



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Angélica Augusta Grigoli Dominato

Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos
Neofusicoccum parvum, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*:
caracterização química e atividade anticoagulante

São José do Rio Preto
2017

Angélica Augusta Grigoli Dominato

Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos
Neofusicoccum parvum, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*:
caracterização química e atividade anticoagulante

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos

São José do Rio Preto
2017

Grigoli Dominato, Angélica Augusta.

Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos
Neofusicoccum parvum, Fusarium sp e Colletotrichum gloeosporioides :
caracterização química e atividade anticoagulante / Angélica Augusta
Grigoli Dominato. – São José do Rio Preto, 2017
122 f. : il., tabs.

Orientador: Maria de Lourdes Corradi da Silva

Coorientador: Ana Flora Dalberto Vasconcelos

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química microbiológica. 2. Fungos endofíticos. 3. Colletotrichum
gloeosporioides. 4. Exopolissacarídeos microbianos. 5. Microbiologia –
Sínteses. 6. Anticoagulantes. I. Dominato, Angélica Augusta Grigoli.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.28

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Angélica Augusta Grigoli Dominato

Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos
Neofusicoccum parvum, *Fusarium sp* e *Colletotrichum gloeosporioides*:
caracterização química e atividade anticoagulante

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva
UNESP – São José do Rio Preto - SP
Orientador

Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos
UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. Maria Antônia P. Colabone Celligoi
UEL- Londrina/PR

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
20 de janeiro de 2017

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”. (Albert Einstein)

Dedicatória

Ao meu esposo JÚLIO CÉSAR DOMINATO e ao meu filho VINÍCIUS GRIGOLI BOSSO pelo incentivo constante e incondicional para vencermos juntos mais esta etapa da vida. À minha mãe ROSEMARY LOPES GRIGOLI que dedicou sua vida pela Educação sendo o nosso principal exemplo.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar à Deus pelo dom da vida e pela grande oportunidade de conhecer os novos caminhos da ciência.

Ao meu esposo Júlio César, filho Vinícius e enteada (filha) Letícia

Ao meu pai Nilson Grigoli (*in memoriam*), minha mãe Rosemary, aos meus amados irmãos Nilson Jr e Sandra, Vanessa e Kleber, e às minhas sobrinhas Júlia e Janine

Aos meus sogros José (*in memoriam*) e Ester, aos cunhados José Jr e Regina, às sobrinhas Natacha, Thiago e Thainá e Bruno.

Aos meus tios, tias, primos, primas que desde sempre estiveram presentes em minha vida. Especialmente ao tio João Carlos (*in memoriam*), que acreditou no meu potencial profissional, por todos os seus ensinamentos.

Às minhas orientadoras que em momento algum mediram esforços para ensinar, repetir, realocar, corrigir, melhorar ... neste tempo de aprendizado. Muito obrigada por partilharem comigo a preciosidade do ensinar.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva que neste período foi além de orientadora, foi uma grande mentora e abriu as portas de outro mundo para mim. Obrigada por todos os seus ensinamentos, sua paciência, dedicação, exemplo.

À Profa. Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos que em todos os momentos esteve presente, sempre ensinando, incentivando e orientando o melhor caminho a seguir. Obrigada por dispor de muitos finais de semana para trabalharmos juntas.

À reitoria da Unoeste que sempre incentivou seus professores a buscar novos conhecimentos e titulações, meu muito obrigada.

Aos Coordenadores dos Cursos de Graduação da Unoeste (Biomedicina, Enfermagem, Farmácia e Medicina) por todo incentivo e compreensão especialmente nas minhas ausências.

Aos meus grandes amigos Cláudia Delfim, Daniel Ângelo, Décio Gomes, Eliane Sucks, Fernanda Rocha, Luciana Marini, Luis Ortega, Marcus Vinícius, Margarida Silveira, Sueli Shadec, Telma Martins vocês foram essenciais, me incentivando especialmente, nos momentos mais difíceis.

Às minhas novas amigas, aquelas que a pós graduação nos presenteia Aline Futami, Jéssica, Mônica, Samara, obrigada por tudo que fizeram por mim.

Especialmente ao Prof. Dr. Silvio Rainho que por uma obra de Deus apresentou-me às minhas orientadoras. Meu muito obrigada.

Aos professores do Curso de Pós Graduação que muito me ensinaram durante a realização deste curso.

À Profa. Dra. Adriana Knob por ter isolado e fornecido os fungos para que o estudo pudesse ser realizado e ao Prof. Dr. André Rodrigues que gentilmente realizou a identificação dos mesmos.

À coordenação do curso de Pós Graduação em Microbiologia por todo auxílio e incentivo.

Aos funcionários da Secretaria da Pós Graduação do Ibilce que prontamente respondiam às dúvidas que surgiam.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra foram importantes para o cumprimento de mais uma etapa de minha vida acadêmica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Fungos filamentosos produtores de exopolissacarídeos (EPS).....	17
2.1.1 Metabolismo fúngico: características básicas	19
2.1.2 Biossíntese de exopolissacarídeos (EPS).....	20
2.2 Fungos endofíticos: descrição geral	25
2.2.1 <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> : endofíticos com potencial para produção de exopolissacarídeos	26
2.2.1.1 <i>Neofusicoccum parvum</i>	26
2.2.1.2 <i>Fusarium</i> sp.....	28
2.2.1.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	29
2.3 Parâmetros de cultivo para obtenção de exopolissacarídeos	31
2.4 Caracterização química de exopolissacarídeos	33
2.5. Derivatização de exopolissacarídeos por sulfatação e atividade biológica	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Materiais	42
4.1.1 Micro-organismos.....	42
4.1.2 Reagentes	42
4.2 Métodos	42
4.2.1 Manutenção dos micro-organismos.....	42
4.2.2 Reativação dos fungos e preparo do inóculo	42
4.2.3 Cultivo submerso para a produção de exopolissacarídeos.....	43
4.2.4 Influência da concentração de inóculo na produção dos exopolissacarídeos	43
4.2.5 Influência do tempo de cultivo na produção dos exopolissacarídeos.....	43
4.2.6 Interrupção dos cultivos e recuperação do Exopolissacarídeos	44
4.2.7 Quantificação dos Exopolissacarídeos	44
4.2.7.1 Determinação de açúcares totais	44
4.2.7.2 Determinação dos açúcares redutores.....	45
4.2.7.3 Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford	45
4.2.8 Teste de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC) acoplada a detector de índice de refração (RID)	46
4.2.9 Hidrólise ácida total dos Exopolissacarídeos.....	46

4.2.10 Análise da composição dos monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC/PAD).....	46
4.2.11 Determinação da posição das ligações glicosídicas do <i>C. gloeosporioides</i> _{prec}	47
4.2.11.1 Metilação.....	47
4.2.11.2 Hidrólise, redução e acetilação do polissacarídeo metilado.....	47
4.2.12 Método físico de separação dos exopolissacarídeos insolúveis em água	48
4.2.13 Métodos Espectroscópicos	48
4.2.13.1 Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador Fourier (FT-IR). 48	
4.2.13.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	48
4.2.14 Derivatização química do Exopolissacarídeo por sulfatação	49
4.2.15 Determinação do grau de substituição (D.S.).....	49
4.3 Atividade Biológica: Atividade Anticoagulante	50
4.3.1 Tempo de protrombina (PT)	50
4.3.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT).....	51
4.3.3 Tempo de trombina (TT)	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Aspectos gerais dos cultivos fúngicos em meio sólido e líquido.....	53
5.2 Determinação do volume de inóculo para a produção de EPS por <i>N. parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	55
5.3 Determinação da influência do tempo de cultivo na produção dos exopolissacarídeos por <i>N. parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	60
5.4 Composição monossacarídica e análise de homogeneidade dos exopolissacarídeos produzidos por <i>N. parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	64
5.5 Purificação dos exopolissacarídeos produzidos pelos fungos <i>N. parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	68
5.6 Sulfatação da α -(1→3)-glucana produzida pelo <i>C. gloeosporioides</i>	76
5.7 Atividade Anticoagulante	79
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXOS.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A.R.	Açúcar Redutor
A.T.	Açúcar Total
A.P.T.T.	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BSA	Soro Albumina Bovina
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
D-Glcp	D-glucopiranoose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido Dinitrossalicílico
DS	Grau de substituição
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
MHz	Mega-hertz
P.T.	Proteínas Totais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
T.P.	Tempo de Protrombina
T.T.	Tempo de Trombina
UDP-Gal	Uridina difosfato-galactose
UDP-Gal-4-epimerase	Uridina difosfato-galactose-4- epimerase
UDP-Glc	Uridina difosfato-glucose
UDP-Glc-desidrogenase	Uridina difosfato-glucose-desidrogenase
UDP-Glc-Gal	Uridina difosfato-glucose-galactose
UDP-glucose pirofosforilase	Uridina difosfato-glucose pirofosforilase
$x g$	Vezes (x) a força centrífuga relativa (g)
δ	Deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores dos pH finais após os tempos de cultivos dos fungos.	64
Tabela 2- Composição monossacarídica do hidrolisado ácido dos EPS secretados pelos fungos <i>N. parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	65
Tabela 3- Peso, porcentagem de açúcar total (AT) e proteínas totais (PT), massa molecular (MW) e composição monossacarídica dos polissacarídeos secretados pelos fungos <i>N. parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	69
Tabela 4- Regiões de frequências normalmente atribuídas para carboidratos.	72
Tabela 5- Atividade anticoagulante determinada pelos testes clássicos (APTT, TT e PT) da α -(1 \rightarrow 3)-glucana e de α -(1 \rightarrow 3)-glucana sulfatada em diferentes concentrações no plasma humano comparada com a heparina (padrão)	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da biossíntese de EPS envolvendo as etapas de assimilação do substrato (glucose), via Embden Meyerhof, síntese de monossacarídeos	23
Figura 2-Esquema da formação de exopolissacarídeo por ação da enzima polimerase	24
Figura 3-Micélio do fungo <i>Neofusicoccum parvum</i> crescidos em BDA a $28 \pm 2^\circ\text{C}$	27
Figura 4-Micélios do fungo <i>Fusarium</i> sp crescido em BDA a $28 \pm 2^\circ\text{C}$	29
Figura 5-Micélios do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> crescido em BDA a $28 \pm 2^\circ\text{C}$	30
Figura 6-Botriosferana [β - (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana], substituída por unidades glucosídicas e/ou gentiobiosídicas a cada cinco unidades da cadeia principal	36
Figura 7-Estrutura química da pululana com unidades de repetição de maltotriose	37
Figura 8-Modelo clássico da cascata da coagulação: vias intrínseca e extrínseca	39
Figura 9-Fluxograma da metodologia utilizada para obtenção e caracterização do exopolissacarídeo e determinação da atividade anticoagulante in vitro	52
Figura 10-Aspectos dos cultivos em meio sólido e líquido (pré-inóculo e inóculo) dos fungos <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Fusarium</i> sp e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	55
Figura 11-Quantificação de açúcares totais (A. T.) (—■—), redutores (A. R.) (—●—) e proteínas (P. T.) (—▲—) nos diferentes volumes de inóculo para os fungos. A: <i>N. parvum</i> , B: <i>Fusarium</i> sp e <i>C. gloeosporioides</i>	56
Figura 12-Curva de inóculo: comparativo da produção de EPS pelos fungos, <i>N. parvum</i> (—■—), <i>Fusarium</i> sp (—●—) e <i>C. gloeosporioides</i> (—▲—)	58
Figura 13-Aspecto da biomassa dos cultivos pigmentados, sendo A: <i>N. parvum</i> . B: <i>Fusarium</i> sp. C: <i>C. gloeosporioides</i>	59
Figura 14-Quantificação de açúcares totais (A. T.) (—■—), redutores (A. R.) (—●—) e proteínas (P. T.) (—▲—) dos cultivos nos tempos realizados para os fungos. A: <i>N. parvum</i> , B: <i>Fusarium</i> sp e C: <i>C. gloeosporioides</i>	62
Figura 15-Curva do tempo de cultivo para produção de EPS pelos fungos <i>N. parvum</i> (—■—), <i>Fusarium</i> sp (—●—) e <i>C. gloeosporioides</i> (—▲—)	63
Figura 16-Cromatograma emitido por HPSEC/RID dos EPS secretados pelos fungos A: <i>N. parvum</i> , B: <i>Fusarium</i> sp, C: <i>C. gloeosporioides</i>	67
Figura 17-Cromatograma emitido por HPSEC/RID dos <i>C. gloeosporioides</i> _{prec} (A), <i>C. gloeosporioides</i> _{sobr} (B), <i>Fusarium</i> sp _{sobr} (C) e <i>N. parvum</i> _{sobr} (D)	70
Figura 18-Espectros no infravermelho dos <i>C. gloeosporioides</i> _{prec} (A), <i>C. gloeosporioides</i> _{sobr} (B), <i>Fusarium</i> sp _{sobr} (C) e <i>N. parvum</i> _{sobr} (D), na região de 4000 a 500 cm^{-1}	71
Figura 19-Cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (A) da glucana obtida no precipitado do <i>C. gloeosporioides</i> e espectro de massa (B) do derivado 1,3,5-tri-O-acetil, 2,4,6-tri-O-metil glucitol	74
Figura 20-Ampliação do Espectro HSQC da glucana obtida no precipitado do <i>C. gloeosporioides</i> em DMSO a 70°C	75
Figura 21-Estrutura química da α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana	76
Figura 22-Espectros de infravermelho do polissacarídeo secretado pelo <i>C. gloeosporioides</i> sem sulfatação, com dois e três ciclos de sulfatação na região de 4000 a 500 cm^{-1}	78
Figura 23-Cromatograma emitido por HPSEC/RID da α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana produzida pelo <i>C. gloeosporioides</i> antes (A) e depois do segundo (B) e terceiro (C) ciclos de sulfatação	79

RESUMO

A atividade metabólica fúngica, especialmente nos endofíticos, favorece a secreção de moléculas como antibióticos, pigmentos, enzimas e polissacarídeos, que podem ser aplicadas nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras. A diversidade química dos exopolissacarídeos (EPS) bem como a possibilidade de sua utilização como substrato para diferentes modificações químicas (carboxilação, sulfatação e metilação) aumentam seu espectro de aplicação. Realizar o cultivo submerso dos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides* para a produção de EPS foi o primeiro objetivo deste trabalho. Uma vez obtidos, os EPS foram purificados e quimicamente caracterizados. Sulfatação e ensaio da atividade anticoagulante foram realizados. Os parâmetros concentração de inóculo e tempo de cultivo foram estabelecidos para maior produção dos EPS, por fermentação submersa. Etapas de purificação, por centrifugação, foram efetuadas após análises por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão, com detecção por índice de refração (HPSEC/RID). Os EPS purificados [precipitado do *C. gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*_{prec}) e os três sobrenadantes] mostraram-se praticamente isentos de proteínas. A hidrólise ácida e subsequente análise dos hidrolisados por cromatografia de troca aniônica a alta pressão com detecção por amperometria pulsada (HPAEC/PAD) indicaram que apenas o *C. gloeosporioides*_{prec} era uma glucana. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) mostrou um único derivado, 1,3,5 tri-*O*-acetil, 2,4,6-tri-*O*-metil glucitol com fragmentos de massa (*m/z* 118, 161, 203, 234.1) condizente com uma glucana do tipo (1→3). Os espectros de FT-IR apresentaram sinais na região de impressão digital, 926 cm⁻¹ e 820 cm⁻¹, típicos de polissacarídeos em configuração α . Esses resultados foram confirmados por ressonância magnética nuclear bidimensional (HSQC), com um único acoplamento C₁/H₁, em 99,3/5,18 ppm e um sinal deslocado para campo baixo, 82,8/3,74 ppm, característico de C-3 substituído, indicando que o EPS é uma α -(1→3)-glucana. A sulfatação desta molécula resultou em α -(1→3)-D-glucana_{sulf} com DS de 0,75 que foi utilizada nos ensaios de atividade anticoagulante. O aumento do tempo para a coagulação, nos testes do APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) e TT (Tempo de Trombina), foi concentração-dependente, indicando que [α -(1→3)-D-glucana_{sulf}] pode atuar como um inibidor da via intrínseca da coagulação sanguínea e da conversão do fibrinogênio em fibrina, caracterizando-a como um potencial anticoagulante.

Palavras-chaves: Fungos endofíticos, *Colletotrichum gloeosporioides*, α -(1→3)-glucana, Sulfatação, Atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Fungal metabolic activity, especially in the endophytic, favors secretion of molecules such as antibiotics, pigments, enzymes and polysaccharides, which can be applicable by food, cosmetic and pharmaceutical industries, and others. The chemical diversity of the exopolysaccharides (EPS), as well as the possibility of their use as substrate for different chemical modifications (carboxylation, sulfation and methylation) increases their application spectrum. Submerged cultivation of the endophytic fungi *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* and *Colletotrichum gloeosporioides* for the production of EPS was the first aim of this study. Once the EPS were obtained, they were purified and chemically characterized. Chemical modification by sulfation and anticoagulant activity assays were performed. Cultivation to obtain EPS were performed in submerged fermentation. The inoculum concentration and incubation time parameters were set in order to obtain a higher amount of EPS. Purification by centrifugation was performed after analysis by high pressure steric exclusion chromatography with refractive index detection (HPSEC / RID). Purified EPS [precipitate of *C. gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*_{prec}) and the three supernatants] proved to be virtually free of protein polysaccharides. Acid hydrolysis and subsequent analysis of the hydrolysates with high performance anionic exchange chromatography with amperometric detection (HPAEC/PAD) indicated that only the *C. gloeosporioides*_{prec} was a glucan. Analysis from gas chromatography and mass spectrometry showed a single derivative, 1,3,5-tri-*O*-acetyl, 2,4,6-tri-*O*-methyl glucitol with mass fragments (m/z 118, 161, 203, 234.1) consistent with a (1→3)-glucan. FT-IR spectra showed absorption bands typical from carbohydrate and signals in the digital region at 926 cm^{-1} and 820 cm^{-1} , typical of polysaccharides in the α -configuration. These results were confirmed by two-dimensional nuclear magnetic resonance (HSQC), with a single C_1/H_1 , in 99.2/4.98 ppm, typical of one α bonding, and low-field 82.6/3.55 ppm signal displacement, characteristic of substituted C-3, indicating that EPS is an α -(1→3)-glucan. Sulfation of this molecule resulted in α -(1→3)-glucan_{sulf} with DS of 0.75 which was used in the anticoagulant activity assays. The increase in coagulation reaction time in the APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) and TT (Thrombin Time) tests was concentration-dependent, indicating that [α -(1→3)-D-glucan_{sulf}] might act as an inhibitor of the intrinsic via of blood clotting and conversion of fibrinogen into fibrin, characterizing it as a potential anticoagulant.

Keywords: Endophytic fungi, *Colletotrichum gloeosporioides*, α -(1→3)-glucan, Sulfation, Anticoagulant activity.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos, a maioria pertencente ao filo *Ascomycota*, são reconhecidos como secretores de biomoléculas, entre elas os polissacarídeos. A classificação dessas macromoléculas conforme sua localização no organismo produtor pode ser: polissacarídeos citosólicos (fontes de carbono e energia para a célula), polissacarídeos de parede celular, ligados ou não a proteínas, e polissacarídeos secretados para o meio extracelular, formando cápsulas ou biofilme, denominados exopolissacarídeos (EPS). Em destaque, os exopolissacarídeos produzidos por bactérias e fungos têm sido amplamente aplicados nas indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outras.

Dentre os exopolissacarídeos secretados pelos fungos estão as glucanas, que apresentam diferenças no comportamento físico e químico, principalmente em relação à solubilidade e viscosidade, resultantes de diferenças na estrutura primária, massa molecular, extensão e ramificação dos substituintes da cadeia lateral e a presença de grupos químicos ionizáveis.

Alguns EPS microbianos apresentam ação antitumoral, imunoestimuladora, anti-hipertensiva, antioxidante, anticoagulante, entre outras.

A ação anticoagulante é apresentada pelos polissacarídeos que são naturalmente ou quimicamente sulfatados. Glucanas fúngicas quimicamente sulfatadas do tipo $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow3, 1\rightarrow6)$ têm sido avaliadas como anticoagulantes, uma vez que aumentam o tempo para a formação do coágulo nos testes clássicos como APTT (tempo de tromboplastina parcial ativada) e TT (tempo de trombina), de maneira concentração-dependente. Há um grande interesse na descoberta de novas substâncias com ação medicamentosa semelhante à heparina (potente atividade anticoagulante), que por ser um polissacarídeo de origem animal pode transmitir doenças por meio de príons como, por exemplo, encefalite espongiforme bovina (BSE).

A proposta deste trabalho foi avaliar a produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*. Caracterizar quimicamente o EPS considerado puro e modificá-lo por sulfatação, ensaiando-o nos testes de atividade anticoagulante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos filamentosos produtores de exopolissacarídeos (EPS)

Os fungos são seres cosmopolitas, eucariotos e podem ser leveduriformes, formando um pseudomicélio, ou constituir hifas, compondo um micélio verdadeiro. A maior diversidade fúngica encontra-se em regiões tropicais, caracterizada por clima quente e úmido, que favorece sua multiplicação (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). Estima-se que, mundialmente, existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais estão descritas aproximadamente 70.000 (~5 %) (AINA et al., 2012). São conhecidos popularmente como bolores, mofos e cogumelos (comestíveis ou alucinógenos). Decompõe substratos de diferentes origens através das enzimas secretadas e utilizam os produtos da biodegradação no seu metabolismo e crescimento, por extensão e ramificação de hifas (FANG; LEGER, 2010).

Os estudos sobre a biologia celular de fungos filamentosos foram acentuados a partir do século XIX e demonstraram que estes organismos podem causar doenças em animais, em humanos e em vegetais. A biologia da infecção fúngica é melhor compreendida em conjunto com a genética molecular e as imagens de células vivas, evidenciando a base molecular da morfogênese, o funcionamento celular e o crescimento das hifas (STEINBERG; SCHUSTER, 2011).

A interação dos fungos com tecidos e órgãos de outros organismos vivos, pode ocorrer de três maneiras: como patógenos, ou seja, causadores de doenças, epifíticos e endofíticos, que vivem, respectivamente, na superfície e interior dos hospedeiros sem causar danos (AZEVEDO, 1998). Os fungos podem ainda apresentar seletividade parcial em relação aos hospedeiros ou seus tecidos (PERSOH et al., 2010).

Durante os processos da interação fungo/hospedeiro, diversas moléculas podem ser produzidas para favorecer essa ligação, como enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos e polissacarídeos. De acordo com Barbosa e colaboradores (2004), polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos ligninolíticos desempenham papel importante no processo de degradação de xenobióticos, uma vez que imobilizam as enzimas extracelulares. O gel formado pelos polissacarídeos impede a desidratação da hifa, permite adesão ao substrato e entre as células, favorecendo a infecção do hospedeiro pelo fungo, auxilia na imobilização de enzimas extracelulares e estoca nutrientes (MANZONI; ROLLINI, 2001).

Para que a associação ecológica micorrízica entre uma planta e um fungo possa ocorrer, é preciso uma interação específica entre o micobionte (fungo) e as células

hospedeiras. Observações citológicas têm mostrado a presença de material fibrilar contendo polissacarídeos e glicoproteínas ligando o fungo às células. Um estudo da produção de polissacarídeos, solúveis em água, obtidos de micélio micorrízico foi realizado com 22 espécies fúngicas, sendo que seis mostraram-se capazes de produzir polissacarídeos extracelulares (OSAKU et al., 2002 apud VASCONCELOS, 2009).

Assim, tanto fungos patogênicos quanto não patogênicos podem ser explorados para a obtenção de metabólitos naturalmente produzidos, como os polissacarídeos, e que possam ser aproveitados para aplicação em diferentes áreas industriais (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; SELIM et al., 2012).

Ganoderma lucidum, *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes* são alguns dos fungos que vem sendo estudados nos últimos vinte anos em relação à produção de polissacarídeos extracelulares (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Outras espécies fúngicas também têm sido analisadas para obtenção desses compostos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* e *Syncephalastrum* sp, isolados da rizosfera de *Rhizopora annamalayana* Kathir, espécie vegetal encontrada em mangues, na Índia (SHARMILA et al., 2014). Osinska-Jaroszuk e colaboradores (2015), identificaram alguns fungos, ascomicetos e basidiomicetos, secretores de exopolissacarídeos como *Trametes versicolor*, *Phellinus* sp, *Aureobasidium pullulans* RYLF-10, *Auricularia auricula*, *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82, *Fusarium oxysporum* JN604549, entre outros.

Os estudos sobre produção de EPS fúngicos têm se diversificado, incluindo os endofíticos, principalmente pela capacidade de síntese e secreção de metabólitos com ações biológicas específicas que estes micro-organismos apresentam (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; SELIM et al., 2012). Esta síntese pode ser explicada devido à intensa atividade metabólica dos endofíticos, causada pela necessidade de adaptação ao hospedeiro, especialmente devido aos mecanismos de defesa que estes últimos apresentam (SURYANARAYANAN et al., 2009).

A produção de EPS e de outros compostos fúngicos deriva basicamente do metabolismo que esses micro-organismos realizam. Assim como o crescimento celular, as atividades metabólicas realizadas por esses organismos são uma resposta às condições físico-químicas do ambiente que os rodeia (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004). Os fungos como todos os organismos vivos, podem modificar o seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes, no meio, como fonte de energia ou como substratos para produção de metabólitos, tanto primários quanto secundários. E essas moléculas podem, por sua vez, favorecer as interações fúngicas com os outros organismos, garantindo assim sua manutenção no ambiente.

2.1.1 Metabolismo fúngico: características básicas

Os processos biotecnológicos exploram o metabolismo fúngico classificando-os como potenciais produtores de metabólitos primários e secundários (GENG et al., 2014). Do ponto de vista do metabolismo energético, os fungos são quimiotróficos, pois dependem de reações de óxido-redução para obtenção de energia. Heterotróficos por utilizarem a matéria orgânica como fonte do carbono necessária para os processos biossintéticos e organotróficos por usarem doador de hidrogênio de origem orgânica. O armazenamento de energia por esses micro-organismos tem como objetivo a manutenção da célula ativa para a reprodução e o crescimento, assim como na organização dos seus constituintes celulares. Os nutrientes do meio onde os micro-organismos se encontram, são assimilados nos processos de biossíntese, gerando os metabólitos primários e secundários (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

O metabolismo fúngico está condicionado à captação apropriada dos substratos, como fontes de carbono e nitrogênio, além de elementos traços. Desta forma, a cinética das reações metabólicas e consequente síntese de produtos do metabolismo podem ser otimizadas (GRIMM et al., 2005). Então o início da via metabólica ocorre após a absorção e fosforilação da glucose pela hexoquinase no citossol (via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)), segue a formação de gliceraldeído, piruvato e finalmente o acetil CoA, molécula principal nos ciclos dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e glioxilato. Esses ciclos desempenham papéis importantes no metabolismo energético dos fungos, sendo que o último parece estar relacionado com sua virulência (GENG et al., 2014). Nos fungos patogênicos o ciclo do glioxilato é empregado para o glicometabolismo, catabolismo de ácidos graxos e aminoácidos, além de utilizar a acetil Coenzima A (CoA), gerada a partir do piruvato. Propionil-CoA produzido com o acetil-CoA, durante o metabolismo de lipídeos, é tóxico para os fungos, entretanto os patogênicos oxidam a molécula em piruvato através dos ciclos do glioxilato e do metilcitrato, outro ciclo presente no metabolismo fúngico, durante o processo de infecção *in vivo*. O ciclo do glioxilato é uma via anaplerótica do TCA que permite o crescimento de fungos utilizando compostos contendo dois carbonos (C2) ignorando os passos de geração de gás carbônico (CO₂) no ciclo do TCA, sendo isocitrato liase e malato sintetase as enzimas utilizadas neste percurso. Os ATP (adenosina trifosfato) formados durante o metabolismo primário são usados para o crescimento e desenvolvimento fúngico, assim como na ação patogênica (GENG et al., 2014; MARTINS et al., 2015).

No processo metabólico as células microbianas hidrolisam compostos orgânicos (como fontes de carbono e energia) de alta massa molecular, em moléculas menores

(aminoácidos, nucleosídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos) que, posteriormente, são convertidas em macromoléculas como proteínas, coenzimas, ácidos nucléicos, mucopeptídeos, polissacarídeos e lipídeos que são utilizados para o crescimento microbiano (SANCHES; DEMAIN, 2002).

Durante o desenvolvimento dos fungos filamentosos há secreção dos produtos como ácidos orgânicos (ácido cítrico, glucônico, fumárico, kójico, itacônico e graxos), universalmente reconhecidos como mediadores do metabolismo, além de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, denominados como metabólitos primários. Os metabólitos secundários são bioativos, de massa molecular pequena, e estão relacionados com o ciclo de vida do micro-organismo. Alguns têm importância para os humanos como a penicilina, cefalosporina, alcalóides, griseofulvina, lovastatina, taxol, zeranol, imunossuppressores e micotoxinas. Alguns fungos são produtores de biosurfactantes e polissacarídeos (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; WARD, 2012).

A síntese e secreção dos diferentes metabólitos influenciáveis no desenvolvimento fúngico dependem de: (a) genes localizados em *clusters* (aglomerados); (b) reguladores globais, que correspondem aos fatores abióticos (fontes de carbono, nitrogênio e pH); (c) presença de aminoácidos, peptídeos, vitaminas e carboidratos (SÖRENSEN; SONDERGAARD, 2014).

2.1.2 Biossíntese de exopolissacarídeos (EPS)

Os polissacarídeos são sintetizados e acumulados geralmente após a fase de crescimento ou quando o micro-organismo se encontra em condições ambientais desfavoráveis, representando uma estratégia metabólica para sua sobrevivência (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

A síntese do EPS pode ser dividida em três fases: assimilação de substrato carbônico; síntese intracelular de polissacarídeo e exsudação do polissacarídeo para o meio extracelular (DONOT et al., 2012; SELBMANN; STINGELE; PETRUCCIOLI, 2003).

Dentre os micro-organismos produtores de EPS, as bactérias são aquelas que têm a via biossintética melhor estabelecida e estudada. As enzimas envolvidas na síntese dos EPS estão localizadas em diferentes regiões da célula bacteriana e classificadas em quatro grupos: **Grupo I:** enzimas intracelulares envolvidas em muitos processos metabólicos, como a hexoquinase, que realiza a fosforilação da glucose (Glc) para glucose-6-fosfato (Glc-6-P) e fosfoglucomutase (PGM) capaz de converter a glucose-6-fosfato (Glc-6-P) em glucose-1-

fosfato (Glc-1-P) (Figura 01); **Grupo II:** apresenta a uridina difosfato-glucose pirofosforilase (UDP-Glc pirofosforilase), que catalisa a conversão de Glc-1-P em uridina difosfato-glucose (UDP-Glc), que é a molécula-chave na síntese de EPS. O nucleotídeo glicosilado presente durante a biossíntese do EPS apresenta duas funções, como: (a) na interconversão de UDP-Glc em UDP-Gal na presença de UDP-Gal-4-epimerase e / ou UDP-Glc em UDP-glucurônico (UDP-GlcA) na presença de UDP-Glc-desidrogenase, (b) como fonte de resíduos de monossacarídeos durante a síntese dos polissacarídeos (Figura 02); **Grupo III:** enzimas localizadas na membrana celular (glucosil transferases), que transfere os UDP-Glc, ou UDP-Gal e / ou UDP-GlcA a uma unidade de repetição ligada ao transportador glucosil – lipídico, através da interação do monossacarídeo por ponte de pirofosfato ao grupo álcool terminal do isoprenol (transportador lipídico) (Figura 02); **Grupo IV:** enzimas (polimerase) situadas no meio externo da membrana celular estão, possivelmente, envolvidas na polimerização das macromoléculas (KUMAR; MODY; JHA, 2007).

Apesar de menos informações científicas a respeito da biossíntese de EPS por fungos, Mahapatra e Banerjee (2013) relatam que *Ganoderma lucidum* representa um dos principais modelos para esse estudo. Tang e Zhong (2002) descreveram que as enzimas envolvidas na síntese de EPS, pelo *G. lucidum*, podem ser divididas em quatro grupos: (a) participantes do metabolismo inicial de carboidratos; (b) participantes da síntese e na interconversão de nucleotídeo glicosilado; (c) glucosil transferase; (d) translocase e polimerase. As enzimas fosfoglucoisomerase (PGI), envolvidas na formação de lactato e alfa fosfoglucomutase (α -PGM) na produção do EPS, estão no ponto de ramificação entre as via de EMP e via posterior de biossíntese de EPS.

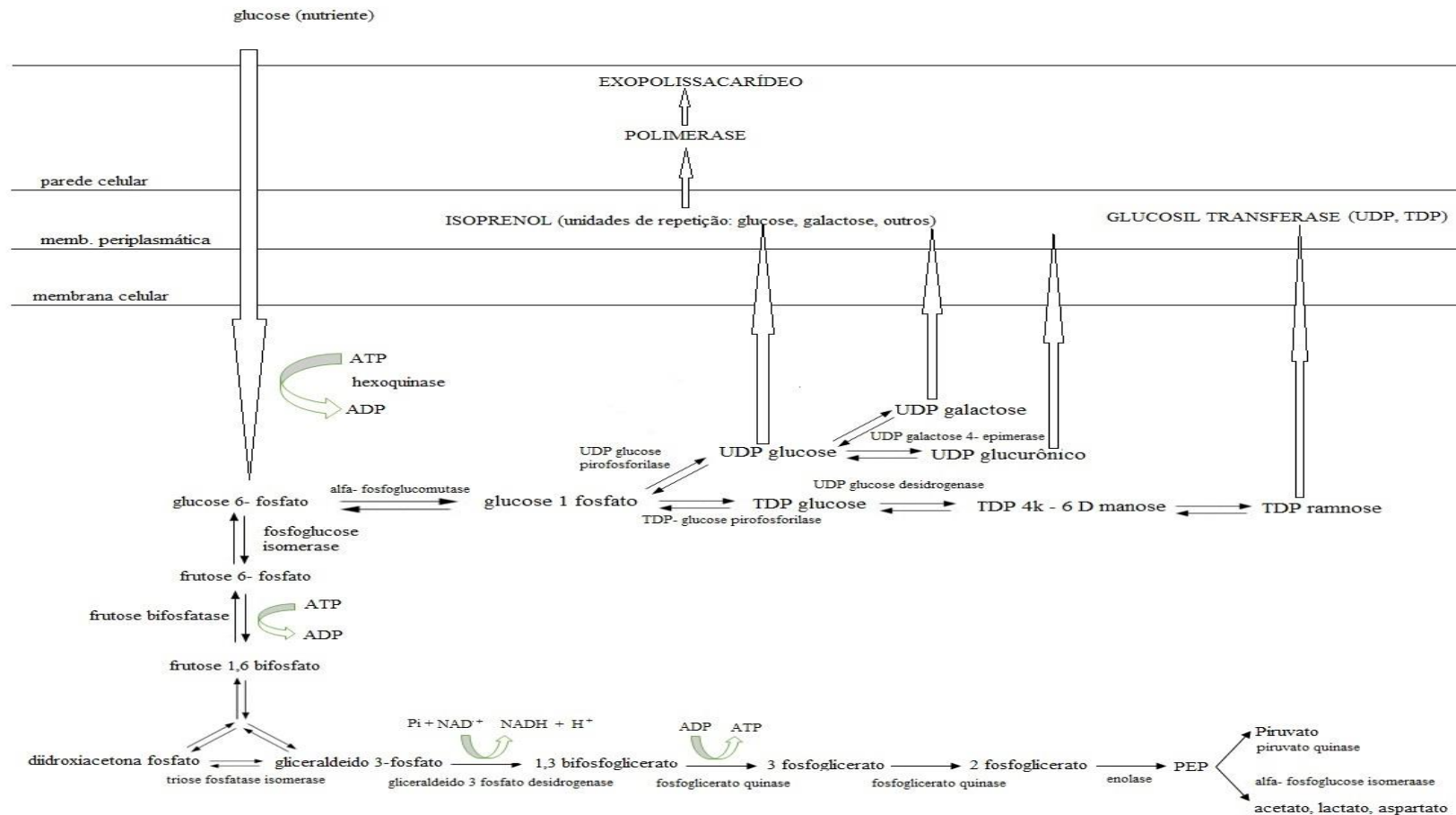
A biossíntese fúngica de polissacarídeos inicia com ação da α -PGM sobre a Glc-6-P para formar a molécula inicial, a Glc-1-P, que por ação da UDP-Glc pirofosforilase é catalisada em UDP-Glc, que é a fornecedora de unidades de glucose para a polimerização do EPS no meio extracelular. Nas situações onde o monossacarídeo deve ser galactose a UDP-Glc é transformada em UDP-Gal por meio da UDP-Gal-4-epimerase, ou UDP-GlcA pela UDP-Glc desidrogenase (Figura 01). Os açúcares nucleotídeos transportam os monossacarídeos para o carreador lipídico (isoprenol), responsável pela realização das ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar. Os nucleotídeos glicosilados interagem com a glucosil transferase e em seguida a polimerase encarrega-se de polimerizar o EPS (Figura 02) (RAMOS, et al., 2001; ZHONG; TANG, 2004).

Donot e colaboradores (2012) descreveram um provável mecanismo biossintético da pululana produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans* através de seus precursores: (1)

formação do glicolípido através do intermediário UDP-Glc, que é catalisada pelo ATP; (2) transferência de uma Glc adicional ligada a outra molécula de UDP-Glc para formar uma molécula de isomaltose (LPh-Glc-(1→6)-Glc); (3) a isomaltose interage com o precursor glicolípido do estágio 1 para produzir a molécula de isopanosil (LPh-Glc-(1→6)-Glc(1→4)-Glc). Finalmente, a molécula de isopanosil é então polimerizada na cadeia de pululana, que é um homopolissacarídeo linear composto unicamente de glucose, com ligações do tipo α (1→4) e (1→6) produzido no citossol e, posteriormente, secretado para o meio extracelular.

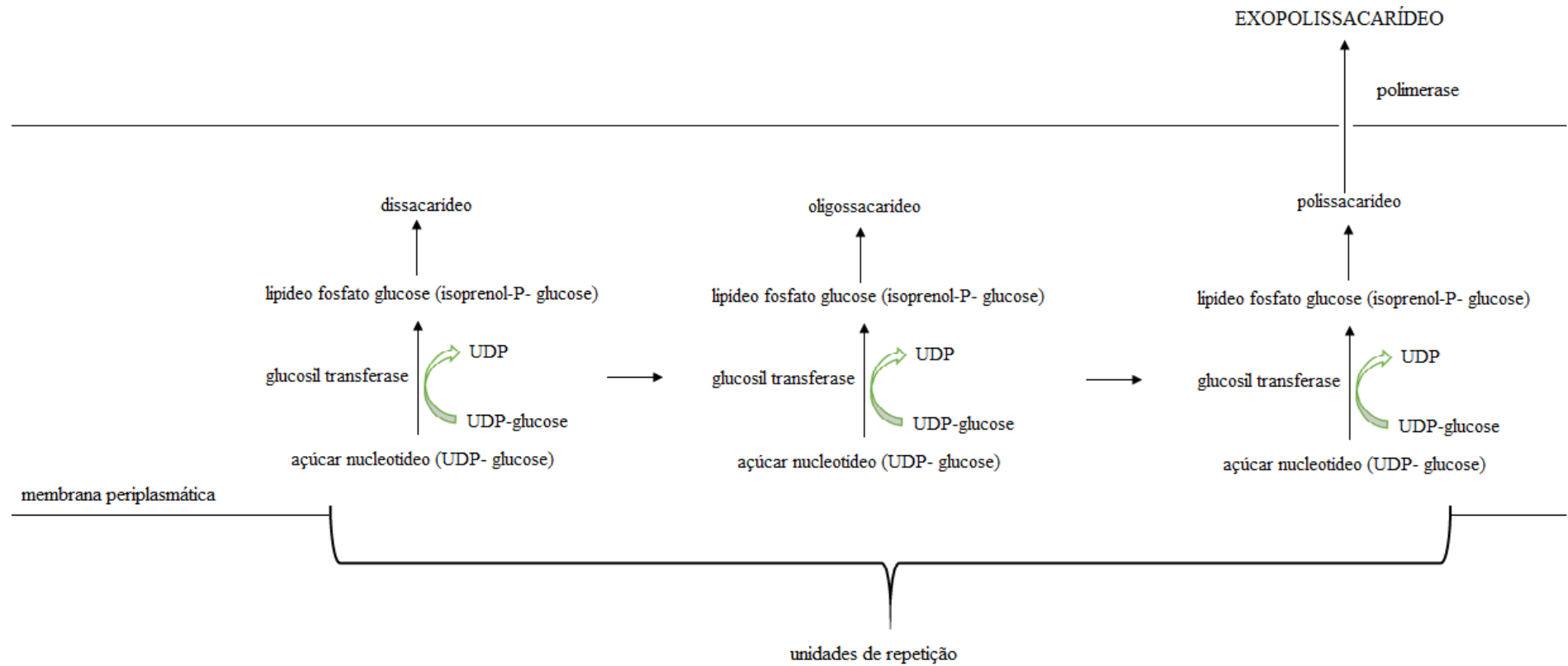
A presença dos EPS no meio extracelular, em culturas fúngicas, pode ser explicada de duas formas. A primeira relaciona-se com a polimerização do EPS no espaço extracelular, após passagem dos monossacarídeos pela parede celular fúngica. A segunda hipótese refere-se à presença de vesículas capazes de carregar as macromoléculas, sintetizadas no interior da célula, através da parede celular, para o meio extracelular. As vesículas são geralmente ovoides, compostas por bicamada lipídica, com diâmetros que variam de 60 a 300 nm, o que facilita sua compressão para passar pelos canais na parede celular fúngica. Esses canais são de tamanho adequado para a passagem das vesículas que, possivelmente, necessitam de um “motor molecular”. Para a manutenção destes motores necessita-se de fontes energéticas, que estão presentes no interior das vesículas como as macromoléculas (carboidratos) envolvidas no metabolismo energético. Embora o conceito do uso de vesículas, pelos fungos, para o transporte de produtos através da parede celular seja recente, a ideia do transporte vesicular entre a membrana celular e a parede celular está bem estabelecida. Os caminhos de transporte vesiculares podem ser uma estratégia evolutiva para que a célula fúngica seja capaz de infectar o tecido de seus hospedeiros, causando alterações na sua fisiologia, o que caracteriza a patogenicidade (CASADEVALL et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; 2013). O transporte de vesículas transmembrana ocorre da mesma forma para os fungos ascomicetos e basidiomicetos (CASADEVALL et al., 2009).

Figura 1- Representação esquemática da biossíntese de EPS envolvendo as etapas de assimilação do substrato (glucose), via Embden Meyerhof, síntese de monossacarídeos



Fonte: Baseado em DONOT et al., 2012; KUMAR; MODY; JHA, 2007; RAMOS, et al., 2001; ZHONG; TANG, 2004.

Figura 2-Esquema da formação de exopolissacarídeo por ação da enzima polimerase



Fonte: Baseado em DONOT et al., 2012; KUMAR; MODY; JHA, 2007; RAMOS, et al., 2001.

2.2 Fungos endofíticos: descrição geral

Bary em 1866 atribuiu o termo endofítico a qualquer micro-organismo que tem como “habitat” os tecidos e órgãos de plantas, sem causar danos imediatos ao hospedeiro. Entretanto, a discreta colonização pode afetar o fenótipo (fisiologia e bioquímica), distribuição e ecologia do hospedeiro (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013; PERSON et al., 2010).

