



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



THAMARA LOUISY SANTOS BRITO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A
PARTIR DE *Aspergillus aculeatus* EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA**

ITAPETINGA - BA

JULHO - 2022

THAMARA LOUISY SANTOS BRITO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A
PARTIR DE *Aspergillus aculeatus* EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA**

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

Orientadora: Profa. Janaina Silva de Freitas

ITAPETINGA - BA

JULHO – 2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu guia e por me fortalecer em todos os momentos difíceis.

À minha mãe, meu bem maior, por me ouvir e me apoiar.

À Arnaldo, por estar ao meu lado em todos os momentos dessa jornada.

Aos familiares e amigos que acreditaram no meu sonho.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Jabson, por me auxiliarem durante os experimentos.

À minha orientadora, Janaína, pela orientação e pelo suporte para que eu conseguisse desenvolver este trabalho no cenário de pandemia da COVID-19.

Aos professores parceiros que contribuíram para execução do presente trabalho.

Ao programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo suporte acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo auxílio financeiro.

“O Senhor é refúgio para os oprimidos, uma torre segura na hora da adversidade. Os que conhecem o teu nome confiam em ti, pois tu, Senhor, jamais abandonas os que te buscam”.

SALMOS 9: 9-10

RESUMO

Aspergillus é um dos gêneros mais conhecidos e estudados de fungos filamentosos. Nessa perspectiva, diferentes biomoléculas oriundas desses microrganismos vêm sendo pesquisadas quanto à sua produção e atividades biológicas, principalmente os polissacarídeos. Sabe-se que as condições em que os microrganismos se encontram afetam o seu metabolismo e, portanto, na produção das biomoléculas e no seu crescimento. Desta forma, o presente trabalho objetivou produzir, caracterizar e avaliar as atividades biológicas de polissacarídeos da biomassa (parede celular) e exopolissacarídeos obtidos a partir de *A. aculeatus* crescido em dois meios de cultura distintos, bem como verificar a ação destes meios sob a produção desse tipo de biomolécula e no crescimento (área e peso) da espécie estudada. Para tanto, a produção de polissacarídeos por *A. aculeatus* ocorreu sob fermentação submersa em um meio contendo caldo de batata e glicose em pH 7,2 (meio de cultura 1) e outro contendo extrato de malte, glicose, extrato de levedura e peptona em pH 5,5 (meio de cultura 2). Ambas fermentações ocorreram em 13 dias, 120 rpm e 30°C. Após esta etapa, os polissacarídeos da biomassa e exopolissacarídeos foram extraídos, liofilizados, pesados e armazenados. Para avaliação da influência da composição dos meios de cultura e pH, foi utilizado o peso médio da biomassa de cada meio de cultura, bem como o peso médio de polissacarídeos obtidos. Ademais, foi realizado um teste em placa para averiguar o crescimento microbiano, de modo que os meios de cultura 1 e 2 foram acrescidos de ágar, inoculados com *A. aculeatus* e fotografados para medição de área dos micélios nos dias 3, 5 e 7 após incubação em estufa a 30°C por 13 dias. Tanto na fermentação submersa quanto em placa, o pH foi medido no 13º dia. Os dados foram analisados através do teste *T-student* bicaudal com 95% de confiança. Após notação dos dados, um dos grupos de polissacarídeos foi selecionado para as etapas de caracterização por espectrometria de massas e análises de atividades biológicas antibacteriana, pelo método de concentração inibitória mínima, e antitumoral, por MTT. Como resultado, foi observado um maior crescimento (peso) fúngico no meio de cultura 2 em fermentação submersa ($p < 0,01$), embora em placa não tenha sido observado diferença entre as amostras ($p > 0,4$). Visivelmente, foi constatado uma maior disposição de esporos no meio de cultura 1. Houve uma maior produção de polissacarídeos de biomassa em relação a exopolissacarídeos ($p < 0,01$), porém dentro de cada grupo, não houve diferença na produção entre os meios utilizados. *A. aculeatus* aumentou o pH na fermentação submersa em ambos os meios, enquanto que em placa o meio de cultura 1 ficou mais ácido ($p < 0,001$) e o meio de cultura 2 mais alcalino ($p < 0,001$). O grupo de polissacarídeos caracterizados apresentou glicose e xilose em diferentes conformações em sua estrutura e não demonstrou ação antibacteriana e antitumoral nas cepas e linhagens celulares selecionadas. Comprovou-se com alguns dados deste trabalho que as condições ambientais podem influenciar no metabolismo e crescimento fúngico, bem como foi evidenciada a capacidade de *A. aculeatus* se adaptar a eles através da modulação do pH descrita. Além disso, o presente trabalho contribui para os estudos em torno da bioprospecção fúngica e para o conhecimento da espécie *A. aculeatus*.

Palavras-chaves: Fermentação submersa. Parede celular. Exopolissacarídeos. Potencial biológico. Bioprospecção.

ABSTRACT

Aspergillus is one of the best known and most studied genera of filamentous fungi. In this perspective, different biomolecules from these microorganisms have been researched about their production and biological activities, mainly polysaccharides. It is known that the conditions in which microorganisms are found affect their metabolism and, therefore, the production of biomolecules and their growth. Thus, the present work aimed to produce, characterize and evaluate the biological activities of biomass polysaccharides (cell wall) and exopolysaccharides obtained from *A. aculeatus* grown in two different culture media, as well as verify the action of these media on the production of this type of biomolecule and in the growth (area and weight) of the studied species. For this, the production of polysaccharides by *A. aculeatus* occurred under submerged fermentation in a medium containing potato broth and glucose and pH 7.2 (culture medium 1) and another containing malt extract, glucose, yeast extract and peptone and pH 5.5 (culture medium 2). Both fermentations happened for 13 days, 120 rpm and 30°C. After this step, the biomass polysaccharides and exopolysaccharides were extracted, lyophilized, weighed and stored. To evaluate the influence of the composition of the culture media and pH, the average weight of the biomass of each culture medium was used, as well as the average weight of polysaccharides obtained. In addition, a plate test was performed to verify microbial growth, so that culture media 1 and 2 were added with agar, inoculated with *A. aculeatus* and photographed to measure the mycelia area on days 3, 5 and 7 after incubation in an oven at 30°C for 13 days. In both submerged and plate fermentation, the pH was measured on the 13th day. Data were analyzed using the two-tailed T-student test with 95% confidence. After notation of the data, one of the groups of polysaccharides was selected for the characterization step by mass spectrometry and analysis of the antibacterial activity, by the method of minimum inhibitory concentration, and antitumor, by MTT. As a result, greater fungal growth (weight) was observed in culture medium 2 in submerged fermentation ($p < 0.01$), although no difference between samples was observed on plate ($p > 0.4$). Clearly, there was a greater disposition of spores in the culture medium 1. There was a greater production of biomass polysaccharides in relation to exopolysaccharides ($p < 0.01$), however, within each group, there was no difference in production between the used media. *A. aculeatus* increased the pH in the submerged fermentation in both media, while in plate culture medium 1 was more acidic ($p < 0.001$) and culture medium 2 more alkaline ($p < 0.001$). The group of characterized polysaccharides presented glucose and xylose in different conformations in their structure, although they did not demonstrate antibacterial and antitumor action in the selected cell lines and strains. It was proved with some data from this work that environmental conditions can influence the metabolism and fungal growth, as well as the ability of *A. aculeatus* to adapt to them through the described pH modulation was evidenced. In addition, the present work contributes to studies on fungal bioprospection and to the knowledge of the species *A. aculeatus*.

Keywords: Submerged Fermentation. Cell wall. Exopolysaccharide. Biological potential. Bioprospecting.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| A. | <i>Aspergillus</i> |
| CCT | Coleção de Culturas Tropical |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CO₂ | Gás carbônico |
| Da | Daltons |
| DHB | Dihidroxidobenzoico |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EPS | Exopolissacarídeos |
| <i>et al</i> | E colaboradores |
| FAT | Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello |
| FES | Fermentação em estado sólido |
| FS | Fermentação submersa |
| FTIR | Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier |
| GAG | Galactosaminogalactano |
| HBSS | Solução balanceada de Hank |
| HUVEC | <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> |
| MALDI-TOF | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> |
| MBC | Concentração bactericida mínima |
| MIC ou CIM | Concentração inibitória mínima |
| MS | Espectrometria de massas |
| MTT | Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) |
| <i>m/z</i> | Relação massa/carga |
| NAD | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPB2 | RNA polimerase II |
| SOD | Superóxido dismutase |
| sp. | Espécie |
| spp. | Espécies |
| TEF | Fator alfa de alongamento da tradução |
| TOF | <i>Time-of-Flight</i> |

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Micélio de <i>A. aculeatus</i> | 17 |
| Figura 2 – Esquema geral das principais vias metabólicas dos fungos..... | 20 |
| Figura 3 – Polímero GAG em <i>Aspergillus</i> | 21 |
| Figura 4 – Identificação da viabilidade celular pelo corante rezasurina..... | 28 |
| Figura 5 – Reação catalisada pela succinato desidrogenase..... | 29 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema da metodologia inicial para obtenção de polissacarídeos da biomassa e exopolissacarídeos..... | 33 |
| Figura 2 – Peso do micélio de <i>A. aculeatus</i> em diferentes meios de cultura líquido..... | 35 |
| Figura 3 – Crescimento do micélio de <i>A. aculeatus</i> em diferentes meios de cultura sólido..... | 35 |
| Figura 4 – Crescimento de <i>A. aculeatus</i> por 7 dias de cultivo em meio de cultura sólido..... | 36 |
| Figura 5 – Crescimento de <i>A. aculeatus</i> no 13º dia de fermentação submersa em diferentes meios de cultura..... | 37 |
| Figura 6 – Modulação do pH na fermentação submersa por <i>A. aculeatus</i> | 39 |
| Figura 7 – Modulação do pH dos meios de cultura sólido por <i>A. aculeatus</i> | 39 |
| Figura 8 – Produção de polissacarídeos a partir da biomassa (parede celular) de <i>A. aculeatus</i> | 40 |
| Figura 9 – Produção de Exopolissacarídeos obtidos a partir de <i>A. aculeatus</i> , em diferentes meios de cultura..... | 41 |
| Figura 10 – Concentração de proteínas nas amostras estudadas..... | 42 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Espectro de massas completo (m/z 700-4400) obtido por MALDI(+)-TOF MS dos polissacarídeos de parede celular de <i>A. aculeatus</i> | 48 |
| Figura 2 – Caracterização parcial do espectro de massas dos polissacarídeos de parede celular de <i>Aspergillus aculeatus</i> gerados por MALDI(+)-TOF MS com zoom em m/z de 700-1900)..... | 50 |
| Figura 3 – Determinação da CIM de diferentes concentrações de polissacarídeos de parede celular de <i>A. aculeatus</i> sobre cepas gram-negativas..... | 51 |
| Figura 4 – Determinação da CIM de diferentes concentrações de polissacarídeos de parede celular de <i>A. aculeatus</i> sob cepas gram-positivas..... | 51 |
| Figura 5 – Ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos de <i>A. acuelatus</i> em células HUVEC..... | 53 |
| Figura 6 – Microscopia da cultura de células HUVEC em contato com os polissacarídeos estudados..... | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 7 – Ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos de <i>A. acuelatus</i> em células A549..... | 54 |
| Figura 8 – Ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos de <i>A. acuelatus</i> em células BEAS-2B..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Atividades biológicas de polissacarídeos obtidos a partir de *Aspergillus* spp..... 22

Tabela 2 – Meios de cultivo e estruturas de polissacarídeos produzidos por *Aspergillus* spp..... 25

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Relação m/z de diferentes tipos de oligossacarídeos nativos e oxidados descritos na literatura e detectados na amostra estudada..... 49

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 14 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| CAPÍTULO I | 15 |
| 1 FUNGOS | 15 |
| 1.1 GÊNERO <i>Aspergillus</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS..... | 16 |
| 1.1.1 <i>Aspergillus aculeatus</i> | 17 |
| 2 POLISSACARÍDEOS | 18 |
| 2.1 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS | 19 |
| 3 FERMENTAÇÃO | 23 |
| 3.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS..... | 24 |
| 4 CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS | 26 |
| 5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS | 27 |
| 5.1 ATIVIDADE ANTIMIBROBIANA..... | 27 |
| 5.2 CITOTOXICIDADE..... | 29 |
| CAPÍTULO II | 30 |
| RESUMO | 30 |
| 1 INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 2.1 MICRORGANISMO..... | 32 |
| 2.1.1 Inóculo | 32 |
| 2.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA..... | 32 |
| 2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO E DO pH EM MEIO SÓLIDO..... | 33 |
| 2.4 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS..... | 33 |
| 2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS..... | 34 |
| 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 34 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 3.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>A. aculeatus</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA..... | 34 |
| 3.2 MODULAÇÃO DO pH..... | 38 |
| 3.3 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS POR <i>A. aculeatus</i> EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA NOS DIFERENTES MEIOS..... | 40 |
| 4 CONCLUSÃO | 42 |
| 5 AGRADECIMENTOS | 43 |
| CAPÍTULO III | 44 |
| RESUMO | 44 |
| 1 INTRODUÇÃO | 45 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 2.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS..... | 45 |
| 2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA..... | 46 |
| 2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1 Cepas bacterianas | 46 |
| 2.3.2 Teste de susceptibilidade | 46 |
| 2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL..... | 47 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL..... | 48 |
| 3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 51 |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL..... | 52 |
| 4 CONCLUSÃO | 55 |
| 6 CONCLUSÃO GERAL | 56 |
| 7 REFERÊNCIAS | 57 |

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são seres eucariontes encontrados em diferentes ambientes e capazes de colonizar uma variedade de substratos, como solo, água e plantas (AZEVEDO; BARATA, 2018). Essas características contribuem para a prospecção desses microrganismos, de modo que milhares de espécies já foram catalogadas.

A importância econômica dos fungos é vasta, uma vez que são entidades produtoras de inúmeras substâncias e biomoléculas, a exemplo das enzimas, não estando apenas vinculados a doenças e a decomposição de materiais (SINGH; SINGH, 2014). Desta maneira, os fungos apresentam diferentes aplicações na sociedade, como na indústria farmacêutica para produção de fármacos, na indústria de alimentos e bebidas em diferentes processos biotecnológicos e na indústria agropecuária atuando no controle biológico de pragas e doenças. Assim, tendo em vista esse cenário de múltiplas aplicações, o uso de microrganismos destaca-se em relação a outras fontes de biomoléculas levando-se em conta fatores como a produção em condições climáticas reguláveis, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, rapidez na obtenção do produto e necessidade de espaço relativamente pequeno (FARIA, 2002).

No que tange às moléculas bioativas, as investigações acerca de polissacarídeos fúngicos seguem em ascensão. Essa notoriedade resulta da ampla utilização dos polissacarídeos na indústria de alimentos, agindo como espessantes e geleificantes, e por apresentarem, por vezes, ações biológicas antioxidante (PRATHYUSHA; SHEELAB, BRAMHACHARIA, 2018) antitumoral (LI *et al.*, 2018), imunomodulatória (WANG *et al.*, 2021), antibacteriana (EL-GHONEMY, 2021), entre outras.

Ainda nesse viés, em termos de produção, os polissacarídeos fúngicos são obtidos, majoritariamente, por fermentação submersa. Entretanto, é importante ressaltar que a quantidade e o tipo de polissacarídeos a serem gerados, podem variar de acordo com a espécie microbiana utilizada, a composição do meio de cultura em que tal microrganismo irá se desenvolver e os fatores físico-químicos aos quais este crescimento será submetido, como a temperatura, pH, agitação e aeração (BARCELOS *et al.*, 2020). Além disso, mesmo sendo aplicados parâmetros similares, a produção de polissacarídeos de parede celular, também chamados de polissacarídeos da biomassa, difere naturalmente da produção de exopolissacarídeos (EPS), sendo estes últimos os mais estudados entre os polissacarídeos fúngicos (OSIŃSKA-JAROSZUK *et al.*, 2015).

Mundialmente, *Aspergillus* é um dos gêneros mais conhecidos e estudados dentre os fungos filamentosos, apresentando 344 espécies caracterizadas (HOUBRAKEN; SAMSON, YILMAZ, 2016). Desta forma, desde o seu descobrimento até os dias atuais, *Aspergillus* spp.

foram amplamente utilizados para obtenção de moléculas como enzimas, ácidos orgânicos e polissacarídeos (PARK *et al.*, 2017; OSIŃSKA-JAROSZUK *et al.*, 2020)

Diante do exposto, embora *Aspergillus* seja aplicado em vários estudos de bioprospecção, há poucos dados na literatura acerca de polissacarídeos oriundos da espécie *A. aculeatus*, uma vez que apenas a ação antitumoral e imunomodulatória de EPS foram relatadas (LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020). Seguindo esta premissa, objetiva-se com este trabalho elucidar a produção de EPS e polissacarídeos da biomassa (parede celular) de *A. aculeatus*, evidenciando os efeitos da composição do meio no crescimento e na produção destas biomoléculas pela espécie fúngica, bem como caracterizar parcialmente e avaliar as bioatividades de um dos grupos de polissacarídeos analisados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, caracterizar parcialmente e avaliar atividades biológicas de polissacarídeos obtidos de *Aspergillus aculeatus* em dois meios de cultura com composição distintas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento (diâmetro e peso) de *A. aculeatus* em diferentes meios de cultura sólido e líquido;
- Avaliar a modulação do pH por *A. aculeatus* em diferentes meios de cultura sólido e líquido;
- Avaliar a produção de polissacarídeos de biomassa (parede celular) e exopolissacarídeos obtidos a partir de *A. aculeatus* em diferentes meios de cultura a partir de fermentação submersa;
- Extrair os polissacarídeos da biomassa e exopolissacarídeos obtidos a partir de *A. aculeatus* em diferentes meios de cultura;
- Selecionar um grupo de polissacarídeos oriundos de *A. aculeatus* para avaliação das bioatividades e caracterização química;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de polissacarídeos oriundos de *A. aculeatus* pelos métodos de determinação da concentração inibitória e bactericida mínima;
- Avaliar a atividade antitumoral em células de câncer de pulmão e citotoxicidade dos polissacarídeos oriundos de *A. aculeatus* pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio);
- Realizar a caracterização química parcial por MALDI-TOF de polissacarídeos oriundos de *A. aculeatus*.

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

1 FUNGOS

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade dos ecossistemas, participando de processos ecológicos básicos como os ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, muitas vezes mantendo relações ecológicas com outros organismos vivos (PACE, 1997). Dentre os seres microscópicos existentes, os fungos merecem destaque por estarem presentes nos diferentes panoramas ambientais da Terra (KOWALCZYK; BENOIT, DE VRIES, 2014) e pelo seu papel nos costumes culturais e, até mesmo, na evolução do homem ao longo da história (ROMERO; GIUDICESSI, VITALE, 2021).

Denomina-se como fungos um grupo de organismos eucariontes, heterotróficos, unicelulares ou constituídos por um sistema de filamentos ramificados (hifas) - leveduras ou fungos filamentosos, respectivamente. Destes, as leveduras são, majoritariamente, anaeróbias facultativas e os fungos filamentosos aeróbios (TORTORA; FUNKE, CASE, 2016).

Além destas características, os fungos apresentam uma nutrição absorptiva. Deste modo, para adquirir nutrientes, estes microrganismos secretam enzimas para o espaço extracelular, responsáveis por clivar as macromoléculas presentes em seu habitat, como polissacarídeos e proteínas, e, posteriormente, absorvem os monômeros resultantes (AZEVEDO; BARATA, 2018). Após absorção, os nutrientes adquiridos podem ser utilizados para biossíntese dos próprios elementos estruturais fúngicos e como fonte de energia para sua sobrevivência (ALCÂNTARA *et al.*, 2001).

