potencial medicinal do gênero advém de seus metabólitos primários e secundários (BELLETTINI et al., 2019). Muito deste potencial é devido aos polissacarídeos presentes em sua estrutura, resultante do metabolismo primário fúngico (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022). Pesquisas recentes avaliam as estruturas químicas e as atividades biológicas dos polissacarídeos de cerca de 20 espécies de *Pleurotus spp.* (YIN et al., 2021b), dentre elas *P. djamor* (MAITY et al., 2021a).

As propriedades imunomoduladoras dos polissacarídeos foram descobertas entre os anos 1970 e 1980. Polissacarídeos imunomoduladores possuem influência tanto no sistema inato quanto no sistema adaptativo, modificando a reação imunológica de tal maneira que o sistema do indivíduo reage adequadamente contra células invasoras (SINDHU et al., 2021). Portanto, são conhecidos como modificadores da resposta biológica. Os β -glucanos são mais conhecidos por possuírem atividade imunomoduladora, porém heteroglucanos também demonstram potencial (YAN et al., 2019).

A via de ativação do sistema imunológico via polissacarídeos ocorre por mediação de receptores na parede celular que fazem o reconhecimento bioquímico específico e definem o tipo de resposta celular. Devido ao elevado peso molecular, os polissacarídeos não podem entrar diretamente nas células (YIN et al., 2021b). As células de defesa inata são os principais alvos para o acoplamento e sinalização bioquímica entre polissacarídeos e proteínas específicas da parede celular ou do interior da célula, sendo que a atividade imunoestimuladora de polissacarídeos é referida principalmente a partir da função dos macrófagos (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020).

Em trabalho realizado por Xu et al., (2016), um polissacarídeo de parede celular de *Pleurotus eryngii* foi isolado e sua atividade imunomoduladora foi estudada. Os testes indicaram que o polissacarídeo induziu a liberação, pelos macrófagos, de fatores de atividade

imune, como óxido nítrico, TNF- α , IL-1 e IL-6 através da ativação de proteínas sinalizadoras, indicando que esse polissacarídeo possui atividade imunorreguladora.

Em estudo que visou avaliar atividade imunomoduladora de polissacarídeo de parede celular de cogumelo *Pleurotus sajor-caju* também apresentou resultados promissores. O polissacarídeo induziu os macrófagos a produzirem óxido nítrico e as citocinas TNF-, IL-1, demonstrando efeito imunoestimulatório (CARBONERO et al., 2012). Estudos que investigaram atividade imunomoduladora de polissacarídeos de parede celular de cogumelos do gênero *Pleurotus spp.* são escassos e nenhum estudo com o polissacarídeo de parede celular de *P. djamor* foi observado com essa finalidade.

O polissacarídeo de parede celular do cogumelo comestível *P. djamor* apresenta potencial farmacológico. Portanto, este trabalho visa otimizar a extração de polissacarídeo de *P. djamor*, bem como a caracterização deste polissacarídeo e a avaliação da sua atividade imunomoduladora a fim de demonstrar seu potencial terapêutico.

2 Materiais e Métodos

2.1 Condições de cultivo de *P. djamor* CCMB 366

A cepa de *P. djamor* CCMB 366 foi cedida pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB, Feira de Santana, Brasil). Para reativação do fungo foi realizado o inóculo em placa de petri contendo meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA) durante 7 dias à temperatura de 28°C (BOD SL200/90 Incubadora- SOLAB). O inóculo em meio líquido foi realizado utilizando frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio composto de: 10gL⁻¹ de glicose, 5 gL⁻¹ de peptona, 3gL⁻¹ de extrato de levedura e 3gL⁻¹ de extrato de malte. Cada erlenmeyer foi inoculado com três discos de ágar, com 1,5 cm de diâmetro cada, correspondendo à aproximadamente 10⁷ UFC de *P. djamor* CCMB 366. O cultivo submerso foi realizado a 150 rpm, 30°C e durante 5 dias em um agitador rotativo (Incubadora shaker SL 222, SOLAB). O meio líquido contendo a biomassa *P. djamor* CCMB 366 cultivado foi filtrado a vácuo (bomba de filtro de vácuo TE-0582, TECNAL). A biomassa fúngica seca obtida foi utilizada para a extração dos polissacarídeos de parede celular.

2.2 Planejamento experimental da extração de polissacarídeo da parede celular de *P. djamor* CCMB 366

Os polissacarídeos de parede celular foram obtidos a partir de um planejamento experimental em que foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio em diferentes concentrações, sob diferentes temperaturas e tempos de extração a partir da biomassa fúngica previamente seca em estufa à 50°C. O planejamento experimental Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960) foi aplicado para observar a influência das variáveis independentes: temperatura (°C), tempo de extração (minutos) e pH, na extração dos polissacarídeos de parede celular. Todas as variáveis foram estudadas em 3 níveis e foram realizadas três repetições do ponto central (C), totalizando 15 ensaios experimentais. Os pontos de temperatura avaliados foram 70, 80 e 90°C, o tempo em 60, 120 e 180 minutos e o pH foi de 11, 12 e 13 (VALASQUES et al., 2014). Para cada ensaio experimental foi utilizado 0,65g de biomassa fúngica seca e 32,5 mL de solução de hidróxido de sódio com pH, temperatura e tempo de extração correspondentes ao planejamento experimental. Posteriormente, a suspensão de cada ensaio foi centrifugada (Modelo 206 BL-EXCELSA) a 8.000 g durante 15 min. Ao sobrenadante foram adicionados etanol absoluto (três vezes o volume inicial), agitado e mantido por 12 horas a 4°C. A suspensão hidroalcoólica obtida contendo os polissacarídeos foi centrifugada a 8.000 g durante 15 min. O precipitado contendo o polissacarídeo foi preservado e o sobrenadante foi descartado. O polissacarídeo bruto foi seco a 50°C até peso constante (DONG et al., 2009). Como resultado, foi observado o rendimento em massa (gramas) da extração de polissacarídeo, para cada 0,65g de biomassa bruta, em cada um dos quinze ensaios. O teor de polissacarídeos foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

2.3 Caracterização química do polissacarídeo

2.3.1 Peso molecular médio (PM) e grau de polimerização (GP)

Através da medida do valor do açúcar redutor, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) e do valor de açúcar total, pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), foi possível determinar o Peso Molecular (PM) e Grau de Polimerização (GP) dos polissacarídeos de parede celular. Para a determinação foi aplicada a fórmula descrita por Vettori, Franchetti & Contiero (2012): $GP = [(\text{carboidratos totais em } \mu\text{g de D-glicose}) / (\text{valor de redução em } \mu\text{g de maltose})] \times 1.9$; $PM = [(GP) \times 162] + 18$.

2.3.2 Determinação da proteína total na amostra

A concentração de proteína total presente na amostra foi determinada a partir do método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.3.3 Análise de espectroscopia no infravermelho

O polissacarídeo foi caracterizado utilizando espectrômetro de Infravermelho (IR) com transformadas de Fourier (modelo Varian Inova 500). O polímero seco foi moído e pressionado em *pellets* para medição espectral FT-IR na faixa de frequência de 4000-500cm⁻¹, com 20 varreduras.

2.3.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A amostra foi diluída em água deuterada (D₂O) e transferida para um tubo de RMN que foi inserido em espectrômetro (Varian Inova 500) operando em 11,7 T. As análises foram realizadas observando o ¹H a 500 MHz e o ¹³C a 125 MHz e utilizando sonda de detecção direta. Os espectros foram registrados a 340 K. Foi empregado o Tetrametilsilano (TMS) como referência de desvio químico.

2.4 Bioensaio

2.4.1 Animais

Camundongos machos Balb-C (20-30g) foram mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia em ciclo claro-escuro (12 horas), a temperatura de 23±2°C, umidade relativa entre 30 e 70%, sendo permitido livre acesso à comida (Labina®, Purina) e água. Para realização dos experimentos em modelo animal, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, (Protocolo 077/2019). Os animais foram homogeneamente distribuídos entre os grupos controle positivo (6 animais), controle negativo (6 animais) e grupos teste (6 animais para cada dose). Todos os animais utilizados foram aclimatados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

2.4.2 Teste de Atividade Imunomoduladora

2.4.2.1 Isolamento de Macrófagos

Para a obtenção dos macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos, foram injetados 2 mL de tioglicolato 3% no peritônio dos animais para estimular a migração de macrófagos. Após 72h os camundongos foram eutanasiados e 5 mL de meio RPMI foram injetados na cavidade peritoneal. O local foi brevemente massageado e o fluido foi recolhido com uma seringa. Essa suspensão celular foi centrifugada em 1500 rpm durante 8 minutos, e descartou-se o sobrenadante. O pellet (células) foi lavado com meio RPMI, e novamente foi centrifugado e o sobrenadante descartado. A ressuspensão das células foi realizada em meio RPMI previamente suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e contendo ciprofloxacina 50 µg/mL. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer a fim de obter uma densidade de 10^6 células por poço em placas de cultura celular de 24 poços. As culturas foram colocadas em estufa de CO₂, a 37°C durante 3 horas para aderência dos macrófagos à placa. O meio de cultura foi retirado da placa e as células foram lavadas duas vezes para eliminar as não aderidas, como hemácias e linfócitos. Após a lavagem, adicionou-se um novo meio RPMI com 10% de SFB contendo antibiótico, e as placas de cultura foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, até o momento do uso.

2.4.2.2 Estimulação de macrófagos

As células foram tratadas com diferentes concentrações do polissacarídeo de parede celular *P. djamor* CCMB 366 (25, 50, 100, 200 µg/mL) ou com o estimulante lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, controle positivo sem a adição do polissacarídeo. No controle negativo as células foram tratadas com solução salina tampão fosfato (PBS). O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, por 24h.

2.4.2.3 Quantificação de citocinas por ELISA

A IL-1 α e TNF- α foram dosadas através de ensaio de imunofluorescência (ELISA) para detecção das citocinas, conforme protocolo do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, Estados Unidos da América). Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.5 Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado com auxílio do software Statistica® versão 7, incluindo a análise de variância (ANOVA). Todos os dados foram apresentados como média

± desvio padrão (SD) com base nos experimentos independentes. As comparações múltiplas foram realizadas no software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA) utilizando o teste paramétrico Anova, seguido pelo pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1. Delineamento experimental Box-Behnken para extração de polissacarídeos de parede celular de *P. djamor* CCMB 366

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é de uma técnica matemática e estatística que visa auxiliar no planejamento de experimentos, na construção dos modelos, na investigação da melhor condição de fatores para obtenção das respostas desejadas e na avaliação dos efeitos desses fatores (BOX; BEHNKEN, 1960). O tipo de delineamento de Box-Behnken, que foi aplicado neste estudo, possui enquanto vantagem, a redução do número de ensaios em um estudo com um maior número de fatores. Apesar dessa vantagem este tipo de planejamento apresenta a desvantagem de não testar condições experimentais extremas (NOVAES et al., 2017).

O delineamento experimental Box-Behnken foi aplicado para ajustar uma superfície de resposta aos dados obtidos. A triplicata do ponto central permitiu a estimativa do erro puro e os tratamentos experimentais foram variados aleatoriamente para detectar a presença de possíveis erros sistemáticos, totalizando quinze ensaios experimentais. A variação do rendimento em massa de polissacarídeo do *P. djamor* CCMB 366 obtida a partir de 0,65g de biomassa bruta, sob diferentes condições de extração (pH, temperatura e tempo de extração) está apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Planejamento Box-Behnken aplicado na otimização da extração de polissacarídeo de *P. djamor* CCMB 366.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Rendimento observado (g)	Rendimento predito (g)
1	11 (-1)	90 (+1)	120(0)	0,0013	0,001300
2	12 (0)	90 (+1)	60(-1)	0,0019	0,001344
3	12 (0)	90 (+1)	180(+1)	0,0031	0,002919
4	13 (+1)	90 (+1)	120(0)	0,0068	0,007538
5	11 (-1)	80 (0)	60(-1)	0,0005	0,001056
6	11 (-1)	80 (0)	180(+1)	0,0004	0,000581
7C	12 (0)	80 (0)	120(0)	0,0005	0,001100
8C	12 (0)	80 (0)	120(0)	0,0005	0,001100
9C	12 (0)	80 (0)	120(0)	0,0023	0,001100
10	13 (+1)	80 (0)	60(-1)	0,0066	0,006419
11	13 (+1)	80 (0)	180(+1)	0,0096	0,009044
12	11 (-1)	70 (-1)	120(0)	0,0001	0,000000
13	12 (0)	70 (-1)	60(-1)	0,0004	0,000581
14	12 (0)	70 (-1)	180(+1)	0,0006	0,001156
15	13 (+1)	70 (-1)	120(0)	0,0041	0,001300

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

O contraste entre os rendimentos observados e preditos, demonstram que a variância residual é suficientemente pequena com o modelo aplicado (**Figura 1**).