O maior número de espécies de endofíticos que pode ser encontrado em diferentes nichos ecológicos está localizado no Filo *Ascomycota*. A entrada dos endofíticos nos hospedeiros acontece de duas maneiras: de forma natural, através dos estômatos e crescimento de raízes e de forma artificial, por meio de injúrias causadas por práticas agrícolas (SURYANARAYANAN et al., 2009). O endofítico pode permanecer latente por longos períodos, quando há condições favoráveis como nutrientes, temperatura e água ou produzir uma ação patogênica, quando ocorre indisponibilidade de um ou mais fatores (KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2013; SURYANARAYANAN et al., 2009).

A relação entre fungos endofíticos e hospedeiros pode ser descrita em termos de especificidade, recorrência, seletividade ou preferência. A especificidade ocorre por restrição do micro-organismo a um único hospedeiro ou a um grupo de espécies afins e implica em interação bioquímica complexa interpretada como uma forma de adaptação ecológica. A recorrência, seletividade ou preferência ocorre quando há fungos endofíticos predominantes em um ou mais hospedeiros vegetais, localizados num mesmo habitat (SELIM et al., 2012).

A adaptação dos fungos endofíticos, ao seu hospedeiro, estimula a atividade de diferentes vias metabólicas, no sentido de produzir compostos que garantam sua sobrevivência na planta. Para o hospedeiro, a presença do fungo endofítico favorece o crescimento, devido à biossíntese de metabólitos secundários, além de permitir maior resistência da planta ao estresse. A co-evolução favoreceu uma relação amigável que foi gradualmente, durante muitos anos, ocorrendo entre o fungo endofítico e seus hospedeiros. Outra característica dos endófitos como espécies extremamente dinâmicas está na concorrência entre fungos e antagonistas no sentido de provocar alterações químicas com efeitos concomitantes sobre os insetos e outros patógenos que também atacam o hospedeiro (YAN et al., 2015).

O metabolismo dinâmico, dos fungos endofíticos, tem estimulado seu estudo com o intuito de obter importantes componentes bioativos, que são aplicáveis nas áreas industriais. Muitos metabólitos secretados por fungos podem ser utilizados como produtos

biotecnológicos, entre eles os exopolissacarídeos. O rastreamento de fungos endofíticos, especialmente Ascomycota, tem sido alvo de pesquisas promissoras na produção dessas moléculas, como descrito por Mahapatra e Banerjee (2012) que relataram o isolamento e caracterização de EPS produzido por cepas endofíticas de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*.

Considerando essa capacidade dos fungos endofíticos, três foram selecionados para estudo neste trabalho, sendo que algumas características abordadas serão descritas a seguir.

2.2.1 *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*: endofíticos com potencial para produção de exopolissacarídeos

2.2.1.1 *Neofusicoccum parvum*

O fungo *Neofusicoccum parvum* (Figura 03) (Filo *Ascomycota*) é um representante da família *Botryosphaeriaceae*, que age como patógeno, necrotrófico ou sapróbio, especialmente em plantas lenhosas (PHILLIPS et al., 2013).

As espécies desta família são encontradas principalmente na forma anamorfa (apenas na forma hifa), sendo a telemorfa (com reprodução sexuada) mais rara, tanto nas culturas *in vitro* como na natureza. Entretanto, as formas anamorfas apresentam caracteres sobrepostos, por isso, a caracterização morfológica e molecular atualmente é utilizada para resolver os problemas de identificação e taxonomia entre seus membros (MOHAMMADI et al., 2013). A diferenciação da complexidade taxonômica entre as espécies desta família, com as técnicas modernas de biologia molecular, tem colaborado com os estudos sobre os diversos aspectos biológicos, incluindo endofíticos, entre os representantes *Botryosphaeriaceae*. As espécies, encontradas na literatura, cujas identificações foram anteriores aos recursos das ferramentas moleculares, devem ser cuidadosamente analisadas, pois podem gerar interpretações errôneas. Um exemplo disto ocorre com a espécie de *N. parvum* que durante anos foi identificada com *N. ribis* (anteriormente descrito como *Botryosphaeria ribis*), e utilizada como sinônimos, porém o sequenciamento genômico separou as espécies (SAKALIDIS et al., 2013; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Figura 3-Micélio do fungo *Neofusicoccum parvum* crescidos em BDA a $28 \pm 2^\circ\text{C}$



Fonte: Própria autora

Neofusicoccum parvum tem distribuição mundial e está associado aos diversos hospedeiros com capacidade de causar doenças, principalmente no caule de algumas espécies de plantas (nativas ou horticulturas) (MARTOS et al., 2008), entretanto em alguns vegetais pode ser encontrado como endofítico (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Durante seu metabolismo pode secretar, nos hospedeiros, substâncias tóxicas e exopolissacarídeos, compostos principalmente de manose, glucose e galactose (MARTOS et al., 2008; SAKALIDIS et al., 2013).

É importante ressaltar que a família Botriosphaeriaceae (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007) apresenta espécies produtoras de exopolissacarídeos do tipo β -glucana (SELBMANN et al., 2002; STELUTI et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2008), que têm potencial para aplicação tanto na área alimentícia quanto médica, devido a suas características físico-químicas e imunomoduladoras específicas. Esteves e colaboradores (2014) analisaram o potencial enzimático de cerca de cinquenta espécies de botriosferáceos, incluindo *N. parvum*, e comprovaram a produção de lacases, celulases, amilases e outras enzimas. Algumas cepas de *Neofusicoccum* são mais conhecidas e estudadas como patógenos de eucalipto e de manga, inclusive na região semiárida do nordeste do Brasil (COSTA et al., 2010). Martos e colaboradores (2008) relataram a obtenção de EPS produzido pelo fungo *N. parvum*, como

patógeno de parreiras de uvas, contendo a seguinte composição manose, glucose e galactose (2:1:1). Não foi relatado exopolissacarídeos produzido pelo *N. parvum*, como endofítico.

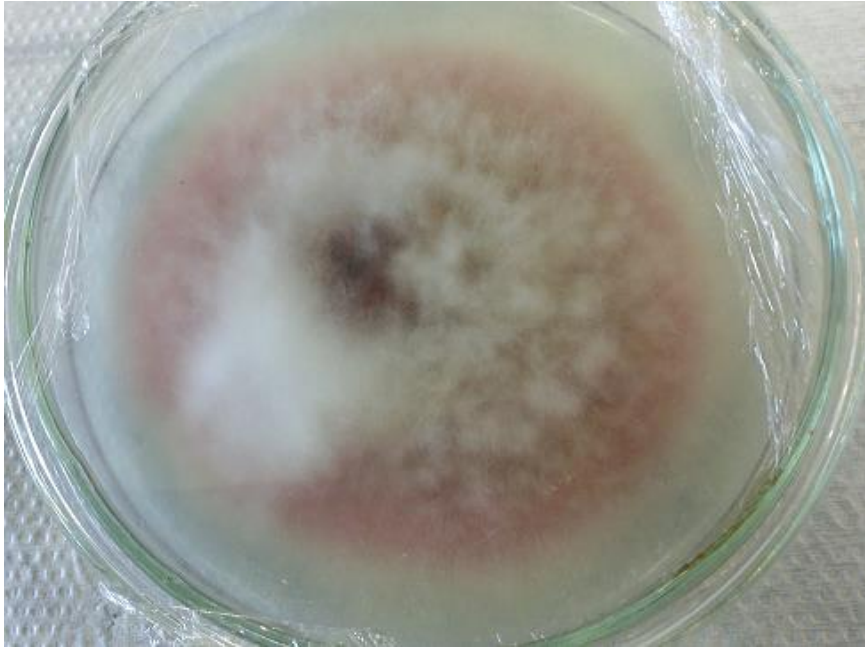
2.2.1.2 *Fusarium* sp

O gênero *Fusarium* (anamorfo) e *Giberella* (telemorfo) pertencente ao filo *Ascomycota*, família *Nectriaceae*, pode ser encontrado no solo, no ar e nos vegetais, incluindo os alimentos *in natura*, com aproximadamente 775 espécies e subespécies descritas (MACIEL, 2012). Com ampla distribuição geográfica, são encontradas espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita em determinados ambientes. Há predomínio nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, embora algumas espécies tenham uma íntima associação com os seus hospedeiros, como endofíticos (PRADEEP et al., 2015). As espécies de *Fusarium* podem ser identificadas pela morfologia dos esporos assexuais, sendo a forma de apresentação a principal característica. Os esporos produzidos por este gênero são: macroconídios, microcondrias e clamidósporos (MORETTI, 2009).

Fusarium sp (Figura 04) tem sido isolado de diversos produtos agrícolas de interesse econômico como milho, arroz, trigo, cevada, entre outros. É um micro-organismo muito estudado na fitopatologia e ciências de alimentos, por secretar metabólitos secundários indesejáveis, como micotoxinas. Em ambiente de estocagem de alimentos, os fungos iniciam a fase de declínio da curva de crescimento, mantendo apenas as toxinas produzidas (metabólitos secundários) (DEGRAEVE et al., 2016). Necessitam de alta umidade para reproduzirem, por isso, são definidos como fungos de campo (HIROOKA; YAMAGUCHI, 1994).

Em termos biotecnológicos as pesquisas com *Fusarium* parecem estar mais centradas na produção de enzimas como xilanases, celulasas, pectinases e lipases (ORTEGA et al., 2013; SURYANARAYANAN et al., 2009). Outros compostos do metabolismo secundário secretados pelo *Fusarium* spp são os pigmentos. O *Fusarium moniliforme*, um importante parasita de ocorrência mundial, secreta dois grupos de pigmentos, bicaverina e carotenóides, com bioatividade contra a *Leishmania braziliensis*. Pradeep e colaboradores (2015) determinaram a atividade larvicida de uma nova isoquinolina isolada do *Fusarium moniliforme* (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; NEHAD; EL-SHAMY, 2010).

Figura 4-Micélios do fungo *Fusarium* sp crescido em BDA a $28 \pm 2^\circ\text{C}$



Fonte: Própria autora

2.2.1.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* sp, anamorfo e *Glomerella* como telemorfo pertencem ao Filo *Ascomycota*, família *Phyllachoraceae*. Uma das espécies desse gênero, o *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 05) é fitopatógeno causador da antracnose, que resulta em grandes perdas econômicas. A contaminação fúngica no hospedeiro ocorre por adesão dos esporos, germinação, formação do tubo germinativo com apressório melanizado, e desenvolvimento de hifas biotróficas e necrotróficas (MANAMGODA et al., 2013).

A identificação do gênero deve ser realizada por observação das características morfológicas, microscópicas e molecular. Entretanto, o *C. gloeosporioides* é uma espécie complexa, cuja identificação deve ser realizada por sequenciamento genético (CANNON et al., 2012).

Figura 5-Micélios do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* crescido em BDA a $28 \pm 2^\circ\text{C}$



Fonte: Própria autora

Colletotrichum spp são encontrados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, apesar de algumas espécies afetarem culturas de clima temperado (CANNON et al., 2012). Asakura e colaboradores (2012) relataram que a patogenicidade, dos gêneros *Magnaporthe* e *Colletotrichum*, estava relacionada com a presença de melanina nos apressórios. Confirmaram tal hipótese após exposição do fungo a agentes mutagênicos e produtos químicos que levaram a perda de patogenicidade. O *C. gloeosporioides* contamina os tecidos e órgãos dos vegetais em qualquer fase do desenvolvimento e pode ser disseminado, de uma planta para outra, por meio de agentes presentes no ambiente aéreo. As principais culturas agrícolas atingidas são manga, banana, abacate, mamão papaia, café e maracujá. Outro fator que colabora com a infecção é a secreção de enzimas (lacase, pectinase, cutinase, amilase, lipase, protease e celulase) que degradam o substrato, expondo o vegetal ao micro-organismo (CANNON et al., 2012; KAMLE et al., 2013).

Espécies desse gênero também são capazes de interagir de forma mutualística ou comensal, com plantas diferentes daquelas onde causam doenças. Assim, podem ser encontradas como endofíticos, como as cepas isoladas de plantas medicinais tradicionais na China, como *Forsythia suspensa* e *Uncaria rhynchophylla*, com o objetivo de obter compostos bioativos aplicáveis no tratamento farmacológico de diferentes patologias (ZHANG; WEI; WANG, 2012).

Espécies endofíticas de *Colletotrichum* têm sido encontradas em uma grande variedade de plantas, como feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), teixo chinês (árvore chinesa) (*Taxus mairei*), café (*Coffe arábica*), entre outras (GONZAGA et al., 2014).

Zou e colaboradores (2000) observaram que o endofítico *C. gloeosporioides*, retirado de hastes de *Artemisia mongolica*, quando cultivado em fermentação submersa, produzia um metabólito secundário, denominado ácido colletotrico, com atividade antimicrobiana. No bioensaio as concentrações inibitórias mínimas, para o crescimento das bactérias estudadas, foram 25 µg/ mL para o *Bacillus subtilis* e 50 µg/ mL para *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lutea*.

Além desses metabólitos, os fungos do gênero *Colletotrichum* também apresentam capacidade de produzir enzimas dos complexos pectinolítico e celulolítico, sintetizadas durante o processo de infecção em frutas como a banana (JAT; SHARMA; GOUR, 2013). Entretanto, pouco se tem na literatura sobre a produção de polissacarídeos por este grupo.

Os fungos endofíticos secretam compostos para o meio extracelular com o intuito de sobreviver no interior do hospedeiro. Por isso, ao investigar os metabólitos secretados, presentes em locais incomuns ou especializados, pode aumentar as possibilidades em descobrir novos compostos com aplicações biológicas (KHARWAR et al., 2011).

2.3 Parâmetros de cultivo para obtenção de exopolissacarídeos

Os principais parâmetros utilizados para a obtenção de exopolissacarídeos fúngicos em meio de cultura são os macronutrientes (fonte de carbono e nitrogênio), e micronutrientes (vitaminas, sais minerais). Os fatores físico-químicos (pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação) devem acompanhar os nutricionais para que o crescimento e o metabolismo do fungo sejam favoráveis à secreção de exopolissacarídeos. Por isso, aperfeiçoar o processo de obtenção de qualquer metabólito microbiano é essencial para que o rendimento do mesmo seja favorável à sua aplicação (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Durante o processo da produção de moléculas por fungos filamentosos é necessário reproduzir em laboratório as condições de desenvolvimento do micro-organismo na natureza. Também é possível estabelecer novas situações de crescimento utilizando, por exemplo, condições previamente utilizadas por outros organismos. É importante ressaltar que cada micro-organismo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico, e isso pode influenciar tanto na produção quanto na determinação da qualidade/quantidade das substâncias produzidas (NEHAD; EL-SHAMY, 2010).

Nem sempre as condições utilizadas geram resultados desejados, mas as características metabólicas dos fungos permitem explorá-las para maximizar o seu aproveitamento. Por isso, para cada processo existe a necessidade de manutenção das condições bióticas e abióticas, além do correto estágio de desenvolvimento fúngico, para a obtenção do máximo de produção do metabólito de interesse (PAPAGIANINI, 2004).

O cultivo *in vitro* é um dos procedimentos utilizados para que os micro-organismos sintetizem e secretem moléculas de interesse. A síntese biológica é um recurso que facilita a obtenção de produtos que, por métodos químicos, seriam difíceis ou dispendiosos devido à complexidade dos precursores e catalisadores como as enzimas. Entretanto, o metabolismo deve estar integrado e coordenado para assegurar que os produtos sejam sintetizados em quantidades suficientes e não interfiram na manutenção do metabolismo e na vida do fungo (SANCHEZ; DEMAIN, 2002).

O cultivo em meio submerso para obtenção de EPS apresenta vantagens em relação ao cultivo em estado sólido devido ao desenvolvimento de maior quantidade de micélio em espaço compacto, além de rapidez no processo de cultivo e menor risco de contaminação microbiana (KIM et al., 2002; LEE et al., 2004). A aglomeração das hifas ocorre na interface líquido-sólido, entre o meio de cultivo e a superfície celular (PAPAGIANNI, 2004).

Alguns fatores são imprescindíveis na formação da biomassa fúngica e para secreção de polissacarídeos: (1) velocidade de agitação dos cultivos, que interfere na cinética e na transferência de calor. O movimento acelerado favorece a esporulação do micro-organismo com diminuição do crescimento celular, além de afetar a agregação micelial, formando *pellets*. Ao contrário, a baixa velocidade de agitação pode inibir a transmissão do calor e, conseqüentemente, retardar o crescimento micelial; (2) a concentração de inóculo é inversamente proporcional ao tamanho dos *pellets*, ou seja, os maiores podem ser obtidos com baixas concentrações de inóculo; (3) as concentrações de íons H^+ presentes no meio de cultivo, afetam a função da membrana celular, a morfologia da célula, a solubilidade dos sais, a ionização dos substratos, a captação de vários nutrientes, a biossíntese de produtos e a formação dos sedimentos celulares (GRIMM et al., 2005).

A aeração é o principal parâmetro que altera a forma de micelial filamentosa (ou sedimentar) para arredondada durante o cultivo submerso, conforme a concentração de oxigênio dissolvido no meio. A primeira observação da alteração da forma dos micélios foi realizada por Emerson em 1950, que propôs um modelo matemático capaz de descrever o crescimento micelial em relação ao fornecimento nutricional, nas culturas dos micro-organismos (PARK et al., 2002). A viscosidade do meio de cultivo é outro parâmetro que

influencia a nutrição das hifas. Os micélios arredondados em geral proporcionam menor viscosidade, ao contrário dos filamentosos. O aumento da viscosidade do caldo e da biomassa influencia na transferência da taxa gás/líquido, no transporte e na captação de nutrientes pelas hifas fúngicas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; GRIMM et al., 2005).

A manutenção do pH ideal favorece o processo de cultivo *in vitro*, tanto na obtenção da quantidade e formato da massa celular, como na produção de biopolímeros e na reologia do caldo. Em estudo realizado com *Schizophyllum commune*, o pH 4,5, favoreceu a secreção de polissacarídeos de alta massa molecular, porém com baixo rendimento. Enquanto que, em pH próximo de 7,0, a quantidade de exopolissacarídeo foi maior com massa molecular menor. Vale ressaltar que massa molecular elevada aliada ao tipo de ligação glicosídica favorece o tipo de aplicação biológica do EPS como, por exemplo, antitumoral. Em geral, o pH ideal para a produção de EPS fúngico está entre 5,0 a 7,0, mas há relatos na literatura sobre a produção de EPS em pH menores ou maiores, dependendo da cepa microbiana (KIM; PARK; YUN, 2006; SHU; LUNG, 2004).

2.4 Caracterização química de exopolissacarídeos

A aplicação biológica de exopolissacarídeos está relacionada com sua estrutura química que, uma vez produzida pelo micro-organismo, deve estar pura, para que a sua identidade química seja estabelecida.

A purificação dos exopolissacarídeos geralmente se faz pela utilização dos mesmos procedimentos utilizados para endopolissacarídeos e polissacarídeos de parede celular. Esses dois últimos grupos são obtidos ou extraídos por procedimentos químicos que levam à presença de diferentes moléculas biológicas, tornando o processo de purificação mais laborioso e complexo (PAZUR, 1994).

Os exopolissacarídeos, uma vez estabelecidas as condições ideais de cultivo, são secretados como um ou dois grupos de moléculas quimicamente distintas, tornando o processo de purificação mais simples. Entretanto, o tamanho das moléculas, dentro de cada grupo, é bastante variável e isso transforma os resultados de procedimentos simples em interpretações, às vezes, ambíguas.

Antes do processo de caracterização química do EPS, alíquotas do caldo de fermentação ou extrato celular são submetidas à diálise exaustiva para remoção de sais, fontes de carbono e nitrogênio, entre outras moléculas de massa molecular pequena. Após essas etapas, análise de cromatografia de exclusão estérica a alta pressão, denominada HPSEC

(*high performance size exclusion chromatography*), acoplada a um sistema de detecção para carboidratos que é o índice de refração (RID – *refraction index detector*), é efetuada. Neste sistema, a utilização de colunas em série preenchidas com géis de porosidade distintas, normalmente separa os exopolissacarídeos por diferença de massas moleculares (ORLANDELLI et al., 2016). A polidispersividade (população de moléculas de mesma identidade química, mas com massas moleculares diferentes) é, infelizmente, um fator complicador. Raramente duas moléculas distintas eluem ao mesmo tempo, porém, a presença de um único pico de base muito alargada também não significa que o material esteja puro sugerindo que procedimentos de purificação devem ser adotados. Eles podem ser tão simples como congelamento e descongelamento, que separa polissacarídeos pelas diferenças de solubilidade, passando pelos métodos químicos que complexam polímeros de manose e galactose com o cobre (solução de Fehling) e os métodos cromatográficos que separam por tamanho (filtração em gel), carga (troca iônica) e adsorção.

Portanto, a primeira etapa na caracterização de um polissacarídeo é a determinação de sua pureza, que é refletida por sua composição química, incluindo conteúdo de açúcar total, presença e quantificação de ácidos urônicos, grupos acetil, proteínas, etc. Métodos colorimétricos são normalmente convenientes para estimar o conteúdo desses compostos ou grupamentos. A segunda etapa é a determinação da composição monossacarídica que informará os diferentes monossacarídeos bem como o percentual relativo de cada um na macromolécula. A composição é determinada analisando os monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão (HPAEC) ou cromatografia líquido-gasosa, após hidrólise ácida total dos exopolissacarídeos (CORRADI DA SILVA et al., 2005; KIM et al., 2003).

O tamanho do anel e a posição da ligação glicosídica nas unidades formadoras do polissacarídeo são estabelecidos pelas análises de metilação (CIUCANU; KEREK, 1984). Resumidamente, o método envolve a metilação completa de um polissacarídeo, hidrólise a uma mistura de monossacarídeos parcialmente metilados, redução destes a alditóis, acetilação dos alditóis e, identificação dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, por cromatografia líquido-gasosa e espectrometria de massa. Os tipos de ligações são deduzidos a partir da natureza dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (PAZUR, 1994)

A conformação D ou L pode ser determinada pelas medidas das propriedades específicas dos monossacarídeos, isolados a partir da hidrólise ácida dos polissacarídeos. É essencial que o monômero seja isolado na forma pura. Rotação específica, susceptibilidade enzimática ou reatividade química com reagentes opticamente ativos podem ser usados. Por

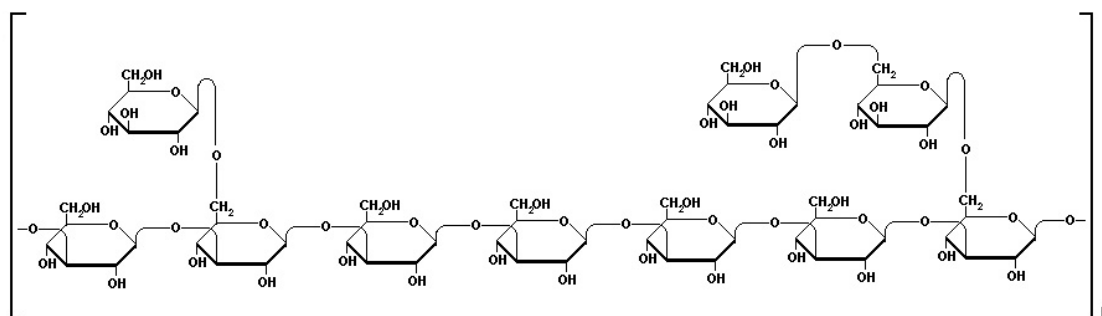
comparação dos resultados com padrões específicos a configuração D ou L dos desconhecidos pode ser estabelecida (PAZUR, 1994).

A configuração α e β das ligações glicosídicas pode ser estabelecida por ensaios enzimáticos, oxidações seletivas e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Essa última técnica tornou-se a ferramenta físico-química mais poderosa e não destrutiva para determinar a estrutura polissacarídica (CUI, 2005). O princípio da espectroscopia de RMN é baseado nas propriedades magnéticas de alguns núcleos. Dependendo do número atômico e número de massa há um momento angular associado ao número do spin. Alguns núcleos possuem estados de spin $+1/2$ e $-1/2$ e essa propriedade permite que eles sejam estudados por RMN. Exemplo desses núcleos são ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P (BRUICE, 2006). Para os carboidratos os núcleos úteis são ^1H e ^{13}C . Geralmente os espectros de RMN contêm todas as informações estruturais sobre oligo- e polissacarídeos. As técnicas de RMN bidimensionais (homonuclear e heteronuclear) surgiram como uma inovação melhorando tanto a resolução quanto a sensibilidade da análise.

Synysya; Novak (2013) relataram que atribuir os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN possibilitam a identificação das formas anoméricas (α e β) dos resíduos de monossacarídeos e a posição de ligações glicosídicas ou presença de substituintes.

Os polímeros de carboidratos são compostos, principalmente, por estruturas de D-glucopiranosose (D-Glcp), constituinte obrigatório da parede celular, micélio, corpos de frutificação, entre outras estruturas fúngicas. Os EPS compostos apenas por glucose são definidos como glucanas. Podem ser encontrados em grande variabilidade com relação à configuração, posição e sequência das ligações glicosídicas, grau de ramificação e conformação.

Figura 6-Botriosferana [β - (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana], substituída por unidades glucosídicas e/ou gentiobiosídicas a cada cinco unidades da cadeia principal



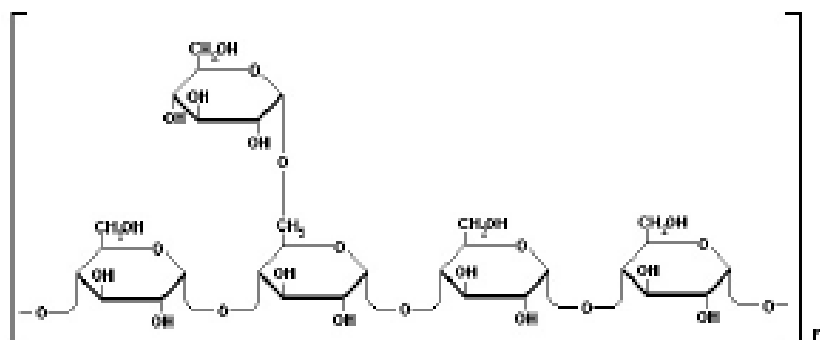
Fonte: CORRADI DA SILVA et al., 2006

As glucanas ramificadas (Figura 06) podem conter cadeias laterais com uma ou mais unidades monossacarídicas, unidas à cadeia principal. A configuração do carbono anomérico das D-Glcp pode classificá-las em três grupos principais: α -D-glucana, β -D-glucana e mista (α e β -D-glucana). As variações no grau de ramificação podem atribuir a essas soluções, propriedades reológicas interessantes assim como a ação antitumoral. Essas propriedades podem ser apresentadas pelas glucanas extracelulares do tipo β , principalmente com ligações (1 \rightarrow 3), em tripla hélice e massa molecular elevada. As glucanas do tipo α ou β -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 6) não apresentam as mesmas propriedades (BARBOSA et al., 2004; SYNYTSYA et al., 2009; SYNYTSYA; NOVAK, 2013).

O fungo *Aureobasidium pullulans*, secreta o homopolissacarídeo composto de glucose, denominado de pululana (Figura 07) e descrito na maioria dos casos como um polímero composto de uma sucessão de trímeros de maltotrioses com estrutura química α -(1 \rightarrow 4)-Glc- α -(1 \rightarrow 4)-Glc- α -(1 \rightarrow 6) e alguns outros tipos com unidades de maltotetraose (α -(1 \rightarrow 4)-Glc- α -(1 \rightarrow 4)-Glc- α -(1 \rightarrow 6)-Glc- α -(1 \rightarrow 6)) utilizada nas indústrias de alimentos, de adesivos, como pré-bióticos e nos poços de petróleo (DONOT et al., 2012).

Heteropolissacarídeo composto de manose e galactose com ligações β -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 2) são secretados pelo fungo *Monilinia fructigena*. *Aspergillus flavus* secreta EPS contendo manose e galactose, com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 2). Um exopolissacarídeo, secretado pelo fungo *Trichoderma pseudokoningii*, composto por ramnose, xilose, fucose, manose, glucose e galactose apresentou atividade apoptótica em células leucêmicas (HUANG et al., 2012). *Isaria farinosa*, fungo entomopatogênico, secreta polissacarídeo contendo os monossacarídeos manose, galactose e glucose, associados ao ácido urônico, com as atividades antitumoral e antioxidante (JIANG et al., 2008).

Figura 7-Estrutura química da pululana com unidades de repetição de maltotriose



Fonte: CORRADI DA SILVA et al., 2006

Em seus nichos ecológicos os fungos secretam os polissacarídeos (EPS) com funções específicas, como meio de adesão ao substrato, imobilização de enzimas exocelulares e armazenamento nutricional. As β -glucanas atuam na prevenção da desidratação de hifas, especialmente, por tratar-se de molécula higroscópica, aumentando a tolerância do fungo, à dessecação, em ambientes com restrição hídrica (MANZONI; ROLLINI, 2001).

2.5. Derivatização de exopolissacarídeos por sulfatação e atividade biológica

A diversidade química dos exopolissacarídeos (EPS) bem como a possibilidade de sua utilização como substrato para diferentes modificações químicas (carboxilação, sulfatação e metilação) aumentam seu espectro de aplicação (VASCONCELOS et al., 2013), que depende de fatores relacionados com a estrutura da molécula.

Habijanic e colaboradores (2015) relataram que o fungo *Ganoderma lucidum*, secreta exopolissacarídeos com estruturas e propriedades químicas e atividades biológicas diversificadas, destacando-se a imunomoduladora. As estruturas químicas identificadas destes EPS foram β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana e β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, prevalecendo a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucopiranosose com ramificação contendo de 1 a 15 unidades de β -(1 \rightarrow 6) monoglucosil. A imunoestimulação parece estar intimamente relacionada com a ligação β -(1 \rightarrow 3) da cadeia principal, cadeias laterais pequenas e estrutura helicoidal.

Há na literatura muitos registros da ação imunomoduladora e/ou antiproliferativa de glucanas fúngicas (ORLANDELLI et al., 2017), entretanto, um outro campo de pesquisa tem se tornado inovativo onde os polissacarídeos são quimicamente modificados, pela inserção de grupamentos químicos, gerando moléculas com ação farmacológica diferenciada. Uma dessas reações de derivatização é conhecida como sulfatação (VASCONCELOS et al., 2013).

Protocolos de sulfatação foram desenvolvidos para diferentes polissacarídeos como curdulana, dextrana, botriosferana, manogalactana, carboximetil celulose, etc. O procedimento ocorre através da reação entre a piridina e o ácido clorossulfônico (ClSO_3H) ou complexos de trióxidos de enxofre com aminas (piridina, trietilamina, *N,N*-dimetilformamida) (GERESH; MAMONTOV; WEINSTEIN, 2002). O primeiro método, ou seja, aquele que utiliza a piridina e o ácido clorossulfônico é mais vantajoso por produzir elevados rendimentos de polissacarídeos sulfatados, com alto grau de substituição (DS). Os polissacarídeos com elevados DS apresentam características importantes para serem aplicados como anticoagulantes e antitrombóticos, pois além de aumentar a hidrossolubilidade da molécula, os substituintes sulfatados desempenham melhor atividade anticoagulante em relação aos não sulfatados (BRANDI et al., 2011; KAGIMURA et al., 2015; MENDES et al., 2009). De acordo com a literatura o valor de DS igual ou superior a 0,60 é fundamental para que o polissacarídeo sulfatado possa agir como um anticoagulante (VASCONCELOS et al., 2013).

Há mais de 70 anos a heparina, uma glicosaminoglicana, é a droga de escolha na prevenção e tratamento de desordens tromboembólicas. Existem alguns problemas relacionados à sua aplicação clínica, tais como ineficácia em pacientes com deficiência em antitrombina, complicações de sangramento e trombocitopenia, induzida pela heparina (ALBAN, SCHAUERTE, FRANZ, 2002). O isolamento da heparina a partir de fonte animal resulta em desvantagens com risco de contaminação, por exemplo, com “prions” que induzem a doenças como BSE (*bovine spongiform encephalopathy* – doença da vaca louca). Portanto, um campo de pesquisa é o desenvolvimento de alternativas para substituir a heparina.

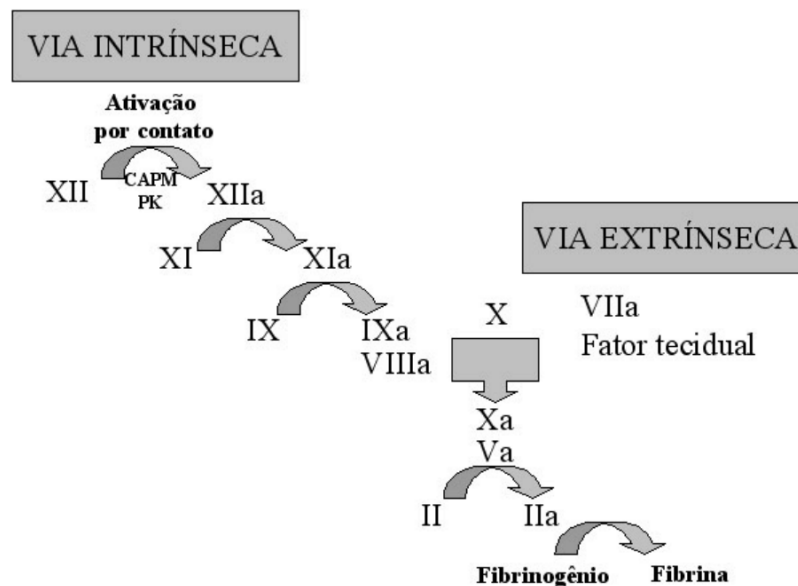
Os polissacarídeos sulfatados têm surgido como uma tentativa para se descobrir novas drogas antitrombóticas (ERGINER et al., 2016). Além de seus efeitos antitrombóticos e anticoagulantes esses polímeros sulfatados também apresentam ação antiaterosclerótica, antiproliferativa, antiadesiva, antiangiogênica e antiviral (ALBAN, SCHAUERTE, FRANZ, 2002).

Vários polissacarídeos quimicamente sulfatados tais como xilana, amilose, celulose, curdulana e galactana tiveram suas atividades anticoagulantes investigadas. Segundo os autores glucanas com ligação β -(1→3) sulfatadas em C-6 apresentaram melhor atividade anticoagulante (CHAIDEDGUMJORN et al., 2002). Mendes e colaboradores (2009) e Brandi e colaboradores (2011) isolaram β -glucanas (1→3; 1→6), obtidas em diferentes condições de cultivo, que por derivatização apresentaram atividade anticoagulante. Uma β -(1→6)-D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, quimicamente modificada por

sulfatação apresentou atividade anticoagulante concentração-dependente como demonstrado pelos testes do APTT e TT, sendo essa ação atribuída aos grupos sulfato inseridos no polissacarídeo, uma vez que a glucana nativa neutra não inibiu os testes de coagulação (VASCONCELOS et al., 2013).

Os ensaios PT, APTT e TT são utilizados para determinar o tempo de formação da fibrina (coágulo). A coagulação sanguínea pode ser bioquimicamente explicada através do modelo da cascata (Figura 08), que é composta por uma série de reações, fortemente controladas, para a geração de trombina no local da lesão. Trata-se de uma rede reacional que depende de compostos como zimógenos, enzimas, co-fatores e inibidores (RANA; NEEVES, 2016).

Figura 8-Modelo clássico da cascata da coagulação: vias intrínseca e extrínseca



Fonte: SILVA; MELO, 2016

A cascata da coagulação, representada na Figura 08, apresenta-se dividida em duas vias: extrínseca e intrínseca que convergem para a via comum. A via extrínseca ocorre com elementos do sangue e componentes não presentes no espaço intravascular. Inicia-se após danos ocorrido no endotélio do vaso sanguíneo, que expõe o fator tecidual (FT) composto por lipoproteínas e fosfolípidos. A via intrínseca, mais complexa que a extrínseca, ocorre no sangue, onde seus ativadores são encontrados. O processo inicia na presença de fatores de contato, seguida da interação e ativação do fator XII em uma superfície negativamente carregada. Ambas convergem para o ponto de ativação do fator X, denominado de via comum. Na extrínseca, o fator VII interage com uma proteína transmembranar, que é

liberada na superfície das células danificadas formando o complexo FT/ fator VII ativado que ativa o fator X. Na intrínseca o fator XII é ativado quando o sangue entra em contato com a superfície contendo cargas negativamente carregadas (fator de contato), desencadeando a ativação do fator XI e assim sucessivamente até a ativação do fator X. A partir daí há ativação de protrombina em trombina, que favorece a conversão de fibrinogênio em fibrina, sendo desta forma formado o coágulo (SILVA; MELO, 2016).

Outra atividade biológica descrita é a presença de espécies oxigênio-reativas (ROS), incluindo radicais livres e peróxidos, estão relacionadas como alguns dos responsáveis por várias doenças em humanos tais como câncer, aterosclerose, doença de Alzheimer, envelhecimento e processos degenerativos. Pela elevada reatividade o excesso de ROS no corpo humano, pode causar a destruição de biomoléculas tais como quebra da fita de DNA, desnaturação de proteínas, inativação de enzimas e degradação de polissacarídeos. Polifenóis, saponinas, taninos e alcalóides são antioxidantes, obtidos de fontes naturais, que podem eliminar as ROS, impedindo ou retardando a oxidação dos componentes celulares. Estudos mostram que polissacarídeos naturalmente sulfatados, isolados de algas e outras fontes, e obtidos por derivatização química apresentam propriedades antioxidantes que estão relacionadas com a presença das cargas aniônicas (JING-KUN et al., 2013).

As reações de sulfatação têm se tornado um caminho para a modificação de polissacarídeos neutros, aumentando suas solubilidades em água e desenvolvendo atividade biológica não apresentada pela molécula nativa, caracterizando-se como uma forma para obtenção de novos agentes farmacológicos com possível uso terapêutico e desenvolvimento de novos produtos para a saúde.

A incessante busca por novos fármacos movimenta a pesquisa científica e a indústria farmacêutica com a descoberta de novas moléculas químicas com potencial ação medicamentosa. Dentre elas, em geral, apenas uma será aplicável na terapêutica de forma segura e satisfatória, no entanto, um longo caminho deve ser percorrido até a concretização do fármaco, que se inicia com a síntese da molécula, seguida da caracterização química e sua aplicabilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp, *Colletotrichum gloeosporioides* visando sua caracterização estrutural e aplicação biológica.

3.2 Objetivos Específicos

Verificar a influência da concentração do inóculo e do tempo de cultivo na produção de exopolissacarídeos;

Determinar a massa molecular, homogeneidade e composição monossacarídica dos EPS produzidos;

Determinar a estrutura química do EPS contendo glucose por metilação e métodos espectroscópicos (FT-IR e RMN).

Derivatizar o EPS por reação de sulfatação;

Realizar ensaios de atividade anticoagulante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Micro-organismos

Os fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp, isolados de folhas de espinheira santa (*Maytenus aquifolia*), e *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de dormideira (*Mimosa pudica*), foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Adriana Knob (UNICENTRO-Guarapuava- Pr) e identificados pelo Prof. Dr. André Rodrigues (UNESP-Rio Claro- SP).

4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo dos meios de cultivo e soluções foram de grau analítico, adquiridos da Fluka, Merck ou Sigma.

4.2 Métodos

4.2.1 Manutenção dos micro-organismos

Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio de 15 mL, contendo meio BDA, inclinados e refrigerados a 4°C (± 2 °C), com repiques bimensais.

4.2.2 Reativação dos fungos e preparo do inóculo

Os fungos foram transferidos assepticamente do meio de manutenção (BDA) para placas de Petri contendo meio mínimo de sais de Vogel (VOGEL, 1956) identificado por MMSV acrescido de glucose 1 % (m/v) e ágar 2 % (m/v). As placas contendo o fungo *Neofusicoccum parvum* foram incubadas por 4 dias, enquanto que *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides* foram mantidas por 5 dias a 28 ± 2 °C, em estufa bacteriológica (Estufa NOVA ÉTICA, 411-D). O preparo do inóculo foi desenvolvido em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de MMSV e glucose 1 % (m/v) para onde foram transferidas, da superfície das placas, pequenas porções aleatórias de hifas. A proporção ar:meio foi mantida em 5:1 e os cultivos foram incubados, sob agitação constante de 180 rpm, em incubadora Orbital (tipo *shaker*) CIENLAB, durante 48 horas a 28 ± 2 °C.

Em seguida ao período de incubação, os micélios fúngicos foram transferidos, assepticamente, para um homogeneizador de células (blender) autoclavado e triturados por 30 segundos, em velocidade máxima. O material obtido foi, então, centrifugado a 4°C por 30 minutos a 4800 x g, com o descarte do sobrenadante, a massa celular precipitada foi ressuspensa em 10 mL de solução salina fisiológica estéril. A suspensão de células homogeneizada foi diluída em solução salina fisiológica estéril até se obter um valor de absorvância entre 0,2 a 0,4 em 400 nm (STELUTI et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2008), de acordo com uma curva turbidimétrica previamente estabelecida, para calcular a concentração de células necessárias para a produção de exopolissacarídeos.

4.2.3 Cultivo submerso para a produção de exopolissacarídeos

Os cultivos submersos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, em triplicata, contendo 100 mL de MMSV acrescido de glucose 5 % (m/v) como fonte de carbono e extrato de levedura 0,2 % (m/v) como fonte de nitrogênio, mantendo-se a proporção 5:1 de ar:meio. Cada frasco foi inoculado com 1 mL da suspensão de células (de acordo com o item 4.2.2), incubados por 72 horas, a 28 ± 2 °C e em agitação constante de 180 rpm (STELUTI et al., 2004).

4.2.4 Influência da concentração de inóculo na produção dos exopolissacarídeos

Utilizando-se do meio de cultivo descrito em 4.2.3, foram testados separadamente e para cada micro-organismo os volumes de inóculo (de 1,0 a 4,0 mL, aumentando de 0,5 em 0,5 mL, da suspensão de células para cada 25 mL de meio de cultivo) para verificação da influência desse parâmetro sobre a produção de exopolissacarídeos.

4.2.5 Influência do tempo de cultivo na produção dos exopolissacarídeos

A concentração de inóculo padronizada para cada micro-organismo foi utilizada para determinar o tempo de cultivo submerso. A cada 25 mL de meio de cultivo foi utilizado o volume de inóculo, previamente determinado, para os fungos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*. Foram testados separadamente, para cada micro-organismo, os tempos de 24 em 24 horas até 120 horas, e os tempos de 168 h, 240 h e 360 h. Os cultivos foram mantidos a 28°C em agitação constante de 180 rpm.

4.2.6 Interrupção dos cultivos e recuperação do Exopolissacarídeos

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (4800 x g durante 30 min) a 4 °C, separando-se a biomassa do sobrenadante que foi posteriormente filtrado a vácuo, usando membrana filtrante de 0,45 µm (Millipore®). O sobrenadante foi então dialisado contra água destilada gelada em sistema fechado durante 24 horas, a 4 °C, com sucessivas trocas, inicialmente a cada 30 min. O material dialisado foi tratado com três volumes de etanol absoluto gelado, para precipitação dos exopolissacarídeos e mantidos *overnight* a 4 °C. Os precipitados de EPS foram centrifugados (4800 x g durante 20 min), para retirar o excesso de etanol e ressuspensos em água destilada com agitação constante até solubilização. Foram retiradas alíquotas de cada material, para as quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas e o restante do material concentrado foi congelado, liofilizado e armazenado.

4.2.7 Quantificação dos Exopolissacarídeos

As quantificações foram realizadas em triplicata para o cálculo da média e desvio padrão de cada determinação analítica.

