

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 14/08/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Samara Marrye Aguiar Alexandre Polido

**Caracterização química e avaliação citotóxica de
heteropolissacarídeos dos fungos *Colletotrichum
gloeosporioides* e *Fusarium sp***

São José do Rio Preto
2019

Samara Marrye Aguiar Alexandre Polido

**Caracterização química e avaliação citotóxica de
heteropolissacarídeos dos fungos *Colletotrichum*
gloeosporioides e *Fusarium* sp**

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

Financiadora: CAPES

Orientadora:

Profª Drª. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva.

Co-orientadora:

Profª Drª. Ana Flora Dalberto Vasconcelos.

São José do Rio Preto
2019

A382c

Alexandre-Polido, Samara Marrye Aguiar

Caracterização química e avaliação citotóxica de heteropolissacarídeos dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp / Samara Marrye Aguiar

Alexandre-Polido. -- São José do Rio Preto, 2019

104 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva

Coorientadora: Ana Flora Dalberto Vasconcelos

1. Química. 2. Polissacarídeos fúngicos. 3. Cromatografia. 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Citotoxicidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



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

**Caracterização química e avaliação citotóxica de
heteropolissacarídeos dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e
*Fusarium sp***

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª Dr^ª. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva
UNESP – Presidente Prudente
Orientadora

Prof^ª Dr^ª. Ana Maria Pires
UNESP – Presidente Prudente

Prof^ª Dr^ª. Elaine Rosechrer Carbonero
UFG – Catalão

Prof^ª Dr^ª. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi
UEL – Londrina

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

São José do Rio Preto
14 de Agosto de 2019

À Deus, por todo Seu amor e cuidado.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sempre me amparar, por não ter deixado eu desistir! Por ter segurado minha mão e me conduzido durante todos esses anos de doutorado! Por ser meu confidente, meu amigo, por me dar muito mais do que mereço! Pela sua misericórdia, por sempre se preocupar em colocar pessoas boas no meu caminho! Obrigada Senhor! Nós conseguimos!

À minha **mãe Josefina**, que orou muito por mim, me fortalecendo espiritualmente pra que eu conseguisse enfrentar todos os desafios que apareceram! Mãe sua compreensão nos meus momentos de fraqueza me fortaleciam, saber que eu tinha um porto seguro me deu conforto pra continuar, isso fez muita diferença. Se hoje a senhora tem uma filha Doutora, é porque ela teve uma mãe que orou por ela! Obrigada! Te amo muito!

À **meu pai**, que plantou uma semente no meu coração quando eu era criança que dizia: você precisa estudar, o estudo é o único bem que ninguém pode te tirar! Pai que bom que ouvi seus conselhos! Obrigada por me encorajar e orar por mim! Agradeço também a **Edna**, que é uma pessoa maravilhosa e sempre me trata com carinho! Amo vocês!

À minha **orientadora profª Dra. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva**! Profª sou muito grata a Deus por Ele ter me direcionado para seu laboratório e permitido que eu aprendesse com a senhora todos esses anos! Tenho certeza que fui privilegiada, a senhora cumpriu seu papel de orientadora com maestria, sempre esteve no laboratório acompanhando o andamento do trabalho, me ajudou muitas vezes em experimentos que eu nunca havia feito, ficou até tarde pra me fazer companhia e dar carona, trabalhou finais de semana comigo quando o prazo estava curto, me apresentou o mundo dos carboidratos e da cromatografia, me ensinou a fazer pesquisa e me deu muitos conselhos, para o trabalho e para a vida! Obrigada! Que feliz eu fui em ter uma profissional como a senhora para me espelhar! Não posso deixar de agradecer o **prof. Dr. João Fernando Custódio da Silva**, que direta/indiretamente contribuiu com meu trabalho, levando equipamentos para arrumar (em plena copa do mundo), buscando professor da banca na estrada...dentre outras coisas. Muito obrigada!

À minha **co-orientadora profª Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos**, por ter me ensinado cultivar os fungos, sempre se preocupando com meus experimentos e me acompanhando. Profª nunca vou me esquecer do dia que a senhora ia viajar e mesmo assim, foi fazer inóculo comigo. Obrigada por nunca ter me abandonado nos momentos que eu precisei e ter me acalmado naqueles que eu estava apavorada! Por toda ajuda, auxílio e companhia durante as análises no “nosso querido” GPC! Por todas as caronas (que facilitavam minha vida) e por ser essa pessoa com um coração generoso e humano. Obrigada por tudo!

Ao meu **marido Johnny**, por ter “entrado” no doutorado junto comigo. Saber que você estava me apoiando me fortaleceu! Amor muito obrigada por ter sido tão compreensível e um super parceiro em todas as minhas escolhas! Eu sei que eu sou MUITO privilegiada por isso! Muito obrigada por valorizar o que eu faço, por ter me encorajado nos momentos que precisei, por me entender e não me cobrar, principalmente nesta fase final. O que eu mais quero a partir de agora é que possamos ser um “casal normal”, onde você não precise mais passar as suas férias trancado em casa porque sua esposa tem que escrever! Você é especial, e eu sou muito feliz por Deus ter nos colocado no mesmo caminho! Te amo muito!

Ao meu **irmão Victor Hugo**, por trazer leveza a minha vida! Por nunca ter cobrado minhas ausências e torcer por mim! A Tata ama você!

À minha **irmã Ângela** que me encorajou e torceu por mim!

Ao meu **avô Seu Aristides (in memorian)** por todo amor e carinho que o senhor me deu durante sua vida! Vô obrigada por sempre orar por mim! Eu te amo muito, o senhor foi uma das pessoas mais especiais que eu conheci. À minha vó, Dona Morena, por sempre se preocupar comigo, me entender, orar e dar ótimos conselhos! Vó a senhora é a alegria da nossa família, eu te amo muito!

À minha **prima-irmã Monica**, por todo incentivo e inúmeras orações! Mo através de você conheci pessoas especiais que me fizeram companhia durante esses anos. Muito obrigada por sempre me ouvir e me dar conselhos sábios. Tenho muito orgulho da mulher que você esta se tornando, te amo merimã! Agradeço também ao **Gabriel**, que orou muitas vezes por mim! Obrigada, sem pessoas como vocês, que oram pelas outras, não chegamos muito longe!

À minha **prima (irmã mais nova) Maria Helena**, por estar sempre por perto, cuidando do Victor. Por todas as vezes que você ia com minha mãe me levar em Andradina. Por me fazer companhia nos finais de semana. Te amo merimã Mary Jane!

À minha **prima Camila**, por nossa amizade! Por ouvir meus desabafos sem julgamentos, me fazendo ver outros caminhos, fazendo com que eu me cobrasse menos. Cá você é a irmã mais velha que eu não tive! Que felicidade ter você na minha vida desde sempre, pra poder compartilhar tudo, sem cobranças! Só aproveitar os preciosos e poucos momentos que temos!

Aos meus demais **primos** (em especial, **Jota e Fabinho**) por toda torcida e momentos de alegria. Amo vocês!