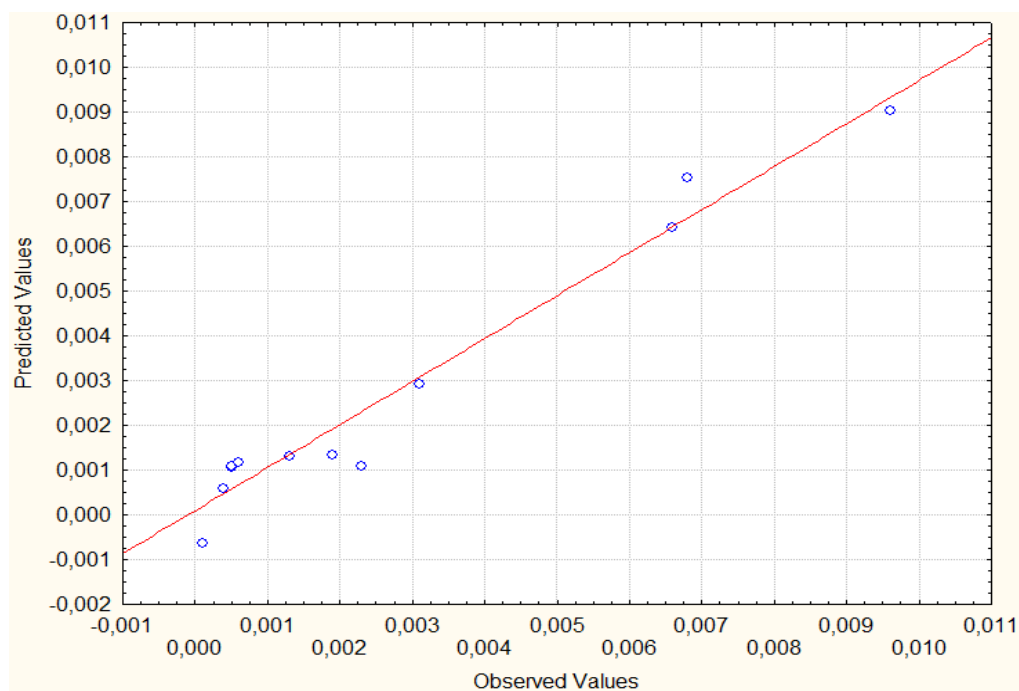


Figura 1. Relação entre valores observados e valores preditos obtidos na otimização da extração de polissacarídeo de *P. djamor* CCMB 366.

Nota-se que os pontos (**Figura 1**) encontram-se localizados próximos e ao longo de uma reta de tendência, o que indica que os componentes de erro do modelo proposto seguem uma distribuição normal para a resposta rendimento(g), sendo assim, o modelo apresentou baixo erro experimental.

A partir dos rendimentos encontrados no conjunto de dados experimentais foi possível realizar a análise de variância (ANOVA) descrita na Tabela 2. A ANOVA é uma ferramenta que permite a avaliação da significância da regressão usada e a qualidade de seu ajuste às respostas.

Tabela 2. Análise de variâncias no modelo de regressão para otimização de polissacarídeos obtidos do *P. djamor* CCMB 366.

Fonte de variação	SQ	GI	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	0,000114	9	1,26574E-05	9,520413	4,7724	0,945
Resíduo	0,000007	5	1,3295E-06			
Falta de ajuste	0,000004	3	0,000001	1,385031	19,1642	
Puro erro	0,000002	2	0,000001			
SQ total	0,000121	14				

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

Através da distribuição de Fisher (teste F) e pelo coeficiente de determinação R², a adequação do modelo foi verificada. A análise de variância indicou que este modelo está bem ajustado, não apresentando falta de ajuste ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$), com isso, os resultados obtidos não são de ordem aleatória. O teste F para regressão se mostrou significativo com um $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O R² obtido foi equivalente a 0,94, o que significa que 94% dos resultados encontrados podem ser explicados pelo modelo experimental que foi aplicado.

Os dados obtidos indicam que o tratamento estatístico foi representativo e que os resultados obtidos são confiáveis. Sendo assim, as condições otimizadas podem ser aplicadas para extração de polissacarídeos de *P. djamor* CCMB 366 em maior escala.

Os gráficos (**Figuras 2 e 3**) construídos relacionam as variáveis estudadas e seus respectivos rendimentos (**Tabela 1**). Assim, as condições ideais para obtenção de polissacarídeo de parede celular deste fungo, a partir do modelo estudado, tendenciam para valores de 13, 90°C e 180 minutos para pH, temperatura e tempo de extração, respectivamente.

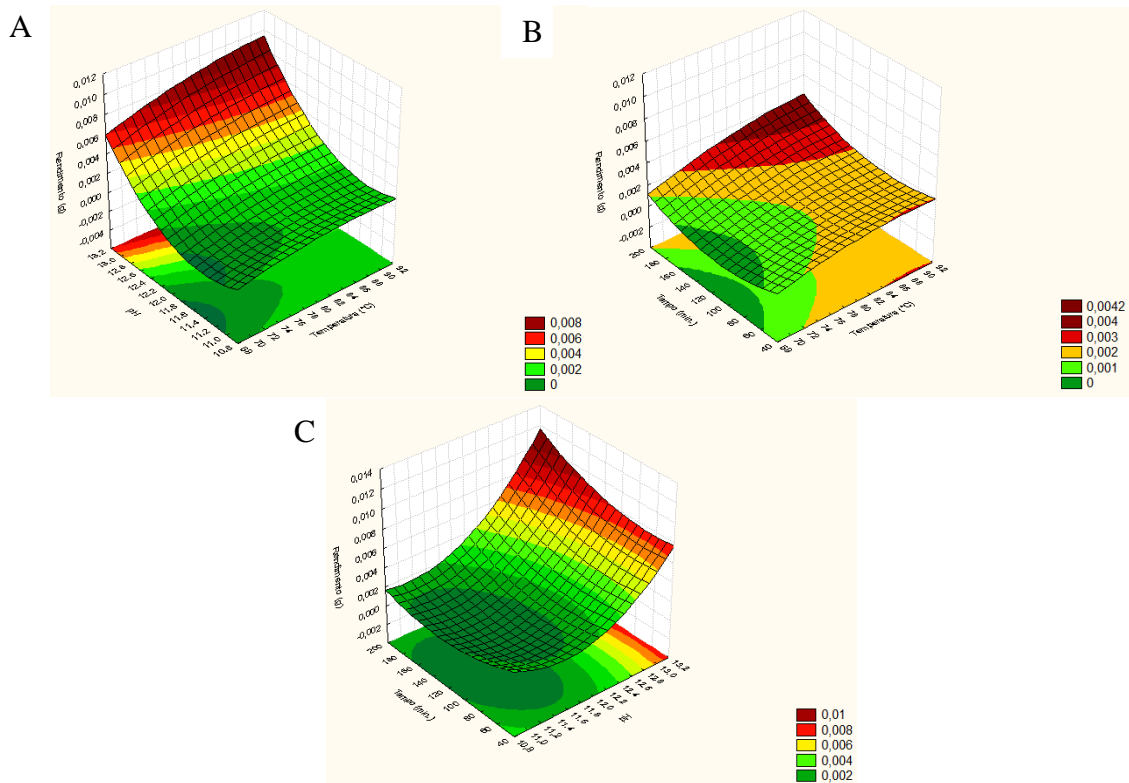


Figura 2. Gráficos de superfície de resposta da otimização da extração de polissacarídeos de *P. djamor* CCMB 366. (A): pH e Temperatura. (B): Tempo e Temperatura. (C): Tempo e pH.

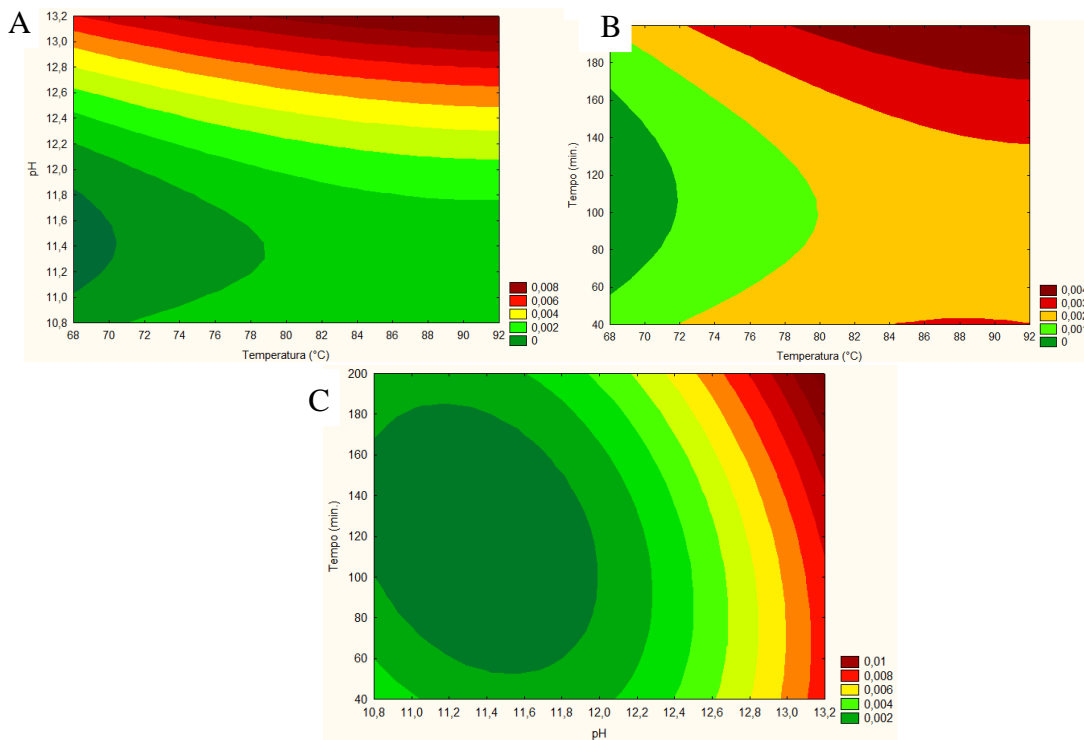


Figura 3. Gráficos de contorno da otimização da extração de polissacarídeos de parede celular de *P. djamor* CCMB 366. (A): pH e Temperatura, (B) Tempo e Temperatura e (C) Tempo e pH.

A partir da análise das **Figuras 2 e 3** infere-se que o pH é a variável que mais influencia no rendimento dos polissacarídeos extraídos da parede celular de *P. djamor* CCMB 366. Na região experimental, o pH 13 foi o que mais influenciou na resposta. A extração alcalina causa a destruição da parede celular do fungo facilitando a liberação do polissacarídeo durante o processo (LEONG; YANG; CHANG, 2021).

A equação que descreve o comportamento da resposta do polissacarídeo extraído de *P. djamor* CCMB 366 em função das variáveis está descrita na **Equação 1**.

$$\text{Massa do Polissacarídeo (g)} = 0,00110 + 0,00620\text{pH} + 0,00475\text{pH}^2 + 0,00198\text{T} - 0,00080\text{T}^2 + 0,00108\text{t} + 0,00160\text{t}^2 + 0,00075(\text{pH})(\text{T}) + 0,00155(\text{pH})(\text{t}) + 0,0005(\text{T})(\text{t}) \text{ (Equação 1)}$$

(T): Temperatura (°C) (t): Tempo (horas)

As variáveis pH, temperatura e tempo de extração são utilizadas com base nos procedimentos utilizados na extração de polissacarídeo e foram aplicadas em outros experimentos que visavam a otimização da extração de polissacarídeos fúngicos (LIU et al., 2018; VALASQUES et al., 2014). A obtenção do polissacarídeo de parede celular de *P. djamor* CCMB 366 utilizado para os demais experimentos, foi realizada utilizando os valores ótimos encontrados para as variáveis estudadas (pH, temperatura e tempo de extração). O rendimento máximo observado, utilizando as condições otimizadas, foi equivalente a 7.93%.

3.2 Peso molecular médio (PM) e grau de polimerização (GP)

Através dos resultados de açúcares totais e redutores da amostra foi possível determinar que os valores para peso molecular e o grau de polimerização do polissacarídeo de parede celular estudado correspondem à $14,9 \times 10^4$ Da e 919, respectivamente.

3.3 Determinação da concentração de proteínas

A análise pelo método de Bradford (1976) para teor de proteína total demonstrou que a amostra do polissacarídeo consistiu em 0,45% de proteína, indicando assim que é composta predominantemente por polissacarídeo.

3.4 Caracterização do polissacarídeo obtido de *P. djamor* CCMB 366

3.4.1 Análise de espectroscopia no infravermelho

Os principais grupos funcionais do polissacarídeo foram identificados por espectroscopia FT-IR e estão apresentadas na **Figura 4**.