4.2.7.1 Determinação de açúcares totais

O método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi utilizado para determinar a concentração de carboidrato total em cada uma das soluções analisadas. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela. Foi seguido o protocolo original do método, conforme descrito:

Reagentes: solução de fenol 5 % (m/v), H₂SO₄ concentrado.

Procedimento: foram adicionados 0,5 mL da solução de fenol a 0,5 mL da amostra seguido da adição de 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado em um único jato. Após 10 minutos em repouso, a leitura foi realizada em um colorímetro da marca Micronal a 480 nm.

Para calcular a concentração de carboidratos, uma curva padrão de glucose (1mg/mL) com faixa de linearidade de 5 a 50 µg foi realizada.

4.2.7.2 Determinação dos açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitro salicílico (DNS). Os açúcares redutores em meio fortemente alcalino e a quente formam enedióis, que cedem seus elétrons para reduzir o reagente de 3,5-di-nitrosalicilato a 3-amino-5-nitro salicilato, produzindo uma coloração alaranjada que será tanto mais intensa quanto maior for a concentração de açúcar redutor (MILLER, 1959)

Procedimento: a 0,250 mL de amostra foram adicionados 0,250 mL do reativo DNS. A solução resultante é deixada em banho-maria fervente por 5 minutos. Após esse tempo a solução foi resfriada e 2,5 mL de água destilada foram adicionados.

A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após homogeneização de cada solução.

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras, foi utilizada uma curva padrão de glucose 0,1 g %. A curva de calibração foi desenvolvida na faixa de linearidade de 10 a 100 µg.

4.2.7.3 Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford

A determinação da concentração de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante (Coomassie Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul. O corante reage preferencialmente com resíduos de arginina e, em menor extensão, com resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina.

Solução estoque: 40 mg de Coomassie Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto e adicionados 40 mL de H₃PO₄ 85% e água destilada para completar 100 mL de solução.

Solução de uso: foi realizada uma diluição (1:4, v/v) da solução estoque em água e, em seguida, filtrada em papel de filtro.

Procedimento: 1 mL da solução diluída do corante foi adicionado a 100 mL da amostra e em seguida sua absorvância foi medida em espectrofotômetro Shimadzu a 595 nm.

A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de calibração com albumina bovina (BSA) com concentração de 1mg/mL, na faixa de linearidade de 10 a 50 µg.

4.2.8 Teste de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC) acoplada a detector de índice de refração (RID)

A homogeneidade e o grau de pureza dos exopolissacarídeos produzidos pelos fungos foram avaliados por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC), equipado com detector de índice de refração diferencial modelo RID 10 A (SHIMADZU). As amostras foram solubilizadas em água deionizada (1mg de açúcar total/mL), com agitação magnética constante e posteriormente filtradas em membranas Millipore® (acetato de celulose) com 0,22 µm de porosidade. Alíquotas de 200 µL foram injetadas no HPSEC/RID. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação marca WATERS, com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da, dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (0,1 M), contendo azida sódica (0,03 %) foi utilizada como fase móvel, com fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 37 °C. A aquisição de dados foi realizada pela utilização do programa LC Solution (SHIMADZU CORPORATION) (CORRADI DA SILVA et al., 2013).

4.2.9 Hidrólise ácida total dos Exopolissacarídeos

A hidrólise ácida foi realizada utilizando as alíquotas liofilizadas contendo cerca de 50 µg de EPS produzido por cada micro-organismo, contidas em tubos apropriados para a prática de hidrólise. O material liofilizado foi solubilizado com 300 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 2 mol/L, os tubos foram selados cuidadosamente e aquecidos a 100 °C, por 3 horas. Após este período, o ácido foi removido por evaporação conforme descrito por BARBOSA et al., 2003, com modificações.

4.2.10 Análise da composição dos monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC/PAD)

A análise dos monossacarídeos, obtidos após hidrólise ácida total, foi realizada em cromatografia líquida de troca aniônica (HPAEC), com detector de amperometria pulsada (PAD) (DIONEX) com os cromatogramas registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente, usando uma coluna analítica CarboPac PA 1 (4 x 250 mm), equipada com guarda coluna PA 1, ao fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas utilizando água deionizada (eluyente 1) e 8 % de NaOH 200 mmol/L (eluyente 2). Após o término da eluição a coluna foi regenerada com 100 % do eluyente 2 (10

min) e, antes da injeção de nova amostra, foi submetida por 15 minutos às condições iniciais da análise (8 % de NaOH 200 mmol/L). Para detecção e quantificação dos monossacarídeos, alíquotas de 25 µL contendo aproximadamente 200 ng de cada açúcar padrão, foram injetadas na HPAEC/PAD. Foram utilizados os padrões de monossacarídeos neutros: fucose, arabinose, ramnose, galactose, glucose e manose (VASCONCELOS et al., 2008).

4.2.11 Determinação da posição das ligações glicosídicas do EPS precipitado do *C. gloeosporioides*

4.2.11.1 Metilação

Amostra de 3 mg do polissacarídeo presente no precipitado do *C. gloeosporioides* foi colocada em tubo de ensaio próprio para o procedimento de metilação e dissolvidas em 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) (para auxiliar a solubilização, ultrassonicação foi utilizado). Após completa solubilização foi adicionada uma pequena espátula de NaOH, finamente pulverizado, e então, a amostra foi submetida ao banho de ultrassom por um período de 2 horas. No tubo já frio, adicionou-se 1 mL de iodeto de metila e novamente foi submetido ao banho de ultrassom por um período de 1 a 2 horas, sendo a reação acompanhada pelo aparecimento da cor alaranjada. A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de água deionizada e o polissacarídeo metilado foi recuperado pela extração com 1,5 mL de diclorometano (4x). A fase orgânica foi recuperada e lavada com água deionizada (3 vezes) e depois, já isenta de sais, seca no evaporador rotativo.

4.2.11.2 Hidrólise, redução e acetilação do polissacarídeo metilado.

O polissacarídeo completamente metilado e seco foi submetido à hidrólise ácida com TFA 3 mol/L (1 mL) e colocado em estufa a 120 °C, durante 1 hora. Após esse tempo o ácido foi eliminado em evaporador rotativo e o material reduzido com borohidreto de sódio deuterado (1,5 mg de NaBD₄ para cada 1 mg de amostra) com o objetivo de marcar o carbono anomérico. A reação permaneceu em repouso *overnight* a temperatura ambiente. Após este período, gotas de HCl concentrado foram adicionadas para neutralização do sistema. O material foi evaporado a securo e lavado (3vezes) com 2 mL de metanol para eliminar os boratos na forma de borato de trimetila. Por fim, a amostra foi acetilada com 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético (1:1), e deixada em reação a 100 °C durante 1 hora. Os

reativos foram evaporados a secura e a amostra dissolvida em 0,1 a 0,2 mL de clorofórmio para ser injetada no cromatógrafo gasoso.

Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida preenchida com HP5-MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m) usando hélio como gás de arraste. Programa de temperatura: 160 °C (1 min) - 2 °C/min - 210 °C.

4.2.12 Método físico de separação dos exopolissacarídeos insolúveis em água

Os exopolissacarídeos liofilizados, obtidos dos três fungos estudados, foram solubilizados em água deionizada em agitação contínua (agitador magnético), sem aquecimento. Os EPS quando solubilizados em água, formavam uma solução viscosa que, centrifugada (3000 x g / 10 minutos), gerava uma fração solúvel, denominada sobrenadante, e um material sedimentado denominado de precipitado.

4.2.13 Métodos Espectroscópicos

4.2.13.1 Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador Fourier (FT-IR)

Esta análise foi efetuada para verificar a configuração anomérica das ligações glicosídicas dos polissacarídeos e acompanhar as reações de sulfatação pelo aparecimento das bandas associadas ao grupo sulfato. A espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier foi realizada usando o espectrômetro BRUKER modelo Vector 22.

Uma alíquota de 0,8 mg do EPS liofilizado, tanto natural quanto sulfatado, foi macerada com 250 mg de KBr. As pastilhas utilizadas para a análise foram feitas com uma pressão de 5 toneladas por 75 segundos. As análises foram conduzidas na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} em uma resolução de 8 cm^{-1} .

4.2.13.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A amostra (~8 mg) foi solubilizada em DMSO deuterado (250 μ L). Os experimentos de RMN uni (^1H) e bidimensional (HSQC) foram conduzidos em espectrômetros Bruker DRX 400 MHz (400,13/100,61 MHz, H/C), em tubos de 5 mm di, a 70°C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm utilizando o DMSO como referência (^1H =2,40 ppm e ^{13}C =39,7 ppm). Os dados foram analisados através de um software da Bruker.

4.2.14 Derivatização química do Exopolissacarídeo por sulfatação

O EPS produzido pelo *Colletotrichum gloeosporioides* foi derivatizado quimicamente através de uma reação de sulfatação conforme descrito por O'Neill (1955) com modificações. Vinte e três (23,0) mg do EPS (precipitado) foram dissolvidos em 5,0 mL de formamida com o uso de agitação magnética vigorosa, por um período de 3 horas.

Foram adicionados 5,0 mL de piridina (catalisador) ao sistema acima, mantendo-se em agitação vigorosa por 24 horas, à temperatura ambiente.

Em seguida, em banho de gelo, foram adicionados 2,0 mL de ácido clorossulfônico, gota a gota, tomando-se os devidos cuidados para evitar a hidratação do sistema reacional, que foi mantido sob agitação a 4 °C *overnight*. A reação foi interrompida com a adição de gelo, neutralizada com uma solução de bicarbonato de sódio 10 % (m/v), até não haver mais desprendimento de gás e então dialisada contra água corrente por 4 dias e contra água destilada por mais dois dias, em sacos de diálise apropriados (12.000 Da).

Após este período, a fração não dialisável foi concentrada em um evaporador rotativo a baixa pressão e liofilizada, para posterior determinação do grau de substituição (D.S.). O procedimento de sulfatação foi repetido mais duas vezes, totalizando três reações, para obtenção de valores de D.S. iguais ou maiores que 0,6. O acompanhamento da reação de sulfatação foi realizado através de FT-IR.

4.2.15 Determinação do grau de substituição (D.S.)

O grau de substituição do EPS_{SULFATADO} (D.S.) foi determinado através do método turbidimétrico, empregando o reagente cloreto de bário-gelatina, descrito por Dodgson e Price (1962).

Amostras de 2 mg do EPS_{SULFATADO} foram hidrolisadas com 2 mL de ácido clorídrico 1M por 5 horas a 100 °C. Após a hidrólise, uma alíquota de 0,2 mL do hidrolisado foi adicionada a 3,8 mL de TCA a 3 % (m/v) e 1 mL de solução protetora recém preparada. A solução protetora foi preparada dissolvendo-se 6 g de cloreto de sódio em 20 mL de água destilada com 0,5 mL de HCl concentrado e 2,5 mL de gelatina a 1 % (m/v). A mistura reacional foi agitada por 1 minuto e deixada em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente e depois realizada a leitura espectrofotométrica a 360 nm.

A determinação do D.S. foi feita através da seguinte fórmula:

D.S. = $162 \times S / (3200 - 102 \times S)$ (para hexoses), onde:

162 - representa 1 mol da unidade repetitiva (hexose)

3200 - representa a massa atômica do enxofre ($32\text{g} \times 100$)

102 - representa 1 mol do éster substituinte (SO_3Na)⁻¹

S - representa o teor de enxofre em porcentagem.

A porcentagem de enxofre na molécula foi determinada através da relação, previamente descrita por Whistler e Spencer, 1964:

$$\% S = (\text{BaSO}_4, \mu\text{g}) \times 0,1374 \times 100 / (\text{massa amostra sulfatada}, \mu\text{g})$$

O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva de calibração de íons sulfato (0,005 g%) na faixa de linearidade de 20 a 180 μg .

4.3 Atividade Biológica: Atividade Anticoagulante

O potencial anticoagulante do EPS SULFATADO foi realizado através dos testes clássicos de atividade anticoagulante TT (Tempo de Trombina), PT (Tempo de Protrombina) e APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado) de acordo com os protocolos presentes nos Kits da marca *In Vitro* Diagnóstica, utilizando a heparina sódica (5000 UI/mL) como padrão. Os ensaios foram conduzidos com as amostras (EPS e EPS SULFATADO 0-200 $\mu\text{g/mL}$) e o padrão (heparina 0-30 $\mu\text{g/mL}$) solubilizados em salina fisiológica (0,9 %, m/v). O plasma humano foi obtido da centrifugação de sangue de doadores saudáveis (1500 x g por 15 minutos). Para os controles, a salina fisiológica foi adicionada ao plasma sanguíneo em uma proporção de 1:10 (10 μL de salina e 90 μL de plasma), sendo esta mesma proporção mantida para as diferentes concentrações utilizadas para as amostras.

4.3.1 Tempo de protrombina (PT)

O tempo de protrombina determina o tempo de coagulação do plasma após a adição de tromboplastina (fonte de fator tissular) e cálcio. A recalcificação do plasma na presença de fator tissular gera o Fator X ativado e posteriormente um coágulo de fibrina.

As amostras (EPS e EPS SULFATADO) e controle foram ensaiados em triplicada. A cada tubo pré-aquecido (37°C) foram adicionados 100 μL da mistura plasma/amostra (90 μL plasma e 10 μL amostra – diferentes concentrações) ou plasma/padrão (90 μL plasma e 10 μL padrão – diferentes concentrações) ou plasma/controle (90 μL plasma e 10 μL salina 0,9 % (m/v)). Os tubos foram então incubados à 37°C por 3 – 5 minutos e em seguida adicionou-se

200 µL de reagente (reconstituído conforme orientação do fabricante e aquecido a 37°C). Imediatamente após a adição do reagente, o cronômetro foi acionado para registrar o tempo gasto para a formação do coágulo.

4.3.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

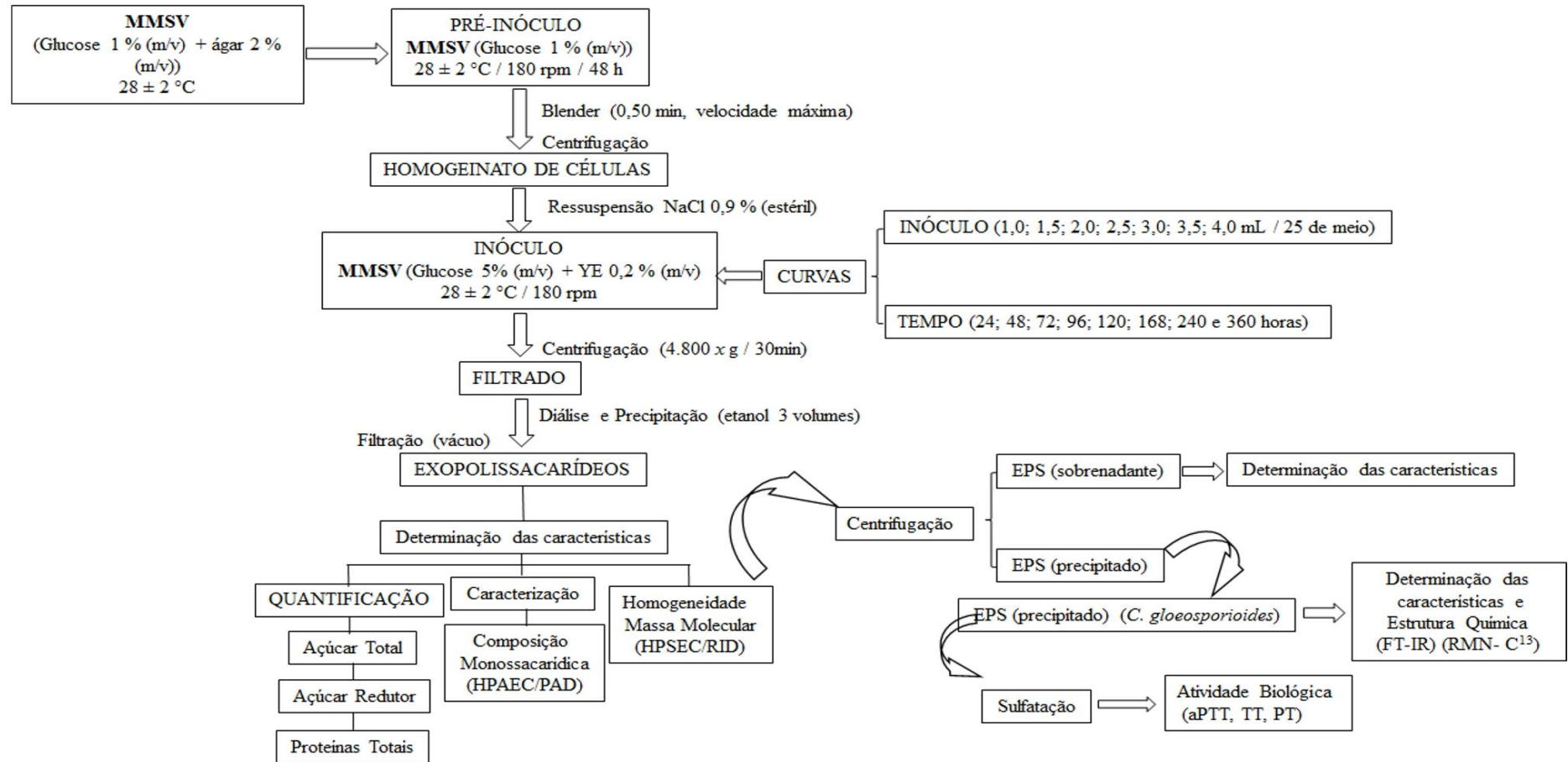
Este teste determina a ativação da fase-contato para posterior desencadeamento da via intrínseca da coagulação. Este teste contém um ativador plasmático e fosfolipídios que atuam como substituinte das plaquetas. A mistura reacional deve ser recalcificada e a formação do coágulo cronometrada.

As amostras e controle foram ensaiados em triplicada. A cada tubo pré-aquecido (37°C) foram adicionados 100 µL da mistura plasma/amostra (10 µL das amostras ou padrão - nas diferentes concentrações - ou salina 0,9% (m/v) e 90 µL plasma) e 100 µL do reagente específico. Os tubos foram então incubados à 37°C por 3 – 5 minutos e em seguida foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio. Os tubos foram então agitados brevemente, e cronometrou-se o tempo gasto para a formação do coágulo.

4.3.3 Tempo de trombina (TT)

O Tempo de Trombina é um teste simples de *screening* para condições que possam interferir na conversão de fibrinogênio em fibrina. Uma trombina de baixa potência é adicionada ao plasma e a formação do coágulo é cronometrada. As amostras e controles foram ensaiados em triplicada. A cada tubo pré-aquecido (37°C) foram adicionados 200 µL da mistura plasma/amostra (180 µL plasma e 20 µL das amostras ou padrão nas diferentes concentrações ou salina 0,9 % (m/v)). Os tubos foram então incubados à 37°C por 3 – 5 minutos, e em seguida foram adicionados 100 µL de reagente e o cronômetro foi imediatamente acionado para registrar o tempo gasto para a formação do coágulo.

Figura 9-Fluxograma da metodologia utilizada para obtenção e caracterização do exopolissacarídeo e determinação da atividade anticoagulante in vitro



Fonte: Própria autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência de experimentos efetuados neste trabalho é apresentada na forma de um fluxograma (Figura 09).

Os primeiros resultados obtidos foram através de testes prévios do meio de cultivo submerso, comparando a adição de extrato de leveduras e peptona como fontes de nitrogênio. Observou-se que os fungos cresceram e secretaram o EPS com maior eficiência, em meio contendo o extrato de leveduras. Xu e colaboradores (2006) trabalharam com fungos entomopatogênicos do gênero *Paecilomyces* e observaram uma melhor produção de EPS, quando utilizado o extrato de levedura, como fonte de nitrogênio orgânico. Smirdele e colaboradores (2006) relataram que, no cultivo *in vitro* de alguns basidiomicetos, a prática de adicionar extrato de levedura contribuiu para obter maior rendimento de polissacarídeo.

A fonte de carbono utilizada foi a glucose por tratar-se de monossacarídeo facilmente utilizado pelo metabolismo energético do micro-organismo para seu crescimento, bem como para a produção de exopolissacarídeos, conforme descrito na literatura (BANERJEE, JANA, MAHAPATRA, 2009; SHARMILLA et al., 2014). Os cultivos foram realizados, segundo Steluti e colaboradores (2004), como relatado na metodologia.

Fungos filamentosos são alvos de pesquisas, na área biotecnológica, para a obtenção de metabólitos, devido à facilidade de cultivo, secreção em quantidades volumosas dos produtos dos metabolismos primário e secundário quando em escala industrial e obtenção das substâncias em tempo e espaços menores (SELBMANN et al., 2002).

5.1 Aspectos gerais dos cultivos fúngicos em meio sólido e líquido

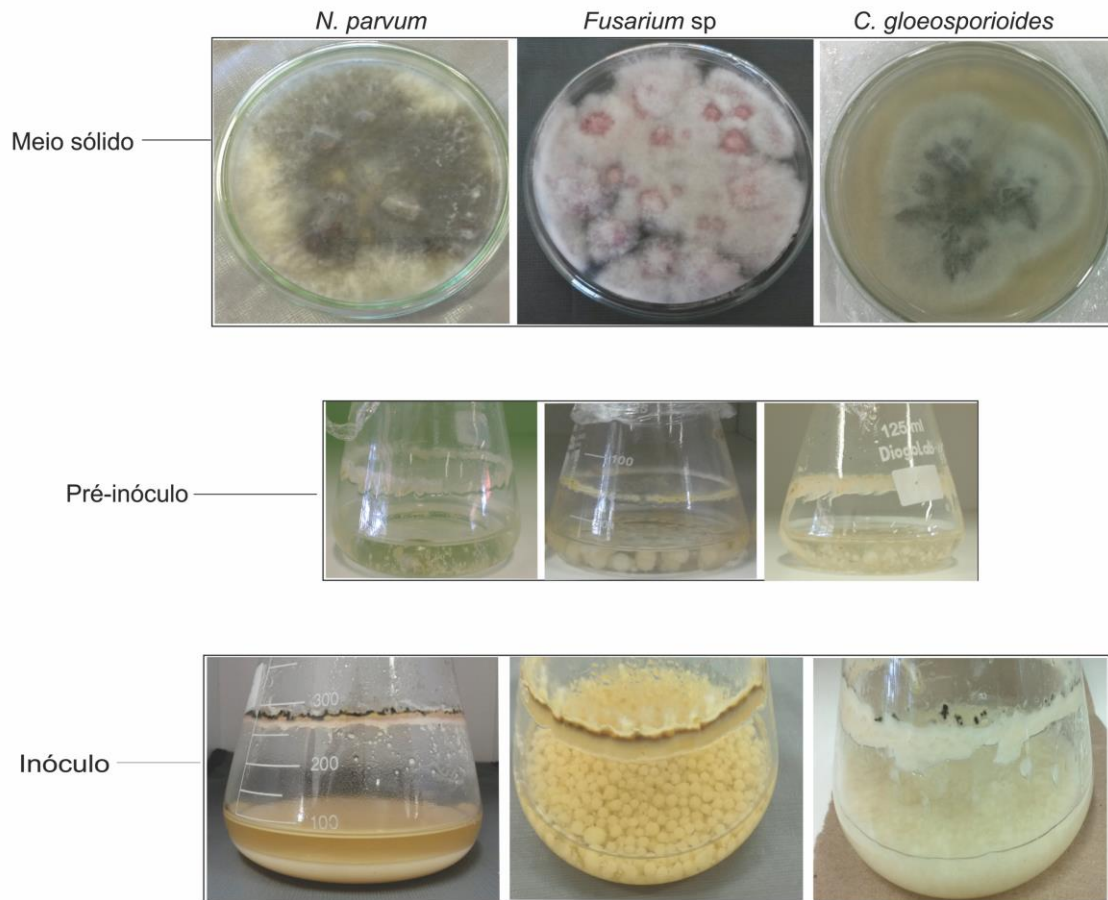
O fungo endofítico *N. parvum* (Figura 10-A), foi cultivado inicialmente em meio sólido por quatro dias, tanto para os experimentos de determinação do volume de inóculo quanto de tempo de cultivo. Observou-se que após este período os micélios eram abundantes e com coloração escura (preto). Os pré inóculos (Figura 10-D) apresentaram a biomassa na forma de filamentos. Em meio submerso (Figura 10-G), nos experimentos de volume de inóculo, o cultivo apresentou aspecto de algodão, uniformemente distribuído, sem a formação de *pellets*. O micélio submerso era de cor amarelo-clara predominante, entretanto a biomassa aderida à parede do erlenmeyer estava com tom mais escuro, semelhante ao cultivo em meio sólido. Durante a realização da curva de tempo a biomassa e o caldo fermentado iam se tornando mais escuros (preto) à medida que o tempo de cultivo aumentava. Nas primeiras 72 horas, a biomassa e o caldo fermentado apresentaram-se claros.

Phillips e colaboradores (2013) descreveram que as pigmentações, marrom escura e preta do micélio, podem surgir desde o período germinativo, particularmente nos conídios, e representam características de diferenciação do *N. parvum*. Esses pigmentos escuros são reconhecidos como melaninas, secretadas por muitos fungos, com colorações que variam desde o marrom escuro até o preto (YUA et al., 2015).

O crescimento do *Fusarium* sp em placa (Figura 10-B), após cinco dias de incubação em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentou um micélio com aspecto de algodão, abundante e de coloração rósea e branca. Os pré inóculos apresentaram biomassa como pellets (Figura 10-E). É importante ressaltar que durante os experimentos em meio submerso (Figura 10-H), tanto para a determinação do volume de inóculo como para o tempo, observou-se que, quanto mais concentrado o inóculo e maior o tempo de incubação utilizado, mais biomassa pigmentada era produzida, passando de uma coloração amarelo-clara para rosa forte, com odor intenso, muito semelhante ao da fruta goiaba. Wiemann e colaboradores (2009) relatam que algumas espécies de *Fusarium* podem produzir pigmentos coloridos como metabólitos secundários, que também serviriam para proteção contra efeitos ambientais, como ao aumento de temperatura, incidência de radiação, entre outros.

O *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 10-C) em meio sólido e após cinco dias de incubação, apresentou micélio com aspecto de flocos de algodão, pouco denso (esparso) sobre toda a placa. As hifas mais novas apresentaram coloração branca e as mais velhas cores entre castanho-claro e castanho-escuro. Os pré inóculos apresentaram biomassa na forma de *pellets* (Figura 10-F). Em meio líquido o micélio apresentou-se na forma de hifas curtas e abundantes (Figura 10-I) com coloração amarela clara, assim como o caldo fermentado, quando incubado por até 72 h e com volume de inóculo de 1,0 mL / 25 mL de meio. A medida que volume e tempo aumentavam, a biomassa e o caldo fermentado tornavam-se escuros.

Figura 10-Aspectos dos cultivos em meio sólido e líquido (pré-inóculo e inóculo) dos fungos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* e *Colletotrichum gloeosporioides*

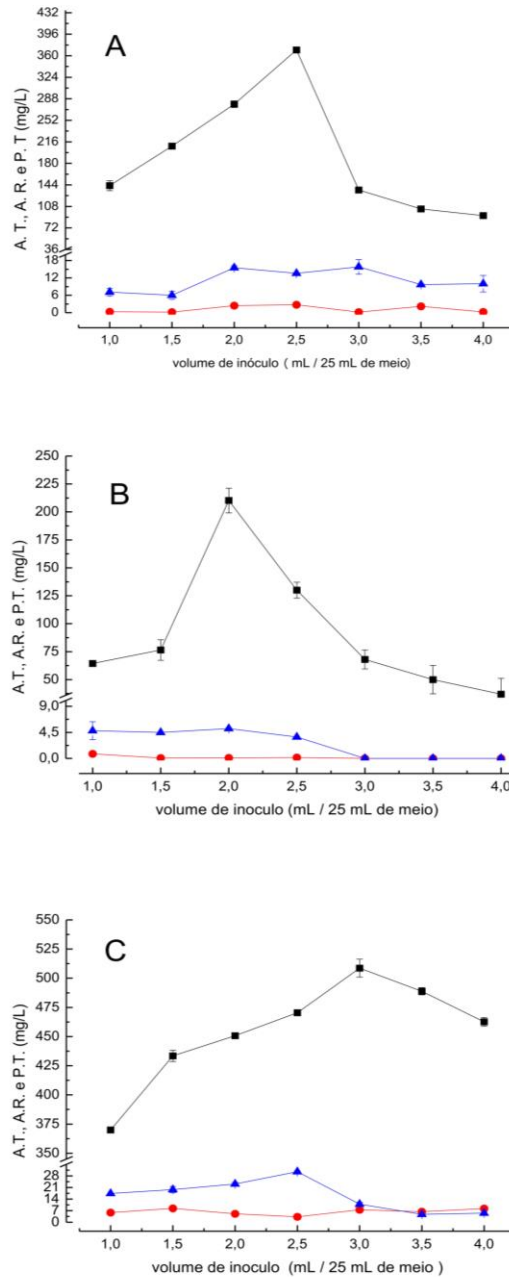


Fonte: Própria autora

5.2 Determinação do volume de inóculo para a produção de EPS por *N. parvum*, *Fusarium sp* e *C. gloeosporioides*.

Os resultados das quantificações de açúcares totais, redutores e proteínas obtidos a partir da curva de volume de inóculo, para os três fungos estudados, estão apresentados na Figura 11. As concentrações de açúcares redutores e proteínas foram pequenas em comparação à concentração de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956). Essa relação entre as concentrações de açúcares sugere que o material secretado esteja na forma de polissacarídeos, que não são açúcares redutores.

Figura 11-Quantificação de açúcares totais (A. T.) (—■—), redutores (A. R.) (—●—) e proteínas (P. T.) (—▲—) nos diferentes volumes de inóculo para os fungos. A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp e C. *C. gloeosporioides*



Os valores correspondem a média e desvio padrão das triplicatas.

De acordo com Barbosa e colaboradores (2004) a produção de EPS, durante a fermentação submersa, se deve a um conjunto de fatores químicos e físicos que favorece o crescimento do micro-organismo assim como a síntese, rendimento e composição da macromolécula. Partindo-se dessa premissa, deve-se estabelecer um protocolo de experimentos onde parâmetros de cultivo, para o processo fermentativo, devem ser definidos.

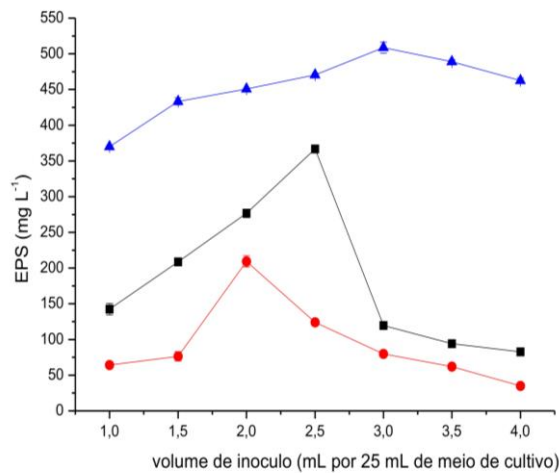
O crescimento de cada micro-organismo pode se apresentar de maneira diferente em resposta ao efeito das mudanças ambientais e à fonte de carbono utilizada, que pode ter parte convertida, pela célula microbiana, em polissacarídeos.

Razack; Velayutham; Thangavelu (2013) pontuam que apesar da análise individual de fatores fermentativos ser considerada difícil e trabalhosa, ela auxilia na seleção de parâmetros de cultivo mais significativos para estudos da produção de grandes quantidades de biopolímeros.

Um desses parâmetros é o volume de inóculo, determinante para a produção de polissacarídeos microbianos. Esses metabólitos são produzidos na fase estacionária e com excesso da fonte de carbono, no meio de cultivo. Quando o volume de inóculo é pequeno, pode comprometer o rendimento do processo fermentativo, pelas células microbianas requererem maior tempo para atingirem sua biomassa máxima (IQBAL, ZAFAR, 1993). Em volume grande de inóculo (maior concentração de células) poderia comprometer a síntese da molécula de interesse, pois o substrato seria utilizado, principalmente, para suprir as necessidades do crescimento celular como a formação das estruturas celulares, de enzimas biossintéticas, entre outras atividades celulares, desfavorecendo a produção de EPS (PAPAGIANINI, 2004).

No Anexo 1 (tabela) estão apresentados os resultados dos EPS produzidos pelos fungos durante a realização da curva de volume de inóculo após a quantificação de açúcares totais e redutores. O cálculo da secreção dos EPS foi realizado subtraindo-se a concentração de açúcares redutores da concentração de açúcares totais. Os resultados dessas análises são mostrados na Figura 11, onde se observa que, para cada fungo estudado, o volume ótimo de inóculo foi diferente: 2,5 mL de células para o *N. parvum*, 2,0 mL para o *Fusarium* sp e 3,0 mL para *C. gloeosporioides*, para cada 25 mL do meio de cultivo.

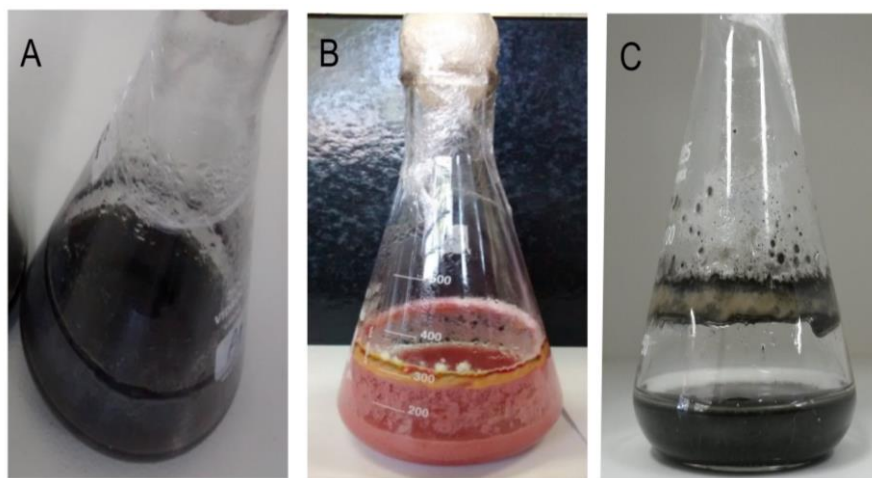
Figura 12-Curva de inóculo: comparativo da produção de EPS pelos fungos, *N. parvum* (—■—), *Fusarium* sp (—●—) e *C. gloeosporioides* (—▲—)



Os valores correspondem a média e desvio padrão das triplicatas.

Apesar de serem esses os volumes de inóculos ideais para cada micro-organismo, nas condições estudadas, o *C. gloeosporioides* (Figura 11-C) secretou pigmentos escuros a partir 1,5 mL de inóculo, dificultando a filtração do caldo fermentado por membrana de acetato de celulose de 0,45 μm . Os fungos *N. parvum* e *Fusarium* sp começaram a apresentar pigmentos a partir de 3,0 mL e 2,5 mL de células, respectivamente (Figura 11-A e B). A diálise dos caldos fermentados, não foi eficiente para a remoção dos pigmentos que permaneceram não dialisáveis. De acordo com Wiemann e colaboradores (2009), fungos fitopatogênicos podem produzir pigmentos, em vias metabólicas secundárias, que geralmente estão relacionados com mecanismos de defesa do micro-organismo contra mudanças no ambiente, por exemplo, efeitos causados por radiações UV, variações de temperatura e pH. Esses metabólitos secundários também podem prevenir, na natureza, as infecções causadas por outros fungos.

Figura 13-Aspecto da biomassa dos cultivos pigmentados, sendo A: *N. parvum*. B: *Fusarium* sp. C: *C. gloeosporioides*



Ainda, de acordo com a Figura 13, é possível observar que a partir de 2,5 mL de inóculo a produção de EPS, pelo *N. parvum*, cai sensivelmente, sugerindo que uma maior quantidade de células, presentes nos volumes maiores de inóculo, aumenta a competição pelos nutrientes do meio de cultivo, restando pouco da fonte de carbono para a síntese e secreção dos polissacarídeos. Para o *N. parvum* pode ser estabelecido que o volume de inóculo de 2,5 mL foi considerado ideal para a produção do EPS (375 mg/L). Para o *Fusarium* sp o melhor rendimento em EPS (209,4 mg/L) foi obtido no volume de inóculo de 2,0 mL, observando-se que em maiores volumes também ocorre uma queda na produção dos polissacarídeos por motivos, provavelmente, semelhantes ao anterior. Em relação ao *C. gloeosporioides* verificou-se que, apesar do inóculo de 3,0 mL ser considerado o melhor para produção de EPS (512,8 mg/mL), não houve uma variação significativa para os diferentes volumes de inóculos, estudados.

Tais resultados demonstraram que o estudo do volume de inóculo foi importante para acompanhar a produção de EPS pelos fungos *N. parvum* e *Fusarium* sp. Para o *C. gloeosporioides* a produção do pigmento impediu que a quantidade ideal de células para maior produção de EPS pudesse ser adotada, embora, felizmente, a síntese do EPS não sofreu variações significativas em diferentes volumes de inóculo e o fungo *C. gloeosporioides* foi considerado o melhor produtor de EPS.

Lee e colaboradores (2004) descreveram que, em fermentação submersa, o inóculo é fator limitante para a produção e secreção de polissacarídeo por fungos filamentosos. Em

estudo com *Grifola frondosa*, os autores determinaram que na faixa de 2 a 6% a concentração de inóculo de 3%, foi considerada ideal para obter maior concentração de exopolissacarídeos.

5.3 Determinação da influência do tempo de cultivo na produção dos exopolissacarídeos por *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.

Para determinar a influência do tempo na produção de EPS foi realizada a curva de tempo de cultivo para cada micro-organismo. Para o estudo desse parâmetro foram utilizados os volumes de inóculos estabelecidos no experimento anterior: para cada 25 mL de meio de cultivo foram utilizados 2,5 mL de inóculo para *N. parvum*, 2,0 mL para *Fusarium* sp e 1,0 mL para *C. gloeosporioides*. Para esse último micro-organismo vale lembrar que o aparecimento do pigmento foi o fator decisivo na escolha do pequeno volume.

Os resultados das quantificações de proteína, açúcares redutores e totais estão mostradas na Figura 13 e Anexo 2 (tabela). A diferença entre os açúcares redutores e totais expressa a quantidade de EPS produzida por cada micro-organismo. De acordo com esse estudo o fungo *N. parvum* (Figura 13 –A) teve o tempo de 72 horas como ideal para a maior secreção de EPS, após o qual ocorre uma queda brusca e assim se mantém até 360 horas, maior tempo estudado. Para os fungos *Fusarium* sp (Figura 13-B) e *C. gloeosporioides* (Figura 13-C) a produção de EPS é crescente, até o período de 360 horas de cultivo.

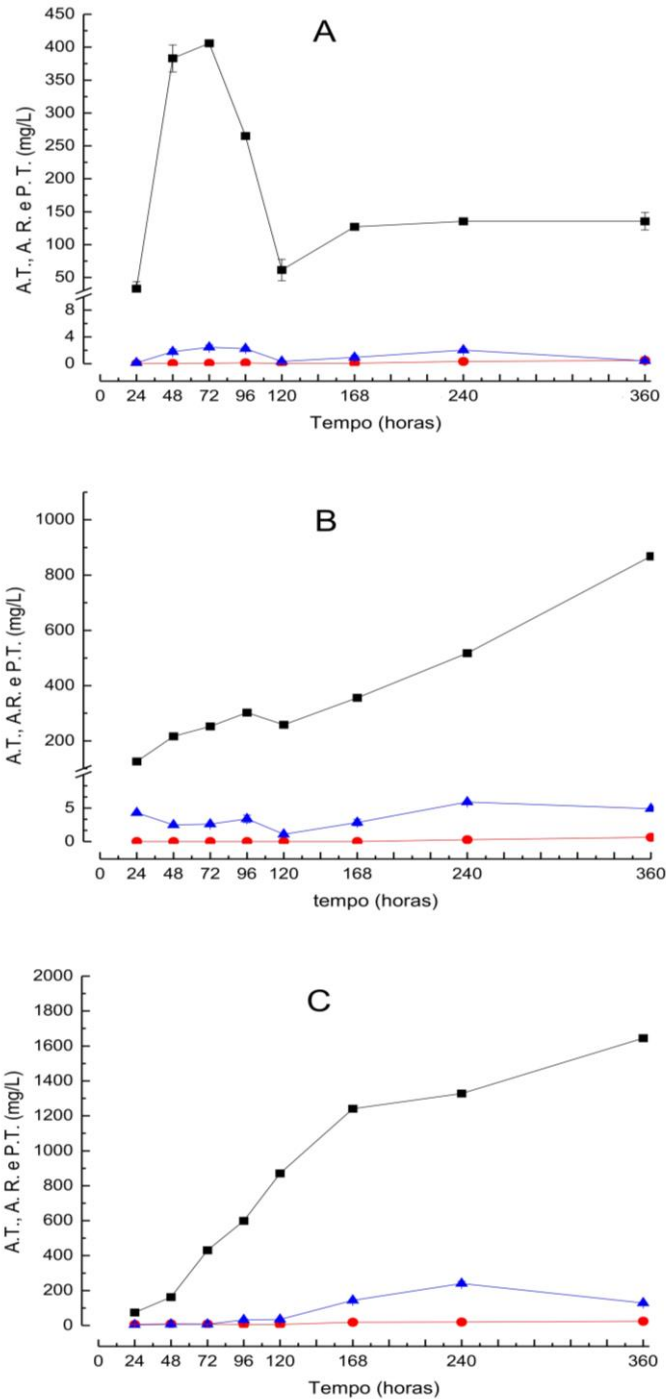
Segundo Xiao e colaboradores (2004) quanto maior for o tempo de cultivo maior será a secreção de polissacarídeo, durante o processo fermentativo e para Wu, Chen e Pan (2012) o tempo de cultivo é um dos fatores que possibilita maior produção de EPS pelos micro-organismos. Osinska-Jaroszuk e colaboradores (2015), descreveram que os fungos ascomicetos e basidiomicetos requerem um tempo variado de incubação para a síntese de polissacarídeos, que pode ser de 3 até 40 dias de cultivo, como observado para a produção de EPS para *Auricularia auricula* (7.5 g/L, 4 dias) e *Fusarium oxysporum* (0,6 g/L em 40 dias). Concordando com o exposto pelos autores acima, dois dos três fungos estudados neste trabalho aumentaram a produção e secreção de EPS proporcionalmente ao tempo, até 360 horas. A Figura 15 demonstra a produção de EPS pelos fungos estudados. O *N. parvum* teve a produção máxima de EPS ($366,5 \pm 4,0$ mg/L) em 72 horas, a partir do qual houve um decréscimo até 120 horas, se estabilizando até 360 horas. A partir de 96 horas de cultivo ocorreu a formação de um pigmento escuro com a concomitante diminuição da secreção do EPS, que poderia sinalizar um desvio da via metabólica de síntese do EPS para a síntese do pigmento.

O fungo *Fusarium* sp, apesar de uma produção crescente de EPS, proporcional ao aumento do tempo de cultivo, também apresentou um pigmento de coloração avermelhada a partir de 120 horas que se acentuava com o aumento do tempo. A separação por centrifugação do caldo de fermentação e da biomassa mostrou que ambos os componentes estavam pigmentados. A diálise exaustiva do caldo de fermentação, seguida da precipitação dos polissacarídeos pelo etanol, não foi eficiente para a regeneração dos biopolímeros límpidos. Desta forma, o tempo de 96 horas foi adotado como melhor tempo de cultivo com o caldo de fermentação límpido e produzindo 302 mg de EPS, por litro de cultivo.