Aos meus tios, **Edinho e Sérgio**, por me tratarem com carinho e torcerem por mim! Às minhas **tias Cida, Dada, Rosa e Vanda**, por tantas orações, conselhos e torcida! Em especial agradeço à **tia Vanda**, por todo o carinho comigo e com o Victor, por me tratar como filha e me encher de alegria! Agradeço também ao Laércio, pelo carinho e por trazer a nossa família momentos de descontração.

À **minha sogra (Dona Célia)** e **meu sogro (Seu João)**, que sempre respeitaram minhas decisões e me tratam com carinho!

À **Ariane, Jéssica e Nagyla**, por terem sido ótimas companhias no período que moramos juntas. **Jeh**, foi muito bom conviver com você no laboratório, onde dividimos alegrias e tristezas. Muito obrigada por toda força que você me deu nos momentos que precisei! **Nah**, muito obrigada por todas as conversas, ouvir meus desabafos, me dar conselhos pra viver a vida de forma mais inteligente e por ter permanecido no apartamento mesmo quando o LLuMeS foi para o Morumbi. Agradeço também seus pais, **Silvia e Carlito**, por me tratarem tão bem e nos ajudar em diversos momentos.

À minha **amiga Gi queridinha!** Gi muito obrigada por todas nossas conversas, por levar nossa amizade de maneira leve e sem cobranças. Obrigada pela amiga que você é, mesmo estando longe, se faz presente!

À minha **amiga Andreza**, pela companhia nas idas a igreja, pelas conversas (sempre me encorajando), orações e torcida!

À **Fer**, que se tornou uma grande amiga. Fer muito obrigada por todas as conversas, por ir no laboratório me visitar enquanto eu fazia colunas. Obrigada por sempre me animar!

Ao **Luis**, por todas conversas, inúmeros favores e amizade! Aproveito para agradecer a **Renata** e o **Gleyson**, que sem querer, me faziam companhia quando passavam pelo corredor.

À **Eliane e Luluzinha**, pela amizade e torcida!

Às queridas **Alexandra Vasconcelos, Cláudia Macarini e Maria Ferreira** que sempre oram por mim!

Aos irmãos da Primeira Igreja Batista de Presidente Prudente, por cuidarem da PIBPP com carinho, e fazerem com que pessoas como eu, que esta longe da família, tenha um lugar seguro e feliz para ir. Agradeço em especial a **Lislie** e a **Shellei** pela amizade! Meninas vocês são pessoas especiais e que fazem muito bem a quem convive com vocês. Muito obrigada por todas as orações, caronas e por permitir que eu tivesse bons momentos. Agradeço também ao **Pastor Edson Borges de Souza** e sua esposa **Maria Edith**, por serem sempre tão atenciosos comigo.

Às **amigas do laboratório** de Química de Carboidratos do DQB: **Aline e Jéssica** (muito obrigada por me ajudarem durante os cultivos e nos momentos que precisei!), **Angélica** (pelos conselhos, conversas, risadas e bolos!), **Carol Machado** e **Carol Oliveira** (meninas vocês foram uma grata surpresa no período que eu estava finalizando os experimentos, me deram uma injeção de ânimo no momento certo, muito obrigada por toda ajuda!).

À **querida Marilsa de Stefani Cardoso**! Má que privilégio ter aprendido trabalhar no laboratório com você! Muito obrigada por me ensinar a ser uma profissional metódica e responsável! Obrigada por se preocupar comigo, pelos conselhos e palavras de incentivo!

À minha dupla querida: **Júlia e Giulia**. Meninas tenho certeza que Deus proporcionou nosso encontro porque Ele sabia que a alegria de vocês me faria muito bem no meu último ano em Prudente! Muito obrigada, vocês foram ótimas companhias e se tornaram especiais para mim!

À **Dona Carmen** e seu **Joaquim**, por me acolherem no primeiro e último ano, foi a melhor decisão finalizar meu doutorado morando na pensão! Obrigada por tudo!

Aos colegas do LLuMeS, **Alessandra, Airton e Camila**, pela ajuda em vários momentos. Agradeço em especial o Airton que me ajudou muito durante a disciplina de Inorgânica Avançada. Você é uma pessoa inteligente, que tem dom pra ensinar e é humilde. Por isso, desejo muito que você alcance seus sonhos e tenha um futuro brilhante!

À **profª Dra. Elaine Rosechrer Carbonero**, do Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás, regional Catalão, pelas análises de CG-EM e RMN da fração P_{II-F}. Profª muito obrigada por me ajudar a interpretar as análises, por sempre responder minhas dúvidas e se mostrar disposta a ajudar.

Ao **prof. Dr. Miguel Daniel Noseda**, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelas análises de CG-EM e RMN da fração P_{IV-C}. Aproveito para agradecer a Profª Dra. Luciana Garcia Ferreira, pelas análises e experimentos e a Profª Dra. Mariana Mazetto de Carvalho, pelo envio das análises.

Ao **prof. Dr. Aldo Eloizo Job**, do Departamento de Física da UNESP-FCT, por disponibilizar seu laboratório para os ensaios biológicos e à **profª Dra. Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante**, por realizar os ensaios junto comigo. Dalita muito obrigada por tudo, sua energia tornou os experimentos mais leves.

À **profª Dra. Ana Maria Pires** e a **profª Dra. Elaine Rosechrer Carbonero**, pela disponibilidade em participar das bancas de qualificação e defesa. Suas contribuições foram muito importantes para o trabalho. Agradeço

também a **profª Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi** e ao **prof. Dr. Roberto da Silva** por contribuírem na banca da defesa.

À **Teacher Fernanda Rotta**, que me ajudou muito na preparação para o exame de proficiência.

Às **secretárias do DQB e DF: Angélica, Juvanir e Fernanda** e as **funcionárias Dona Margarida e Tatiane**.

Obrigada por sempre me ajudarem quando precisei, pelas conversas e torcida!

Aos **funcionários da Central de laboratórios de Química da FCT: Sidney**, muito obrigada por sempre me ajudar quando eu solicitei! Obrigada pelas conversas animadoras e torcida! **Gabriel**, desde a graduação você me ajudou em diversos momentos. Muito obrigada! **Murillo e Paulo**, obrigada por ajudarem sempre que precisei.

Aos **funcionários do IBILCE**, em especial à **Alíria, Felipe, Mauro e Silvia (pós-graduação)**, e à **Luciane e Vivian (biblioteca)**, por sempre responderem minhas dúvidas e ajudar quando necessário.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química**, em especial o **prof. Luis Octávio Regasini**, que sempre respondeu com prontidão meus e-mails.

Aos **professores do curso de graduação em Química da Unesp (Presidente Prudente)** que preparam seus alunos para os principais processos seletivos do país.

Aos **funcionários da UNESP-FCT**: graças a vocês, a FCT funciona mesmo diante das dificuldades! Obrigada por cuidarem do local que foi minha casa por 11 anos com carinho!

