



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 estive 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

esporos, que são gerados em grandes quantidades, assegurando a sobrevivência do grupo no planeta. Devido aos seus tamanhos pequenos e leveza, os esporos são naturalmente disseminados no ambiente (ar, solo, água, plantas e animais), se acomodando em qualquer lugar que lhe seja conveniente, como em nossos alimentos (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

O reino Fungi é dividido em quatro filos: Quitridiomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos (MADIGAN et al., 2010). Como os fungos estudados neste trabalho pertencem ao grupo dos Ascomicetos, informações e características do grupo serão mencionadas abaixo.

2.1.1 Ascomicetos

Os ascomicetos formam um grupo com ampla diversidade de espécies. Existem desde as unicelulares (sua maioria) como a levedura *Saccharomyces*, utilizada na fabricação de pães e bebidas, até as mais desenvolvidas, com formação de filamentos, como a *Neurospora crassa*, conhecido como bolor do pão (MADIGAN, et al., 2010).

A característica que define o grupo é a presença da estrutura sexuada chamada asco, cuja forma é cilíndrica, lembrando sacos ou bolsas. No interior dos ascos ocorre a formação dos esporos (conhecidos por ascósporos), que são isolados do ambiente através de uma camada protetora. Os esporos permanecem nos ascos até se tornarem maduros. Após este período são liberados, germinando em locais favoráveis para seu desenvolvimento (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Outros representantes dos ascomicetos são espécies sapróbias e parasitas de plantas e animais. Além disso, o grupo contém espécies que estabelecem relação de mutualismo com algas ou cianobactérias, resultando nos líquens (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

2.2 PAREDE CELULAR DOS FUNGOS

O material celular fúngico, conhecido também por biomassa, é formado por citossol, membrana plasmática e parede celular (FUKUDA et al., 2009). A parede

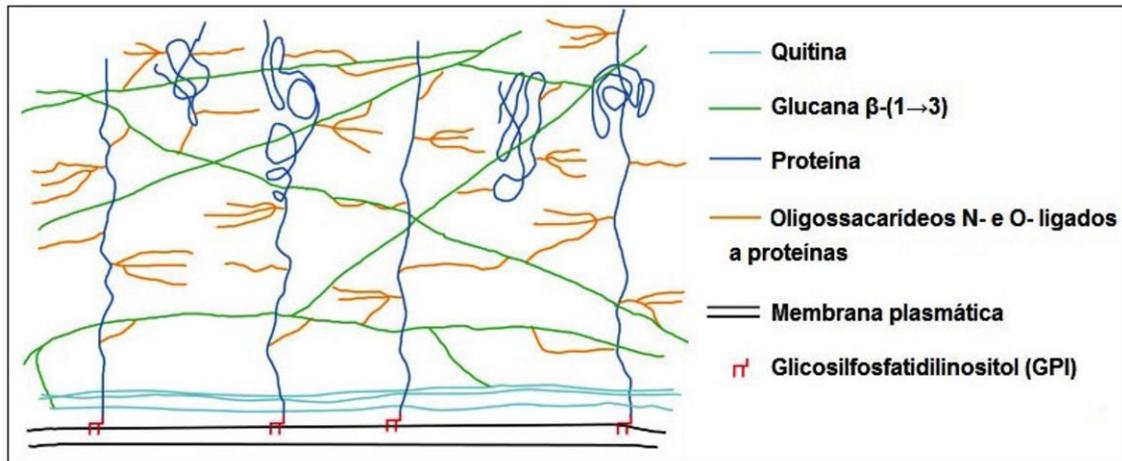
celular é de extrema importância para o crescimento, sobrevivência e morfogênese dos fungos (FREE, 2013) e ao mesmo tempo que ela os protege de ambientes ofensivos, é capaz de armazenar compostos tóxicos que podem ser usados contra outros micro-organismos (LATGÉ, 2007). A estrutura rígida da parede fornece forma, integridade para a célula e possibilita que o fungo ataque substratos sólidos para sua colonização (BOWMAN, FREE, 2006; LATGÉ, 2007). Pelos benefícios que proporciona para a vida e o bem estar do fungo, quando o objetivo é eliminá-lo, a parede celular acaba se tornando o alvo dos agentes antifúngicos (BOWMAN, FREE, 2006).

Apesar da rigidez, a parede celular também se comporta como uma estrutura que é suficientemente dinâmica para suprir as necessidades de crescimento e desenvolvimento do fungo ao longo do seu ciclo de vida, além de permitir sua interação com o meio externo. É ela que controla a adesão das células entre si e também com o substrato e atua como um centro de sinalização para o funcionamento das vias de transdução de sinal. Fissuras na estrutura da parede podem prejudicar o crescimento e morfologia das células fúngicas, podendo levar a morte do fungo (BOWMAN, FREE, 2006).

2.2.1 Composição da parede celular: polissacarídeos

A parede celular fúngica (Figura 1) é composta por glicoproteínas, polissacarídeos e moléculas menores que variam de acordo com as espécies de fungos (BOWMAN, FREE, 2006). Os polissacarídeos ocupam mais de 90% da parede celular, sendo glucanas e quitina, os predominantes (BOWMAN, FREE, 2006; LATGÉ, 2007).

Figura 1- Representação da parede celular fúngica.

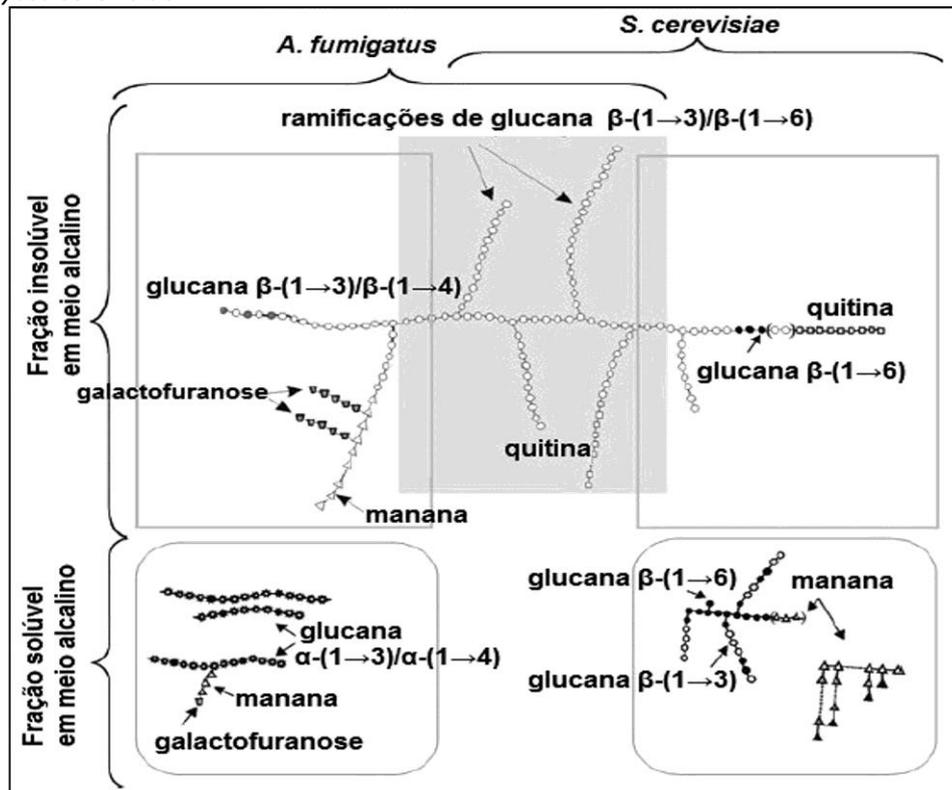


Fonte: Adaptado a partir de BOWMAN, FREE (2006).

Grande parte dos estudos dirigidos para os polissacarídeos que compõem a parede celular fúngica, são realizados com o ascomiceto *Aspergillus fumigatus* (Figura 2). Esses estudos mostram que polissacarídeos presentes nessa estrutura podem ser separados em duas frações: os insolúveis e os solúveis em meio alcalino. Na fração insolúvel estão aqueles que formam o núcleo fibrilar, composto por glucanas β -(1 \rightarrow 3) ramificadas em O-6, em cuja posição estão ligadas covalentemente quitina/quitosana, glucanas β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 4) e galactomananas (LATGÉ, BEAUVAIS, 2014). A fração solúvel tem como principais polissacarídeos glucanas α -(1 \rightarrow 3) com algumas unidades intra cadeia de glucose α -(1 \rightarrow 4), além de galactomananas e galactosaminogalactanas (MOUYNA, FONTAINE, 2009).

A composição da fração insolúvel da parede celular da maior parte dos fungos são similares a do *Aspergillus fumigatus*, sendo formada por glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) ligadas a quitina. Já os polissacarídeos que constituem a fração solúvel da parede celular, são específicos para cada classe e gênero de fungo (LATGÉ, BEAUVAIS, 2014).

Figura 2- Polissacarídeos da parede celular do fungo *Aspergillus fumigatus* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Adaptado a partir de LATGÉ (2007).

2.2.3 A composição da parede celular é mutável

A composição e a organização da parede celular não são permanentes, ao contrário, estão em constante mudança (LATGÉ, BEAUVAIS, 2014). Clavaud e colaboradores (2012) constataram que modificações no meio de cultivo para o crescimento de *Aspergillus fumigatus* interferiu na atividade da glucana β -(1→3) sintetase, resultando em menores quantidades de glucana β -(1→3) encontradas na parede celular do fungo.

Apesar da parede celular ser uma estrutura vital para a existência dos fungos, pesquisas precisam ser realizadas para a compreensão das etapas que levam à sua síntese. As informações disponíveis apontam que alterações no ambiente provocam mudanças na composição e organização estrutural da parede celular, dificultando a determinação das etapas que levam à biossíntese. Todos esses fatores mostram que a estrutura da parede celular muda frequentemente para se adequar ao ambiente e estresse externo. Modificações na composição bem como na localização do

polissacarídeo podem ser caminhos usados pelo fungo para se proteger contra agressões (LATGÉ, BEAUVAIS, 2014). Este recurso fisiológico e bioquímico, usado para sobrevivência, gera uma quantidade bastante elevada de polissacarídeos heterogêneos. A seguir se encontram alguns trabalhos disponíveis na literatura com polissacarídeos isolados da biomassa e parede celular dos fungos.

2.3 POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS ASCOMICETOS

A galactose é uma das hexoses mais frequentes nas estruturas dos polissacarídeos. Normalmente nos mamíferos e nas plantas, ela se encontra na forma piranosídica, enquanto que nos fungos suas unidades podem ser piranosídicas ou furanosídicas (HEESEMAN et al., 2011). Particularmente, quando se trata de polissacarídeos provenientes de fungos ascomicetos, é comum unidades galactofuranosídicas (Gal_f) estarem presentes nas estruturas (BARRETO-BERGTER, GORIN, TRAVASSOS, 1981; TISCHER et al., 2002) como será observado nesta seção.

Do extrato alcalino da biomassa do *Arachniotus verruculosus* foi isolado um heteropolissacarídeo de galactose e manose. Os resultados de metilação mostraram como principais derivados 1,4,6-tri-*O*-acetil-2,3,5-tri-*O*-metil-galactitol e 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil-galactitol e os espectros de RMN, com deslocamentos químicos mais intensos em campo baixo, caracterizaram a estrutura do heteropolissacarídeo como linear, formada por unidades β-D-Gal_f-(1→6) e β-D-Gal_f-(1→5). A baixa concentração de manose (3%) sugeriu a presença de um núcleo de manana na estrutura (AHRAZEM et al., 2001). O mesmo grupo de pesquisadores extraiu de *Discula destructiva* spp uma molécula de estrutura semelhante, porém com ramificações em O-2 por resíduos α-L-Rhap nas unidades β-D-Gal_f-(1→6), confirmada pela presença do derivado 1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3,5-di-*O*-metil-galactitol (AHRAZEM, et al., 2007).

Outro heteropolissacarídeo, chamado de glucogalactana, foi obtido após purificação por cromatografia de filtração em gel do extrato alcalino da biomassa do *Verticillium lecanii*. A análise por cromatografia de exclusão estérica a alta pressão acoplada com detector de índice de refração (HPSEC/RID) revelou uma glucogalactana com massa molecular de $1,8 \times 10^4$ Da. Com as análises de FTIR e RMN a molécula foi

caracterizada como tendo uma cadeia principal formada por unidades β -D-Galp-(1 \rightarrow 6) ligadas, substituídas em O-2 por unidades α -D-Glcp-(1 \rightarrow) ou pelo dissacarídeo α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) (CORRADI DA SILVA et al., 2013).

O heteropolissacarídeo isolado do extrato aquoso a quente do corpo de frutificação do *Cordyceps militaris*, com massa molecular aparente de $4,3 \times 10^3$ Da, foi analisado por HPAEC/PAD, FTIR, CG-EM e RMN. Os resultados dessas análises indicaram que o polissacarídeo era constituído por uma cadeia principal de unidades α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) e α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4), sendo as últimas, substituídas em O-6 por resíduos dissacarídicos de α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -L-Rha-(1 \rightarrow) (JING et al., 2014). Do extrato alcalino dessa mesma espécie fúngica, foi isolado um heteropolissacarídeo com a cadeia principal composta por unidades α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) e α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3), com as últimas unidades possuindo ramificação em O-6 pelos resíduos dissacarídicos: α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow) e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Manp-(1 \rightarrow) (BI et al., 2018).