O fungo *C. gloeosporioides* foi, nas condições estudadas, o melhor produtor de EPS a partir de 72 horas, alcançando um máximo de 1.640,8 mg/L no tempo de 360 horas. Entretanto, a partir de 96 horas, tanto o caldo de fermentação quanto a biomassa tomaram uma coloração acinzentada que foi se intensificando, com o tempo, até se tornarem negras (Figura 13-C). Centrifugação, filtração (muito difícil) e diálise exaustiva, não foram capazes de remover o pigmento. Para o *C. gloeosporioides* o tempo anterior (72 horas) ao aparecimento do pigmento foi considerado ideal para a produção do EPS, que foi de 421,4 mg/L.

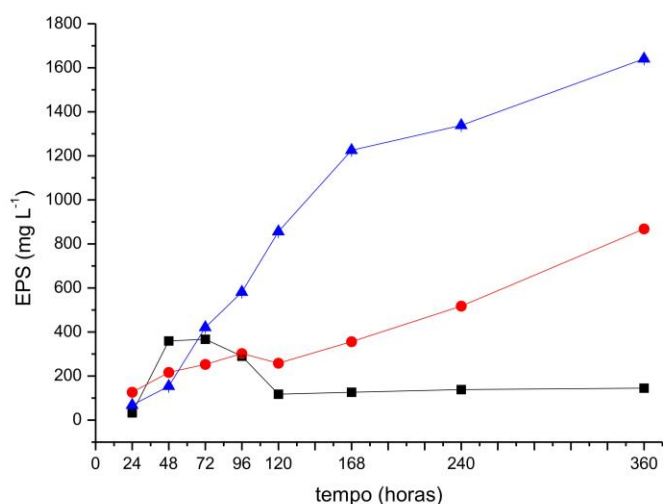
De acordo com a literatura, para a produção de EPS os tempos de cultivo utilizados são geralmente superiores a 4 dias. Li; Jiang; Guan (2010) descreveram que a secreção de EPS pelo *Hirsutella* sp foi mais eficiente em 4 dias de incubação. Lima e colaboradores (2008) relataram que o maior rendimento de EPS secretado por *Agaricus brasiliensis* foi com adição de proteína hidrolisada de soja e 9 dias de incubação (1.430,7 mg/L) e 6 dias sem adição da proteína (993,5 mg/L). Lin e Sung (2006) descreveram que foram necessários 14 dias de cultivo para a maior produção de EPS pelo *Antrodia cinnamomea*. *Pleurotus pulmonarius* apresentou a melhor produção de EPS em 10 dias de cultivo (EL-DEIN et al., 2004).

Figura 14-Quantificação de açúcares totais (A. T.) (—■—), redutores (A. R.) (—●—) e proteínas (P. T.) (—▲—) dos cultivos nos tempos realizados para os fungos. A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp e C: *C. gloeosporioides*



Os valores correspondem a média e desvio padrão das triplicatas.

Figura 15-Curva do tempo de cultivo para produção de EPS pelos fungos *N. parvum* (—■—), *Fusarium* sp (—●—) e *C. gloeosporioides* (—▲—).



Dados na literatura (WIEMANN et al., 2009), relacionados aos estudos da produção de pigmentos em cultivos submerso de fungos, mostram que a biossíntese desses metabólitos secundários começa a ocorrer no final da fase de crescimento e início da idiofase (fase estacionária) como um mecanismo de defesa do micro-organismo contra limitação das fontes de carbono e nitrogênio bem como as mudanças de pH, que podem acontecer nessa etapa do desenvolvimento celular

Os valores de pH do caldo de fermentação foram determinados ao final de cada tempo na curva do tempo de cultivo, após filtração para separação da biomassa (Tabela 1). O pH inicial do meio para os três fungos estudados foi de 5,6. A melhor produção de EPS para o *N. parvum* aconteceu em pH 6,0 e para o *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* em pH 5,0. A partir de pH 7,0, para qualquer um dos três fungos estudados, ocorreu a secreção de pigmentos que se intensificavam na cor, com o aumento do tempo de cultivo, embora em alguns casos o pH se manteve 7,0. Provavelmente, o surgimento do pigmento, bem como a intensificação de sua cor pode ter sido uma resposta fisiológica dos fungos aos processos de oxidação, por exposição às alterações de temperatura ambiente, luminosidade e pH do meio, além da oferta de fontes nutricionais de carbono e nitrogênio, como relatado por Yu e colaboradores (2015) em seu trabalho.

O fungo *Chlorociboria aeruginascens* (isolado de madeira em Haliburton Forest, ON, Canadá) exibiu mudanças na cor, em função das faixas de variações do pH do meio de cultivo. Em meio ácido ele produziu um pigmento amarelo esverdeado, em meio neutro ele se

tornou verde escuro e, novamente, se modificou para um tom verde claro acastanhado com o aumento do tempo de cultivo (TUDOR; ROBINSON; COOPER, 2013).

Tabela 1- Valores dos pH finais após os tempos de cultivos dos fungos.

Tempo (horas)	<i>N. parvum</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
24	5	5	5
48	6	5	5
72	6	5	5
96	7	5	7
120	7	7	7
168	7	7	7
240	7	7	8
360	7	7	8

De acordo com Kim; Park; Yun (2006), o pH é um parâmetro que influencia o crescimento micelial, a produção de metabólitos, a morfologia celular e a reologia do caldo fermentativo. Em geral o crescimento celular ocorre em pH menor do que é necessário para a produção de EPS. Para a produção de EPS por ascomicetos e basidiomicetos os valores de pH dos meios de cultivo oscilam entre 4 a 7 (OSINSKA-JAROSZUK et al., 2015). Em estudos realizados com *G. lucidium*, os pesquisadores observaram que na faixa de pH inicial entre 3 a 7, a maior produção de EPS ocorreu em pH 5 (KIM; PARK; YUN, 2006).

A produção de pigmentos pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium sp* e *C. gloeosporioides*, aparentemente em maior concentração nos cultivos de tempo, pode estar relacionada com estratégias metabólicas do fungos para se manterem ativos mesmo com as variações de pH observadas, favorecendo seus crescimentos assim como a síntese de EPS, ou seja, permitindo suas sobrevivências e consequente produção de metabólitos de interesse.

5.4 Composição monossacarídica e análise de homogeneidade dos exopolissacarídeos produzidos por *N. parvum*, *Fusarium sp* e *C. gloeosporioides*

Para a caracterização química dos EPS a primeira reação é a hidrólise ácida, que promove a quebra das ligações glicosídicas liberando os monossacarídeos constituintes da macromolécula. Geralmente condições mais gerais encontradas na literatura científica podem ser utilizadas, mas, uma vez conhecido os constituintes, condições específicas de hidrólise podem ser necessárias uma vez que a labilidade da configuração (α e β) e da posição da

ligação glicosídica (1→2, 1→3, 1→4, 1→6) são diferentes. Portanto, quando uma condição mais geral de hidrólise é utilizada se obtém valores de quantificação dos monossacarídeos próximos dos reais, mas não exatos. Para se obter esses últimos são realizadas curvas de hidrólise onde tempo, tipo e concentração de ácido devem ser cuidadosamente selecionados.

Com a disponibilização dos métodos cromatográficos, a quantificação dos monossacarídeos provenientes da hidrólise tem sido relativamente simples. A seleção do método cromatográfico, a ser usado, depende da disponibilidade do equipamento, dos padrões e da quantidade de EPS hidrolisada. Os procedimentos mais comuns são cromatografia líquido-gasosa e mais recentemente, o uso da cromatografia líquida a alta pressão. No primeiro caso os monossacarídeos devem ser derivatizados para tornarem-se voláteis antes da análise; a cromatografia líquida dispensa a derivatização quando um detector eletroquímico é utilizado.

A identificação bem como a quantificação dos monossacarídeos presentes no hidrolisado, proveniente do tratamento ácido dos EPS secretados pelos três micro-organismos (Tabela 2) foi efetuada por cromatografia líquida de íons em alta pressão (HPAEC – *high performance anionic exchange chromatography*) acoplada a um detector de óxido-redução (amperometria integrada ou pulsada – PAD) (ORLANDELLI et al., 2016; PAZUR, 1994).

Tabela 2- Composição monossacarídica do hidrolisado ácido dos EPS secretados pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.

Fungo/ Monossacarídeo (%)	Gal	Glc	Man
<i>N. parvum</i>	14	78	08
<i>Fusarium</i> sp	19	13	68
<i>C. gloeosporioides</i>	18	81	01

Os resultados dessa análise (Tabela 2) foram obtidos a partir dos EPS separados considerando a melhor concentração de inóculo e do tempo de cultivo considerado ideal, sem a presença de pigmento. *N. parvum* (78%) e *C. gloeosporioides* (81%) tiveram como componente majoritário o monossacarídeo glucose, sugerindo a presença de uma glucana. No EPS produzido pelo *Fusarium* sp a manose se mostrou como principal monômero, sugerindo a presença de uma manana. Pela diversidade na composição monossacarídica, é importante observar que, para qualquer um dos três fungos, há um forte indício da presença de mais de um tipo de polímero constituindo o material secretado, sugerindo a necessidade de procedimentos de purificação.

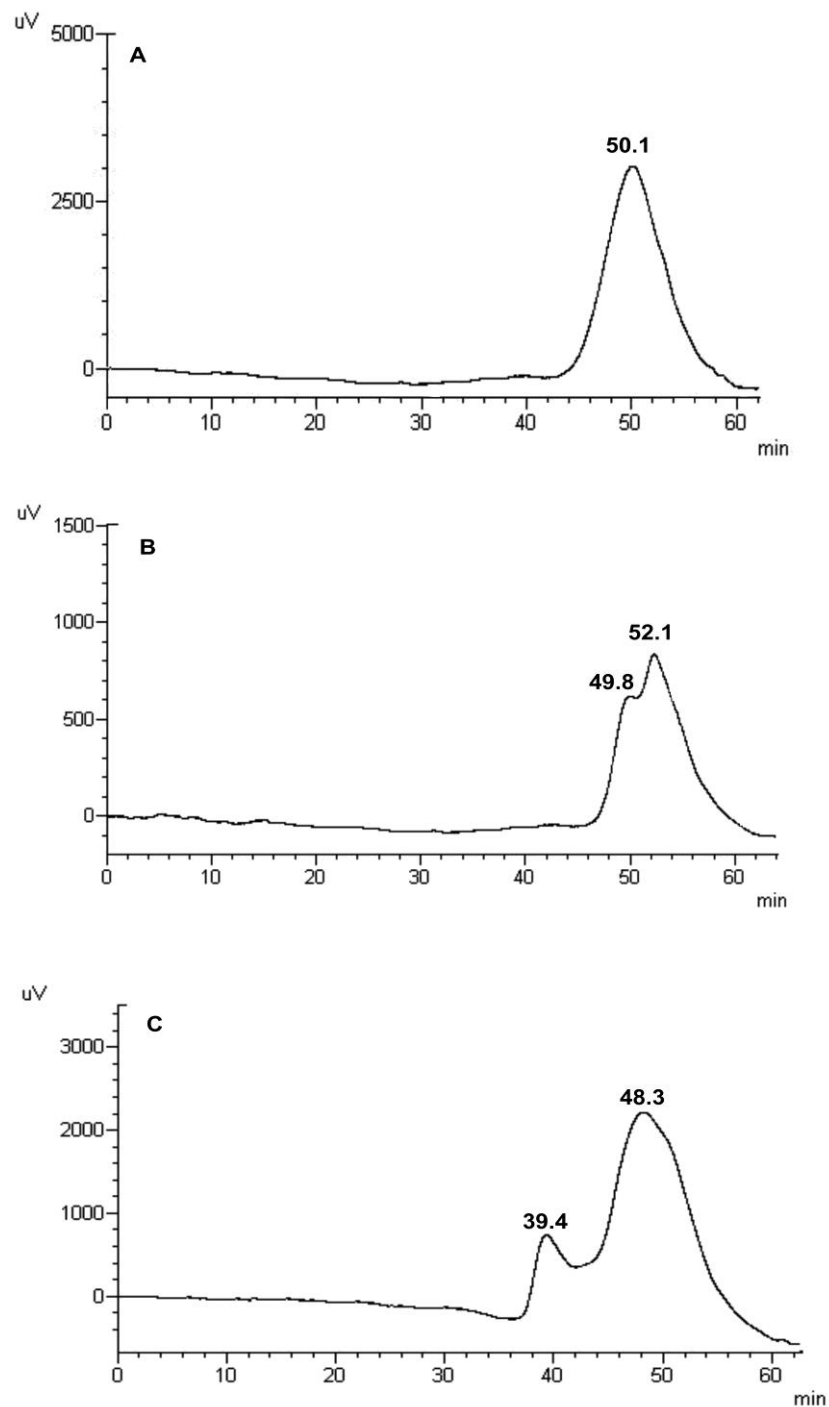
Mahapatra; Banerjee (2013) relataram a diversidade na composição dos EPS fúngicos. Esses biopolímeros apresentam monossacarídeos combinados com compostos de diferentes naturezas ou estruturas químicas como proteínas, fosfatos, sulfatos ou aminas. Os monossacarídeos mais encontrados em polissacarídeos secretados são glucose, manose, galactose, xilose, fucose e ramnose. A glucose é o principal monômero dos EPS produzidos pelos fungos *Acremonium diospyri* Crandall; *Aspergillus niger*; *Botryosphaeria rhodina* RCYU30101; *Cyttaria harioti*; *Drechsleras picifera*; *Elsino eleucospila*; *Epicoccumnigrum* Ehrenb. ex Schlecht; *Lachnum* sp. YM261; *Nigrospora oryzae* var. *glucanicum*; *Pestaloti* asp. 815; *Phanerochaete chrysosporium*. Mahapatra; Banerjee (2012) encontraram galactose e ramnose na proporção de 2:1 no EPS secretado pelo *Fusarium solani*.

Steluti et al. (2004) descreveram que variações na composição e no percentual dos monossacarídeos formadores dos EPS estão relacionadas com diferentes fontes de carbono (por exemplo: glucose, frutose, sacarose, manose, entre outros), de nitrogênio (orgânicas como o extrato de levedura e peptona e inorgânicas como nitrato de amônia), pH, aeração, velocidade de agitação, concentração de inóculo e tempo de cultivo. Peng e colaboradores (2015) relataram que o *Ganoderma lucidum* produziu exopolissacarídeos compostos por 7 monossacarídeos diferentes, predominando glucose, manose e galactose. As concentrações dos monossacarídeos nos EPS variaram conforme alterou a temperatura de cultivo e pH do meio. O aumento da temperatura de incubação ou a diminuição do pH inicial do meio diminuiu a quantidade de glucose em porcentagem molar no EPS produzido pelo fungo.

Levando-se em conta que qualquer alteração das condições do meio de cultivo, até mesmo aquelas não comandadas pelo experimentador, pode levar a algumas variações da composição molecular, torna-se necessário que um procedimento experimental seja adotado para acompanhar a pureza e o grau de homogeneidade do material secretado pelo micro-organismo. A cromatografia de exclusão estérica a alta pressão, acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID) é o procedimento adotado, para este fim, no estudo dos polissacarídeos.

A Figura 16 mostra os cromatogramas dos EPS secretados pelos três fungos, na melhor condição de cultivo, a mesma que foi adotada para os experimentos de hidrólise.

Figura 16-Cromatograma dos EPS secretados pelos fungos A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp, C: *C. gloeosporioides* por HPSEC/RID.



O cromatograma das soluções dos EPS dos fungos *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* mostrou dois picos que eluíram em tempos distintos, porém próximos para o *Fusarium* sp (Figura 16-B) indicando massas moleculares não muito diferentes para os componentes, e mais afastados no caso do *C. gloeosporioides* (Figura 16-C), sugerindo maior diferença entre

os tamanhos das moléculas. A presença dos dois picos indica que pelo menos duas moléculas distintas foram secretadas por cada um dos dois micro-organismos. O *N. parvum* (Figura 16-A) apresentou um único pico na cromatografia, entretanto a sua base alargada sinaliza um elevado grau de polidispersividade, sugerindo uma população de moléculas pouco homogênea. A polidispersividade é uma característica físico-química dos polissacarídeos, diferentemente das proteínas, cujo comando de síntese é DNA dirigido, gerando moléculas de mesmo tamanho, ou seja, monodispersas. Os polissacarídeos, principalmente aqueles que são secretados, por não fazerem parte da estrutura física das células tornam-se muito grandes e formam grandes complexos moleculares gerando soluções muito viscosas e, portanto, de difícil caracterização química.

Considerando que a identificação química da molécula, ainda que polidispersa, só tem significado verdadeiro se estiver pura, (sem contaminantes de mesma espécie química ou de espécie química diferente) o próximo passo foi encontrar um método simples e eficiente para a separação dos prováveis diferentes componentes presentes no EPS.

5.5 Purificação dos exopolissacarídeos produzidos pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*

Os EPS (150 mg para *N. parvum*, 140 mg para *Fusarium* sp e 300 mg para *C. gloeosporioides*) quando solubilizados em água, formavam uma solução viscosa que, centrifugada, gerava uma fração solúvel, denominada sobrenadante, e um material sedimentado que passamos a denominar de precipitado. Os precipitados liofilizados pesaram 11,0 mg, 20,8 mg e 114,5 mg para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Alíquotas dessas frações, solubilizadas em água, com aquecimento controlado (45 °C) foram utilizadas para a determinação do conteúdo de proteínas totais, cujos resultados indicaram os percentuais de 56%, 88% e 1% para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Só foi possível efetuar a hidrólise ácida no sedimento proveniente do *C. gloeosporioides*, cujo resultado foi 100% glucose. Para as frações solúveis, os resultados são mostrados abaixo, na Tabela 3.

Tabela 3- Peso, porcentagem de açúcar total (AT) e proteínas totais (PT), massa molecular (MW) e composição monossacarídica dos polissacarídeos secretados pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.

Micro-organismo	EPS (mg)	AT (%)	PT (%)	MW (kDa)	Composição monossacarídica (%)		
					Gal	Glc	Man
<i>N. parvum</i> _{sobr}	140,0	98,0	2,0	86,8	23	64	13
<i>Fusarium</i> sp _{sobr}	116,0	98,0	2,0	42,9	03	02	95
<i>C. gloeosporioides</i> _{sobr}	178,0	99,0	1,0	---	14	78	08
<i>C. gloeosporioides</i> _{prec}	114,5	99,0	1,0	71,2	---	100	---

EPS (mg): exopolissacarídeo liofilizado

As frações solúveis, separadas pela centrifugação dos EPS secretado pelos *N. parvum* e *C. gloeosporioides*, são formadas principalmente de glucose, enquanto o *Fusarium* sp, cujo percentual de manose aumentou na fração solúvel (sobrenadante), secreta principalmente uma manana. É sabido que os polissacarídeos secretados podem ser quimicamente semelhantes àqueles da parede celular, os quais, neste caso, estão geralmente ligados a proteínas e lipídeos e cuja composição e estrutura química variam entre as diferentes espécies de fungos (KLIS, BOORSMA, DE GROOT, 2006). As β -glucanas do tipo (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 6) compreendem os principais constituintes da parede celular de fungos e leveduras e são os polímeros mais frequentes no material secretado (WILLIAMS, 1997). Estudos recentes (SHEPPARD, HOWELL, 2016), mostram que alguns fungos patogênicos secretam um biofilme, composto por glucanas β (1 \rightarrow 3) e um complexo manana-glucana, fundamental para o desenvolvimento e manutenção da estrutura de proteção. Há registros na literatura mostrando que α -(1 \rightarrow 3)-glucanas também estão presentes na parede celular de muitos fungos, principalmente aqueles que provocam doenças em plantas ou seja, fitopatogênicos. Entretanto não há nenhuma informação, até o momento, desse tipo de molécula secretada por fungos. Embora os polissacarídeos secretados sejam semelhantes àqueles da parede celular, as sínteses são governadas por caminhos independentes, segundo os autores acima.

Os resultados encontrados mostram que o material secretado pelos três fungos e denominado de EPS, embora majoritariamente formado por carboidrato, não é constituído por um único tipo de polissacarídeo, indicando com isso a necessidade de purificação. É possível que o material secretado seja uma mistura de polissacarídeos que formam complexos supramoleculares, cuja solubilidade em água é muito pequena. Ligações de hidrogênio devem ser as principais interações químicas responsáveis pela formação dessas estruturas,

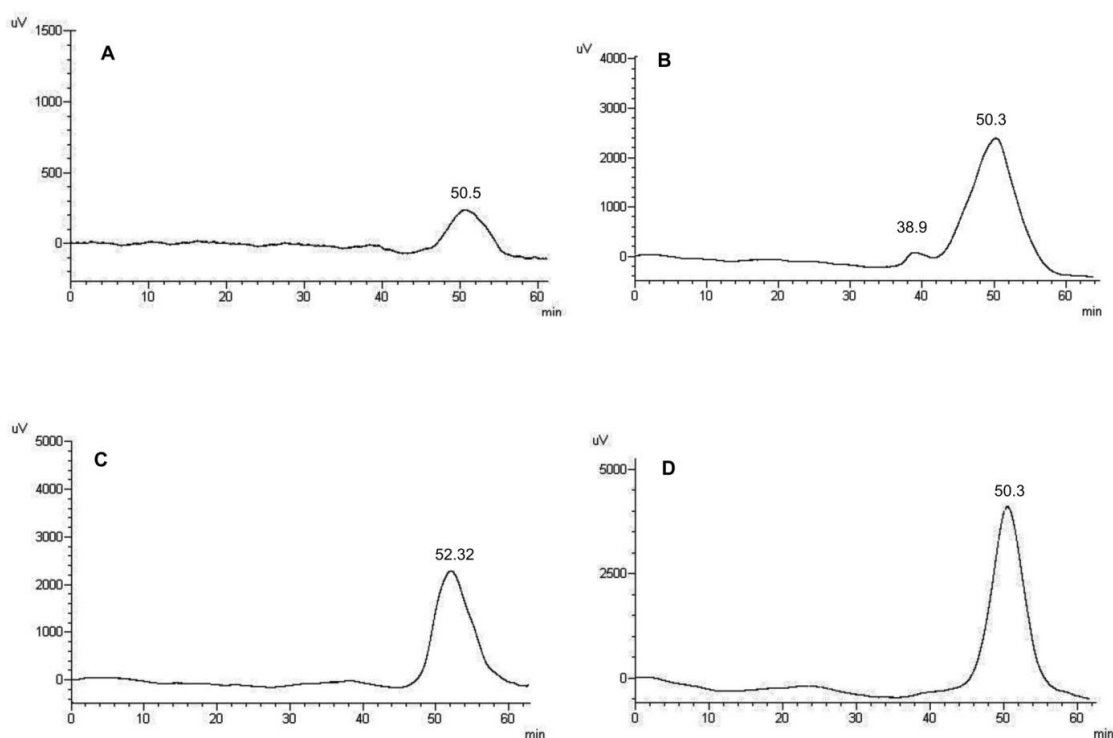
considerando o elevado grau de hidroxilas presentes nos carboidratos. Essas ligações, embora individualmente fracas, quando em conjunto geram esses grandes complexos que dificilmente são separados por procedimentos químicos brandos, como cromatografia de filtração em gel. Assim sendo, a presença de um único pico no HPSEC/RID, nem sempre é um indicativo de material homogêneo.

Guo e colaboradores (2013) relataram que o EPS produzido por *Fusarium oxysporum* Y24-2, em meio submerso, composto por galactose e glucose na proporção molar de 1:1, apresentou um único pico na cromatografia de filtração em gel, com massa molecular de 36 kDa. Mahapatra e Banerjee (2012) isolaram um EPS de *Fusarium solani* SD5, composto por galactose e ramnose na proporção de 2:1, purificado por filtração em gel e com massa molecular de $1,87 \times 10^5$ Da.

O *Fusarium* sp estudado nesse trabalho tem a manose como principal componente da fração solúvel e massa molecular de 43 kDa, aproximadamente (Figura 17-C).

As quatro frações polissacarídicas separadas por centrifugação, denominadas *C. gloeosporioides*_{prec}, *C. gloeosporioides*_{sobr}, *Fusarium* sp_{sobr} e *N. parvum*_{sobr} foram analisadas por HPSEC/RID (Figura 17).

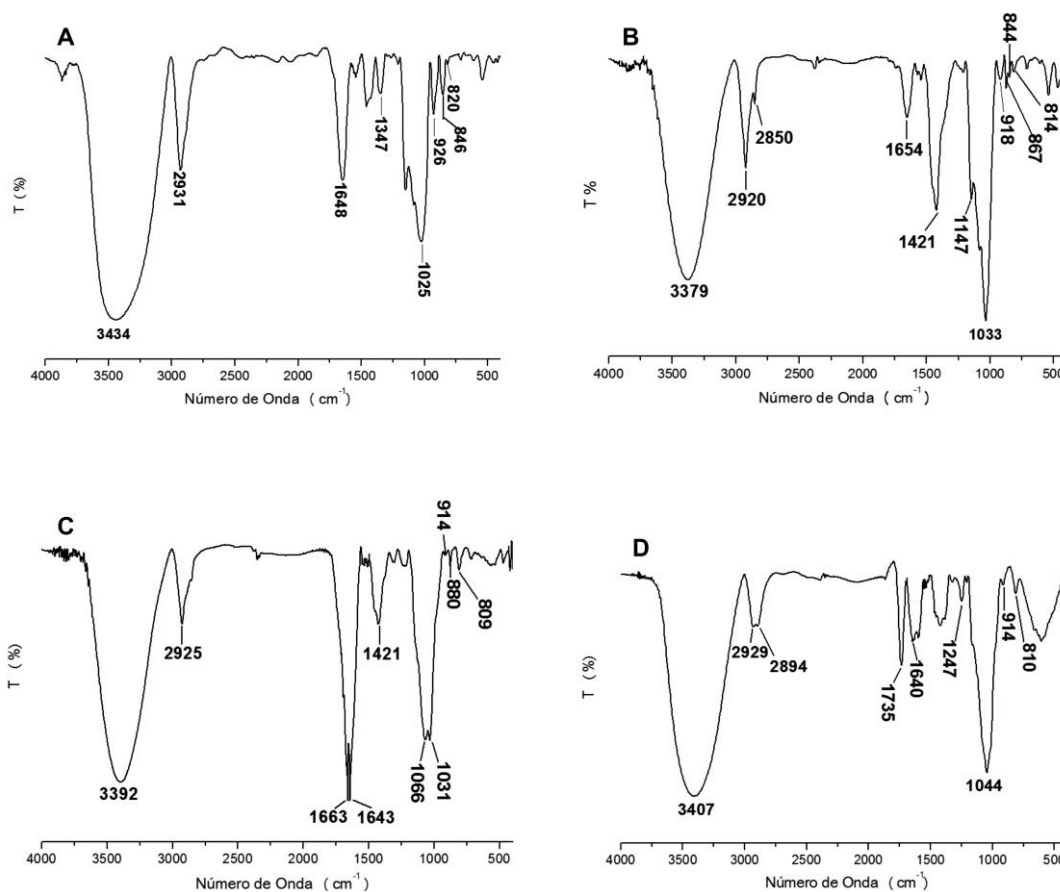
Figura 17- Cromatogramas dos EPS secretados por *C. gloeosporioides*_{prec} (A), *C. gloeosporioides*_{sobr} (B), *Fusarium* sp_{sobr} (C) e *N. parvum*_{sobr} (D), por HPSEC/RID.



Das quatro frações acima analisadas apenas o sobrenadante do *C. gloeosporioides* mostrou 2 picos (Figura 17-B), indicando ainda a presença de pelo menos dois polissacarídeos distintos. As demais frações apresentaram um único pico com base alargada que pode estar relacionada com a polidispersividade dos polissacarídeos. Essa hipótese foi confirmada pelos valores do Mw/Mn (grau de polidispersividade), que foram superiores a 1,5.

Para determinar a configuração das ligações glicosídicas, α e/ou β , presentes nos polissacarídeos em estudo, análises de espectroscopia de FT-IR foram efetuadas e os resultados, dispostos na Figura 18, são compatíveis com espectros de glicanas, encontrados na literatura (BARBOSA et al., 2003; STELUTI et al., 2004; ZHANG; ZHANG; CHENG, 1999).

Figura 18-Espectros no infravermelho dos *C. gloeosporioides*_{prec} (A), *C. gloeosporioides*_{sobr} (B), *Fusarium* sp_{sobr} (C) e *N. parvum*_{sobr} (D), na região de 4000 a 500 cm^{-1}



Fonte: Própria autora

A espectroscopia de FT-IR é utilizada para detectar variações nos estados de energia vibracional das moléculas (KACURÁCOVÁ et al., 2002; WOLKERS et al., 2004). As frequências vibracionais são específicas para cada grupo funcional e são sensíveis ao

ambiente molecular, conformação e características das cadeias (CAMPBELL; WHITE, 1989). Embora o espectro no infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura molecular.

Nos carboidratos neutros existem basicamente quatro tipos de ligações, C-C, C-O, C-H e O-H, que apresentam as frequências teóricas, aproximadas, calculadas a partir do modelo de um oscilador harmônico como 1187, 1327, 2965 e 3084 cm^{-1} , respectivamente. Outros tipos de ligações, como C-N (1144 cm^{-1}) e N-H (3010 cm^{-1}), aparecem em carboidratos aminados, enquanto C=O (2299 cm^{-1}) aparece em carboidratos ácidos. Esses valores são verificados para moléculas simples e sem interação com o ambiente; em sistemas mais complexos como polissacarídeos e outras macromoléculas, a complexidade das interações inter e intramoleculares é maior, podendo haver um deslocamento destas frequências.

A determinação da estrutura de uma molécula orgânica a partir de um espectro de FT-IR baseia-se na observação de sinais presentes na região de frequências de grupos, que está compreendida entre 3600 a 1200 cm^{-1} (Tabela 4).

Tabela 4- Regiões de frequências normalmente atribuídas para carboidratos.

Grupo	Tipo de vibração	Região de Frequência (cm^{-1})
OH em álcool	Estiramento	3600 - 3100
	Deformação	1660 - 1600
C-O-C em éter alifático	Deformação	1240 - 1200
C-C alifático	Estiramento	1200 - 1000
-CH ₂ - e -CH ₃ alifático	Estiramento	2930 - 2880
C-N Amina e amidas	Deformação	1360 - 1180
N-H amina e amidas	Deformação	3500 - 3300

Uma segunda etapa nas análises de FT-IR consiste na comparação da região compreendida entre 1200 e 600 cm^{-1} conhecida como região de impressão digital, valiosa para a atribuição das diferentes vibrações provocadas pelos anômeros α e β e estendidas para a configuração das ligações glicosídicas no caso de oligo- e polissacarídeos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Para as hexoses o sinal ao redor de 880 cm^{-1} geralmente é atribuído à configuração β e em 810 cm^{-1} , à configuração α . Como dito anteriormente, a

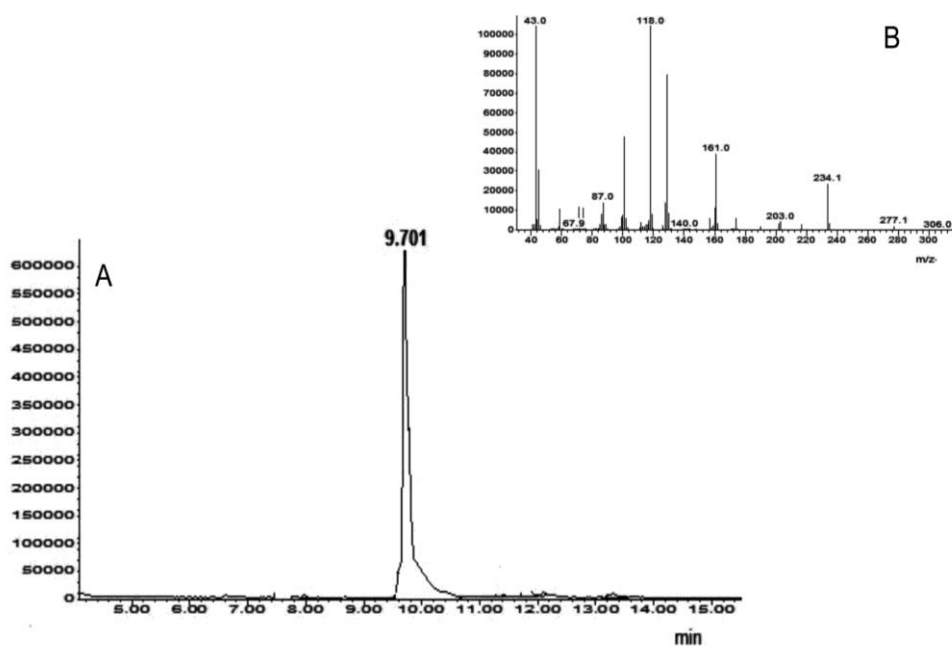
complexidade das interações inter e intramoleculares promove pequenos deslocamentos nessas frequências.

Observando a região de impressão digital para as quatro frações analisadas, podemos verificar que tanto *Fusarium* sp_{sobr} quanto *C. gloeosporioides*_{sobr} apresentam sinais de ligações α ($\sim 810\text{ cm}^{-1}$) e β ($\sim 880\text{ cm}^{-1}$) (Figura 18-B e C), que pode sugerir a presença de mais de um polímero, comprovado, no caso do *C. gloeosporioides*, pelo perfil do HPSEC/RID (Figura 17-B). O *N. parvum*_{sobr} apesar de indicar apenas ligação α , apresenta uma composição em monossacarídeos bastante complexa, o que não significa tratar-se de uma mistura, mas que novas tentativas de purificação devem ser efetuadas para eliminar essa possibilidade.

O precipitado do *C. gloeosporioides*, constituído de 100% de glucose e com dois sinais característicos de um polissacarídeo em configuração α (926 cm^{-1} e 820 cm^{-1}), foi selecionado para dar continuidade aos estudos de caracterização e atividade biológica. Segundo Zhang; Zhang; Cheng (1999) uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana, isolada do corpo de frutificação do *Lentinus edodes*, apresentou bandas de absorção em 926 , 844 e 822 cm^{-1} , indicando que pela semelhança dos sinais, o polissacarídeo isolado do *C. gloeosporioides* possa ser uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana.

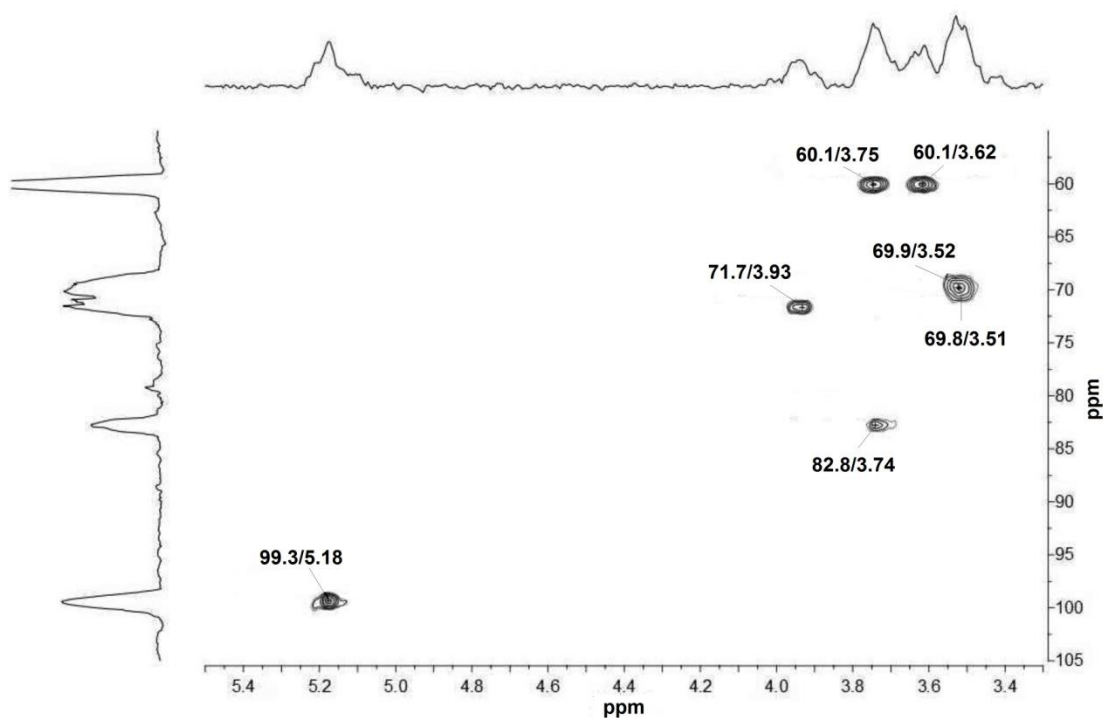
Para investigar a posição das ligações glicosídicas o *C. gloeosporioides*_{prec} foi metilado e os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC/MS, cujo cromatograma mostrou uma única banda, com tempo de retenção ($9,701\text{ min}$) e com fragmentos de massa (m/z 87, 101, 118, 129, 161, 234), correspondente ao derivado 3-*O*-substituído (2,4,6 tri-*O*-metil-glucitol), sinalizando a presença de um polímero constituído por unidades de glucose 3-*O* ligadas (Figura 19)

Figura 19-Cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (A) da glucana obtida no precipitado do *C. gloeosporioides* e espectro de massa (B) do derivado 1,3,5-tri-O-acetil, 2,4,6-tri-O-metil glucitol



Finalmente, para confirmar a estrutura do polímero a partir das análises acima, foi realizado um experimento de ressonância magnética nuclear bidimensional heteronuclear (hidrogênio-carbono) (HSQC) a fim de determinar quais prótons (^1H) estão ligados aos respectivos núcleos de carbono (^{13}C) a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de prótons já determinados pelo COSY ou pela literatura.

Figura 20- Espectro HSQC da glucana obtida no precipitado do *C. gloeosporioides* em DMSO a 70°C



O espectro de HSQC (Figura 20) apresentou um único sinal na região anomérica confirmando que a molécula tem apenas uma unidade monomérica repetitiva, com um único tipo de ligação glicosídica. O sinal de C1 em campo alto (99,3 ppm) e de H¹ superior a 4,99 (5,18 ppm) é característico de polissacarídeos com ligações glicosídicas em configuração α . O deslocamento do carbono envolvido na ligação para campo baixo, na região de δ 82,8/3,74 corresponde às unidades de C-3 substituídas. Os demais acoplamentos δ 71,7/3,93, 69,9/3,52 e 69,8/3,51 correspondem ao C-5/H-5, C-2/H-2 e C-4/H-4, respectivamente. O sinal em campo alto 60,1/3,75/3,62 corresponde ao C-6/H-6 a,b livre. Esses valores foram atribuídos de acordo com dados da literatura (ZHANG, ZHANG, CHENG, 1999).

Dos experimentos efetuados pode-se concluir que um dos polissacarídeos secretados pelo *C. gloeosporioides* é uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana (Figura 21) com massa molecular de 71,2 kDa, cuja estrutura química proposta está apresentada abaixo:

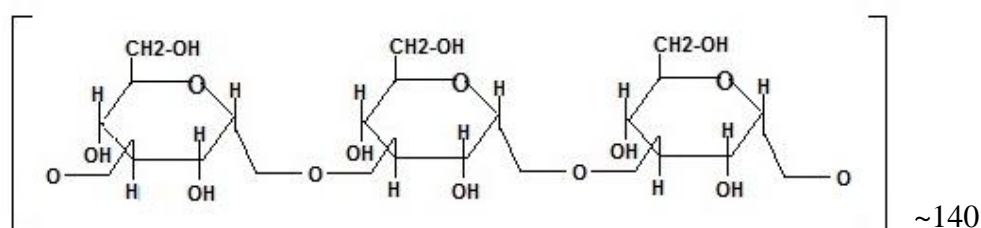


Embora esse tipo de polissacarídeo já tenha sido isolado da parede celular de fungos entre eles, *Aspergillus niger* (SYNYTSYA, NOVAK, 2014) e *Lentinus edodes* (ZHANG, ZHANG, CHENG, 1999), trata-se do primeiro registro dessa molécula como um metabólito secretado, indicando mais uma vez que os polissacarídeos, constituintes da parede celular,

podem ser liberados ao meio como um mecanismo para auxiliar na infecção do fungo ao hospedeiro, criando um ambiente favorável para o processo de sobrevivência.

Considerando a baixa solubilidade desse polissacarídeo em água, experimentos de modificação química por sulfatação foram efetuados a fim de que o polímero resultante pudesse ser aplicado nos testes de atividade biológica.

Figura 21-Estrutura química da α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana



5.6 Sulfatação da α -(1 \rightarrow 3)-glucana produzida pelo *C. gloeosporioides*

Modificações químicas de polissacarídeos oferecem a oportunidade de obtenção de novos agentes farmacológicos para aplicação terapêutica (OSINSKA-JAROSZUK et al, 2015). Processos de modificação de glucanas, principalmente pelo método de sulfatação, têm recebido muita atenção, pois os grupamentos sulfato inseridos no polímero, geram um derivado mais solúvel e bioativo (MANTOVANI et al., 2008). Entre as atividades farmacológicas apresentadas pelos polissacarídeos sulfatados estão anticoagulante, antitrombótica, antiviral, antiinflamatória, antiangiogênica e antiproliferativa (YANG et al., 2003). Acredita-se que o sucesso dessas ações depende da estrutura do polímero, do grau de sulfatação (DS), da massa molecular (MW) e das ramificações. Portanto, é importante estabelecer um método apropriado de sulfatação, para cada grupo de macromoléculas.

A α -(1 \rightarrow 3)-glucana produzida pelo *C. gloeosporioides* foi solubilizada em formamida que, por ser um solvente aprótico, permanece inerte no meio reacional. Após a solubilização do polímero a piridina, que tem como função agir como catalisador da reação de sulfatação foi adicionada. O fato de a piridina possuir um par de elétrons disponível para formar pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos polissacarídeos faz com que a nucleofilia desses grupamentos (OH) aumente, tornando-os mais reativos (HAINES, 1976).

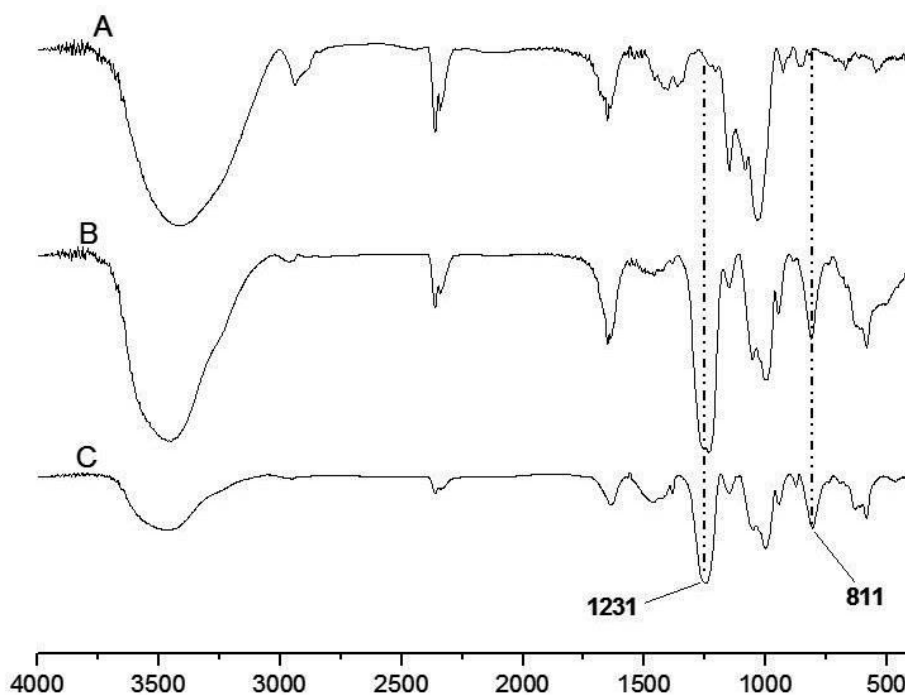
O conteúdo de enxofre (S %) nas amostras sulfatadas foi determinado pelo cálculo do grau de substituição (DS) do polissacarídeo sulfatado. Os valores obtidos neste tipo de análise

indicam o número médio de resíduos de sulfato presentes nos monossacarídeos componentes da cadeia polissacarídica (YANG et al., 2003) e esta informação é importante uma vez que a atividade biológica aumenta com o grau de sulfatação ou seja, a bioatividade é dependente do grau de sulfatação (HUANG et al., 2008).