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

“Porque eu, o Senhor, teu Deus, te tomo pela tua mão direita, e te digo: não temas, que eu te ajudo”.

Isaías 41.13, Bíblia.

RESUMO

Muitas pesquisas apontam que moléculas naturais, como polissacarídeos extraídos de fungos, podem ser aplicados em diferentes ensaios biológicos. Embora existam trabalhos com os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp, relacionados com produção de metabólitos ou com fitopatogenicidade, a lacuna sobre a composição química da biomassa desses organismos ainda existe. Assim, este trabalho teve como objetivo principal realizar estudos inéditos para esclarecer essa composição, focando nos polissacarídeos. Isso irá fornecer dados adicionais sobre os micro-organismos, além de disponibilizar novas moléculas para ensaios biológicos. Para isso, os micro-organismos foram cultivados e suas biomassas submetidas a procedimentos de extrações etanólica e aquosa. Os extratos aquosos foram tratados com ciclos de congelamento e descongelamento, diálise e precipitação com etanol, resultando nos precipitados etanólicos do *C. gloeosporioides* (PE_{H2O-C}) e do *Fusarium* sp (PE_{H2O-F}). Ambos foram purificados por cromatografia de filtração em gel, onde o PE_{H2O-C} foi separado em cinco frações, com a P_{IV-C} selecionada para os demais estudos. As análises de caracterização química (por HPAEC/PAD, CG-EM e RMN) revelaram que P_{IV-C} possui galactose e glucose como componentes majoritários, sendo a cadeia principal formada por unidades β-D-galactofuranosídicas ligadas em (1→5) e (1→6), com algumas dessas últimas unidades substituídas em O-3 por resíduos α-D-glucopiranosídicos. A cromatografia de filtração em gel separou o PE_{H2O-F} em três frações, sendo a P_{II-F} selecionada para os estudos de caracterização. As análises mostraram que P_{II-F} possui manose e galactose como monossacarídeos principais e que se trata de uma β-D-galactofuranana 1→6 com substituição em O-2, principalmente, por resíduos α-D-manopiranosídicos 2-O- ligados. Testes de citotoxicidade realizados com P_{IV-C} e P_{II-F} mostraram que a viabilidade das células CHO-K1 não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a viabilidade do controle negativo, nos tempos experimentais de 24 e 48 horas. Além disso, o teste de genotoxicidade com a fração P_{II-F} mostrou que o heteropolissacarídeo não causou danos significativos ao DNA das células CHO-K1. Esses resultados apontam para novas perspectivas de estudos com os polissacarídeos presentes nas frações P_{IV-C} e P_{II-F}, onde poderão ser investigadas aplicações para essas moléculas.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fusarium* sp. Galactofuranana. Espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C. Ensaio do MTT.

ABSTRACT

Many researches suggest that natural molecules as fungal polysaccharides can be applied in different biological assays. Although there are works with *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium* sp related to metabolite production or phytopathogenicity, there still is a gap on the chemical composition of the biomass of these organisms. Thus, the main goal of this work was to performed unpublished studies to clarify this composition as for polysaccharides. This will provide additional data on microorganisms and new molecules for biological assays. For this, the fungi were cultivated and their biomass submitted to ethanolic and aqueous extraction procedures. The aqueous extracts were submitted to freeze-thaw cycles, dialysis and precipitation with ethanol, resulting in ethanolic precipitate from *C. gloeosporioides* and *Fusarium* sp named, respectively, PE_{H2O-C} and PE_{H2O-F}. These materials were purified by gel filtration chromatography and the procedure separated the PE_{H2O-C} fraction into five peaks being the P_{IV-C} selected for research. Chemical characterization analyses (HPAEC/PAD, GC-MS and NMR) revealed that galactose and glucose were the main components and the polysaccharide is a (1→5, 1→6) linked-β-D-Galf main chain partially substituted in O-3 by α-D-glucopyranosyl residues. The gel permeation chromatography separated the PE_{H2O-F} in three peaks and P_{II-F} was selected for characterization studies. The analysis from P_{II-F} showed mannose and galactose as the main monosaccharides and the polysaccharide is (1→6) linked-β-D-Galf main chain partially substituted in O-2 by α-(1→2) linked mannopyranosyl residues. Cytotoxicity assays performed with P_{IV-C} and P_{II-F}, showed that there was no significant difference in the viability of CHO-K1 cells, when compared to the negative control, in the experimental time of 24 and 48 hours. The genotoxicity assay showed that P_{II-F} did not cause significant damage to the DNA of CHO-K1 cells. These results showed that new perspectives of studies with polysaccharides from fractions P_{IV-C} and P_{II-F} where applications for these molecules could be investigated.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fusarium* sp. Galactofuranan. ¹H e ¹³C NMR Spectroscopy. MTT Assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da parede celular fúngica.....	24
Figura 2- Polissacarídeos da parede celular do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> e da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Figura 3- Estrutura proposta para a α -manana obtida do extrato alcalino de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	29
Figura 4- Sintomas de antracnose provocada por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em: (a) folhas de chuchu (Fonte: LIMA, 2013); (b) nos frutos de mamão (Fonte: HALFELD-VIERA, 2010) e (c) manga (Fonte: AGRIPORTICUS, 2015).....	31
Figura 5- Doenças provocadas por fungos do gênero <i>Fusarium</i> . (a) podridões na batata (Fonte: LOPES, 2018) e no (b) milho (Fonte: PEREIRA DE MELO, 2012) e (c) fusariose no abacaxi (Fonte: VENTURA, COSTA, 2008).....	34
Figura 6- Cultivo do micro-organismo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> : (a) micro-organismo crescido da placa de Petri; (b) pré-inóculo de 48 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm; (c-e) inóculo de 72 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm.....	40
Figura 7- Cultivo do micro-organismo <i>Fusarium</i> sp: (a) micro-organismo crescido da placa de Petri; (b) pré-inóculo de 48 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm; (c-e) inóculo de 72 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm.....	41
Figura 8- Biomassa <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sendo lavada (a), após a lavagem (b), e sendo macerada (c-d).....	42
Figura 9- (a) Biomassa <i>Fusarium</i> sp; b) biomassa sendo lavada; (c) águas provenientes do tratamento da biomassa com água; (d) biomassa lavada, (e) liofilizada e sendo macerada (f).....	42
Figura 10- Extração aquosa da biomassa do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1:20 m/v, 100 °C, 4h, 4x).....	45
Figura 11- Materiais provenientes do processo de congelamento e descongelamento dos extratos aquosos do <i>C. gloeosporioides</i> (a) e do (b) <i>Fusarium</i> sp.....	46
Figura 12- Sequência das etapas realizadas para obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente metilados das frações P _{IV-C} e P _{II-F}	52
Figura 13- Sequência das principais etapas do ensaio do MTT (MOSMANN, 1983).....	55
Figura 14- Sequência das principais etapas do ensaio do Cometa (SINGH et al., 1988).....	58
Figura 15- Protocolo dos procedimentos experimentais para obtenção dos polissacarídeos provenientes da biomassa do (a) <i>C. gloeosporioides</i> e do (b) <i>Fusarium</i> sp.....	61
Figura 16- (a) Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida do PE _{H₂O-C} por HPAEC/PAD. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Condições de hidrólise: TFA 4 mol/L, 4 h, 100 °C. (b) Perfil de eluição do PE _{H₂O-C} por HPSEC/RID. Alíquotas: 200 μ g em 200 μ L; Fluxo: 0,6 mL/min; Eluente: NaNO ₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,03%.....	64