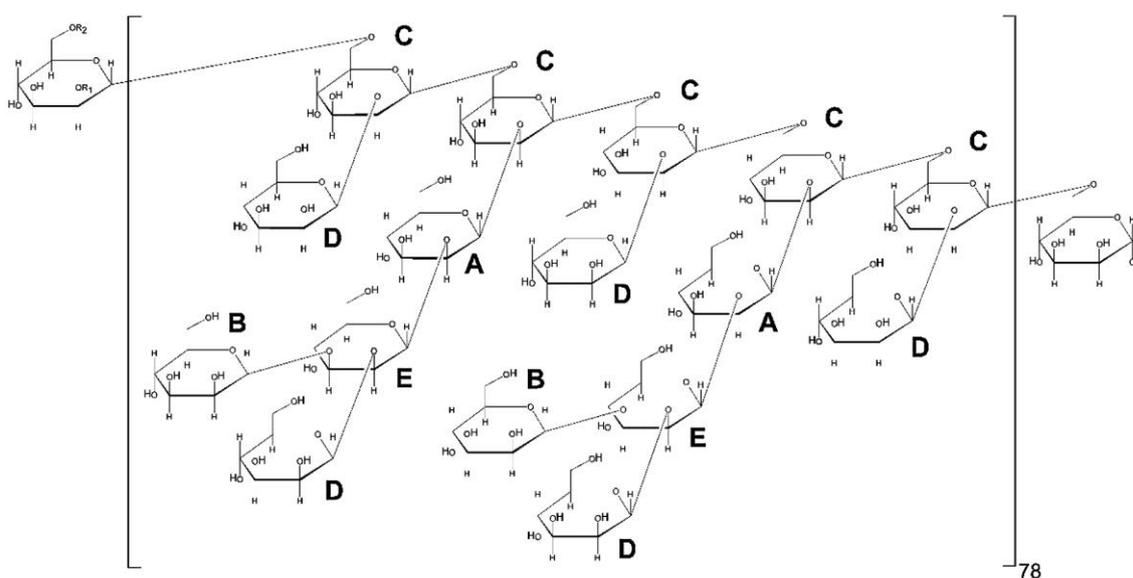
Da espécie *Shiraia bambusicola*, foi extraído um heteropolissacarídeo ramificado, formado por manose, glucose e galactose. Com os resultados de metilação e análises de RMN, pôde-se concluir que sua cadeia principal é formada por unidades α -D-Manp-(1 \rightarrow 2) ligadas, com substituição em O-6 por unidades com diferentes graus de polimerização, sendo elas: α -D-Manp-(1 \rightarrow 6), α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4), α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6), além de unidades β -D-Galp-(1 \rightarrow 6) substituídas em O-2 pelo dissacarídeo β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galp-(1 \rightarrow) (ZHOU et al., 2019). A estrutura deste e dos demais heteropolissacarídeos descritos nesta seção, estão representadas na Tabela 1.

2.4 POLISSACARÍDEOS DE ASCOMICETOS - ESTUDOS DE POSSÍVEIS APLICAÇÕES

Há algum tempo polissacarídeos fúngicos são alvos de pesquisas que buscam por novas moléculas com potencial de uso nos diversos setores industriais. Suas diferentes propriedades terapêuticas têm sido estudadas e os resultados mostram que a biomassa e parede celular fúngica podem ser fontes de biopolímeros biologicamente ativos (GIAVASIS, 2014).

A α -manana (Figura 3) obtida do extrato alcalino de *Kluyveromyces marxianus* teve sua atividade antiproliferativa ensaiada frente às células humanas tumorais de cólon do útero (HeLa) e do fígado (Hep-G2) e normais 3T3 (proveniente de fibroblasto de camundongo). O polissacarídeo não foi citotóxico para as células HeLa e pouco citotóxico às Hep-G2, atingindo a menor proliferação dessas células na concentração de 2,0 mg/mL. A concentração de 0,5 mg/mL foi a única capaz de não promover danos na linhagem de célula normal 3T3. Outro estudo para aplicação da α -manana foi sua possível ação como quelante de íons cobre e ferro. Diferentemente dos experimentos com as células tumorais, a α -manana apresentou excelente atividade quelante, onde conseguiu reter 84,6% do ferro presente em uma solução, quando na concentração de 2,0 mg/mL (GALINARI et al., 2017).

Figura 3- Estrutura proposta para a α -manana obtida do extrato alcalino de *Kluyveromyces marxianus*.



Fonte: Galinari e colaboradores (2017).

O extrato de polissacarídeo obtido de *Cordyceps cicadae* apresentou atividade contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. A concentração inibitória mínima para a ação bactericida foi de 0,10 mg/mL. O efeito inibidor do polissacarídeo no crescimento da *E. coli* diminuiu após o período de 4 horas, podendo ser justificado pelo fato do polissacarídeo estar sendo utilizado como alimento pela bactéria. Entretanto, após o período de 24 horas, o processo de inibição foi observado novamente. Além disso, o polissacarídeo conseguiu modificar a permeabilidade da membrana plasmática e da parede celular da bactéria, colocando-a em contato com compostos prejudiciais e, conseqüentemente, causando sua morte (ZHANG et al., 2017). Esses resultados apontam o uso de polissacarídeos fúngicos em tratamentos contra infecções bacterianas.

Outra possibilidade do uso de polissacarídeos na área medicinal é como imunoreguladores. O heteropolissacarídeo obtido de *Shiraia bambusicola* foi capaz de ativar macrófagos, que são importantes células de defesa contra patógenos e corpos estranhos que invadem o organismo. Para cumprir essa função, normalmente os macrófagos usam o mecanismo da fagocitose para matar e eliminar os invasores. O heteropolissacarídeo também estimulou os macrófagos a produzirem maior quantidade da enzima óxido nítrico sintase, o que proporcionou, conseqüentemente, maior formação do óxido nítrico, que tem dentre várias funções, trabalhar na resposta inflamatória e no processo de imunidade do organismo (ZHOU et al., 2019).

Liu e colaboradores (2019) compararam a atividade antitumoral de polissacarídeos provenientes dos cultivos em meio sólido (a partir do corpo de frutificação) e meio líquido (a partir da cepa) do fungo *Cordyceps militaris*. Ambos os polissacarídeos tinham características estruturais semelhantes, porém com proporções monossacarídicas diferentes. O melhor efeito antitumoral sobre as células de câncer de pulmão H1299 resultou do polissacarídeo proveniente do cultivo em meio líquido, o qual inibiu a proliferação das células em cerca de 20% a mais do que o outro polissacarídeo, ambos na concentração de 500 µg/mL. Este resultado faz com que os cultivos em meio líquido do *Cordyceps militaris* seja o escolhido para a produção de polissacarídeos e, segundo os autores, é uma vantagem, visto que são cultivos com

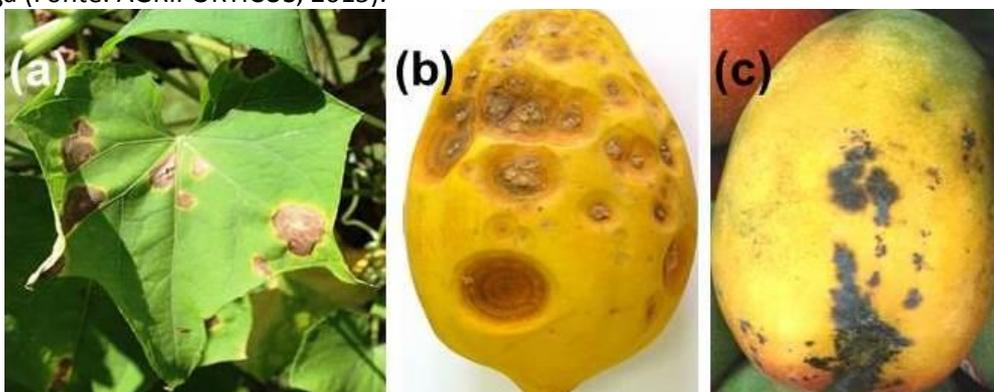
ciclos curtos, onde há baixo consumo de energia, livres de metais pesados e facilidade no controle (LIU et al., 2019).

2.5 *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* engloba fungos saprófitos e patógenos, sendo os últimos causadores de uma das doenças mais severas que ocorrem em plantas de regiões tropicais e subtropicais, conhecida por antracnose (MENEZES, 2006).

A antracnose (Figura 4) é uma doença que ocasiona lesões em frutos antes e após a colheita. Ela é mais frequente no verão, devido à temperatura e umidade altas. (TAVARES, COSTA, SANTOS, 2005). As plantas estão expostas a esta doença em todas as etapas do seu crescimento, e o patógeno é capaz de se dispersar de uma espécie para outra, através de agentes do ambiente aéreo. Dentre as espécies causadoras da antracnose, a *C. gloeosporioides* é apontada como uma das mais ativas (MENEZES, 2006). Esta espécie se espalha principalmente pela ação do vento e de respingos de chuva, atacando a planta em suas aberturas naturais ou ferimentos e tendo a capacidade de invadir os órgãos do hospedeiro, permanecendo inativa até que surjam condições favoráveis de temperatura e umidade, podendo, então, se manifestar somente no período de pós-colheita, ainda que o ataque tenha ocorrido durante a floração da planta (TAVARES, COSTA, SANTOS, 2005).

Figura 4- Sintomas de antracnose provocada por *Colletotrichum gloeosporioides* em: (a) folhas de chuchu (Fonte: LIMA, 2013); (b) nos frutos de mamão (Fonte: HALFELD-VIERA, 2010) e (c) manga (Fonte: AGRIPORTICUS, 2015).



Entre os diversos micro-organismos utilizados como antifúngicos, se destacam os fungos do grupo *Trichoderma*. Espécies desse ascomiceto foram testadas na busca por alternativas contra a contaminação do *Colletotrichum gloeosporioides* em plantações de pimentão (*Capsicum annuum*). As espécies de *Trichoderma* exibiram atividade micoparasítica e usaram o micélio do *C. gloeosporioides* como fonte de carbono e energia. As espécies que mais inibiram o crescimento do *C. gloeosporioides* foram *T. asperellum* e *T. longibranchiatum*, em respectivamente, 22,5% e 21,9%. As linhagens de *Trichoderma* não apresentaram alterações morfológicas após o experimento. Os resultados podem indicar que o comportamento de cada cepa de *Trichoderma* depende da espécie e dos compostos metabólicos que ela pode liberar, como antibióticos, que podem limitar o crescimento normal do fungo, no caso do *C. gloeosporioides* (CRUZ-QUIROZ et al., 2018).

Outra alternativa para evitar a antracnose provocada por *C. gloeosporioides* é utilizar o composto orgânico 1-metilciclopropeno (1-MCP). Ele foi capaz de controlar o progresso da antracnose na manga reduzindo-a em 45,7%. Nos testes *in vitro*, reduziu o crescimento do *C. gloeosporioides* com taxas de germinação de esporos (para o período de dez horas) de 86,4% para a amostra tratada com 1-MCP, contra 98,3% do controle. Além disso, o 1-MCP estimulou a formação das espécies reativas de oxigênio, o que provocou mudanças na membrana dos esporos e reduziu a quantidade de mitocôndrias saudáveis. Com todos esses resultados pode-se dizer que o composto 1-MCP é uma excelente alternativa para preservar a qualidade e tempo de vida da fruta manga nas prateleiras, visto que seu uso em frutos pós-colheita pode adiar o processo natural de envelhecimento da fruta evitando o desenvolvimento do *C. gloeosporioides* e conseqüentemente, da antracnose (XU et al., 2017).

Há, sem dúvida, muitas pesquisas voltadas para o estudo da fitopatologia causada pelo ascomiceto *C. gloeosporioides*, entretanto, o micro-organismo também pode ser considerado como uma fonte de compostos benéficos. Park e colaboradores (2001) testaram a propriedade dispersante do polissacarídeo secretado por *C. gloeosporioides*, durante seu cultivo em meio líquido. O polissacarídeo foi capaz de dispersar dentre alguns compostos, a argila. Como esta técnica é utilizada em muitos campos, como na produção de pesticidas, cimentos e aditivos cerâmicos, a

propriedade do polissacarídeo é atraente. No entanto, a identificação química do composto é essencial para correlacionar a atividade com a estrutura química (PARK et al., 2001).

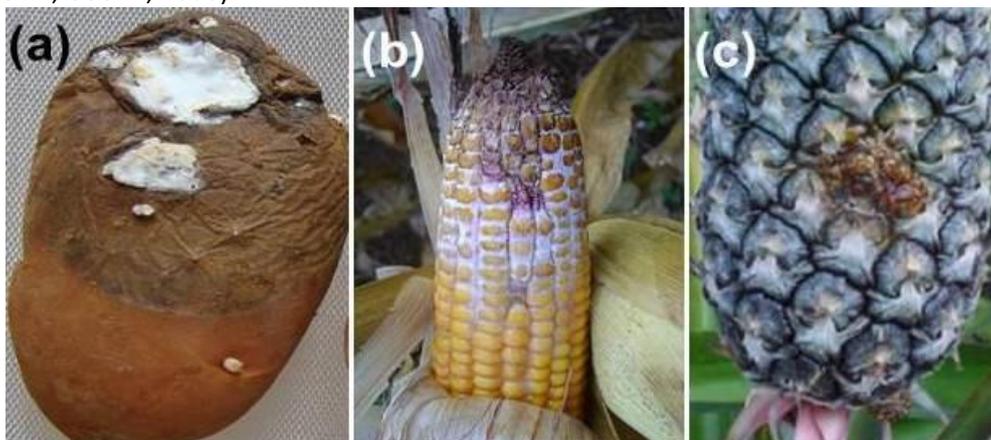
Outro resultado positivo com fungos do gênero *Colletotrichum* envolveu espécies endofíticas - que são aquelas que habitam o interior das plantas sem provocar danos aparentes ao hospedeiro (AZEVEDO, 1998) - de *Colletotrichum* sp, isoladas da planta *Carapa guianensis* (nativa da Amazônia, conhecida por “andiroba”). As espécies apresentaram atividade antibacteriana no ensaio contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 11775. Esta habilidade de proteção que os fungos endofíticos exercem pode estar relacionada com a adaptação que eles necessitam para sobreviverem e colonizarem a planta hospedeira, num ambiente selvagem. Pesquisadores revelam que compostos bioativos podem ser os responsáveis por essa função e que há possibilidade dessas moléculas serem utilizadas para o controle ou inibição de doenças (FERREIRA et al., 2015).

Apesar dos inúmeros estudos realizados com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, pouco se sabe sobre a composição química da sua biomassa e da parede celular, portanto, conhecê-la, principalmente, com respeito aos polissacarídeos, poderá contribuir com os estudos que visam o combate desse micro-organismo como causador de doença e, nossa principal proposta, como uma fonte de moléculas que poderá ser utilizada no futuro como novos agentes farmacológicos.

2.6 *Fusarium* sp

Os fungos do gênero *Fusarium*, considerados ascomicetos, são conhecidos pelo rápido crescimento e formação de colônias de coloração pálida ou colorida, contendo micélio aéreo e difuso. Várias espécies de *Fusarium* se desenvolvem no solo e promovem a degradação de substratos provenientes da celulose que são encontrados nas plantas. Além de se comportarem como saprófitos, algumas espécies do gênero são consideradas parasitas (Figura 5) (DOMSCH, GAMS, ANDERSON, 1980 apud GOMES et al., 2013).

Figura 5- Doenças provocadas por fungos do gênero *Fusarium*. (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).