No meio ambiente, em uma visão limitada, observa-se os fungos como agentes decompositores e causadores de doenças aos seres humanos, animais e plantas. Entretanto, ao expandir esse olhar, os fungos constituem-se de uma possibilidade em potencial para obtenção de novas moléculas bioativas, tais como os antibióticos, à exemplo da penicilina (LETEK, 2020). Assim, além das aplicações na indústria farmacêutica, estes microrganismos apresentam grande importância na indústria alimentícia, biorremediação de áreas degradadas e outros processos biotecnológicos devido à sua extensa variedade de metabólitos (SINGH; SINGH, 2014; PARK *et al.*, 2017; OSIŃSKA-JAROSZUK *et al.*, 2020).

Estima-se que existam mais de 2 milhões de espécies fúngicas dispostas no ambiente, entretanto, apenas 1200 espécies foram devidamente caracterizadas (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017; AZEVEDO; BARATA, 2018). O reino em que estas espécies estão incluídas, denominado Reino Fungi, é atualmente dividido em quatro filos: Chytridiomycota,

Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Dos filios mencionados, os dois últimos apresentam maior destaque, uma vez que o filo Ascomycota é o que apresenta maior número de fungos descritos, incluindo o gênero *Aspergillus*, enquanto o filo Basidiomycota compreende os cogumelos e fungos evolutivamente mais diferenciados (ATHAYDE, 2011; BARREIRO *et al.*, 2012).

1.1 GÊNERO *Aspergillus*: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 (SAMSON *et al.*, 2014). Trata-se do gênero mais comum dentre os fungos filamentosos, além de mais abundante, com mais de 340 espécies catalogadas (HOUBRAKEN; SAMSON, YILMAZ, 2016). Estes microrganismos são capazes de nutrir-se de diversos substratos e crescerem em uma gama de condições abióticas, a exemplo da temperatura, que pode variar entre 6 e 55 °C, apesar da temperatura ótima para crescimento da maioria desses fungos estar em torno de 20 a 30°C (RHODES, 2006).

Os fungos deste gênero são facilmente reconhecidos. Nessa perspectiva, a identificação ocorre frequentemente pela estrutura reprodutiva, já que se reproduzem principalmente pela formação de esporos assexuados, denominados conídios, produzidos em estruturas multicelulares chamadas conidióforos. Os conidióforos são usualmente asseptado e com a base em forma de “T” ou “L”, conectada a uma hifa vegetativa (SAMSON *et al.*, 2014; TORTORA; FUNKE, CASE, 2016).

Algumas das espécies de *Aspergillus* podem levar à degradação de alimentos ou ainda parasitar insetos, plantas e animais, incluindo o homem. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, por exemplo, são capazes de contaminar alimentos e produzirem diferentes tipos de aflatoxinas, um agente carcinogênico (YOGENDRARAJAH *et al.*, 2015), enquanto que *Aspergillus fumigatus* é responsável por infecções fúngicas graves em humanos, conhecidas como aspergiloses, a qual pode levar ao comprometimento pulmonar dos pacientes (BAMFORD *et al.*, 2020).

Em contrapartida, estes microrganismos podem também ser benéficos, atuando como importantes agentes econômicos devido suas aplicações biotecnológicas. Assim, os fungos do gênero *Aspergillus* vem sendo amplamente estudados e apontados como produtores de antibióticos (OLA *et al.*, 2014), enzimas (SANGEETHA *et al.*, 2020), pigmentos (SARAVAN *et al.*, 2020), polissacarídeos (LI *et al.*, 2016; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2019), entre outras biomoléculas.

1.1.1 *Aspergillus aculeatus*

A. aculeatus é uma das espécies de *Aspergillus* comumente isolada do solo e de frutas em decomposição. Considerando seu habitat, a espécie já esteve associada como causa de podridão seca em tomates (FAJOLA, 1979) e na podridão de cacho de uvas, juntamente com outros fungos do mesmo gênero (JARVIS; TRAQUAIR, 1984; LEONG; HOCKING, PITT, 2004), mas também foi relatada como um fungo endofítico, isto é, microrganismo que habita o interior de uma planta sem causar sintomas ou doenças na mesma (relação de endossimbiose) (CAMPOS *et al.*, 2005).

A espécie apresenta semelhanças com outras espécies do gênero devido a presença de esporos negros (Figura 1) e outros critérios morfológicos como forma, tamanho e ornamentação de conídios; sendo estas características usualmente aplicadas para classificar o gênero. No entanto, devido às semelhanças, a identificação correta dos fungos à nível de espécie costuma ser mais laboriosa.

Figura 1. Micélio de *A. aculeatus*.



Fonte: A autora.

Nesse sentido, para melhor diferenciação das espécies e de seus clados, Varga *et al.* (2011) realizaram um estudo com *Aspergillus* da secção *Nigri* analisando o gene da calmodulina de diferentes espécies. No estudo em questão, verificou-se que o clado de *A. aculeatus* apresenta as espécies *A. aculeatinus*, *A. uvarum*, *A. japonicus*, *A. fijiensis*, e *A. violaceofuscus*. Posteriormente, Jurjević *et al.* (2012) ao avaliar os genes da B-tubulina, calmodulina, RNA polimerase II (RPB2) e o fator alfa de alongamento da tradução (TEF), mostraram que *A. trinidadensis*, *A. floridensis*, *A. brunneoviolaceus* também participam do clado de *A. aculeatus*.

Além destes, outros trabalhos enfatizam a diferenciação molecular das espécies do gênero *Aspergillus* como a melhor alternativa para a especiação correta (SAMSON *et al.*, 2014;

GAUTIER; NORMAND, RANQUE, 2016; DE VRIES *et al.*, 2017; HOUBRAKEN *et al.*, 2020). Diante desse panorama, atualmente, *A. aculeatus* é taxonomicamente caracterizado como pertencente ao reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae, Gênero *Aspergillus*, secção *Nigri*.

Ademais, sabe-se que temperatura é um fator importante para o crescimento fúngico e produção de metabólitos. Nesse sentido, *A. aculeatus* cresce entre 10 e 42°C, com temperatura ótima próxima de 30°C (LEONG; HOCKING, PITT, 2004). Os demais parâmetros, como meio de cultivo, agitação e dias de fermentação, variam de acordo com o objetivo de cada estudo.

Entre os metabólitos produzidos por *A. aculeatus*, vários estudos contemplam a produção de enzimas, como tanases (BANERJEE; MONDAL, PATI, 2007), endoglucanases (NAIKA *et al.*, 2009), β -galactosidases (BABA *et al.*, 2015), celulase, peptidases, amilases (MAIA; FRAGA, 2017) e poligalacturonases (SILVA *et al.*, 2019), além de outras biomoléculas como ácido gálico (BANERJEE; MAHAPATRA, PATI, 2007), sesquiterpenos (GAO *et al.*, 2015), ácido secalônico D e F (YODSING *et al.*, 2018), Acurina A (WOLFF *et al.*, 2020) e polissacarídeos (LI *et al.*, 2016. LI *et al.*, 2020).

2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são biomoléculas constituídas por mais de 20 unidades de monossacarídeos, como por exemplo: glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, entre outras. Para formação dos polissacarídeos, cada unidade (monômero) encontra-se ligada a outra por ligações glicosídicas (α ou β), formando estruturas distintas que podem apresentar pesos moleculares variados (número de monossacarídeo por molécula), além de diferentes conformações (linear, ramificada, helicoidal) e posições das ligações. Ademais, os glicanos, nome também utilizado para se referir aos polissacarídeos, podem ser classificados como homopolissacarídeos, os quais contêm somente uma única espécie monomérica (a celulose, por exemplo), e heteropolissacarídeos, que contêm dois ou mais tipos diferentes de monossacarídeo (como os glicosaminoglicanos) (NELSON; COX, 2018).

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre na forma de polissacarídeos, sendo estes polímeros de média a alta massa molecular. Sabe-se ainda que os polissacarídeos podem ser sintetizados em diferentes estágios do ciclo de vida de todos os organismos vivos com diferentes finalidades (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Nesse contexto, os polissacarídeos produzidos por microrganismos vêm ganhando destaque econômico devido às suas aplicações em setores industriais distintos e sua obtenção facilitada com relação a outras fontes, como plantas e animais (FARIA, 2002).

Diante disso, as novas funcionalidades dos polissacarídeos na indústria também favoreceram a utilização de microrganismos para sua obtenção em decorrência da maior demanda por essas biomoléculas. Nessa perspectiva, por tempos os polissacarídeos foram conhecidos quase que exclusivamente por suas aplicações em alimentos, como espessantes e geleificantes, por exemplo. No entanto, nas últimas décadas, as investigações sobre as atividades biológicas dos polissacarídeos aumentaram, elucidando-os como importantes agentes para saúde (MAUGERI; GOUDBECK, 2019).

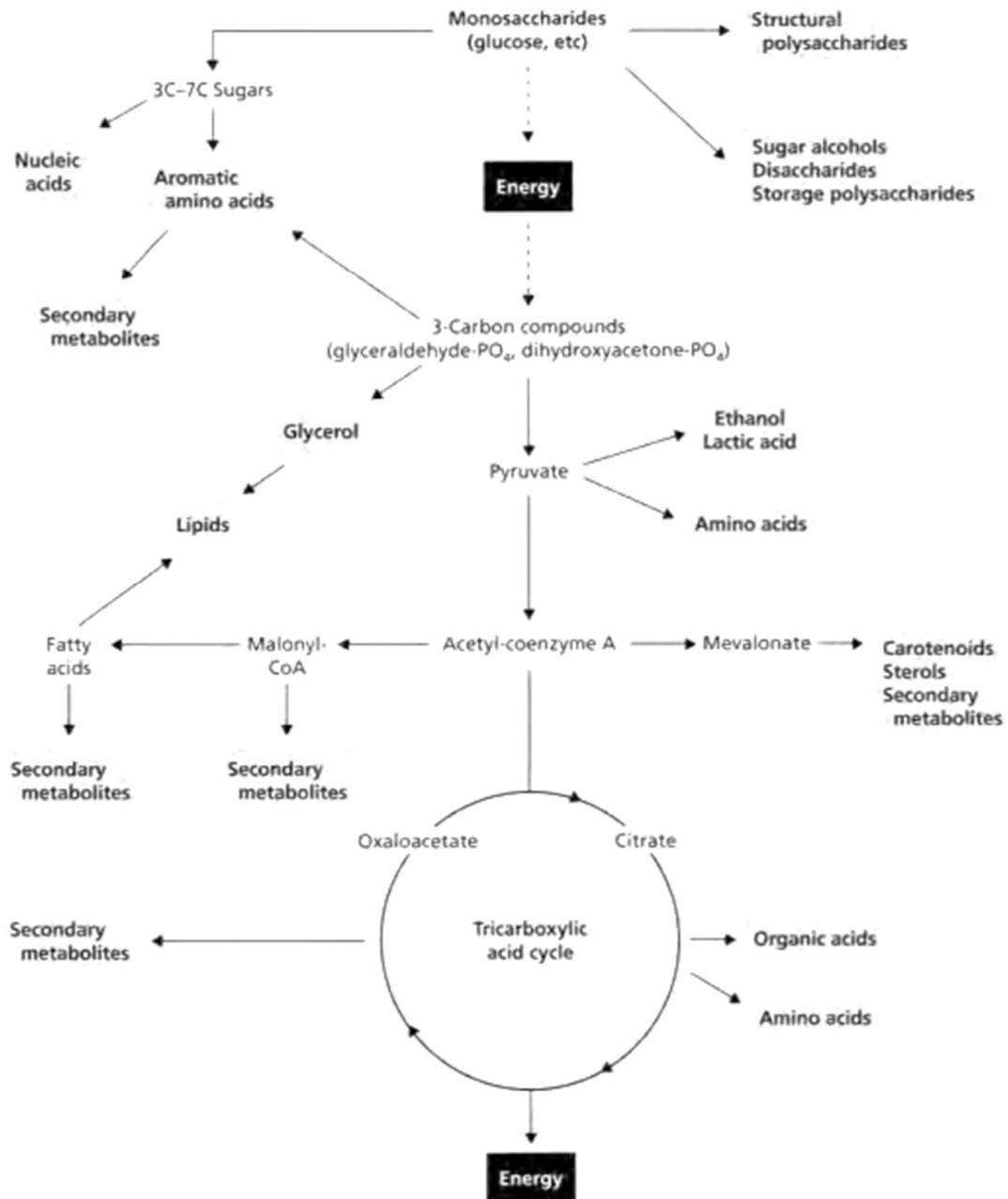
2.1 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

Os polissacarídeos fúngicos podem ser obtidos por diferentes bioprocessos de acordo com a sua localização na célula microbiana. Levando em consideração este fator, os glicanos apresentam a seguinte classificação: (i) polissacarídeos citosólicos, (ii) polissacarídeos da biomassa (parede celular) e (iii) exopolissacarídeos ou polissacarídeos extracelulares (EPS), polissacarídeos que são excretados para o meio onde o microrganismo se encontra (DONOT *et al.*, 2012).

Seguindo esse viés, a parede celular dos fungos atua na proteção osmótica, além de contribuir na determinação da forma das células e o tipo de crescimento que o fungo apresenta (miceliano ou leveduriforme) (BEATRIZ; CAMBAZA, 2015). Tal estrutura é composta principalmente por polissacarídeos e, em menor teor, proteínas e lipídeos ligados a eles. A quantidade e complexidade dos polissacarídeos presentes na parede celular podem variar de acordo com grupos taxonômicos: o filo Ascomycota, por exemplo, apresenta majoritariamente quitinas e glucanas (DEACON, 2006).

As quitinas são polímeros lineares de N-acetil-D-glucosamina com ligações β -1,4 e as glucanas são polímeros da glicose que podem apresentar ligações β -1,3, β -1,6 ou δ -1,3, sendo as estruturas beta as mais abordadas na literatura (KAGIMURA *et al.*, 2015; NELSON; COX, 2018). Essas moléculas e os demais polissacarídeos gerados pelos fungos são sintetizados ao longo do metabolismo primário destes microrganismos (figura 2). Uma vez produzidos, os polissacarídeos podem, além de compor a parede celular, serem liberados para o meio extracelular, a depender, entre outros fatores, do tipo de microrganismo e das condições ambientais em que ele se encontra.

Figura 2 - Esquema geral das principais vias metabólicas dos fungos.

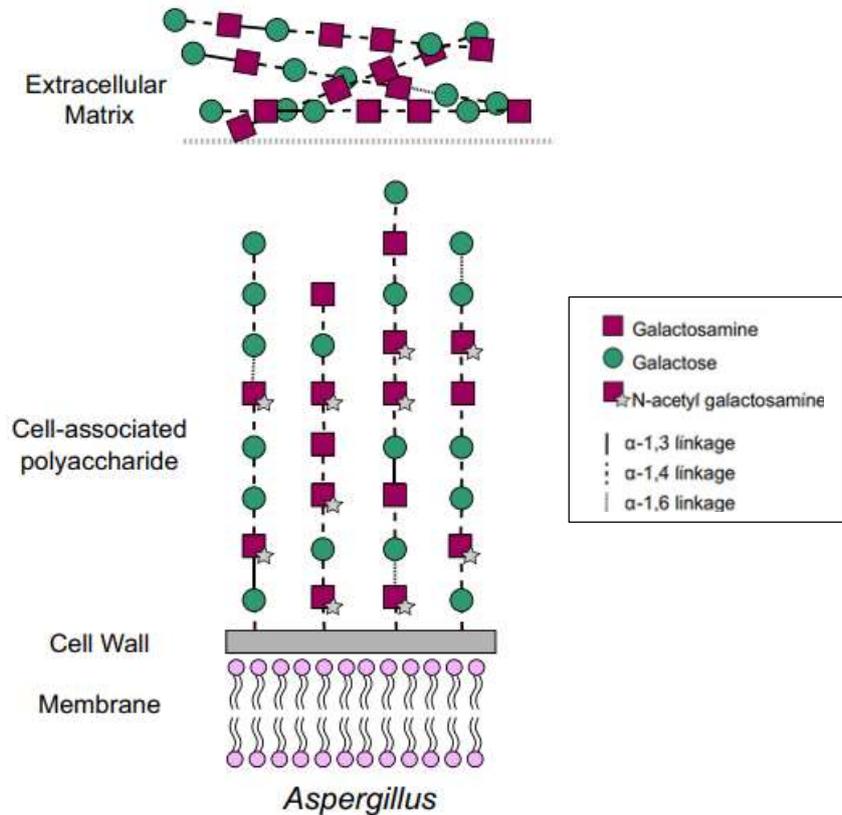


Fonte: DEACON, 2006

No que tange os polissacarídeos excretados pelos fungos (EPS), são importantes agentes de sobrevivência para esses microrganismos. Os mesmos podem atuar no processo de degradação de xenobióticos, impedir a desidratação da hifa, colaborar com a adesão ao substrato e entre as células, favorecer a infecção do hospedeiro através da formação de capsula ou biofilme, a depender da espécie; ou ainda auxiliar na imobilização de enzimas extracelulares e estocagem de nutrientes na matriz extracelular (MANZONI; ROLLINI, 2001; BARBOSA et al, 2004).

Elucidando a ação dos exopolissacarídeos, Chung e Brown (2020) esboçaram a estrutura da parede celular fúngica de *Aspergillus*, a qual é formada em sua maioria por um polímero não ramificado de N-acetil galactosamina e galactose (GAG) (Figura 3). Esse mesmo polímero pode ser excretado e auxiliar na formação da matriz extracelular, desencadeando os efeitos anteriormente mencionados mediante a desacetilação dos resíduos.

Figura 3 - Polímero GAG em *Aspergillus*.



Fonte: Chung; Brown, 2020 – adaptado.

Em contrapartida, além de contribuir para o desenvolvimento e sobrevivência dos fungos, é importante ressaltar que, quando isolados, os exopolissacarídeos, assim como os polissacarídeos da biomassa, podem apresentar atividades biológicas relevantes para a humanidade, como ação antioxidante, anticoagulante, antimicrobiana, entre outras. Deste modo, os exopolissacarídeos (EPS) tornaram-se particularmente interessantes por apresentarem uma variedade de aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, agrícola e de cosméticos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Nesse contexto, os polissacarídeos produzidos através de processos fermentativos com fungos do gênero *Aspergillus* vêm sendo caracterizados e relatados como moléculas bioativas em diferentes estudos (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades biológicas de polissacarídeos obtidos a partir de *Aspergillus* sp.

| Espécies | Tipo | Atividades biológicas | Autor(es)* |
|---|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | EPS | Absorção de metais pesados | LIAN <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Aspergillus</i> sp. Y16 | EPS | Antioxidante | CHEN <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Aspergillus versicolor</i> LCJ-5-4 | EPS | Antioxidante | CHEN <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Aspergillus terreus</i> | EPS | Antioxidante | WANG <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Parede celular | Ativação da resposta imune inata | DUBEY <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | EPS | Antioxidante e antitumoral | JIN; ZHAO, 2014 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Parede celular | Imunomodulatória | BECKER <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Aspergillus versicolor</i> N ₂ bc | EPS | Antioxidante | YAN <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Aspergillus aculeatus</i> | EPS | Antitumoral | LI <i>et al.</i> , 2016 ^a |
| <i>Aspergillus terreus</i> | EPS | Antitumoral | LI <i>et al.</i> , 2016 ^b |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Parede celular | Inibidor de α -amilase | ZHANG <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Aspergillus aculeatus</i> | EPS | Imunomodulatória | LI <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Aspergillus terreus</i> SEI | EPS | Anticoagulante e antitumoral | AMER; ZAGHLOUL, IBRAHIM, 2020 |
| <i>Aspergillus</i> sp. DHE6 | EPS | Antioxidante e antimicrobiana | EL-GHONEMY, 2021 |

Legenda: *Estudos em ordem cronológica; EPS = exopolissacarídeos. Fonte: A autora.

3 FERMENTAÇÃO

A fermentação constitui-se de um processo pelo qual os microrganismos obtêm energia através dos nutrientes cedidos pelo meio de cultivo e geram diferentes produtos naturais relevantes para a indústria a partir de seu crescimento (CASADEI, 2012). Diante disso, os processos fermentativos tornaram-se conhecidos e aplicados a milhares de anos na história, apresentando grande importância econômica. Apesar disso, é válido ressaltar que o sucesso de um processo fermentativo, além da viabilidade do microrganismo aplicado, depende da composição do meio de cultivo, o qual geralmente apresenta fontes de carbono, nitrogênio e outros compostos (MANAN; WEBB, 2018).