Figura 17- Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do PE _{H2O-C} . Vol. coluna: 173 mL, Material aplicado: 8 mg; Fluxo: 1,0 mL/min; Vol. fração: 2,5 mL; Vol. morto: 55 mL.	65
Figura 18- Perfil de eluição por HPSEC/RID das frações obtidas na coluna Sepharose CL-6B a partir do PE _{H2O-C} . Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de 7.10 ⁶ , 4.10 ⁵ , 8.10 ⁴ e 5.10 ³ Da. Total de material aplicado: 200 µg em 200 µL; Fluxo: 0,6 mL/min a 37 °C; Eluente: NaNO ₃ 0,1 mol/L contendo azida sódica 0,03%.	67
Figura 19- Espectros de RMN- ¹ H (a), RMN- ¹³ C (b) e região do RMN- ¹³ C-DEPT (c) da fração P _{IV-C} obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do <i>C. gloeosporioides</i>	72
Figura 20- Espectro bidimensional heteronuclear (HSQC) da fração P _{IV-C} obtida do extrato aquoso do <i>C. gloeosporioides</i>	73
Figura 21- Regiões selecionadas dos espectros COSY e HMBC da fração P _{IV-C} : (a) acoplamento entre H-1/H-2 e (b) H-2/H-3 das unidades β-D-Galf-(1→6) ligadas; (c) acoplamento entre o C-6 das unidades β-D-Galf-(1→6) ligadas com o H-1 das unidades β-D-Galf-(1→5) ligadas e acoplamento entre C-3 das unidades β-D-Galf-(1→6) ligadas com H-1 das unidades α-D-Glcp.	74
Figura 22- Possíveis resíduos presentes na estrutura da fração P _{IV-C}	75
Figura 23- (a) Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida do PE _{H2O-F} por HPAEC/PAD. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Condições de hidrólise: TFA 4 mol/L, 6 h, 100 °C. (b) Perfil de eluição do PE _{H2O-F} por HPSEC/RID. Alíquotas: 200 µg em 200 µL; Fluxo: 0,6 mL/min; Eluente: NaNO ₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,03%.	76
Figura 24- Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do PE _{H2O-F} . Vol. coluna: 173 mL, Material aplicado: 8 mg; Fluxo: 1,0 mL/min; Vol. fração: 2,5 mL; Vol. morto: 55,0 mL.	77
Figura 25- Perfil de eluição por HPSEC/RID das frações obtidas na coluna Sepharose CL-6B a partir do PE _{H2O-F} . Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de 7.10 ⁶ , 4.10 ⁵ , 8.10 ⁴ e 5.10 ³ Da. Total de material aplicado: 200 µg em 200 µL; Fluxo: 0,6 mL/min a 37 °C; Eluente: NaNO ₃ 0,1 mol/L contendo azida sódica 0,03%.	78
Figura 26- Análise por HPAEC/PAD dos produtos de hidrólise das frações P _{I-F} , P _{II-F} , P _{II-AF} e P _{II-BF} . Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 4 mol/L, 6 h, 100 °C. Padrões de açúcares neutros: L- fucose, L-ramnose, L-arabinose, D-galactose, D-glucose e D-manose.	80
Figura 27- Espectros de: (a) RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C (b) da fração P _{II-F} , obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do <i>Fusarium</i> sp.	83
Figura 28- Espectro de HSQC-DEPT da fração P _{II-F} , obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do <i>Fusarium</i> sp.	85
Figura 29- Espectro de HSQC-TOCSY (editado) da fração P _{II-F} , obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do <i>Fusarium</i> sp.	85
Figura 30- Possíveis resíduos presentes na estrutura da fração P _{II-F}	87
Figura 31- Viabilidade celular (%) das linhagens CHO-K1 expostas às diferentes concentrações da fração P _{IV-C} ou somente ao meio de cultura (CN- linha tracejada) por 24 e 48 horas.	88

Figura 32- Imagens das células CHO-K1 expostas às diferentes concentrações da fração P _{IV-C} após o período de 24 e 48 horas durante as análises de viabilidade celular pelo ensaio do MTT. As células expostas somente ao meio de cultura (CN) e ao Triton-X também são mostradas.	89
Figura 33- Viabilidade celular (%) das linhagens CHO-K1 expostas às diferentes concentrações da fração P _{II-F} ou somente ao meio de cultura (CN- linha tracejada) por 24 e 48 horas.	90
Figura 34- Imagens das células CHO-K1 expostas às diferentes concentrações da fração P _{II-F} após o período de 24 e 48 horas durante as análises de viabilidade celular pelo ensaio do MTT. As células expostas somente ao meio de cultura (CN) e ao Triton-X (CP) também são mostradas.....	91
Figura 35- Genotoxicidade da fração P _{II-F} sobre as células CHO-K1.	93
Figura 36- Imagens dos nucleoides das células CHO-K1 expostas às diferentes concentrações da fração P _{II-F} após o período de 48 horas durante as análises de genotoxicidade pelo ensaio do cometa. Os nucleoides expostos somente ao meio de cultura (CN) e a ciclofosfamida (CP) também são mostrados.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura de polissacarídeos provenientes de fungos ascomicetos.	28
Tabela 2- Quantificação de açúcar total e proteínas do PE _{H2O-C} e do PE _{H2O-F}	63
Tabela 3- Composição monossacarídica do PE _{H2O-C}	64
Tabela 4- Composição monossacarídica após hidrólise ácida da fração solúvel do extrato aquoso (PE _{H2O-C}) e das frações homogêneas (P _{IV-C} e P _{V-C}) provenientes da cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	68
Tabela 5- Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da fração P _{IV-C}	70
Tabela 6- Assinalamentos de C/H da fração P _{IV-C} obtida do extrato aquoso do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	75
Tabela 7- Quantificações de açúcares totais, proteínas, massas moleculares aparentes e índices de polidispersividade das frações obtidas na purificação do PE _{H2O-F}	79
Tabela 8- Análise da composição monossacarídica (%) por HPAEC/PAD após hidrólise ácida das frações consideradas puras do PE _{H2O-F}	79
Tabela 9- Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da fração P _{II-F}	81
Tabela 10- Assinalamentos de C/H da fração P _{II-F} obtida do extrato aquoso do <i>Fusarium sp.</i>	86