O fungo *Fusarium* sp é encontrado ao redor do mundo habitando todos os tipos de solos ou estabelecendo relações com espécies vegetais. Ele pode permanecer vivo durante longos períodos degradando a matéria orgânica do solo, atuando, portanto, como uma espécie saprófita, como também, provocar doenças em culturas de grande importância econômica. Além disso, o gênero *Fusarium* também engloba espécies endofíticas (MARTINS, 2005).

Na biorremediação de solos a espécie de *Fusarium* sp mostrou eficiência na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Diferentes concentrações de inóculo do fungo foram testadas contra HAPs de cinco a seis anéis benzênicos. Os melhores resultados foram nos testes com HAPs de seis anéis. Para a melhoria dos experimentos, os mesmos testes foram realizados com adição de amido. O processo de fornecer uma fonte extra de carbono nos tratamentos de biodegradação de HAPs (contendo a partir de quatro anéis de benzeno) é usualmente realizado com sucesso. Como previsto, a junção do amido ao micélio do *Fusarium* sp aumentou a porcentagem de degradação dos HAPs, verificando-se que quanto maior a quantidade de amido adicionado, maior o efeito de biorremediação (ZHAO et al., 2017).

Salehi e colaboradores (2018) isolaram espécies de *Fusarium* do solo. Após o cultivo em laboratório, as biomassas fúngicas foram submetidas a extrações aquosas a quente para a remoção dos polissacarídeos solúveis em água. Esses polissacarídeos

foram avaliados frente à ação antitumoral contra as linhagens de células humanas linfoblastoides (LCL), causadoras de câncer nos linfócitos B, e HeLa (provenientes do colón do útero). Os polissacarídeos foram eficientes contra as células LCL, porém não mostraram efeito considerável contra as células HeLa.

A espécie endofítica de *Fusarium* sp, isolada do açafreão, foi cultivada em laboratório para que seus metabólitos secundários fossem investigados. Após o processo de purificação, o metabólito que se mostrou puro, foi submetido a testes de atividade citotóxica, provocando um efeito de inibição contra células de leucemia da linhagem THP-1. Sabe-se que este composto tem a fórmula molecular representada por $C_{44}H_{64}O_{24}$, no entanto, há uma lacuna quanto sua estrutura. Para que o metabólito possa ser aplicado no futuro, um detalhamento de sua estrutura deverá ser efetuado, segundo os autores (RAJ et al., 2015).

Outra espécie endofítica de *Fusarium* também apresentou metabólitos secundários com propriedades biologicamente ativas: polissacarídeos secretados por *Fusarium oxysporum* Dzf17 mostraram respostas positivas quando submetidos a ensaios de atividade antioxidante. Os autores acreditam que esses polissacarídeos possam ser utilizados de forma segura, após uma investigação minuciosa sobre as suas estruturas químicas (LI et al., 2011a).

O polissacarídeo secretado pela espécie *Fusarium oxysporum* Y24-2 com massa molecular de $3,6 \times 10^4$ Da, foi caracterizado como tendo derivados 1,5,6-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol e 1,2,4-tri-*O*-acetil-3,5,6-tri-*O*-metil-galactitol, na proporção de 1,02:1,00. Esses derivados metilados sugerem a presença de resíduos piranosídicos e furanosídicos na estrutura polimérica correspondendo, respectivamente, a glucose e galactose. Esses resultados foram confirmados pelos espectros de RMN, os quais mostraram que o exopolissacarídeo possui estrutura linear com a cadeia formada por unidades alternadas β -D-Galp ligadas em O-2 por α -D-Glcp, e resíduos α -D-Glcp substituídos em O-6 por unidades β -D-Galp (GUO et al., 2013).

Do *Fusarium solani* DO7, isolado da planta *Dendrobium officinale* (uma espécie de orquídea), foi obtido um exopolissacarídeo com os seguintes resíduos estruturais: α -L-Araf-(1→5), α -D-Manp-(1→3), β -D-Glcp-(1→4), β -D-Galp-(1→3,6) e β -D-Galp-(1→6). Devido à elevada viscosidade e baixa solubilização, os autores encontraram

dificuldades em concluir a caracterização química, focando a continuidade da pesquisa na aplicação. A citotoxicidade do exopolissacarídeo foi avaliada frente às células embrionárias de rim humano e células da linhagem RAW 264.7 de macrófagos. Nas duas células o exopolissacarídeo manteve a viabilidade, indicando não toxicidade para elas. Além disso, a capacidade fagocitária das células RAW 264.7 aumentou de maneira dose-dependente com a adição do exopolissacarídeo nas diferentes concentrações (ZENG et al., 2019).

Embora existam trabalhos que visam a aplicação de polissacarídeos e outros metabólitos produzidos pelo *Fusarium* sp, a lacuna sobre a composição química de sua biomassa e parede celular ainda existe. Este trabalho tem como um dos objetivos principais esclarecer essa composição, focando nos polissacarídeos. Isso irá fornecer dados adicionais sobre o micro-organismo, além de disponibilizar novas moléculas para ensaios biológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Obter polissacarídeos a partir da biomassa dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp, caracterizá-los quimicamente e realizar ensaios de citotoxicidade.

3.2 Específicos

Realizar extração etanólica para remoção de compostos de natureza lipídica.

Realizar extração aquosa a quente para remoção dos polissacarídeos de interesse do estudo.

Purificar os polissacarídeos obtidos na extração aquosa utilizando ciclos de congelamento e descongelamento e cromatografia de filtração em gel.

Definir o grau de homogeneidade dos polissacarídeos por cromatografia de exclusão estérica acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID).

Determinar a composição monossacarídica por cromatografia líquida de troca iônica em alta pressão, após hidrólise ácida total dos polissacarídeos.

Identificar a posição das ligações glicosídicas dos polissacarídeos analisando os espectros dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, usando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

Determinar a estrutura dos polissacarídeos por ressonância magnética nuclear mono (^1H , ^{13}C) e bidimensional (COSY, HMBC, HSQC, TOCSY).

Realizar ensaios biológicos para avaliar a capacidade citotóxica dos polissacarídeos puros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Micro-organismos

Os fungos endofíticos *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da *Mimosa pudica*, e *Fusarium* sp, isolado da *Maytenus aquifolia* (conhecida como espinheira santa), foram cedidos pela professora Dra. Adriana Knob (UNICENTRO - Guarapuava, PR) e identificados pelo professor Dr. André Rodrigues (UNESP - Rio Claro, SP). Os fungos estão depositados no banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Unicentro - PR.

4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes utilizados para o desenvolvimento da pesquisa foram de grau analítico. Na cromatografia de filtração em gel a pressão normal, utilizou-se o gel Sepharose CL-6B.

4.1.3 Equipamentos

Aagitadores magnéticos Quimis, modelo Q261-22 e Fisatom, modelo 752.

Aagitador de tubos Phoenix, modelo AP-56.

Autoclaves verticais Fabbe (modelo 103) e Phoenix (modelo AV-50), condições de uso: 121 °C, 15 a 20 minutos.

Balança analítica Mettler-Toledo, modelo AB204.

Balança semi-analítica Gehaka BG 2000.

Câmara de fluxo laminar Marconi, modelo 1552/120.

Centrífuga refrigerada Cientec, modelo 5000R e microcentrífuga Beckman, modelo 365606.

Cromatografia de filtração em gel: desenvolvida em coluna de vidro preenchida com gel Sepharose CL-6B, com auxílio da bomba peristáltica Pump P-1, Amersham Pharmacia Biotech e coletor Frac-100, Amersham Pharmacia Biotech.

Cromatógrafo gasoso 2010-plus acoplado ao espectrômetro de massa T08040, Shimadzu.

Cromatógrafo gasoso 7820A acoplado ao espectrômetro de massa 5975E, Agilent.

Cromatógrafo líquido de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC-High Pressure Size Exclusion Chromatography) Shimadzu, equipado com detector de índice de refração diferencial, Shimadzu, modelo RID-10A, para análises de cromatografia de permeação em gel.

Cromatógrafo líquido de troca iônica com detector eletroquímico, modelo ED 40, bomba gradiente, modelo GP 40 e integrador Dionex, modelo 4600.

Deionizador marca Labconco, Water Pro Ps.

Destilador Quimis.

Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-Vis 1601.

Estufa bacteriológica Cienlab, modelo CE-210/64-I.

Estufa Nova Ética, modelo 400/*ND.

Evaporador rotativo Büchi, modelo R-114, com auxílio de bomba de vácuo Büchi, modelo V-100.

Fotocolorímetro Micronal, modelo B440.

Incubadora Shaker SP Labor, modelo SP-222.

Liofilizador Edwards, modelo E-C.

Sistema para filtração a vácuo.

4.2 MÉTODOS GERAIS

4.2.1 Manutenção dos micro-organismos

Os fungos foram mantidos em meio BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado, a 4 °C, com repiques trimestrais.

4.2.2 Cultivo dos micro-organismos para obtenção da biomassa

Para a obtenção da biomassa de cada fungo os cultivos foram desenvolvidos de acordo com os protocolos estabelecidos por Dominato (2017), onde as condições selecionadas foram as que apresentaram maior quantidade de biomassa no final do experimento.

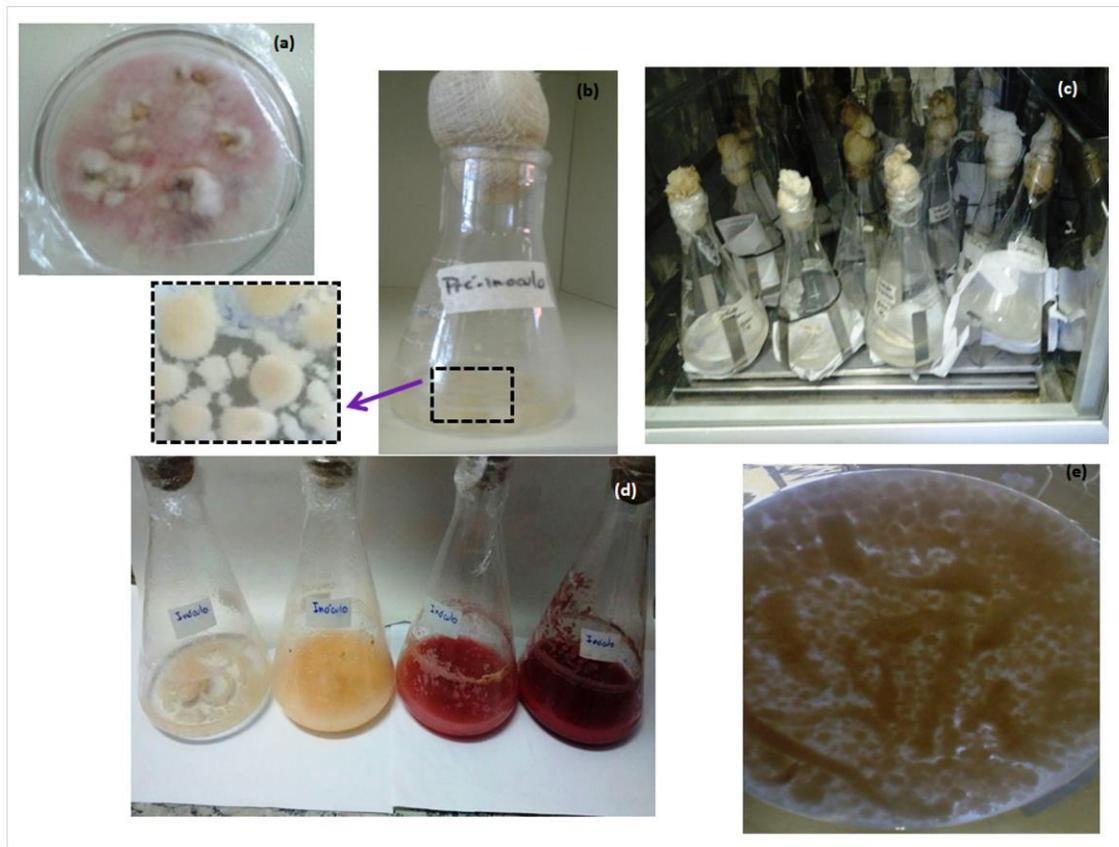
Inicialmente os fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), glucose 1% (m/v) e ágar 2% (m/v). As placas foram incubadas durante 5 dias a 28 ± 2 °C em estufa bacteriológica. Após este período, foram transferidas pequenas porções de hifas dos fungos das superfícies das placas, para frascos de erlenmeyer de 125 mL, contendo meio mínimo de Vogel e glucose 1% (m/v). Os frascos foram mantidos sob agitação constante (180 rpm) por 48 horas a 28 ± 2 °C. Após este período, os micélios foram transferidos assepticamente para um homogeneizador de células (blender) previamente autoclavado, sendo homogeneizados por 30 segundos a velocidade máxima. Os homogeneizados foram centrifugados (4 °C, 30-32 minutos, 4800 x g), os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em solução salina fisiológica estéril 0,9%. As suspensões de células homogeneizadas foram diluídas em solução salina fisiológica estéril 0,9%, até se obter um valor de absorvância entre 0,4 a 0,5 em 400 nm (as leituras foram

realizadas no espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-Vis 1601). As soluções de células obtidas foram inoculadas em frascos de erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio mínimo de Vogel acrescido de glicose 5% (m/v). Nos frascos referentes ao cultivo do *Colletotrichum gloeosporioides* foram utilizados 12 mL de inóculo (3 mL de solução de células para cada 25 mL de meio) e nos frascos referentes ao cultivo do *Fusarium* sp foram utilizados 8 mL de inóculo (2 mL de solução de células para cada 25 mL de meio). Os cultivos foram mantidos sob agitação constante (180 rpm) por 72 horas a 28 ± 2 °C, totalizando 11 dias para cada cultivo. Os volumes de inóculo selecionados foram os que apresentaram maior produção de biomassa fúngica nos experimentos realizados por Dominato (2017). As Figuras 6 e 7 mostram as etapas dos cultivos.

Figura 6- Cultivo do micro-organismo *Colletotrichum gloeosporioides*: (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.



Figura 7- Cultivo do micro-organismo *Fusarium* 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.



4.2.3 Isolamento da biomassa fúngica

Os cultivos foram interrompidos utilizando um sistema de filtração a vácuo, o que resultou na separação do meio líquido da biomassa.