O polissacarídeo do *C. gloeosporioides* foi submetido a três processos de sulfatação. No segundo ciclo de sulfatação o valor encontrado para o DS, de acordo com o método turbidimétrico, foi de 0,38 e, no terceiro processo de sulfatação o DS foi de 0,75. O primeiro ciclo de sulfatação não foi analisado para poupar o gasto de material e geralmente, uma única reação de derivatização mostra-se ineficiente para o DS desejado ($\geq 0,6$). Análises turbidimétricas e de espectroscopia de infravermelho acoplado ao transformador Fourier (FT-IR) foram utilizadas para acompanhar o processo de sulfatação.

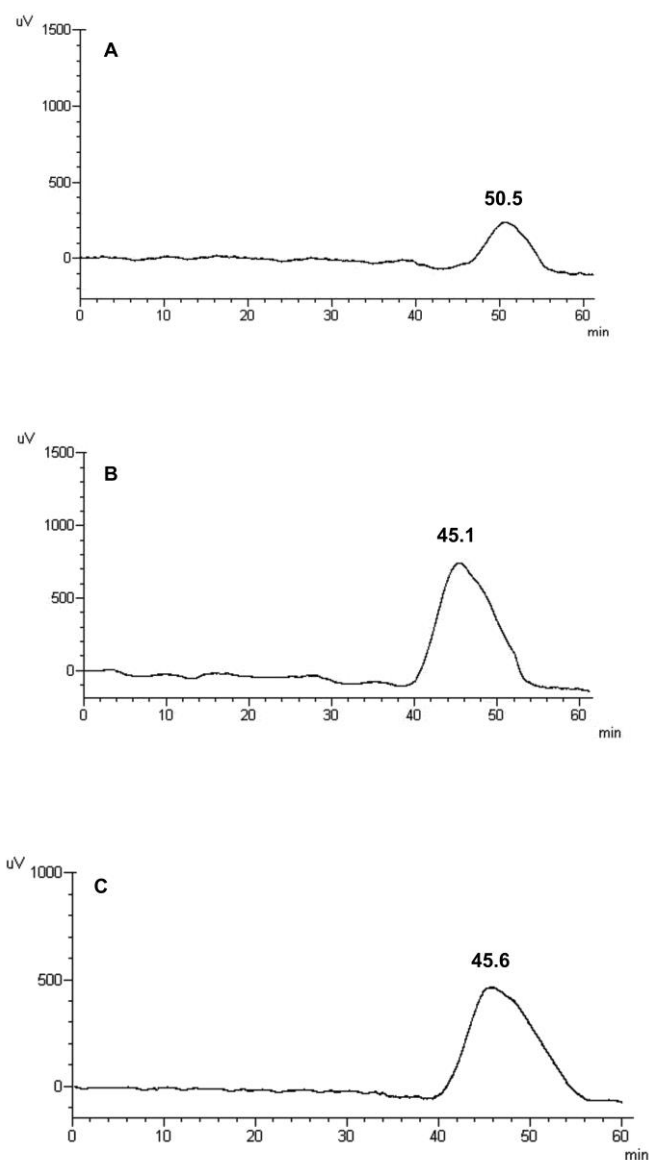
A efetividade da reação de sulfatação foi acompanhada através da comparação dos espectros de absorção de FT-IR (MENDES et al., 2009; YANG et al., 2003) do polissacarídeo não sulfatado, sulfatado 2 vezes e sulfatado 3 vezes. Os grupamentos sulfato inseridos no polissacarídeo induziram o aparecimento de novas bandas no espectro de FT-IR (Figura 22). Bandas de absorção na região de 1231 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações S=O assimétricas associadas à distribuição dos grupamentos sulfato na molécula (YANG et al., 2003; GERESH, MAMONTOV, WEINSTEIN, 2002). A banda encontrada na região de 811 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração simétrica da ligação C-O-S do grupo COSO_3 , o que indica efetivamente a reação de sulfatação (NIE et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2013; YANG et al., 2003). Apesar dos resultados das análises turbidimétricas indicarem o aumento do DS na terceira reação de sulfatação, não foi possível observar diferenças significativas entre os espectros obtidos na segunda e terceira sulfatações. Isso se deve provavelmente a menor quantidade de material utilizada na confecção da pastilha após a terceira sulfatação.

Figura 22-Espectros de infravermelho do polissacarídeo secretado pelo *C. gloeoporiodes*_{Sprec} sem sulfatação, com dois e três ciclos de sulfatação na região de 4000 a 500 cm⁻¹.



A cromatografia de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC/RID) foi efetuada para verificar, através do volume de eluição das amostras sulfatadas, a alteração da massa molecular e possível ocorrência de degradação, devido às condições da reação. O cromatograma do polissacarídeo sulfatado (Figura 23) foi semelhante ao polímero original. A reação de sulfatação por inserir vários grupos sulfato aumenta a massa molecular e, portanto a eluição na cromatografia de exclusão estérica acaba ocorrendo antes. A sulfatação aumenta a solubilidade do material e, pela inserção de grupos negativamente carregados, também promove modificações na conformação levando a diminuição da viscosidade (GERESH, MAMONTOV, WEINSTEIN, 2002). O alargamento da base dos picos, que indica maior polidispersividade (Figura 23-B e C) reflete que a população de moléculas gerada pela reação de derivatização é mais heterogênea, uma vez que os grupos sulfatos podem ocupar diferentes hidroxilas e às vezes, mais de uma hidroxila (VASCONCELOS et al., 2013; GRACHER et al, 2016). É provável que ainda haja moléculas da glucana que não foram sulfatadas, embora três ciclos de sulfatação tenham sido realizados. A repetição desses experimentos não foi efetuada porque, como dito anteriormente, as condições da reação são bastante severas ainda que cuidados sejam tomados.

Figura 23-Cromatograma por HPSEC/RID da α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana produzida pelo *C. gloeosporioides* antes (A) e depois do segundo (B) e terceiro (C) ciclos de sulfatação.



5.7 Atividade Anticoagulante

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados (naturalmente ou quimicamente) é atribuída aos grupamentos sulfatos. As características químicas e físico-químicas dos compostos interrelacionam-se com a atividade biológica. A sulfatação pode então criar ou melhorar a atividade biológica no polissacarídeo, pelo aumento da ligação eletrostática como o sítio receptor celular (MENDES et al., 2009).

Após os procedimentos de sulfatação, as soluções de α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana de *C. gloeosporioides* estavam mais solúveis e menos viscosas, por isso foram efetuados os experimentos de atividade anticoagulante, através de testes clássicos de coagulação

sanguínea: APTT (Tromboplastina Parcial Ativada), PT (Tempo de Protrombina) e TT (Tempo de Trombina).

A coagulação sanguínea ocorre através de uma rede de reações bioquímicas, finamente controladas, que conduzem à geração de trombina (Fator IIa). Em áreas lesionadas a trombina deve ser rapidamente formada a partir de precursores incluindo zimogênios, enzimas, cofatores e inibidores (RANA; NEEVES, 2016). Trombina é uma enzima efetora chave do sistema de coagulação, que tem muitas funções biologicamente importantes, tais como a ativação de plaquetas, a conversão do fibrinogênio a uma rede de fibrina e a amplificação do *feedback* da coagulação (DAHLBÄCK, 2000).

Com o intuito de controlar e/ou prevenir a coagulação intravascular excessiva, que é capaz de causar doenças como acidentes vasculares encefálicos, ataques cardíacos e embolia pulmonar, são utilizados os fármacos com ação anticoagulante. O anticoagulante é um composto químico ou proteico que controla a coagulação do sangue através de sua ligação aos fatores de coagulação, inibindo as reações da cascata da coagulação (JIN; GOPINATH, 2016).

Dentre os anticoagulantes utilizados como medicamentos está a heparina, polissacarídeo que contém grupamentos *N*- e *O*-sulfatos, naturalmente substituídos, que se liga com a antitrombina, inibindo a ativação da trombina na cascata da coagulação, aumentando o tempo para a formação do coágulo. Na terapêutica, a heparina apresenta limitações de usos por desencadear efeitos colaterais ou efeitos plasmáticos inespecíficos. Por isso, mesmo sendo até o momento o fármaco de escolha, estudos têm sido realizados no intuito de buscar novas substâncias com ação anticoagulante, especialmente outros polissacarídeos sulfatados que apresentem menores efeitos colaterais (GRACHER et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2017).

Vários testes de atividade anticoagulante respondem ao prolongamento do tempo de coagulação sanguínea e é variável em função da dose necessária para a eficácia da ação (VASCONCELOS, 2009). Eles podem indicar a interação do anticoagulante com os diferentes estágios do processo de coagulação, ou dando informações básicas sobre a maneira de ação desses compostos (BRANDI et al., 2011). Normalmente, estes testes avaliam o desempenho das vias intrínseca, extrínseca, comum e conversão do fibrinogênio em fibrina na cascata da coagulação (DAHLBÄCK, 2000).

O APTT é o ensaio que monitora a via intrínseca da coagulação, medindo a função dos fatores XII, XI, IX e VIII, e também dos fatores da via comum (X, V e II). PT avalia a via extrínseca da coagulação que é ativada pelo fator tecidual, uma proteína extra vascular. Além

dos fatores da via comum, o PT avalia a função do fator VII. O TT por sua vez, avalia a conversão do fibrinogênio plasmático em fibrina na presença de trombina exógena. O tempo de coagulação na última etapa do sistema de coagulação é a conversão do fibrinogênio em fibrina, pela trombina (VASCONCELOS et al., 2013).

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de atividade anticoagulante da α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana sulfatada (GS) e da α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana nativa (GN), determinados pelos testes APTT, TT e PT, utilizando a heparina como anticoagulante padrão de referência. A GN não inibiu nenhum dos testes, apontando que a presença do grupamento sulfato é importante para essa atividade biológica.

Tabela 5- Atividade anticoagulante determinada pelos testes clássicos (APTT, TT e PT) da α -(1 \rightarrow 3)-glucana e de α -(1 \rightarrow 3)-glucana sulfatada em diferentes concentrações no plasma humano comparada com a heparina (padrão de concentração 5000 UI/mL)

Plasma/ anticoagulante	APTT Tempo (s)	TT Tempo (s)	PT Tempo (s)
Plasma com Heparina (μ g/mL)			
(controle) 0	26,7 \pm 0,4	15,9 \pm 0,3	13,1 \pm 0,5
1	46,1 \pm 5,9	19,8 \pm 0,3	14,1 \pm 0,1
2	65,9 \pm 0,5	64,4 \pm 1,9	13,9 \pm 0,6
3	118,0 \pm 2,8	148,5 \pm 9,2	14,2 \pm 0,6
Plasma com α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana (μ g/mL)			
(controle) 0	26,7 \pm 0,4	15,9 \pm 0,3	13,1 \pm 0,5
1	29,0 \pm 3,4	14,7 \pm 0,6	14,0 \pm 1,8
5	25,8 \pm 0,1	16,7 \pm 0,2	12,7 \pm 1,0
10	27,5 \pm 0,2	16,0 \pm 0,0	12,8 \pm 0,4
15	26,5 \pm 0,7	16,4 \pm 0,8	12,9 \pm 1,1
20	27,1 \pm 0,2	15,9 \pm 0,1	12,4 \pm 1,3
Plasma com α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana sulfatada (μ g/mL)			
(controle) 0	26,7 \pm 0,4	15,9 \pm 0,3	13,1 \pm 0,5
1	32,2 \pm 0,2	17,2 \pm 1,3	13,9 \pm 0,1
5	43,6 \pm 4,5	23,3 \pm 2,9	12,4 \pm 0,1
10	59,4 \pm 1,8	45,9 \pm 1,3	12,4 \pm 0,3
15	81,3 \pm 4,7	70,0 \pm 2,8	12,9 \pm 0,2
20	139,5 \pm 2,1	118,0 \pm 7,1	12,4 \pm 0,2
30	227,5 \pm 9,2	151,5 \pm 9,2	13,0 \pm 0,1
40	415,0 \pm 7,1	289,0 \pm 8,5	14,5 \pm 0,1

Os dados correspondem a média e desvio padrão.

Para a α -(1 \rightarrow 3)-glucana sulfatada (GS), os resultados demonstraram que a constituição do coágulo nos testes APTT e TT foi concentração dependente, ou seja, houve

um prolongamento do tempo de formação do coágulo com o aumento da concentração do material sulfatado. No APTT, em 20, 30 e 40 ug/mL da GS, os tempos de coagulação foram respectivamente, seis, oito e quinze vezes maiores que o tempo do controle. Para o TT, nas mesmas concentrações, os tempos de coagulação variaram de sete, dez e dezenove vezes a mais que o controle. Esses resultados demonstram uma importante atividade anticoagulante da α -(1→3)-glucana sulfatada, que pode ser atribuído ao grau de sulfatação da molécula (DS= 0,75).

A comparação dos resultados de APTT e TT da α -(1→3)-glucana sulfatada com o padrão heparina mostrou que era necessária uma concentração pelo menos 10 vezes maior da GS para obter-se o mesmo tempo de coagulação demonstrado pela heparina. Resultados semelhantes foram observados para β -glucanas quimicamente sulfatadas do tipo (1→3) (LEE et al., 2001), (1→3,6) (MENDES et al., 2009; BRANDI et al., 2011) e (1→6) (VASCONCELOS et al., 2013). De acordo com Martinichen-Herrero e colaboradores (2005), polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante menor que a heparina podem exibir um potente efeito antitrombótico com menor risco de hemorragia.

Em relação ao PT, a α -(1→3)-glucana sulfatada não apresentou um efeito significativo no tempo de formação do coágulo, o que é condizente com dados da literatura, que mostram que mesmo para a heparina este teste não é muito sensível (WANG et al., 2007; MENDES et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2013). Portanto, esses anticoagulantes não atuam sobre a via extrínseca da coagulação.

Os resultados positivos da α -(1→3)-glucana sulfatada para os testes do APTT e TT, dose dependente, sinalizaram um bom potencial anticoagulante do polímero derivatizado que atua, provavelmente, como um inibidor da via intrínseca de coagulação e da conversão do fibrinogênio em fibrina, não mostrando, entretanto, nenhum efeito sobre a via extrínseca de coagulação.

6 CONCLUSÕES

- Os fungos endofíticos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* são produtores de exopolissacarídeos no meio de cultivo *in vitro*.
- As concentrações de inóculo e tempo de cultivo para obtenção de EPS sem a presença de pigmentos pelos fungos, *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*, foram respectivamente 2,5 mL em 72 horas, 2,0 mL em 96 horas e 1,0 mL em 72 horas para 25 mL de meio de cultivo.
- As massas liofilizadas dos EPS brutos foram 367 mg para o *N. parvum*, 300 mg do *Fusarium* sp e 421 mg do *C. gloeosporioides*, com composição monossacarídica principalmente composta por glucose (*N. parvum* e *C. gloeosporioides*) e manose (*Fusarium* sp).
- *C. gloeosporioides* apresentou maior quantidade de EPS cujo teor de açúcar total estava em 99 %, sendo que 78 % era glucose.
- A purificação por centrifugação separou os EPS em frações insolúvel (precipitado) e solúvel (sobrenadante). As análises por HPSEC/RID (um pico) e HPAEC/PAD (100% glucose) indicaram que apenas o precipitado do *C. gloeosporioides* estava apto a ser caracterizado.
- As análises de metilação e espectroscópicas por FT-IR e RMN bidimensional heteronuclear (HSQC) mostraram que a glucana em questão tem as unidades de glucose unidas por ligação do tipo α -(1 \rightarrow 3).
- A α -(1 \rightarrow 3)-glucana foi derivatizada por sulfatação e apresentou um DS de 0,75. A glucana sulfatada apresentou um aumento no tempo de coagulação, concentração dependente, nos testes do APTT e TT, indicando atuar como um inibidor da via intrínseca da coagulação e da conversão do fibrinogênio em fibrina, sinalizando ação anticoagulante.

REFERÊNCIAS

- AINA, D. A.; OLOKE, J. K.; JONATHAN, S. G.; OLAWUYI, O. J. Comparative assessment of mycelial biomass and exo-polysaccharide production of wild type and mutante strains of *Schizophyllum commune* grown in submerged liquid medium. **Nature and Science**, New York, v.10, n.10, p. 82-89, 2012.
- ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 267-76, 2002.
- ASAKURA, M.; YOSHINO, K.; HILL, A. M.; KUBOC, Y.; SAKAIA, Y.; TAKANO, Y. Primary and secondary metabolism regulates lipolysis in appressoria of *Colletotrichum orbiculare*. **Fungal Genetics and Biology**, v.49, p. 967–975, 2012.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.
- BANERJEE, D.; JANA, M.; MAHAPATRA, S. Production of exopolysaccharide by endophytic *Stemphylium* sp. **Micología Aplicada International**, v. 21, n. 2, p. 57-62, 2009.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T. DA; PIGATTO, M. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-D- glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691–1698, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRANDI, J.; OLIVEIRA, E. C.; MONTEIRO, N. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; MOURÃO, P. A. S.; SILVEIRA, J. L. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Chemical Modification of Botryosphaeran: Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Water-Soluble Sulfonated (1→3)(1→6)-β-D-Glucan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, n 21, v. 10, p. 1036–1042, 2011.
- BRUCE, P.Y. Espectroscopia de RMN, In Bruce, P.Y., **Química Orgânica**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2006, p.524-590.
- CAMPBELL, D.; WHITE, J. R. Polymer Characterization: **Physical Techniques**. London: Chapman&Hall, p.50, 1989.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.

- CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.; WILLIAMSON, P.; RODRIGUES, M. L. Vesicular transport across the fungal cell wall. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 158-162, 2009.
- CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYODA, H.; WOO, E. R.; BOK LEE, K.; KIM, Y. S.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Effect of (1→3)- and (1→4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 925 – 33, 2002.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofítios: Uma fonte inexplorável e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, 2013 Disponível em <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/275/280>
- CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; EXPOSTI, D. T. D.; VASCONCELOS, A. F. D.; ALEXANDRE, S. M. A.; SILVEIRA, J. L. M.; DUCATTI, D. R. B. Glucogalactan: A polysaccharide isolated from the cell-wall of *Verticillium Lecanii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1353– 1359, 2013.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; IZELIA, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, G. V. J. DA Purification and structural characterization of (1→3,1→6)-β-glucan (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, 10-17, 2005.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v.29, p. 85-92, 2006.
- COSTA, V. S. DE O; MICHEREFF, S. J.; MARTINS, R. B.; GAVA, C. A. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P. S. Special of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant and Pathology**, v. 127, p. 509-519, 2010.
- CUI, S.W. Structural analysis of polysaccharides. In CUI, S.W. **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. United States of America: Taylor and Francis Group, 2005, p. 105-160.
- DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **The Lancet**, v. 355, n. 6, p. 1627- 1632, 2000.
- DEGRAEVE, S.; MADEGE, R. R.; AUDENAERT, K.; KAMALA, A.; ORTIZ, J.; KIMANYA, M.; M. TIISEKWA, M.; DE MEULENAER, B.; HAESAERT, G. Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania. **Food Control**, v. 59, p. 225-233, 2016.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G.; A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v.84, p.106–109, 1962.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers** v. 87, p. 951-962, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

EL-DEIN, M. M. N.; EL-FALLAL, A. A.; TOSON, E. S. A. HEREHER, F. E. Exopolysaccharides Production by *Pleurotus pulmonarius*: Factors Affecting Formation and Their Structures. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p 1078-1084, 2004.

EMERSON, S. The growth phase in *Neurospora* corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms. **Journal of Bacteriology**, v. 60, n.3, p.221–223, 1950.

ERGINER, M.; AKCAY, A.; COSKUNKAN, B.; MOROVA, T.; RENDE, D.; BUCAK, S.; BAYSAL, N.; OZISIK, R.; EROGLU, M. S.; AGIRBASLI, M.; ONER, E. T. Sulfated levan from *Halomonas smyrnensis* as a bioactive, heparina-mimetic glycan for cardiac tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 289-296, 2016.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510 p.

ESTEVES, A. C.; SARAIVA, M.; CORREIA, A.; ALVES, A. *Botryosphaeriales* fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, p. 332–342, 2014.

FANG, W.; LEGER, R. J. St. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1549–1557, 2010.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: crescimento, morfologia e diferenciação. In: **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. EDUCS, p. 91-122, 2004.

GENG, Z.; ZHU, W.; SU, H.; ZHAO, Y.; ZHANG, K. Q.; YANG, J. Recent advances in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and pathogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*). **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 390–402, 2014.

GERESH, S.; MAMONTOV, A.; WEINSTEIN, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 50, p. 179–187, 2002.

GONZAGA, L. L., COSTA, L. E. O; SANTOS, T. T.; ARAUJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 485-496, 2014.

GRACHER, A. H. P.; SANTANA, A. G.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. A procoagulant chemically sulfated mannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 177-186, 2016.

GRACHER, A. H. P.; CIPRIANI, T. R.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**, v. 126, p. e180–e187, 2010.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375–384, 2005.

GUO, S.; MAOB, W.; LIA, Y.; TIANC, J.; XUB, J. Structural elucidation of the exopolysaccharide produced by fungus *Fusarium oxysporum* Y24-2. **Carbohydrate Research**, v. 365, p. 9–13, 2013.

HABIJANIC, J.; BEROVIC, M.; BOH, B.; PLANKL, P.; WRABER, B. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, 2015.

HAINES, A. H. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. In **Adv Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 33, p. 11-109, 1976.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M. Micotoxinas e metabólitos bioativos de *Fusarium sp*: perspectivas de sua importância para o Brasil. **Semina Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p. 74-79, 1994.

HUANG, X.; HU, Y.; ZHAO, X.; LU, Y.; WANG, J.; ZHANG, F.; SUN, J. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of astragalus polysaccharide for ND vaccine. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.303–308, 2008.

HUANG, Z.; YANG, J.; CAI, X.; SHE, Z.; LIN, Y. A new furanocoumarin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium sp.* (ZH16). **Natural Product Research**, v. 26, n.14, p. 1291-1295, 2012.

IQBAL, M.; ZAFAR, S. I. Effects of Photon Flux Density, CO₂, Aeration Rate, and Inoculum Density on Growth and Extracellular Polysaccharide Production by *Porphyridium cruentum*. **Folia Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 509-514, 1993.

JAT, B. L.; SHARMA, P.; GOUR, H. N. Production of Enzymes and Culture Filtrates by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causing Banana Fruit Rot. **Biological Science**, v. 83, n. 2, p. 177-180, 2013.

JIANG, Y.; JIANG, X.; WANG, P.; MOU, H.; HU, X.; LIU, S. The antitumor and antioxidative activities of polysaccharides isolated from *Isaria farinosa* B05. **Microbiological Research**, v. 163, p. 424-430, 2008.

JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 84, p. 356–365, 2016.

JING-KUN, Y.; WEN-QIANG, W.; HAI-LE, M.; JIAN-YONG, W. Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. **Molecules**, v. 18, n. 167 – 77, 2013.

- KACURÁKOVÁ M.; SMITH, A. C.; GIDLEY, M. J.; WILSON, R. H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1147-1153, 2002.
- KAGIMURA, F. J.; CUNHA, M. A. A DA; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2015.
- KAMLE, M.; KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; TIWARI, A. K.; MISRA, A. K.; PANDEY, B. K. Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 285–287, 2013.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews – Microbiology**, v.3, p. 937-947, 2005.
- KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLEB, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges Review. **Natural Product Report**, v. 28, p. 1208–1228, 2011.
- KIM, H. M.; PARK, M. K.; YUN, J. W. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, p. 249-262, 2006.
- KIM, S. W.; HWANG, H. J.; PARK, J. P.; CHO, Y. J.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p. 56-61, 2002.
- KIM, S. W.; XU, C. P.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; KIM, C. W.; YUN, J. W. Production and characterization of exopolysaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 428-435, 2003.
- KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185–202, 2006.
- KUMAR, A. S.; MODY, K; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 103-117, 2007.
- KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81–87, 2013.
- LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S.W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p.369–376, 2004.
- LEE, K. B.; BAE, J. H.; KIM, J. S.; YOO, Y. C.; KIM, B. S.; KWAK, S. T.; KIM, Y. S. Anticoagulant activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan. *Archives of Pharmacal Research*, Seoul, v. 24, n. 2, p. 109-113, 2001.

LI, R.; JIANG, X.; GUAN, H. Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella* sp. in submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 195-202, 2010.

LIMA, L. F. O.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J. L.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p.283–294, 2008.

LIN, E.S.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 182–187, 2006.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 93f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2012.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers** v.90, n. 1, p. 683–689, 2012.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.

MANAMGODA, D. S.; UDAYANGA, D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 107–115, 2013.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, Nova Iorque, v. 658, p. 154–161, 2008.

MANZONI, M.; ROLLINI, M. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1491-1497, 2001.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C., CARBONERO, E. R., SASSAKI, G. L., GORIN P. A. J., IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 35, p. 97–102, 2005.

MARTINS, T. M.; HARTMANN, D. O.; PLANCHON, S.; MARTINS, I.; RENAUT, J.; PEREIRA, C. S. The old 3-oxoadipate pathway revisited: New insights in the catabolism of aromatics in the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v.74, p.32–44, 2015.

MARTOS, S.; ANDOLFI, A.; LUQUE, J.; MUGNAI, L.; SURICO, G.; EVIDENTE, A. Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline

on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.121, p. 451–461, 2008.

MENDES, S.F.; SANTOS, O.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ARANDA-SELVERIO, G.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R.; PEREIRA, M. S.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 305 – 309, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMMADI, H.; GRAMAJE, D.; BANIHASHEMI, Z.; ARMENGOL, J. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, p. 603-616, 2013.

MORETTI, A. N. Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. **Matica Srpska Journal for Natural Sciences, Sérvia**, v. 117, p. 7—13, 2009.

NEHAD, E. A.; EL-SHAMY, A. R. Physiological studies on the production of exopolysaccharide by *Fungi*. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, n. 6, p. 1303-1308, 2010.

NIE, X.; SHI, B.; DING, Y.; TAO, W. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, p. 228–233, 2006.

NOGUEIRA, A. V.; DREHMER, D. L.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R. Biological and structural analyses of bovine heparin fractions of intermediate and high molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 72–78, 2017.

O'NEILL, A. N.; Sulphated derivatives of Laminarin. **Canadian Journal Chemistry**, v 33, p. 1097–1101, 1955.

ORLANDELLI, R. C.; CORRADI DA SILVA, M. L.; VASCONCELOS, A. F. D.; ALMEIDA, I.V.; VICENTINI, V. E. P.; PRIETO, A.; HERNANDEZ, M. D.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. β -(1 → 3,1 → 6)-D -glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.94, p. 431-437, 2017

ORLANDELLI, R. C.; VASCONCELOS, A. F. D.; AZEVEDO, J. L.; CORRADI DA SILVA, M. L.; PAMPHILE, J. A. Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: preliminary characterization of crude exopolysaccharide produced by submerged culture of *Diaporthe* sp JF766998 under different cultivation time. **Biochimie Open**, v. 2, p. 33-40, 2016.

ORTEGA, L. M.; KIKOT, G. E.; ASTORECA, A. L.; ALCONADA, T. M. Screening of *Fusarium graminearum* Isolates for Enzymes Extracellular and Deoxynivalenol Production. **Journal of Mycology, La Plata**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

- OSINSKA-JAROSZUK, M.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; JAROSZUK-SCISEŁ, J.; SZAŁAPATA, K.; NOWAK, A.; JASZEK, M.; OZIMEK, E.; MAJEWSKA, M. Extracellular polysaccharides from *Ascomycota* and *Basidiomycota*: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.1823–1844, 2015.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p. 189 – 259, 2004.
- PARK, J. P.; KIM, Y. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHO, Y. J.; LEE, Y. S.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and *exo*-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1257–1262, 2002.
- PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In: CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. (Ed.). **Carbohydrate analysis: a practical approach**. 2th ed. Oxford, U K: Oxford University Press, 1994, p.181.
- PENG, L; QIAO, S.; XUC, Z.; GUANA, F.; DING, Z.; GUB, Z.; ZHANG, L.; SHI, G. Effects of culture conditions on monosaccharide composition of *Ganoderma lucidum* exopolysaccharide and on activities of related enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 104–109, 2015.
- PERSOH, D.; MELCHER, M.; FLESSA, F; RAMBOLD, G. First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus*. **Fungal Biology**, v.114, p. 585 -596, 2010.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, 2013.
- PRADEEP, F. S.; PALANISWAMY, M.; RAVI, S.; THANGAMANI, A.; PRADEEP, B.V Larvicidal activity of a novel isoquinoline type pigment from *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1479–1486, 2015.
- RAMOS, A.; BOELS, I. C.; DE VOS, W. M.; SANTOS, H. Relationship between Glycolysis and Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 33–41, 2001.
- RANA, K.; NEEVES, K. B. Blood flow and mass transfer regulation of coagulation. **Blood Reviews**, v. 30, p. 357–368, 2016.
- RAZACK, S. A.; VELAYUTHAM, V. THANGAVELU, V. Influence of various parameters on Exopolysaccharide production from *Bacillus subtilis*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n.5, p. 2221-2228, 2013.
- RODRIGUES, M. L.; FRANZEN, A. J; NIMRICHTER, L.; MIRANDA, K. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p.414-420, 2013.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; CASADEVALL, A.; NIMRICHTER, L. Vesicular transport system in fungi. **Future Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1371–1381, 2011.

SAKALIDIS, M. L.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D.; HARDY, G. E. St. J.; BURGESS, T. I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum* – *N. ribis* species complex. **Diversity and Distributions**, v. 19, 873–883, 2013.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 895–906, 2002.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M., FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, p.585–592, 2002.

SELBMANN, L.; STINGELE, F.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, p. 135-145, 2003.

SELIM, K. A.; EL-BEIH, A. A.; ABDEL-RAHMAN, T. M.; EL-DIWANY, A. I. Biology of Endophytic Fungi. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 2, n.1, p. 31–82, 2012.

SHARMILA, K.; THILLAIMAHARANI, K. A.; DURAIRAJ, R.; KALAISELVAM, M. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from mangrove filamentous fungus, *Syncephalastrum* sp. **African Journal Microbiology Research**, v. 8, n. 21, p. 2155-2161, 2014.

SHEPPARD, D. C.; HOWELL, P. L. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 12529-12537, 2016.

SHU, C.H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorate* in batch cultures. **Process Biochemistry**. v. 39, n. 8, p. 931-937, 2004.

SILVA, R. D. R.; MELO, E. M. de A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v.2, n.1, p. 79-92, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental** 5 ed. Porto Alegre, Bookman, 2002, 1055 p.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latente pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Review**, v. 21, p. 90–106, 2007.

SÖRENSEN, J. L.; SONDERGAARD, T. E. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 55–60, 2014.

- STEINBERG, G.; SCHUSTER, M. The dynamic fungal cell. **Fungal Biology Review**, v. 25, p. 14 – 37, 2011.
- STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of *Botryosphaeran* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 480–486, 2004.
- SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9 – 19, 2009.
- SYNYTSYA, A.; MÍCKOVÁ, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKY, I.; SPEVACEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘIKOVÁ, E.; COPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 548–556, 2009.
- SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 792– 809, 2013.
- SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v.4, p.1-14, 2014.
- TANG, Y. J.; ZHONG, J. J Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1023–1026, 2002.
- TUDOR, D.; ROBINSON, S. C.; COOPER, P. A. The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 80, p. 22 -28, 2013.
- VASCONCELOS, A. F. D. **β - glucanas de isolados fúngicos do gênero *Botryosphaeria*: produção, caracterização química e atividade anticoagulante**. 2009. 126f Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.
- VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1→6)-d-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–1914, 2013.
- VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L. Three exopolysaccharides of the β -(1→6)-D-glucan type and a β -(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p.2481–2485, 2008.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, Z. M.; LI, L.; ZHENG, B. S.; NORMAKHAMATOV, N.; GUO, S. Y. Preparation and anticoagulation activity of sodium cellulose sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 41, p. 376–382, 2007.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1119–1139, 2012.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. Triethylamin-sulfur trioxide complex. In: WHISTLER, R. L. (Ed.) **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, Academic Press, v. 4, p. 235-275, 1964.

WIEMANN, P.; WILLMANN, A.; STRAETEN, M.; KLEIGREWE, K.; BEYER, M.; HUMPF, H. U.; TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 931–946, 2009.

WILLIAMS, D. L., Overview of (1→3)- β -D-Glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v.6, p. 247-250, 1997.

WOLKERS, W. F.; OLIVER, A. E; TABLIN, F.; CROWE, J. H. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbohydrate Research**, v.339, p.1077-1085, 2004.

WU, S.; CHEN, J.; PAN, S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1696– 1700, 2012.

XIAO, J. H.; CHEN, D. X.; LIU, J. W.; LIU, Z. L.; WAN, W. H.; FANG, N.; XIAO, Y.; QI, Y.; LIANG, Z.Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1105–1116, 2004.

XU, C. P.; SINHA, J.; BAE, J. T.; KIM, S. W.; YUN, J. W. Optimization of physical parameters for exo-biopolymerproduction in submerged mycelial cultures of two entomopathogenic fungi *Paecilomyces japonica* and *Paecilomyces tenuipes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 501-506, 2006.

YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically?. **Fungal Ecology**, v. 13, p. 53-59, 2015.

YANG, J.; DU, Y.; WEN, Y.; LI, T.; HU, L.; Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, v.52, p.397–403, 2003.

YU, X.; HUO, L.; LIU, H.; CHEN, L.; WANG, Y.; ZHU, X. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Microbiological Research**, v. 179, p. 1–11, 2015.

YUA, X.; HUO, L.; LIU, H.; CHEN, L.; WANG, Y.; ZHU, X. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspore*. **Microbiological Research**, v. 179, p.1–11, 2015.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Chemical structure and molecular weights of α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Lentinus edodes*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, p. 1197-1202, 1999.

ZHANG, Q.; WEI, X.; WANG, J. Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspense*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1500–1505, 2012.

ZHONG, J. J.; TANG, Y. J. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. In **Biomanufacturing**. Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 25-59.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1- Curva de produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) de *N. parvum*, *Fusarium sp* e *C. gloeosporioides* nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL de inóculo celular / 25 mL de meio de cultivo.

Concentração de inóculo (mL / 25 mL de meio de cultivo)	EPS (mg/L)		
	<i>N. parvum</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
1,0	142,4 ± 8,0	64,4 ± 1,0	369,9 ± 1,4
1,5	208,8 ± 1,0	76,5 ± 6,5	433,4 ± 4,8
2,0	276,6 ± 6,0	209,4 ± 7,9	450,7 ± 1,0
2,5	366,9 ± 4,0	124,0 ± 10	470,5 ± 2,3
3,0	119,7 ± 1,0	80,0 ± 1,8	508,7 ± 7,6
3,5	94,1 ± 1,0	62,0 ± 1,8	488,9 ± 3,0
4,0	82,7 ± 5,0	35,0 ± 1,8	462,6 ± 3,6

Os valores dos EPS correspondem a média e desvio padrão das triplicatas dos experimentos com pH inicial do meio de Vogel: 5,6 por 72 horas de cultivo, 180 rpm, 28 °C.

ANEXO 2- Concentração de EPS (mg/L) produzido pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* durante curva de tempo de cultivo.

Tempo de cultivo (horas)	EPS (mg/L) \pm DP		
	<i>N. parvum</i>	<i>Fusarium</i> sp	<i>C. gloeosporioides</i>
24	33,0 \pm 3,0	126,0 \pm 4,2	67,9 \pm 1,7
48	359,8 \pm 11,0	216,5 \pm 3,5	153,6 \pm 3,0
72	366,5 \pm 4,0	252,5 \pm 7,2	421,4 \pm 2,1
96	290,5 \pm 3,1	302,0 \pm 3,5	581,4 \pm 2,8
120	117,5 \pm 1,0	258,5 \pm 0,7	856,5 \pm 0,7
168	126,1 \pm 1,0	356,4 \pm 0,5	1.225,0 \pm 2,8
240	138,0 \pm 13,5	517,2 \pm 13,4	1.338,6 \pm 0,7
360	145,0 \pm 10,0	867,6 \pm 13,4	1.640,8 \pm 4,0

Os valores EPS correspondem à média e (\pm) desvio padrão das triplicatas dos experimentos. O pH inicial do meio de Vogel: 5,6 e concentração de inóculo de 2,5 mL de células a cada 25 mL de meio para o *N. parvum*, 2,0 mL de células para o *Fusarium* sp e 3,0 mL de células para o *C. gloeosporioides*, incubadas a 28 °C, em agitação de 180 rpm.

ANEXO 3- Normas da Revista

SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Author Guidelines

Guidelines for Authors

Articles can be submitted in Portuguese or English, but will only be published in English. Articles that are submitted in Portuguese, if accepted for publication, will have to be **translated into English.**

Articles sent to the journal by march 31, 2014 and those that are still being processed may be published in Portuguese; however, priority for publication will be given to the articles that are translated into English.

All articles, after being accepted for publication, must be accompanied by a proof certificate of translation or correction (as a supplementary file) from one of the following translation services:

[American Journal Experts](#)

[Editage](#)

[Elsevier](#)

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

The lead author must attach the **document that provides evidence of** this translation or correction in the electronic system on the submission page in “**Docs. Sup.**”

COMMENTS:

1) Original manuscripts submitted for review are initially assessed by the Editorial Committee of *Semina: Ciências Agrárias*. In this assessment, quality requirements for publishing with the journal will be evaluated, such as scope of the article, suitability with regard to the journal standards, quality of writing and theoretical foundation. Additionally, it is also considered literature review update, consistency and accuracy of the methodology, contribution of the results, discussion of the data observed in the study, table and figure depiction, and originality and consistency of conclusions.

If the number of submitted manuscripts exceeds the assessment and publication capacity of *Semina: Ciências Agrárias*, a comparison between submissions will be made, and the works considered to have the highest contribution potential to scientific knowledge will be directed to ad hoc advisors. The manuscripts that are not approved by these criteria are archived, whereas the remaining manuscripts are subjected to assessment by at least two scientific advisors who are experts in the subject area of the manuscript, without identifying the authors. The submission fee will not be returned to authors who have their manuscripts archived.

2) Where appropriate, if the research project that originated the article was performed according to biosafety and ethics technical standards under approval from an ethics committee involving humans

and/or an ethics committee involving animals, the commission name, institution, and process number should be stated.

MANDATORY REQUIREMENTS FOR ACCEPTANCE:

- a) The attached main article file has the names of the authors and their respective affiliations.
- b) The **complete registration** of all authors has been added to the metadata during submission; **Example:** Full name; Institution/Affiliation; Country; Summary of Biography/Title/Role.
- c) Text explaining the relevance of the work (importance and distinction from previously published works), with a maximum length of 10 lines, is included in the field COMMENTS TO THE EDITOR.
- d) The submission is accompanied by a document proving payment of the submission fee as a supplementary file in the **“Docs.Sup.”** section.
- e) The main article is accompanied by supplementary files, including graphs, figures, photos, and other documents, IN THEIR ORIGINAL VERSION (JPEG, TIFF, or EXCEL formats).
- f) The following information is included in the original manuscript: title, abstract, keywords in Portuguese and English, tables, and figures.

RESTRICTIONS BY SUBJECT AREA:

FOR THE AGRONOMY FIELD, MANUSCRIPTS WILL NOT BE ACCEPTED IN CASE OF THE FOLLOWING:

- a) The experiments conducted with an *in vitro* culture are limited to the improvement of protocols already standardized or do not provide new information about the subject area;
- b) The field experiments do not include data corresponding to at least two years or to diverse locations within the same year;
- c) The experiments refer only to tests about the efficiency of commercial products against biotic and abiotic agents or physiological stress;
- d) The experiments involve only bioassays (screening) on the efficacy of methods for controlling insects, mites, or diseases in plants, unless they contain an important contribution about the action mechanisms under the perspective of a frontier of knowledge; or
- e) The objective is limited to registering the occurrence of a species of a plague or pathogen or associations with hosts in new locations within geographical regions where the species is already known. Documenting already known species or associations will only be considered if they are described in new ecological areas. The distribution records should be based on ecosystems and not on political boundaries.

FOR THE VETERINARY FIELD, THE MANUSCRIPTS WILL NOT BE ACCEPTED IN CASE OF THE FOLLOWING:

- a) Publication of case reports is restricted; only articles with great relevance and originality that make a real contribution to the advance of knowledge in the field will be selected for processing.

Work Categories

- a) Scientific articles: maximum of 20 pages, including figures, tables, and bibliographic references

- b) Scientific communications: maximum of 12 pages, with bibliographic references limited to 16 citations and a maximum of two tables, two figures, or a combination of one table and one figure
- c) Case reports: maximum of 10 pages, with bibliographic references limited to 12 citations and a maximum of two tables, two figures, or one table and one figure
- d) Review articles: maximum of 25 pages, including figures, tables, and bibliographic references

Presentation of the Work

Complete original articles, communications, case reports, and reviews should be written in Portuguese or English using Microsoft Word for Windows, on A4-size paper, with lines numbered per page, 1.5 spacing between lines, Times New Roman font, size 11 normal, 2 cm margins on all sides, with pages numbered on the upper right corner and following the guidelines for the maximum number of pages according to the category of the work.

Figures (drawings, graphics, and photographs) and tables should be numbered with Arabic numerals, should be included at the end of the work immediately after the bibliographic references, and should be cited within the text. In addition, the figures must be of good quality and must be attached in their original format (JPEG, TIFF, etc.) in Docs Sup on the submission page. Figures and tables will not be accepted if they do not comply with the following specifications: width of 8 cm or 16 cm with maximum height of 22 cm. If the figure has greater dimensions, it will be reduced during the editorial process to the above-mentioned dimensions.

Note: Figures (Ex. **Figure 1.** Title) and tables (**Table 1.** Title) should have a width of 8 cm or 16 cm with maximum height of 22 cm. Those with greater dimensions will be reduced during the editorial process to the above-mentioned dimensions. For any tables and figures that are not the author's original work, a citation to the source consulted is mandatory. Place this citation below the table or figure and indicate using a smaller font (Times New Roman 10).

Ex: “**Fonte**”: IBGE (2014), or **Source**: IBGE (2014).

Manuscript preparation

Scientific article:

Scientific articles should report results of original research on the related areas, with the sections organized in the following way: Title in English; Title in Portuguese; Abstract in English with keywords (maximum six words, in alphabetic order); Abstract in Portuguese with keywords (maximum six words, in alphabetical order); Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion, with Conclusions at the end of the Discussion or Results (Discussion and Conclusions should be written separately); Acknowledgements; Suppliers, if applicable; and Bibliographic References. The headings should be in boldface without numbering. If there is a need to include a sub-heading within a section, it should be placed in italics, and if there are further sub-topics to include under a sub-heading, these should be numbered with Arabic numerals. (Example: **Materials and Methods**, *Areas of study, 1. Rural area, 2. Urban area.*)

The submitted work cannot have been published elsewhere with the same content, except in the form of an Abstract in Scientific Events, Introductory Notes, or Reduced Format.