LISTA DE ABREVIações, FóRMULAS QUÍMICAS E SIGLAS

Ara	-Arabinose
CG-EM	-Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
<i>C. gloeosporioides</i>	- <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
COSY	-Correlation spectroscopy
DEPT	-Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	-Dimetil sulfóxido
D ₂ O	-Água deuterada/Óxido de deutério
<i>f</i>	-Furanosídica
Glc	-Glucose
Gal	-Galactose
HMBC	-Heteronuclear multiple bond correlation
HPAEC/PAD	-Cromatografia líquida de íons a alta pressão, com detecção amperométrica pulsada
HPSEC/RID	-Cromatografia de exclusão estérica a alta pressão acoplada com detector de índice de refração
HSQC	-Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy
Man	-Manose
MWCO	-Massa molecular de corte
m/z	-Relação massa/carga
NaBD ₄	-Borohidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	-Borohidreto de sódio
<i>p</i>	-Piranosídica
PE _{H2O-C}	-Precipitado etanólico do extrato aquoso do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
PE _{H2O-F}	-Precipitado etanólico do extrato aquoso do <i>Fusarium sp</i>

RMN- ¹³ C	-Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	-Ressonância magnética nuclear de próton
TFA	-Ácido trifluoroacético
TOCSY	-Total correlation spectroscopy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 FUNGOS.....	21
2.1.1 Ascomicetos	22
2.2 PAREDE CELULAR DOS FUNGOS.....	22
2.2.1 Composição da parede celular: polissacarídeos	23
2.2.3 A composição da parede celular é mutável	25
2.3 POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS ASCOMICETOS	26
2.4 POLISSACARÍDEOS DE ASCOMICETOS - ESTUDOS DE POSSÍVEIS APLICAÇÕES	29
2.5 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	31
2.6 <i>Fusarium</i> sp	33
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAIS.....	37
4.1.1 Micro-organismos	37
4.1.2 Reagentes.....	37
4.1.3 Equipamentos	38
4.2 MÉTODOS GERAIS	39
4.2.1 Manutenção dos micro-organismos	39
4.2.2 Cultivo dos micro-organismos para obtenção da biomassa	39
4.2.3 Isolamento da biomassa fúngica.....	41
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	43
4.3.1 Método de Bradford	43
4.3.2 Método do Fenol-Ácido sulfúrico.....	43
4.4 EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS	44
4.4.1 Extração etanólica	44
4.4.2 Extração aquosa a quente.....	44

4.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS	45
4.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos por tratamentos consecutivos de congelamento e descongelamento.....	45
4.5.2 Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B	46
4.5.3 Teste de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID).....	47
4.5.4 Hidrólise ácida total	48
4.5.5 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC/PAD).....	48
4.5.6 Determinação da posição e tipos de ligações glicosídicas dos polissacarídeos purificados.....	49
4.5.6.1 Metilação pelo Método de Ciucanu e Kerek (1984)	49
4.5.6.2 Hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos metilados.....	50
4.5.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	53
4.6 TESTES BIOLÓGICOS: ATIVIDADE CITOTÓXICA E ENSAIO DO COMETA.....	53
4.6.1 Linhagem celular	53
4.6.2 Preparo das amostras para o teste de toxicidade e genotoxicidade.....	54
4.6.3 Protocolo de exposição e ensaio de citotoxicidade	54
4.6.4 Ensaio de genotoxicidade - Ensaio do cometa.....	55
Fonte: Adaptado a partir de Singh e colaboradores (1988).....	58
4.6.5 Análises estatísticas.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA.....	59
5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	60
5.2.1 Extração etanólica	60
5.2.2 Extração aquosa a quente.....	62
5.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS	62
5.3.1 Resultados referentes ao precipitado etanólico do extrato aquoso do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (PE _{H₂O-C})	63
5.3.1.1 Análise da composição monossacarídica e do grau de homogeneidade do PE _{H₂O-C}	63
5.3.1.2 Purificação do PE _{H₂O-C} por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B.....	65
5.3.1.3 Determinação da massa molecular e grau de polidispersividade da fração P _{IV-C}	68
5.3.1.4 Determinação das posições das ligações glicosídicas da fração P _{IV-C} por CG-EM	69

5.3.1.4 Caracterização química por RMN da fração P _{IV-C}	70
5.3.2 Resultados referentes ao precipitado etanólico do extrato aquoso do <i>Fusarium</i> sp (PE _{H₂O-F})	76
5.3.2.1 Análise da composição monossacarídica e do grau de homogeneidade do PE _{H₂O-F}	76
5.3.2.2 Purificação do PE _{H₂O-F} por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B	77
5.3.2.3 Determinação das posições das ligações glicosídicas da fração P _{II-F} por CG-EM	81
5.3.2.4 Caracterização química por RMN da fração P _{II-F}	82
.....	87
5.4 TESTES BIOLÓGICOS	87
5.4.1 Atividade citotóxica - Ensaio do MTT	87
5.4.1.1 Teste de viabilidade celular da fração P _{IV-C} obtida do extrato aquoso do <i>C. gloeosporioides</i> ..	87
5.4.1.2 Teste de viabilidade celular da fração P _{II-F} obtida do extrato aquoso do <i>Fusarium</i> sp	90
5.4.2 Atividade genotóxica - Ensaio do cometa	92
6 CONCLUSÕES	95
7 REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos carboidratos identificados na natureza está sob a forma de polissacarídeos. Essas moléculas, também conhecidas por glicanos, podem se diferenciar quanto à composição das unidades monossacarídicas que se repetem ao longo do polímero, nos tipos de ligações glicosídicas, no tamanho e no grau de ramificação das cadeias. Os polissacarídeos formados por um tipo predominante de monossacarídeo são chamados de homopolissacarídeos, como por exemplo, o amido e o glicogênio. Ambos possuem glucose em sua composição, e são utilizados como fontes de energia por animais. Já os polissacarídeos que possuem dois ou mais tipos de monômeros em sua estrutura, são denominados heteropolissacarídeos que, dentre as suas funções, oferecem suporte extracelular para os organismos dos reinos naturais (NELSON, COX, 2006).

Os polissacarídeos microbianos se destacam por apresentarem facilidades na sua obtenção. A possibilidade de cultivos sem a interferência de condições climáticas e o uso de espaço físico relativamente pequeno, tornam esses biopolímeros atraentes para aplicação. Pelo controle de parâmetros como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura, os polissacarídeos microbianos acabam apresentando menos heterogeneidade em suas propriedades físico-químicas (SOUZA, 2005).

Existe uma grande tendência em aplicar comercialmente polissacarídeos microbianos, tanto os isolados da biomassa e da parede celular dos fungos, quanto àqueles secretados por esses organismos. Isto porque moléculas biologicamente ativas como enzimas (SOUZA, OLIVEIRA, ANDRADE, 2008), manoproteínas (FERRACINI-SANTOS, SATO, 2009), lipídeos (ZEN et al., 2014) e principalmente polissacarídeos (BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018; GIAVASIS, 2014; WASSER, 2002), vem mostrando em pesquisas ao longo dos anos, que podem ser usadas nas diferentes áreas, como alimentícia, farmacêutica e ambiental.