As biomassas foram lavadas com água destilada para remoção do meio de cultivo e dos resíduos metabólicos secretados pelos micro-organismos. Este procedimento foi realizado até que a água de lavagem apresentasse resultado negativo para o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), o qual detecta a presença de açúcar. Após este processo as biomassas foram liofilizadas e pesadas. A sequência dos procedimentos pode ser observada nas Figuras 8 e 9.

Figura 8- Biomassa *Colletotrichum gloeosporioides* sendo lavada (a), após a lavagem (b), e sendo macerada (c-d).



Figura 9- (a) Biomassa *Fusarium* sp; b) biomassa sendo lavada; (c) águas provenientes do tratamento da biomassa com água; (d) biomassa lavada, (e) liofilizada e sendo macerada (f).



4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Método de Bradford

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas. O fundamento do método consiste na ligação do corante (Coomassie Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul.

Solução estoque: 40 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto. Foram adicionados 40 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada para completar 100 mL de solução. A solução foi deixada em repouso “*overnight*”, filtrada em papel de filtro e armazenada na geladeira em frasco escuro.

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

Procedimento: em 100 µL de amostra foram adicionados 1 mL da solução diluída do corante e, em seguida, foi efetuada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Para o cálculo da concentração de proteína, foi utilizada uma curva de calibração com albumina bovina (BSA) (1 mg/mL) na faixa de concentração de 5 a 50 µg.

4.3.2 Método do Fenol-Ácido sulfúrico

O método do fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956) foi utilizado nas etapas de extração, purificação e caracterização para identificar e quantificar os carboidratos totais. O método consiste na formação do derivado hidroximetil furfural, a partir de hexoses, ou furfural, a partir de pentoses, pela presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol, formando um complexo de coloração amarela.

Reagentes: solução de fenol 5% e H₂SO₄ concentrado.

Procedimento: em 0,5 mL de amostra (diluída com água destilada para ajuste de uma solução com a quantidade de açúcar dentro da faixa de concentração da curva padrão) foram adicionados 0,5 mL de solução de fenol 5% e, em um único jato, 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após o esfriamento da amostra (deixada em repouso), as

leituras foram efetuadas no espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-Vis 1601, a 490 nm. Para calcular a concentração de açúcar total, foi utilizada uma curva de calibração de glucose (0,1 mg/mL) na faixa de concentração de 5 a 50 µg.

4.4 EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS

4.4.1 Extração etanólica

As biomassas liofilizadas foram maceradas e submetidas à extração etanólica (1:20 m/v) a 78 °C, utilizando sistema Soxhlet, por um período de 12 horas. Os extratos etanólicos, denominados E_{EtOH-C} para o *C. gloeosporioides* e E_{EtOH-F} para o *Fusarium* sp, foram concentrados para redução do volume, secos em estufa a 50 °C e armazenados. Os resíduos das extrações etanólicas R_{1C} (proveniente da extração do *C. gloeosporioides*) e R_{1F} (proveniente da extração do *Fusarium* sp) foram secos a 50 °C, macerados e pesados.

4.4.2 Extração aquosa a quente

Os resíduos das extrações etanólicas, R_{1C} e R_{1F} , foram submetidos à extração aquosa a quente (1:20 m/v), a 100 °C, por um período de 4 horas (Figura 10). Os materiais resultantes da extração foram filtrados, ainda quentes, com papel de filtro, e os resíduos restantes foram submetidos ao mesmo procedimento de extração, por mais três vezes.

Os extratos obtidos foram reunidos em porções únicas, denominadas E_{H_2O-C} (para o *C. gloeosporioides*) e E_{H_2O-F} (para o *Fusarium* sp), tendo seus volumes reduzidos e posteriormente congelados, para iniciar o procedimento de congelamento e descongelamento.

Os resíduos das extrações aquosas a quente, denominados R_{2C} para o *C. gloeosporioides* e R_{2F} para o *Fusarium* sp, foram secos em estufa a 50 °C, pesados e armazenados.

Figura 10- Extração aquosa da biomassa do *Colletotrichum gloeosporioides* (1:20 m/v, 100 °C, 4h, 4x).



4.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS

4.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos por tratamentos consecutivos de congelamento e descongelamento

Os extratos aquosos (E_{H_2O-C} e E_{H_2O-F}) foram solubilizados em água destilada, congelados e então, descongelados a temperatura ambiente (CORRADI DA SILVA et al., 2008; GORIN, IACOMINI, 1984). Este processo resultou em uma fração solúvel e outra insolúvel (Figura 11), separadas por centrifugação (4 °C, 30 minutos, 4800 x *g*). Na fração insolúvel foi adicionada água destilada e, novamente, ambas as frações solúvel e insolúvel, foram congeladas e depois, descongeladas a temperatura ambiente. A fração insolúvel foi separada novamente por centrifugação e o sobrenadante e precipitado (solubilizado em água destilada) foram congelados, separadamente.

Este processo foi repetido diversas vezes, até que as frações solúveis não apresentassem precipitados durante o descongelamento.

Figura 11- Materiais provenientes do processo de congelamento e descongelamento dos extratos aquosos do *C. gloeosporioides* (a) e do (b) *Fusarium* sp.



As frações solúveis foram reduzidas a pequeno volume sob pressão reduzida e adicionadas a 3 volumes de álcool etílico absoluto, para precipitação dos polissacarídeos. Após a centrifugação, os precipitados etanólicos dos extratos aquosos, provenientes das biomassas do *C. gloeosporioides* e do *Fusarium* sp, foram solubilizados em água destilada e submetidos a diálise (em tubos de 12.000 MWCO) contra água corrente por aproximadamente 24 horas. Após esse período, as frações retidas nos tubos, denominadas, respectivamente, de PE_{H2O-C} (fração correspondente ao *C. gloeosporioides*) e PE_{H2O-F} (fração correspondente ao *Fusarium* sp) foram liofilizadas, pesadas e solubilizadas em volumes conhecidos de água destilada. Destas frações, foram retiradas alíquotas para: dosagem de açúcar total e proteína, determinação da composição monossacarídica após hidrólise ácida total e verificação do grau de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica.

4.5.2 Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B

As frações PE_{H2O-C} e PE_{H2O-F} foram purificadas por cromatografia de filtração em gel a pressão normal.

O gel selecionado, Sepharose CL-6B, é formado por aproximadamente 6% de agarose, sendo estabilizado por ligações de hidrogênio. Possui faixa de fracionamento

de 1×10^4 a 4×10^6 Da para peptídeos e proteínas globulares e de 1×10^4 a 1×10^6 Da para dextranas (BOYER, 1993; CHAMBERS, RICKWOOD, 1993).

Para os testes iniciais a coluna de vidro tinha um volume aproximado de 173 mL (28 cm x 2,8 cm). Posteriormente, uma coluna de vidro maior, com volume aproximado de 220 mL (45 cm x 2,5 cm) foi utilizada para dar continuidade aos experimentos relacionados com o *C. gloeosporioides*. Os experimentos relacionados ao fracionamento do extrato do *Fusarium* sp foram realizados na coluna menor (volume de 173 mL).

Condições da análise: a água destilada foi utilizada como eluente, o fluxo de 1,0 mL/min foi selecionado e o volume da fração coletada era de 2,5 mL. Para averiguar o empacotamento da coluna, foi aplicado 500 μ L de uma solução de 1 mg/mL de blue dextran, que é uma dextrana com alta massa molecular, cujo perfil de eluição pode ser utilizado como parâmetro de bom empacotamento, bem como para a determinação do volume morto.

Procedimento: alíquotas do PE_{H₂O-C} e do PE_{H₂O-F}, contendo de 8 a 14 mg de açúcar total, foram solubilizadas em 2,0 mL de água destilada e centrifugadas (5100 x g, 5 minutos). Seus respectivos sobrenadantes foram aplicados, separadamente, em colunas de gel Sepharose CL-6B. Os experimentos ocorreram em ambiente climatizado (24 \pm 2 °C).

Alíquotas das frações foram retiradas e analisadas para carboidrato pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após determinar o perfil de eluição, as frações correspondentes a cada pico foram reunidas e liofilizadas. Alíquotas de cada pico foram retiradas para determinar a composição monossacarídica, após hidrólise ácida total, e o grau de homogeneidade por HPSEC/RID.

4.5.3 Teste de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID)

Alíquotas do PE_{H₂O-C} e do PE_{H₂O-F}, em seus diferentes estágios de purificação, foram solubilizadas em água deionizada (1 mg de açúcar total/mL) e filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) com 0,22 μ m de porosidade. Alíquotas de

200 µL foram injetadas em cromatógrafo líquido de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC - High Pressure Size Exclusion Chromatography), marca SHIMADZU, equipado com detector de índice de refração diferencial, SHIMADZU modelo RID 10A. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação marca WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da, dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (0,1 mol/L), contendo azida sódica (0,03%) foi utilizada como fase móvel, 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). Padrões de dextrana de massa molecular entre $9,4 \times 10^3$ a $6,7 \times 10^5$ Da foram utilizados para construir a curva de calibração para determinação da massa molecular dos polissacarídeos.

4.5.4 Hidrólise ácida total

Para a hidrólise ácida, foram utilizadas alíquotas liofilizadas, contendo cerca de 50 µg de açúcares totais, distribuídas em tubos próprios para hidrólise, completamente selados.

Condição: foram adicionados 300 µL de ácido trifluoracético (TFA) 4 mol/L na amostra liofilizada. Após solubilização, os tubos foram selados e colocados na estufa a 100 °C por 4 ou 6 horas.

Após hidrólise, o ácido foi removido por evaporação à baixa pressão seguida de adição e evaporação consecutivas de água deionizada, para completa eliminação do ácido. Após a remoção total do ácido a amostra foi solubilizada em água deionizada e analisada por cromatografia líquida de íons em alta pressão com detecção por amperometria pulsada.

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)

Para análise dos monossacarídeos obtidos na hidrólise ácida total foi utilizado um sistema Dionex DX500 (cromatografia líquida de íons) e um detector de

amperometria pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocriticamente, usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm) equipada com guarda coluna PA1 ao fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas utilizando 93% de H₂O deionizada (eluente 1) e 7% NaOH 200 mM/L (eluente 2), resultando em uma fase móvel de solução de NaOH 14 mM/L, e corridas de 25 minutos. A coluna foi regenerada por 10 minutos, após o término da corrida, com 100% do eluente 2 e em seguida, submetida às condições iniciais da análise (93% do eluente 1 e 7% do eluente 2), durante 15 minutos (para equilibrar a coluna) antes da injeção da amostra.

Procedimento: alíquotas de 25 µL da amostra foram injetadas no cromatógrafo líquido.

Padrões: para detecção e quantificação dos monossacarídeos, utilizou-se como padrão uma mistura de açúcares neutros contendo 167 ng/25 µL de cada um dos monossacarídeos: L-fucose, L-ramnose, L-arabinose, D-galactose, D-glucose e D-manose, totalizando 1,0 µg/25 µL de açúcares totais.

4.5.6 Determinação da posição e tipos de ligações glicosídicas dos polissacarídeos purificados

4.5.6.1 Metilação pelo Método de Ciucanu e Kerek (1984)

Antes de iniciar o experimento de metilação as amostras foram reduzidas “*overnight*” com NaBH₄, com o pH estabelecido para 9,0. Após a redução, as amostras foram neutralizadas com solução diluída de ácido acético, em banho de gelo e, então, dialisadas em água corrente por aproximadamente 19 horas. Após esse período as amostras foram congeladas e liofilizadas para dar início à metilação.

Amostras de 5 a 10 mg de cada polissacarídeo foram colocadas em balões de fundo redondo para o procedimento de metilação e dissolvidas em 1 mL de DMSO (para auxiliar a solubilização as amostras foram deixadas em agitação “*overnight*”). Após esta etapa foi adicionado cerca de duas espátulas pequenas de NaOH, finamente pulverizado e, em seguida, as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom por

um período de duas horas. Após este período adicionou-se (em banho de gelo) 1 mL de CH₃I em cada amostra. As amostras foram cobertas com papel alumínio e colocadas por mais uma hora no ultrassom, em seguida foram colocadas em agitação, onde permaneceram “*overnight*”.

A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de água destilada gelada e o polissacarídeo metilado foi recuperado pela extração com 1,5 mL de clorofórmio (5x). A fase orgânica foi recuperada e lavada com 4 mL de água destilada (5x). Para a remoção da água residual, utilizou-se sulfato de sódio anidro, que foi retirado posteriormente por filtração com algodão. A fase orgânica, já isenta de sais, foi seca no evaporador rotativo.

Obs: O procedimento de metilação foi repetido por mais duas vezes apenas com a amostra da fração P_{II-F}.

4.5.6.2 Hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos metilados

Os polissacarídeos completamente metilados e secos foram submetidos à hidrólise ácida com TFA 1,5 mol/L (1 mL) e colocados em estufa a 100 °C, durante 30 minutos (AHRAZEM et al., 2001). Após esse tempo o ácido foi eliminado em evaporador rotativo e o material reduzido com boroidreto de sódio (usou-se o deuterado para a fração P_{II-F}). A reação permaneceu em repouso “*overnight*” a temperatura ambiente. Após este período, gotas de HCl 12,5% foram adicionadas para neutralização do sistema. O material foi evaporado a securo e lavado (4x) com 2 mL de metanol para eliminar os boratos na forma de borato de trimetila. Por fim, a amostra foi acetilada com 0,8 mL de piridina e 0,8 mL de anidrido acético (1:1), e deixada em repouso “*overnight*”. A acetilação foi interrompida pela adição de gelo picado e posteriormente, 10 mL de clorofórmio. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram recuperados pela extração com 15 mL de sulfato de cobre 2% (10x). Para a retirada do sulfato de cobre residual, a fase clorofórmica (contendo os derivados acetilados) foi lavada com 10 mL de água destilada (5x). Para a remoção da água remanescente, utilizou-se sulfato de sódio anidro, que foi retirado por filtração com

algodão. O produto final foi evaporado a secura, dissolvido em 0,1 a 0,2 mL de clorofórmio e analisado por CG-EM. Condições utilizadas:

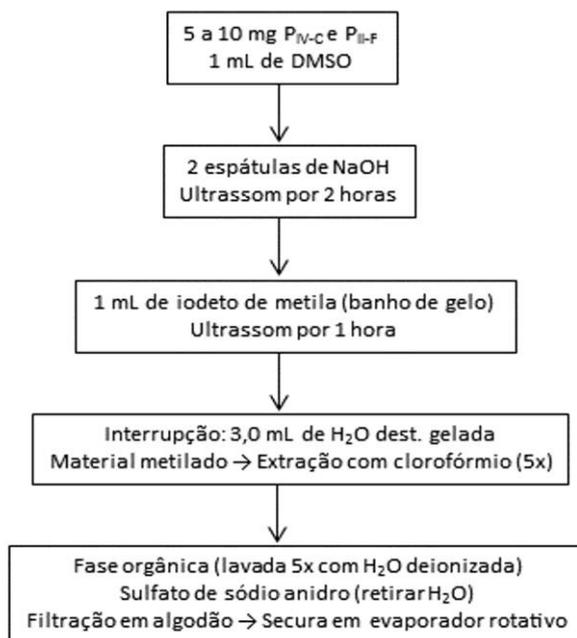
As análises referentes à P_{IV-C} foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Miguel Daniel Nosedá, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, localizado no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Dados do experimento: Cromatógrafo gasoso 2010-plus acoplado ao espectro de massa T08040, marca Shimadzu. Foi utilizada a coluna SH-Rtx-5MS. Programa de temperatura: rampa 100-300 °C, aumento de 10°C/min e com 8 minutos a 300 °C antes do início. Temperatura do injetor: 250 °C.