Entre os tipos de fermentação encontram-se a fermentação submersa (FS), também chamada de fermentação em estado líquido, e a fermentação em estado sólido (FES). A primeira apresenta como vantagens um maior controle dos parâmetros físico-químicos e a biodisponibilidade dos nutrientes, sendo mais aplicada nos processos industriais. Já a FES é a menos onerosa, mas compreende um processo geralmente mais lento devido às barreiras de difusão impostas pela natureza sólida do meio fermentado e ausência de água livre (CHEN, 2013; FARINAS *et al.*, 2014).

No contexto histórico, a fermentação submersa teve maior notoriedade pela obtenção de vinhos e cervejas, sendo mais tarde aplicada para a obtenção e isolamento de inúmeras biomoléculas. Neste tipo de fermentação, um microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de inóculo, permanecendo em fermentadores com agitação e aeração controlados, correção de pH e temperatura, propiciando maior acessibilidade dos nutrientes pelo organismo vivo (ROVEDA, 2007; SHARMA; OBEROI, DHILLON, 2016). Em contrapartida, é na fermentação em estado sólido em que o inóculo encontra-se em um ambiente que imita o ambiente natural dos fungos (ARORA; RANI, GOSH, 2018).

Para a produção de enzimas, ambos os tipos de fermentação podem ser utilizados. Nesse sentido, Doriya *et al.* (2016) ressalta que a FES apresenta menores chances de contaminação, devido ao menor teor de água e que pode ter elevado rendimento e atividade do produto, o que é corroborado pelos estudos de Subramaniyam e Vimala (2012), Farinas e colaboradores (2014) e Arora, Rani e Gosh *et al.* (2018). Entretanto, ao se tratar de polissacarídeos fúngicos, a fermentação submersa ainda é o método mais aplicado (LI *et al.*, 2016; EL-GHOMENY, 2021).

3.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os microrganismos são capazes de se adaptar ao seu habitat natural. Nessa perspectiva, as condições que o ambiente apresenta, sejam bióticas ou abióticas, podem influenciar no metabolismo microbiano e, conseqüentemente, nas moléculas que são produzidas. O mesmo ocorre com os meios de cultura (um habitat sintético), pois o pesquisador pode definir quais nutrientes serão oferecidos ao microrganismo e ainda em quais condições, como temperatura e pH, seu crescimento ocorrerá. Diante desse cenário, destaca-se também que a quantidade disponível dos nutrientes também pode interferir na produção de biomoléculas microbianas (BARBOSA et al., 2004).

Acerca da produção de polissacarídeos, são fatores relevantes a serem analisados na composição do meio de cultivo:

- a) Fonte de carbono: a utilização dos carboidratos oferecidos pelo meio de cultivo é fundamental para a produção de energia e polissacarídeos pelos fungos (DEACON, 2006). Entre as principais substâncias utilizadas para este fim se encontram: glicose, maltose e sacarose.
- b) Fontes de nitrogênio: estas fontes podem ser orgânicas, como peptona e extrato de levedura, ou inorgânicas, como sulfato de amônio e nitratos em geral. Para avaliar a real influência desse fator deve-se considerar o tipo de microrganismo (BARBOSA et al., 2004).
- c) Microelementos: estes são sais inorgânicos, metais e não metais, essenciais à composição de enzimas, vitaminas, entre outras estruturas celulares (BASU *et al.*, 2015). Entre essas moléculas se destacam na produção de polissacarídeos fúngicos o K_2HPO_4 e $MgSO_4$.
- d) Agitação: variam de acordo com a espécie fúngica. A agitação atua de modo a melhorar a distribuição de nutrientes dissolvidos no meio, bem como a oxigenação.
- e) Temperatura e pH: relacionam-se com a melhor atividade metabólica do microrganismo. Acerca do pH, os microrganismos apresentam mecanismos de modulação do meio que permitem o seu desenvolvimento (VYLKOVA, 2017).

A tabela a seguir (Tabela 2) evidencia a utilização desses diferentes parâmetros no cultivo e produção de polissacarídeos por algumas espécies de microrganismos do gênero *Aspergillus*.

Tabela 2. Meios de cultura e estruturas de polissacarídeos produzidos por *Aspergillus sp.*

| Microorganismo | Temperatura (°C) | Tempo de cultivo | Agitação | pH | Fonte de carbono | Fonte de nitrogênio | Microelementos | Estrutura química dos polissacarídeos | Autor(es) |
|------------------------------|------------------|------------------|----------|-------|--|--|--|---|----------------------------|
| <i>A. sp.</i> Y16 | 25 | 7 dias | Estática | 6-6,5 | Glicose e extrato de malte | Extrato de levedura, peptona e cloreto de amônio | KH ₂ PO ₄ e sea salt | Galactomanana com cadeia lateral de galactofuranose. | CHEN <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>A. versicolor</i> LCI-5-4 | 20 | 30 dias | Estática | 6,5 | Maltose e sorbitol | Extrato de levedura, glutamato e triptofano | KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O e sea salt | (1→6)-α-D-glicopirranose e (1→2)-α-D-manopirranose. | CHEN <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>A. versicolor</i> | 20 | 30 dias | NI | 6,5 | Maltose e sorbitol | Extrato de levedura, glutamato e triptofano | KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O e sea salt | AWP (nome dado ao polissacarídeo) é constituído por uma grande quantidade de (1→6)-α-D-glicopirranose com alguns substituições em C-3 por (1→)-α-D-manopirranose. | CHEN <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>A. terreus</i> | 20 | 45 dias | Estática | 7,5 | Glicose, manitol e maltose | Extrato de levedura e glutamato | KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O e sea salt | Galactomanana ramificado contendo galactofuranose. | WANG <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>A. fumigatus</i> AF1 | 40 | 24 horas | 150 rpm | NI | Solução de palha de arroz pré-tratada com NaOH | Sulfato de amônio | NA | AFEPS (nome dado ao polissacarídeo) composto por arabinose, xilose e glicose. | JIN; ZHAO, 2014 |
| <i>A. versicolor</i> N2bc | 25 | 30 dias | Estática | 6,5 | Glicose, manitol e maltose | Extrato de levedura e glutamato | KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O e sea salt | Mananoglucogalactana com cadeia lateral de galactofuranose. | YAN <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>A. aculeatus</i> | 28 | 13 dias | 120 rpm | 7,2 | Caldo de batata e glicose | NA | NA | WPA e WPB (nomes dados aos polissacarídeos) são similares a mananas e galactomananas. | LI <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>A. terreus</i> | 28 | 8 dias | 98 rpm | 8 | Glicose | Nitato de amônio ou urcia | K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ e MgSO ₄ ·7H ₂ O | Galactomananas, β-glucanas e glucanas semelhantes a glicogênio. | COSTA <i>et al.</i> , 2019 |

Legenda: RPM = rotações por minuto; NI = não informado; NA = não aplicado. Fonte: A autora.

4 CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

No que tange a caracterização de polissacarídeos, a aplicação da Espectrometria de massas (MS) vem ganhando espaço junto à outras técnicas como Espectroscopia no infravermelho (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), uma vez que os estudos na área da metabolômica microbiana estão em ascensão (BELINATO *et al.*, 2019). Tal alternativa é possível porque a MS é um método analítico capaz de detectar moléculas em concentrações muito baixas (pmol), considerando a relação massa-carga (m/z), e ainda identificá-las ao nível molecular (HARRIS, 2008).

Um espectrômetro de massas é formado por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e detector (SKOOG *et al.*, 2010). Diante disso, diferentes combinações de fontes de ionização e analisadores de massas permitem uma variedade de tipos de espectrômetros de massas no mercado. Entretanto, apesar das variedades disponíveis, o tipo de espectrômetro de massas utilizado em cada análise deve ser determinado de acordo com as características de cada estudo, isto é, molécula a ser analisada e tipo de informação desejada (qualitativa ou quantitativa) (HOFFMANN; STROBANT, 2007).

Para análises de polissacarídeos, o espectrofotômetro MALDI-TOF (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization e Time-of-Flight*) é amplamente atribuído por ser capaz de caracterizar moléculas maiores e apresentar alta sensibilidade (HUNG *et al.*, 2012). Nessa perspectiva, LÓPEZ-GARCÍA e colaboradores (2016) demonstraram a aplicação da técnica para caracterização de B-glucanas sem tratamento prévio (derivatização) ou purificação.

Além disto, considerando o peso molecular, Andrade *et al.* (2015) obtiveram bons resultados de detecção em uma extensão de massas de 4000 a 20000 m/z em um estudo comparativo de diferentes matrizes e solventes para a análise de microalgas por MALDI-TOF MS. Entretanto, outros estudos apontam a metodologia como mais eficaz na análise moléculas de massas intermediárias (a partir de m/z 500), fazendo-se necessário, por vezes, um tratamento para hidrólise parcial dos glicanos, formando-se assim oligossacarídeos (CHIZHOV *et al.*, 1998; DEERY; STIMSON, CHAPPELL, 2001; GHOSH *et al.*, 2008; GÜNL; KRAEMER, PAULY, 2011; HUNG *et al.*, 2012; KIMURA *et al.*, 2012; AI *et al.*, 2015).

Quanto à execução, a metodologia MALDI inicia-se com a deposição da amostra em uma placa junto com uma matriz até que a mistura fique cristalizada. Após a cristalização, a placa é irradiada com um laser, cuja energia é absorvida pela matriz, levando à ionização da amostra. Em seguida, os íons são acelerados por meio de um campo eletrostático através de um tubo submetido a vácuo, até colidirem com um detector no fim do tubo. O tempo necessário até a colisão é chamado “tempo de voo”, ou *Time of Flight* (TOF), a qual depende da relação

massa/carga dos íons. Após a detecção, o equipamento gera um gráfico com a relação massa/carga em um eixo e a quantidade de cada íon em outro. Por fim, o espectro da amostra é então comparado com espectros de amostras de referência (CROXATTO; PROD'HOM, GREUBM, 2011; PATEL, 2013)

De acordo com Suryanarayanan e colaboradores (2009), os fungos endofíticos, como *A. aculeatus* (CAMPOS *et al.*, 2005), são importantes produtores de compostos com bioatividades devido ao intenso metabolismo que esses organismos apresentam. Entretanto, no que tange os polissacarídeos, as atividades biológicas ainda se relacionam intimamente com diferentes parâmetros físico-químicos, como solubilidade, estrutura, massa molecular e ramificações da cadeia estrutural, e de como eles interagem com outras macromoléculas, como proteínas (SOLTANIAN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2016). Assim, a caracterização é uma etapa imprescindível no estudo dos polissacarídeos fúngicos e suas aplicações.

5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os microrganismos são capazes de produzir estruturas moleculares variadas e complexas que apresentam múltiplas funções para sua sobrevivência nos diferentes ecossistemas (DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2016). Essas mesmas biomoléculas, cruciais no metabolismo microbiano, quando isoladas, podem apresentar atividades biológicas de suma importância para a humanidade. Nessa perspectiva, entre as bioatividades pode-se citar a ação antimicrobiana, antitumoral e a avaliação da citotoxicidade dessas moléculas sob células normais do corpo. Quando explanadas, as biomoléculas microbianas detêm grande potencial comercial e industrial (SHARMA *et al.*, 2020).

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Entende-se como antimicrobianos substâncias capazes de inibir ou debelar o desenvolvimento de microrganismos, a exemplos dos antibióticos e antifúngicos. Nessa perspectiva, a descoberta dessas moléculas apresentou grande relevância nas áreas da saúde e agricultura, permitindo a sobrevivência dos organismos vivos frente ao ataque microbiano. Entretanto, o seu uso repetitivo e a longo prazo contribuiu para a resistência dos microrganismos patogênicos, fazendo-se necessário a investigação de novos compostos bioativos, incluindo os produtos naturais de origem microbiana.

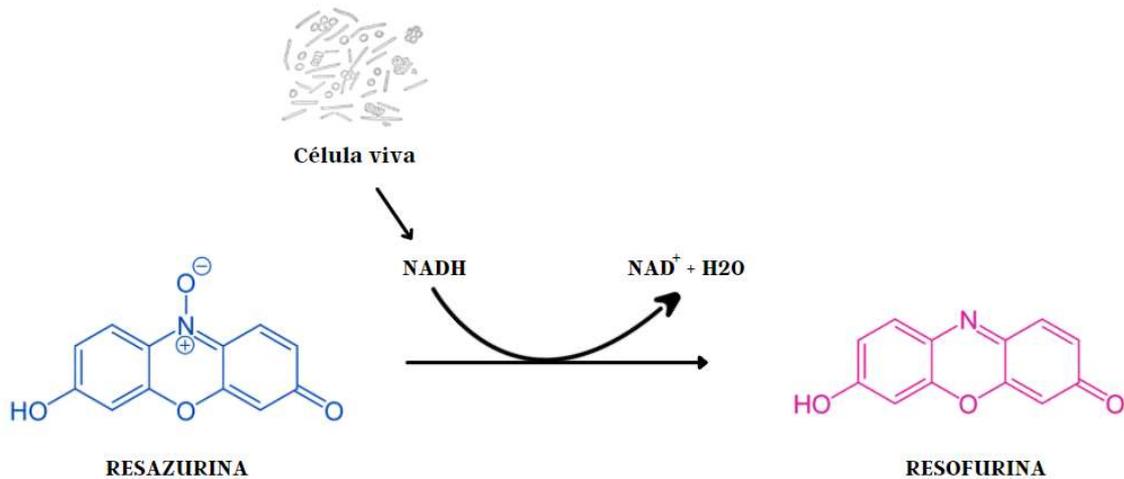
Diante desse cenário, a avaliação da atividade antimicrobiana de exopolissacarídeos de origem fúngica ainda está em progresso, sendo mais comum os estudos com polissacarídeos extraídos da parede celular, como as β -glucanas (NOVAK; VETVICKA, 2009). Tal abordagem

é uma alternativa viável, uma vez essas moléculas podem apresentar mecanismos de ação diferentes dos produtos convencionais disponíveis no mercado.

Para análise da atividade antibacteriana, os métodos mais empregados têm sido: (i) concentração inibitória mínima (MIC), isto é, menor concentração do composto que inviabiliza o crescimento do microrganismo; (ii) concentração bactericida mínima (MBC), sendo a menor concentração capaz de matar pelo menos 99,9% dos microrganismos; e (iii) teste de difusão em ágar, o qual permite avaliar a ação do composto pela formação e tamanho do halo de inibição (NCCLS, 2003).

No caso das metodologias de MIC e MBC, utiliza-se o corante resazurina para confirmar se não houve crescimento bacteriano nos poços das placas-teste, as quais não houveram crescimento visível. Tal reagente é um indicador redox de coloração azul, que na presença de crescimento bacteriano, isto é, a partir da doação de um elétron pelo NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) resultante do metabolismo dessas células, é convertido em resofurina de coloração róseo-avermelhada (Figura 4). Após o tempo de reação, faz-se a leitura das placas em espectrofotômetro a 570nm.

Figura 4 - Identificação da viabilidade celular pelo corante resazurina.



Fonte: A autora.

A identificação de moléculas antimicrobianas apresenta relevância econômica devido às suas extensas aplicações contra microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, responsáveis por infecções hospitalares severas, *Xanthomonas campestris*, responsável pela mancha bacteriana em tomateiros, além de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, contaminantes frequentes de alimentos.

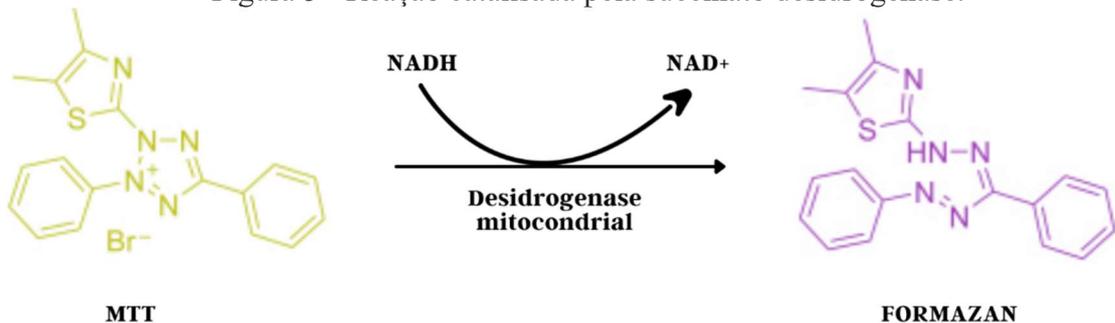
5.2 CITOTOXICIDADE

Compreende-se como citotoxicidade a capacidade que uma substância inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões às células, havendo diferentes mecanismos descritos capazes de culminar nesta ação (ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2019).

A determinação da citotoxicidade de um composto faz-se necessária, principalmente, em casos que a substância tenha uma aplicação em potencial em organismos vivos, contribuindo para calcular seus efeitos (LEMOS, 2018). Para tanto, devido ao maior controle do uso de animais experimentais, métodos com uso de cultura de células vêm sendo recomendados para avaliar o perfil biológico de compostos a serem colocados em contato com tecidos vivos (PITHON *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o ensaio com o reagente brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) avalia a atividade metabólica celular através da ação da succinato desidrogenase, enzima localizada na mitocôndria (CHACON; ACOSTA, LEMASTERS, 1997). O método baseia-se na capacidade celular de converter o reagente em questão a MTT-formazano, um composto insolúvel e coloração arroxeadada (KUETE; KARAOSMANOĞLU, SIVAS, 2017). Para tanto, o MTT é absorvido por endocitose, é reduzido pelas enzimas mitocondriais e é então transportado para as superfícies celulares para formar formazanos de MTT, no entanto, tal reação só é possível em células vivas (LÜ *et al.*, 2012).

Figura 5 - Reação catalisada pela succinato desidrogenase.



Fonte: A autora.

Apesar de ser considerado padrão ouro para testes de citotoxicidade, no ensaio de MTT a conversão em cristais de formazan depende da taxa metabólica e do número de mitocôndrias, o que pode influenciar nos resultados (LÜ *et al.*, 2012; VAN TONDER; JOUBERT, CROMARTY, 2015).

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E pH NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS POR *Aspergillus aculeatus*

Thamara Louisy Santos Brito^{1,*}, Jabson Meneses Teixeira², Erlon Oliveira Xavier¹, Thamilly Moreira Silva¹, Mateus Sousa Porto¹, Thais Santos Moraes Lima¹, Ana Laura Santos Sirino¹, Janaína Silva de Freitas¹

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga-BA.

²Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus-BA.