Embora se encontre uma grande biodiversidade no reino Fungi, apenas cerca de 100.000 espécies de fungos foram descritas, das 1,5 milhões estimadas (MADIGAN et al., 2010). Portanto, muito ainda pode ser descoberto em relação a esses

organismos, inclusive sobre as moléculas que fazem parte da sua estrutura e que podem ter alguma aplicação biológica. Sendo assim, a ausência de estudos sobre polissacarídeos provenientes da biomassa dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp fizeram com que ambos fossem escolhidos para esta pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS

Fungos são organismos eucariotos produtores de esporos que utilizam compostos orgânicos como fontes de energia e carbono (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Grande parte desses organismos são multicelulares, gerando uma rede de filamentos de células conhecida por hifas. Essas hifas crescem unidas em uma dada superfície formando um conjunto chamado de micélio, que pode ser observado sem o uso do microscópio (MADIGAN et al., 2010).

Como organismos heterotróficos, os fungos suprem suas necessidades nutricionais por absorção. Para isso, eles secretam enzimas capazes de hidrolisar compostos orgânicos complexos (como polissacarídeos e proteínas) em seus respectivos monômeros. Dessa forma, as moléculas menores conseguem atravessar a membrana plasmática, servindo como fonte de energia, carbono e outros nutrientes para o fungo. A possibilidade de ocupar áreas amplas através da expansão e ramificação permite que o micélio fúngico alcance maior quantidade de nutrientes (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Os fungos podem ser considerados os principais agentes de decomposição na Terra: no ecossistema florestal eles se destacam na decomposição da celulose e lignina. Eles também degradam matéria orgânica morta como folhas, troncos, corpos de plantas e animais, resultando na reciclagem de nutrientes que são devolvidos ao ecossistema (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Em relação ao *habitat*, grande parte dos fungos encontra-se em ambientes terrestres, sendo a maioria aeróbica. A reprodução da espécie ocorre através dos

6 CONCLUSÕES

A partir de procedimentos de extração e purificação foi possível isolar polissacarídeos inéditos provenientes da biomassa dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp.

Do *C. gloeosporioides*, o polissacarídeo considerado homogêneo foi caracterizado com a cadeia principal formada por unidades β -D-Galf (1 \rightarrow 5) e (1 \rightarrow 6) ligadas, as últimas podendo ser substituídas em O-3 por unidades α -D-Glcp.

Do *Fusarium* sp, o polissacarídeo estudado foi caracterizado com uma estrutura formada por unidades β -D-galactofuranosídicas (1 \rightarrow 6), com substituição em 2-O- por resíduos manopiranosídicos (1 \rightarrow 2) ligados. Mais raramente alguns deles tem Glcp ou Galf como terminais não redutores ou ainda uma unidade a mais de manose na ramificação (manotriose).

A presença de unidades galactofuranosídicas na estrutura dos polissacarídeos isolados do *C. gloeosporioides* e do *Fusarium* sp pode estar relacionada com o fato desses fungos serem patogênicos e pertencerem ao mesmo Filo.

O ensaio de citotoxicidade revelou que os heteropolissacarídeos não apresentam riscos nocivos para as células normais CHO-K1. Essa resposta sinaliza novas perspectivas de estudos futuros com testes toxicológicos tanto em outras linhagens de células normais como em células tumorais.

O ensaio de genotoxicidade com o heteropolissacarídeo isolado do *Fusarium* sp mostrou que ele não provocou danos ao DNA das células CHO-K1, reforçando a ideia da continuidade de testes com o heteropolissacarídeo.

7 REFERÊNCIAS

- AGRIPORTICUS. Antracnose em manga/Anthracnose on manga fruit, 2015. Disponível em: <<http://www.agronomicabr.com.br/agriporticus/detalhe.aspx?id=417>>. Acesso 22 julho 2018.
- AHRAZEM, O.; LEAL, J. A.; PRIETO, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus verruculosus* and *A. ruber*. *Carbohydrate Research*, v. 336, p. 325-328, 2001.
- AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GIMÉNEZ-ABÍAN, M. I.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Fungal cell wall polysaccharides isolated from *Discula destructiva* spp. *Carbohydrate Research*, v. 342, p. 1138-1143, 2007.
- ALEXANDRE, S. M. A.; CORRADI DA SILVA, M. L.; VASCONCELOS, A. F. D.; EXPOSTI, D. T. D.; TISCHER, C. A.; PRIETO, A.; DIAZ, D.; KANENO, R. *Rhizoctonia solani* fucomannogalactan: chemical characterization and antiproliferative activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115, p. 106-113, 2018.
- ALEXANDRE, S. M. A.; CORRADI DA SILVA, M. L.; VASCONCELOS, A. F. D.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; JOB, A. E.; FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R. Caracterização química e avaliação da citotoxicidade de um heteropolissacarídeo isolado da biomassa do *Colletotrichum gloeosporioides*. *Química Nova*, v. 42, n. 4, p. 405-411, 2019.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 117-137.
- BALDWIN, A. D.; KIICK, K. L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Biopolymers*, v. 94, p. 128-140, 2010.
- BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Research*, v. 95, p. 205-218, 1981.
- BATISTA, A. C. L.; SOUZA NETO, F. E.; PAIVA, W. S. Review of fungal chitosan: past, presente and perspectives in Brazil. *Polímeros*, v. 28, p. 275-283, 2018.
- BI, S.; JING, Y.; ZHOU, Q.; HU, X.; ZHU, J.; GUO, Z.; SONG, L.; YU, R. Structural elucidation and immunostimulatory activity of a new polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *Food and Function*, v. 9, p. 279-293, 2018.
- BÍBLIA. Bíblia sagrada contendo o antigo e novo testamento. Tradução de João Ferreira de Almeida. Edição com letras maiores, novo testamento em duas cores. Revista e corrigida. Santo André: Geográfica Editora, 2011.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wal. *BioEssays*, v. 28, p. 799-808, 2006.
- BOYER, R. F. *Modern experimental biochemistry*. 2 ed. Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1993. p. 59-114.

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

BRUMMER, Y.; CUI, S. W. Understanding carbohydrate analysis. In CUI, S. W. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. p. 67-104.

CHAMBERS, J. A. A.; RICKWOOD, D. *Biochemistry labfax*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1993. p. 49-68.

CIUCANU, I. KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, v. 131, p. 209-217, 1984.

CLAVAUD, C.; BEAUVAIS, A.; BARBIN, L.; MUNIER-LEHMANN, H.; LATGÉ, J. P. The composition of the culture medium influences the β -1,3-glucan metabolism of *Aspergillus fumigatus* and the antifungal activity of inhibitors of β -1,3-glucan synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 3428-3431, 2012.

CORDEIRO, L. M. C.; BEILKE, F.; BETTIM, F. L.; REINHARDT, V. F.; RATTMANN, Y. D.; IACOMINI, M. (1 \rightarrow 2) and (1 \rightarrow 6)-linked β -D-galactofuranan of microalga *Myrmecia biatorellae*, symbiotic partner of *Lobaria linita*. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 1779-1785, 2012.