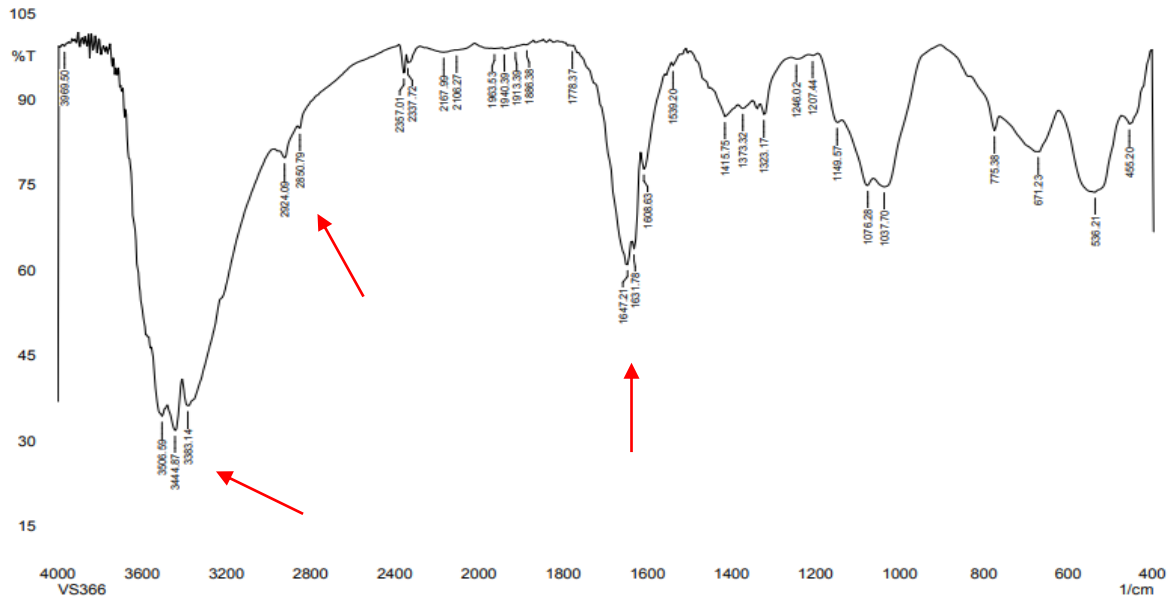


Figura 4. Espectro FT-IR de polissacarídeo obtido da parede celular de *P. djamor* CCMB 366.

Os sinais entre $2500\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ e $900\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ são bandas de absorção característicos de polissacarídeos (LI et al., 2021c). A banda larga forte e característica em torno de 3444 cm^{-1} está relacionada às vibrações O-H (estiramento) (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021b). A banda em em torno de 2924 cm^{-1} está associado à vibração da ligação simples C-H (estiramento) (LI et al., 2021b). A banda observada em torno de 1647 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento assimétrico da ligação C-O (WANG et al., 2021). As bandas na região entre $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas às vibrações de ângulo variável de C-H ou às vibrações de estiramento simétrico de C-O em $-\text{COO}$ (LI et al., 2021c). Os sinais entre 1200 e 1000 cm^{-1} são devido às vibrações C-OH ou C-O-C (estiramento). As bandas entre $700\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ podem estar relacionados à vibração do grupo hidroxil envolvido em uma ligação de hidrogênio (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021a).

3.4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise por RMN foi empregada no auxílio da caracterização estrutural de polissacarídeos. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do polissacarídeo de parede celular de *P. djamor* CCMB 366 estão apresentados na **Figura 5**.

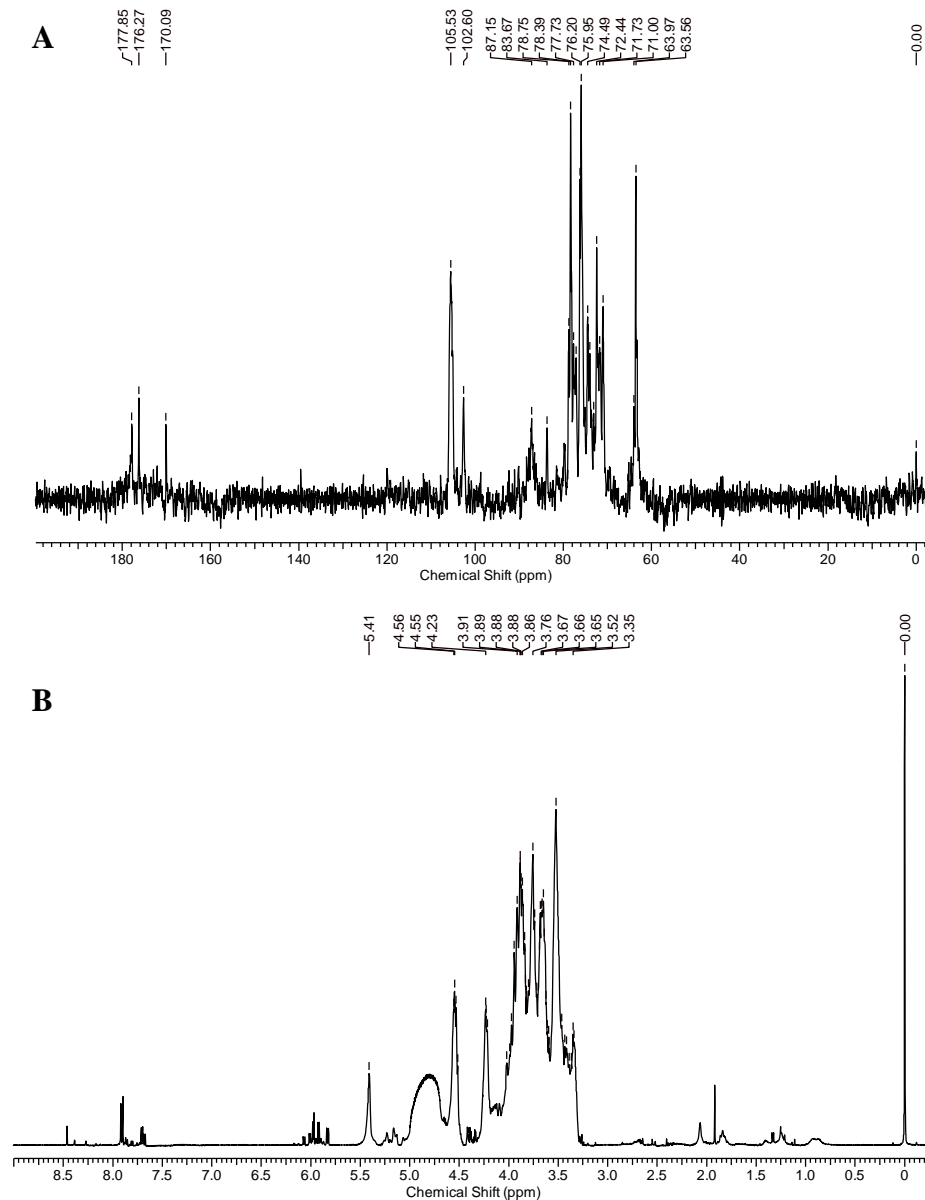


Figura 5. Espectro de RMN de polissacarídeo isolado de *Pleurotus djamor* CCMB 366 (A) RMN ^{13}C . (B) RMN ^1H

Os sinais químicos presentes no espectro da **Figura 5A** apresentam características de polissacarídeos. Os deslocamentos $\delta\text{C}105\text{ppm}$ e $\delta\text{C}102\text{ppm}$ são característicos de ligações β de carbonos anoméricos, sugerindo assim a presença de, pelo menos, 2 carbonos anoméricos no polissacarídeo isolado. Os deslocamentos em 87ppm e 83ppm são sugestivos de ligação

em carbono 3. Portanto, é possível que existam 2 monossacarídeos de ligação do tipo β -(1 \rightarrow 3). Os deslocamentos δ C 78,7 / 78,3ppm, δ C 77,7 / 76,2ppm, δ C 72,44 / 71,7ppm e δ C 63,9 / 63,5ppm, podem ser atribuídos aos C-2, C-4, C-5 e C6 dos monossacarídeos que compõem o polissacarídeo isolado de *Pleurotus djamor* CCMB 366. Em contrapartida, a análise do espectro de ^1H (**Figura 5B**) permite identificar um intenso sinal em δ H 5,4ppm, que pode ser atribuído à sobreposição dos sinais dos hidrogênios anoméricos ligados aos carbonos em δ C 105 e δ C 102ppm. Enquanto que, sinais entre δ H 3,35 e δ H 4,56 correspondem aos hidrogênios H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6.

Em estudo realizado por Maity et al. (2019) foi obtido um polissacarídeo (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano também de *P. djamor*, ao qual foi avaliada sua capacidade antitumoral através do efeito citotóxico específico, contra células PA1 de carcinoma de ovário, destruindo quase todas as células PA1 e com atividade antiproliferativa significativa.

3.5 Atividade Imunomoduladora

Imunomoduladores são utilizados para estimulação, supressão e modulação de todas as características do sistema imunológico através das imunidades inata e adaptativa (SINDHU et al., 2021). Uma das maneiras de avaliar o potencial imunomodulador de uma substância é através da sua capacidade de ativar macrófagos a partir da secreção de citocinas. Os resultados da quantificação das citocinas IL-1 α e TNF- α dosadas através de ensaio de ELISA, após tratamento de macrófagos murinos com polissacarídeos de parede celular de *P. djamor* CCMB 366, estão apresentados a seguir na **Figura 6**.

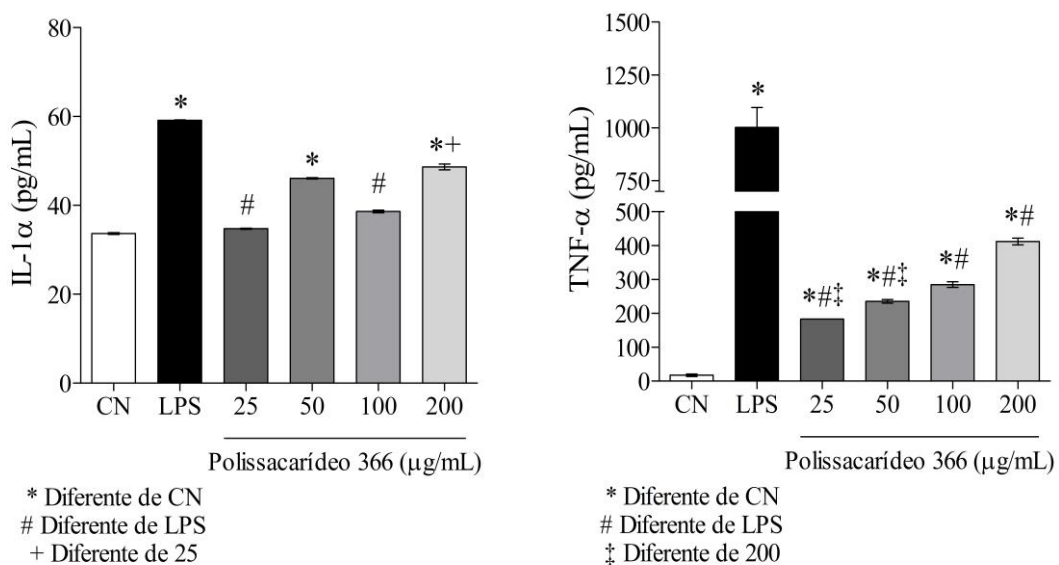


Figura 6. Secreção das citocinas IL-1 α e TNF- α foram examinadas usando o ensaio ELISA. O LPS foi utilizado como controle positivo e solução salina tampão fosfato (PBS) como controle negativo.

A partir da observação dos resultados, a ativação dos macrófagos com secreção de TNF- α ocorreu de maneira dose-dependente do polissacarídeo utilizado. Enquanto a secreção de IL-1 α pelos macrófagos foi mais expressiva quando o tratamento foi realizado na maior concentração de polissacarídeo (200 μ g/mL).

A literatura relata que os polissacarídeos de cogumelos são reconhecidos pelo sistema imunológico inato dos animais como moléculas estranhas. Sendo assim, os polissacarídeos são considerados padrões moleculares associados a patógenos clássicos, estimulando o sistema imunológico e conseqüentemente facilitando o reconhecimento e a resposta à um patógeno invasor (JANEWAY, 1992). Portanto, os polissacarídeos exercem uma função imurreguladora ao invés de uma ativação imune, ou seja, a interação com os receptores correspondentes nas células imunes humanas atua como um possível mecanismo de estimulação do sistema imunológico (KHAN et al., 2018).

Os macrófagos desempenham papel importante como uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunológico (YIN et al., 2021b). Quando ativados, os macrófagos são capazes de fagocitar e neutralizar substâncias estranhas, microrganismos invasores e células cancerosas através do aumento da liberação de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e citocinas (YAN et al., 2019). As citocinas TNF- α e IL-1 α são mediadores pró-inflamatórios muito importantes que estão relacionados com a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios (YADAV; NEGI, 2021).

Os resultados obtidos na **Figura 6** demonstram que o polissacarídeo de parede celular de *P. djamor* CCMB 366 possui a capacidade de ativar macrófagos com a secreção das citocinas pró-inflamatórias de maneira discreta. Assim, há um potencial de estimulação do sistema imunológico sem que haja uma resposta imune exarcebada. Estes resultados demonstram que a utilização deste polissacarídeo regularmente enquanto nutracêutico possui potencial de prevenção de patologias ao reforçar o sistema imune (KHAN et al., 2018).

A secreção de IL-10 também foi avaliada, porém não ocorreu secreção em nenhuma concentração de polissacarídeo adicionada. A citocina IL-10, entretanto, é anti-inflamatória e imunossupressora, age inibindo a ação de outras citocinas (SINDHU et al., 2021).