*Autora correspondente: thaamaralouisy@hotmail.com

RESUMO

Os fungos são seres ubíquos capazes de colonizar e se adaptar a diferentes espaços no meio ambiente. Apesar disto, as condições bióticas e abióticas a que estes microrganismos são expostos interferem no seu metabolismo e, portanto, em seu desenvolvimento. Considerando este fato e a relevância econômica do gênero *Aspergillus*, o presente trabalho objetivou avaliar o crescimento fúngico e a produção de polissacarídeos, pela espécie *Aspergillus aculeatus*, em dois meios de cultura com composições e pH distintos: (1) glicose e caldo de batata com pH 7,2 e (2) extrato de malte, glicose, extrato de levedura e peptona com pH 5,5. A avaliação do crescimento fúngico se deu através de fermentação submersa e em meio sólido. No primeiro, o fungo foi crescido nos meios mencionados durante 13 dias, a 120 rpm e 30°C, seguido da filtração do meio, secagem e pesagem do micélio. Já em meios sólidos, os meios foram acrescidos de ágar e as placas de petri foram incubadas em estufa por 13 dias, a 30°C, dos quais as áreas foram medidas nos dias 3, 5 e 7 após incubação. Ao final dos 13 dias, em ambos os casos, houve a aferição do pH final. Para a avaliação da produção de polissacarídeos, utilizou-se somente os produtos da fermentação submersa, isto é, o micélio para extração de polissacarídeos da parede celular e meio de cultura para obtenção de polissacarídeos extracelulares. Os dados foram computados e analisados pelo teste estatístico *T-student* bicaudal. Como resultado foi possível observar um melhor desenvolvimento do fungo no meio de cultura 2, sob fermentação submersa ($p < 0,01$), porém não houve diferença entre o crescimento nos meios de cultura sólido ($p > 0,4$). O meio 1 apresentou, visivelmente, maior quantidade de esporos. Observou-se ainda que, na fermentação submersa, *A. aculeatus* alcalinizou os dois meios estudados, entretanto, em meio sólido, o meio 1 tornou-se mais ácido ($p < 0,001$) e o meio 2, básico ($p < 0,001$). Quanto a produção de polissacarídeos, houve a obtenção de maior teor de polissacarídeos de biomassa em detrimento de exopolissacarídeos ($p < 0,01$), porém quando avaliados os grupos separadamente, não houve diferença entre os meios estudados. O presente trabalho evidencia os efeitos que o ambiente exerce sobre o metabolismo e crescimento fúngico, contribuindo ainda para os conhecimentos sobre a espécie *A. aculeatus*.

Palavras-chave: Gênero *Aspergillus*. Metabolismo microbiano. Bioprospecção. Parede celular. Exopolissacarídeos.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos capazes de colonizar diferentes ambientes naturais e antropogênicos da Terra (KOWALCZYK *et al.*, 2014). Tal habilidade decorre, principalmente, da capacidade destes seres em perceber, se adaptar e modular as condições ambientais em que eles se encontram (VYLKOVA, 2017). Deste modo, o metabolismo fúngico atua de forma a contribuir para a sua sobrevivência, produzindo e excretando moléculas importantes para lidar com cada situação.

Nessa perspectiva, entre os fatores que podem influenciar no crescimento fúngico destaca-se a composição do meio de cultura destinado à realização dos processos fermentativos, uma vez que os macro e microelementos são importantes para a biossíntese de moléculas presentes no organismo microbiano, como carboidratos e proteínas (BASU *et al.*, 2015). Seguindo esse viés, o meio de cultura pode afetar desde a produção de esporos até as demais fases da curva de crescimento, sendo um meio de cultura ideal aquele que viabiliza o melhor desenvolvimento fúngico (MELETIADES *et al.*, 2001). Tendo em vista esse cenário, a avaliação das fontes de carbono, nitrogênio, bem como o pH, são alguns dos pontos a serem considerados, inclusive em seus habitats naturais (SILVA-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

No que tange ao pH, os fungos são capazes de crescer e se desenvolver em uma ampla faixa (BOUSSET *et al.* 2018). Apesar disso, alterações no pH do meio em que o microrganismo se encontra, seja um aumento ou diminuição, correspondem a estímulos celulares importantes por influenciarem na atividade de enzimas, as quais geralmente apresentam um pH ideal para sua atividade máxima (MARKINA-IÑARRAIRAEGUI *et al.*, 2020). Ainda nesse sentido, os fungos apresentam um sistema complexo de adaptação ao pH através da via denominada Pal/Rim-pH, a qual atua na regulação, isto é, ativação ou repressão, da expressão de inúmeros genes (FREITAS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2021).

Deste modo, compreende-se que as diferentes condições a que um microrganismo é submetido podem afetar a expressão de todas as biomoléculas que o compõe, incluindo os polissacarídeos. Tais estruturas compõem um dos grupos mais importantes de metabólitos fúngicos pois constituem a parede celular (polissacarídeos da biomassa) e podem ainda ser excretados (polissacarídeos extracelulares) para compor a matriz extracelular, a qual também contribui para a sobrevivência microbiana (CHUNG e BROWN 2020).

Nesse sentido, os fungos do gênero *Aspergillus* foram relatados como produtores de polissacarídeos em condições de cultivo e pH distintos e com aplicações biológicas que lhe conferem alto valor agregado (AMER *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; EL-GHONEMY, 2021). Além disso, as espécies do gênero vêm sendo estudadas há anos, apresentando aplicações na

produção de alimentos fermentados (PUNIA *et al.*, 2021) e obtenção de moléculas bioativas, como os polissacarídeos e enzimas (COSTA *et al.*, 2019) ou ainda na biodeterioração de frutos (VON HERTWIG *et al.*, 2018) e elementos históricos, como objetos de madeira e pinturas (ROMERO *et al.*, 2021).

Tendo em vista a vasta aplicação biotecnológica de *Aspergillus* e considerando a influência que o ambiente exerce no metabolismo fúngico, o presente trabalho visa elucidar a produção de polissacarídeos pela espécie *Aspergillus aculeatus* em dois meios de cultura de composições e pH distintos, bem como a influência destes no crescimento micelial em meio sólido (área) e em fermentação submersa (peso).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

O fungo *A. aculeatus*, CCT 3084 foi adquirido da Coleção de Culturas Tropical – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (CCT – FAT), localizado em Campinas - São Paulo. O microrganismo foi mantido no laboratório pelo método de sílica-gel (PERKINS, 1962).

2.1.1 Inóculo

A. aculeatus foi cultivado em meio de cultura contendo ágar (20 g.L⁻¹), extrato de malte (20 g.L⁻¹), glicose (20 g.L⁻¹) e peptona (1 g.L⁻¹) por 5 dias a 30°C, para ativação. Em seguida, a suspensão de esporos foi preparada em solução Tween 80, a 0,1% (v/v) e inoculada nos meios de cultura para fermentação submersa a 1×10^8 (ZHAO *et al.*, 2020 - adaptado) e 1×10^6 esporos.mL⁻¹ em meio sólido.

2.2 MEIOS DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O fungo foi inoculado em dois meios de cultivo distintos para fermentação submersa. O meio de cultura 1 foi formulado com caldo de batata (200 g.L⁻¹) e glicose (10 g.L⁻¹) com pH inicial 7,2 (LI *et al.*, 2016) e o meio de cultura 2 foi preparado com extrato de malte (10kg/m³), extrato de levedura (10kg/m³), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹) com pH inicial 5,5. O processo fermentativo ocorreu em erlenmeyers de 250mL, contendo 200mL de meio de cultura, a 30°C e 120 rpm, por 13 dias em incubadora shaker (SOLAB SL-22) (LI *et al.*, 2016 – adaptado). Ao final do processo, realizou-se análises físico-químicas, bem como a medição do pH final e extração dos polissacarídeos.

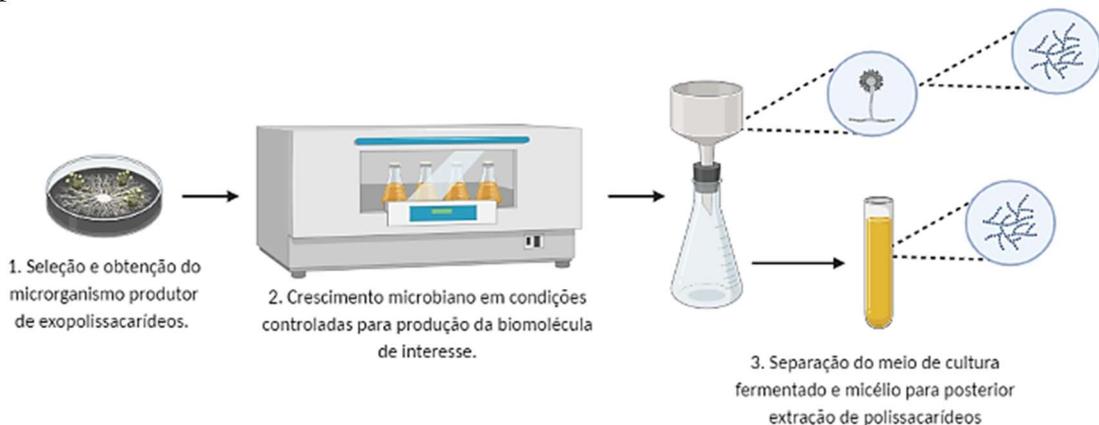
2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO E DO pH EM MEIO SÓLIDO

Para esta etapa do estudo, foram utilizados os meios de cultura 1 e 2, descritos no item 2.2, acrescidos de ágar (20 g.L^{-1}), para avaliação do crescimento fúngico e pH. Posteriormente ao preparo dos meios de cultura, os mesmos foram vertidos em placa de petri. Após solidificação do meio de cultura foi realizado um poço no ágar de cada placa com ponteiros de 1 mL, previamente autoclavadas, onde foi pipetado 1×10^6 esporos. mL^{-1} de *A. aculeatus*. Em seguida as placas foram colocadas em estufa (SOLAB SL-101), a 30°C e fotografadas nos dias 3, 5 e 7 após a inoculação nos diferentes meios. Foi utilizado o programa *ImageJ* para determinar a área do micélio. O pH final foi verificado no 13º dia (FREITAS *et al.*, 2007).

2.4 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

O fermentado de *A. aculeatus* foi separado do micélio por filtração com auxílio de funil de Büchner. O meio de cultura foi utilizado para a extração de exopolissacarídeos (EPS) e o micélio foi utilizado para a obtenção dos polissacarídeos da parede celular, mencionados aqui principalmente como polissacarídeos de biomassa (Figura 1).

Figura 1 - Esquema da metodologia inicial para obtenção de polissacarídeos da biomassa e exopolissacarídeos.



Fonte: Autores.

Para extração dos polissacarídeos da biomassa, os micélios foram secos até peso constante. Os pesos foram anotados e utilizados também para avaliar a influência dos meios de cultivo no crescimento fúngico. Posteriormente, aplicou-se o método de extração alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) a 5% onde a cada 0,5 g da biomassa foi adicionado 50 mL da solução alcalina. O material foi colocado em banho-maria a 90°C , por três (3) horas. Em seguida, a suspensão foi centrifugada em 5000 rpm, por 15 minutos, à 4°C . Ao sobrenadante foram adicionados etanol absoluto (três volumes), agitado vigorosamente e mantido *overnight*

a 4°C. A suspensão hidroalcoólica obtida contendo os polissacarídeos foi centrifugada 5000 rpm, por 15 minutos. O precipitado contendo os polissacarídeos foi liofilizado, pesado e armazenado para posterior avaliação das atividades biológicas e caracterização química. O rendimento do produto calculado por porcentagem (%) de polissacarídeos (g) por peso da biomassa (g) (MENDES, 2018 - adaptado).

Na extração de exopolissacarídeos, foi utilizado o meio de cultura. Este foi centrifugado a 5000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado, adicionado a três volumes de etanol 95% e agitado vigorosamente para precipitar os EPS bruto. Em seguida, a solução foi colocada em freezer *overnight* para aumentar o tempo de precipitação do material. Após esse período de incubação, a solução foi centrifugada a 5000 rpm, por 15 minutos, à 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo os polissacarídeos foi liofilizado, pesado e armazenado para análises futuras. O rendimento do produto foi calculado pela concentração de polissacarídeos (g) por quantidade de meio de cultivo (mL) (COSTA *et al.*, 2019 - adaptado).

2.5 ANÁLISES FISÍCO-QUÍMICAS

Foram coletadas amostras do processamento dos polissacarídeos de biomassa e exopolissacarídeos para análises físico-químicas. Para avaliação do conteúdo total de açúcares foi utilizado o método fenol-ácido sulfúrico, utilizando glicose como padrão, conforme descrito por Dubois (1956). Para avaliação do conteúdo proteico foi aplicado o método de Bradford (1996), utilizando albumina como padrão.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

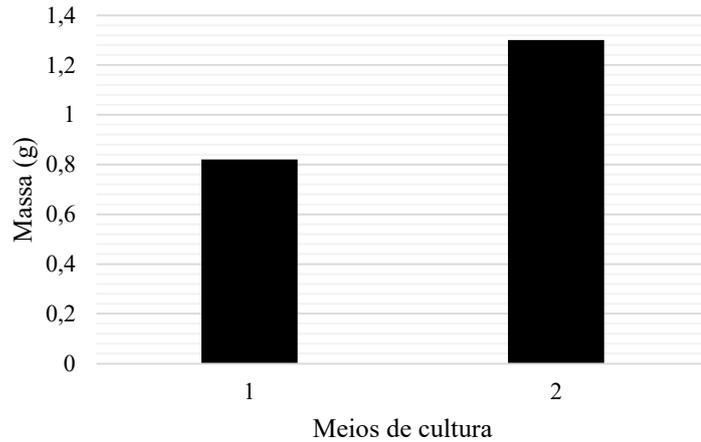
Os dados obtidos foram analisados através do teste estatístico *T-student* bicaudal no Excel (2016). Foi considerado o intervalo de confiança de 95%, sendo, portanto, significativos os resultados com $p\text{-valor} < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *A. aculeatus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Após 13 dias de cultivo em fermentação submersa nos diferentes meios de cultura, o micélio fúngico foi seco e pesado. Deste modo, foi possível observar que a média da biomassa crescida no meio de cultura 1 foi inferior à média da biomassa do meio de cultura 2 ($p < 0,01$), sendo estas médias, respectivamente, $0,817 \pm 0,036$ g e $1,297 \pm 0,06$ g (Figura 2).

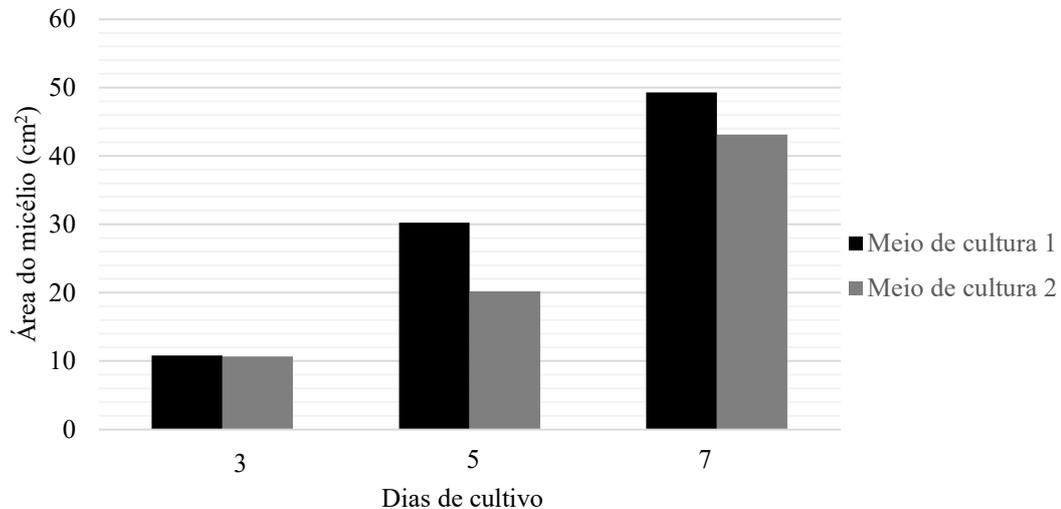
Figura 2 - Peso do micélio de *A. aculeatus* em diferentes meios de cultura líquido.



Legenda: Meio de cultura líquido 1 = caldo de batata (200g.L⁻¹) e glicose (10 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; Meio de cultura líquido 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), pH inicial 5,5.

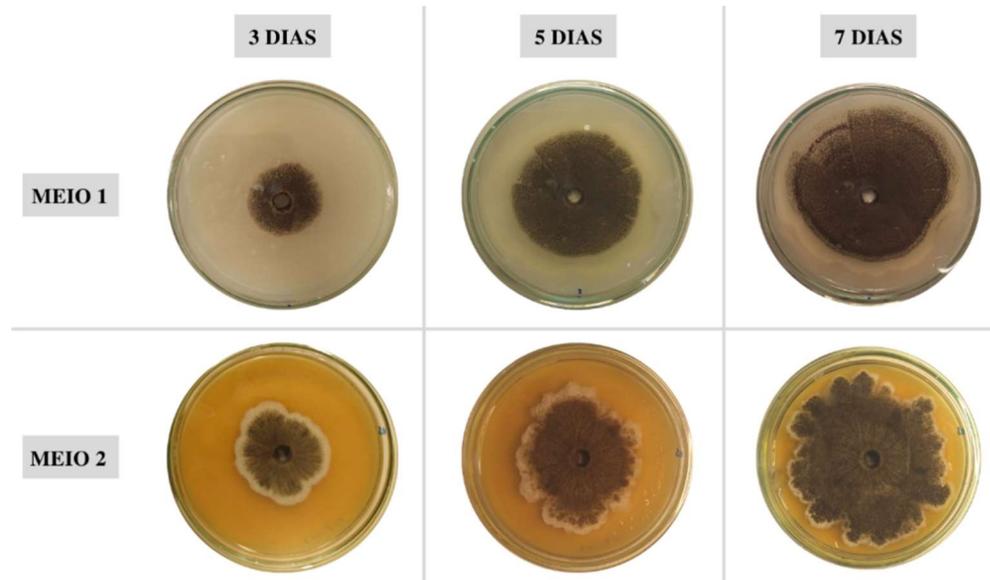
No meio sólido, as áreas do micélio foram calculadas nos dias 3, 5 e 7 após a inoculação de *A. aculeatus*. Destes, somente no dia 5 constatou-se uma média de área estatisticamente superior no meio de cultura 1, em relação ao meio de cultura 2 ($p < 0,01$). Ao se considerar o conjunto de dados, não houve diferença significativa nas áreas de micélio entre os meios de cultura estudados ($p > 0,4$). A comparação dos valores médios das áreas de crescimento fúngico nas placas de petri, nos diferentes meios de cultura, podem ser visualizadas na figura 3. Em seguida, a figura 4 revela as imagens do crescimento fúngico de acordo com os dias de incubação.

Figura 3 - Crescimento do micélio de *A. aculeatus* em diferentes meios de cultura sólido



Legenda: Meio de cultura sólido 1 = caldo de batata (200g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; Meio de cultura sólido 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹), pH inicial 5,5.

Figura 4 - Crescimento de *A. aculeatus* por 7 dias de cultivo em meio de cultura sólido.



Legenda: Meio de cultura sólido 1 = caldo de batata (200g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; Meio de cultura sólido 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹), pH inicial 5,5. Fonte Autores.

De acordo com Beatriz e Cambaza (2015), os fungos podem utilizar diferentes fontes de carbono da mesma maneira, como glicose, maltose, sacarose e amido. Nesse sentido, no meio de cultura 1, as principais fontes de carbono foram glicose e amido e no meio de cultura 2, glicose e extrato de malte. Posto isto, estima-se que o melhor desenvolvimento de *A. aculeatus* no meio de cultura 2 na fermentação submersa tenha sido provocado pela presença das fontes de nitrogênio, peptona e extrato de levedura, as quais estavam ausentes no meio de cultura 1.