The work should be presented in the following order:

- 1. Title of the work**, accompanied by its translation in Portuguese, if appropriate.

2. Abstract and Keywords: An informative abstract with a minimum of 200 words and a maximum of 400 words must be included, in the same language used in the text of the article, accompanied by an English translation (*Abstract and Keywords*) if the text has not been written in English.

3. Introduction: The introduction must be concise and contain only the review that is strictly necessary to introduce the topic and support the methodology and discussion.

4. Materials and Methods: This section may be presented in a continuous, descriptive way or with sub-headings to allow the reader to understand and be able to repeat the methodology cited with or without the support of bibliographic citations.

5. Results and Discussion: *This section* must be presented in a clear way, with the aid of tables, graphs, and figures, so that it does not raise any questions for the reader with regard to the authenticity of the results and points of view discussed.

6. Conclusions: *These* must be clear and presented according to the objectives proposed in the work.

7. Acknowledgements: People, institutions, and companies that contributed to the work should be mentioned at the end of the text, before the Bibliographic References section.

Note:

Notes: Each note regarding the body of the text must be indicated with a superscripted symbol immediately after the phrase it concerns and must be included as a footnote at the end of the page.

Figures: The figures that are deemed essential will be accepted and should be cited in the text by their numeric order, in Arabic numerals. If any submitted illustrations have already been published, the source and permission for publication should be stated.

Tables: Tables should be accompanied by a header that will allow understanding of the data collected without the need to use the body of the text for reference.

Quantities, units, and symbols:

a) Manuscripts should be in agreement with the criteria established in the International Codes for each subject area.

b) Use the International System of Units in all text.

c) Use the negative power format to note and present related units: e.g., kg ha⁻¹. Do not use the forward slash symbol to relate units: e.g., kg/ha.

d) Use a simple space between units: g L⁻¹, not g.L⁻¹ or gL⁻¹.

e) Use 24-hour time representation with four digits for the hours and minutes: 09h00, 18h30.

8. In-text author citations

Citations must be followed by the year of publication, and multiple citations should follow the alphabetical order system, according to the following examples:

a) The results by Dubey (2001) confirmed that

b) According to Santos et al. (1999), the effect of nitrogen

c) Beloti et al. (1999b) assessed the microbiological quality

d) [...] and inhibit the test for syncytium formation (BRUCK et al., 1992).

e) [...] compromising the quality of its derivatives (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citations with two authors

In citations of sources that have two authors, the authors' names are separated by a semicolon when citing them within parentheses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Use *and* when the authors are included in the sentence rather than cited in parentheses.

Ex: Pinheiro and Cavalcanti (2000).

Citing more than two authors

Indicate the first author followed by the expression et al.

Within parentheses, separate references with a semicolon when more than one reference is cited.

Ex: (RUSSO et al., 2000) or Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Citing multiple documents by the same author, published in the same year

Add lowercase letters, in alphabetical order, after the date and without a space.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

Citing multiple documents by the same author, published in different years

Separate the dates with a comma.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Citing various documents by various authors, mentioned simultaneously

Place the citations in alphabetical order, separated by a semicolon.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. References: The references, according to the standard NBR 6023, Aug. 2000, and reformulation number 14.724 of the Brazilian Technical Standards Association (ABNT), 2011, must be listed in alphabetical order at the end of the manuscript. **All the authors participating in a referenced study must be mentioned, regardless of the number of participants.** The accuracy and adequacy of references for works that have been consulted and mentioned in the text of the article, as well as opinions, concepts, and statements, are entirely the responsibility of the authors.

Note: Consult recently published issues of *Semina: Ciências Agrárias* for more details about how to format references in the article.

The remaining categories of works (Scientific Communication, Case Report, and Review) must follow the above-mentioned standards but with the following additional directions for each category:

Scientific communication

Scientific communications must be presented in a concise manner but with a complete description of the term research or ongoing research (Introductory note), with complete bibliographic documentation and methodologies, similar to a regular scientific article. Scientific communications must contain the following sections: Title (in Portuguese and English); Abstract with Keywords in Portuguese; Abstract with Keywords in English; and Body of the text. The body of the text should not be divided into sections but should follow this sequence: introduction, methodology, results and discussion (tables and figures may be included), conclusion, and bibliographic references.

Case report

A case report should be a brief description of clinical and pathological cases, unprecedented results, reporting of new species, or studies on the occurrence or incidence of plagues, microorganisms, or parasites of agronomic, zootechnical, or veterinary interest. The case report must contain the following sections: Title (Portuguese and English); Abstract with Keywords in Portuguese; Abstract with Keywords in English; Introduction with a literature review; case report(s), including results, discussion, and conclusion; and bibliographic references.

Bibliographic review articles

Review articles must involve relevant topics within the scope of the journal. The number of review articles per issue is limited, and authors can only write review articles of interest to the journal, following an invitation by the editorial board members of the journal. If a review article is submitted by an author, the inclusion of relevant results from the author or from the group involved in the study is required, along with bibliographic references demonstrating experience and knowledge about the topic.

A review article must contain the following sections: Title (Portuguese and English); Abstract with Keywords in Portuguese; Abstract with Keywords in English; Development of the proposed topic (the text may be divided into sections, but this is not required); Conclusions or Final Considerations; Acknowledgements (if applicable); and Bibliographic References.

Other important information

1. The publication of articles depends on the favorable opinion of ad hoc advisors and the approval of the *Semina: Ciências Agrárias* UEL Editorial Board.
2. Reprints will not be given to the authors, since the issues will be available online at the journal's website (<http://www.uel.br/revistas/uel>).
3. Copyright transfer: The authors agree with the transfer of publication rights of the manuscript to the journal. Reproduction of the articles is only allowed when the source is cited. Commercial use of the information is forbidden.
4. Unforeseen questions about or problems in the present standards will be addressed by the Editorial Board of the subject area in which the article was submitted for publication.
5. *Number of authors*: There is no limit to the number of authors, but people included as co-authors should have effectively participated in the study. People with limited participation in the study or the article preparation should be cited in the Acknowledgements section, as should institutions that granted scholarships and other financial resources.

Submission conditions

As part of our submission process, the authors should verify that the submission conforms to all of the items listed below. Submissions that are not in compliance with the standards will be rejected and the authors informed about the decision.

1. The authors should state that the contribution is original and new and that it is not being assessed for publication elsewhere; any exception(s) should be justified in the “Comments to the Editor.”
2. The authors should also state that the material is correctly formatted and that the Supplementary Documents are attached, BEING AWARE that the **incorrect format will result in the SUSPENSION of the evaluation process WITHOUT EVALUATION OF MERIT.**
3. **Authoring data for all of the authors should be entered in the Metadata field during the submission process.**

Use the button “**include author.**”

1. **In the following step, please fill in the metadata in English.**

In order to include the data, after saving the submission data in Portuguese, click on “**edit metadata**” at the top of the page. Change the language to English and insert the title in English, the abstract, and keywords. Save and continue to the next step.

1. The **authorship identification** of the work should be removed from the archive and from Word using the “Properties” option in order to ensure the anonymity criteria of the journal, in case the article is subjected to peer review, according to the directions available at [Ensuring a blind peer review](#).
2. The files for submission should be in Word, OpenOffice, or RTF format (as long as they do not exceed 2 MB).

The text should be typed on A4 paper, with numbered lines, 1.5 line spacing, and Times New Roman size 11 font.

1. Confirm that all ethical standards were followed if the research was performed with living beings. Include proof documents of approval by an institutional ethics committee involving humans and/or an ethics committee involving animals, if these documents are requested.
2. **Include the payment of the [Submission Fee](#), and attach the proof of payment as a supplementary document in “[Docs. Sup.](#)”**

Copyright Declaration

The **Copyright Declaration** for articles published in this journal is the author’s right. Since the articles published in this journal are open access, the articles may be used freely, with their own attributions, for educational and non-commercial purposes.

The journal has the right to make changes on a normative, orthographic, and grammatical level in the original articles, with the aim of maintaining proper standard use of the language and the credibility of the journal. Nevertheless, the writing style of the authors will be respected.

Alterations, corrections, or suggestions at a conceptual level, when necessary, will be directed to the authors.

The opinions expressed by the authors of the articles are their exclusive responsibility.

Privacy Policy

The names and affiliations reported in this journal are used exclusively for the services provided and are not made available for any other purpose or to third parties.

1 **Analysis of the volume of inoculum influence and cultivation time on the production of**
2 **exopolysaccharides by endophytic strains of *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* and**
3 ***Colletotrichum gloeosporioides*.**

4

5 **Análise da influência do volume de inóculo e do tempo de cultivo na produção de**
6 **exopolissacarídeos por cepas endofíticas de *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* e**
7 ***Colletotrichum gloeosporioides*.**

8

9 Angélica Augusta Grigoli-Dominato¹, Ana Flora Dalberto Vasconcelos², Jessica Moreli Ferreira²,
10 Aline, Midori Futami², André Rodrigues³, Adriana Knob⁴, Maria de Lourdes Corradi da Silva^{1,2}

11 1-Programa de Pós Graduação em Microbiologia IBILCE-Unesp São José do Rio Preto -SP 2- Depto de
12 Química e Biquímica- FCT- Unesp Presidente Prudente SP Brasil, 3- Departamento de Bioquímica e
13 Microbiologia - Instituto de Biociências –Unesp Rio Claro – SP; 4. Departamento de Biologia – Unicentro –
14 Guarapuava, PR, Brasil

15

16

17

Abstract

18 Endophytic fungi, for requiring adaptation in order to survive in their host, present intense metabolism
19 producing biomolecules, such as exopolysaccharides (EPS), with viability of applications in several
20 industrial areas. *In vitro*, the submerged fungus cultivation allows obtaining of such biopolymers efficiently,
21 in compact space and with better control of physical (pH, temperature, aeration) and chemical (nutrient)
22 variables. The aim of this report was to obtain the EPS of the endophytic fungi *Neofusicoccum parvum*,
23 *Fusarium sp* and *Colletotrichum gloeosporioides*, identifying the condition of culture in relation to volume
24 of inoculum and incubation time. The EPS production was performed in means of culture containing
25 medium minimal of Vogel's salts (MMVS), at 28 ° C (± 2 ° C), at 180 rpm, to perform the volume of
26 inoculum curves (1.0 to 4 mL, plus 0.5 mL in 0.5 mL per 25 mL of medium) and incubation time (02400 h at
27 12000 h, 16800 h, 24000 h and 36000 h). The EPS were quantified by the phenol-H₂SO₄, DNS and Bradford
28 methods for total sugars, reducers and total proteins, respectively. The determination of the purity and degree
29 of homogeneity of the molecules was high performance size exclusion chromatography equipped with
30 refractive differential index (HPSEC / RID) and the monosaccharide composition after total acid hydrolysis
31 (TFA) which was determined by high performance anion exchange chromatography with pulsed
32 amperometric detector (HPAEC / PAD). The EPS production for the reported conditions was: 366.5 ± 4.0
33 mg L⁻¹ for *N. parvum* in 2.5 mL of inoculum and 07200 h of culture, 302.0 ± 3.5 mg L⁻¹ for *Fusarium sp* in
34 2.0 mL and 09600 h and 421.4 ± 2.1 mg L⁻¹ for *C. gloeosporioides* in 1.0 mL and 07200 h. The
35 chromatograms obtained by HPSEC / RID showed a broad base for *N. parvum*, indicating a high degree of
36 polydispersity and suggesting the presence of a homogeneous population of molecules and two peaks, with
37 different retention times for *Fusarium sp* and *C. gloeosporioides*, demonstrating the need for purification of
38 the EPS solutions. The monosaccharides found in the highest proportion were: glucose (*N. parvum* and *C.*
39 *gloeosporioides*) and mannose (*Fusarium sp*). The purification by centrifugation allowed obtaining a
40 precipitate with the characteristics of a pure compound, formed exclusively by glucose (*C. gloeosporioides*),
41 that will later have the determined chemical structure and the tested biological activity.

42

43 **Keywords:** Endophytes, cultivation time, inoculum volume, *Colletotrichum gloeosporioides*, glucan.

Resumo

44

45 Os fungos endofíticos, por necessitarem de adaptações para sua sobrevivência no hospedeiro, apresentam
46 intenso metabolismo produzindo biomoléculas, como os exopolissacarídeos (EPS), com viabilidade de
47 aplicações em diversas áreas industriais. *In vitro*, o cultivo submerso dos fungos, permite a obtenção destes
48 biopolímeros com eficiência, em espaço compacto e com melhor controle das variáveis físicas (pH,
49 temperatura, aeração) e químicas (nutrientes). O objetivo deste estudo foi obter EPS dos fungos endofíticos
50 *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides* identificando a condição do cultivo
51 em relação ao volume de inóculo e tempo de incubação. A produção de EPS foi realizada em meio de cultura
52 contendo meio mínimo de sais de Vogel (MMSV), a 28 °C (± 2 °C), a 180 rpm, para a realização das curvas
53 de volume de inóculo (1,0 a 4 mL, acrescidos de 0,5 mL em 0,5 mL por 25 mL de meio) e tempo de
54 incubação (02400 h à 12000 h, 16800 h, 24000 h e 36000 h). Os EPS foram quantificados pelos métodos
55 fenol-H₂SO₄, DNS e Bradford para açúcares totais, redutores e proteínas totais, respectivamente. A
56 determinação da pureza e grau de homogeneidade das moléculas foi realizada por cromatografia de exclusão
57 estérica a alta pressão, equipado com índice de refração diferencial (HPSEC/RID) e a composição
58 monossacarídica, após hidrólise ácida total (TFA), foi determinada por cromatografia líquida de troca
59 aniônica com detector de amperometria pulsada (HPAEC/PAD). A produção de EPS para as condições
60 estudadas foram: $366,5 \pm 4,0$ mg L⁻¹ para *N. parvum* em 2,5 mL de inóculo e 07200 h de cultivo, $302,0 \pm 3,5$
61 mg L⁻¹ para *Fusarium* sp em 2,0 mL e 09600 h e $421,4 \pm 2,1$ mg L⁻¹ para *C. gloeosporioides* em 1,0 mL e
62 07200 h. Os cromatogramas obtidos pelo HPSEC/RID apresentaram base alargada para *N. parvum*,
63 sinalizando elevado grau de polidispersividade e sugerindo a presença de uma população de moléculas pouco
64 homogênea e dois picos, com tempos de retenção diferentes para *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*,
65 demonstrando a necessidade de purificação das soluções de EPS. Os monossacarídeos encontrados em maior
66 proporção foram: glucose (*N. parvum* e *C. gloeosporioides*) e manose (*Fusarium* sp). A purificação por
67 centrifugação permitiu a obtenção de um precipitado com características de um composto puro, formado
68 exclusivamente por glucose (*C. gloeosporioides*), que posteriormente terá a estrutura química determinada e
69 a atividade biológica ensaiada.

70 Palavras chaves: Endofíticos, tempo de cultivo, volume de inóculo, *Colletotrichum gloeosporioides*, glucana.

71

72 Introdução

73 Na natureza, os fungos endofíticos, a maioria pertencente ao filo *Ascomycota*, vivem nos tecidos das
74 plantas sem aparentemente causar nenhum dano ao hospedeiro e são considerados como uma fonte
75 importante de diferentes moléculas, pois tem capacidade de sintetizar e secretar metabólitos como enzimas,
76 antibióticos, pigmentos e polissacarídeos, entre outros (CHAPLA et al., 2013; SELIM et al., 2012). A síntese
77 e a secreção desses metabólitos podem ser entendidas como uma resposta fisiológica de adaptação do fungo
78 ao hospedeiro, especialmente devido aos mecanismos de defesa que estes últimos apresentam
79 (SURYANARAYANAN et al., 2009). Para o hospedeiro, a presença desses compostos é vantajosa, pois
80 aumenta sua resistência ao estresse e ao ataque de parasitas, insetos e outros micro-organismos. Os
81 endofíticos permanecem latentes por longos períodos em condições favoráveis de nutrientes, temperatura e
82 água, porém, podem tornar-se patogênicos, quando um ou mais desses fatores estão indisponíveis (YAN et
83 al., 2015).

84 Considerando que exopolissacarídeos, um dos metabólitos secretados pelos endofíticos, pode
85 apresentar atividade biológica interessante para a saúde humana e animal, despertando o interesse das
86 indústrias de alimento, cosmética e de medicamento, a produção dessas substâncias por cultivos *in vitro* tem
87 sido avaliada.

88 A produção em meio de cultivo *in vitro* de exopolissacarídeos fúngicos dependem de condições
89 como o tipo de cepa (micro-organismo), composição do meio e manutenção das condições físicas durante o
90 processo fermentativo. Fatores como fontes de carbono e nitrogênio (orgânico e inorgânico), sais minerais,
91 vitaminas, em conjunto com as condições físico-químicas de cultivo (pH, temperatura, aeração, velocidade
92 de agitação, tempo de incubação) e a quantidade de inóculo empregada, são estratégias úteis que interferem
93 diretamente no aumento da densidade celular e conseqüente síntese dos polissacarídeos secretados. Por isso,
94 aperfeiçoar o processo de obtenção de qualquer metabólito microbiano é essencial para que o rendimento do
95 mesmo seja favorável à sua aplicação (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

96 O cultivo em meio submerso é um dos procedimentos mais utilizados por oferecer rapidez na
97 obtenção dos metabólitos, em especial os exopolissacarídeos, devido ao maior desenvolvimento micelial, em
98 espaço pequeno e com menor risco de contaminação microbiana (LEE et al., 2004). A obtenção de
99 polissacarídeos por meios biotecnológicos é vantajosa em comparação aos procedimentos químicos, que são
100 complexos e dispendiosos, por necessitarem de precursores e catalisadores como as enzimas, além da
101 limitação em relação ao tamanho dos polímeros obtidos (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

102 Os EPS são macromoléculas formadas por monossacarídeos iguais (homopolímeros) ou diferentes
103 (heteropolímeros), unidos por ligações glicosídicas, gerando moléculas lineares ou ramificadas. D-
104 glucopiranosose é o monômero mais abundante fazendo parte tanto dos polissacarídeos de reserva energética
105 (glicogênio), quanto aqueles da parede celular (β - e α - glucanas), muitas vezes presentes no material
106 secretado pelo fungo (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Como podem apresentar grande variabilidade com
107 relação à configuração, posição e sequência das ligações glicosídicas, grau de ramificação, conformação e
108 composição monossacarídica, formam moléculas com características químicas e físicas distintas que, em
109 conjunto, são as responsáveis pelas várias aplicações dos EPS, como emulsificante, espessante e geleificante,
110 na indústria alimentícia; antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, antiviral e
111 imunomodulatório, na indústria de medicamentos ou cosméticos (produtos de cuidados com a pele, cremes e
112 loções protetivas) (CORRADI DA SILVA et al., 2006)

113 No presente estudo, cepas endofíticas de *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum*
114 *gloeosporioides* foram investigadas, pela primeira vez, como produtores de exopolissacarídeos, analisando-
115 se a influência de dois parâmetros de cultivo: volume de inóculo e tempo de incubação. Os EPS produzidos
116 por esses micro-organismos foram estudados quanto à composição química e homogeneidade, que são
117 parâmetros preliminares importantes para a caracterização química da molécula bem como para a sua
118 aplicação.

119

120 **Material e Métodos**

121

122 *Reagentes e meio de cultura*

123 Ágar batata dextrose (BDA) foi adquirido da HiMedia Laboratories (Mumbai, MH, Índia). Padrões
124 analíticos e reagentes utilizados são de grau analítico da Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, USA). O
125 meio mínimo de sais de Vogel (MMSV) foi preparado de acordo com Vogel (1956).

126 *Métodos*127 *Micro-organismos*

128 Os fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp, isolados de folhas de espinheira santa
129 (*Maytenus aquifolia*), e *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de dormideira (*Mimosa pudica*), foram
130 identificados morfológicamente e mantidos em tubos, contendo BDA, inclinados e refrigerados a 4°C (\pm
131 2°C), com repiques bimensais.

132

133 *Reativação dos fungos*

134 Os fungos foram transferidos assepticamente do meio de manutenção (BDA) para as placas de Petri
135 contendo MMSV (VOGEL, 1956) acrescido de glucose (10 g L⁻¹) e ágar (20 g L⁻¹).

136

137 *Cultivos submersos*

138 As condições dos cultivos submersos para a produção de EPS foram previamente descritas por
139 Steluti et al. (2004) e Vasconcelos et al. (2008). Os pré-inóculos foram preparados em frascos de Erlenmeyer
140 (125 mL) contendo 25 mL MMSV e glucose (10 g L⁻¹), para onde foram transferidas, da superfície das
141 placas, pequenas porções de hifas retiradas de forma aleatória. Os cultivos foram incubados a 28 °C (\pm 2 °C)
142 a 180 rpm durante 04800 h. A seguir, os micélios fúngicos foram transferidos assepticamente para um
143 homogeneizador estéril (Blender) e triturados por 0,5 min em velocidade máxima. Após, o material foi
144 centrifugado a 4800 x g durante 30 min com descarte do sobrenadante. A biomassa foi ressuspensa (10 mL)
145 e diluída com salina fisiológica estéril até a obtenção de valor de absorbância entre 0,2 a 0,4 em 400 nm, de
146 acordo com curva turbidimétrica previamente estabelecida para calcular a concentração de células necessária
147 para a produção de exopolissacarídeos. Os inóculos foram preparados, segundo Steluti et al., (2004) em
148 frascos Erlenmeyer de 500 mL, em triplicata, contendo 100 mL de MMSV, acrescido de glucose (50 g L⁻¹) e
149 extrato de levedura (2 g L⁻¹). Cada frasco foi inoculado com 1 mL da suspensão de células e incubados a 28
150 °C (\pm 2 °C) a 180 rpm durante 07200 h. Os cultivos foram testados separadamente para cada micro-
151 organismo.

152

153 *Influência do volume de inóculo na produção do EPS*

154 Foram ensaiados separadamente e para cada micro-organismo os volumes de inóculo de 1,0 a 4,0
155 mL, aumentando de 0,5 em 0,5 mL, da suspensão de células para cada 25 mL de meio de cultivo. Os frascos
156 (em triplicata) foram inoculados com os diferentes volumes de células, incubados por 07200 h, a 28 \pm 2 °C e
157 em agitação constante de 180 rpm.

158

159 *Influência do tempo de incubação do inóculo na produção do EPS*

160 Foram testados separadamente, para cada micro-organismo, os tempos de cultivo de 02400 h em
161 02400 h até 12000 h e os tempos de 16800 h, 24000 h e 36000 h. Os frascos (em triplicata) foram inoculados
162 com volumes de células determinados para cada fungo, incubados nos diferentes tempos, a 28 °C \pm 2 °C e
163 em agitação constante de 180 rpm.

164 *Interrupção dos cultivos e recuperação dos EPS*

165 Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (4800 x g durante 30 min) a 4 °C, separando-se a
166 biomassa do sobrenadante, que foi posteriormente filtrado à vácuo (membrana filtrante de 0,45 µm). O
167 sobrenadante foi dialisado contra a água destilada, em sistema fechado, durante 02400 h a 4 °C. A fração não
168 dialisável foi tratada com 3 volumes de etanol absoluto gelado, para a precipitação dos EPS e mantida
169 *overnight* a 4 °C. Os precipitados foram centrifugados (4800 x g durante 20 min) a 4 °C e ressuspensos em
170 água destilada, com agitação constante, até solubilização. Alíquotas de cada material foram separadas para as
171 quantificações de açúcares total, redutor e proteína e o restante foi congelado, liofilizado e armazenado.

172

173 *Quantificação dos EPS*

174 As quantificações foram realizadas em triplicata para o cálculo da média e desvio padrão de cada
175 determinação analítica. A concentração de açúcares totais foi determinada pelo método do fenol-ácido
176 sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e os açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando a
177 D-glucose como padrão, para a construção das curvas de calibração. As proteínas totais foram quantificadas
178 pelo método de Bradford (1976), utilizando a soro albumina bovina (BSA) como padrão.

179

180 *Determinação da homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC) acoplada*
181 *a detector de índice de refração (RID)*

182 Para determinação da homogeneidade as amostras foram solubilizadas em água destilada (1 mg/mL)
183 e filtradas em membranas Millipore® (acetato de celulose) com 0,22 µm de porosidade. Alíquotas de 200 µL
184 foram injetadas no HPSEC acoplada ao detector de índice de refração (RID), modelo 10 A e detector de UV-
185 Vis (Shimadzu Company, Kyoto, KYT, Japan). O sistema de cromatografia líquida consiste de uma bomba
186 de HPLC, modelo 10AD, com válvula de injeção manual (Shimadzu) equipado com um *loop* 200 µL e 4
187 colunas de gel permeação, Ultrahydrogel (7,8 X 300 mm) (WATERS), com limites de exclusão de 1×10^6 ,
188 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da, dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (0,1 M) contendo azida sódica
189 (0,03 %) foi utilizada como fase móvel, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de 37 °C. A aquisição de
190 dados foi realizada utilizando o programa LC Solution (Shimadzu Corporation) (CORRADI DA SILVA et
191 al., 2013).

192

193 *Hidrólise ácida total e determinação da composição monossacarídica dos EPS*

194 A hidrólise de cada amostra liofilizada (0,05 mg de EPS) foi realizada com a adição de 300 µL de
195 solução de ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol L⁻¹, em tubos próprios para hidrólise, que posteriormente
196 foram selados e aquecidos a 100 °C, por 00300 h. Após este período o TFA foi removido por evaporação.

197 A análise da composição monossacarídica foi realizada por cromatografia de troca aniônica
198 (HPAEC) equipada com detector de amperometria pulsada (PAD), Dionex DX 500 (Dionex Company,
199 Sunnyvale, CA, USA) com os cromatogramas registrados em integrador modelo 4600. Os açúcares neutros
200 foram separados isocriticamente, utilizando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm) equipado

201 com guarda coluna PA1, ao fluxo de 1 mL min⁻¹. As condições de eluição foram produzidas utilizando água
202 deionizada (eluyente 1) e 8 % de NaOH 200 mmol L⁻¹ (eluyente 2). Após o término da corrida a coluna foi
203 regenerada com 100 % do eluyente 2 por 10 min e, antes da injeção de nova amostra, a coluna foi submetida,
204 durante 15 min, às condições iniciais de análise (8% do NaOH 200 mmol L⁻¹). Para detecção e quantificação
205 dos monossacarídeos, alíquotas de 25 µL de uma mistura contendo aproximadamente 200 ng de cada açúcar
206 padrão (fucose, arabinose, ramnose, galactose, glucose e manose) foram injetadas no HPAEC/PAD. A
207 quantificação monossacarídica foi realizada comparando as medidas das áreas dos picos dos padrões de
208 monossacarídeos neutros com aqueles obtidos das amostras (VASCONCELOS et al., 2008).

209

210 *Método físico de separação dos componentes presentes no EPS*

211 Os exopolissacarídeos liofilizados, obtidos dos três fungos estudados, foram solubilizados em água
212 deionizada com agitação contínua (agitador magnético), sem aquecimento. Os EPS quando solubilizados em
213 água, formavam uma solução viscosa e turva que, após centrifugação (3000 x g durante 10 minutos), gerava
214 uma fração límpida, denominada sobrenadante, e um material sedimentado denominado precipitado.

215

216 *Análise estatística*

217 A produção de EPS pelos fungos estudados não apresentaram diferenças significativas para os dois
218 parâmetros (volume de inóculo e tempo de incubação), através do Teste de Tukey- ANOVA, ao nível de 5%
219 (p<0,05) usando o programa estatístico SISVAR.

220

221 **Resultados e Discussão**

222 A Figura 1 esquematiza a sequência dos experimentos efetuados para a obtenção dos EPS dos três
223 fungos estudados.

224

225 *Cultivos em meio sólido e líquido para obtenção de exopolissacarídeos*

226 Nos cultivos em meio sólido, as colônias fúngicas apresentaram aspectos diferentes devido às
227 características morfológicas e fisiológicas individuais (Figura 2 -A-1; B-1; C-1). Após observações visuais
228 das culturas (hifas jovens), os períodos de incubação estabelecidos foram de 4 dias para o *N. parvum* e 5 dias
229 para o *Fusarium* sp e o *C. gloeosporioides*.

230 Os cultivos de pré-inóculos apresentaram hifas de tom amarelo claro e com os aspectos filamentosos
231 para o *N. parvum* e de *pellets* para *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* (Figura 2- A-2; B-2; C-2). Os cultivos
232 submersos dos inóculos, após os períodos de incubação para as curvas estudadas, apresentaram-se
233 pigmentados conforme aumentava o volume de inóculo e o tempo de cultivo. A Figura 2 (A-3; B-3; C-3)
234 mostra aspecto dos inóculos sem a presença de pigmentos, sendo então identificadas como as condições para
235 os cultivos.

236

237

238

239 *Determinação da influência do volume de inóculo na produção de exopolissacarídeos*

240 Nos cultivos submersos, para qualquer volume de inóculo estudado (Figura 3: A-1, B-1 e C-1) bem
241 como para os diferentes tempos de cultivo (Figura 3: A-2, B-2 e C-2), os três fungos foram produtores de
242 EPS. A confirmação da produção de EPS se fez pela diferença entre açúcares totais e redutores, sendo este
243 último encontrado sempre em valores pequenos, principalmente porque procedimentos de diálise eram
244 efetuados antes das quantificações. A formação de precipitado quando o caldo de fermentação era tratado
245 com etanol absoluto gelado (Figura 2: A-4, B-4, C-4) indicava também a presença de polímeros que, uma
246 vez excluída a contaminação por proteínas, quantificadas pelo método de Bradford, pode-se afirmar que a
247 maior parte do material secretado pelos micro-organismos, nas condições estudadas neste trabalho, era
248 polissacarídeo (Figura 2: A-5, B-5, C-5).

249 De acordo com Barbosa et al. (2004) a produção de EPS, durante a fermentação submersa, se deve a
250 um conjunto de fatores químicos e físicos que favorece o crescimento do micro-organismo bem como a
251 síntese, rendimento e composição da macromolécula. O crescimento de cada micro-organismo apresenta-se
252 de maneira distinta, em resposta ao efeito das mudanças ambientais e à fonte de carbono utilizada, que pode
253 ter parte convertida, pela célula microbiana, em polissacarídeos. Razack et al. (2013) pontuam que apesar da
254 análise individual de fatores fermentativos ser considerada difícil e trabalhosa, ela auxilia na seleção de
255 parâmetros mais significativos para produção de biopolímeros. Um desses parâmetros é o volume de inóculo,
256 determinante para a produção de polissacarídeos microbianos. Esses metabólitos são produzidos na fase
257 estacionária e com excesso da fonte de carbono, no meio de cultivo. Quando o volume de inóculo é muito
258 pequeno, pode comprometer o rendimento do processo fermentativo, pois as células microbianas requerem
259 maior tempo para atingirem sua biomassa máxima e, conseqüentemente, a fase estacionária que é a
260 responsável pela produção do EPS. Um volume muito grande de inóculo (maior concentração de células)
261 poderia comprometer a síntese da molécula de interesse, pois o substrato seria utilizado, principalmente, para
262 suprir as necessidades do crescimento celular (formação das estruturas celulares, produção de enzimas
263 biossintéticas, entre outras) desfavorecendo a produção de EPS (PAPAGIANINI, 2004).

264 Portanto, considerando essa necessidade, foi estudado qual volume de inóculo para 25 mL de meio
265 de cultivo seria ideal para maior produção de EPS, para cada micro-organismo. A produção máxima de EPS
266 (375 mg L^{-1}) pelo *N. parvum* foi com o volume de inóculo de 2,5 mL (Figuras 3-A-1 e 5-A) e para o
267 *Fusarium* sp ($209,4 \text{ mg L}^{-1}$) com 2,0 mL de inóculo (Figuras 3-B-1 e 5-A). A partir destes volumes de
268 inóculo a produção de EPS, pelos dois micro-organismos, diminui sensivelmente, sugerindo que uma maior
269 quantidade de células, presentes nos volumes maiores de inóculo, aumenta a competição pelos nutrientes do
270 meio, restando pouco da fonte de carbono para a síntese e secreção dos polissacarídeos. Tais resultados
271 demonstraram que determinar o volume de inóculo ideal foi importante para acompanhar a produção de EPS
272 pelos fungos *N. parvum* e *Fusarium* sp.

273 O fungo *C. gloeosporioides* comportou-se como o melhor produtor de EPS ($512,8 \text{ mg L}^{-1}$) com 3,0
274 mL de células (Figuras 3 C-1 e 5-A). Entretanto, a produção de pigmentos, a partir de 1,5 mL de inóculo
275 (Figura 4), impediu que a quantidade ideal de células para maior produção de EPS pudesse ser adotada.
276 Tentativas de utilização de membranas filtrantes e de procedimentos de diálise não foram capazes de

277 remover os pigmentos. A Figura 3 C-1 mostra que a síntese do EPS pelo *C. gloeosporioides* não sofreu
278 variações significativas nos diferentes volumes de inóculo e o fungo foi considerado o melhor produtor de
279 EPS. Lee et al. (2004) descreveram que, em fermentação submersa, o inóculo é fator limitante para a
280 produção e secreção de polissacarídeo por fungos filamentosos e no estudo com *Grifola frondosa*
281 determinaram que a concentração de inóculo de 3% foi considerada ideal para a maior produção de EPS, na
282 faixa de 2% a 6% estudada.

283 Phillips et al. (2013) descreveram que pigmentos escuros, de marrom ao preto, presentes nas colônias
284 de *N. parvum* podem surgir nos conídios, desde o período germinativo, e representam uma forma de
285 diferenciação deste fungo. Dados na literatura (MEDENTSEV et al., 2005; WIEMANN et al., 2009),
286 relacionados aos estudos da produção de pigmentos em cultivos submerso de fungos, mostram que a
287 biossíntese desses metabólitos secundários começa a ocorrer no final da fase de crescimento e início da
288 idiofase (fase estacionária), como um mecanismo de defesa do micro-organismo contra limitação das fontes
289 de carbono e nitrogênio e nas mudanças de pH, que podem acontecer nessa etapa do desenvolvimento
290 celular. A Figura 4 mostra os aspectos das biomassas dos cultivos submersos dos fungos estudados neste
291 trabalho, com a produção de pigmentos.

292

293 *Determinação da influência do tempo de cultivo na produção de exopolissacarídeos*

294 A produção máxima de EPS ($366,5 \pm 4,0 \text{ mg L}^{-1}$) pelo *N. parvum* ocorreu em 07200 h (Figuras 3-A-
295 2 e 5-B), a partir do qual houve um decréscimo progressivo até 12000 h, se estabilizando até 36000 h. A
296 partir do cultivo de 09600 h ocorreu a formação de um pigmento escuro e a diminuição da secreção do EPS,
297 que poderia sinalizar um desvio da via metabólica de síntese do EPS para a biossíntese do pigmento.

298 Osinska-Jarozuk et al. (2015), relataram que fungos ascomicetos e basidiomicetos requerem um
299 tempo relativamente longo e variável de incubação para a síntese e secreção de polissacarídeos. Segundo os
300 mesmos autores o tempo pode variar de 3 até 40 dias de cultivo, como observaram para a produção de EPS
301 pelo *Auricularia auricula* (7.5 g L^{-1} , 4 dias) e *Fusarium oxysporum* ($0,6 \text{ g L}^{-1}$ em 40 dias).

302 Neste trabalho, dois dos três micro-organismos apresentaram um comportamento semelhante ao
303 relatado por Osinska-Jarozuk et al. (2015). O fungo *Fusarium* sp (Figura 3 B-2), apesar da produção
304 crescente de EPS até 36000 h, proporcional ao aumento do tempo de cultivo, também apresentou um
305 pigmento de coloração avermelhada a partir de 12000 h, que se acentuava com o aumento do tempo. A
306 separação por centrifugação do caldo de fermentação e da biomassa mostrou que ambos os componentes
307 estavam pigmentados. A diálise exaustiva do caldo fermentado, seguida da precipitação dos polissacarídeos
308 em etanol, não foi eficiente para a obtenção de um material despigmentado. Desta forma, o tempo de 09600
309 h foi adotado como melhor para obtenção de um caldo de fermentação límpido e produzindo $302 \pm 3,5 \text{ mg L}^{-1}$
310 de EPS (Figura 5-B).

311 O fungo *C. gloeosporioides*, com produção crescente de EPS até o maior tempo de cultivo, foi, nas
312 condições estudadas, o melhor produtor de EPS a partir de 07200 h, alcançando um máximo de $1.640,8 \text{ mg}$
313 L^{-1} no tempo de 36000 h (Figuras 3 C-2 e 5-B). Entretanto, a partir de 09600 h, tanto o caldo de fermentação
314 quanto a biomassa tomaram uma coloração acinzentada que se intensificavam com o tempo, até se tornarem

315 pretas. Centrifugação, filtração e diálise não foram eficientes para remoção do pigmento. O tempo de 07200
316 h, anterior ao aparecimento do pigmento, foi considerado ideal para a produção do EPS ($421,4 \pm 2,1 \text{ mg L}^{-1}$)
317 pelo *C. gloeosporioides*.

318 Xiao et al. (2004) sugerem que quanto maior for o tempo de cultivo, mais polissacarídeo será
319 secretado, durante o processo fermentativo e Wu et al. (2012) afirmam que o tempo de cultivo é um dos
320 fatores que possibilita maior produção de EPS pelos micro-organismos.

321 De acordo com a literatura os tempos ideais de cultivo para a produção de EPS são geralmente
322 superiores a 4 dias. Lima et al. (2008) relataram que o maior rendimento de EPS secretado por *Agaricus*
323 *brasiliensis* foi com adição de proteína hidrolisada de soja e 9 dias de incubação ($1.430,7 \text{ mg L}^{-1}$) e 6 dias,
324 sem adição da proteína ($993,5 \text{ mg L}^{-1}$). Lin e Sung (2006) descreveram que foram necessários 14 dias de
325 cultivo para a maior produção de EPS pelo *Antrodia cinnamomea*.

326 O pH inicial do meio de cultivo foi de 5,6 e sofreu alterações durante a realização da curva de tempo.
327 A aferição do pH final, no caldo fermentado, mostrou que a melhor produção de EPS para o *N. parvum*
328 ocorreu em pH 6,0 e para o *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* em pH 5,0. A partir de pH 7,0, para qualquer
329 um dos três fungos estudados, a secreção de pigmentos se intensificava na cor, com o aumento do tempo de
330 cultivo, embora em alguns casos o pH se manteve 7,0. De acordo com Kim et al. (2006), o pH é um
331 parâmetro que influencia o crescimento micelial, a produção de metabólitos, a morfologia celular e a
332 reologia do caldo fermentativo. Em geral o crescimento celular é favorecido em menores valores de pH, no
333 entanto, em estudo realizado com ascomicetos e basidiomicetos, para a produção de EPS, os pH dos meios
334 de cultivo oscilaram entre 4 a 7 (OSINSKA-JAROSZUK et al., 2015). Em experimentos realizados com *G.*
335 *lucidium*, os pesquisadores observaram que na faixa de pH inicial entre 3 a 7, a maior produção de EPS
336 ocorreu em pH 5 (KIM et al., 2006).

337

338 *Composição monossacarídica e análise da homogeneidade dos exopolissacarídeos*

339 Essas análises foram efetuadas com os EPS obtidos a partir da melhor concentração de inóculo e do
340 tempo de cultivo considerado ideal, sem a presença de pigmento. Os resultados da hidrólise ácida e
341 subsequente identificação e quantificação por HPAEC/PAD mostraram que a glucose era o componente
342 majoritário no *N. parvum* (78%) e no *C. gloeosporioides* (81%); o EPS produzido pelo *Fusarium* sp era
343 constituído principalmente de manose (68%), um açúcar bastante comum em carboidratos complexos, como
344 glicoproteínas, presentes na parede celular de fungos e, às vezes, no material secretado. Apesar de cada um
345 dos fungos apresentar um componente monossacarídico majoritário no EPS, os açúcares galactose, glucose e
346 manose estavam presentes em todos. Essa composição heterogênea de monômeros sinaliza que o material
347 secretado e identificado como sendo somente polissacarídeo, pode ser constituído por mais de um polímero
348 sugerindo a necessidade de averiguação. Os EPS fúngicos podem ter composição diversificada incluindo
349 monossacarídeos combinados com compostos de diferentes naturezas ou estruturas químicas como proteínas,
350 fosfatos, sulfatos ou aminas. Os monossacarídeos mais encontrados em polissacarídeos secretados são
351 glucose, manose, galactose, xilose, fucose e ramnose. A glucose é o principal monômero dos EPS
352 produzidos pelos fungos *Acremonium diospyri* Crandall; *Aspergillus niger*; *Botryosphaeria rhodina*

353 RCYU30101; *Cyttaria harioti*; *Drechleras picifera*; *Elsino eleucospila*; *Epicoccumnigrum* Ehrenb. ex
354 Schlecht; *Lachnum* sp. YM261; *Nigrospora oryzae* var. *glucanicum*; *Pestaloti asp.* 815; *Phanerochaete*
355 *chrysosporium* (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

356 A pureza e homogeneidade dos polissacarídeos são, geralmente, verificadas pelas análises da
357 cromatografia de exclusão estérica a alta pressão, acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID).
358 O número de picos e o grau de polidispersividade (Mw/Mn) informam a pureza e homogeneidade do
359 material. Para os 3 fungos estudados, os resultados dessa análise mostram que a base alargada no
360 cromatograma do EPS produzido pelo *N. parvum* (Figura 6-A), sinaliza elevado grau de polidispersividade
361 (Mw/Mn ~ 2,0), sugerindo heterogeneidade e/ou a presença de mais de um componente. O perfil dos
362 cromatogramas dos EPS produzidos pelos *Fusarium* sp (Figura 6-B) e *C. gloeosporioides* (Figura 6-C)
363 mostra dois picos, com R_T diferentes, sugerindo moléculas distintas, pelo menos com relação à massa
364 molecular e apontando para a necessidade de procedimentos de purificação

365

366 *Purificação dos exopolissacarídeos*

367 Os EPS produzidos pelo *N. parvum* (150 mg), *Fusarium* sp (140 mg) e *C. gloeosporioides* (300 mg)
368 quando solubilizados em água, formavam uma solução viscosa e turva que, centrifugada, produzia uma
369 fração solúvel, sobrenadante, e um material sedimentado, denominado precipitado. Os precipitados
370 liofilizados pesaram 11,0 mg, 20,8 mg e 114,5 mg para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*,
371 respectivamente. Alíquotas dessas frações, solubilizadas em água, com aquecimento controlado (45 °C)
372 foram utilizadas para a determinação do conteúdo de proteínas totais, cujos resultados indicaram os
373 percentuais de 56%, 88% e 1% para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Só foi
374 possível efetuar a hidrólise ácida no sedimento proveniente do *C. gloeosporioides*, cujo resultado foi 100%
375 glucose (Tabela 1).

376 Os sobrenadantes do *N. parvum* e do *C. gloeosporioides*, são constituídos principalmente de glucose,
377 e o sobrenadante do *Fusarium* sp de 95% de manose, provavelmente formando uma manana, constituinte da
378 parede celular de fungos, geralmente “entrelaçados” com proteínas (Tabela 1). É sabido que os
379 polissacarídeos secretados podem ser quimicamente semelhantes àqueles da parede celular, os quais, neste
380 caso, estão geralmente ligados a proteínas e lipídeos e cuja composição e estrutura química variam entre as
381 diferentes espécies de fungos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Um exopolissacarídeo produzido pelo
382 *Fusarium solani* SD5, composto por galactose e ramnose na proporção de 2:1, foi purificado por filtração em
383 gel e apresentou massa molecular de $1,87 \times 10^5$ Da (MAHAPATRA; BANERJEE, 2012). O *Fusarium* sp
384 estudado nesse trabalho tem a manose como principal constituinte da fração solúvel e apresentou massa
385 molecular aparente de aproximadamente 43 kDa (dados não mostrados). As quatro frações polissacarídicas
386 separadas por centrifugação foram denominadas *C. gloeosporioides*_{prec}, *C. gloeosporioides*_{sobr}, *Fusarium* sp_{sobr}
387 e *N. parvum*_{sobr}.