A atividade imunomoduladora dos polissacarídeos ocorre quando estes se ligam aos receptores da membrana celular para desencadear eventos intracelulares e, conseqüentemente, uma resposta imune (YIN et al., 2021b). Na ativação dos macrófagos os receptores Toll-like (TLRs) são os principais canais de sinalização envolvidos, incluindo a via do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Estudos

demonstraram que polissacarídeos naturais podem ativar macrófagos por meio da ligação ao receptor TLR2 (RODRIGUES BARBOSA et al., 2020). Porém, são necessários mais estudos para definir a via a qual o polissacarídeo de parede celular de *P. djamor* CCMB 366 utiliza para ativação dos macrófagos.

Nworu et al. (2015) estudaram a atividade imunomoduladora do extrato rico em β -D-glucana do cogumelo *Pleurotus tuberregium*. A produção de TNF- α por células RAW264.7 tratadas com o extrato polissacarídico de *P. tuberregium*, na maior concentração (100 μ g/mL), foi em torno de 2000 pg/mL. Nessa mesma concentração o polissacarídeo de *P. djamor* estimulou a produção de TNF- α em torno de 300 pg/mL, de maneira mais discreta. Porém no estudo de Nworu et al. (2015) foi utilizado o extrato polissacarídico, o que pode estar influenciando no resultado observado.

Em estudo realizado por Yan et al., (2019), um heterogalactano 3-O-metilado obtido dos corpos de frutificação de *Pleurotus eryngii* demonstrou ativar macrófagos aumentando a produção de NO, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , bem como aumento da captação fagocitária. No nível molecular, a ativação de macrófagos ocorreu através das vias de sinalização MAPK e NF- κ B usando o receptor TLR2.

4 Conclusão

Neste estudo, foi obtido um polissacarídeo do tipo β -(1 \rightarrow 3) da parede celular de *P. djamor* CCMB 366, com peso molecular e o grau de polimerização correspondentes à 14,9 x 10⁴ Da e 919, respectivamente, e apresentando 0,45% de proteína.

A MSR foi empregada através do delineamento de Box-Behnken que se mostrou uma ferramenta bem sucedida para otimizar a extração do polissacarídeo de *P. djamor*. O rendimento máximo observado, utilizando as condições otimizadas, foi equivalente a 7,93%, sob as variáveis de pH 13, temperatura de 90°C e 180 minutos de tempo extração.

Nos estudos com macrófagos murinos, após tratamento com polissacarídeos de parede celular de *P. djamor* CCMB 366, a ativação dos macrófagos aumentou a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 α . Os resultados sugerem que o polissacarídeo estudado possui um efeito imunoestimulante, embora mais estudos sejam necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

CAPÍTULO III

Potencial hipoglicemiante, antinociceptiva e imunomoduladora do polissacarídeo de parede celular de *Aspergillus niger* ATCC 1004

Revista: Carbohydrate Polymers

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

Potencial hipoglicemiante, antinociceptiva e imunomoduladora de (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano de parede celular de *Aspergillus niger* ATCC 1004

Tátilla Putumujú Santana Mendes¹, Pâmala Évelin Pires Cedro¹, Alana Caise dos Anjos Miranda¹, Lorena Lôbo Brito Morbeck², Gildomar Lima Valasques Junior¹

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

² Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Rio de Contas, Vitória da Conquista 45029-094, BA, Brazil

RESUMO

Os polissacarídeos de origem fúngica são metabólitos primários que possuem potencial para fins terapêuticos. Diversos estudos vêm sendo realizados nos últimos anos visando explorar esse potencial farmacológico. Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo avaliar as atividades hipoglicemiante, antinociceptiva e imunomoduladora do (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano isolado da parede celular do *Aspergillus niger* ATCC 1004. Os resultados demonstraram que o polissacarídeo apresentou a capacidade de inibir a enzima α-amilase de maneira dose dependente, em que, na maior concentração estudada, houve 53,7% de inibição. O resultado para o teste antinociceptivo utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, demonstrou redução dose dependente significativa das respostas nociceptivas a estímulos inflamatórios induzidos por ácido acético. A resposta antinociceptiva do polissacarídeo isolado da parede celular do *A. niger* ATCC 1004 foi superior ao controle positivo em todas as doses estudadas. A ativação dos macrófagos murinos com consequente secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α demonstra o potencial de imunoestimulação induzida pelo polissacarídeo estudado. Sendo assim, o (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano isolado de parede celular de *A. Niger* ATCC 1004 demonstrou ser promissor quanto ao potencial hipoglicemiante e imunomodulador *in vitro*, como também, ao potencial antinociceptivo *in vivo*.

Palavras-chave: Polissacarídeo. Imunomodulador. Hipoglicemiante. Antinocicepção.

1 Introdução

Os fungos são os organismos mais abundantes do planeta (LI et al., 2021d). Conhecidos desde os tempos antigos, os fungos eram usados como fermentadores e como alimentos. Diversas pesquisas micológicas demonstram diferentes aplicações a partir da utilização de seus metabólitos primários e secundários (LIM et al., 2020).

Os metabólitos obtidos dos fungos são diversos, como ácidos orgânicos, alcalóides, terpenóides, esteróides, enzimas e polissacarídeos. A utilização destes metabólitos contempla uma ampla variedade de indústrias, incluindo cosméticas, alimentos e farmacêuticas (VIEIRA GOMES et al., 2019). A produção de metabólitos primários e secundários derivados de fungos pode ser ampliada para escala industrial com custos de produção relativamente baixos em comparação com o desenvolvimento de drogas sintéticas (TAKAHASHI et al., 2021).

Os polissacarídeos, obtidos a partir do metabolismo primário dos fungos, são carboidratos de relativa complexidade. São considerados como os primeiros biopolímeros a serem formados na Terra (MAITY et al., 2021b) e são a substância biótica mais abundante presente na biosfera (SINDHU et al., 2021). Os polissacarídeos apresentam diferenças estruturais características que são importantes para as aplicações e respostas biológicas que apresentam (GUNASEKARAN; GOVINDAN; RAMANI, 2021a). Distintas atividades biológicas são atribuídas aos polissacarídeos obtidos de fungos, como antioxidante (MAITY et al., 2021a), antitumoral (WANG et al., 2021), antinociceptiva (ABREU et al., 2019), hipoglicemiante (CAO et al., 2020) e imunomoduladora (LIU et al., 2020).

O *Aspergillus niger* é um fungo conhecido por infectar humanos e plantas (DESVITA et al., 2022). No entanto, fungos do gênero *Aspergillus* integram um grupo de microrganismos industrialmente importante. O *Aspergillus niger* possui metabólitos reconhecidos como seguros nas indústrias alimentícia e farmacêutica (GERMEC; TURHAN, 2020). Diversos estudos são realizados com o *A. niger* valendo-se do seu potencial biotecnológico (BAI et al., 2022; JIANG et al., 2022; PRIYANKA; LENS, 2022). No entanto, a maioria dos trabalhos correlacionam a utilização do *A. niger* para produção de enzimas, havendo carência de estudos com polissacarídeos de parede celular deste fungo. A descoberta de novas substâncias naturais com potencial farmacológico e com menores efeitos indesejáveis quando comparados aos sintéticos impulsionam novos estudos (DE SOUZA SAMPAIO et al., 2020; MAZUMDER et al., 2021; SINDHU et al., 2021).

Este trabalho visou avaliar as atividades hipoglicemiante a partir da inibição da enzima α -amilase, antinociceptiva com o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e a atividade imunomoduladora a partir da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e TNF- α após tratamento de macrófagos murinos com (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* ATCC 1004.

2 Materiais e métodos

2.1 Microrganismo

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

2.2 Condições de cultivo de *A. niger*

O fungo foi incubado em um meio de cultura de BDA para ativação durante 5 dias a 30°C (BOD SL200 / 90 Incubadora - SOLAB). Para o cultivo, o inóculo foi realizado em meio líquido utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultura pH 5 contendo: 10 g/L de D-glicose, 3 g/L de extrato de levedura em pó, 3 g/L de extrato de malte e 5g/L de peptona, seguindo a metodologia descrita por Manera et al. (2011) com modificações. Para o inóculo foram utilizados três discos de ágar, com 1,5 cm de diâmetro cada, correspondendo à aproximadamente 10^7 UFC contendo o microrganismo. O cultivo submerso foi realizado a 150 rpm por 120 horas e temperatura de 30°C em agitador rotativo (Incubadora shaker SL 222, SOLAB). Após o cultivo, o meio de cultura líquido inoculado foi filtrado a vácuo (bomba de filtro de vácuo TE-0582, TECNAL), e a biomassa do microrganismo foi seca em estufa à 50°C e seguida da extração do polissacarídeo (Dong et al., 2009).

2.3 Extração de polissacarídeo de *A. niger*

A extração alcalina ocorreu utilizando 50mL de hidróxido de sódio pH 13 (0,1M) para cada 1g de biomassa seca triturada de *A. niger*, à 90°C e durante 180 minutos (MENDES et al., 2023). A suspensão foi centrifugada (Modelo 206BL-EXCELSA) a 8.000 g durante 15 min. O precipitado foi descartado e adicionou-se ao sobrenadante três vezes o volume de etanol absoluto, deixando-o por 12 horas à 4°C. O polissacarídeo precipitado foi isolado através de uma centrifugação a 8.000g durante 15 min. O precipitado de polissacarídeos foi liofilizado.

2.5 Atividades biológicas

2.5.1 Avaliação da capacidade inibitória da α -amilase

A atividade inibitória da α -amilase foi estimada de acordo ao método descrito por Chen et al., (2013). O volume de 0,1 mL de solução pancreática de α -amilase suína (2 mg/mL) em tampão citrato-fosfato (2 mg/mL, pH 6) foi adicionado a 0,1 mL de solução de polissacarídeo em diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 e 2,0 mg/mL) e, em seguida, foi incluído 0,1 mL de solução de amido (1,0 mg/mL). Posteriormente, a mistura reacional foi incubada a 50°C por 10 min. O processo reacional foi interrompido por acréscimo de 0,2 mL de reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) e, consecutivamente, foi colocado em banho-maria a 100°C por 5 minutos. A mistura reacional foi diluída pela adição de 2 mL de água destilada e a absorbância foi medida em 540 nm. A acarbose foi utilizada como controle positivo.

2.5.2 Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos Balb-C machos, pesando entre 20-30g. Os animais permaneceram em ambiente climatizado, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro), com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e livre acesso à água e comida. A realização dos experimentos em modelo animal, obteve a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, (protocolo 077/2019). Os camundongos foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e ambientados ao laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. O número de animais e a intensidade dos estímulos realizados foram os mínimos necessários para confiabilidade dos tratamentos estudados.

2.5.3 Atividade Antinociceptiva

2.5.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% (Sigma-Aldrich®), pela via intraperitoneal (i.p.) (0,1 mL/10g), de acordo com procedimentos previamente descritos por Koster, Anderson & Beer (1959) e Vacher, Duchêne-Marullaz & Barrat (1964). Os animais (n=06) foram pré-tratados com polissacarídeo nas concentrações de 30 e 60mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.), os controles (C+) Indometacina (10mg/kg) e (C-) diluente de água destilada foram administrados via oral (v.o.).

Após 30 minutos da amostra de polissacarídeos, (C-) diluente de água destilada e de 01 hora da (C+) Indometacina, os animais foram colocados em caixas separadas e receberam uma injeção de ácido acético 0,6% (Sigma-Aldrich®), pela via intraperitoneal (0,1 mL/10g). Iniciando o teste com as contagens durante 20 minutos das contorções da parede abdominal, seguidas de contorções do tronco e extensão dos membros posteriores como indicativo de nocicepção.

2.5.4 Imunomoduladora

2.5.4.1 Isolamento de Macrófagos

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos após injeção de 2 mL de tioglicolato 3% no peritônio dos animais para estimular a migração de macrófagos. Os camundongos foram eutanasiados após 72h. Foram injetados 5 mL de meio RPMI na cavidade peritoneal dos animais. O local foi massageado e o fluído foi extraído com auxílio de uma seringa. A suspensão celular foi centrifugada em 1500 rpm durante 8 minutos, e descartou-se o sobrenadante. O pellet de células foi lavado com meio RPMI, centrifugado e o sobrenadante foi novamente descartado. A ressuspensão das células foi executada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e contendo ciprofloxacina 50 µg/mL. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer para obtenção de densidade de 10^6 células por poço em placas de cultura celular de 24 poços. As culturas foram colocadas em estufa de CO₂, a 37°C durante 3 horas com o objetivo de que ocorresse a aderência dos macrófagos à placa. O meio de cultura foi retirado da placa e as células foram lavadas duas vezes para eliminar as células não aderidas (hemácias e linfócitos). Após a lavagem, adicionou-se um novo meio RPMI com 10% de SFB contendo antibiótico, e as placas de cultura foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, até o momento do experimento.

2.5.4.2 Estimulação de macrófagos

Diferentes concentrações do polissacarídeo de parede celular *A. niger* ATCC 1004 (25, 50, 100, 200 µg/mL) foram adicionadas às células isoladas. O controle positivo foram as células tratadas apenas com o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sem adição do polissacarídeo. No controle negativo, as células foram tratadas com solução salina tampão fosfato (PBS). O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, por 24h.