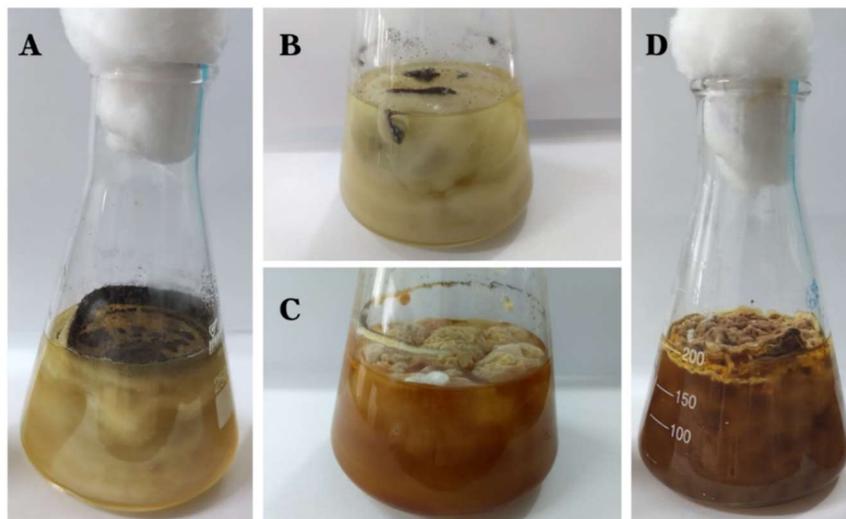
O nitrogênio é um elemento fundamental para a formação de estruturas biológicas, como proteínas e ácidos nucléicos (PEREZ-CUESTA *et al.*, 2021). Acerca do extrato de levedura, este corresponde a uma fonte orgânica de nitrogênio, além de apresentar fósforo e outros macro e micronutrientes importantes para o desenvolvimento fúngico (DZURENDOVA *et al.*, 2020). Ao se avaliar fontes de nitrogênio, Germec e colaboradores (2020) relataram que o uso de sulfato de amônio teve um efeito negativo na produção de inulase por *Aspergillus niger*, enquanto extrato de levedura e peptona foram favoráveis a tal produção. Por outro lado, *Aspergillus terreus* sofreu alterações morfológicas e teve a produção de (+)-geodin e ácido astérico inibida em altas concentrações de extrato de levedura (BORUTA *et al.*, 2021). Com isto, é possível afirmar que tanto o tipo da fonte de nitrogênio (orgânica ou inorgânica) quanto a quantidade atribuída desses elementos podem influenciar no crescimento e metabolismo fúngico, o que justifica o resultado encontrado nesse estudo.

Além disso, no estudo de Silva-Sanchez, Soares e Rousk (2019) foi observado que tratamentos no solo que aumentaram o pH resultaram em taxas de crescimento de fungos reduzidas. Deste modo, o pH de 7,2 no meio de cultura 1 (mais alcalino) pode ter influenciado no crescimento micelial, o que corrobora com o melhor crescimento fúngico no meio de cultura com pH mais ácido (meio de cultura 2).

A diferença entre o crescimento microbiano observado nos meios de cultura avaliados na fermentação submersa e em placa de petri (meio de cultura sólido), pode estar relacionada a disponibilidade de nutrientes. Na fermentação submersa, além do maior teor de água, houve agitação, o que favorece o acesso às moléculas pelos microrganismos (SHARMA *et al.*, 2016). Por outro lado, em meio sólido e estático, é necessário um maior empenho microbiano, como a secreção aumentada de enzimas, para assimilação dos compostos (ARORA *et al.*, 2018).

Ainda ao comparar o comportamento de *A. aculeatus* nos diferentes meios, foi possível constatar uma maior disposição visível de esporos no meio de cultura 1, enquanto o meio 2 apresentou uma região vegetativa melhor definida. *A. aculeatus* faz parte da seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*, a qual apresenta, entre as características marcantes, a presença de esporos negros responsáveis por sua reprodução (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). Na figura 4, acerca dos meios de cultura sólidos, pode-se visualizar uma maior região de coloração preta no meio de cultura 1, bem como a região branca (vegetativa) na periferia do micélio no meio cultura 2. Tais traços também foram observados na fermentação submersa (Figura 5).

Figura 5 - Crescimento de *A. aculeatus* no 13º dia de fermentação submersa em diferentes meios de cultura.



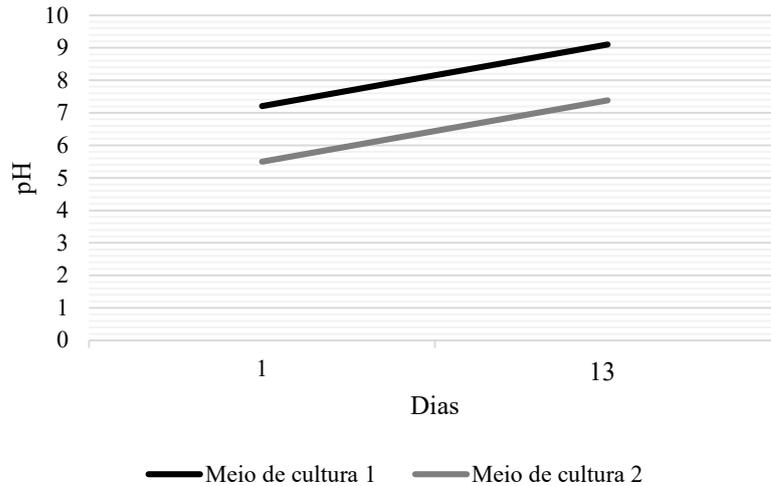
Legenda: A e B = crescimento de *A. aculeatus* no meio de cultura 1, composto por caldo de batata (200 g.L⁻¹) e glicose (10 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; C e D = crescimento de *A. aculeatus* no meio de cultura 2, constituído por extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), pH inicial 5,5. Fonte: Autores.

Sugimoto e Oda (2021) relataram que diferentes espécies de fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus sojae*, quando cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio e/ou na presença de polímeros hidrofóbicos, revelaram uma maior produção de esporos; o que corrobora com o resultado deste trabalho, onde o maior teor de esporos foi visualizado no meio com fonte de nitrogênio ausente (meio de cultura 1). Ainda nesse sentido, os próprios polissacarídeos excretados pelo metabolismo microbiano, como α -1,3-glucano, podem agir como compostos insolúveis que estimulam a produção de esporos, além de contribuir para a agregação dos conídios em germinação, o que é visto na figura 5(B) (FONTAINE *et al.* 2010). Os conídios são esporos assexuados que permitem a sobrevivência dos fungos até que eles cheguem em ambientes adequados e se desenvolvam em micélios, contribuindo assim para a distribuição das espécies no espaço e tempo (NOVODVORSKA *et al.*, 2016; DIJKSTERHUIS, 2019).

Apesar destes dados para esporulação, a germinação, a qual origina a porção vegetativa, associa-se com a presença de outros nutrientes além de carboidratos, como aminoácidos e sais inorgânicos (OSHEROV e MAY, 2001). Tal fato justifica o desenvolvimento de *A. aculeatus* observado no meio de cultura 2. A germinação é caracterizada pelo inchaço por absorção de água e formação de tubo germinativo (DIJKSTERHUIS, 2019). A exemplo da influência de outros nutrientes nesta etapa, a adição de NaNO_3 , KH_2PO_4 , ou MgSO_4 à glicose aumentou em 5,4% a germinação de conídios de *A. niger* e em 10,99% quando adicionado dois destes compostos (IJADPANAHSARAVI *et al.*, 2021). Além disso, o pH na faixa de 5-6 também favoreceu de germinação de fungos filamentosos no estudo de Kalai *et al.* (2017) e Santos, Chaves e Sant'ana (2020).

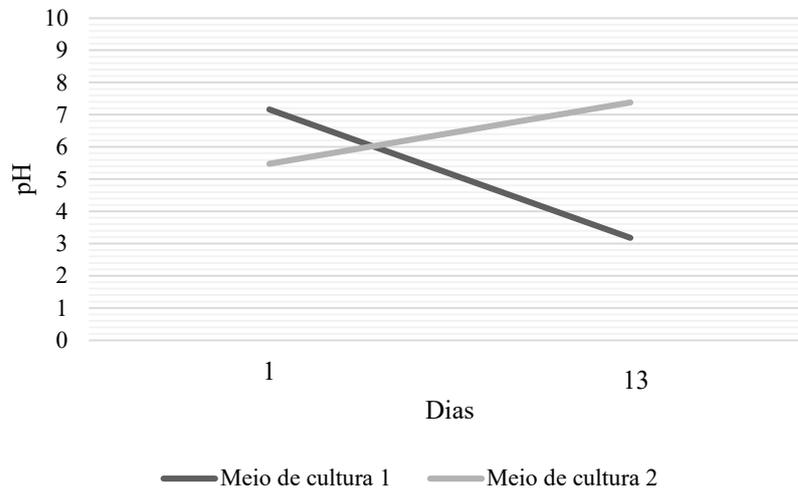
3.2 MODULAÇÃO DO pH

Neste trabalho, ao final de 13 dias de fermentação submersa, foi constatado que *A. aculeatus* aumentou o pH sob fermentação submersa nos dois meios de cultura avaliados. Foi identificado que no meio de cultura 1 o pH foi alterado de 7,2 para $9,11 \pm 0,24$ ($p < 0,001$) e no meio de cultura 2 o pH foi ajustado de 5,5 para $7,39 \pm 0,33$ ($p < 0,001$) pela ação do microrganismo (Figura 6).

Figura 6 - Modulação do pH na fermentação submersa por *A. aculeatus*

Legenda: Meio de cultura 1 = caldo de batata (200g.L⁻¹) e glicose (10 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; Meio de cultura 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), pH inicial 5,5.

Em meio de cultura sólido, *A. aculeatus* se comportou no meio 2 de modo semelhante ao observado na fermentação submersa, aumentando pH de 5,48 para $8,2 \pm 0,07$ ($p < 0,001$). Entretanto, a modulação vista no meio de cultura 1 foi contrária, ocorrendo uma queda acentuada do pH de 7,17 para $3,18 \pm 0,17$ ($p < 0,001$) (Figura 7).

Figura 7 - Modulação do pH dos meios de cultura sólido por *A. aculeatus*

Legenda: Meio de cultura sólido 1 = caldo de batata (200g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹), pH inicial 7,17; Meio de cultura sólido 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹), pH inicial 5,48.

No que tange o cultivo em meio sólido, Zhao e colaboradores (2020) apresentaram um resultado semelhante ao ocorrido no meio de cultura 1, composto por caldo de batata e glicose. No estudo mencionado, no quinto dia de fermentação de polpa de batata por *A. aculeatus*, o pH foi modulado de 6,05 para 3,76. Estima-se que tal decaimento seja decorrente do favorecimento

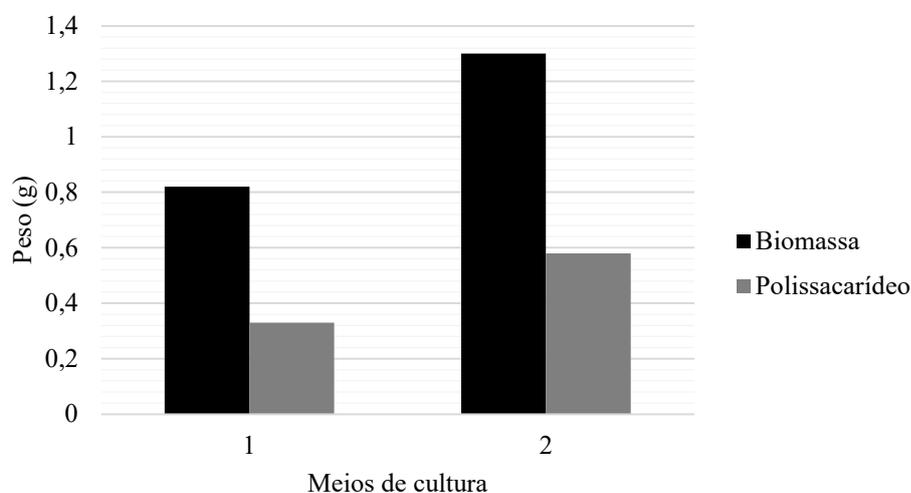
da produção de ácidos orgânicos pela espécie fúngica nesse meio, uma vez que a produção desses compostos já foi relatada anteriormente por esta espécie (YODSING *et al.*, 2018).

Diante desses resultados, pode-se salienta a importância da capacidade dos fungos de monitorar e se adaptar ao ambiente em que eles se encontram, conferindo a esses microrganismos versatilidade fisiológica sob diversas condições de cultivo, para produção de biomoléculas. Os mecanismos mais gerais associados a essa adaptação relacionam-se com a regulação da expressão gênica e outros ajustes intracelulares, incluindo frente as diferentes condições de pH (PICAZO *et al.*, 2020). Nesse sentido, dentro do gênero *Aspergillus*, a espécie *A. nidulans* foi a mais atribuída nos estudos dos mecanismos de reconhecimento e modulação do pH, sendo estes conservados em outras espécies fúngicas (LI *et al.*, 2021).

3.3 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS POR *A. aculeatus* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Nesse estudo foi identificada a produção de polissacarídeos nos dois meios de cultura distintos em fermentação submersa. Os polissacarídeos da parede celular, retratados aqui também como polissacarídeos da biomassa, apresentaram um rendimento similar em ambos os meios de cultura estudados. Deste modo, mesmo com o peso do micélio no meio de cultura 1 sendo inferior ao meio de cultura 2 ($p < 0,001$), resultado também observado no peso de polissacarídeos obtidos da biomassa ($p < 0,01$) (Figura 8), o rendimento das moléculas de interesse obtidas a partir dos micélios foi, respectivamente, $40 \pm 0,06\%$ e $44 \pm 0,07\%$, cuja diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0,4$).

Figura 8 - Produção de polissacarídeos a partir da biomassa (parede celular) de *A. aculeatus*



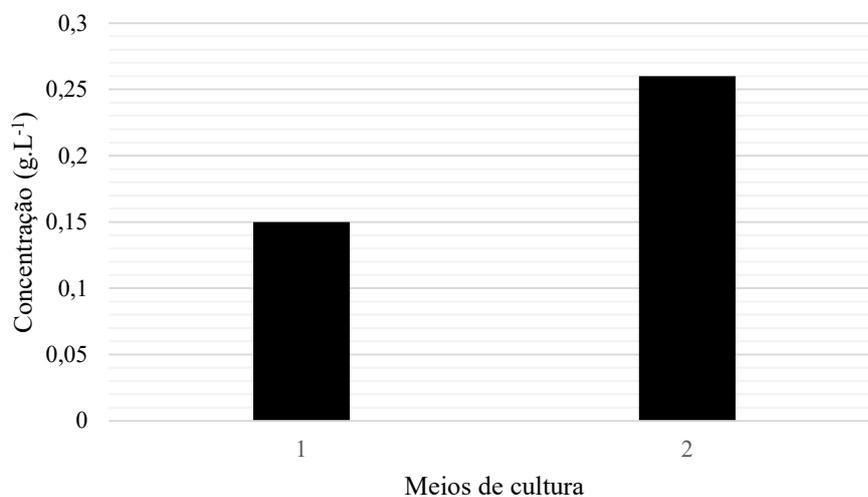
Legenda: Meio de cultura 1 = caldo de batata (200 g.L^{-1}) e glicose (10 g.L^{-1}), pH inicial 7,2; Meio de cultura 2 = extrato de malte (10 g.L^{-1}), extrato de levedura (10 g.L^{-1}), glicose (10 g.L^{-1}) e peptona (5 g.L^{-1}), pH inicial 5,5.

O rendimento equivalente de polissacarídeos extraídos em ambas amostras pode ser decorrente de limitações na ação do NaOH 5% na solubilização desses compostos. Em estudos abordando celulose bacteriana e de origem vegetal, foi relatado que a concentração dessa solução é importante no processo de diluição de polissacarídeos, de modo que soluções com concentrações entre 5-7% podem ser insuficientes para dissolver totalmente tais compostos, bem como concentrações elevadas com baixo teor de água favorecem a formação de cristais (mercerização) (DUCHEMIN, 2015; FARIA-TISCHER *et al.*, 2015).

Quanto a produção de exopolissacarídeos, esta foi inferior aos teores de polissacarídeos obtidos a partir da biomassa de *A. aculeatus* no meio de cultura 1 ($p < 0,01$) e no meio de cultura 2 ($p < 0,001$). Este resultado era esperado, pois os fungos não secretam polissacarídeos na mesma proporção que os produzem para sua composição estrutural. Deste modo, os exopolissacarídeos são excretados em condições especiais, como em caso de estresse frente às condições ambientais ou mesmo para auxiliar em processos infecciosos (CHUNG e BROWN, 2020).

Quando analisados entre si, a produção de exopolissacarídeos nos dois meios de cultivo não apresentou diferença significativa utilizando o teste *T-student* bicaudal ($p > 0,2$), padronizado neste trabalho. A figura 9 demonstra a concentração em gramas por litro de polissacarídeos nos dois meios de cultura estudados, sendo o cálculo realizado considerando-se o valor do meio de cultura atribuído a cada erlenmeyer de fermentação (200 mL). É válido ressaltar que os mecanismos de excreção de polissacarídeos podem ser complexos, dependendo de outros fatores, além do meio e pH, como agitação e aeração (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

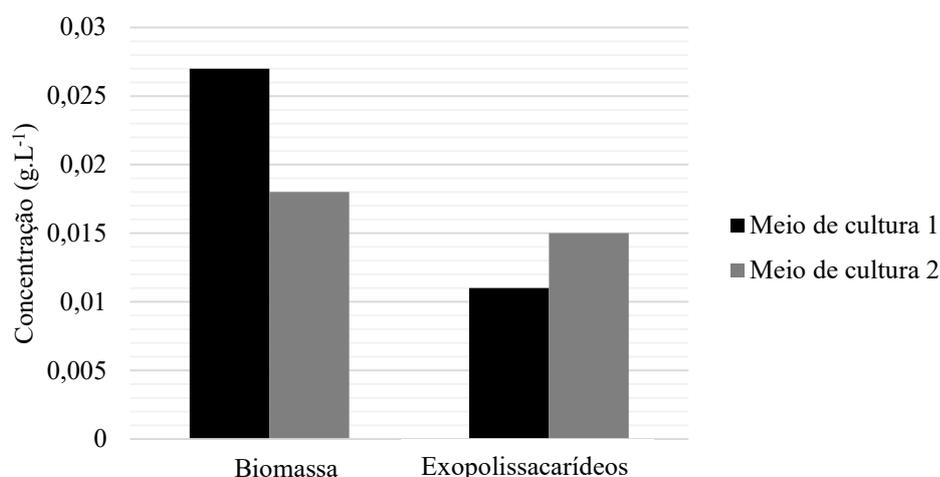
Figura 9 - Produção de exopolissacarídeos obtidos a partir de *A. aculeatus*, em diferentes meios de cultura



Legenda: Meio de cultura 1 = caldo de batata (200 g.L⁻¹) e glicose (10 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; Meio de cultura 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), pH inicial 5,5.

As análises físico-químicas foram atribuídas neste trabalho como forma de confirmação da estrutura molecular avaliada. Nesse sentido, em todas as amostras os polissacarídeos foram detectados pelo método Fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956), o qual identifica açúcares totais. Considerando que tais moléculas podem encontrar-se associados a proteínas, o método de Bradford (BRADFORD, 1976) também foi aplicado de modo que as concentrações proteicas obtidas estão presentes a seguir (Figura 10). Não houve diferença estatística entre a concentração de proteínas nas amostras da biomassa ($p>0,5$) ou de exopolissacarídeos ($p>0,5$).

Figura 10 - Concentração de proteínas nas amostras estudadas.



Legenda: Meio de cultura 1 = caldo de batata (200 g.L⁻¹) e glicose (10 g.L⁻¹), pH inicial 7,2; Meio de cultura 2 = extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), pH inicial 5,5.

A complexidade da parede celular fúngica decorre da presença de moléculas distintas, como glucanas, quitina, quitosana e proteínas associadas aos polissacarídeos (glicoproteínas) (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020). De acordo com Gow, Latgé e Munro (2017), moléculas ligadas a proteínas associadas a parede celular, como β -(1,6) glucana, podem representar até 50% do peso da massa seca da parede celular a depender da espécie fúngica, evidenciando que muitos polissacarídeos estão associados a esse tipo de molécula. Em *A. fumigatus*, foi constatado que as proteínas podem fazer diferentes tipos de ligações com galactosaminogalactano (GAG), compondo, assim, também os polissacarídeos excretados que compõe a matriz extracelular, fator este importante em processos infecciosos causados pela espécie (LATGÉ *et al.*, 2017).

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível constatar que a presença de fonte de nitrogênio no meio de cultura 2, bem como o pH ácido foi favorável ao crescimento de *A. aculeatus*, sob fermentação submersa. Apesar disto, não foi observada diferença no crescimento do microrganismo em

placa de petri entre os meios de cultura estudados, ou o efeito dos meios sob a produção de polissacarídeos de biomassa e exopolissacarídeos com a metodologia de extração aplicada. O presente estudo é de grande relevância para o setor industrial, uma vez que aborda a influência dos meios de cultura e pH no crescimento microbiano, fatores associados à modulação do pH e o rendimento de polissacarídeos estruturais (biomassa) e extracelulares; moléculas estas que vêm sendo amplamente estudadas para aplicação em setores produtivos como as indústrias alimentícia e farmacêutica.

5. AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são destinados à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), onde o trabalho foi desenvolvido e a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL POR MALDI/TOF E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE *Aspergillus aculeatus*

Thamara Louisy Santos Brito^{1,*}, Jabson Meneses Teixeira², Vinícius Queiroz Oliveira³, Yane Neves Valadares¹, Thais Santos Moraes Lima¹, Tallyta Santos Teixeira⁴, Janaína Silva de Freitas¹

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga - BA.

²Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus - BA.

³Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista - BA.

⁴Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO.

*Autora correspondente: thaamaralouisy@hotmail.com

RESUMO

Polissacarídeos fúngicos têm sido alvo de diversos estudos. Tais moléculas podem apresentar diferentes tipos de atividades biológicas com aplicações em setores industriais distintos. Nessa perspectiva, polissacarídeos oriundos de *Aspergillus* spp. vêm sendo caracterizados ao longo dos anos. Diante disso, o presente estudo visou elucidar as propriedades biológicas de polissacarídeos da parede celular de *Aspergillus aculeatus*, crescido em meio contendo extrato de malte, glicose, extrato de levedura e peptona. A fermentação submersa ocorreu por 13 dias a 120rpm e 30°C. Após a fermentação, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração e os polissacarídeos isolados pelo método de extração alcalina, em seguida, liofilizados, pesados e armazenados para análises posteriores. A caracterização dessas moléculas foi feita pela técnica MALDI-TOF MS. A avaliação da atividade antibacteriana em cepas gram-negativas e gram-positivas se deu pelo método de determinação da concentração inibitória mínima e a avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral pelo método de MTT nas linhagens celulares HUVEC, BEAS-2B e A549. Em tais análises foram aplicadas soluções aquosas dos polissacarídeos nas concentrações de 0,5; 1; 1,5 e 2 g.L⁻¹. Como resultado, através da caracterização parcial do espectro de massas da molécula, observou-se a presença de glicose e xilose em diferentes configurações em sua estrutura. Os polissacarídeos não apresentaram atividade antibacteriana e antitumoral sob as cepas e linhagens analisadas. Este trabalho agrega conhecimentos aos estudos sobre polissacarídeos oriundos de *Aspergillus aculeatus*, ainda pouco reportados, bem como contribui para o acervo de informações sobre bioprospecção com alvo em novas moléculas de interesse industrial.

Palavras-chave: Bioprospecção. Antibacteriano. Citotoxicidade. Antitumoral. Espectrometria de massas.

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos fúngicos apresentam diferentes funcionalidades e, por este motivo, são alvo de inúmeras pesquisas. Os fungos são seres capazes de produzir diferentes tipos de polissacarídeos, sendo eles: intracelulares, estruturais (presentes na parede celular) e extracelulares (exopolissacarídeos - EPS) (OSÍŃSKA-JAROSZUK *et al.*, 2020). Os polissacarídeos intracelulares são utilizados como fonte de energia ou ainda como precursores para os demais tipos de polissacarídeos mencionados, sendo os EPS e polissacarídeos da parede celular mais amplamente estudados quanto às propriedades biológicas (DONOT *et al.*, 2012).

Acerca dos polissacarídeos da parede celular, estes são constituídos principalmente de quitina, glucanas e galactomananas (LATGÉ; BEAUVAIS, CAMILOS, 2017). Tais moléculas conferem à parede celular a capacidade de proteção osmótica, além de contribuir na determinação da forma celular (BEATRIZ; CAMBAZA, 2015). Entretanto, quando isolados, os polissacarídeos fúngicos apresentam também grande utilidade para o setor industrial, com aplicações em alimentos e diferentes tipos de medicamentos (MAUGERI; GOUDBECK, 2019).

Nesse sentido, propriedades biológicas de polissacarídeos de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* vem sendo reportadas, conferindo-os destaque econômico. Entre as atividades até então elucidadas encontram-se: biorremediação (LIAN *et al.*, 2008), ação antioxidante (YAN *et al.*, 2016), antitumoral (LI *et al.*, 2016), hipoglicemiante (ZHANG *et al.*, 2017), imunomodulatória (LI *et al.*, 2020), anticoagulante (AMER; ZAGHLOUL, IBRAHIM, 2020) e antimicrobiana (EL-GHONEMY, 2021). Entretanto, acerca de polissacarídeos da espécie *A. aculeatus* poucas bioatividades foram elucidadas (LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020).

Tendo em vista esse cenário, o presente trabalho visou agregar novos conhecimentos acerca da espécie *A. aculeatus*, desvendando a capacidade antibacteriana, antitumoral e citotóxica de polissacarídeos extraídos da parede celular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos oriundos da parede celular (biomassa) de *A. aculeatus* foram obtidos a partir do micélio fúngico crescido em fermentação submersa em meio contendo extrato de malte (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹) com pH inicial 5,5 a 30°C por 13 dias e 120 rpm. Após a etapa de fermentação, o meio foi filtrado separando-se biomassa e meio de cultura. A partir disso, a biomassa foi utilizada para extração

de polissacarídeos aplicando-se o método de extração alcalina com NaOH 5% seguida de precipitação por etanol absoluto (3:1 v/v) (MENDES, 2018 - adaptado). Os polissacarídeos foram liofilizados e armazenados para posteriores análises das atividades biológicas.

2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DOS POLISSACARÍDEOS

A caracterização química parcial dos polissacarídeos de parede celular extraídos de *Aspergillus aculeatus* foi realizada pela técnica MALDI-TOF/TOF MS (*UltrafleXtreme, Bruker Daltonics*) pela Central Analítica de Instrumentação da Universidade de São Paulo – USP. A amostra liofilizada foi preparada na concentração de 1 g.L⁻¹ utilizando como matriz o ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DHB) na concentração de 10 g.L⁻¹. Os dados de massas (*m/z*) gerados pela análise através do modo refletor positivo do analisador nas faixas de massas de *m/z* 700-4400 foram interpretados parcialmente utilizando-se a estratégia de desrepliação, que consiste em comparar os dados detectados nas amostras com os dados obtidos na literatura.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

2.3.1 Cepas bacterianas

Foram selecionadas duas cepas bacterianas gram-negativas – *Escherichia coli* (ATCC 35212) e *Salmonella* spp. (CBAM 0015) – e duas gram-positivas – *Enterococcus faecalis* (ATCC 31299) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29913) – para realização do estudo. As cepas bacterianas utilizadas foram obtidas da Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), pertencentes a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) que fazem parte do acervo dos Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio) e Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental (LABIMICRO), ambos localizados no campus de Itapetinga da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

2.3.2 Teste de susceptibilidade

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos polissacarídeos de parede celular oriundos de *A. aculeatus* foi realizada de acordo o protocolo do NCCLS (2003), com modificações. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental (LABMICRO) da UESB, no *Campus* de Itapetinga, onde primeiro foram preparadas as suspensões bacterianas utilizando-se tubos de ensaio com cada cepa

bacteriana dissolvida em solução salina a 0,9% e, em seguida, realizada a comparação com a escala McFarland (tubo padrão de 0,5 μL equivalente a 5×10^8 UFC.mL⁻¹). Os polissacarídeos foram diluídos em água deionizada para se obter soluções nas concentrações de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g.L⁻¹.

Para a determinação da CIM foram utilizadas placas de microtitulação (ou placa de 96 poços) com fundo “U”, onde foram pipetados 90 μL de Caldo Mueller Hinton em todos os poços; em seguida, adicionou-se 90 μL da solução de polissacarídeos nas diferentes concentrações anteriormente mencionadas. Posteriormente, adicionou-se 10 μL da suspensão bacteriana padronizada, previamente preparada, nos poços a serem testados.

Ademais, utilizou-se um controle negativo, onde os poços continham apenas o meio de cultura (Caldo Mueller Hinton), para testar a esterilidade do meio e outro onde continha apenas o meio de cultura e as bactérias, para verificar sua viabilidade. O controle positivo foi realizado com os microrganismos inoculados em poços contendo o meio de cultura e o antibiótico Ofloxacino (na concentração de 10 g.L⁻¹). Todas as soluções de concentrações dos polissacarídeos e os controles foram testadas em triplicata.

Por fim, as placas de 96 poços foram incubadas a 37°C por 24 horas, temperatura ideal para o crescimento dos microrganismos. Para a revelação final das placas, foi adicionado 30 μL de Resazurina (0,01%) em todos os poços das placas, deixando-se agir por cerca de 3 horas. A partir da coloração observada pôde-se avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias frente às diferentes concentrações das amostras testadas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração testada capaz de inibir o crescimento bacteriano (apresentando a cor azulada após a aplicação da Resazurina).

2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL

Para avaliar a citotoxicidade e ação antitumoral, foi aplicado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo) de acordo com a metodologia descrita por GIMENES e colaboradores (2017). Primeiramente, realizou-se a avaliação da citotoxicidade em células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). A partir do resultado, seguiu-se com a avaliação da ação antitumoral dos polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus* em células tumorais de câncer de pulmão (BEAS-2B) e células normais deste mesmo tecido (A549). Em ambas as análises foram semeadas 3×10^4 células por poço em microplacas de 96 poços. Após 24 horas, um novo meio de cultura contendo as diferentes concentrações de polissacarídeos da parede celular de *A. aculeatus* (2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g.L⁻¹) ou meio de cultura para o grupo controle, foram adicionados e incubados a 37°C e 5% de CO₂, por mais 24 horas.

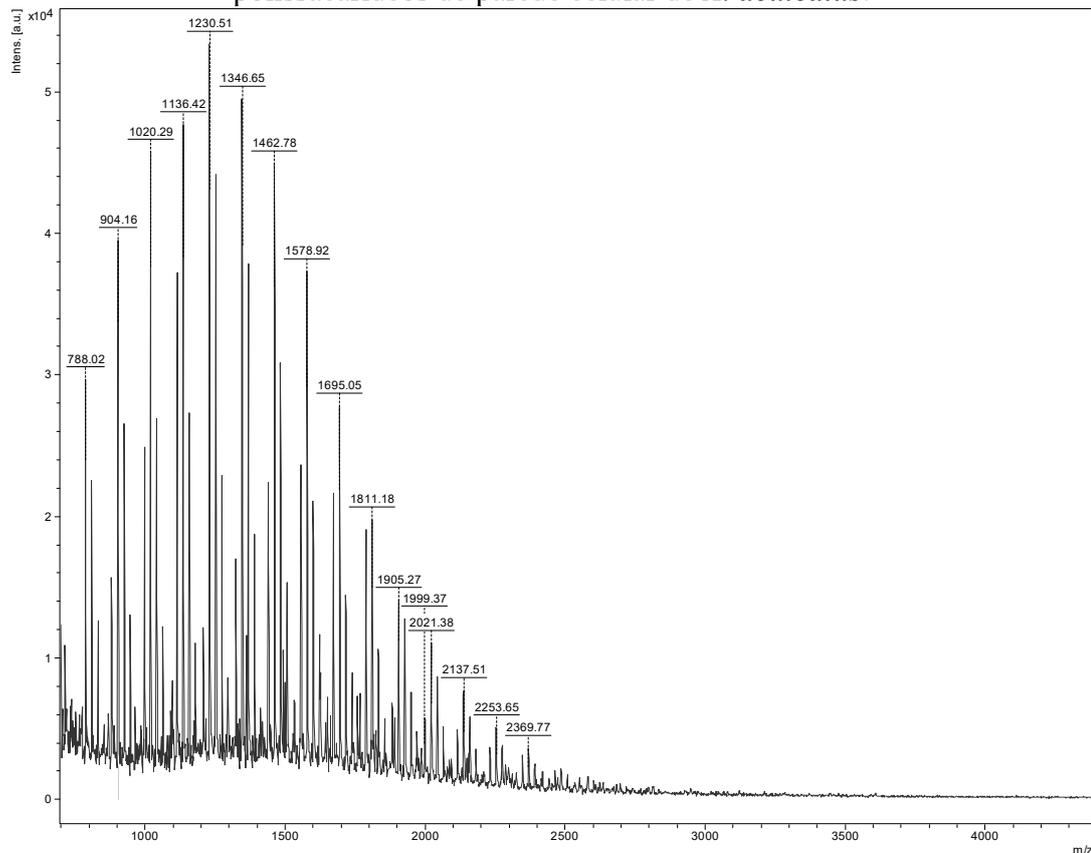
Após tal tratamento, as células foram incubadas com MTT (5 g.L^{-1} , $10 \text{ }\mu\text{L/poço}$) por 3 horas a 37°C . Em seguida, foram adicionados $100 \text{ }\mu\text{L/poço}$ de PBS contendo 10% de SDS e $0,01\text{M}$ de HCl (18 horas , 37°C e 5% de CO_2). A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços a 570nm . Os resultados foram analisados em porcentagem de viabilidade, onde o controle positivo de viabilidade foi considerado 100%. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas por análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey no software *GraphPad Prism 6*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL

Utilizando-se a técnica MALDI-TOF/TOF MS (*UltrafleXtreme, Bruker Daltonics*) com a amostra de polissacarídeos extraídos da parede celular de *A. aculeatus* diluída em água deionizada e como matriz o ácido 2,5-dihidroxiobenzoico (DHB), obteve-se o espectro de massas a seguir (Figura 1).

Figura 1 - Espectro de massas completo (m/z 700-4400) obtido por MALDI(+)-TOF MS dos polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus*.



Legenda: m/z = relação massa carga; u.a = unidade arbitrária. Fonte: Autores.

Da visualização do gráfico à sua interpretação, faz-se necessário reforçar que, além do diluente e técnica aplicada, todo aparato do metabolismo microbiano pode influenciar nas moléculas obtidas. Dito isto, o fungo *A. aculeatus* é conhecido por ser produtor de enzimas hidrolíticas, Mananase (KAIRA; KAPOOR, 2021); transferases, como Frutossiltransferase (GHAZI *et al.*, 2006); e oxirredutases, como superóxido dismutase (SOD), peroxidase e catalase (XIE *et al.*, 2019). Tal fato amplia as possibilidades de formas estruturais de polissacarídeos e oligossacarídeos a serem encontrados. Assim, as moléculas em estudo podem ser evidenciadas na forma nativa (M), com modificações em virtude das condições do meio (pH ou enzimas mencionadas, por exemplo), as quais podem permitir formas oxidadas, como de lactona ou cetoaldose (M - 2Da) e ácido carboxílico ou gem-diol (M + 16Da), ou ainda serem detectados de diferentes formas pela técnica de espectrometria de massas (com diferentes adutos, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+HCOO]^+$, por exemplo) (SILVA *et al.*, 2020).

Dessa forma, nota-se a complexidade do processo de obtenção e interpretação de dados de moléculas. Apesar disso, é possível obter sugestões de compostos, tendo em vista informações biológicas, descritas anteriormente, associadas às possíveis combinações

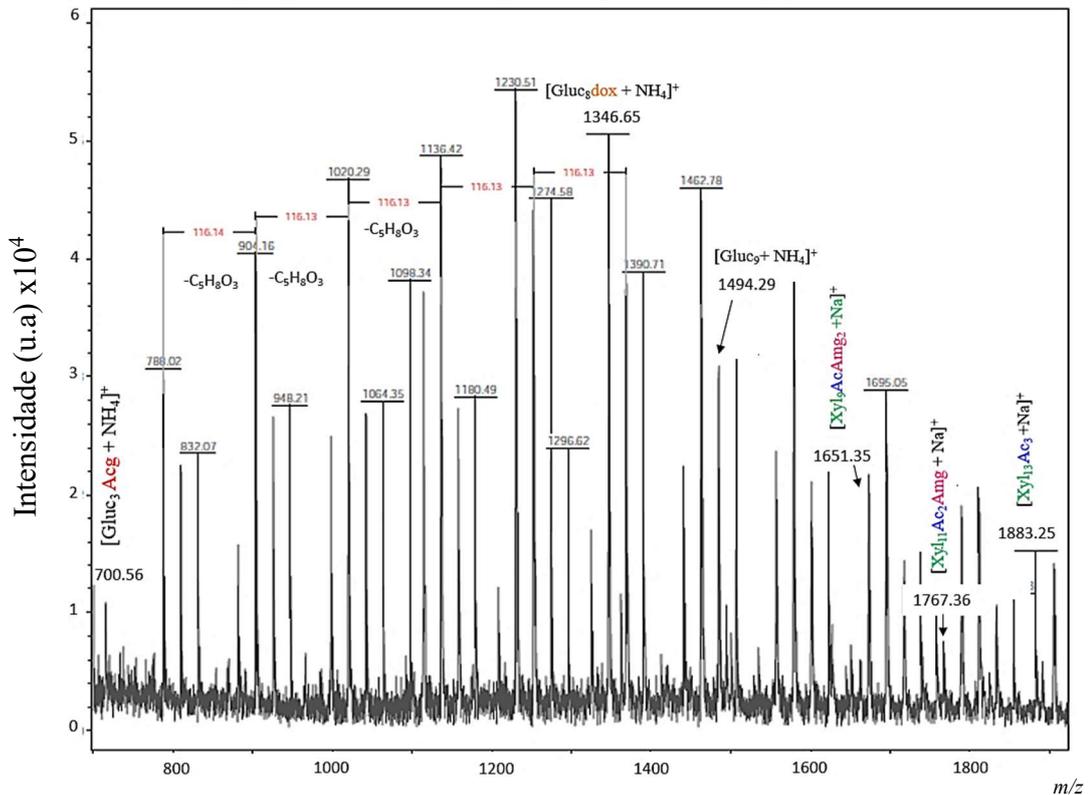
encontradas em artigos científicos e diferenças de massas do perfil da amostra. Com base nisso, foi elaborada a tabela 1, com compostos identificados no espectro de massas da amostra de polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus*, dos quais alguns deles estão destacados na Figura 2.

Tabela 1 – Relação m/z de diferentes tipos de oligossacarídeos nativos e oxidados descritos na literatura e detectados na amostra estudada.

| m/z | Descrição do composto | Forma | Referência |
|-------|--|-----------------------------------|------------------------|
| 700 | Gluc ₃ Acg | [M+NH ₄] ⁺ | Teixeira (2018, p.49) |
| 1346 | Gluc ₈ dox | [M+NH ₄] ⁺ | Teixeira (2018, p.50) |
| 1494 | Gluc ₉ | [M+NH ₄] ⁺ | Teixeira (2018, p.50) |
| 1651 | Xyl ₉ AcAmg ₂ | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.83) |
| 1767 | Xyl ₁₁ Ac ₂ Amg | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.82) |
| 1883 | Xyl ₁₃ Ac ₃ | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.79) |
| 1999 | Xyl ₁₁ Ac ₃ Amg ₃ | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.83) |
| 1999 | Gluc ₁₂ dox | [M+Na] ⁺ | Teixeira (2018) |
| 2021 | Gluc ₁₂ dox | [M+HCOO] ⁺ | Teixeira (2018) |
| 2231 | Xyl ₁₅ Ac ₅ | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.79) |
| 2231 | Xyl ₁₀ Ac ₂ AmgAcg | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.84) |
| 2369 | Xyl ₁₇ Ac ₂ | [M+Na] ⁺ | Gonçalves (2007, p.79) |

Legenda: Gluc = Glicose; Xyl = xilose; Ac = O-acetil; Amg = ácido 4-O-metil-glucurônico; Acg = ácido glucurônico; Dox = duplamente oxidado. Fonte: Autores.

Figura 2 – Caracterização parcial do espectro de massas dos polissacarídeos de parede celular de *Aspergillus aculeatus* gerados por MALDI(+)-TOF MS



Legenda: m/z = relação massa carga; u.a = unidade arbitrária. Fonte: Autores.