388 Entre as quatro frações analisadas apenas o sobrenadante do *C. gloeosporioides* mostrou 2 picos
389 (Figura 7-B), indicando a necessidade de novos procedimentos de purificação. As demais frações
390 apresentaram um único pico com base alargada que pode estar relacionada com a polidispersividade dos

391 polissacarídeos. Essa hipótese foi confirmada pelos valores do Mw/Mn (grau de polidispersividade), que
392 foram próximos de 1,5.

393 Das quatro frações apresentadas na Tabela 1 é possível concluir que apenas os polissacarídeos
394 presentes nos sobrenadante do *Fusarium* sp e no precipitado do *C. gloeosporioides* reúnem condições para
395 serem quimicamente analisados, uma vez que pelo HPSEC/RID comportam-se como um material puro, mas
396 ainda com caráter de polidispersividade, e após hidrólise apresentam composição monossacarídica quase
397 homogênea.

398 É importante observar que dados da literatura descrevem EPS, de uma maneira geral, como sendo
399 uma fração pura secretada pelo micro-organismo. Entretanto, de nossa experiência, EPS é uma fração
400 composta por diferentes polissacarídeos, que devem ser purificados, antes de qualquer análise adicional, seja
401 ela química ou biológica.

402

403 **Conclusões**

404 Os três fungos endofíticos estudados (*N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*) produziram
405 exopolissacarídeos em meio de cultivo *in vitro*, nas condições estudadas. As concentrações de inóculo e
406 tempo de cultivo ideais para obtenção de EPS, em 25 mL de meio foram, 2,5 mL em 72 horas, 2,0 mL em 96
407 horas e 1,0 mL em 72 horas, respectivamente para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*. O *C.*
408 *gloeosporioides* foi o fungo que produziu maior quantidade de EPS cujo teor de açúcar total foi de 99 %. A
409 glucose foi o monossacarídeo mais abundante para os EPS de *N. parvum* e *C. gloeosporioides* e a manose
410 para o *Fusarium* sp. Procedimentos de purificação, como centrifugação, foram necessários para confirmar
411 que os EPS secretados pelos micro-organismos são uma mistura de polissacarídeos, que necessitam ter a
412 homogeneidade estabelecida antes da caracterização química e aplicação biológica.

413

414 **Referências Bibliográficas**

415

416 BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T. DA; PIGATTO, M. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Produção e
417 Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42,
418 2004. Bradford (1976)

419

420 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein
421 utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

422

423 CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorável e
424 sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, 2013 Disponível
425 em <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/275/280>

426

427 CORRADI DA SILVA, M. L.; EXPOSTI, D. T. D.; VASCONCELOS, A. F. D.; ALEXANDRE, S. M. A.;
428 SILVEIRA, J. L. M.; DUCATTI, D. R. B. Glucogalactan: A polysaccharide isolated from the cell-wall of
429 *Verticillium Lecanii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1353– 1359, 2013.

430

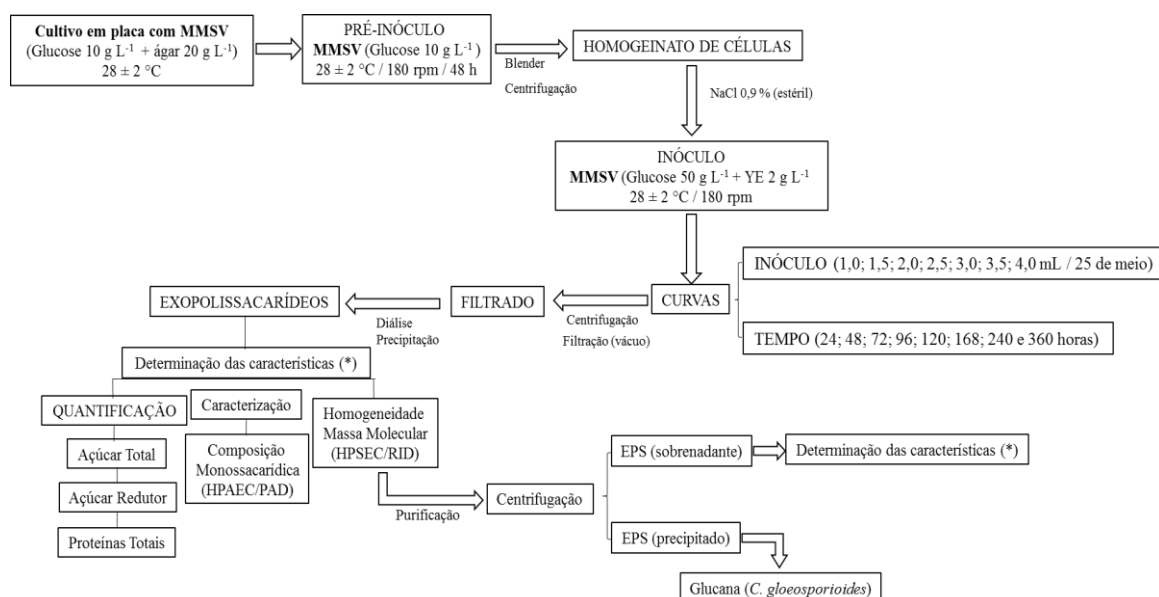
431 CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.;
432 CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química**
433 **Nova**, v.29, p. 85-92, 2006.

434

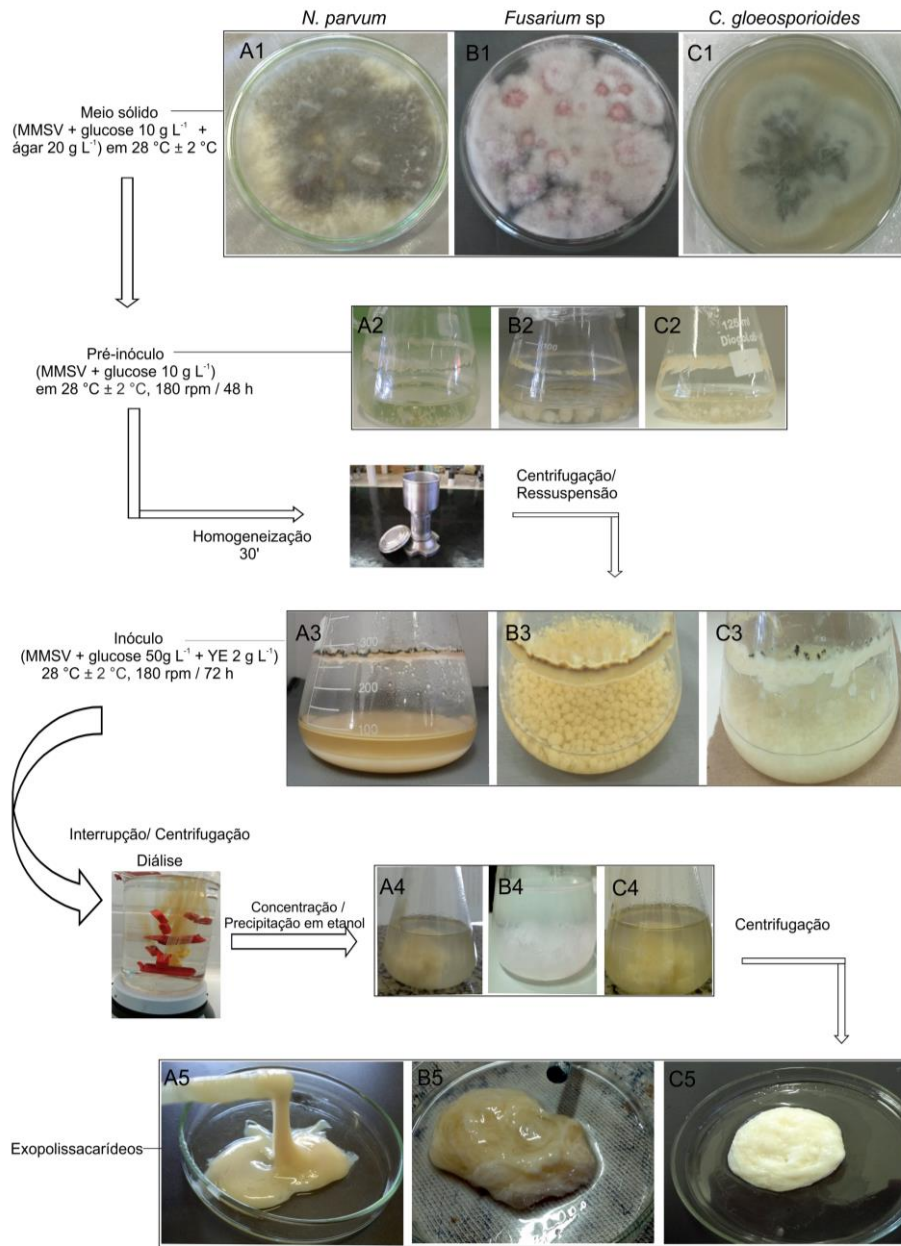
- 435 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for
436 determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
437
- 438 KIM, H. M.; PARK, M. K.; YUN, J. W. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged
439 mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, p. 249-262,
440 2006.
441
- 442 LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S.W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W Submerged
443 culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible
444 Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p.369–376, 2004.
445
- 446 LIMA, L. F. O.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J. L.; NOSEDA, M. D.;
447 GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and
448 characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation.
449 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p.283–294, 2008.
450
- 451 LIN, E.S.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible
452 Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **International Journal of Food Microbiology**,
453 v. 108, p. 182–187, 2006.
454
- 455 MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide
456 from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers** v.90, n. 1, p. 683–689, 2012.
457
- 458 MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications.
459 **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.
460
- 461 MEDENTSEV, A. G., ARINBASAROVA, A. I., AKIMENKO, V. K. Biosynthesis of naphthoquinone
462 pigments by fungi of the genus *Fusarium*. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**. v.41, n. 5, p. 573–
463 577, 2005.
464
- 465 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical**
466 **Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
467
- 468 OSINSKA-JAROSZUK, M.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; JAROSZUK-SCISEŁ, J.; SZALAPATA, K.;
469 NOWAK, A.; JASZEK, M.; OZIMEK, E.; MAJEWSKA, M. Extracellular polysaccharides from
470 *Ascomycota* and *Basidiomycota*: production conditions, biochemical characteristics, and biological
471 properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.1823–1844, 2015.
472
- 473 PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.
474 **Biotechnology Advances**, v.22, p. 189 – 259, 2004.
475
- 476 PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.;
477 GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture.
478 **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, 2013.
479
- 480 RAZACK, S. A.; VELAYUTHAM, V. THANGAVELU, V. Influence of various parameters on
481 Exopolysaccharide production from *Bacillus subtilis*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5,
482 n.5, p. 2221-2228, 2013.
483
- 484 SELIM, K. A.; EL-BEIH, A. A.; ABDEL-RAHMAN, T. M.; EL-DIWANY, A. I. Biology of Endophytic
485 Fungi. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 2, n.1, p. 31–82, 2012.
486
- 487 STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.;
488 CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of
489 *Botryosphaeran* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different

- 490 carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n.
 491 6, p. 480–486, 2004.
- 492
- 493 SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.;
 494 JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9 –
 495 19, 2009.
- 496
- 497 SYNITSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p.
 498 792– 809, 2013.
- 499
- 500 VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO,
 501 E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L. Three
 502 exopolysaccharides of the β -(1→6)-D-glucan type and a β -(1→3;1→6)- D-glucan produced by strains of
 503 *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p.2481–2485,
 504 2008.
- 505
- 506 VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.
 507
- 508 WIEMANN, P.; WILLMANN, A.; STRAETEN, M.; KLEIGREWE, K.; BEYER, M.; HUMPF, H. U.;
 509 TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and
 510 regulation. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 931– 946, 2009.
- 511
- 512 WU, S.; CHEN, J.; PAN, S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new
 513 strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. **Carbohydrate Polymers**,
 514 v. 87, p. 1696– 1700, 2012.
- 515
- 516 XIAO, J. H.; CHEN, D. X.; LIU, J. W.; LIU, Z. L.; WAN, W. H.; FANG, N.; XIAO, Y.; QI, Y.; LIANG,
 517 Z.Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and
 518 exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p.
 519 1105–1116, 2004.
- 520
- 521 YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their
 522 hosts systemically? **Fungal Ecology**, v. 13, p. 53-59, 2015.
- 523
- 524

525 **Figura 1.** Fluxograma dos experimentos efetuados para a obtenção dos EPS relacionando volume de inóculo e tempo
 526 de cultivo para os fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.
 527



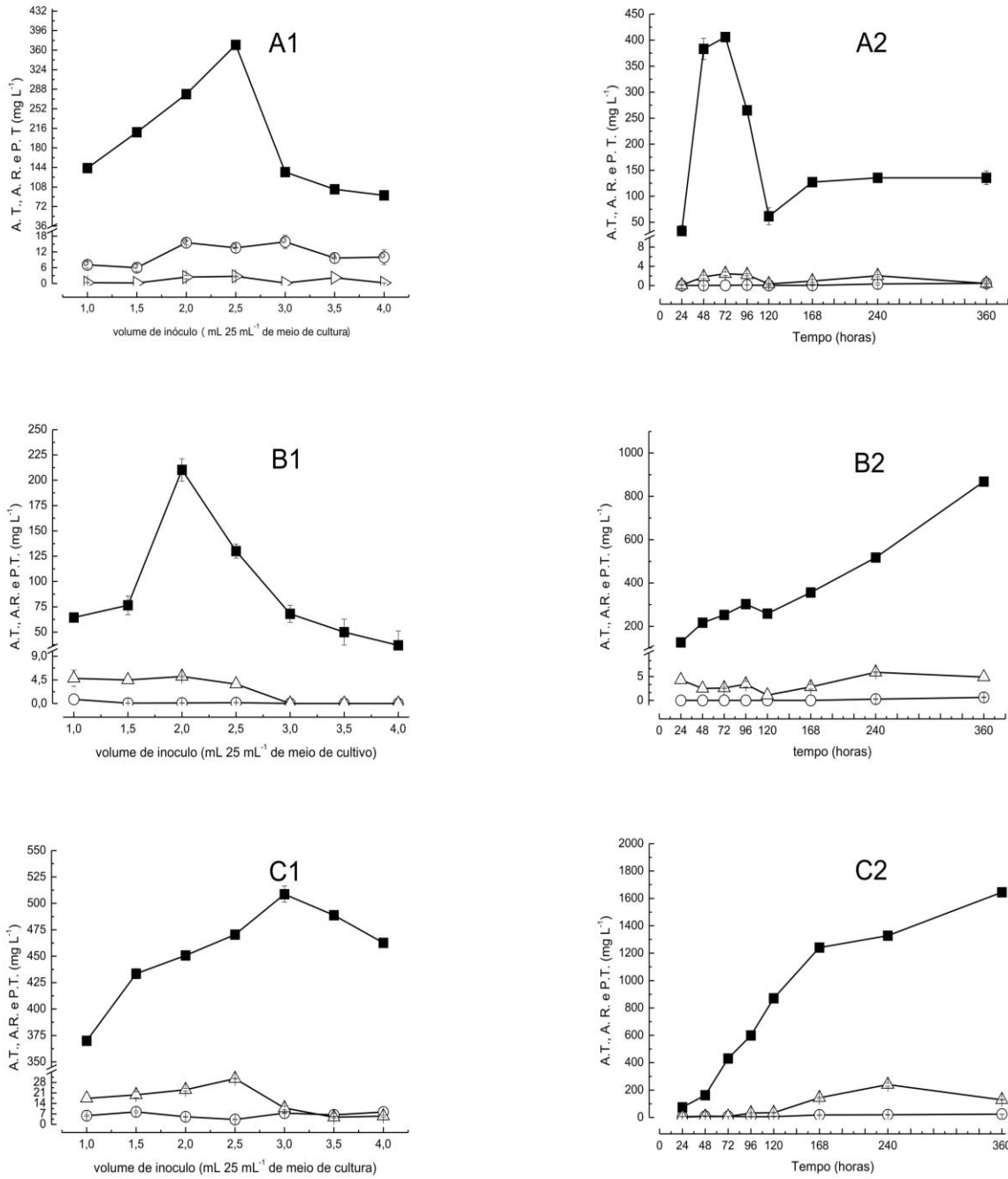
529 **Figura 2.** Aspectos dos cultivos em meios sólido e submerso e exopolissacarídeos dos fungo *N. parvum* (A), *Fusarium*
 530 sp (B) e *C. gloeosporioides* (C).
 531



532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547

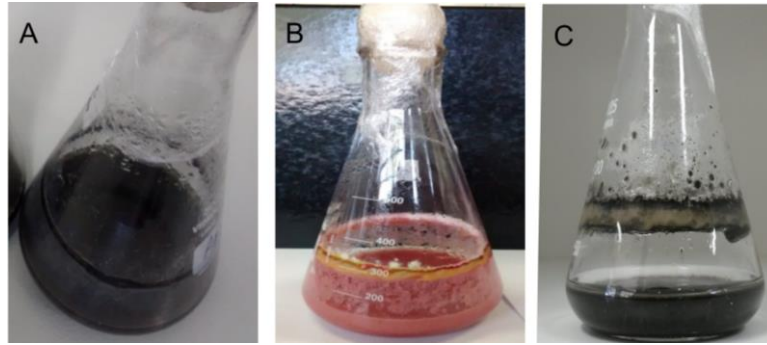
548
549
550
551

Figura 3. Quantificação de açúcares totais (A. T.) (■), redutores (A. R.) (○) e proteínas (P. T.) (△) nos diferentes volumes de inóculo (1) e tempo de cultivo (2) para os fungos. A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp e C: *C. gloeosporioides*.

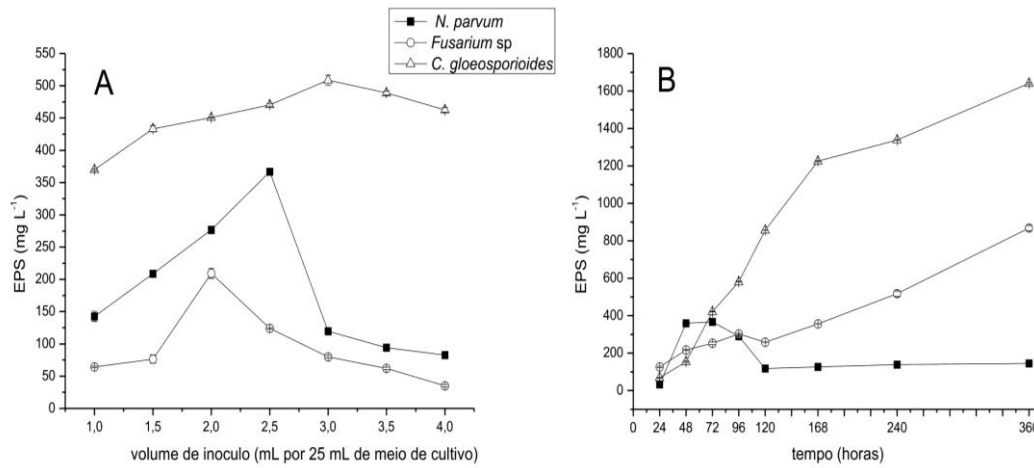


552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562

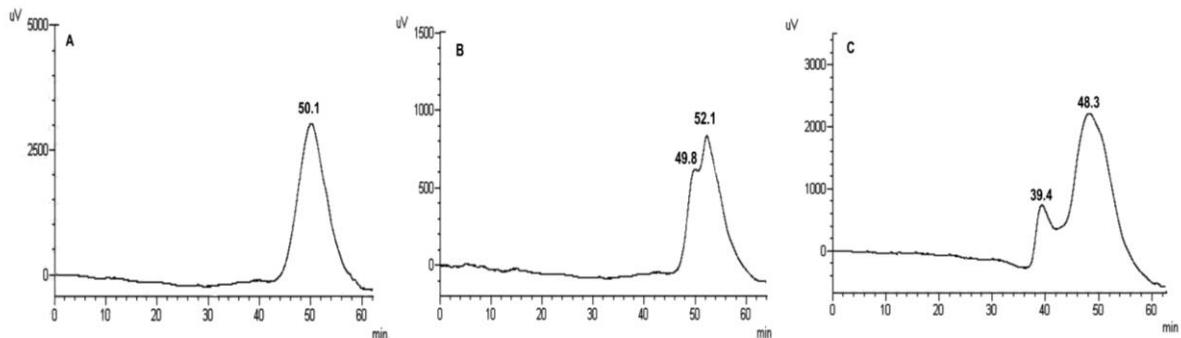
563 **Figura 4.** Presença de pigmentos nos cultivos submersos, realizados durante as curva de volume de inóculo e tempo de
 564 cultivo, dos fungos A- *N. parvum*, B- *Fusarium* sp e C- *C. gloeosporioides*.
 565



566
 567
 568 **Figura 5.** Perfil da produção de EPS pelos fungos *N parvum* (■), *Fusarium* sp (□) e *C. gloeosporioides*
 569 (△) nos estudos de volumes de inóculo (A) e tempos de cultivo (B).
 570

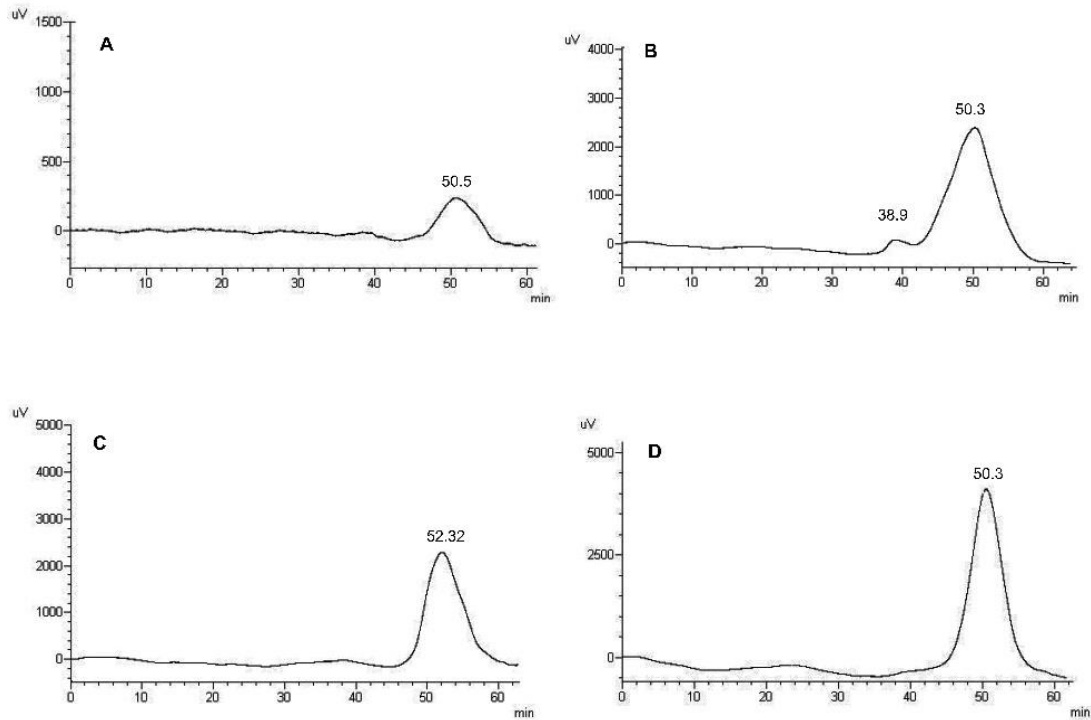


571
 572
 573 **Figura 6.** Perfil de eluição dos EPS secretados pelos fungos A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp, C: *C. gloeosporioides* por
 574 HPSEC/RID. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da.
 575 Material aplicado: 200 μ g em 200 μ L; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: NaNO₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,003%,
 576 pressão de 1422 psi a 37 °C.
 577



578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585

586 **Figura 7.** Perfil de eluição por HPSEC/RID dos *C. gloeoporioides*_{prec} (A), *C. gloeoporioides*_{sobr} (B), *Fusarium* sp_{sobr} (C) e
 587 *N. parvum*_{sobr} (D). Condições da análise: colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de
 588 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da. Material aplicado: 200 μ g em 200 μ L; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: NaNO₃ 0,1 M
 589 contendo azida sódica 0,003%, pressão de 1422 psi a 37 °C.
 590



591
 592
 593
 594
 595
 596
 597

Tabela 1- Peso, porcentagem de açúcar total (AT) e proteínas totais (PT), Mw/Mn (grau de polidispersividade) e composição monossacarídica dos polissacarídeos secretados pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.

Micro-organismo	EPS (mg)	AT (%)	PT (%)	Mw/Mn	Composição monossacarídica (%)		
					Gal	Glc	Man
<i>N. parvum</i> _{sobr}	140,0	98,0	2,0	1,4	23	64	13
<i>Fusarium</i> sp _{sobr}	116,0	98,0	2,0	1,5	03	02	95
<i>C. gloeosporioides</i> _{sobr}	178,0	99,0	1,0	---	14	78	08
<i>C. gloeosporioides</i> _{prec}	114,5	99,0	1,0	1,6	---	100	---

598 EPS (mg): exopolissacarídeo liofilizado

599
 600
 601

1 **Analysis of the volume of inoculum influence and cultivation time on the production of**
2 **exopolysaccharides by endophytic strains of *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* and**
3 ***Colletotrichum gloeosporioides*.**

4

5 **Análise da influência do volume de inóculo e do tempo de cultivo na produção de**
6 **exopolissacarídeos por cepas endofíticas de *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* e**
7 ***Colletotrichum gloeosporioides*.**

8

9 Angélica Augusta Grigoli-Dominato¹, Ana Flora Dalberto Vasconcelos², Jessica Moreli Ferreira²,
10 Aline, Midori Futami², André Rodrigues³, Adriana Knob⁴, Maria de Lourdes Corradi da Silva^{1,2}

11 1-Programa de Pós Graduação em Microbiologia IBILCE-Unesp São José do Rio Preto -SP 2- Depto de
12 Química e Biquímica- FCT- Unesp Presidente Prudente SP Brasil, 3- Departamento de Bioquímica e
13 Microbiologia - Instituto de Biociências –Unesp Rio Claro – SP; 4. Departamento de Biologia – Unicentro –
14 Guarapuava, PR, Brasil

15

16

17

Abstract

18 Endophytic fungi, for requiring adaptation in order to survive in their host, present intense metabolism
19 producing biomolecules, such as exopolysaccharides (EPS), with viability of applications in several
20 industrial areas. *In vitro*, the submerged fungus cultivation allows obtaining of such biopolymers efficiently,
21 in compact space and with better control of physical (pH, temperature, aeration) and chemical (nutrient)
22 variables. The aim of this report was to obtain the EPS of the endophytic fungi *Neofusicoccum parvum*,
23 *Fusarium sp* and *Colletotrichum gloeosporioides*, identifying the condition of culture in relation to volume
24 of inoculum and incubation time. The EPS production was performed in means of culture containing
25 medium minimal of Vogel's salts (MMVS), at 28 ° C (± 2 ° C), at 180 rpm, to perform the volume of
26 inoculum curves (1.0 to 4 mL, plus 0.5 mL in 0.5 mL per 25 mL of medium) and incubation time (02400 h at
27 12000 h, 16800 h, 24000 h and 36000 h). The EPS were quantified by the phenol-H₂SO₄, DNS and Bradford
28 methods for total sugars, reducers and total proteins, respectively. The determination of the purity and degree
29 of homogeneity of the molecules was high performance size exclusion chromatography equipped with
30 refractive differential index (HPSEC / RID) and the monosaccharide composition after total acid hydrolysis
31 (TFA) which was determined by high performance anion exchange chromatography with pulsed
32 amperometric detector (HPAEC / PAD). The EPS production for the reported conditions was: 366.5 ± 4.0
33 mg L⁻¹ for *N. parvum* in 2.5 mL of inoculum and 07200 h of culture, 302.0 ± 3.5 mg L⁻¹ for *Fusarium sp* in
34 2.0 mL and 09600 h and 421.4 ± 2.1 mg L⁻¹ for *C. gloeosporioides* in 1.0 mL and 07200 h. The
35 chromatograms obtained by HPSEC / RID showed a broad base for *N. parvum*, indicating a high degree of
36 polydispersity and suggesting the presence of a homogeneous population of molecules and two peaks, with
37 different retention times for *Fusarium sp* and *C. gloeosporioides*, demonstrating the need for purification of
38 the EPS solutions. The monosaccharides found in the highest proportion were: glucose (*N. parvum* and *C.*
39 *gloeosporioides*) and mannose (*Fusarium sp*). The purification by centrifugation allowed obtaining a
40 precipitate with the characteristics of a pure compound, formed exclusively by glucose (*C. gloeosporioides*),
41 that will later have the determined chemical structure and the tested biological activity.

42

43 **Keywords:** Endophytes, cultivation time, inoculum volume, *Colletotrichum gloeosporioides*, glucan.

Resumo

44

45 Os fungos endofíticos, por necessitarem de adaptações para sua sobrevivência no hospedeiro, apresentam
46 intenso metabolismo produzindo biomoléculas, como os exopolissacarídeos (EPS), com viabilidade de
47 aplicações em diversas áreas industriais. *In vitro*, o cultivo submerso dos fungos, permite a obtenção destes
48 biopolímeros com eficiência, em espaço compacto e com melhor controle das variáveis físicas (pH,
49 temperatura, aeração) e químicas (nutrientes). O objetivo deste estudo foi obter EPS dos fungos endofíticos
50 *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides* identificando a condição do cultivo
51 em relação ao volume de inóculo e tempo de incubação. A produção de EPS foi realizada em meio de cultura
52 contendo meio mínimo de sais de Vogel (MMSV), a 28 °C (± 2 °C), a 180 rpm, para a realização das curvas
53 de volume de inóculo (1,0 a 4 mL, acrescidos de 0,5 mL em 0,5 mL por 25 mL de meio) e tempo de
54 incubação (02400 h à 12000 h, 16800 h, 24000 h e 36000 h). Os EPS foram quantificados pelos métodos
55 fenol-H₂SO₄, DNS e Bradford para açúcares totais, redutores e proteínas totais, respectivamente. A
56 determinação da pureza e grau de homogeneidade das moléculas foi realizada por cromatografia de exclusão
57 estérica a alta pressão, equipado com índice de refração diferencial (HPSEC/RID) e a composição
58 monossacarídica, após hidrólise ácida total (TFA), foi determinada por cromatografia líquida de troca
59 aniônica com detector de amperometria pulsada (HPAEC/PAD). A produção de EPS para as condições
60 estudadas foram: $366,5 \pm 4,0$ mg L⁻¹ para *N. parvum* em 2,5 mL de inóculo e 07200 h de cultivo, $302,0 \pm 3,5$
61 mg L⁻¹ para *Fusarium* sp em 2,0 mL e 09600 h e $421,4 \pm 2,1$ mg L⁻¹ para *C. gloeosporioides* em 1,0 mL e
62 07200 h. Os cromatogramas obtidos pelo HPSEC/RID apresentaram base alargada para *N. parvum*,
63 sinalizando elevado grau de polidispersividade e sugerindo a presença de uma população de moléculas pouco
64 homogênea e dois picos, com tempos de retenção diferentes para *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*,
65 demonstrando a necessidade de purificação das soluções de EPS. Os monossacarídeos encontrados em maior
66 proporção foram: glucose (*N. parvum* e *C. gloeosporioides*) e manose (*Fusarium* sp). A purificação por
67 centrifugação permitiu a obtenção de um precipitado com características de um composto puro, formado
68 exclusivamente por glucose (*C. gloeosporioides*), que posteriormente terá a estrutura química determinada e
69 a atividade biológica ensaiada.

70 Palavras chaves: Endofíticos, tempo de cultivo, volume de inóculo, *Colletotrichum gloeosporioides*, glucana.

71

72 Introdução

73 Na natureza, os fungos endofíticos, a maioria pertencente ao filo *Ascomycota*, vivem nos tecidos das
74 plantas sem aparentemente causar nenhum dano ao hospedeiro e são considerados como uma fonte
75 importante de diferentes moléculas, pois tem capacidade de sintetizar e secretar metabólitos como enzimas,
76 antibióticos, pigmentos e polissacarídeos, entre outros (CHAPLA et al., 2013; SELIM et al., 2012). A síntese
77 e a secreção desses metabólitos podem ser entendidas como uma resposta fisiológica de adaptação do fungo
78 ao hospedeiro, especialmente devido aos mecanismos de defesa que estes últimos apresentam
79 (SURYANARAYANAN et al., 2009). Para o hospedeiro, a presença desses compostos é vantajosa, pois
80 aumenta sua resistência ao estresse e ao ataque de parasitas, insetos e outros micro-organismos. Os
81 endofíticos permanecem latentes por longos períodos em condições favoráveis de nutrientes, temperatura e
82 água, porém, podem tornar-se patogênicos, quando um ou mais desses fatores estão indisponíveis (YAN et
83 al., 2015).

84 Considerando que exopolissacarídeos, um dos metabólitos secretados pelos endofíticos, pode
85 apresentar atividade biológica interessante para a saúde humana e animal, despertando o interesse das
86 indústrias de alimento, cosmética e de medicamento, a produção dessas substâncias por cultivos *in vitro* tem
87 sido avaliada.

88 A produção em meio de cultivo *in vitro* de exopolissacarídeos fúngicos dependem de condições
89 como o tipo de cepa (micro-organismo), composição do meio e manutenção das condições físicas durante o
90 processo fermentativo. Fatores como fontes de carbono e nitrogênio (orgânico e inorgânico), sais minerais,
91 vitaminas, em conjunto com as condições físico-químicas de cultivo (pH, temperatura, aeração, velocidade
92 de agitação, tempo de incubação) e a quantidade de inóculo empregada, são estratégias úteis que interferem
93 diretamente no aumento da densidade celular e conseqüente síntese dos polissacarídeos secretados. Por isso,
94 aperfeiçoar o processo de obtenção de qualquer metabólito microbiano é essencial para que o rendimento do
95 mesmo seja favorável à sua aplicação (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

96 O cultivo em meio submerso é um dos procedimentos mais utilizados por oferecer rapidez na
97 obtenção dos metabólitos, em especial os exopolissacarídeos, devido ao maior desenvolvimento micelial, em
98 espaço pequeno e com menor risco de contaminação microbiana (LEE et al., 2004). A obtenção de
99 polissacarídeos por meios biotecnológicos é vantajosa em comparação aos procedimentos químicos, que são
100 complexos e dispendiosos, por necessitarem de precursores e catalisadores como as enzimas, além da
101 limitação em relação ao tamanho dos polímeros obtidos (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

102 Os EPS são macromoléculas formadas por monossacarídeos iguais (homopolímeros) ou diferentes
103 (heteropolímeros), unidos por ligações glicosídicas, gerando moléculas lineares ou ramificadas. D-
104 glucopiranosose é o monômero mais abundante fazendo parte tanto dos polissacarídeos de reserva energética
105 (glicogênio), quanto aqueles da parede celular (β - e α - glucanas), muitas vezes presentes no material
106 secretado pelo fungo (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Como podem apresentar grande variabilidade com
107 relação à configuração, posição e sequência das ligações glicosídicas, grau de ramificação, conformação e
108 composição monossacarídica, formam moléculas com características químicas e físicas distintas que, em
109 conjunto, são as responsáveis pelas várias aplicações dos EPS, como emulsificante, espessante e geleificante,
110 na indústria alimentícia; antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, antiviral e
111 imunomodulatório, na indústria de medicamentos ou cosméticos (produtos de cuidados com a pele, cremes e
112 loções protetivas) (CORRADI DA SILVA et al., 2006)

113 No presente estudo, cepas endofíticas de *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum*
114 *gloeosporioides* foram investigadas, pela primeira vez, como produtores de exopolissacarídeos, analisando-
115 se a influência de dois parâmetros de cultivo: volume de inóculo e tempo de incubação. Os EPS produzidos
116 por esses micro-organismos foram estudados quanto à composição química e homogeneidade, que são
117 parâmetros preliminares importantes para a caracterização química da molécula bem como para a sua
118 aplicação.

119

120 **Material e Métodos**

121

122 *Reagentes e meio de cultura*

123 Ágar batata dextrose (BDA) foi adquirido da HiMedia Laboratories (Mumbai, MH, Índia). Padrões
124 analíticos e reagentes utilizados são de grau analítico da Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, USA). O
125 meio mínimo de sais de Vogel (MMSV) foi preparado de acordo com Vogel (1956).

126 *Métodos*127 *Micro-organismos*

128 Os fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp, isolados de folhas de espinheira santa
129 (*Maytenus aquifolia*), e *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de dormideira (*Mimosa pudica*), foram
130 identificados morfológicamente e mantidos em tubos, contendo BDA, inclinados e refrigerados a 4°C (\pm
131 2°C), com repiques bimensais.

132

133 *Reativação dos fungos*

134 Os fungos foram transferidos assepticamente do meio de manutenção (BDA) para as placas de Petri
135 contendo MMSV (VOGEL, 1956) acrescido de glucose (10 g L⁻¹) e ágar (20 g L⁻¹).

136

137 *Cultivos submersos*

138 As condições dos cultivos submersos para a produção de EPS foram previamente descritas por
139 Steluti et al. (2004) e Vasconcelos et al. (2008). Os pré-inóculos foram preparados em frascos de Erlenmeyer
140 (125 mL) contendo 25 mL MMSV e glucose (10 g L⁻¹), para onde foram transferidas, da superfície das
141 placas, pequenas porções de hifas retiradas de forma aleatória. Os cultivos foram incubados a 28 °C (\pm 2 °C)
142 a 180 rpm durante 04800 h. A seguir, os micélios fúngicos foram transferidos assepticamente para um
143 homogeneizador estéril (Blender) e triturados por 0,5 min em velocidade máxima. Após, o material foi
144 centrifugado a 4800 x g durante 30 min com descarte do sobrenadante. A biomassa foi ressuspensa (10 mL)
145 e diluída com salina fisiológica estéril até a obtenção de valor de absorbância entre 0,2 a 0,4 em 400 nm, de
146 acordo com curva turbidimétrica previamente estabelecida para calcular a concentração de células necessária
147 para a produção de exopolissacarídeos. Os inóculos foram preparados, segundo Steluti et al., (2004) em
148 frascos Erlenmeyer de 500 mL, em triplicata, contendo 100 mL de MMSV, acrescido de glucose (50 g L⁻¹) e
149 extrato de levedura (2 g L⁻¹). Cada frasco foi inoculado com 1 mL da suspensão de células e incubados a 28
150 °C (\pm 2 °C) a 180 rpm durante 07200 h. Os cultivos foram testados separadamente para cada micro-
151 organismo.

152

153 *Influência do volume de inóculo na produção do EPS*

154 Foram ensaiados separadamente e para cada micro-organismo os volumes de inóculo de 1,0 a 4,0
155 mL, aumentando de 0,5 em 0,5 mL, da suspensão de células para cada 25 mL de meio de cultivo. Os frascos
156 (em triplicata) foram inoculados com os diferentes volumes de células, incubados por 07200 h, a 28 \pm 2 °C e
157 em agitação constante de 180 rpm.

158

159 *Influência do tempo de incubação do inóculo na produção do EPS*

160 Foram testados separadamente, para cada micro-organismo, os tempos de cultivo de 02400 h em
161 02400 h até 12000 h e os tempos de 16800 h, 24000 h e 36000 h. Os frascos (em triplicata) foram inoculados
162 com volumes de células determinados para cada fungo, incubados nos diferentes tempos, a 28 °C \pm 2 °C e
163 em agitação constante de 180 rpm.

164 *Interrupção dos cultivos e recuperação dos EPS*

165 Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (4800 x g durante 30 min) a 4 °C, separando-se a
166 biomassa do sobrenadante, que foi posteriormente filtrado à vácuo (membrana filtrante de 0,45 µm). O
167 sobrenadante foi dialisado contra a água destilada, em sistema fechado, durante 02400 h a 4 °C. A fração não
168 dialisável foi tratada com 3 volumes de etanol absoluto gelado, para a precipitação dos EPS e mantida
169 *overnight* a 4 °C. Os precipitados foram centrifugados (4800 x g durante 20 min) a 4 °C e ressuspensos em
170 água destilada, com agitação constante, até solubilização. Alíquotas de cada material foram separadas para as
171 quantificações de açúcares total, redutor e proteína e o restante foi congelado, liofilizado e armazenado.

172

173 *Quantificação dos EPS*

174 As quantificações foram realizadas em triplicata para o cálculo da média e desvio padrão de cada
175 determinação analítica. A concentração de açúcares totais foi determinada pelo método do fenol-ácido
176 sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e os açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando a
177 D-glucose como padrão, para a construção das curvas de calibração. As proteínas totais foram quantificadas
178 pelo método de Bradford (1976), utilizando a soro albumina bovina (BSA) como padrão.

179

180 *Determinação da homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC) acoplada*
181 *a detector de índice de refração (RID)*

182 Para determinação da homogeneidade as amostras foram solubilizadas em água destilada (1 mg/mL)
183 e filtradas em membranas Millipore® (acetato de celulose) com 0,22 µm de porosidade. Alíquotas de 200 µL
184 foram injetadas no HPSEC acoplada ao detector de índice de refração (RID), modelo 10 A e detector de UV-
185 Vis (Shimadzu Company, Kyoto, KYT, Japan). O sistema de cromatografia líquida consiste de uma bomba
186 de HPLC, modelo 10AD, com válvula de injeção manual (Shimadzu) equipado com um *loop* 200 µL e 4
187 colunas de gel permeação, Ultrahydrogel (7,8 X 300 mm) (WATERS), com limites de exclusão de 1×10^6 ,
188 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da, dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (0,1 M) contendo azida sódica
189 (0,03 %) foi utilizada como fase móvel, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de 37 °C. A aquisição de
190 dados foi realizada utilizando o programa LC Solution (Shimadzu Corporation) (CORRADI DA SILVA et
191 al., 2013).

192

193 *Hidrólise ácida total e determinação da composição monossacarídica dos EPS*

194 A hidrólise de cada amostra liofilizada (0,05 mg de EPS) foi realizada com a adição de 300 µL de
195 solução de ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol L⁻¹, em tubos próprios para hidrólise, que posteriormente
196 foram selados e aquecidos a 100 °C, por 00300 h. Após este período o TFA foi removido por evaporação.

197 A análise da composição monossacarídica foi realizada por cromatografia de troca aniônica
198 (HPAEC) equipada com detector de amperometria pulsada (PAD), Dionex DX 500 (Dionex Company,
199 Sunnyvale, CA, USA) com os cromatogramas registrados em integrador modelo 4600. Os açúcares neutros
200 foram separados isocriticamente, utilizando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm) equipado

201 com guarda coluna PA1, ao fluxo de 1 mL min⁻¹. As condições de eluição foram produzidas utilizando água
202 deionizada (eluente 1) e 8 % de NaOH 200 mmol L⁻¹ (eluente 2). Após o término da corrida a coluna foi
203 regenerada com 100 % do eluente 2 por 10 min e, antes da injeção de nova amostra, a coluna foi submetida,
204 durante 15 min, às condições iniciais de análise (8% do NaOH 200 mmol L⁻¹). Para detecção e quantificação
205 dos monossacarídeos, alíquotas de 25 µL de uma mistura contendo aproximadamente 200 ng de cada açúcar
206 padrão (fucose, arabinose, ramnose, galactose, glucose e manose) foram injetadas no HPAEC/PAD. A
207 quantificação monossacarídica foi realizada comparando as medidas das áreas dos picos dos padrões de
208 monossacarídeos neutros com aqueles obtidos das amostras (VASCONCELOS et al., 2008).