2.5.4.3 Quantificação de citocinas por ELISA

As dosagens das citocinas IL-1 α e TNF- α foram realizadas através de ensaio de imunofluorescência (ELISA) conforme protocolo do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, Estados Unidos da América). Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.6 Análise estatística

Os dados foram expostos como média \pm desvio padrão (SD) com base nos experimentos independentes. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas por ANOVA e com pós-teste de Tukey. Nos testes com animais, foram utilizados seis animais por grupo. Para todas as análises foi usado o programa GraphPad Prism® versão 5.00. Valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA One-Way, seguida do teste de múltipla comparação Bonferroni.

3 Resultados e Discussão

O polissacarídeo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizado apresenta peso molecular de 375×10^7 Da, grau de polimerização de 23 e teor total de proteínas de 1% conforme demonstrado em estudo de caracterização realizado (MENDES et al., 2023).

3.1 Avaliação da capacidade inibitória da α -amilase

Os efeitos inibitórios do (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* e da acarbose sobre a enzima α -amilase foram comparadas e os resultados são mostrados na **Fig. 1**.

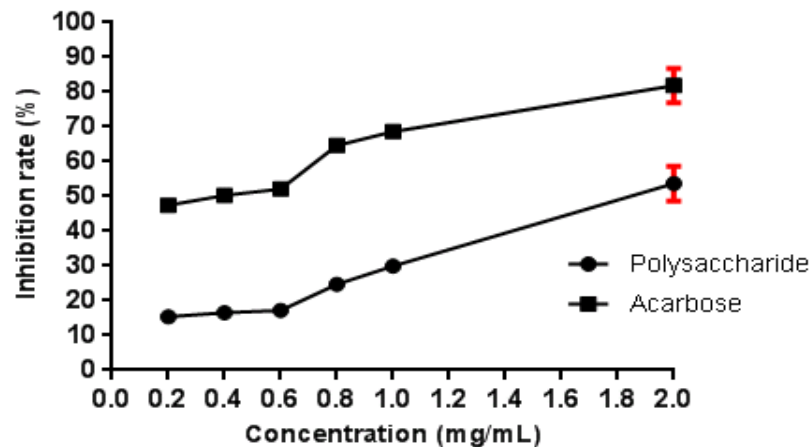


Fig.1. Capacidade de inibição da enzima α -amilase pelo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger*.

O resultado observado demonstrou que a inibição da enzima é dose dependente, em que 53,7% de inibição foi observado na maior concentração do polissacarídeo (2mg/mL). A acarbose na mesma concentração apresentou atividade de inibição da α -amilase de 81,8%.

Os carboidratos presentes no alimento são inicialmente fragmentado em oligossacarídeos pela enzima α -amilase secretada pelas glândulas salivares e pelo pâncreas, posteriormente estes são reduzidos à monossacarídeos pela α -glicosidase secretada pelo intestino delgado (STOJKOVIC et al., 2019). Os fragmentos de glicose resultantes são absorvidos e aumentam os níveis de açúcar no sangue. Inibir a ação das enzimas digestivas pode retardar o aumento do açúcar no sangue e contribuir no controle do desenvolvimento do diabetes (LI et al., 2021c). Sendo assim, os inibidores naturais da enzima α -amilase possuem potencial de ação hipoglicêmico de interesse terapêutico (YADAV; NEGI, 2021).

Wang et al., (2018b) avaliaram a capacidade inibitória da α -amilase pelo exopolissacarídeo de *Lachnum sp.* fungo filamentoso antes de uma modificação química, demonstrando inibição de cerca de 55% a 5 mg/mL. Portanto, o (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* demonstrou potencial hipoglicêmico através da inibição da enzima α -amilase.

3.2 Avaliação da capacidade antinociceptiva

Os dados obtidos a partir do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, ilustrando a atividade antinociceptiva periférica do polissacarídeo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano é apresentado na **Figura 2**.

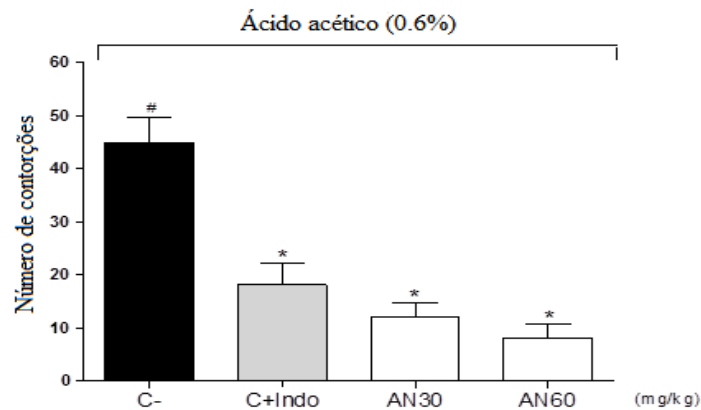


Fig. 2. Avaliação da administração intraperitoneal de (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos (n= 06). Os animais foram pré-tratados, de acordo os grupos com as amostras de polissacarídeos (30 e 60mg/kg), (C+) Indometacina (10mg/kg) e Controle (C-) diluente de água destilada. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA One-Way, seguida do teste de múltipla comparação Bonferroni. As variações diferem respectivamente de forma significativa onde: (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo Controle (C-) aos demais grupos e (#) quando comparado grupo Controle (C+) aos demais grupos.

O grupo controle negativo (C-), que recebeu apenas solução salina 0,9%, apresentou o maior número de contorções. A inibição de contorções foi dependente da dose, em que o número de contorções foi reduzido na dose mais alta de 60 mg/kg de polissacarídeo. A resposta de inibição do número de contorções, por consequente analgesia, com o uso do polissacarídeo, foi superior a obtida com a utilização do fármaco padrão indometacina, embora não tenha sido estatisticamente significativo, havendo apenas uma diminuição na média de contorções observadas. Estes resultados demonstram o potencial antinociceptivo do (1→3)(1→6)-β-D-glucogalactano de parede celular de *A. niger*.

Através do teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em animais, há a indução nociceptiva química, que possibilita avaliar os analgésicos periféricos na nocicepção visceral e inflamatória (FRANÇA et al., 2001). A resposta inflamatória localizada é iniciada através da via de biossíntese de prostaglandinas que resulta na sensação de dor e leva ao resultado comportamental como contorções ou constrição (MAZUMDER et al., 2021). Em animais, além das prostaglandina, também há o aumento de serotonina, histamina, bradicinina e outros reguladores inflamatórios (GAO et al., 2021). Desta maneira, quanto menor o número de contorções abdominais, maior a atividade antinociceptiva do polissacarídeo testado.

O processamento da dor é um mecanismo complexo que envolve a interação de estruturas periféricas e centrais, além de diferentes vias modulatórias (GAO et al., 2021). Com o avanço da biologia molecular e os conhecimentos mais aprofundados relativos aos mecanismos moleculares da fisiopatologia da dor, substâncias analgésicas mais eficazes têm sido descobertas. Nessa perspectiva, estudos são desenvolvidos visando a identificação de alvos envolvidos na transmissão nociceptiva, principalmente receptores, enzimas, canais iônicos, sistemas de transporte e da modulação da liberação de neuromediadores (GASPARINI; SUTHERLAND; GRIFFITHS, 2013).

Em estudo utilizando um (1→3)- β -D-glucano de *Rhodotorula mucilaginosa* foi avaliada a atividade antinociceptiva por meio de diferentes testes experimentais. Os resultados demonstraram que na dose de 30 mg/kg houve inibição significativa da resposta de contorção induzida pelo ácido acético, demonstrando o potencial antinociceptivo deste polissacarídeo (VALASQUES et al., 2014).

3.3 Avaliação da capacidade imunomoduladora

Os níveis de secreção de IL-1 α e TNF- α , após tratamento de macrófagos murinos com (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* foram quantificados e utilizados para avaliar a atividade imunomoduladora deste polissacarídeo (**Figura 3**).

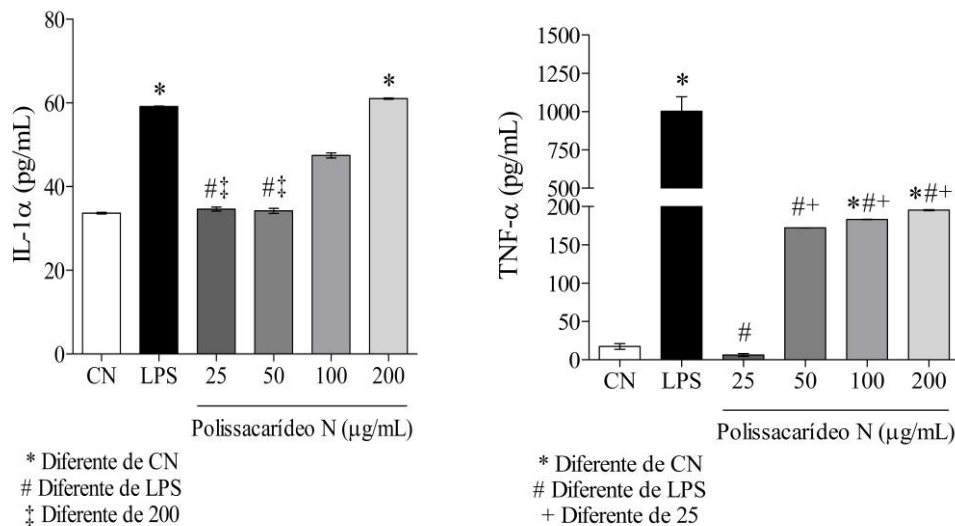


Fig. 3. As citocinas IL-1 α e TNF- α secretadas por macrófagos estimulados com (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* ATCC 1004 foram examinadas usando o ensaio ELISA. O LPS foi utilizado como controle positivo e PBS como controle negativo.

Os resultados evidenciaram dose-dependência, sendo que, na maior concentração de (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano (200 μ g/mL) houve efeito significativo do aumento da

secreção tanto de IL-1 α quanto de TNF- α quando comparados ao controle negativo. Sendo assim, o (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* estudado, demonstrou potencial imunoestimulatório pró-inflamatório.

Os macrófagos são importantes na defesa imune inata do organismo. Quando ativados, os macrófagos podem secretar moléculas imunorreativas que se ligam a receptores na superfície das células efectoras, transmitem informações entre as células e causam proliferação, diferenciação e alterações funcionais celulares, protegendo as células de patógenos (YIN et al., 2021b).

Os macrófagos podem secretar interleucinas e fator de necrose tumoral durante o processo de “engolfamento” de invasores para promover a produção de plaquetas, estimular a proliferação de linfócitos B e aumentar a diferenciação e maturação dos megacariócitos da medula óssea (LI et al., 2021c). As citocinas TNF- α e IL-1 são pró-inflamatórias típicas, que são produzidas quando os macrófagos são ativados e estão envolvidas nas respostas imunes e na defesa do hospedeiro (CARBONERO et al., 2012).

A citocina IL-10, no entanto, é anti-inflamatória (SINDHU et al., 2021), e quando avaliada, os resultados indicaram que não houve alteração na secreção em nenhuma concentração de polissacarídeo avaliada. Sendo assim, o (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* estudado demonstrou potencial imunoestimulatório.

O β -glucano é descrito como um importante imunoestimulador (KHAN et al., 2018). Este polissacarídeo modula a imunidade humoral e celular, estimulando o sistema imunológico contra infecções com a ativação via β -glucano das células NK, macrófagos, monócitos e neutrófilos (YAN et al., 2019).

A maioria dos fungos possuem β -glucanos em sua composição (MAITY et al., 2021b). Os β -glucanos não podem ser digeridos no trato gastrointestinal humano devido as enzimas secretadas pelas células epiteliais da borda de escova do intestino serem incapazes de hidrolisar as ligações β -glicosídicas. Portanto, β -glucanos fúngicos possuem função potencial de prebióticos (KHAN et al., 2018). O possível mecanismo de estimulação do sistema imunológico se baseia na interação entre a β -glucana e os receptores correspondentes nas células imunes (YAN et al., 2019). Tanto em humanos quanto em animais, o efeito protetor dos β -glucanos acontece através do aumento das citocinas e imunoglobulinas circulantes. Portanto, a alteração de parâmetros clínicos sugere uma função imonoreguladora de β -glucano ao invés de ativação imune (KHAN et al., 2018). Apesar dos β -glucanos serem reconhecidos,

alguns heteroglucanos estudados também possuem atividade imunoestimulatória (LI et al., 2021c; MENG et al., 2017; YAN et al., 2019).

Polissacarídeos de *Aspergillus cristatus* foram estudados por Xie et al., (2022) quanto à atividade imunomoduladora associada à regulação da função de barreira intestinal e microbiota intestinal. Os resultados demonstraram fortalecimento da função imunológica, com aumento de citocinas e imunoglobulina e equilíbrio da disbiose da microbiota intestinal. Os autores sugeriram que os polissacarídeos exerceram atividade imunomoduladora através da restauração da função da barreira intestinal e regulação da microbiota intestinal, fortalecendo a imunidade do hospedeiro.

4 Conclusão

Os resultados demonstraram dose-dependência nas três atividades biológicas avaliadas. A atividade inibitória da enzima α -amilase exercida pelo (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano foi de 53,7% de inibição na maior concentração do polissacarídeo (2mg/mL). A acarbose, usada como controle positivo, apresentou atividade de inibição da α -amilase de 81,8% na mesma concentração.