Já as análises referentes à fração P_{II-F} foram realizadas em colaboração com a professora Dra. Elaine Rosechrer Carbonero, do Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás, regional Catalão. Dados do experimento: Cromatógrafo gasoso Agilent 7820A acoplado ao espectro de massa Agilent 5975E. Foi utilizada a coluna capilar HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Programa de temperatura: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 250 °C (10 min), 50 °C/min até 270 °C (10 min). A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C.

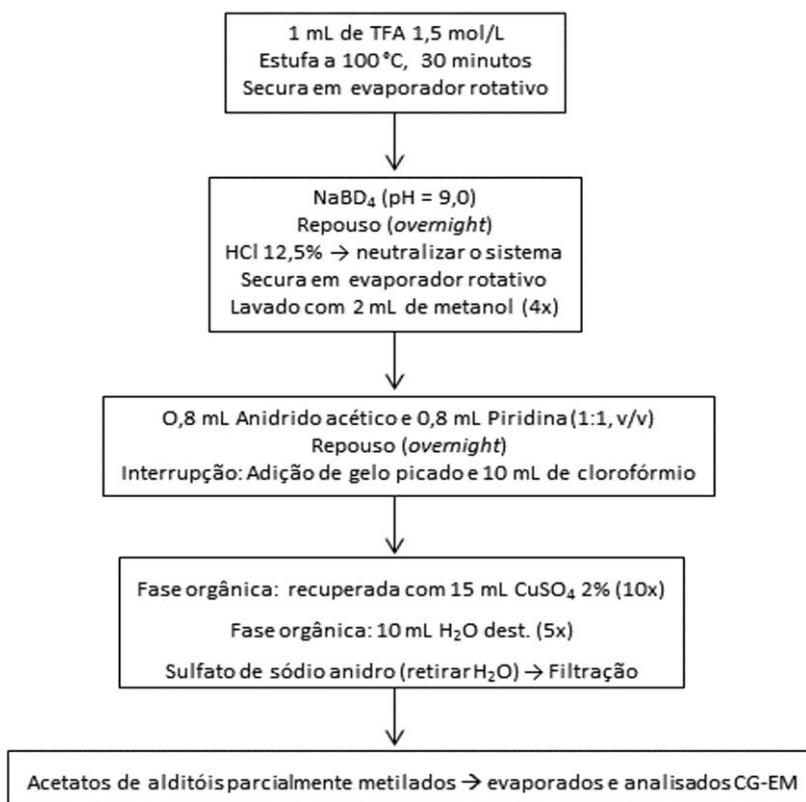
Os acetatos de alditóis parcialmente metilados de ambas frações foram identificados por comparação com os padrões (JANSSON et al., 1976; SASSAKI, IACOMINI, GORIN, 2005; SASSAKI et al., 2005). A Figura 12 mostra as principais etapas para a obtenção dos derivados de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

Figura 12- Sequência das etapas realizadas para obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente metilados das frações P_{IV-C} e P_{II-F}.

Metilação pelo Método de Ciucanu e Kerek (1984)



Hidrólise, Redução e Acetilação dos Polissacarídeos Metilados



Fonte: Adaptado a partir de Ciucanu e Kerek (1984) e Cui (2005).

4.5.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises de RMN referentes à fração P_{IV-C}, proveniente da biomassa do *C. gloeosporioides*, foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Miguel Daniel Nosedá.

Os experimentos foram realizados em espectrômetro da marca BRUKER, modelo Avance-DRX-400, em tubos de 5 mm de diâmetro, operando em 400 MHz, a 30 °C. As amostras foram dissolvidas em água deuterada 99% (D₂O). Os deslocamentos químicos, expressos em ppm (δ), foram determinados utilizando acetona como padrão interno, para as análises de ¹³C, $\delta = 30,2$ e para as análises de ¹H, $\delta = 2,224$. Os dados foram analisados através de um *software* da Bruker.

As análises de RMN referentes à fração P_{II-F}, proveniente da biomassa do *Fusarium* sp, foram realizadas em colaboração com a professora Dra Elaine Rosechrer Carbonero. Para isso foi utilizado o espectrômetro Bruker, modelo Avance de 500 MHz. As análises foram realizadas a 50 ou 70 °C e as amostras dissolvidas em D₂O. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ), de acordo com o padrão interno de tetrametilsilano (TMS, $\delta_{C/H} = 0,0$). Os dados foram processados usando o *software* TopSpin.

4.6 TESTES BIOLÓGICOS: ATIVIDADE CITOTÓXICA E ENSAIO DO COMETA

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Professora Dra. Dalita Gomes Silva Moraes Cavalcante, do Laboratório de Tecnologia de Borracha e Aplicações (LTBA), localizado no núcleo Morumbi da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista, câmpus Presidente Prudente.

4.6.1 Linhagem celular

A linhagem celular usada neste estudo foi a CHO-K1 (Células de Ovário de Hamster Chinês). As células foram cultivadas em 10 mL de DMEM/F10 suplementada

com 10% de soro bovino fetal em frascos de 25 cm² e mantidas em incubadora sem CO₂ a 37 °C.

4.6.2 Preparo das amostras para o teste de toxicidade e genotoxicidade

Inicialmente amostras das frações P_{IV-C} e P_{II-F} foram diluídas em tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 1 mg/mL e colocadas em agitação constante “*overnight*”, em ambiente climatizado a 24±2 °C. Para melhorar a homogeneidade, as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom por um período de uma hora e, em seguida, centrifugadas (5100 x *g*, 5 minutos). Os sobrenadantes foram esterilizados, para isso foram filtrados em fluxo laminar, utilizando filtro de seringa estéril com porosidade de 0,22 µm. Para obter a concentração efetiva de açúcar do material que transpôs o filtro, alíquotas dos filtrados foram quantificadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A partir desta estimativa, diferentes concentrações dos materiais (25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL de PBS) foram preparadas a partir da solução filtrada estéril e usadas para os testes de toxicidade.

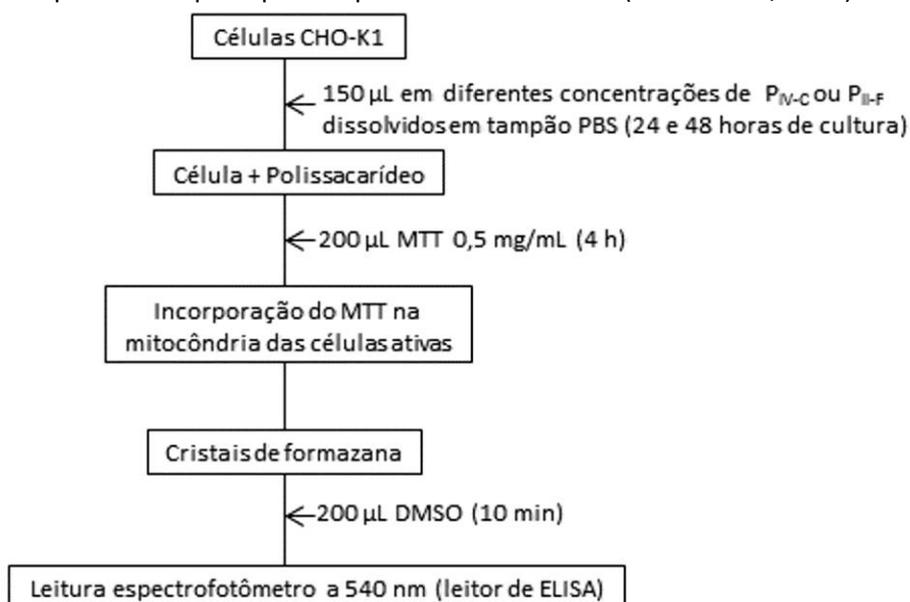
4.6.3 Protocolo de exposição e ensaio de citotoxicidade

O potencial citotóxico das diferentes concentrações do material foi avaliado pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Mosmann (1983), com algumas modificações. As células foram semeadas numa placa transparente de 96 poços na densidade inicial de 2,0 x10⁵ células por poço. As células foram incubadas com PBS e meio de cultura (1:1), controle negativo (CN) ou com diferentes concentrações da amostra (25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL) e meio de cultura (1:1), pelos tempos experimentais de 24 e 48 h. Um controle positivo (CP) também foi preparado na concentração de 1% de Triton-X.

Após a finalização dos tempos experimentais (24 e 48h), o sobrenadante das culturas foi cuidadosamente removido, e então, adicionado em cada poço 200 µL do MTT (0,5 mg/mL de meio de cultura). As células foram incubadas novamente por mais 4 horas, em incubadora sem CO₂ a 37 °C.

Após esse período, o sobrenadante resultante foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados. A absorbância correspondente foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas. A absorbância obtida para o controle negativo foi considerada como 100% de viabilidade celular (VC). A VC das outras amostras foi determinada pela seguinte fórmula: $VCE = [(AE - AB) / (ACN - AB)] \times 100$ onde: VCE = viabilidade celular das células expostas ao material; AE = Absorbância encontrada para células expostas ao material; ACN = Absorbância encontrada para as células do controle negativo; AB = Absorbância encontrada para o branco (poço apenas com DMSO). A Figura 13 resume as principais etapas do ensaio.

Figura 13- Sequência das principais etapas do ensaio do MTT (MOSMANN, 1983).



Fonte: Adaptado a partir de Mosmann (1983).

4.6.4 Ensaio de genotoxicidade - Ensaio do cometa

Devida à quantidade de material disponível, este ensaio foi realizado apenas com a fração P_{II-F}.

Os níveis de danos ao DNA das células foram monitorados pelo ensaio do Cometa, seguindo o protocolo descrito por Singh e colaboradores (1988), com algumas modificações (Figura 14). Para isso, as células foram semeadas numa placa

transparente de 96 poços na densidade inicial de $2,0 \times 10^5$ células por poço. Elas foram incubadas com PBS e meio de cultura (1:1), controle negativo (CN) ou com diferentes concentrações da amostra (100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e meio de cultura (1:1), pelo tempo experimental de 48 horas. Como controle positivo (CP) foi utilizado ciclofosfamida (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Após o período de 48 horas o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com adição de PBS, que posteriormente foi removido para adição de tripsina em cada poço. A ação da tripsina faz com que as células desgrudem dos poços, sendo monitorado pelo microscópio. Para inativar a tripsina foi adicionado em cada poço 500 μL de meio de cultura.

Os materiais de cada poço foram transferidos para eppendorfs e centrifugados por 5 minutos a 1.700 RPM. Após a centrifugação, foram retirados de cada poço, 500 μL de sobrenadante e adicionados 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Os materiais foram homogeneizados suavemente com auxílio da micropipeta e depois transferidos sobre lâminas previamente preparadas com agarose (de ponto de fusão normal). As lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas a geladeira por cerca de 30 minutos. Após esse período as lamínulas foram retiradas e as lâminas transferidas para cubas de vidro para a etapa de lise.

Em cada cuba foi adicionado solução de lise uso gelada (recém-preparada). Deve-se adicionar um volume de solução de lise suficiente para preencher a cuba. Em seguida, as cubas foram cobertas com papel alumínio e armazenadas na geladeira por 1 hora.

Após a etapa de lise as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese. Esta cuba deve estar sobre um recipiente com gelo, pois esta etapa deve ocorrer em temperaturas baixas. O tampão de eletroforese gelado (recém-preparado) foi adicionado cuidadosamente até cobrir as lâminas. A fonte para a eletroforese foi ajustada para 25 V, 300 mA, 20 minutos.

Antes de iniciar a corrida, as lâminas foram deixadas em repouso por 30 minutos. Transcorrido este tempo, a eletroforese foi realizada.

As lâminas foram transferidas para uma bandeja onde foram adicionados em cada uma, 4 mL de solução de neutralização, deixando agir por cerca de 5 minutos. O

processo foi repetido mais duas vezes (não é necessário retirar a solução de uma lavada para outra).

Após a neutralização, as lâminas foram dispostas em cubas de vidro, sendo fixadas com etanol absoluto e deixadas a temperatura ambiente para a secagem.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 50 µL do corante DAPI. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência no aumento de 400 vezes.

Foram contados 100 nucleoides por lâmina. As células foram classificadas em classes de acordo com a intensidade e tamanho da cauda dos fragmentos de DNA.

Classificação das classes segundo Kobayashi e colaboradores (1995):

0: nucleoide sem cauda com poucos fragmentos ao redor

1: cauda menor que o diâmetro do núcleo

2: comprimento da cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo

3: comprimento da cauda 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo

Para obter o escore dos tratamentos foi realizada uma soma entre os resultados da multiplicação:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células encontradas na classe} \times \text{N}^{\circ} \text{ da classe}$$

Depois disso fez-se uma média entre os escores de todas as lâminas correspondentes a determinada condição.

Abaixo seguem os reagentes de cada solução:

Agarose 0,5% (de baixo ponto de fusão): 100 mg de agarose para 20 mL de PBS.

Agarose com ponto de fusão normal 1,5%: 300 mg de agarose para 20 mL de PBS.

Solução de lise estoque: NaCl 2,5 mol/L, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH = 10,0.