CORRADI DA SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 793-798, 2008.

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.

CRUZ-QUIROZ, R.; ROUSSOS, S.; RODRÍGUES-HERRERA, R.; HERNANDEZ-CASTILHO, D.; AGUILAR, C. N. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, v. 4, p. 237-243, 2018.

CUI, S. W. Structural analysis of polysaccharides. In CUI, S. W. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. p. 105-160.

DOMINATO, A. A. G. Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*: caracterização química e atividade anticoagulante. São José do Rio Preto, 2017, 122p. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi, New York: Academic Press, 1980; 859 p. apud GOMES, U. D.; ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; RUBIN FILHO, C. J. Avaliação do desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) após colonização pelo fungo endofítico *Fusarium verticillioides*. Iniciação Científica CESUMAR, v. 15, n. 2, p. 131-137, 2013.

FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H. H. Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada. Química Nova, v. 32, p. 322-326, 2009.

FERREIRA, M. C.; VIEIRA, M. L. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; SALES JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; GIL, L. H. V. G.; CARVALHO, A. G. O.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compound of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis Aublet* (*Meliaceae*). Biochemical Systematics and Ecology, v. 59, p. 36-44, 2015.

FREE, S. J. Chapter Two - Fungal cell wall organization and biosynthesis. Advances in Genetics, v. 81, p. 33-82, 2013.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização, Semina: Ciências Agrárias, v. 30, p. 117-134, 2009.

GALINARI, E.; SABRY, D. A.; SASSAKI, G. L.; MACEDO, G. R.; PASSOS, F. M. L.; MANTOVANI, H. C.; ROCHA, H. A. O. Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -D-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. Carbohydrate Polymers, v. 157, p. 1298-1305, 2017.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Preliminary studies on cytotoxic effect of fungal taxol on cancer cell lines. African Journal of Biotechnology, v. 6, p. 1382-1386, 2007.

GE, Q.; ZHANG, A. Q.; SUN, P. L. Structural investigation of a novel water-soluble heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilát. Food Chemistry, v. 114, p. 391-395, 2009.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. Current Opinion in Biotechnology, v. 26, p. 162-173, 2014.

GOMES, U. D.; ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; RUBIN FILHO, C. J. Avaliação do desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) após colonização pelo fungo endofítico *Fusarium verticillioides*. Iniciação Científica CESUMAR, v. 15, n. 2, p. 131-137, 2013.

GORIN, P. A. J. Rationalization of carbon- 13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. Canadian Journal of Chemistry, v. 51, p. 2375-2383, 1973.

GORIN, P. A. J.; BARRETO-BERGTER, E. M.; CRUZ, F. S. The chemical structure of the D-galacto-D-mannan component of *Trypanosoma cruzi*: ^{13}C -N.M.R. shift dependence on structure of D-galactose to D-mannose linkage. Carbohydrate Research, v. 88, p. 177-188, 1981.

- GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*, v. 128, p. 119-132, 1984.
- GUO, S.; MAO, W.; LI, Y.; TIAN, J.; XU, J.; Structural elucidation of exopolysaccharide produced by fungus *Fusarium oxysporum* Y24-2. *Carbohydrate Research*, v. 365, p. 9-13, 2013.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. Doenças do mamoeiro. In HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; ARAÚJO, S. L. F. Principais doenças em cultivos de pequenas propriedades do entorno de boa vista. 1 ed. Boa Vista: Embrapa, Roraima, 2010. p. 7-8.
- HAN, X. Q.; WU, X. M.; CHAI, X. Y.; CHEN, D.; DAI, H.; DONG, H. L.; MA, Z. Z.; GAO, X. M.; TU, P. F. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sacordon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Food Research International*, v. 44, p. 489-493, 2011.
- HEESEMANN, L.; KOTZ, A.; ECHTENACHER, B.; BRONISZEWSKA, M.; ROUTIER, F.; HOFFMANN, P.; EBEL F. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, p. 523-530, 2011.
- IZQUIERDO-VEGA, J. A.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; BETANZOS-CABRERA, G.; SOSA-DELGADO, S. M.; SUMAYA-MARTÍNEZ, M. T.; MORALES-GONZÁLEZ, A.; PANAIAGUA-PÉREZ, R.; MADRIGAL-BUJADAR, E.; SANTILLÁN, E. M. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients*, v. 102, p. 1-27, 2017.
- IZYDORCZYK, M. Understanding the chemistry of food carbohydrates. In CUI, S. W. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. p. 2-66.
- JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical Communications*, n. 8, p. 1-73, 1976.
- JING, Y.; CUI, X.; CHEN, Z.; HUANG, L.; SONG, L.; LIU, T.; LV, W.; YU, R. Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p. 288-296, 2014.
- JOSEPH, J.; PANICKER, S. N.; JANARDHANAN, K. K. Protective effect of polysaccharide-protein complex from a polypore mushroom, *Phellinus rimosus* against radiation-induced oxidative stress. *Redox Report*, v. 17, p. 22-27, 2012.
- KEONG, L. C.; HALIM, A. S. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p. 1300-1313, 2009.
- KIM, Y. O.; PARK, H. W.; KIM, J. H.; LEE, J. Y.; MOON, S. H.; SHIN, C. S. Anti-cancer effect and structural characterization o fendo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences*, v. 79, p. 72-80, 2006.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun*, v. 3, p. 103-115, 1995.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, v. 66. P.279-290, 2007.

LATGÉ, J. P.; BEAUVAIS, A. Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology* v. 20, p. 111-117, 2014.

LEAL, J.A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M.; PRIETO, A. Structural elucidation of a cell wall fungal polysaccharide isolated from *Ustilagoidea virens*, a pathogenic fungus of *Oriza sativa* and *Zea mays*. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 2980-2984, 2008.

LI, P.; LUO, C.; SUN, W.; LU, S.; MOU, Y.; PENG, Y.; ZHOU, L. In vitro antioxidant activities of polysaccharides from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Dzf17. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, p. 5990-5993, 2011a.

LI, P.; MOU, Y.; SHAN, T.; XU, J.; LI, Y.; LU, S.; ZHOU, L. Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporum* Dzf17 on growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis*. *Molecules*, v. 16, p. 9003-9016, 2011b.

LIMA, M. L. P. Estudos em doenças de plantas – IFGoiano campus Urutaí, 2013. Disponível em: <<https://fitopatologia1.blogspot.com/2013/03/>>. Acesso em 22 julho 2018.

LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. *Methods in enzymology*, v. 28, p. 178-195, 1972.

LIU, F.; WANG, Z.; LIU, J.; LI, W.; Radioprotective effect of orally administered beta-D-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115, p. 572-579, 2018.

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

LOPES, C. A. Árvore do conhecimento batata. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2018. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/batata/arvore/CONT000gnc4knh302wx5ok0edacxlnqqvc0v.html>>. Acesso em 22 julho 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. Tradução: Andrea Queiroz Maranhão, Beatriz Dolabela de Lima, Cynthia Maria Kyaw. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 535-542.