A analgesia do polissacarídeo foi avaliada a partir do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, ilustrando a atividade antinociceptiva periférica do (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano. Na maior concentração de polissacarídeo (60 mg/kg) o número de contorções foi reduzido, sendo menor que o observado quando utilizado o fármaco padrão indometacina. Quanto à atividade imunomoduladora, os resultados indicaram que na concentração de 200 μ g/mL de (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano aumento da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e TNF- α quando comparados ao controle negativo.

Esses resultados indicaram que o (1→3)(1→6)- β -D-glucogalactano obtido da parede celular de *A. niger* pode ser utilizado com potencial hipoglicemiante, antinociceptivo e agente imonoestimulatório, sendo necessário mais estudos que permitirão elucidar os mecanismos de ação precisos envolvidos.

3. CONCLUSÃO GERAL

Com a realização deste estudo, foi possível otimizar a extração do polissacarídeo de parede celular de *Pleurotus djamor* CCMB 366 visando a identificação de condições ideais para o maior rendimento de polissacarídeo em massa (g). A caracterização parcial permitiu inferir que a amostra obtida se trata de um polissacarídeo com ligação do tipo β -(1 \rightarrow 3), no entanto, mais métodos de caracterização serão empregados com a finalidade de elucidar a estrutura molecular deste polissacarídeo. O polissacarídeo *P. djamor* demonstrou potencial imunoestimulatório através da secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos isolados de murinos.

Os estudos de atividades biológicas do (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucogalactano obtido da parede celular de *Aspergillus niger* ATCC 1004 demonstraram que este polissacarídeo possui potencial hipoglicemiante *in vitro*, antinociceptivo e imunoestimulatório, sendo promissor para a aplicação na área farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHHAB, Mosaad A. et al. Bioactive compounds from *Aspergillus niger* extract enhance the antioxidant activity and prevent the genotoxicity in aflatoxin B1-treated rats. **Toxicon**, [S. l.], v. 181, n. March, p. 57–68, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.04.103. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.103>.

ABREU, Hellen; SIMAS, Fernanda Fogagnoli; SMIDERLE, Fhernanda Ribeiro; SOVRANI, Vanessa; DALLAZEN, Jorge Luiz; MARIA-FERREIRA, Daniele; WERNER, Maria Fernanda; CORDEIRO, Lucimara M. C.; IACOMINI, Marcello. Gelling functional property, anti-inflammatory and antinociceptive bioactivities of β -D-glucan from the edible mushroom *Pholiota nameko*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 122, p. 1128–1135, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.062. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.062>.

ABREU, Hellen; SMIDERLE, Fhernanda Ribeiro; SASSAKI, Guilherme Lanzi; SOVRANI, Vanessa; CORDEIRO, Lucimara M. C.; IACOMINI, Marcello. Naturally methylated mannogalactans from the edible mushrooms *Pholiota nameko* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. l.], v. 102, n. May, p. 103985, 2021. DOI: 10.1016/j.jfca.2021.103985. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103985>.

ARAÚJO, Nelma Lopes; AVELINO, Katielle Vieira; HALABURA, Marisangela Isabel Wietzikoski; MARIM, Renan Alberto; KASSEM, Adma Soraia Serea; LINDE, Giani Andrea; COLAUTO, Nelson Barros; DO VALLE, Juliana Silveira. Use of green light to improve the production of lignocellulose-decay enzymes by *Pleurotus* spp. in liquid cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 149, n. April, p. 109860, 2021. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109860. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109860>.

BAI, Meng; WANG, Yue; LIU, Ting; LIAN, Yu Xing; BAI, Qi Qi; SONG, Xiao Ping; HAN, Chang Ri; ZHENG, Cai Juan; CHEN, Guang Ying. One new piperazinedione isolated from a mangrove-derived fungus *Aspergillus niger* JX-5. **Natural Product Research**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1080/14786419.2020.1828407.

BARBOSA, Jhonatas Rodrigues; CARVALHO JUNIOR, Raul Nunes De. Occurrence and possible roles of polysaccharides in fungi and their influence on the development of new technologies. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 246, n. May, p. 116613, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116613. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116613>.

BELLETTINI, Marcelo Barba; FIORDA, Fernanda Assumpção; MAIEVES, Helayne Aparecida; TEIXEIRA, Gerson Lopes; ÁVILA, Suelen; HORNING, Polyanna Silveira; JÚNIOR, Agenor Maccari; RIBANI, Rosemary Hoffmann. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 633–646, 2019. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.12.005.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Design for Study of quantitative variables Box Behnkee.pdf. **Technometrics**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00401706.1960.10489912>.

BOX, G. E. P.; DRAPER, Norman R. A Basis for the Selection of a Response Surface Design. **Journal of the American Statistical Association**, [S. l.], v. 54, n. 287, p. 622–654, 1959. DOI: 10.1080/01621459.1959.10501525.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>.

BRIARD, Benoit; FONTAINE, Thierry; KANNEGANTI, Thirumala Devi; GOW, Neil A. R.; PAPON, Nicolas. Fungal cell wall components modulate our immune system. **The Cell Surface**, [S. l.], v. 7, p. 100067, 2021. DOI: 10.1016/j.tcs.2021.100067. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100067>.

BRUGNARI, Tatiane; BRACHT, Adelar; PERALTA, Rosane Marina; FERREIRA, Isabel C. F. R. Trends in Food Science & Technology Biotechnological , nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp . (Oyster mushroom) related with its chemical composition : A review on the past decade findings. [S. l.], v. 50, 2016. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.01.012.

CALDAS, Lhaís Araújo; ZIED, Diego Cunha; SARTORELLI, Patrícia. Dereplication of extracts from nutraceutical mushrooms *pleurotus* using molecular network approach. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 370, n. September 2021, p. 131019, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131019>.

CAO, Xiangyu; XIA, Ying; LIU, Dan; HE, Yonglin; MU, Teng; HUO, Yapeng; LIU, Jianli.

Inhibitory effects of *Lentinus edodes* mycelia polysaccharide on α -glucosidase, glycation activity and high glucose-induced cell damage. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 246, p. 116659, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116659. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116659>.

CARBONERO, Elaine R. et al. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 814–819, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.06.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.005>.

CARON, Thibault et al. Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 354, p. 109174, 2021. DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109174.

CARRASCO-GONZÁLEZ, Jorge Alberto; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O.; GUTIÉRREZ-URIBE, Janet A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. l.], v. 58, p. 69–81, 2017. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.01.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.016>.

CHAKRABORTY, Indranil; SEN, Ipsita K.; MONDAL, Soumitra; ROUT, Dilip; BHANJA, Sunil K.; MAITY, Gajendra Nath; MAITY, Prasenjit. Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 22, n. October, p. 101425, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101425. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101425>.

CHEN, Shuhan; CHEN, Haixia; TIAN, Jingge; WANG, Yanwei; XING, Lisha; WANG, Jia. Chemical modification, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 98, n. 1, p. 428–437, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.011>.

CHEN, Yin et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 218–226, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.042.

COLOSIMO, Raffaele; WARREN, Frederick J.; EDWARDS, Cathrina H.; RYDEN, Peter;

DYER, Paul S.; FINNIGAN, Tim J. A.; WILDE, Peter J. Comparison of the behavior of fungal and plant cell wall during gastrointestinal digestion and resulting health effects: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 110, n. January, p. 132–141, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.02.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.001>.

CORTÉS, Juan Carlos G.; CURTO, M. Ángeles; CARVALHO, Vanessa S. D.; PÉREZ, Pilar; RIBAS, Juan Carlos. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 107352, 2019. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.008>.

COUSIN, M. A. **Fungi: Classification of the Eukaryotic Ascomycetes**. Second Edi ed. [s.l.] : Elsevier, 2014. v. 2 DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00137-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00137-3>.

CURTO, M. Ángeles; BUTASSI, Estefanía; RIBAS, Juan C.; SVETAZ, Laura A.; CORTÉS, Juan C. G. Natural products targeting the synthesis of $\beta(1,3)$ -D-glucan and chitin of the fungal cell wall. Existing drugs and recent findings. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 88, n. March, 2021. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153556.

DE ALMEIDA, Wanessa Sales; DA SILVA, Durcilene Alves. Does polysaccharide quaternization improve biological activity? **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 182, p. 1419–1436, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.012>.

DE SOUZA SAMPAIO, Renata et al. Antinociceptive activity of the Psidium brownianum Mart ex DC. leaf essential oil in mice. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 135, n. December 2019, p. 111053, 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2019.111053. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111053>.

DESVITA, Hera; FAISAL, Muhammad; MAHIDIN; SUHENDRAYATNA. Antimicrobial potential of wood vinegar from cocoa pod shells (*Theobroma cacao* L.) against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1016/J.MATPR.2022.02.410.

DIJKSTERHUIS, Jan. The fungal spore and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, [S. l.], v. 17, p. 68–74, 2017. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.10.006. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.006>.

DIJKSTERHUIS, Jan. Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 81, p. 2–11, 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2018.11.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>.

DONG, C. H.; XIE, X. Q.; WANG, X. L.; ZHAN, Y.; YAO, Y. J. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. **Food and Bioprocess Processing**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 139–144, 2009. DOI: 10.1016/j.fbp.2008.06.004.

DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017>.

DUMLUPINAR, Berrak. Immunomodulatory and antiinflammatory activities of terrestrial fungal polysaccharides: A review. **Studies in Natural Products Chemistry**, [S. l.], v. 69, p. 417–440, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-819487-4.00007-0.

EL ENSHASY, Hesham A. Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development. **Current Opinion in Chemical Engineering**, [S. l.], v. 35, p. 100729, 2022. DOI: 10.1016/j.coche.2021.100729. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100729>.

ERKMEN, Osman. Morphological characteristics of yeasts and molds. **Laboratory Practices in Microbiology**, [S. l.], p. 221–230, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-323-91017-0.00022-6.

FAZENDA, Mariana L.; SEVIOUR, Robert; MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. **Advances in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 63, n. 07, p. 33–103, 2008. DOI: 10.1016/S0065-2164(07)00002-0.

FERREIRA, Jorge A.; MAHBOUBI, Amir; LENNARTSSON, Patrik R.; TAHERZADEH, Mohammad J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 215, p. 334–345, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI,

C.; COELHO, M. M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 421, n. 3, p. 157–164, 2001.

GAO, Li; CUI, Shasha; HUANG, Zhiqiang; CUI, Hailong; AWAD ALAHMADI, Tahani; MANIKANDAN, Velu. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of butein in different nociceptive and inflammatory mice models. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 12, p. 7090–7097, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.08.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.006>.

GASPARINI, Claudia; SUTHERLAND, Heidi; GRIFFITHS, Lyn. Studies on the Pathophysiology and Genetic Basis of Migraine. **Current Genomics**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 300–315, 2013. DOI: 10.2174/13892029113149990007.

GERMEC, Mustafa; TURHAN, Irfan. Partial purification and characterization of *Aspergillus niger* inulinase produced from sugar-beet molasses in the shaking incubator and stirred-tank bioreactors. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 3789–3799, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.032. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.032>.

GHAFORI, Shamimeh; HABIBIPOUR, Reza; BAYAT, Samiye. Optimization of a real-time PCR assay for identification of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* from flour samples: Comparison of phenotypic and genotypic methods. **Gene Reports**, [S. l.], v. 22, n. November 2020, p. 100993, 2021. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100993. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100993>.

GHARAGHANI, Maral; REZAEI-MATEHKOLAEI, Ali; HARDANI, Amir Kamal; ZAREI MAHMOUDABADI, Ali. Pediatric candiduria, epidemiology, genotype distribution and virulence factors of *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 160, n. March, p. 105173, 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105173. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105173>.

GIL-SERNA, Jéssica; GARCÍA-DÍAZ, Marta; VÁZQUEZ, Covadonga; GONZÁLEZ-JAÉN, María Teresa; PATIÑO, Belén. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 82, n. January, p. 240–248, 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2019.02.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.013>.

GMOSER, Rebecca; SINTCA, Carissa; TAHERZADEH, Mohammad J.; LENNARTSSON, Patrik R. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus. **Waste Management**, [S. l.], v. 97, p. 63–70, 2019. DOI: 10.1016/j.wasman.2019.07.039. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.039>.

GOLDMAN, Gustavo H.; DELNESTE, Yves; PAPON, Nicolas. Fungal Polysaccharides Promote Protective Immunity. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 379–381, 2021. DOI: 10.1016/j.tim.2021.02.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.004>.

GORDON, Debra B.; LOVE, Georgette. Pharmacologic management of neuropathic pain. **Pain Management Nursing**, [S. l.], v. 5, n. SUPPL., p. 19–33, 2004. DOI: 10.1016/j.pmn.2004.10.005.

GUNASEKARAN, Sasikala; GOVINDAN, Sudha; RAMANI, Prasanna. Investigation of chemical and biological properties of an acidic polysaccharide fraction from *Pleurotus eous* (Berk.) Sacc. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 42, n. June, p. 101209, 2021. a. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101209. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101209>.

GUNASEKARAN, Sasikala; GOVINDAN, Sudha; RAMANI, Prasanna. Sulfated modification, characterization and bioactivities of an acidic polysaccharide fraction from an edible mushroom *Pleurotus eous* (Berk.) Sacc. **Heliyon**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. e05964, 2021. b. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e05964. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05964>.