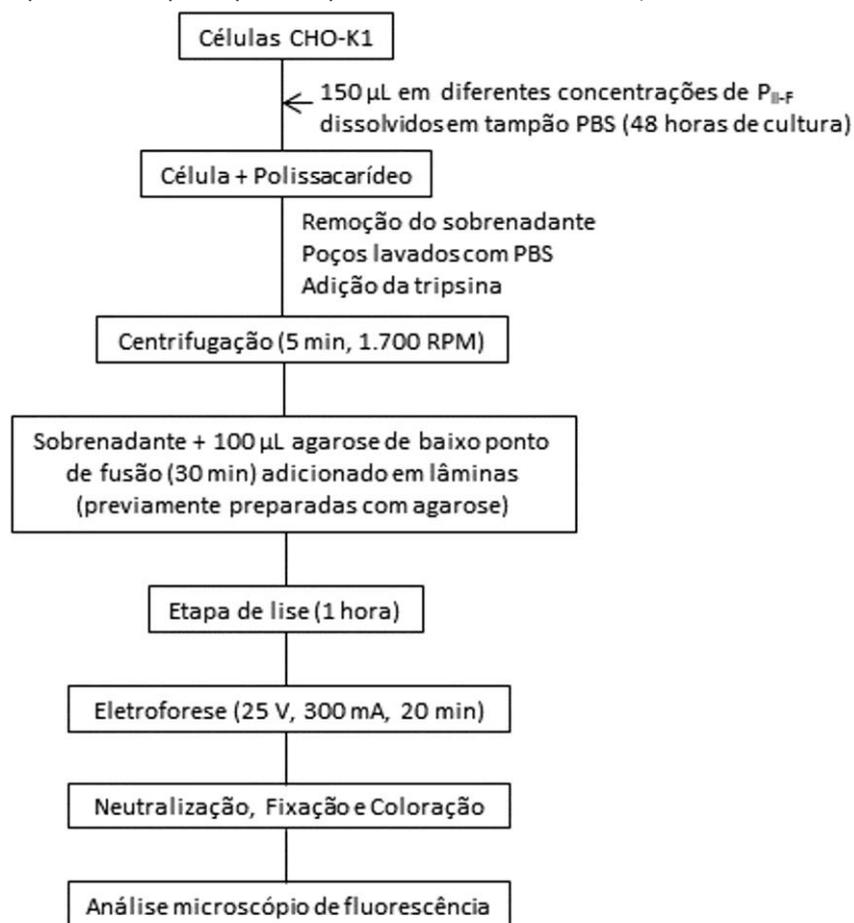
Solução de lise para uso: 1 mL Triton X-100, 10 mL DMSO, 100 mL solução de lise estoque (q.s.p).

Tampão para eletroforese, solução estoque: 200 g NaOH, (q.s.p 500 mL).

Tampão para eletroforese, solução de uso: 5 mL EDTA 200 mM, 30 mL NaOH 10 (q.s.p 1000 mL).

Tampão de neutralização: Tris 0,4 mol/L (q.s.p 1000 mL).

Figura 14- Sequência das principais etapas do ensaio do Cometa (SINGH et al., 1988).



Fonte: Adaptado a partir de Singh e colaboradores (1988).

4.6.5 Análises estatísticas

Para os dois ensaios (MTT e cometa) foram realizados os mesmos procedimentos de análise. Os resultados foram comparados por análise paramétrica de variância (ANOVA), utilizando o método Student-Newman-Keuls ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos em média \pm SE (desvio padrão).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos deste trabalho são conhecidos principalmente quanto à capacidade fitopatogênica e, apesar de serem espécies diferentes, podem apresentar hospedeiros em comum, tais como plantas frutíferas, leguminosas e forrageiras (MAKI, 2006; SILVA, 2016). Isso provavelmente demonstra um comportamento biológico muito semelhante entre eles, por exemplo, quanto à forma de infecção na planta. A análise de polissacarídeos da biomassa desses fungos, além de importante para o conhecimento básico de composição química fúngica, poderá contribuir para determinação de características estruturais em comum entre ascomicetos patogênicos.

5.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA

Para a obtenção da maior quantidade possível de biomassa, os fungos foram cultivados de acordo com os resultados observados por Dominato (2017), sendo selecionadas as condições que resultaram em maior produção de biomassa. Para este trabalho foram realizados 6 cultivos do *C. gloeosporioides* e 5 cultivos do *Fusarium sp*, resultando, respectivamente, em 53,4 e 51 gramas de biomassa. Em ambos os experimentos pode-se observar que os fungos produzem pigmentos. A biomassa do *C. gloeosporioides* apresentou uma coloração cinza (Figura 8, seção 4.2.3) enquanto a do *Fusarium sp* apresenta-se no tom amarelo claro no início do cultivo, resultando num tom rosa após as 72 horas de inóculo (Figuras 7d, seção 4.2.2 e 9a, seção 4.2.3). Após os cultivos, as biomassas foram separadas do meio líquido através de um sistema de filtração a vácuo e lavadas com água destilada até que o teste de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) resultasse negativo, indicando ausência de açúcar (exopolissacarídeos). Em seguida, as biomassas foram liofilizadas e maceradas para o início das extrações.

5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A metodologia utilizada para a separação dos polissacarídeos das biomassas fúngicas foi adaptada de trabalhos de extração, purificação e caracterização de polissacarídeos de diferentes micro-organismos (ALEXANDRE et al., 2018; ALEXANDRE et al., 2019; CORRADI DA SILVA et al., 2008; CORRADI DA SILVA et al., 2013). As extrações foram efetuadas para obtenção dos polissacarídeos com base em suas características químicas de solubilidade (Figura 15).

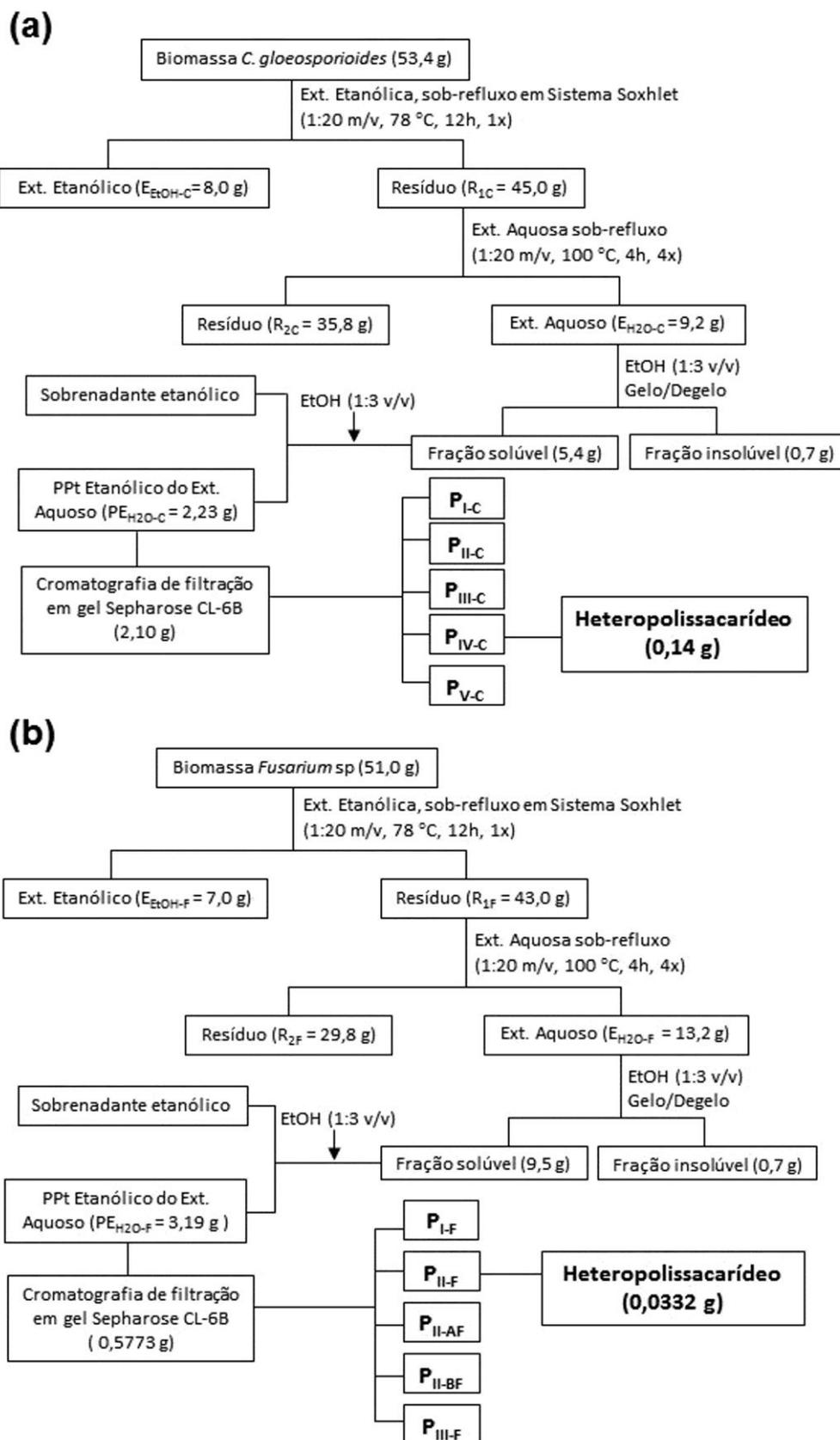
5.2.1 Extração etanólica

Para a remoção de componentes de baixa massa molecular, a extração etanólica foi selecionada. Tratamentos semelhantes foram realizados com a biomassa dos fungos *Phelinus baumii* (GE, ZHANG, SUN, 2009) e *Verticillium lecanii* (CORRADI DA SILVA et al., 2013).

Os resíduos das extrações etanólicas, denominados de R_{1C} (referente ao *C. gloeosporioides*) e R_{1F} (referente ao *Fusarium* sp), pesaram respectivamente, 45 e 43 gramas, após secagem em estufa a 50 °C. Indicando, portanto, que o procedimento foi eficiente na remoção de, aproximadamente, 16% de compostos de baixa massa molecular presentes nas biomassas dos fungos *C. gloeosporioides* e *Fusarium* sp. Os extratos etanólicos, E_{EtOH-C} e E_{EtOH-F}, foram armazenados pois não foram objetos de estudo deste trabalho.

Os resíduos das extrações etanólicas, R_{1C} e R_{1F}, foram macerados e preparados para a extração seguinte.

Figura 15- Protocolo dos procedimentos experimentais para obtenção dos polissacarídeos provenientes da biomassa do (a) *C. gloeosporioides* e do (b) *Fusarium* sp.



Fonte: Adaptado a partir de Alexandre e colaboradores (2018).

5.2.2 Extração aquosa a quente

A extração aquosa a quente é, geralmente, eficaz para isolar polissacarídeos da biomassa fúngica. Normalmente este procedimento isola β -glucanas, galactanas e mananas (ALEXANDRE et al., 2018; HAN et al., 2011; RUTHES et al., 2013; SMIDERLE et al., 2008; ZHOU et al., 2013).

Os resíduos das extrações etanólicas, R_{1C} e R_{1F} , foram submetidos à extração aquosa a quente, por quatro vezes. Esse procedimento, com repetição, aumenta a eficiência da extração e gera maior rendimento em polissacarídeos nos extratos (RUTHES, SMIDERLE, IACOMINI, 2015). Os produtos das quatro extrações aquosas, E_{H_2O-C} (extrato aquoso *C. gloeosporioides*) e E_{H_2O-F} (extrato aquoso *Fusarium* sp), foram reunidos, concentrados a pressão reduzida e congelados. Os resíduos provenientes das extrações aquosas, R_{2C} e R_{2F} , foram armazenados.

5.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS

Aos descongelar os extratos, E_{H_2O-C} e E_{H_2O-F} , em temperatura ambiente, houve a formação de precipitado em ambos, indicando a necessidade de separação por centrifugação. Essa passou a ser considerada como a primeira etapa na purificação dos extratos.

O processo de congelamento e descongelamento é uma metodologia simples e eficaz na separação de moléculas solúveis e insolúveis em água fria. O método consiste na diferença de solubilidade de moléculas lineares e ramificadas. Polissacarídeos lineares ou com porcentagens menores de ramificação são normalmente encontrados na fração insolúvel, enquanto os mais ramificados são encontrados na fração solúvel (RUTHES et al., 2013; RUTHES, SMIDERLE, IACOMINI, 2015). Isto ocorre porque as ramificações estão mais disponíveis para interagir com a água do que os resíduos presentes nas cadeias principais. Consequentemente, polissacarídeos lineares tendem a ser menos solúveis em água.

Após o processo de congelamento e descongelamento as frações solúveis de ambos os fungos foram submetidas à precipitação com etanol (1:3), centrifugação e diálise. As frações resultantes passaram a ser denominadas de precipitados etanólicos dos extratos aquosos do *C. gloeosporioides* (PE_{H2O-C}), e do *Fusarium* sp (PE_{H2O-F}); os resultados de suas quantificações estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Quantificação de açúcar total e proteínas do PE_{H2O-C} e do PE_{H2O-F}.

Fração	Massa após gelo/degelo (g)	Açúcar total (%)	Proteínas (%)
PE _{H2O-C}	2,23	94	6
PE _{H2O-F}	3,19	83	17

Apesar do elevado percentual de proteínas, optou-se por desproteínizar as frações, se necessário, em etapas posteriores da purificação. A partir daqui, os tratamentos com as frações PE_{H2O-C} e PE_{H2O-F} serão mostrados individualmente.