209

210 *Método físico de separação dos componentes presentes no EPS*

211 Os exopolissacarídeos liofilizados, obtidos dos três fungos estudados, foram solubilizados em água
212 deionizada com agitação contínua (agitador magnético), sem aquecimento. Os EPS quando solubilizados em
213 água, formavam uma solução viscosa e turva que, após centrifugação (3000 x g durante 10 minutos), gerava
214 uma fração límpida, denominada sobrenadante, e um material sedimentado denominado precipitado.

215

216 *Análise estatística*

217 A produção de EPS pelos fungos estudados não apresentaram diferenças significativas para os dois
218 parâmetros (volume de inóculo e tempo de incubação), através do Teste de Tukey- ANOVA, ao nível de 5%
219 (p<0,05) usando o programa estatístico SISVAR.

220

221 **Resultados e Discussão**

222 A Figura 1 esquematiza a sequência dos experimentos efetuados para a obtenção dos EPS dos três
223 fungos estudados.

224

225 *Cultivos em meio sólido e líquido para obtenção de exopolissacarídeos*

226 Nos cultivos em meio sólido, as colônias fúngicas apresentaram aspectos diferentes devido às
227 características morfológicas e fisiológicas individuais (Figura 2 -A-1; B-1; C-1). Após observações visuais
228 das culturas (hifas jovens), os períodos de incubação estabelecidos foram de 4 dias para o *N. parvum* e 5 dias
229 para o *Fusarium* sp e o *C. gloeosporioides*.

230 Os cultivos de pré-inóculos apresentaram hifas de tom amarelo claro e com os aspectos filamentosos
231 para o *N. parvum* e de *pellets* para *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* (Figura 2- A-2; B-2; C-2). Os cultivos
232 submersos dos inóculos, após os períodos de incubação para as curvas estudadas, apresentaram-se
233 pigmentados conforme aumentava o volume de inóculo e o tempo de cultivo. A Figura 2 (A-3; B-3; C-3)
234 mostra aspecto dos inóculos sem a presença de pigmentos, sendo então identificadas como as condições para
235 os cultivos.

236

237

238

239 *Determinação da influência do volume de inóculo na produção de exopolissacarídeos*

240 Nos cultivos submersos, para qualquer volume de inóculo estudado (Figura 3: A-1, B-1 e C-1) bem
241 como para os diferentes tempos de cultivo (Figura 3: A-2, B-2 e C-2), os três fungos foram produtores de
242 EPS. A confirmação da produção de EPS se fez pela diferença entre açúcares totais e redutores, sendo este
243 último encontrado sempre em valores pequenos, principalmente porque procedimentos de diálise eram
244 efetuados antes das quantificações. A formação de precipitado quando o caldo de fermentação era tratado
245 com etanol absoluto gelado (Figura 2: A-4, B-4, C-4) indicava também a presença de polímeros que, uma
246 vez excluída a contaminação por proteínas, quantificadas pelo método de Bradford, pode-se afirmar que a
247 maior parte do material secretado pelos micro-organismos, nas condições estudadas neste trabalho, era
248 polissacarídeo (Figura 2: A-5, B-5, C-5).

249 De acordo com Barbosa et al. (2004) a produção de EPS, durante a fermentação submersa, se deve a
250 um conjunto de fatores químicos e físicos que favorece o crescimento do micro-organismo bem como a
251 síntese, rendimento e composição da macromolécula. O crescimento de cada micro-organismo apresenta-se
252 de maneira distinta, em resposta ao efeito das mudanças ambientais e à fonte de carbono utilizada, que pode
253 ter parte convertida, pela célula microbiana, em polissacarídeos. Razack et al. (2013) pontuam que apesar da
254 análise individual de fatores fermentativos ser considerada difícil e trabalhosa, ela auxilia na seleção de
255 parâmetros mais significativos para produção de biopolímeros. Um desses parâmetros é o volume de inóculo,
256 determinante para a produção de polissacarídeos microbianos. Esses metabólitos são produzidos na fase
257 estacionária e com excesso da fonte de carbono, no meio de cultivo. Quando o volume de inóculo é muito
258 pequeno, pode comprometer o rendimento do processo fermentativo, pois as células microbianas requerem
259 maior tempo para atingirem sua biomassa máxima e, conseqüentemente, a fase estacionária que é a
260 responsável pela produção do EPS. Um volume muito grande de inóculo (maior concentração de células)
261 poderia comprometer a síntese da molécula de interesse, pois o substrato seria utilizado, principalmente, para
262 suprir as necessidades do crescimento celular (formação das estruturas celulares, produção de enzimas
263 biossintéticas, entre outras) desfavorecendo a produção de EPS (PAPAGIANINI, 2004).

264 Portanto, considerando essa necessidade, foi estudado qual volume de inóculo para 25 mL de meio
265 de cultivo seria ideal para maior produção de EPS, para cada micro-organismo. A produção máxima de EPS
266 (375 mg L^{-1}) pelo *N. parvum* foi com o volume de inóculo de 2,5 mL (Figuras 3-A-1 e 5-A) e para o
267 *Fusarium* sp ($209,4 \text{ mg L}^{-1}$) com 2,0 mL de inóculo (Figuras 3-B-1 e 5-A). A partir destes volumes de
268 inóculo a produção de EPS, pelos dois micro-organismos, diminui sensivelmente, sugerindo que uma maior
269 quantidade de células, presentes nos volumes maiores de inóculo, aumenta a competição pelos nutrientes do
270 meio, restando pouco da fonte de carbono para a síntese e secreção dos polissacarídeos. Tais resultados
271 demonstraram que determinar o volume de inóculo ideal foi importante para acompanhar a produção de EPS
272 pelos fungos *N. parvum* e *Fusarium* sp.

273 O fungo *C. gloeosporioides* comportou-se como o melhor produtor de EPS ($512,8 \text{ mg L}^{-1}$) com 3,0
274 mL de células (Figuras 3 C-1 e 5-A). Entretanto, a produção de pigmentos, a partir de 1,5 mL de inóculo
275 (Figura 4), impediu que a quantidade ideal de células para maior produção de EPS pudesse ser adotada.
276 Tentativas de utilização de membranas filtrantes e de procedimentos de diálise não foram capazes de

277 remover os pigmentos. A Figura 3 C-1 mostra que a síntese do EPS pelo *C. gloeosporioides* não sofreu
278 variações significativas nos diferentes volumes de inóculo e o fungo foi considerado o melhor produtor de
279 EPS. Lee et al. (2004) descreveram que, em fermentação submersa, o inóculo é fator limitante para a
280 produção e secreção de polissacarídeo por fungos filamentosos e no estudo com *Grifola frondosa*
281 determinaram que a concentração de inóculo de 3% foi considerada ideal para a maior produção de EPS, na
282 faixa de 2% a 6% estudada.

283 Phillips et al. (2013) descreveram que pigmentos escuros, de marrom ao preto, presentes nas colônias
284 de *N. parvum* podem surgir nos conídios, desde o período germinativo, e representam uma forma de
285 diferenciação deste fungo. Dados na literatura (MEDENTSEV et al., 2005; WIEMANN et al., 2009),
286 relacionados aos estudos da produção de pigmentos em cultivos submerso de fungos, mostram que a
287 biossíntese desses metabólitos secundários começa a ocorrer no final da fase de crescimento e início da
288 idiofase (fase estacionária), como um mecanismo de defesa do micro-organismo contra limitação das fontes
289 de carbono e nitrogênio e nas mudanças de pH, que podem acontecer nessa etapa do desenvolvimento
290 celular. A Figura 4 mostra os aspectos das biomassas dos cultivos submersos dos fungos estudados neste
291 trabalho, com a produção de pigmentos.

292

293 *Determinação da influência do tempo de cultivo na produção de exopolissacarídeos*

294 A produção máxima de EPS ($366,5 \pm 4,0 \text{ mg L}^{-1}$) pelo *N. parvum* ocorreu em 07200 h (Figuras 3-A-
295 2 e 5-B), a partir do qual houve um decréscimo progressivo até 12000 h, se estabilizando até 36000 h. A
296 partir do cultivo de 09600 h ocorreu a formação de um pigmento escuro e a diminuição da secreção do EPS,
297 que poderia sinalizar um desvio da via metabólica de síntese do EPS para a biossíntese do pigmento.

298 Osinska-Jarozuk et al. (2015), relataram que fungos ascomicetos e basidiomicetos requerem um
299 tempo relativamente longo e variável de incubação para a síntese e secreção de polissacarídeos. Segundo os
300 mesmos autores o tempo pode variar de 3 até 40 dias de cultivo, como observaram para a produção de EPS
301 pelo *Auricularia auricula* (7.5 g L^{-1} , 4 dias) e *Fusarium oxysporum* ($0,6 \text{ g L}^{-1}$ em 40 dias).

302 Neste trabalho, dois dos três micro-organismos apresentaram um comportamento semelhante ao
303 relatado por Osinska-Jarozuk et al. (2015). O fungo *Fusarium* sp (Figura 3 B-2), apesar da produção
304 crescente de EPS até 36000 h, proporcional ao aumento do tempo de cultivo, também apresentou um
305 pigmento de coloração avermelhada a partir de 12000 h, que se acentuava com o aumento do tempo. A
306 separação por centrifugação do caldo de fermentação e da biomassa mostrou que ambos os componentes
307 estavam pigmentados. A diálise exaustiva do caldo fermentado, seguida da precipitação dos polissacarídeos
308 em etanol, não foi eficiente para a obtenção de um material despigmentado. Desta forma, o tempo de 09600
309 h foi adotado como melhor para obtenção de um caldo de fermentação límpido e produzindo $302 \pm 3,5 \text{ mg L}^{-1}$
310 de EPS (Figura 5-B).

311 O fungo *C. gloeosporioides*, com produção crescente de EPS até o maior tempo de cultivo, foi, nas
312 condições estudadas, o melhor produtor de EPS a partir de 07200 h, alcançando um máximo de $1.640,8 \text{ mg}$
313 L^{-1} no tempo de 36000 h (Figuras 3 C-2 e 5-B). Entretanto, a partir de 09600 h, tanto o caldo de fermentação
314 quanto a biomassa tomaram uma coloração acinzentada que se intensificavam com o tempo, até se tornarem

315 pretas. Centrifugação, filtração e diálise não foram eficientes para remoção do pigmento. O tempo de 07200
316 h, anterior ao aparecimento do pigmento, foi considerado ideal para a produção do EPS ($421,4 \pm 2,1 \text{ mg L}^{-1}$)
317 pelo *C. gloeosporioides*.

318 Xiao et al. (2004) sugerem que quanto maior for o tempo de cultivo, mais polissacarídeo será
319 secretado, durante o processo fermentativo e Wu et al. (2012) afirmam que o tempo de cultivo é um dos
320 fatores que possibilita maior produção de EPS pelos micro-organismos.

321 De acordo com a literatura os tempos ideais de cultivo para a produção de EPS são geralmente
322 superiores a 4 dias. Lima et al. (2008) relataram que o maior rendimento de EPS secretado por *Agaricus*
323 *brasiliensis* foi com adição de proteína hidrolisada de soja e 9 dias de incubação ($1.430,7 \text{ mg L}^{-1}$) e 6 dias,
324 sem adição da proteína ($993,5 \text{ mg L}^{-1}$). Lin e Sung (2006) descreveram que foram necessários 14 dias de
325 cultivo para a maior produção de EPS pelo *Antrodia cinnamomea*.

326 O pH inicial do meio de cultivo foi de 5,6 e sofreu alterações durante a realização da curva de tempo.
327 A aferição do pH final, no caldo fermentado, mostrou que a melhor produção de EPS para o *N. parvum*
328 ocorreu em pH 6,0 e para o *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides* em pH 5,0. A partir de pH 7,0, para qualquer
329 um dos três fungos estudados, a secreção de pigmentos se intensificava na cor, com o aumento do tempo de
330 cultivo, embora em alguns casos o pH se manteve 7,0. De acordo com Kim et al. (2006), o pH é um
331 parâmetro que influencia o crescimento micelial, a produção de metabólitos, a morfologia celular e a
332 reologia do caldo fermentativo. Em geral o crescimento celular é favorecido em menores valores de pH, no
333 entanto, em estudo realizado com ascomicetos e basidiomicetos, para a produção de EPS, os pH dos meios
334 de cultivo oscilaram entre 4 a 7 (OSINSKA-JAROSZUK et al., 2015). Em experimentos realizados com *G.*
335 *lucidium*, os pesquisadores observaram que na faixa de pH inicial entre 3 a 7, a maior produção de EPS
336 ocorreu em pH 5 (KIM et al., 2006).

337

338 *Composição monossacarídica e análise da homogeneidade dos exopolissacarídeos*

339 Essas análises foram efetuadas com os EPS obtidos a partir da melhor concentração de inóculo e do
340 tempo de cultivo considerado ideal, sem a presença de pigmento. Os resultados da hidrólise ácida e
341 subsequente identificação e quantificação por HPAEC/PAD mostraram que a glucose era o componente
342 majoritário no *N. parvum* (78%) e no *C. gloeosporioides* (81%); o EPS produzido pelo *Fusarium* sp era
343 constituído principalmente de manose (68%), um açúcar bastante comum em carboidratos complexos, como
344 glicoproteínas, presentes na parede celular de fungos e, às vezes, no material secretado. Apesar de cada um
345 dos fungos apresentar um componente monossacarídico majoritário no EPS, os açúcares galactose, glucose e
346 manose estavam presentes em todos. Essa composição heterogênea de monômeros sinaliza que o material
347 secretado e identificado como sendo somente polissacarídeo, pode ser constituído por mais de um polímero
348 sugerindo a necessidade de averiguação. Os EPS fúngicos podem ter composição diversificada incluindo
349 monossacarídeos combinados com compostos de diferentes naturezas ou estruturas químicas como proteínas,
350 fosfatos, sulfatos ou aminas. Os monossacarídeos mais encontrados em polissacarídeos secretados são
351 glucose, manose, galactose, xilose, fucose e ramnose. A glucose é o principal monômero dos EPS
352 produzidos pelos fungos *Acremonium diospyri* Crandall; *Aspergillus niger*; *Botryosphaeria rhodina*

353 RCYU30101; *Cyttaria harioti*; *Drechleras picifera*; *Elsino eleucospila*; *Epicoccumnigrum* Ehrenb. ex
354 Schlecht; *Lachnum* sp. YM261; *Nigrospora oryzae* var. *glucanicum*; *Pestaloti asp.* 815; *Phanerochaete*
355 *chrysosporium* (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

356 A pureza e homogeneidade dos polissacarídeos são, geralmente, verificadas pelas análises da
357 cromatografia de exclusão estérica a alta pressão, acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID).
358 O número de picos e o grau de polidispersividade (Mw/Mn) informam a pureza e homogeneidade do
359 material. Para os 3 fungos estudados, os resultados dessa análise mostram que a base alargada no
360 cromatograma do EPS produzido pelo *N. parvum* (Figura 6-A), sinaliza elevado grau de polidispersividade
361 (Mw/Mn ~ 2,0), sugerindo heterogeneidade e/ou a presença de mais de um componente. O perfil dos
362 cromatogramas dos EPS produzidos pelos *Fusarium* sp (Figura 6-B) e *C. gloeosporioides* (Figura 6-C)
363 mostra dois picos, com R_T diferentes, sugerindo moléculas distintas, pelo menos com relação à massa
364 molecular e apontando para a necessidade de procedimentos de purificação

365

366 *Purificação dos exopolissacarídeos*

367 Os EPS produzidos pelo *N. parvum* (150 mg), *Fusarium* sp (140 mg) e *C. gloeosporioides* (300 mg)
368 quando solubilizados em água, formavam uma solução viscosa e turva que, centrifugada, produzia uma
369 fração solúvel, sobrenadante, e um material sedimentado, denominado precipitado. Os precipitados
370 liofilizados pesaram 11,0 mg, 20,8 mg e 114,5 mg para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*,
371 respectivamente. Alíquotas dessas frações, solubilizadas em água, com aquecimento controlado (45 °C)
372 foram utilizadas para a determinação do conteúdo de proteínas totais, cujos resultados indicaram os
373 percentuais de 56%, 88% e 1% para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Só foi
374 possível efetuar a hidrólise ácida no sedimento proveniente do *C. gloeosporioides*, cujo resultado foi 100%
375 glucose (Tabela 1).

376 Os sobrenadantes do *N. parvum* e do *C. gloeosporioides*, são constituídos principalmente de glucose,
377 e o sobrenadante do *Fusarium* sp de 95% de manose, provavelmente formando uma manana, constituinte da
378 parede celular de fungos, geralmente “entrelaçados” com proteínas (Tabela 1). É sabido que os
379 polissacarídeos secretados podem ser quimicamente semelhantes àqueles da parede celular, os quais, neste
380 caso, estão geralmente ligados a proteínas e lipídeos e cuja composição e estrutura química variam entre as
381 diferentes espécies de fungos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Um exopolissacarídeo produzido pelo
382 *Fusarium solani* SD5, composto por galactose e ramnose na proporção de 2:1, foi purificado por filtração em
383 gel e apresentou massa molecular de $1,87 \times 10^5$ Da (MAHAPATRA; BANERJEE, 2012). O *Fusarium* sp
384 estudado nesse trabalho tem a manose como principal constituinte da fração solúvel e apresentou massa
385 molecular aparente de aproximadamente 43 kDa (dados não mostrados). As quatro frações polissacarídicas
386 separadas por centrifugação foram denominadas *C. gloeosporioides*_{prec}, *C. gloeosporioides*_{sobr}, *Fusarium* sp_{sobr}
387 e *N. parvum*_{sobr}.

388 Entre as quatro frações analisadas apenas o sobrenadante do *C. gloeosporioides* mostrou 2 picos
389 (Figura 7-B), indicando a necessidade de novos procedimentos de purificação. As demais frações
390 apresentaram um único pico com base alargada que pode estar relacionada com a polidispersividade dos

391 polissacarídeos. Essa hipótese foi confirmada pelos valores do Mw/Mn (grau de polidispersividade), que
392 foram próximos de 1,5.

393 Das quatro frações apresentadas na Tabela 1 é possível concluir que apenas os polissacarídeos
394 presentes nos sobrenadante do *Fusarium* sp e no precipitado do *C. gloeosporioides* reúnem condições para
395 serem quimicamente analisados, uma vez que pelo HPSEC/RID comportam-se como um material puro, mas
396 ainda com caráter de polidispersividade, e após hidrólise apresentam composição monossacarídica quase
397 homogênea.

398 É importante observar que dados da literatura descrevem EPS, de uma maneira geral, como sendo
399 uma fração pura secretada pelo micro-organismo. Entretanto, de nossa experiência, EPS é uma fração
400 composta por diferentes polissacarídeos, que devem ser purificados, antes de qualquer análise adicional, seja
401 ela química ou biológica.

402

403 **Conclusões**

404 Os três fungos endofíticos estudados (*N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*) produziram
405 exopolissacarídeos em meio de cultivo *in vitro*, nas condições estudadas. As concentrações de inóculo e
406 tempo de cultivo ideais para obtenção de EPS, em 25 mL de meio foram, 2,5 mL em 72 horas, 2,0 mL em 96
407 horas e 1,0 mL em 72 horas, respectivamente para *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*. O *C.*
408 *gloeosporioides* foi o fungo que produziu maior quantidade de EPS cujo teor de açúcar total foi de 99 %. A
409 glucose foi o monossacarídeo mais abundante para os EPS de *N. parvum* e *C. gloeosporioides* e a manose
410 para o *Fusarium* sp. Procedimentos de purificação, como centrifugação, foram necessários para confirmar
411 que os EPS secretados pelos micro-organismos são uma mistura de polissacarídeos, que necessitam ter a
412 homogeneidade estabelecida antes da caracterização química e aplicação biológica.

413

414 **Referências Bibliográficas**

415

416 BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T. DA; PIGATTO, M. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Produção e
417 Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42,
418 2004. Bradford (1976)

419

420 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein
421 utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

422

423 CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorável e
424 sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, 2013 Disponível
425 em <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/275/280>

426

427 CORRADI DA SILVA, M. L.; EXPOSTI, D. T. D.; VASCONCELOS, A. F. D.; ALEXANDRE, S. M. A.;
428 SILVEIRA, J. L. M.; DUCATTI, D. R. B. Glucogalactan: A polysaccharide isolated from the cell-wall of
429 *Verticillium Lecanii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1353– 1359, 2013.

430

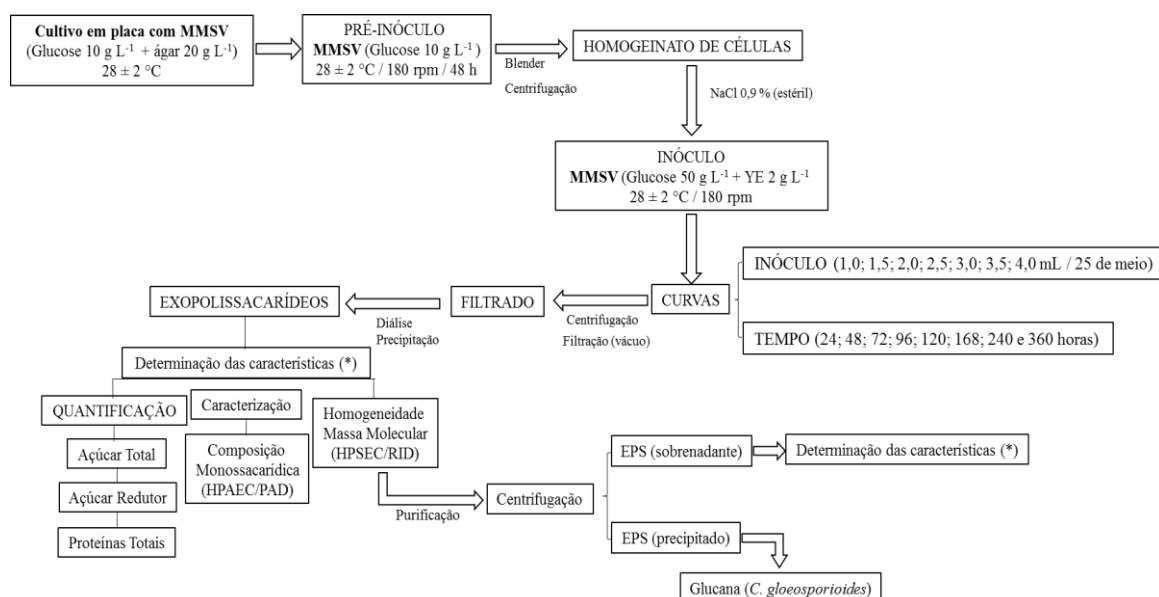
431 CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.;
432 CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química**
433 **Nova**, v.29, p. 85-92, 2006.

434

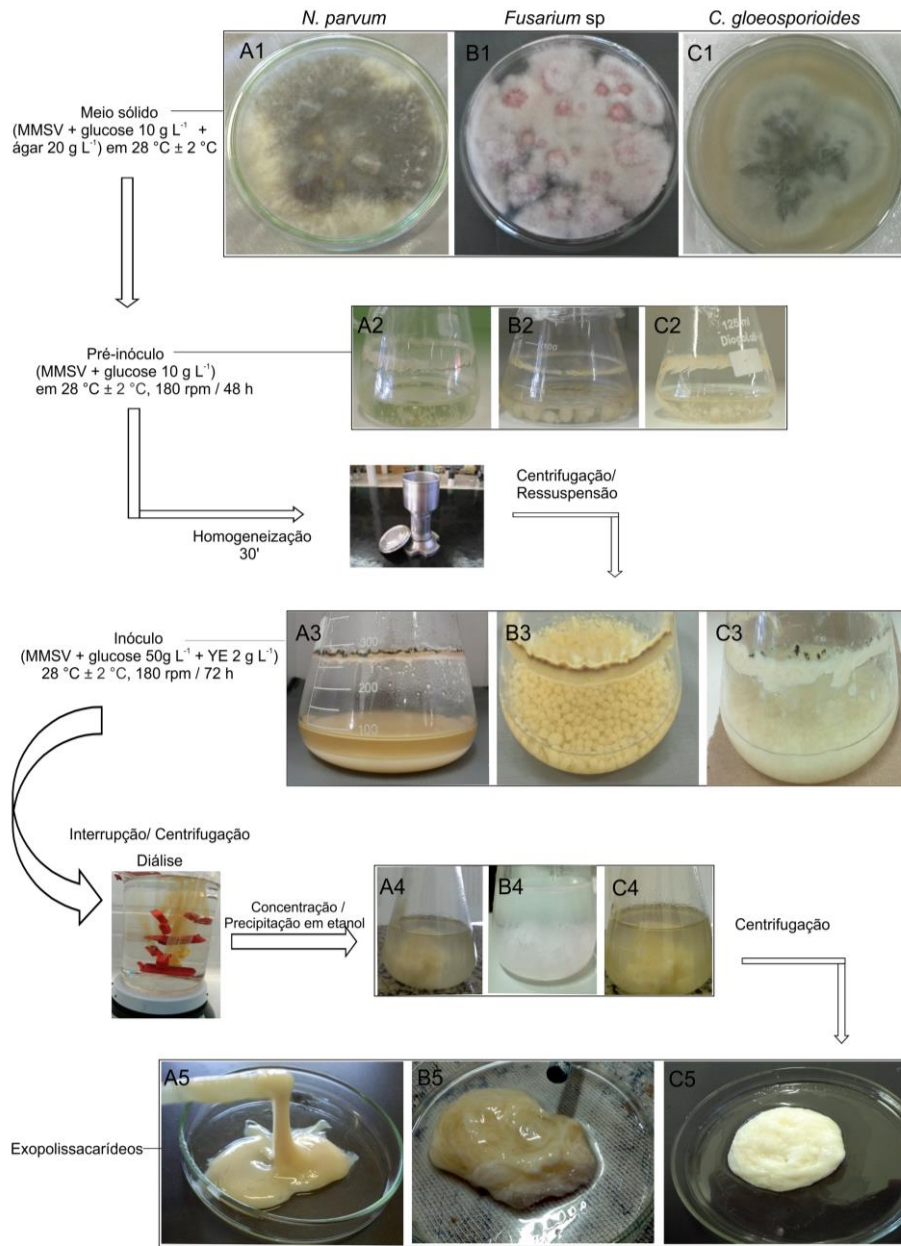
- 435 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for
436 determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
437
- 438 KIM, H. M.; PARK, M. K.; YUN, J. W. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged
439 mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, p. 249-262,
440 2006.
441
- 442 LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S.W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W Submerged
443 culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible
444 Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p.369–376, 2004.
445
- 446 LIMA, L. F. O.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J. L.; NOSEDA, M. D.;
447 GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and
448 characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation.
449 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p.283–294, 2008.
450
- 451 LIN, E.S.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible
452 Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **International Journal of Food Microbiology**,
453 v. 108, p. 182–187, 2006.
454
- 455 MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide
456 from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers** v.90, n. 1, p. 683–689, 2012.
457
- 458 MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications.
459 **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.
460
- 461 MEDENTSEV, A. G., ARINBASAROVA, A. I., AKIMENKO, V. K. Biosynthesis of naphthoquinone
462 pigments by fungi of the genus *Fusarium*. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**. v.41, n. 5, p. 573–
463 577, 2005.
464
- 465 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical**
466 **Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
467
- 468 OSINSKA-JAROSZUK, M.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; JAROSZUK-SCISEŁ, J.; SZALAPATA, K.;
469 NOWAK, A.; JASZEK, M.; OZIMEK, E.; MAJEWSKA, M. Extracellular polysaccharides from
470 *Ascomycota* and *Basidiomycota*: production conditions, biochemical characteristics, and biological
471 properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.1823–1844, 2015.
472
- 473 PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.
474 **Biotechnology Advances**, v.22, p. 189 – 259, 2004.
475
- 476 PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.;
477 GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture.
478 **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, 2013.
479
- 480 RAZACK, S. A.; VELAYUTHAM, V. THANGAVELU, V. Influence of various parameters on
481 Exopolysaccharide production from *Bacillus subtilis*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5,
482 n.5, p. 2221-2228, 2013.
483
- 484 SELIM, K. A.; EL-BEIH, A. A.; ABDEL-RAHMAN, T. M.; EL-DIWANY, A. I. Biology of Endophytic
485 Fungi. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 2, n.1, p. 31–82, 2012.
486
- 487 STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.;
488 CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of
489 *Botryosphaeran* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different

- 490 carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n.
 491 6, p. 480–486, 2004.
- 492
- 493 SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.;
 494 JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9 –
 495 19, 2009.
- 496
- 497 SYNITSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p.
 498 792– 809, 2013.
- 499
- 500 VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO,
 501 E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L. Three
 502 exopolysaccharides of the β -(1→6)-D-glucan type and a β -(1→3;1→6)- D-glucan produced by strains of
 503 *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p.2481–2485,
 504 2008.
- 505
- 506 VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.
 507
- 508 WIEMANN, P.; WILLMANN, A.; STRAETEN, M.; KLEIGREWE, K.; BEYER, M.; HUMPF, H. U.;
 509 TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and
 510 regulation. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 931– 946, 2009.
- 511
- 512 WU, S.; CHEN, J.; PAN, S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new
 513 strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. **Carbohydrate Polymers**,
 514 v. 87, p. 1696– 1700, 2012.
- 515
- 516 XIAO, J. H.; CHEN, D. X.; LIU, J. W.; LIU, Z. L.; WAN, W. H.; FANG, N.; XIAO, Y.; QI, Y.; LIANG,
 517 Z.Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and
 518 exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p.
 519 1105–1116, 2004.
- 520
- 521 YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their
 522 hosts systemically? **Fungal Ecology**, v. 13, p. 53-59, 2015.
- 523
- 524

525 **Figura 1.** Fluxograma dos experimentos efetuados para a obtenção dos EPS relacionando volume de inóculo e tempo
 526 de cultivo para os fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.



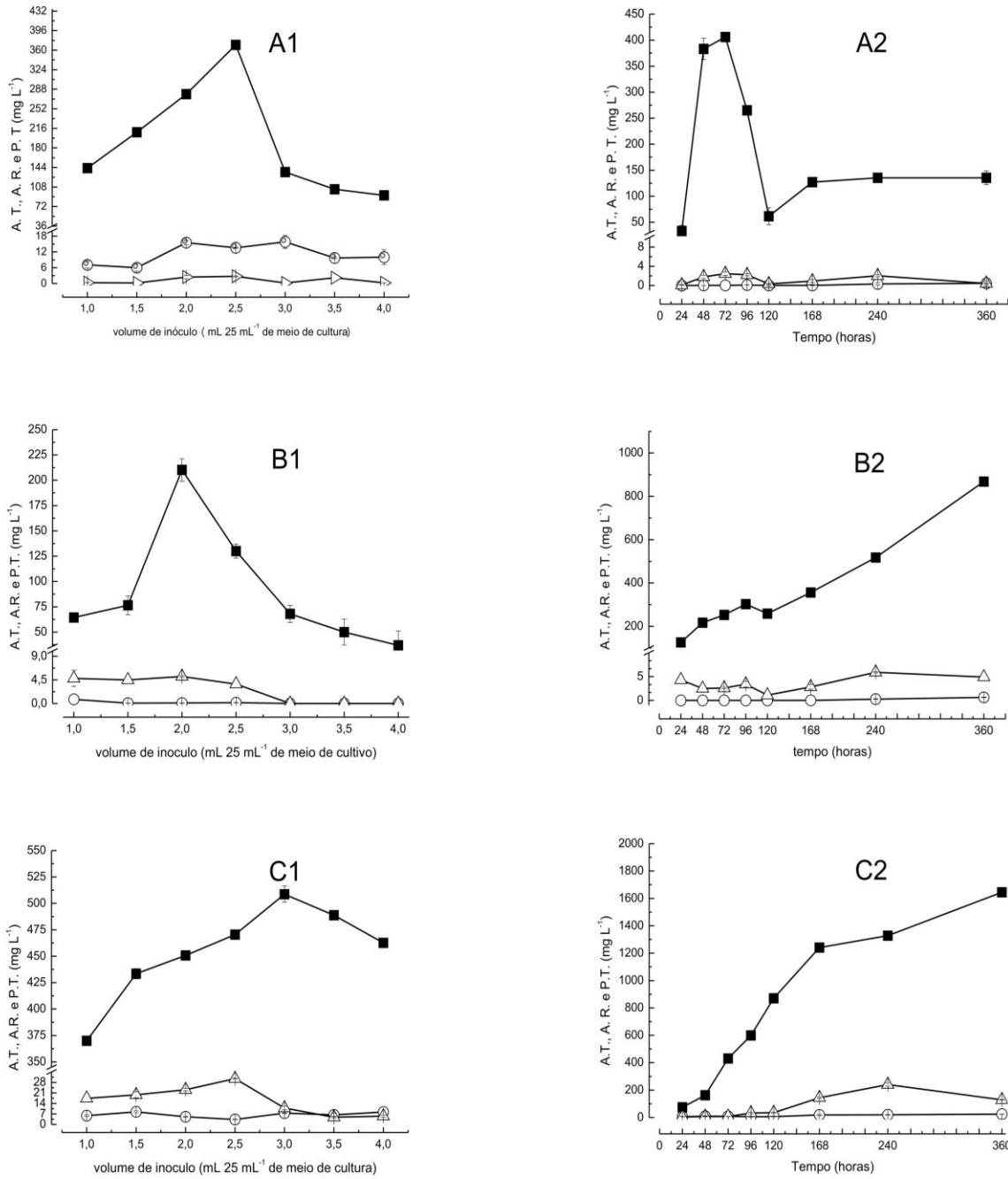
529 **Figura 2.** Aspectos dos cultivos em meios sólido e submerso e exopolissacarídeos dos fungo *N parvum* (A), *Fusarium*
 530 sp (B) e *C. gloeosporioides* (C).
 531



532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547

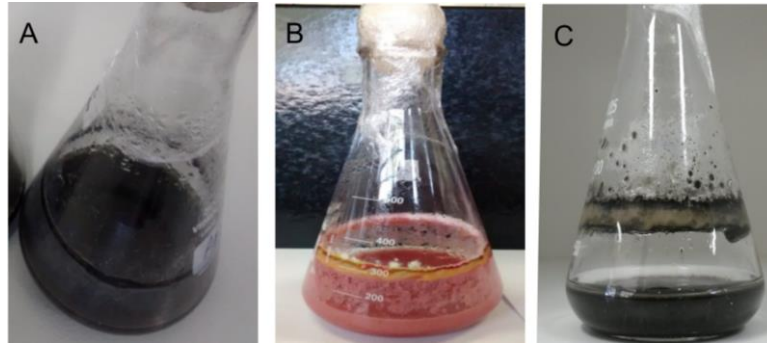
548
549
550
551

Figura 3. Quantificação de açúcares totais (A. T.) (■), redutores (A. R.) (○) e proteínas (P. T.) (△) nos diferentes volumes de inóculo (1) e tempo de cultivo (2) para os fungos. A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp e C: *C. gloeosporioides*.

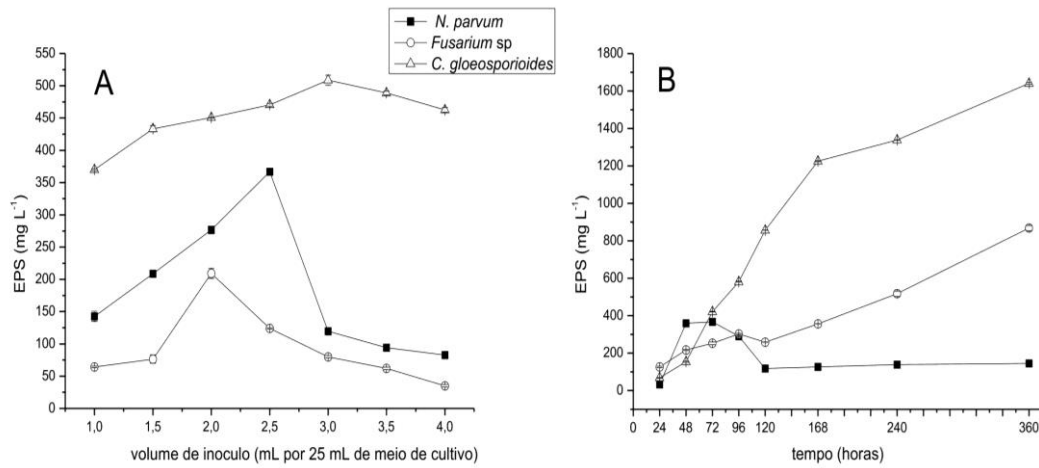


552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562

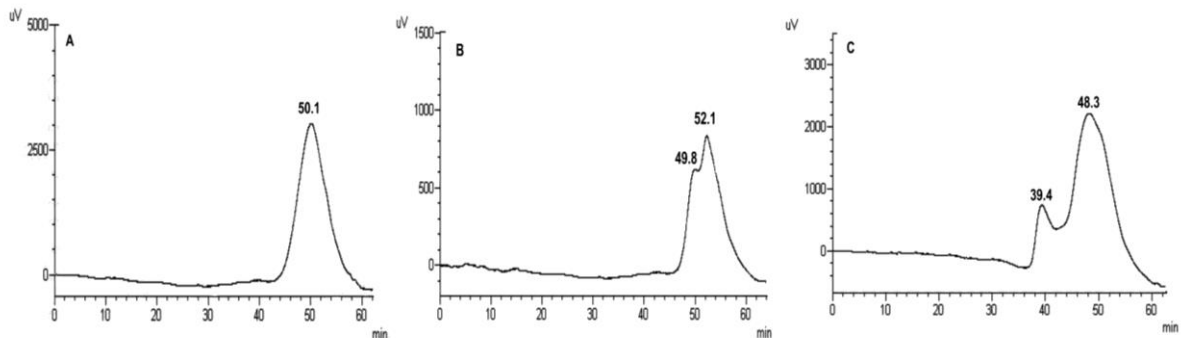
563 **Figura 4.** Presença de pigmentos nos cultivos submersos, realizados durante as curva de volume de inóculo e tempo de
 564 cultivo, dos fungos A- *N. parvum*, B- *Fusarium* sp e C- *C. gloeosporioides*.
 565



566
 567
 568 **Figura 5.** Perfil da produção de EPS pelos fungos *N parvum* (■), *Fusarium* sp (□) e *C. gloeosporioides*
 569 (△) nos estudos de volumes de inóculo (A) e tempos de cultivo (B).
 570

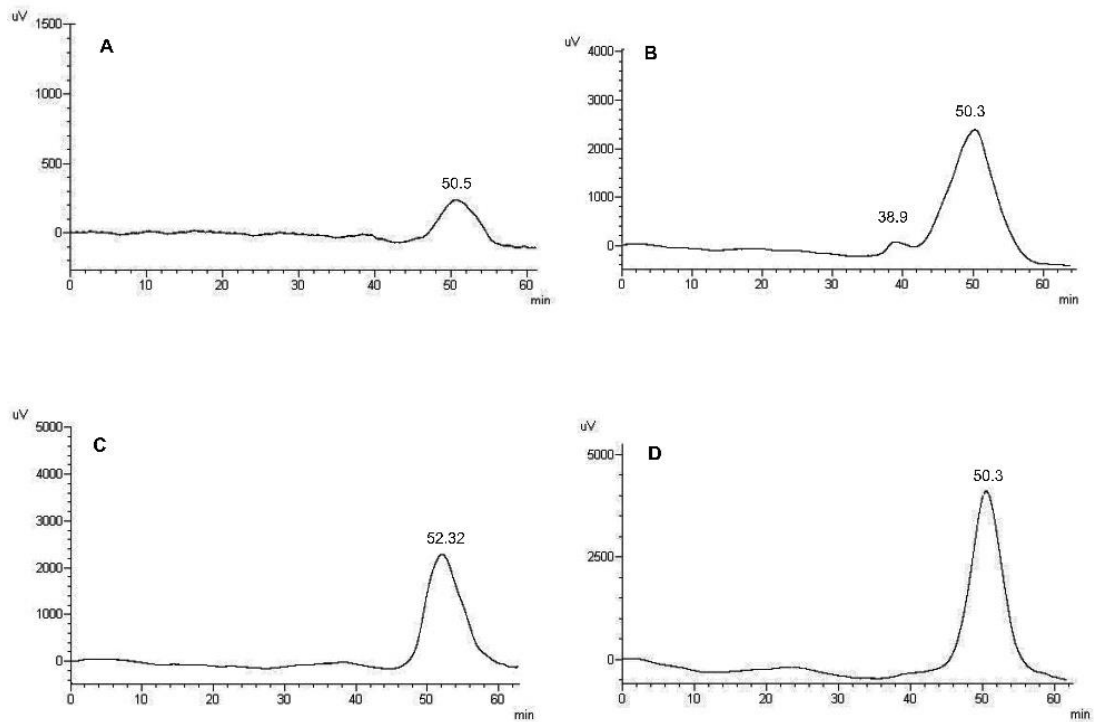


571
 572
 573 **Figura 6.** Perfil de eluição dos EPS secretados pelos fungos A: *N. parvum*, B: *Fusarium* sp, C: *C. gloeosporioides* por
 574 HPSEC/RID. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da.
 575 Material aplicado: 200 μ g em 200 μ L; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: NaNO₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,003%,
 576 pressão de 1422 psi a 37 °C.
 577



578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585

586 **Figura 7.** Perfil de eluição por HPSEC/RID dos *C. gloeoporioides*_{prec} (A), *C. gloeoporioides*_{sobr} (B), *Fusarium* sp_{sobr} (C) e
 587 *N. parvum*_{sobr} (D). Condições da análise: colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de
 588 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da. Material aplicado: 200 μ g em 200 μ L; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: NaNO₃ 0,1 M
 589 contendo azida sódica 0,003%, pressão de 1422 psi a 37 °C.
 590



591
 592
 593
 594
 595
 596
 597

Tabela 1- Peso, porcentagem de açúcar total (AT) e proteínas totais (PT), Mw/Mn (grau de polidispersividade) e composição monossacarídica dos polissacarídeos secretados pelos fungos *N. parvum*, *Fusarium* sp e *C. gloeosporioides*.

Micro-organismo	EPS (mg)	AT (%)	PT (%)	Mw/Mn	Composição monossacarídica (%)		
					Gal	Glc	Man
<i>N. parvum</i> _{sobr}	140,0	98,0	2,0	1,4	23	64	13
<i>Fusarium</i> sp _{sobr}	116,0	98,0	2,0	1,5	03	02	95
<i>C. gloeosporioides</i> _{sobr}	178,0	99,0	1,0	---	14	78	08
<i>C. gloeosporioides</i> _{prec}	114,5	99,0	1,0	1,6	---	100	---

598 EPS (mg): exopolissacarídeo liofilizado
 599
 600
 601

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **ANGELICA AUGUSTA GRIGOLI DOMINATO**, RA nº: 152061-1, RG nº 154.520.263, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 20/01/2017, a tese intitulada ***Produção de Exopolissacarídeos pelos fungos Neofusicoccum parvum, Fusarium sp, Colletotrichum gloeosporioides: caracterização química e aplicação biológica***, junto ao Programa de Pós Graduação em MICROBIOLOGIA, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

São José do Rio Preto, 20 de janeiro de 2017


m Rosemar Rosa de Carvalho Brena
Supervisor Técnico de Seção
Seção Técnica de Pós-Graduação