GUO, Cuiling et al. Ganoderma lucidum polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 267, n. May, p. 118231, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118231. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118231>.

HARRIS, Steven D. Hyphal branching in filamentous fungi. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 451, n. 1, p. 35–39, 2019. DOI: 10.1016/J.YDBIO.2019.02.012.

HEGDE, Rajneesh. Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 14–19, 2006. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2005.01.050.

HUANG, Xuenian; MEN, Ping; TANG, Shen; LU, Xuefeng. *Aspergillus terreus* as an

industrial filamentous fungus for pharmaceutical biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 69, p. 273–280, 2021. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.02.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.02.004>.

ISAAC, Susan. What factors determine the duration of the dormancy of fungus spores prior to Germination? **Mycologist**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 38–39, 1998. DOI: 10.1016/S0269-915X(98)80109-2.

JANEWAY, Charles A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunology Today**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 11–16, 1992. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90198-G.

JI, Jing; GAO, Tianpeng; SALAMA, El Sayed; EL-DALATONY, Marwa M.; PENG, Liang; GONG, Yuxing; LIU, Pu; LI, Xiangkai. Using *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst mycelial aerobic granular sludge to treat pharmaceutical wastewater containing β -lactam antibiotics. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 412, n. October 2020, p. 128665, 2021. DOI: 10.1016/j.cej.2021.128665. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128665>.

JIANG, Jun; ZHANG, Mingyue; AN, Tingting; ZU, Zhongqi; SONG, Pengpeng; CHEN, Mengxue; YUE, Pengxiang; GAO, Xueling. Preparation of instant dark tea by liquid-state fermentation using sequential inoculation with *Eurotium cristatum* and *Aspergillus niger*: Processes optimization, physiochemical characteristics and antioxidant activity. **LWT**, [S. l.], v. 162, p. 113379, 2022. DOI: 10.1016/J.LWT.2022.113379. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643822003140>. Acesso em: 24 maio. 2022.

KE, Yuan; DING, Beibei; ZHANG, Miaomiao; DONG, Tongjun; FU, Yang; LV, Qingyun; DING, Wenping; WANG, Xuedong. Study on Inhibitory Activity and Mechanism of Chitosan Oligosaccharides on *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Fumigatus*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 275, n. 68, p. 118673, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118673. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118673>.

KHAN, Asma Ashraf; GANI, Adil; KHANDAY, Firdous A.; MASOODI, F. A. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [S. l.], v. 16, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1016/j.bcdf.2017.12.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.12.002>.

KHURSHEED, Rubiya; SINGH, Sachin Kumar; WADHWA, Sheetu; GULATI, Monica;

AWASTHI, Ankit. Therapeutic potential of mushrooms in diabetes mellitus: Role of polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 1194–1205, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.145. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.145>.

KOMURA, Dirce L.; CARBONERO, Elaine R.; GRACHER, Ana Helena P.; BAGGIO, Cristiane H.; FREITAS, Cristina S.; MARCON, Rodrigo; SANTOS, Adair R. S.; GORIN, Philip A. J.; IACOMINI, Marcello. Structure of Agaricus spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 15, p. 6192–6199, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.142. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.142>.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, [S. l.], v. 18, p. 412–416, 1959.

KOT, Anna M.; KIELISZEK, Marek; PIWOWAREK, Kamil; BŁAŻEJAK, Stanisław; MUSSAGY, Cassamo Ussemane. Sporobolomyces and Sporidiobolus – non-conventional yeasts for use in industries. **Fungal Biology Reviews**, [S. l.], v. 37, p. 41–58, 2021. DOI: 10.1016/j.fbr.2021.06.001.

KUMAR, Sameer; AUROSHREE, Pravamayee; MISHRA, Jigni. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties : A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1016/j.bcdf.2015.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.11.001>.

LEONG, Yoong Kit; YANG, Fan Chiang; CHANG, Jo Shu. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 251, n. May 2020, p. 117006, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117006>.

LI, Guanlong; LIU, Xiaolan; CONG, Shanzi; DENG, Yongping; ZHENG, Xiqun. A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 168, p. 631–639, 2021. a. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.11.118.

LI, Hongyan; GAO, Tong; WANG, Jingchen; TIAN, Shasha; YUAN, Xin; ZHU, Huajie.

Structural identification and antitumor activity of the extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 51, n. 10, p. 1714–1720, 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.08.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.001>.

LI, Huaping; FENG, Yanbo; SUN, Wenxue; KONG, Yi; JIA, Le. Antioxidation, anti-inflammation and anti-fibrosis effect of phosphorylated polysaccharides from *Pleurotus djamor* mycelia on adenine-induced chronic renal failure mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 170, p. 652–663, 2021. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.159. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.159>.

LI, Yanli; LIU, Jiahao; WANG, Gang; YANG, Meiyang; YANG, Xue; LI, Tongbing; CHEN, Guang. De novo transcriptome analysis of *Pleurotus djamor* to identify genes encoding CAZymes related to the decomposition of corn stalk lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 128, n. 5, p. 529–536, 2019. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.04.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.011>.

LI, Yi Meng; ZHONG, Rui fang; CHEN, Jian; LUO, Zhi Gang. Structural characterization, anticancer, hypoglycemia and immune activities of polysaccharides from *Russula virescens*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 184, p. 380–392, 2021. c. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.06.026.

LI, Yuanning et al. A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. **Current Biology**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 1653–1665.e5, 2021. d. DOI: 10.1016/j.cub.2021.01.074. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.074>.

LIANG, Jingjing; ZHANG, Meina; WANG, Xingnan; REN, Yichen; YUE, Tianli; WANG, Zhouli; GAO, Zhenpeng. Edible fungal polysaccharides, the gut microbiota, and host health. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 273, n. June, p. 118558, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118558. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118558>.

LIM, Jolyn Jia Jia et al. Fungi.guru: Comparative genomic and transcriptomic resource for the fungi kingdom. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 18, p. 3788–3795, 2020. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.11.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.019>.

LIN, Ximeng; LI, Wenxia; YUEN, Hywel; YUEN, Michael; PENG, Qiang. Immunomodulatory effect of intracellular polysaccharide from mycelia of *Agaricus bitorquis* (QuéL.) Sacc. Chaidam by TLR4-mediated MyD88 dependent signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 183, p. 79–89, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.120. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.120>.

LINDEQUIST, Ulrike; NIEDERMEYER, Timo H. J.; JU, Wolf-dieter. The Pharmacological Potential of Mushrooms. [S. l.], v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005. DOI: 10.1093/ecam/neh107.

LIU, Guo et al. Extraction, structural characterization, and immunobiological activity of ABP Ia polysaccharide from *Agaricus bisporus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 162, p. 975–984, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.204. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.204>.

LIU, Qin; TIAN, Guoting; YAN, Hao; GENG, Xueran; CAO, Qingpeng; WANG, Hexiang; NG, Tzi Bun. Characterization of Polysaccharides with Antioxidant and Hepatoprotective Activities from the Wild Edible Mushroom *Russula vinosa* Lindblad. [S. l.], 2014.

LIU, Yang; ZHOU, Yifa; LIU, Mengdi; WANG, Qi; LI, Yu. Extraction optimization, characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of a novel polysaccharide from the wild mushroom *Paxillus involutus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 112, p. 326–332, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.132.

LOUZADA DOS SANTOS, Thainá; HUERTAS TAVARES, Orlando Carlos; DE ABREU LOPES, Samuel; ELIAS, Sael Sánchez; LOURO BERBARA, Ricardo Luiz; GARCÍA, Andrés Calderín. Environmental implications of the organic matter structure for white-rot fungus *Pleurotus eryngii* growth in a tropical climate. **Fungal Biology**, [S. l.], n. xxxx, 2021. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.05.006.

MA, Xiaoyu; GAO, Ming; WANG, Nuohan; LIU, Shuo; WANG, Qunhui; SUN, Xiaohong. Lactic acid production from co-fermentation of food waste and spent mushroom substance with *Aspergillus niger* cellulase. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 337, n. May, p. 125365, 2021. a. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125365. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125365>.

MA, Yan et al. Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarisii* and *Aspergillus fumigatus*. **Food Chemistry**, [S. l.], v.

334, n. June 2020, p. 127560, 2021. b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127560. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127560>.

MAITY, Gajendra Nath; MAITY, Prasenjit; CHOUDHURI, Indranil; BHATTACHARYYA, Nandan; ACHARYA, Krishnendu; DALAI, Sudipta; MONDAL, Soumitra. Structural studies of a water insoluble β -glucan from *Pleurotus djamor* and its cytotoxic effect against PA1, ovarian carcinoma cells. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 222, n. April, p. 114990, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.114990. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.114990>.

MAITY, Gajendra Nath; MAITY, Prasenjit; KHATUA, Somanjana; ACHARYA, Krishnendu; DALAI, Sudipta; MONDAL, Soumitra. Structural features and antioxidant activity of a new galactoglucan from edible mushroom *Pleurotus djamor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 168, p. 743–749, 2021. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.131. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.131>.

MAITY, Prasenjit; SEN, Ipsita K.; CHAKRABORTY, Indranil; MONDAL, Soumitra; BAR, Harekrishna; BHANJA, Sunil K.; MANDAL, Soumitra; MAITY, Gajendra Nath. Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 172, p. 408–417, 2021. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.081. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.081>.

MAO, Hongliang; WANG, Hao. Resolution of deep divergence of club fungi (phylum Basidiomycota). **Synthetic and Systems Biotechnology**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 225–231, 2019. DOI: 10.1016/j.synbio.2019.12.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.12.001>.

MARGULIS, Lynn; CHAPMAN, Michael J. KINGDOM FUNGI. **Kingdoms and Domains**, [S. l.], p. 379–409, 2009. DOI: 10.1016/B978-0-12-373621-5.00004-0.

MAZUMDER, Kishor; RUMA, Yasmeen Nazim; AKTER, Rasheda; AKTAR, Asma; HOSSAIN, Mir Monir; SHAHINA, Zinnat; MAZUMDAR, Santosh; KERR, Philip G. Identification of bioactive metabolites and evaluation of in vitro anti-inflammatory and in vivo antinociceptive and antiarthritic activities of endophyte fungi isolated from *Elaeocarpus floribundus* blume. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 273, p. 113975, 2021. DOI:

10.1016/J.JEP.2021.113975.

MEHANNA, Mohammed M.; DOMIATI, Souraya; NAKKASH CHMAISSE, Hania; EL MALLAH, Ahmed. Antinociceptive effect of tadalafil in various pain models: Involvement of opioid receptors and nitric oxide cyclic GMP pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 352, n. 2017, p. 170–175, 2018. DOI: 10.1016/j.taap.2018.05.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.013>.

MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; DALHUIJSEN, S.; SAMSON, R. A.; DE VRIES, R. P. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 69, p. 19–30, 2011. DOI: 10.3114/sim.2011.69.02. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.69.02>.

MENDES, Tátilla P. S.; SANTANA, Romário A.; CEDRO, Pâmala E. P; MIRANDA, A. C. A; NASCIMENTO JUNIOR, B. B.; VALASQUES JUNIOR, G. L. Extraction , characterization , antioxidant and α - amylase inhibitory activities of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β - D - glucogalactan from *Aspergillus niger* ATCC 1004. **3 Biotech**, [S. l.], 2023. DOI: 10.1007/s13205-023-03467-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03467-5>.

MENEGUIN, Andréia Bagliotti; SILVESTRE, Amanda Letícia Polli; SPOSITO, Larissa; DE SOUZA, Maurício Palmeira Chaves; SÁBIO, Rafael Miguel; ARAÚJO, Victor Hugo Sousa; CURY, Beatriz Stringhetti Ferreira; CHORILLI, Marlus. The role of polysaccharides from natural resources to design oral insulin micro- and nanoparticles intended for the treatment of Diabetes mellitus: A review. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 256, n. November 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117504.

MENG, Jiali; CHROUMPI, Tania; MÄKELÄ, Miia R.; DE VRIES, Ronald P. Xylitol production from plant biomass by *Aspergillus niger* through metabolic engineering. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 344, p. 126199, 2022. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126199. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852421015418>. Acesso em: 31 out. 2021.

MENG, Meng; CHENG, Dai; HAN, Lirong; CHEN, Yuanyuan; WANG, Chunling. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting body. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 157, p. 1134–1143, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.082. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.082>.

MENOLLI, Nelson; BRETERNITZ, Bruna Suellen; CAPELARI, Marina. The genus *Pleurotus* in Brazil: A molecular and taxonomic overview. **Mycoscience**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 378–389, 2014. DOI: 10.1016/j.myc.2013.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.12.001>.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MORENO, Roberta B.; RUTHES, Andrea C.; BAGGIO, Cristiane H.; VILAPLANA, Francisco; KOMURA, Dirce L.; IACOMINI, Marcello. Structure and antinociceptive effects of β -d-glucans from *Cookeina tricholoma*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 141, p. 220–228, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.01.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.001>.

MORTON, Joseph B. Fungi. **Principles and Applications of Soil Microbiology**, [S. l.], p. 149–170, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-820202-9.00006-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012820202900006X>. Acesso em: 4 out. 2021.