5.3.1 Resultados referentes ao precipitado etanólico do extrato aquoso do *Colletotrichum gloeosporioides* (PE_{H2O-C})

5.3.1.1 Análise da composição monossacarídica e do grau de homogeneidade do PE_{H2O-C}

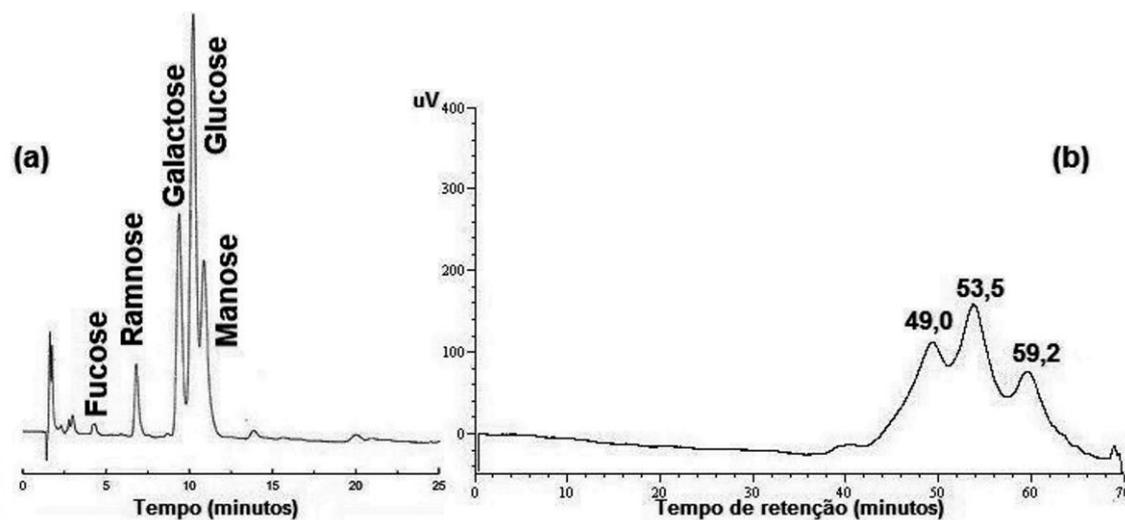
Muitas técnicas são requeridas para a caracterização química dos polissacarídeos e uma delas tem como finalidade determinar a composição em monossacarídeos. Com o avanço das técnicas cromatográficas, esse processo costuma ser simples. Inicialmente o polissacarídeo deve ser hidrolisado, dessa forma as ligações glicosídicas são quebradas liberando os respectivos monômeros que formam a molécula (PAZUR, 1994). Os monossacarídeos livres são detectados e quantificados por cromatografia líquida de íons em alta pressão (HPAEC), com detecção amperométrica pulsada (PAD), onde os tempos de retenção são comparados com os da mistura de padrões. O uso do HPAEC/PAD para o estudo da composição monossacarídica dos carboidratos é mais conveniente por não necessitar da derivatização das amostras. Além disso, sua alta precisão detecta e quantifica

quantidades mínimas de material (BRUMMER, CUI, 2005). A alíquota hidrolisada do PE_{H2O-C} (Figura 16a) apresentou os monossacarídeos cujos tempos de retenção foram correspondentes aos padrões de L-ramnose, D-galactose, D-glucose e D-manose. As proporções desses componentes na estrutura polissacarídica estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3- Composição monossacarídica do PE_{H2O-C}.

Monossacarídeos	T _R dos padrões (min)	T _R do PE _{H2O-C} (min)	% dos monômeros
L-fucose	4,11	4,18	<2%
L-ramnose	6,50	6,55	8
D-galactose	8,92	9,08	25
D-glucose	9,72	9,88	41
D-manose	10,38	10,52	24

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 µg em 200 µL; Fluxo: 0,6 mL/min; Eluente: NaNO₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,03%.



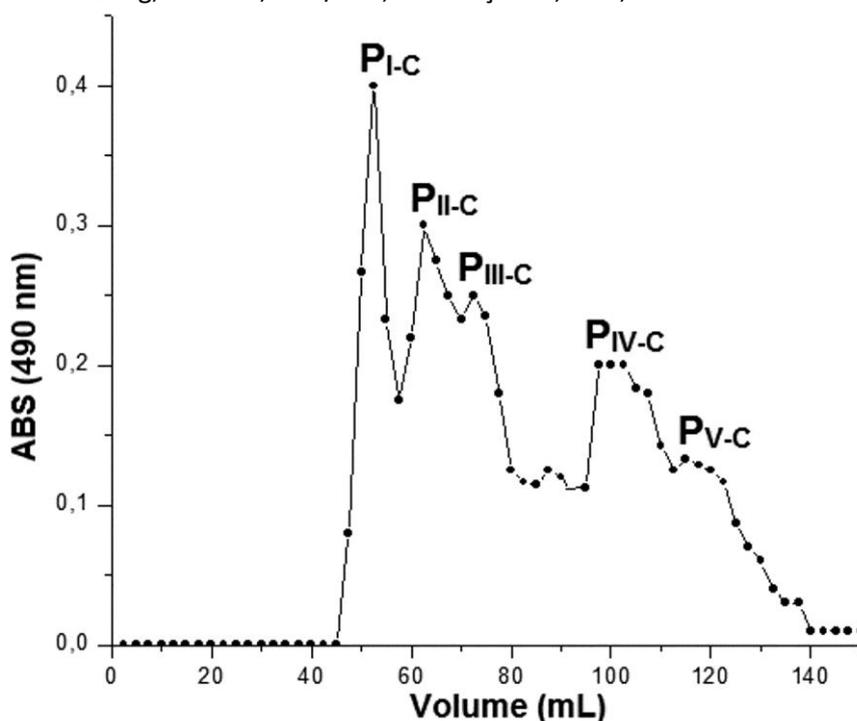
Para dar sequência à caracterização química, é fundamental verificar a pureza e a homogeneidade do material. Na química dos carboidratos, a cromatografia de exclusão estérica acoplada ao detector de índice de refração (HPSEC/RID) é um dos métodos mais utilizados para essa finalidade.

Segundo esta técnica, PE_{H2O-C} eluiu em três picos, com tempos de retenção em 49,0, 53,5 e 59,2 minutos (Figura 16b). Este perfil é de uma mistura de, pelo menos, três polissacarídeos de massas moleculares diferentes e sinaliza a necessidade de novos procedimentos de purificação antes de se proceder à caracterização química dos polissacarídeos.

5.3.1.2 Purificação do PE_{H2O-C} por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B

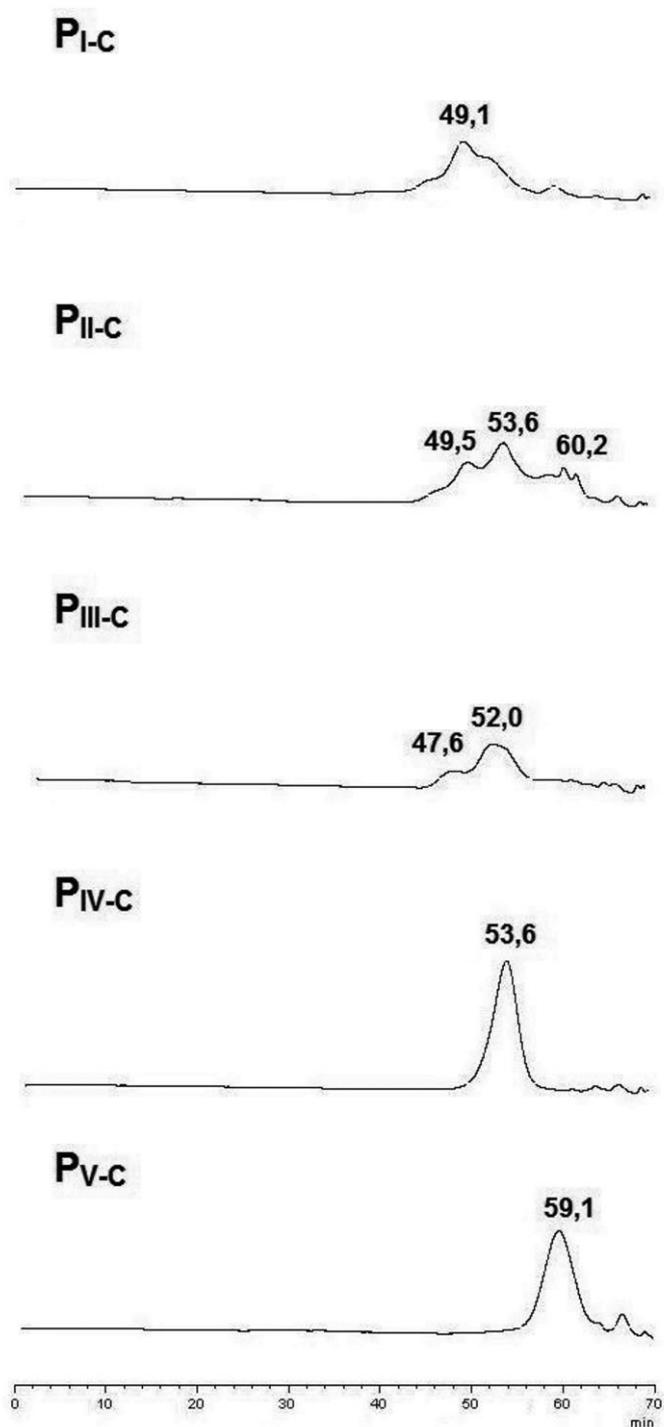
Sendo PE_{H2O-C} uma mistura de polissacarídeos que pode ser separada pelas diferenças de massa molecular (Figura 16b), a cromatografia de filtração em gel, a pressão normal, foi o procedimento escolhido para a nova etapa de purificação. Esta técnica separa as moléculas de acordo com suas massas moleculares, em ordem decrescente de tamanho. A coluna preenchida com gel Sepharose CL-6B separou o PE_{H2O-C} em cinco picos (Figura 17). Várias alíquotas do PE_{H2O-C} foram aplicadas na coluna e as frações correspondentes a cada pico foram reunidas, concentradas, quantificadas e novamente analisadas por HPSEC/RID.

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.



A partir das análises por HPSEC/RID (Figura 18) pode-se observar que a fração P_{I-C} apresenta um perfil bastante polidisperso, a detecção de um ombro e base bem larga podem indicar a presença de outro(s) polissacarídeo(s) que possuem massas moleculares muito próximas e por isso não foram separados na coluna de filtração em gel Sepharose CL-6B. Já as frações P_{II-C} e P_{III-C} mostram que são formadas por uma mistura de dois a três polissacarídeos diferentes, visualizados em dois picos mais definidos e um ombro no P_{II-C}. A quantidade de picos, bem como a simetria dos mesmos, podem indicar o grau de pureza do material (IZYDORCZYK, 2005). Quanto maior a simetria, maior será a homogeneidade (PAZUR, 1994). Em relação às frações P_{IV-C} e P_{V-C}, pode-se inferir que elas se comportam como moléculas homogêneas, pois verifica-se apenas um pico na análise. A fração P_{IV-C} apresenta-se menos polidispersa, o que pode indicar maior pureza em relação a fração P_{V-C}.

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 7.10⁶, 4.10⁵, 8.10⁴ e 5.10³ Da. Total de material aplicado: 200 µg em 200 µL; Fluxo: 0,6 mL/min a 37 °C; Eluente: NaNO₃ 0,1 mol/L contendo azida sódica 0,03%.



Para conhecer a composição monossacarídica das frações consideradas puras por HPSEC/RID, alíquotas do P_{IV-c} e P_{V-c} foram separadas, hidrolisadas (TFA 4 mol/L, 100

°C, 6h) e analisadas por HPAEC/PAD. Os resultados (Tabela 4) mostraram que galactose (68%) é o monossacarídeo majoritário da fração P_{IV-C}, seguida de glucose (28) e manose (5%). Na fração P_{V-C}, galactose (56%) e glucose (30%) foram os principais monossacarídeos encontrados, além de manose (12%) e traços de fucose (<2%).

A quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) mostrou que ambas frações possuem em sua composição menos de 1% desse componente, indicando portanto, que não há necessidade de desproteínizar as frações.

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 *C. gloeosporioides*.

Frações	Monossacarídeos (%)					Quantidade de Material (mg)
	Fucose	Ramnose	Galactose	Glucose	Manose	
PE _{H2O-C}	Traços*	8	25	41	24	2230,0
P _{IV-C}	-	-	68	28	5	140,0
P _{V-C}	Traços*	-	56	30	12	53,0

*<2%.

A partir do rendimento das frações P_{IV-C} e P_{V-C}, optou-se por dar continuidade à caracterização química com a fração P_{IV-C}.

5.3.1.3 Determinação da massa molecular e grau de polidispersividade da fração P_{IV-C}

De todos os polissacarídeos presentes na biomassa do *C. gloeosporioides*, aquele correspondente à fração IV-C, denominado P_{IV-C}, indica estar puro o suficiente para novos experimentos de caracterização química como RMN e CG-EM, bem como uma resposta efetiva e confiável a um teste de atividade biológica. Os resultados de caracterização química e atividade citotóxica referentes à fração P_{IV-C} descritos neste trabalho, constam na publicação de Alexandre e colaboradores (2019).

A massa molecular aparente da fração P_{IV-C} foi estimada em 28.222 Da, a partir da comparação com uma curva de calibração com padrões de dextrana. O valor do índice de polidispersividade (Mw/Mn) de 1,17, indica um polímero pouco polidisperso, o que pode ser observado pela base mais estreita do pico. A composição

monossacarídica da fração P_{IV-C} (Tabela 4), revela que se trata, provavelmente, de uma glucogalactana. A hexose manose pode fazer parte da estrutura polimérica ou, mais provavelmente, ser o elo entre o polissacarídeo e as glicoproteínas presentes na parede celular, como mostrado na Figura 2 (Revisão Bibliográfica).

5.3.1.4 Determinação das posições das ligações glicosídicas da fração P_{IV-C} por CG-EM

Para entender como esses monossacarídeos estão interligados na estrutura polissacarídica é necessário determinar a posição das ligações glicosídicas. Neste caso, a metilação é normalmente o método selecionado (JANSSON, et al., 1976; SIMS et al., 2018). Inicialmente o polissacarídeo é metilado, onde todas as hidroxilas livres devem ser substituídas por grupos metil, resultando no polissacarídeo completamente metilado. Posteriormente, as ligações glicosídicas do polissacarídeo são quebradas por hidrólise ácida, gerando monossacarídeos parcialmente metilados. Esses são convertidos em alditóis parcialmente metilados, por redução, e, finalmente, são acetilados resultando nos produtos finais desse processo de derivatização, que são os acetatos de alditóis parcialmente metilados. Esses derivados, então voláteis, são analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (JANSSON, et al., 1976; LINDBERG, 1972).

A cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados da fração P_{IV-C} mostrou a presença de quatro derivados principais: 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-glucitol, 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil-galactitol, 1,4,6-tri-*O*-acetil-2,3,5-tri-*O*-metil-galactitol e 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2,5-di-*O*-metil-galactitol (Tabela 5).

Esses resultados indicam que a estrutura da fração P_{IV-C} é formada por terminais não redutores *Glc*p-(1→, resíduos galactofuranosídicos 5-*O*- e 6-*O*- substituídos, além de um derivado dimetilado correspondendo ao resíduo galactofuranosil 6-*O*-substituído com ramificação na hidroxila do carbono 3, provavelmente pelas unidades glucopiranosídicas.