Além de alguns dos compostos detectados, a imagem anterior destaca a diferença de massas de 116,123 Da, como unidade de repetição. Essa massa pode ser atribuída a fórmula molecular de $C_5H_8O_3$, a qual possui diferentes sugestões pelo banco de dados *PubChem*. Em geral, carboidratos sofrem perda neutra de 162 Da, em virtude da perda de hexoses e água (ligação glicosídica rompida), e pentoses tem perda neutra de 132 Da. Seguindo esta premissa, a perda neutra de unidade de uma tetrose ($C_4H_8O_4$, como eritrose, treose ou eritrose) seria de 102 Da e a perda de 116 Da poderia estar associada a perda de uma tetrose acrescida de CH_2 (cadeia alquil), o qual apresenta 14 Da.

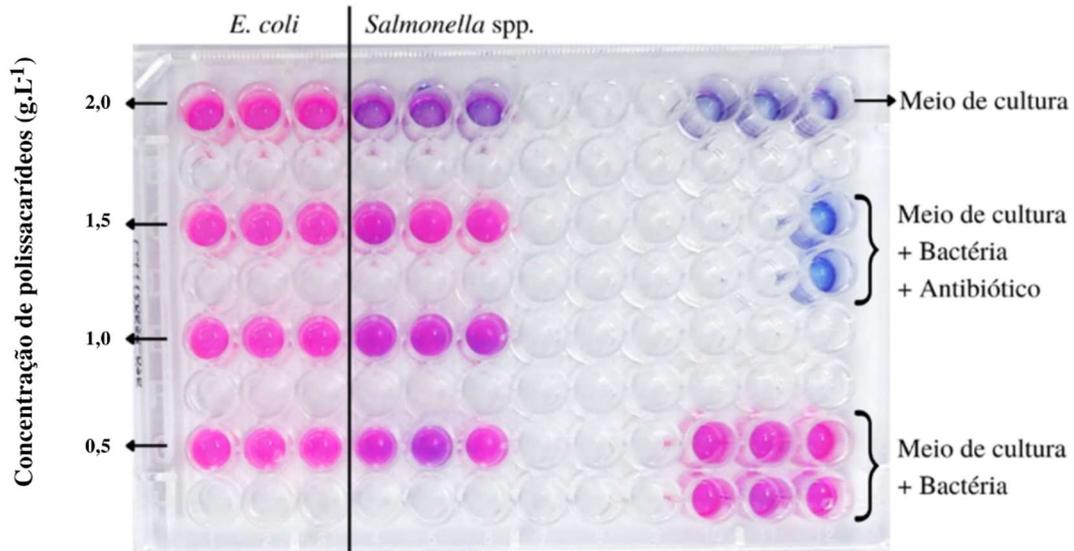
Em síntese, os polissacarídeos extraídos e analisados neste trabalho apresentam xilose e glicose em sua estrutura, estando estas na forma nativa ou ligadas a outras moléculas. Jin e colaboradores (2014) identificaram polissacarídeos extracelulares de *Aspergillus fumigatus* AF1 compostos por xilose e glicose, além de arabinose. Vale ressaltar que as estruturas propostas no presente trabalho poderão ser confirmadas posteriormente através de análises com padrões analíticos.

O processo de caracterização de uma amostra biológica é, de fato, complexo, além de oneroso e demandar um longo período de tempo. Apesar disso, constitui uma etapa essencial no estudo de polissacarídeos, uma vez que contribui para desvendar como tais moléculas interagem umas com as outras e, portanto, suas atividades biológicas (SOLTANIAN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2016).

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

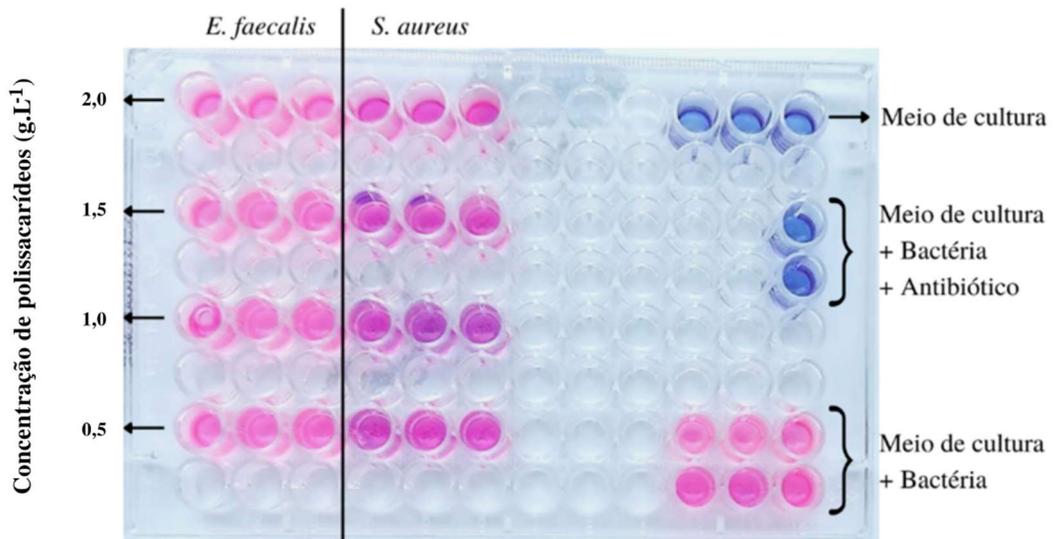
As investigações acerca da atividade antimicrobiana de polissacarídeos fúngicos ainda são incipientes, principalmente no que tange os polissacarídeos de parede celular e do gênero *Aspergillus*. Nesse sentido, este estudo inova ao trazer tal avaliação com polissacarídeos da espécie *Aspergillus aculeatus*. Apesar disso, não foi detectada ação antibacteriana das amostras de estudo sobre as cepas gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 35212) e *Salmonella* spp. (CBAM 0015) (Figura 3) e gram-positivas, *Enterococcus Faecales* (ATCC 31299) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29913) (Figura 4), nas concentrações ensaiadas, utilizando o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Figura 3 – Determinação da CIM de diferentes concentrações de polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus* sobre cepas gram-negativas



Legenda: Imagem da placa de ensaio após uma hora da aplicação da rezasurina. Fonte: Autores

Figura 4 – Determinação da CIM de diferentes concentrações de polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus* sob cepas gram-positivas



Legenda: Imagem da placa após uma hora da aplicação da rezasurina. Fonte: Autores

Tal resultado pode estar relacionado ao fato dos polissacarídeos serem usados pelos microrganismos como fonte de energia em seu metabolismo, principalmente a glicose, molécula evidenciada na constituição dos polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus* neste trabalho. Assim, reforça-se que os microrganismos são capazes de liberar enzimas no meio em que se encontram e degradar macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas, transformando-as em monômeros assimiláveis (TORTORA; FUNKE, CASE, 2016).

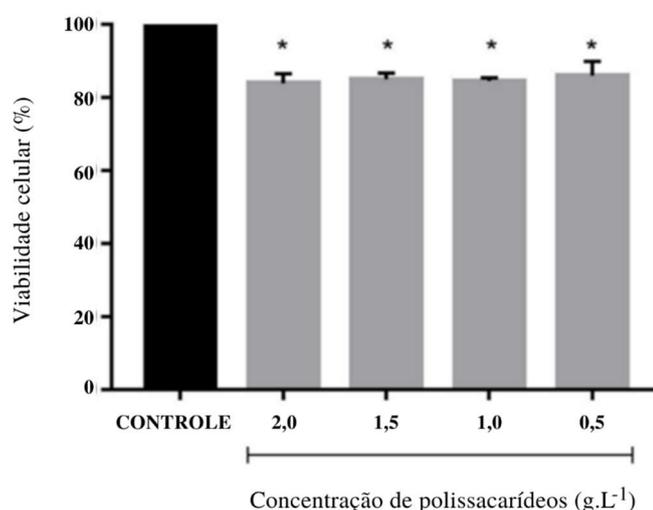
Apesar dessa premissa, no que tange a xilose, outra das moléculas constituintes encontradas no processo de caracterização da amostra de estudo, Hidalgo e colaboradores (2018) evidenciaram que a associação desse composto com outros antibióticos contribuiu para potencializar a ação dos medicamentos em modelo murino de infecção de pele com *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. Ademais, Feng e colaboradores (2021) também relataram capacidade antimicrobiana de derivados da xilose. Em contrapartida, nesta análise aplicou-se somente a amostra bruta de polissacarídeos da parede celular de *A. aculeatus* nas diferentes concentrações, sem associações ou derivatizações.

De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS/OMS) (2021), novos mecanismos de resistência aos antimicrobianos estão surgindo, fato este que pode intervir no tratamento de doenças infecciosas comuns. Neste cenário, estudos como este são relevantes na tentativa de elucidar novas moléculas bioativas capazes de conter a proliferação ou levar a morte de microrganismos patogênicos.

3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL

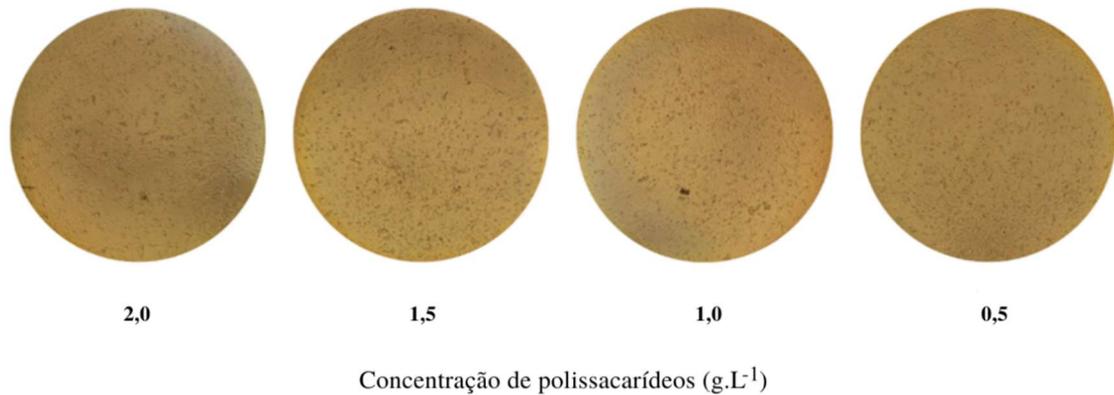
A princípio foi realizado a análise da citotoxicidade dos polissacarídeos extraídos da parede celular de *A. aculeatus* em células endoteliais da veia umbilical (HUVEC). Neste ensaio, observou-se que os polissacarídeos estudados apresentaram ação citotóxica às células nas diferentes concentrações propostas quando comparado ao grupo controle onde foi aplicado apenas o meio de cultura para o desenvolvimento celular (Figura 5). Além da análise estatística, as culturas celulares foram fotografadas com intuito de averiguar as alterações morfológicas (Figura 6).

Figura 5 – Ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos de *A. acuelatus* em células HUVEC



Legenda: *p<0,05. Fonte: Autores

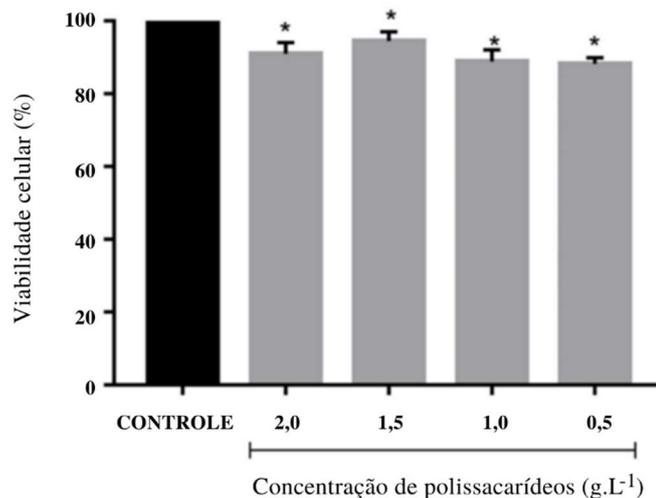
Figura 6 – Microscopia da cultura de células HUVEC em contato com os polissacarídeos estudados



Legenda: Visualização em microscópio com ocular no aumento de 4x e óptica de 10x. Fonte: Autores.

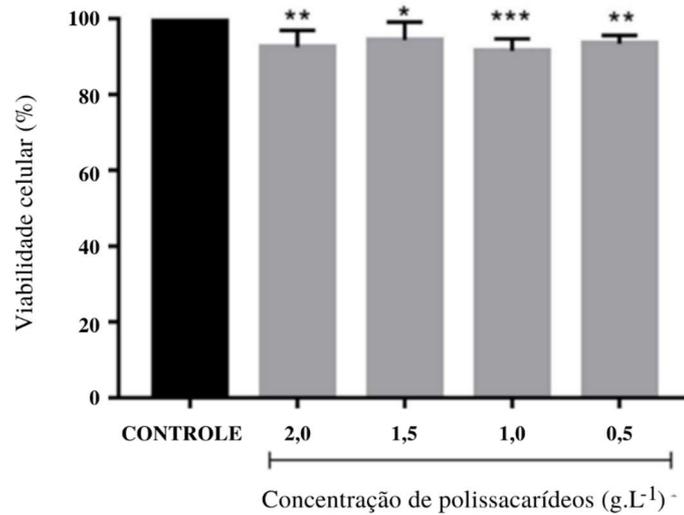
Caso apresentassem propriedades biológicas, tal resultado aponta que as moléculas estudadas não estariam aptas para administração endovenosa em decorrência da citotoxicidade em células endoteliais. Assim, deu-se início à avaliação acerca da atividade antitumoral em linhagens celulares diferentes, sendo usadas células de câncer de pulmão (linhagem A549) (Figura 7) e células normais desse mesmo tecido (BEAS-2B) (Figura 8). Os polissacarídeos apresentaram ação contra as células tumorais e, novamente, citotoxicidade sob às células normais do pulmão. Com este resultado, não foi possível detectar ação antitumoral dos polissacarídeos estudados para câncer de pulmão com as linhagens celulares analisadas, pois não houve seletividade para as células malignas – a amostra de polissacarídeos foi citotóxica para células normais e tumorais.

Figura 7 – Ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos de *A. acuelatus* em células A549



Legenda: *p<0,05. Fonte: Autores

Figura 8 – Ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos de *A. aculeatus* em células BEAS-2B



Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. Fonte: Autores

Li e colaboradores (2016) isolaram, caracterizaram e evidenciaram a atividade antitumoral de dois exopolissacarídeos oriundos de *A. aculeatus*, denominados WPA e WPB, em células de carcinoma cervical (HeLa), carcinoma de mama humano (MCF-7) e carcinoma gástrico (MGC-803) *in vitro*. Embora tenha sido utilizada a mesma espécie fúngica, o presente trabalho visou a avaliação de polissacarídeos de parede celular, além da análise em células tumorais diferentes do estudo chinês. Nesse sentido, é importante ressaltar que tais moléculas, EPS e polissacarídeos de parede celular, são produzidos em estágios diferentes no metabolismo fúngico, como metabólitos secundários e primários, respectivamente. Além disso, a liberação de EPS para o meio pode estar associada a desacetilação dos resíduos (CHUNG; BROWN, 2020), o que também reforça a presença de modificações estruturais entre esses dois tipos de moléculas.

Ainda nesse sentido, as estruturas integras e complexas dos polissacarídeos podem influenciar nas suas atividades biológicas. Como exemplo disso, embora os polissacarídeos caracterizados neste trabalho apresentem glicose e xilose, não é possível afirmar que eles apresentariam atividade antitumoral em células de hepatocarcinoma (H22) como os polissacarídeos do fungo *Pleurotus citrinopileatus*, composto por essas duas moléculas além de rabinose, galactose, manose e ácido glicurônico, sendo estas características e propriedades evidenciadas por Wang e colaboradores (2020).

Dessa forma, as estruturas dos polissacarídeos a serem evidenciadas podem variar de acordo com o tipo de microrganismo, tipo de polissacarídeo alvo, meio de crescimento, método de extração ou ainda tempo de armazenamento. Além disso, no que tange a atividade

antitumoral, uma mesma molécula pode ter ação contra um tipo de tumor e não manter este padrão em outro linhagem de células.

4 CONCLUSÃO

Através da análise do espectro de massas obtido pela técnica de MALDI-TOF MS, foi possível realizar a caracterização parcial dos constituintes dos polissacarídeos extraídos da parede celular de *A. aculeatus*, evidenciando-se a presença dos monossacarídeos glicose e xilose na forma nativa e/ou ligadas a outras moléculas. Não foi constada atividade antibacteriana dos polissacarídeos estudados sobre as cepas gram-negativas e gram-positivas analisadas. Ademais, não foi constatada atividade antitumoral sobre células de câncer pulmonar, de modo que as amostras apresentaram citotoxicidade às células das duas linhagens normais testadas, além da linhagem tumoral. O presente estudo é de grande importância uma vez que traz informações sobre um grupo de moléculas com poucos estudos publicados, como os polissacarídeos de parede celular de *A. aculeatus*, além de realizar uma bioprospecção na tentativa de encontrar novas moléculas com atividades biológicas importantes.

6 CONCLUSÃO GERAL

Tendo em vista os processos adaptativos dos fungos ao meio em que se encontram, a importância econômica do gênero *Aspergillus* e as vastas aplicações dos polissacarídeos microbianos em setores industriais distintos, o presente trabalho demonstrou que o crescimento de *A. aculeatus* foi melhor em meio suplementado com nitrogênio do que em um meio onde tal elemento estava ausente, bem como foi evidenciada a capacidade desse microrganismo em se adaptar aos diferentes meios através da modulação do pH. Ademais, foi possível confirmar que a produção de polissacarídeos de parede celular é superior aos polissacarídeos extracelulares, embora quando avaliados separadamente, não tenha sido observada diferença entre os dois meios de cultura testados. Após tais constatações, um dos grupos de polissacarídeos de parede celular extraídos foi caracterizado parcialmente e detectado nele a presença de glicose e xilose em diferentes configurações. Apesar disso, essa mesma amostra não apresentou atividades biológicas antibacteriana e antitumoral sobre as cepas e linhagens celulares selecionadas. Em geral, ao passo que foram analisadas as condições de produção e suas taxas até a avaliação de atividades biológicas, pode-se afirmar que este trabalho apresenta grande relevância para a sociedade, trazendo novas informações sobre um grupo de moléculas ainda pouco estudadas, os polissacarídeos de *A. aculeatus*.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

ABDUL MANAN, Musaalbakri; WEBB, Colin. Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 3, p. 618-627, 2018.

AI, Xin-Xin et al. MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 2, p. 673-684, 2015.

ALCÂNTARA, F.; CUNHA, M. A.; ALMEIDA, M. A. Microbiologia: Práticas Laboratoriais. Aveiro – Portugal: **UA editora**. 2^a ed., 2001.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. *Quim. Nova*, Salvador, v. 33, n. 10, p.2202-2210, out. 2010.

AMER, M. S.; ZAGHLOUL, E. H.; IBRAHIM, M. I. A. Characterization of exopolysaccharide produced from marine-derived *Aspergillus terreus* SEI with prominent biological activities. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 4, p. 363-369, 2020.

ANDRADE, L. M., MENDES, M. A., KOWALSKI, P., NASCIMENTO, C. A. O. COMPARATIVE study of different matrix/solvent systems for the analysis of crude lyophilized microalgal preparations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 3, p. 295-303, 2015.

ARORA, Sidharth; RANI, Richa; GHOSH, Sanjoy. Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. **Journal of biotechnology**, v. 269, p. 16-34, 2018.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ATHAYDE, Maria Margarida Sousa. Citoxidade e atividade antimicrobiana de extratos de duas cepas do fungo *Pycnoporus sanguineus* oriundas da Amazônia. 2011. 40 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP.

AZEVEDO, E.; BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, 2018.

BABA, Y.; SUMITANI, J., TANI, S.; KAWAGUCHI, T.. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma cellulase* system. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 3, 2015.