MAKI, C. S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). Piracicaba, 2006, 127p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MALINI, M.; CAMARGO, M. S.; HERNANDES, L. C.; VARGAS-RECHIA, C. G.; VARANDA, E. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; MATSUMOTO, S. T.; ANTUNES, L. M. G.; CÓLUS, I. M. S. Chemopreventive effect and lack of genotoxicity and mutagenicity of the exopolysaccharide botryosphaeran on human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, v. 36, p. 18-15, 2016.

MARINO, C.; RINFLERCH, A.; LEDERKREMER, R. M. Galactofuranose antigens, a target for diagnosis of fungal infections in humans. *Future Science OA*, v. 3, p.1-14, 2017.

MARTINS, M. K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Tese (Doutorado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 3, p. 170-179, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOUYNA, I.; FONTAINE, T. Cell wall of *Aspergillus fumigatus*: a dynamics structure. In LAGTÉ, J. P.; STEINBACH, W. *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*. Washington: ASM Press, 2009, p. 169-183.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. Tradução: Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. p. 236-270.

PACKIARAJ, R.; JEYAKUMAR, S.; AYYAPPAN, N.; ADHIRAJAN, N.; PREMKUMAR, G.; RAJARATHINAM, K.; MUTHURAMKUMAR, S. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from endemic tree *Cinnamomum malabattrum*. *Studies in Fungi*, v. 1, p. 104-113, 2016.

PALEM, P. P. C.; KURIAKOSE, G. C.; JAYABASKARAN, C. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. *PLOS ONE*, v. 11, p. 1-22, 2015.

PARK, S. H.; CHOI, C. W.; SHIM, M. Y.; PARK, W. M.; HWANG, S. S.; KOO, J.M. Isolation and characterization of a clay-dispersing polysaccharide produced by the phytopathogenic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biotechnology Letter*, v. 23, p. 1719-1722, 2001.

PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. *Carbohydrate analysis: a practical approach*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1994. p. 73-124.

PEREIRA DE MELO, M. Estudos em doenças de plantas – IFGoiano campus Urutaí, 2012. Disponível em: <<https://fitopatologia1.blogspot.com/2012/10/>>. Acesso em 22 julho 2018.

RAJ, P.; KHAN, S. S.; MODAK, M.; CHAUHAN, D. Cytotoxic activity of secondary metabolite produced by endophytic fungus *Fusarium* sp. of *Crocus sativus*. *BMR Microbiology*, v. 1, p. 1-4, 2015.

REIS, R. L.; NEVES, N. M.; MANO, J. F.; GOMES, M. E.; MARQUES, A. P.; AZEVEDO, H. S. Natural-based polymers for biomedical applications. 1 ed. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2008. 832 p.

RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; BAGGIO, C. H.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SANTOS, A. R. S.; IACOMINI, M. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 761-769, 2013.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, v. 117, p. 753-761, 2015.

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

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, p. 223-234, 2005.

SILVA, I. Prospecção de celulasas dos fungos fitopatogênicos *Scytalidium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp. da palma forrageira em diferentes meios de cultura. Rio Largo, 2016, 58p. Dissertação (Mestrado em Energia da Biomassa). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2016.

SIMS, I. M.; CARNACHAN, S. M.; BELL, T. J.; HINKLEY, S. F. R. Methylation analysis of polysaccharides: technical advice. *Carbohydrate Polymers*, v. 188, p. 1-7, 2018.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R. SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3), (1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonaris*. *European Journal of Pharmacology*, v. 597, p. 86-91, 2008.

SOUZA, D. M. Estudo de parâmetros de fermentação na produção de biopolímeros por bactérias isoladas do solo e caracterização química dos grupamentos acetila e piruvato nos biopolímeros obtidos. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.

- SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 116-124, 2008.
- TAVARES, S. C. C. H.; COSTA, V. S. O.; SANTOS, V. F. C.; Manejo da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) na produção integrada de manga. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: Instruções Técnicas da Embrapa Semi-Árido, v. 65, p. 1-6, 2005.
- TERÇARIOLI, G. R.; PALEARI, L. M.; BAGAGLI, E. O incrível mundo dos fungos. São Paulo: Unesp, 2010. 125 p.
- TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, M. B.; BARRETO-BERGTER, E. Structures of phosphogalactomannans isolated from mycelia of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 225-230, 2002.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Tradução de Aristóbolo Mendes da Silva. Supervisão de Flávio Guimarães da Fonseca. v. 1, 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 330-331.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H. Estratégias de manejo para o controle de doenças de plantas: casos de sucesso em banana, abacaxi e morango. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008.
- VOGEL, H. J. A. A conveniente growth medium for *Neurospora crassa*. *Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42-47, 1956.
- WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 258-274, 2002.
- XU, X.; LEI, H.; MA, X.; LAI, T.; SONG, H.; SHI, X.; LI, J. Antifungal activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP) against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest mango fruit and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, v. 241, p. 1-6, 2017.
- YANG, Z. J.; YANG, T.; LUO, M. Y.; XIA, X.; CHEN, D. J.; QIAN, X. P. A new sesquiterpenoid from fungus *Colletotrichum* sp. and its cytotoxicity. *Acta Pharmaceutica Sinica*, v. 48, p. 891-895, 2013.
- ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. *Revista CLATEC-UPF*, v. 6, p. 40-47, 2014.
- ZENG, Y. J.; YANG, H. R.; WANG, H. F.; ZONG, M. H.; LOU, W. Y. Immune enhancement activity of a novel polysaccharide produced by *Dendrobium officinale* endophytic fungus *Fusarium solani* DO7. *Journal of Functional Foods*, v. 53, p. 266-275, 2019.
- ZHANG, Y.; WU, Y. T.; ZHENG, W.; HAN, X. X.; JIANG, Y. H.; HU, P. L.; TANG, Z. X.; SHI, L. E. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*. *Journal of Functional Foods*, v. 38, p. 273-279, 2017.

ZHAO, O. Y.; ZHANG, X. N.; FENG, S. D.; ZHANG, L. X.; SHI, W.; YANG, Z. X.; CHENA, M. M.; FANGA, X. D. Starch-enhanced degradation of HMW PAHs by *Fusarium* sp. in an aged polluted soil from a coal mining area. *Chemosphere*, v. 174, p. 774-780, 2017.

ZHOU, S.; LIU, Y.; YANG, Y.; JIA, W.; TANG, Q.; TANG, C.; FENG, N.; ZHANG, J. Separation and structural elucidation of a polysaccharide CC30w-1 from the fruiting body of *Coprinus comatus*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 1, p. 99-104, 2013.

ZHOU, D.; LI, P.; DONG, Z.; WANG, T.; SUN, K.; ZHAO, Y.; WANG, B.; CHEN, Y. Structure and immunoregulatory activity of β -D-galactofuranose-containing polysaccharides from the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 129, p. 530-537, 2019.