MUTHUSAMY, Subbulakshmi; UDAYAKUMAR, Gowthama Prabu; NARALA, Venkata Ramireddy. Recent advances in the extraction and characterization of seed polysaccharides, and their bioactivities: A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [S. l.], v. 26, n. April, p. 100276, 2021. DOI: 10.1016/j.bcdf.2021.100276. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2021.100276>.

NIRMALA, Chongtham; BISHT, Madho Singh; BAJWA, Harjit Kaur; SANTOSH, Oinam. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 77, p. 91–99, 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.05.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.003>.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Optimization of analytical methods using response surface methodology part i: Process variables. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017. DOI: 10.21577/1984-6835.20170070.

NWORU, Chukwuemeka S.; IHIM, Stella A.; OKOYE, Festus B. C.; ESIMONE, Charles O.;

ADIKWU, Michael U.; AKAH, Peter A. Immunomodulatory and immunorestorative activities of β -D-glucan-rich extract and polysaccharide fraction of mushroom, *Pleurotus tuberregium*. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 53, n. 11, p. 1555–1566, 2015. DOI: 10.3109/13880209.2014.991838. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.991838>.

OSI, Monika; SULEJ, Justyna; JASZEK, Magdalena; Ś, Jolanta Jaroszuk-. Applications of Fungal Polysaccharides. [S. l.], v. 1, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21092-3.

PRIYANKA, Uddandarao; LENS, Piet N. L. Enhanced removal of hydrocarbons BTX by light-driven *Aspergillus niger* ZnS nanobiohybrids. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 157, p. 110020, 2022. DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2022.110020.

RANDHAWA, Kudrat; SINGH, Varinder; KAUR, Sanimardeep; KAUR, Ravinder; KUMAR, Suresh; SHRI, Richa. Isolation of *Pleurotus florida* derived acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of cognitive dysfunction in mice. **Food Science and Human Wellness**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 490–496, 2021. DOI: 10.1016/j.fshw.2021.04.011. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.04.011>.

RODRIGUES BARBOSA, Jhonatas; DOS SANTOS FREITAS, Maurício Madson; DA SILVA MARTINS, Luiza Helena; DE CARVALHO, Raul Nunes. Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 229, n. October 2019, p. 115550, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115550. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115550>.

ROJAS-CHALLA, Yahsé; DE GYVES, Josefina; ORTEGA-MUÑOZ, Raquel; MONTIEL-AGUIRRE, Fernando; GONZÁLEZ-ALBARRÁN, René; RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL, Eduardo. Comparative study of As (V) uptake in aqueous medium by a polymer inclusion membrane-based passive sampling device and two filamentous fungi (*Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp.). **Chemosphere**, [S. l.], v. 272, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129920.

SCAZZOCCHIO, Claudio. **Aspergillus: A multifaceted genus**. 4. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20803-0. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20803-0>.

SCHMIDT-DANNERT, Claudia. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 31, p. 40–49, 2016. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.01.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.002>.

SCROCCARELLO, Annalisa; MOLINA-HERNÁNDEZ, Bernardo; DELLA PELLE, Flavio; CIANCETTA, Johnny; FERRARO, Giovanni; FRATINI, Emiliano; VALBONETTI, Luca; CHAVES COPEZ, Clemencia; COMPAGNONE, Dario. Effect of phenolic compounds-capped AgNPs on growth inhibition of *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 199, n. September 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111533.

SEONG, Kye Yong; ZHAO, Xinhua; XU, Jin Rong; GÜLDENER, Ulrich; KISTLER, H. Corby. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 389–399, 2008. DOI: 10.1016/J.FGB.2007.09.002.

SEPHTON-CLARK, Poppy C. S.; VOELZ, Kerstin. Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 102, p. 117–157, 2018. DOI: 10.1016/BS.AAMBS.2017.10.002.

SHARMA, Juhi; SHARMA, Divakar; SHARMA, Anjana; BANSAL, Shikha. Thermo stable tyrosinase purified from *Pleurotus djamor* grown in biomimetic calcium carbonate: A biological strategy to industrial waste remediation. **Environmental Technology and Innovation**, [S. l.], v. 21, p. 101294, 2021. DOI: 10.1016/j.eti.2020.101294. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101294>.

SINDHU, Rakesh K.; GOYAL, Annima; DAS, Jaya; NEHA; CHODEN, Sangay; KUMAR, Pradeep. Immunomodulatory potential of polysaccharides derived from plants and microbes: A narrative review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [S. l.], v. 2, n. February, p. 100044, 2021. DOI: 10.1016/j.carpta.2021.100044. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100044>.

STEINBERG, Gero; PENALVA, Miguel A.; RIQUELME, Meritxell; WÖSTEN, Han A.; HARRIS, Steven D. Cell biology of hyphal growth. **The Fungal Kingdom**, [S. l.], p. 231–265, 2017. DOI: 10.1128/9781555819583.ch11.

STOFFEL, Fernanda; SANTANA, Wesley de Oliveira; FONTANA, Roselei Claudete; CAMASSOLA, Marli. Use of *Pleurotus albidus* mycoprotein flour to produce cookies:

Evaluation of nutritional enrichment and biological activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S. l.], v. 68, n. February, p. 102642, 2021. DOI: 10.1016/j.ifset.2021.102642. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102642>.

STOJKOVIC, D.; SMILJKOVIC, M.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; VAN GRIENSVEN, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; SOKOVIC, M. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, [S. l.], v. 120, p. 100–103, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.01.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.007>.

SUN, Hai Hong; MAO, Wen Jun; CHEN, Yin; GUO, Shou Dong; LI, Hong Yan; QI, Xiao Hui; CHEN, Yan Li; XU, Jian. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 117–124, 2009. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.04.017.

TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida; BARBOSA, Bianca Vianna Rodrigues; LIMA, Matheus Thomaz Nogueira Silva; CARDOSO, Patrícia Gomes; CONTIGLI, Christiane; PIMENTA, Lúcia Pinheiro Santos. Antiviral fungal metabolites and some insights into their contribution to the current COVID-19 pandemic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, p. 116366, 2021. DOI: 10.1016/J.BMC.2021.116366.

TAYLOR, Thomas N.; KRINGS, Michael; TAYLOR, Edith L. Basidiomycota. **Fossil Fungi**, [S. l.], p. 173–199, 2015. a. DOI: 10.1016/b978-0-12-387731-4.00009-8.

TAYLOR, Thomas N.; KRINGS, Michael; TAYLOR, Edith L. **Ascomycota**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/b978-0-12-387731-4.00008-6.

TZELEPIS, Georgios; KARLSSON, Magnus. Killer toxin-like chitinases in filamentous fungi: Structure, regulation and potential roles in fungal biology. **Fungal Biology Reviews**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 123–132, 2019. DOI: 10.1016/J.FBR.2018.11.001.

VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 11, p. 51–58, 1964.

VALASQUES, Gildomar L.; DE LIMA, Flávia O.; BOFFO, Elisangela F.; SANTOS, Jener D. G.; DA SILVA, Bruno C.; DE ASSIS, Sandra A. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)- β -d-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate**

Polymers, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 293–299, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.064>.

VETTORI, Mary Helen Palmuti Braga; FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; CONTIERO, Jonas. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranase. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 1440–1444, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.048. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.048>.

VIEIRA GOMES, Débora Cássia et al. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic/antitumoral bioactives from the phylum Basidiomycota and their possible mechanisms of action. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 112, n. August 2018, p. 108643, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108643. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108643>.

WANG, Cong; LI, Weiwei; CHEN, Zhongqin; GAO, Xudong; YUAN, Guoqi; PAN, Yuxiang; CHEN, Haixia. Effects of simulated gastrointestinal digestion in vitro on the chemical properties, antioxidant activity, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides from *Inonotus obliquus*. **Food Research International**, [S. l.], v. 103, n. October 2017, p. 280–288, 2018. a. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.058. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.058>.

WANG, Dong; SUN, Shu Qing; WU, Wei Zhen; YANG, Shun Liang; TAN, Jian Ming. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 127–134, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.12.085. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.085>.

WANG, Qing; NIU, Lu Lu; LIU, Hui Ping; WU, Ya Ru; LI, Meng Yu; JIA, Qi. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* and its antitumor activity on H22 tumor-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 168, p. 251–260, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.053.

WANG, Ya-Jun; ZHENG, Yu-Guo; XUE, Ya-Ping; WANG, Yuan-Shan; SHEN, Yin-Chu. Analysis and Determination of Anti-diabetes Drug Acarbose and its Structural Analogs. **Current Pharmaceutical Analysis**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 12–20, 2011. DOI: 10.2174/157341211794708721.

WANG, Yufen; HOU, Guohua; LI, Jinglei; SURHIO, Maheen Mahwish; YE, Ming. Structure characterization, modification through carboxymethylation and sulfation, and in vitro antioxidant and hypoglycemic activities of a polysaccharide from *Lachnum* sp. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. January, p. 177–187, 2018. b. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.06.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.002>.

XIE, Zhiyong; BAI, Yixuan; CHEN, Guijie; DONG, Wei; PENG, Yujia; XU, Weiqi; SUN, Yi; ZENG, Xiaoxiong; LIU, Zhonghua. Immunomodulatory activity of polysaccharides from the mycelium of *Aspergillus cristatus*, isolated from Fuzhuan brick tea, associated with the regulation of intestinal barrier function and gut microbiota. **Food Research International**, [S. l.], v. 152, p. 110901, 2022. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2021.110901.

XU, Ce; XU, Kuo; YUAN, Xiao Long; REN, Guang Wei; WANG, Xiao Qiang; LI, Wei; DENG, Ning; WANG, Xiu Fang; ZHANG, Peng. Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 176, n. January, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112399.

XU, Duoduo; WANG, Haiyang; ZHENG, Wei; GAO, Yang; WANG, Mingxing; ZHANG, Yanqiu; GAO, Qipin. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharide isolated from *Pleurotus eryngii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.016>.

XU, Fei et al. Comparative transcriptome analysis reveals the differential response to cadmium stress of two *Pleurotus* fungi: *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 416, n. March, p. 125814, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125814. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125814>.

YADAV, Divya; NEGI, Pradeep Singh. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. **Food Research International**, [S. l.], v. 148, n. April, p. 110599, 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110599. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>.

YAN, Jingmin; MENG, Yue; ZHANG, Mengshan; ZHOU, Xiaohuan; CHENG, Hairong; SUN, Lin; ZHOU, Yifa. A 3-O-methylated heterogalactan from *Pleurotus eryngii* activates

macrophages. **Carbohydrate Polymers**, [*S. l.*], v. 206, n. August 2018, p. 706–715, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.11.063. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.063>.

YANG, Lei; LÜBECK, Mette; LÜBECK, Peter S. Aspergillus as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, [*S. l.*], v. 31, n. 1, p. 33–49, 2017. DOI: 10.1016/j.fbr.2016.11.001.

YANG, Yunfeng. Emerging Patterns of Microbial Functional Traits. **Trends in Microbiology**, [*S. l.*], v. 29, n. 10, p. 874–882, 2021. DOI: 10.1016/j.tim.2021.04.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.04.004>.

YIN, Zhenhua; LIANG, Zhenhua; LI, Changqin; WANG, Jinmei; MA, Changyang; KANG, Wenyi. Immunomodulatory effects of polysaccharides from edible fungus: a review. **Food Science and Human Wellness**, [*S. l.*], v. 10, n. 4, p. 393–400, 2021. a. DOI: 10.1016/j.fshw.2021.04.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.04.001>.

YIN, Zhenhua; SUN-WATERHOUSE, Dongxiao; WANG, Jinmei; MA, Changyang; WATERHOUSE, Geoffrey I. N.; KANG, Wenyi. Polysaccharides from edible fungi *Pleurotus* spp.: advances and perspectives. **Journal of Future Foods**, [*S. l.*], v. 1, n. 2, p. 128–140, 2021. b. DOI: 10.1016/j.jfutfo.2022.01.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.01.002>.

ZERVAKIS, Georgios I.; VENTURELLA, Giuseppe; FRYSSOULI, Vassiliki; INGLESE, Paolo; POLEMIS, Elias; GARGANO, Maria Letizia. *Pleurotus opuntiae* revisited – An insight to the phylogeny of dimitic *Pleurotus* species with emphasis on the *P. djamor* complex. **Fungal Biology**, [*S. l.*], v. 123, n. 3, p. 188–199, 2019. DOI: 10.1016/j.funbio.2018.12.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.12.005>.

ZHAO, Bo; ZHAO, Jinyan; LV, Mingshuai; LI, Xiaoyan; WANG, Jinhua; YUE, Zhengrong; SHI, Jinming; ZHANG, Guocai; SUI, Guangchao. Comparative study of structural properties and biological activities of polysaccharides extracted from *Chroogomphus rutilus* by four different approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 188, n. July, p. 215–225, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.025>.

ZHAO, Chao; GAO, Luying; WANG, Chunyang; LIU, Bin; JIN, Yu; XING, Zheng. Structural characterization and antiviral activity of a novel heteropolysaccharide isolated from

Grifola frondosa against enterovirus 71. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 144, p. 382–389, 2016. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2015.12.005.