- BALASUBRAMANIAN, B., ILAVENIL, S., AL-DHABI, N. A., AGASTIAN, P., CHOI, K. C. Isolation and characterization of *Aspergillus* sp. for the production of extracellular polysaccharides by response surface methodology. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 3, p. 449-454, 2019.
- BAMFORD, Natalie C. et al. Structural and biochemical characterization of the exopolysaccharide deacetylase Agd3 required for *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BANERJEE, D.; MAHAPATRA, S.; PATI, B. R. Gallic acid production by submerged fermentation of *Aspergillus aculeatus* DBF9. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 462-468, 2007.
- BANERJEE, D.; MONDAL, K.; PATI, B. Tannase production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid-state fermentation. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 159-166, 2007.
- BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BARCELOS, Mayara CS et al. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1475-1495, 2020.
- BARREIRO C., MARTÍN J. F., GARCÍA-ESTRADA C. Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**: p. 1–15, 2012.
- BASU, Srijoni et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. **Bioinformation, Puducherry**, v. 11, n. 4, p. 182-184, 2015.
- BEATRIZ, C.; CAMBAZA, E. *Biologia dos fungos*. 2015
- BECKER, K. L. et al. *Aspergillus* cell wall chitin induces anti-and proinflammatory cytokines in human PBMCs via the Fc- γ receptor/Syk/PI3K pathway. **MBio**, v. 7, n. 3, p. e01823-15, 2016.
- BELINATO, João Raul et al. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546-559, 2019.
- BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248 – 254 (1976) 17.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BORUTA, Tomasz et al. Exploring the extremes: applying high concentration of yeast extract leads to drastic morphological changes and elimination of (+)-geodin and asteric acid

production in *Aspergillus terreus* submerged cultures. **Biotechnology letters**, v. 43, n. 1, p. 61-71, 2021.

BOUSSET, Lydia et al. Fungal growth is affected by and affects pH and redox potential (Eh) of the growth medium. **BioRxiv**, p. 401182, 2018.

CAMPOS, F. R. **Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microbispora* sp. isolados como microrganismos endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 2005. 282p. Tese (doutorado) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2005.

CASADEI, M. E. **Processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar**. 2012. 38 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Curso Superior de Tecnologia em Biotecnologia - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

CHACON, E.; ACOSTA, D.; LEMASTERS, J. J. Primary cultures of cardiac myocytes as in vitro models for pharmacological and toxicological assessments. **In vitro methods in pharmaceutical research**, p. 209-223, 1997.

CHEN, Hongzhang. Biotechnology principles of solid state fermentation. In: **Modern Solid State Fermentation**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 23-74.

CHEN, Y. et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 218-226, 2012.

CHEN, Yin et al. Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by the marine fungus *Aspergillus versicolor*. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 478-483, 2013.

CHEN, Y.; MAO, W.; TAO, H.; ZHU, W.; QI, X.; CHEN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technol.**, v. 102, n. 17, p. 8179-84, 2011.

CHIZHOV, Alexander O. et al. Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. **Carbohydrate Research**, v. 310, n. 3, p. 203-210, 1998.

CHUNG, Krystal Y.; BROWN, Jessica CS. Biology and Function of Exo-Polysaccharides from Human Fungal Pathogens. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2020.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

COSTA, Claudia RL de M. et al. Exopolysaccharides from *Aspergillus terreus*: Production, chemical elucidation and immunoactivity. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 654-664, 2019.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; MURTHY, M. V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 771-799, 2004.

DE VRIES, Ronald P. et al. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 1-45, 2017.

DEACON, J., *Fungal Biology*. Blackwell publishing. 4th edition, 2006.

DEERY, M. J.; STIMSON, E.; CHAPPELL, C. G. Size exclusion chromatography/mass spectrometry applied to the analysis of polysaccharides. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 23, p. 2273-2283, 2001.

DELGADO-BAQUERIZO, Manuel et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2016.

DIJKSTERHUIS, J. Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. **Food microbiology**, v. 81, p. 2-11, 2019.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.

DORIYA, K. et al. Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. **Advances in food and nutrition research**, v. 78, p. 115-135, 2016.

DUBEY, Lalit Kumar et al. Induction of innate immunity by *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharides is enhanced by the composite presentation of chitin and beta-glucan. **Immunobiology**, v. 219, n. 3, p. 179-188, 2014.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUCHEMIN, B. J. C. Mercerisation of cellulose in aqueous NaOH at low concentrations. **Green Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 3941-3947, 2015.

DZURENDOVA, S. et al. The influence of phosphorus source and the nature of nitrogen substrate on the biomass production and lipid accumulation in oleaginous Mucoromycota fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 18, p. 8065-8076, 2020.

EL-GHONEMY, Dina H. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Exopolysaccharides Produced by a Novel *Aspergillus* sp. DHE6 under Optimized Submerged Fermentation Conditions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 102150, 2021.

FAJOLA, A. O. The post-harvest fruit rots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Nigeria. **Food/Nahrung**, v. 23, n. 2, p. 105-109, 1979.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo**. 2002. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de

Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FARIA-TISCHER, Paula CS et al. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 167-173, 2015.

FARINAS, C. S., PIROTA, R., FONSECA, R., & BERTUCCI NETO, V. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. **Embrapa Instrumentação-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2014.

FENG, Tingting et al. α -Dicarbonyl compounds related to antimicrobial and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and corn peptide hydrolysate. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100951, 2021.

FREITAS, J. S. et al. Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, n. 5, p. 565-572, 2011.

FREITAS, J. S.; SILVA, E. M.; ROSSI, A. Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. **Genet Mol Res**, v. 6, n. 3, p. 721-9, 2007.

FRISVAD, Jens C.; LARSEN, Thomas O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7859-7877, 2015.

FONTAINE, T. et al. Cell wall α 1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 8, p. 707-712, 2010.

FUJIMOTO, Hiroaki et al. Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 538-540, 1995.

GAO, Y. Q.; GUO, C. J.; ZHANG, Q.; ZHOU, W. M., WANG, C. C.; GAO, J. M. Asperaculanes A and B, two sesquiterpenoids from the fungus *Aspergillus aculeatus*. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 325-334, 2015.

GARCIA-RUBIO, Rocio et al. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2993, 2020.

GAUTIER, M.; NORMAND, A.-C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical microbiology and infection**, v. 22, n. 8, p. 662-669, 2016.

GERMEC, M. *et al.* Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 43, n. 2, p. 217-232, 2020.

GHAZI, Iraj et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of biotechnology**, v. 128, n. 1, p. 204-211, 2007.

GHOSH, K., CHANDRA, K., OJHA, A. K., ISLAM, S. S. NMR and MALDI-TOF analysis of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Volvariella diplasia*. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 16, p. 2834-2840, 2008.

GIMENES, Sarah NC et al. Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

GOW, Neil AR; LATGE, Jean-Paul; MUNRO, Carol A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 5.3. 01, 2017.

GÜNL, Markus; KRAEMER, Florian; PAULY, Markus. Oligosaccharide mass profiling (OLIMP) of cell wall polysaccharides by MALDI-TOF/MS. In: **The Plant Cell Wall**. Humana Press, Totowa, NJ, 2011. p. 43-54.

HARRIS, D. C. Espectrometria de massas. Capítulo 22. In: *Análise química quantitativa*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 523-524, 2008.

HAWKSWORTH, David L.; LÜCKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 5.4. 10, 2017.

HIDALGO, Alejandro A. et al. Xylose Improves Antibiotic Activity of Chloramphenicol and Tetracycline against *K. pneumoniae* and *A. baumannii* in a Murine Model of Skin Infection. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2018, 2018.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3ed. Chichester: Wiley, p.2007.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in mycology**, v. 95, p. 5-169, 2020.

Houbraken, J., Samson, R. A., & Yilmaz, N. Taxonomy of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* and its significance for biotechnology. **Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era**, p. 1-15, 2016.

HUNG, Wei-Ting et al. MALDI-TOF MS analysis of native and permethylated or benzimidazole-derivatized polysaccharides. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 4950-4961, 2012.
JARVIS, W. R.; TRAQUAIR, J. A. Bunch rot of grapes caused by *Aspergillus aculeatus*. **Plant disease**, v. 68, n. 8, p. 718-719, 1984.

IJADPANAHSARAVI, Maryam et al. Minimal nutrient requirements for induction of germination of *Aspergillus niger* conidia. **Fungal biology**, v. 125, n. 3, p. 231-238, 2021.

JIN, X.; ZHAO, S. Extraction optimization and bioactivities of an extracellular polysaccharide produced by *Aspergillus fumigatus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 68, p. 13-17, 2014.

JURJEVIĆ, Z.; PETERSON, S.W.; STEA, G.; SOLFRIZZO, M.; VARGA, J.; HUBKA, V.; PERRONE, G. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **IMA Fungus** 2012, 3, 159–173.

KAGIMURA, Francini Yumi et al. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015.

KAIRA, Gaurav Singh; KAPOOR, Mukesh. Molecular advancements on over-expression, stability and catalytic aspects of endo- β -mannanases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2021.

KALAI, S. et al. Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. **International journal of food microbiology**, v. 240, p. 124-130, 2017.

KIMURA, Katsuki et al. Further examination of polysaccharides causing membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs): application of lectin affinity chromatography and MALDI-TOF/MS. **Water research**, v. 46, n. 17, p. 5725-5734, 2012.

KOWALCZYK, Joanna E.; BENOIT, Isabelle; DE VRIES, Ronald P. Regulation of plant biomass utilization in *Aspergillus*. **Advances in applied microbiology**, v. 88, p. 31-56, 2014.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, Oğuzhan; SIVAS, H. Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. In: **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. Academic Press, 2017. p. 271-297.

LATGÉ, Jean-Paul; BEAUVAIS, Anne; CHAMILOS, Georgios. The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 99-116, 2017.

LEMOS, R. C. **Testes de citotoxicidade in vitro no controle da qualidade de biomateriais empregados em luvas utilizadas por profissionais da FIOCRUZ**. 2018. 117 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, n. 1, p. 83-88, 2004.

LETEK, Michal. Alexander Fleming, the discoverer of the antibiotic effects of penicillin. **Front. Young Minds**, v. 7, p. 159, 2020.

LI, Boqiang; CHEN, Yong; TIAN, Shiping. Function of pH-dependent transcription factor PacC in regulating development, pathogenicity, and mycotoxin biosynthesis of phytopathogenic fungi. **The FEBS Journal**, 2021.

LI, H., GAO, T., WANG, J., TIAN, S., YUAN, X., ZHU, H. Structural identification and antitumor activity of the extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1714-1720, 2016.

- LI, H., LIU, X., XU, Y., WANG, X., e ZHU, H. Structure and antitumor activity of the extracellular polysaccharides from *Aspergillus aculeatus* via apoptosis and cell cycle arrest. **Glycoconjugate journal**, v. 33, n. 6, p. 975-984, 2016.
- LI, H., XIE, W., SUN, H., CAO, K., YANG, X. Effect of the structural characterization of the fungal polysaccharides on their immunomodulatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3603-3610, 2020.
- LI, Hongyan et al. Structure characterization and antitumor activity of the extracellular polysaccharide from the marine fungus *Hansfordia sinuosae*. **Carbohydrate polymers**, v. 190, p. 87-94, 2018.
- LIAN, B., WANG, B., PAN, M., LIU, C., TENG, H. H. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, n. 1, p. 87-98, 2008.
- LÓPEZ-GARCÍA, Marta et al. MALDI-TOF to compare polysaccharide profiles from commercial health supplements of different mushroom species. **Food chemistry**, v. 199, p. 597-604, 2016.
- LÜ, Lanhai, Zhang, L., Wai, M. S. M., Yew, D. T. W., Xu, J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 636-644, 2012.
- MAHAPATRA, S; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.
- MAIA, Tatiana Faria; FRAGA, Marcelo Elias. Bioprospecção de *Aspergillus* seção *Nigri* em solo e serrapilheira da Mata Atlântica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 2017.
- MANZONI, Matilde; ROLLINI, Manuela. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina*. **Biotechnology letters**, v. 23, n. 18, p. 1491-1497, 2001.
- MARKINA-IÑARRAIRAEGUI, Ane et al. Tolerance to alkaline ambient pH in *Aspergillus nidulans* depends on the activity of ENA proteins. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.
- MAUGERI, F. F. & GOLDBECK, R. Produção de polissacarídeos. **Biociencia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 220, 2019.
- MENDES, T. P. S. **Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de polissacarídeos de fungos filamentosos**. 2018. 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2018.
- MELETIADIS, Joseph et al. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. **Journal of Clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 478-484, 2001.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J. A new method for measuring antioxidant activity. **Biochemical Society Transactions**. 1993.

NAIKA, G. S.; PRAKASH, V.; TIKU, P. K. Effect of cosolvents on the structural stability of endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10450-10456, 2009.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª ed. Artmed Editora, São Paulo, 2018.

NOVAK, M; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. *Endoc Metab Immune Disord Drug Targets*, v. 9, p. 67-75, 2009.

NOVODVORSKA, M. et al. Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes during conidial outgrowth. **Fungal Genetics and Biology**, v. 94, p. 23-31, 2016.

OLA, A. R. B et al. Absolute configuration and antibiotic activity of neosartorin from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 5, p. 1020-1023, 2014.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Resistência antimicrobiana. OPAS, 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>>. Acesso em 08 de maio de 2021.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS microbiology letters**, v. 199, n. 2, p. 153-160, 2001.

OSIŃSKA-JAROSZUK, Monika et al. Applications of Fungal Polysaccharides. *Encyclopedia of Mycology*, v. 2, p 613-628, 2020.

OSIŃSKA-JAROSZUK, Monika et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 1823-1844, 2015.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 734-740, 1997.

PARK, Hee-Soo et al. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. **Advances in applied microbiology**, v. 100, p. 161-202, 2017.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 4, p. 564-572, 2013.

PEREZ-CUESTA, U. et al. Nitrogen, Iron, and Zinc Acquisition: Key Nutrients to *Aspergillus fumigatus* Virulence. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 518, 2021.

PERKINS, D.D. Preservation of neurospora stock culture with anhydrous sílica-gel. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 8, p. 591-594, 1962

PICAZO, I. et al. Defining the transcriptional responses of *Aspergillus nidulans* to cation/alkaline pH stress and the role of the transcription factor SltA. **Microbial genomics**, v. 6, n. 8, 2020.

PITHON et al. Avaliação da citotoxicidade de luvas de procedimentos. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac**, v. 9, n. 3, 2009.

PRATHYUSHA, A. M. V. N.; SHEELA, G. Mohana; BRAMHACHARI, P. V. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. e00277, 2018.

PRATHYUSHA, A. M. V. N.; SHEELA, G. Mohana; BRAMHACHARI, P. V. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. e00277, 2018

PUNIA, Sneh et al. *Aspergillus oryzae* fermented rice bran: A byproduct with enhanced bioactive compounds and antioxidant potential. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 70, 2021.

RHODES, J. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. **Medical Mycology**, v. 44, p. 7781, 2006.

ROMERO, Stella M.; GIUDICISSI, Silvana L.; VITALE, Roxana G. Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage?. **Journal of Cultural Heritage**, v. 51, p. 107-124, 2021.

ROVEDA, M. **Produção de Lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁹⁺. **Embrapa Agroindústria Tropical: Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

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

SANGEETHA, A. B et al. Evaluation of in vitro activities of extracellular enzymes from *Aspergillus* species isolated from corneal ulcer/keratitis. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 2, p. 701-705, 2020.

SANTOS, J. L. P.; CHAVES, R. D.; SANT'ANA, A. S. Modeling the impact of water activity, pH, and calcium propionate on the germination of single spores of *Penicillium paneum*. **LWT**, v. 133, p. 110012, 2020.

SARAVANAN, A., JAYASREE, R., KUMAR, P. S., VARJANI, S., HEMAVATHY, R. V., JEEVANANTHAM, S., YAASHIKAA, P. R.. Production of pigment using *Aspergillus*

tamarii: New potentials for synthesizing natural metabolites. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100967, 2020.

SHARMA, Minaxi et al. The biomolecular spectrum drives microbial biology and functions in agri-food-environments. **Biomolecules**, 10(3), 401, 2020.

SHARMA, R.; OBEROI, H. S.; DHILLON, G. S. Fruit and vegetable processing waste: renewable feed stocks for enzyme production. In: **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production**. Academic Press, 2016. p. 23-59.

SILVA, Caio de Oliveira Gorgulho et al. Combination of MALDI-TOF MS and UHPLC-ESI-MS for the characterization of lytic polysaccharide monoxygenase activity. **Analytical Methods**, v. 12, n. 2, p. 149-161, 2020.

SILVA, J. C.; DE FRANÇA, P. R. L.; DE MELO, A. H. F.; NEVES-PETERSEN, M. T.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 18-27, 2019.

SILVA-SÁNCHEZ, Alex; SOARES, Margarida; ROUSK, Johannes. Testing the dependence of microbial growth and carbon use efficiency on nitrogen availability, pH, and organic matter quality. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 134, p. 25-35, 2019.

SINGH, Adya P.; SINGH, Tripti. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 198-206, 2014.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. São Paulo: Cengage Learning, p.722-3,826,906-9, 2010.

SOLTANIAN, S., STUYVEN, E., COX, E., SORGELOOS, P., BOSSIER, P. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. **Critical reviews in microbiology**, v. 35, n. 2, p. 109-138, 2009.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **Int J Sci Nat**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUGIMOTO, Kyoko; ODA, Shinobu. Efficient production of fungal spores by the combination of reduction of nitrogen source content and embedding of hydrophobic polymer in an agar plate. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 131, n. 4, p. 390-395, 2021.

SURYANARAYANAN, T. S., THIRUNAVUKKARASU, N., GOVINDARAJULU, M. B., SASSE, F., JANSEN, R., MURALI, T. S.. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal biology reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 9-19, 2009.

TEIXEIRA, J., GASPAR, A., GARRIDO, E. M., GARRIDO, J., BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. **BioMed research international**, 2013.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia - 12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

VALGIMIGLI, L.; BASCHIERI, A.; AMORATI, R. Antioxidant activity of nanomaterials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 14, p. 2036-2051, 2018.

VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.

VON HERTWIG, Aline Morgan et al. Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee. **Journal of microbiological methods**, v. 148, p. 87-92, 2018

VYLKOVA, Slavena. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006149, 2017.

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

WANG, Nifei et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of mycelium polysaccharide from liquid fermentation of *Monascus purpureus* (Hong Qu). **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117945, 2021.

WANG, Qing et al. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* and its antitumor activity on H22 tumor-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 251-260, 2021.

WIKLER, Matthew A. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. **CLSI (NCCLS)**, v. 26, p. M7-A7, 2006

WOLFF, Peter B. et al. Acurin A, a novel hybrid compound, biosynthesized by individually translated PKS-and NRPS-encoding genes in *Aspergillus aculeatus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 139, p. 103378, 2020.

XIE, Yan et al. Characterization of the Cd-resistant fungus *Aspergillus aculeatus* and its potential for increasing the antioxidant activity and photosynthetic efficiency of rice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, p. 373-381, 2019.

YAN, M. X. et al. Extracellular polysaccharide with novel structure and antioxidant property produced by the deep-sea fungus *Aspergillus versicolor* N2bc. **Carbohydrate polymers**, v. 147, p. 272-281, 2016.

YODSING, N.; LEKPHROM, R.; SANGSOPHA, W.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Secondary metabolites and their biological activity from *Aspergillus aculeatus* KKU-CT2. **Current microbiology**, v. 75, n. 5, p. 513-518, 2018.

YOGENDRARAJAH, Pratheeba et al. Toxigenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method. **Food microbiology**, v. 52, p. 185-196, 2015.

ZHANG, Silai et al. Cell wall α -1, 3-glucan prevents α -amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 124, n. 1, p. 47-53, 2017.

ZHAO, L.; CHENG, L.; DENG, Y.; LI, Z.; HONG, Y.; LI, C.; BAN, X.; GU, Z. Study on rapid drying and spoilage prevention of potato pulp using solid-state fermentation with *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource technology**, v. 296, p. 122323, 2020.