Os tempos de retenção e os fragmentos de massa de cada derivado metilado proveniente da CG-EM da fração P_{IV-C} estão apresentados na Tabela 5. A detecção desses derivados é importante para a confirmação da estrutura química da molécula,

entretanto a quantificação não é um processo totalmente confiável porque a presença de unidades piranosídicas e furanosídicas, fazendo parte da mesma molécula, dificulta os métodos químicos de análise desses açúcares. Em outras palavras, as condições de hidrólise, uma das etapas na técnica da metilação, consideradas severas para algumas unidades (furanosídicas), são muito brandas para as outras (piranosídicas), e o percentual dos derivados metilados não representa o valor real dos mesmos na molécula, ainda que diferentes condições de hidrólise fossem aplicadas. Portanto, para polissacarídeos com unidades monossacarídicas com conformações diferentes, os métodos físico-químicos de análise, que geralmente usam pouca ou nenhuma reação química para modificação da molécula original, são os mais apropriados.

Tabela 5- Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da fração P_{IV-C}.

Tempo de retenção (min)	Derivados metilados	Tipos de ligação	% da área dos derivados	Fragmentos de massa (m/z)
13,41	2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	Glc _p -(1→	24,2	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
14,50	2,3,6-Me ₃ -Gal _f	5→)-Gal _f -(1→	27,3	71, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 143, 173, 233
14,94	2,3,5-Me ₃ -Gal _f	6→)-Gal _f -(1→	24,9	85, 101, 117, 127, 143, 159, 201, 233
15,15	2,5-Me ₂ -Gal _f	3,6→)-Gal _f -(1→	23,6	87, 99, 111, 117, 129, 143, 161, 185, 201

5.3.1.4 Caracterização química por RMN da fração P_{IV-C}

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é bastante usada na química de carboidratos como uma técnica não destrutiva, sensível e bastante elucidativa. O RMN- ¹H embora mais sensível que o de ¹³C, não oferece tanta informação estrutural, devido a separação incompleta dos sinais de ressonância de prótons para moléculas de carboidratos, que são bastante complexas. Já, para os polissacarídeos, o RMN- ¹³C, embora menos sensível, é capaz de informar a configuração (α e/ou β), a posição das ligações glicosídicas (1→3, 1→6, etc...) e a

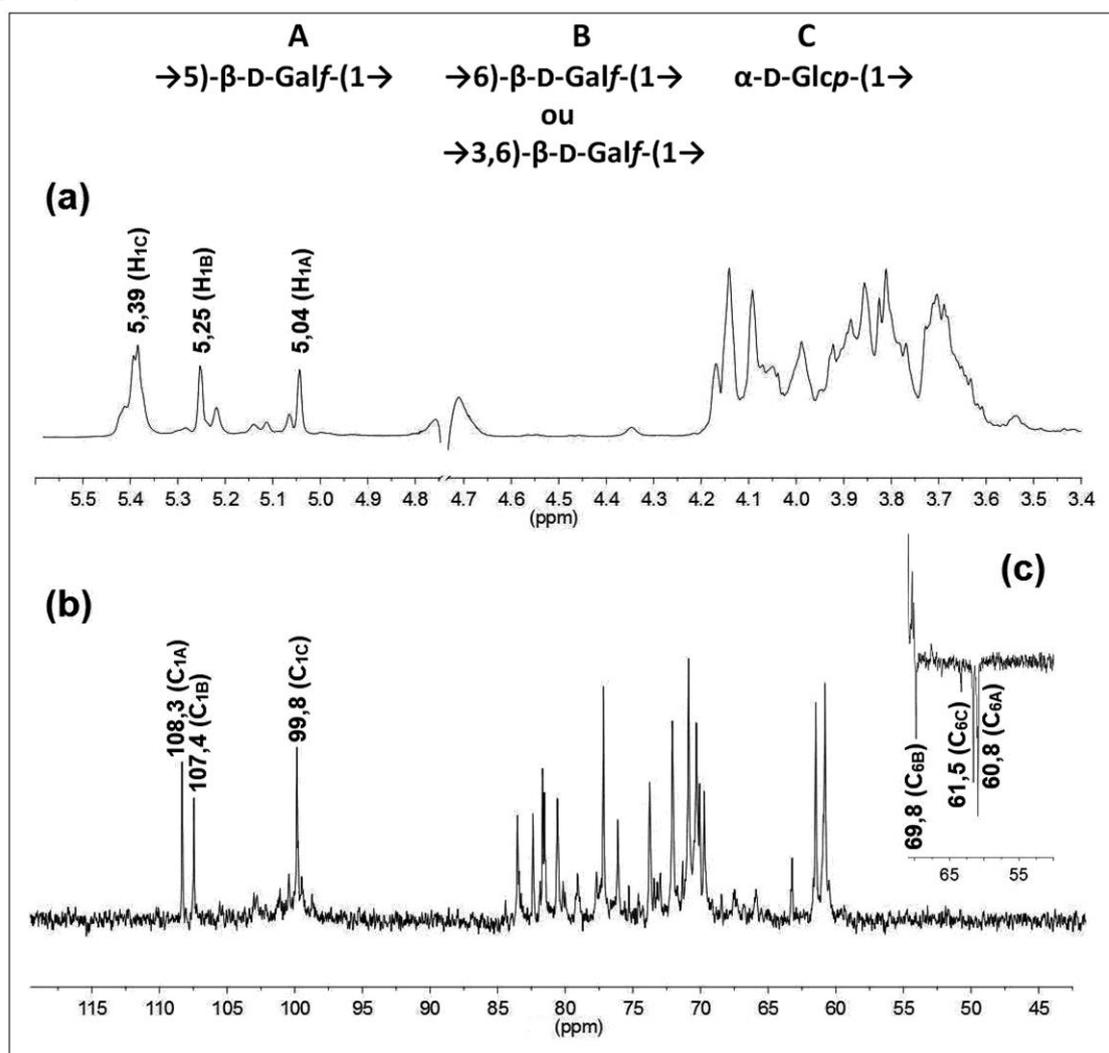
conformação (furanosídica ou piranosídica) de suas unidades. Desde que os espectros bidimensionais, principalmente heteronucleares, puderam ser obtidos correlacionando a sensibilidade dos sinais dos prótons com a separação mais eficiente dos carbonos, essa técnica tem se tornado a preferida para a determinação da estrutura de polissacarídeos.

Seguindo essa linha de raciocínio, análises de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas para caracterizar a estrutura de P_{IV-C}. O espectro de RMN- ¹H (Figura 19a) mostrou três sinais anoméricos intensos em δ 5,39, 5,25 e 5,04, sugerindo a presença de, pelo menos, três resíduos distintos na molécula. Prótons anoméricos com menor intensidade também foram observados. No espectro de RMN- ¹³C (Figura 19b) foram encontrados dois sinais anoméricos na região de campo baixo, em δ 108,3 e 107,4. De acordo com a literatura, é comum polissacarídeos provenientes da biomassa de fungos ascomicetos serem constituídos por unidades galactofuranosídicas (BARRETO-BERGTER, GORIN, TRAVASSOS, 1981; LATGÉ, 2007; MARINO, RINFLERCH, LEDERKREMER, 2017), cujos espectros de RMN- ¹³C apresentam sinais de deslocamentos químicos em campo baixo, superiores a δ 106,0 (AHRAZEM et al., 2007; CORDEIRO et al., 2012). Com esses dados da literatura, pode-se inferir que os sinais em δ 108,3 e 107,4, encontrados no espectro de RMN- ¹³C de P_{IV-C}, pertencem a unidades β -D-galactofuranosídicas ligadas em (1 \rightarrow 5) e (1 \rightarrow 6), respectivamente (AHRAZEM et al., 2001). Confirmando com essas informações da literatura estão os resultados da metilação, cujos derivados tri- e di- metilados confirmam uma estrutura furanosídica. Considerando que a glucose é o outro componente do polissacarídeo também presente em quantidade elevada (~28%), o sinal em δ 99,8 pode ser atribuído às unidades D-glucopiranosídicas (CORRADI DA SILVA et al., 2013), cujo valor sugere a configuração α . Sinais menos intensos entre δ 103,0 e 98,7 podem estar relacionados às unidades piranosídicas de qualquer um dos três monossacarídeos presentes na estrutura de P_{IV-C}.

Na região de C-6 substituído do espectro de RMN- ¹³C-DEPT (Figura 19c), observa-se um sinal em δ 69,8, que pode ser atribuído aos C-6 envolvidos na ligação glicosídica das unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 6) ligadas. Neste mesmo espectro, os outros dois sinais invertidos observados em δ 60,8 e 61,5, correspondem, respectivamente, aos C-

6 livres das unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 5) ligadas e das unidades α -D-Glcp. Segundo a literatura, muitos polissacarídeos da biomassa fúngica, solúveis em água, são ricos em galactose furanosídica, com cadeias poliméricas de diferentes comprimentos, tipos de ligações e ramificações de glucose (AHRAZEM et al., 2007; CORRADI DA SILVA et al., 2013). Geralmente essa estrutura encontra-se ligada a um “core” de manose (LEAL et al., 2008).

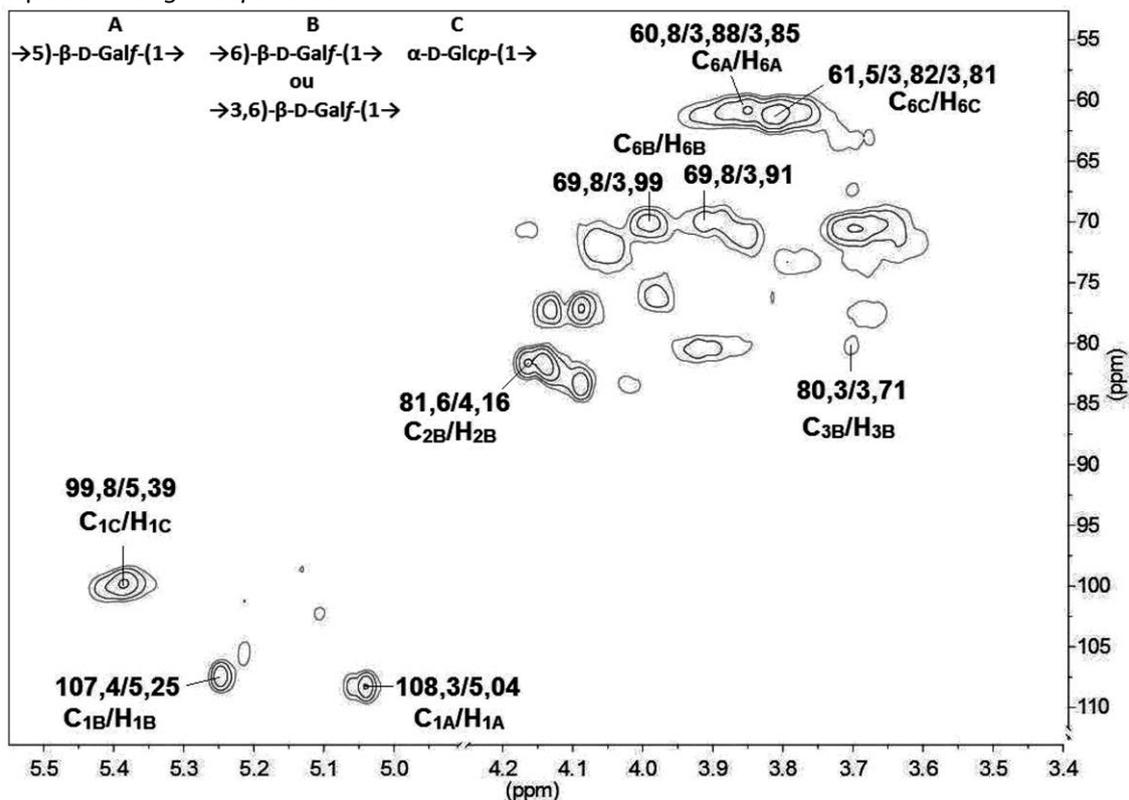
Figura 19- Espectros de RMN- ^1H (a), RMN- ^{13}C (b) e região do RMN- ^{13}C -DEPT (c) da fração P_{IV-C} obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do *C. gloeosporioides*.



Para correlacionar os carbonos aos seus respectivos prótons o espectro de HSQC foi analisado (Figura 20). Os prótons anoméricos em δ 5,04 e 5,25 mostraram, respectivamente, correlação com os sinais δ 108,3 e 107,4, referentes às unidades β -D-

Galf-(1→5) e β-D-Galf-(1→6) ligadas e a correlação em δ 99,8/5,39, ao C-1/H-1 das unidades α-D-Glcp. Na região de C-6 substituído, os sinais em δ 69,8/3,99/3,91 correspondem aos C-6/H-6 das unidades β-D-Galf-(1→6). As correlações em δ 60,8/3,88/3,85 e δ 61,5/3,82/3,81 correspondem, respectivamente, aos C-6/H-6 das unidades β-D-Galf-(1→5) ligadas e α-D-Glcp.

Figura 20- Espectro bidimensional heteronuclear (HSQC) da fração P_{IV-C} obtida do extrato aquoso do *C. gloeosporioides*.



Do espectro bidimensional homonuclear COSY foi correlacionado o sinal de H-1 (δ 5,25) aos respectivos H-2 (δ 4,16) (Figura 21a) e H-3 (δ 3,71) (Figura 21b) das unidades β-D-Galf-(1→6) ligadas. Com essas atribuições, os deslocamentos químicos para C-2 (δ 81,6) e C-3 (δ 80,3) puderam ser obtidos no HSQC e com isso foi possível correlacionar no espectro de HMBC (Figura 21c), o C-3 (δ 80,3) dessas unidades, ao H-1 (δ 5,39) das unidades α-D-Glcp, sugerindo substituição em O-3 nas unidades β-D-Galf-(1→6) por unidades α-D-Glcp. Esses resultados confirmam o que foi observado na

análise de CG-EM, onde um dos derivados corresponde a unidades galactofuranosídicas 2,5-dimetiladas.

Também no espectro HMBC são visualizadas a correlação entre o C-6 (δ 69,8) dos resíduos β -D-Galf-(1 \rightarrow 6) ao H-1 (δ 5,04) do resíduo β -D-Galf-(1 \rightarrow 5), indicando, portanto, a ligação entre essas unidades. A Tabela 6 resume os assinalamentos discutidos.

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 \rightarrow 6) ligadas; (c) acoplamento entre o C-6 das unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 6) ligadas com o H-1 das unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 5) ligadas e acoplamento entre C-3 das unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 6) ligadas com H-1 das unidades α -D-Glcp.

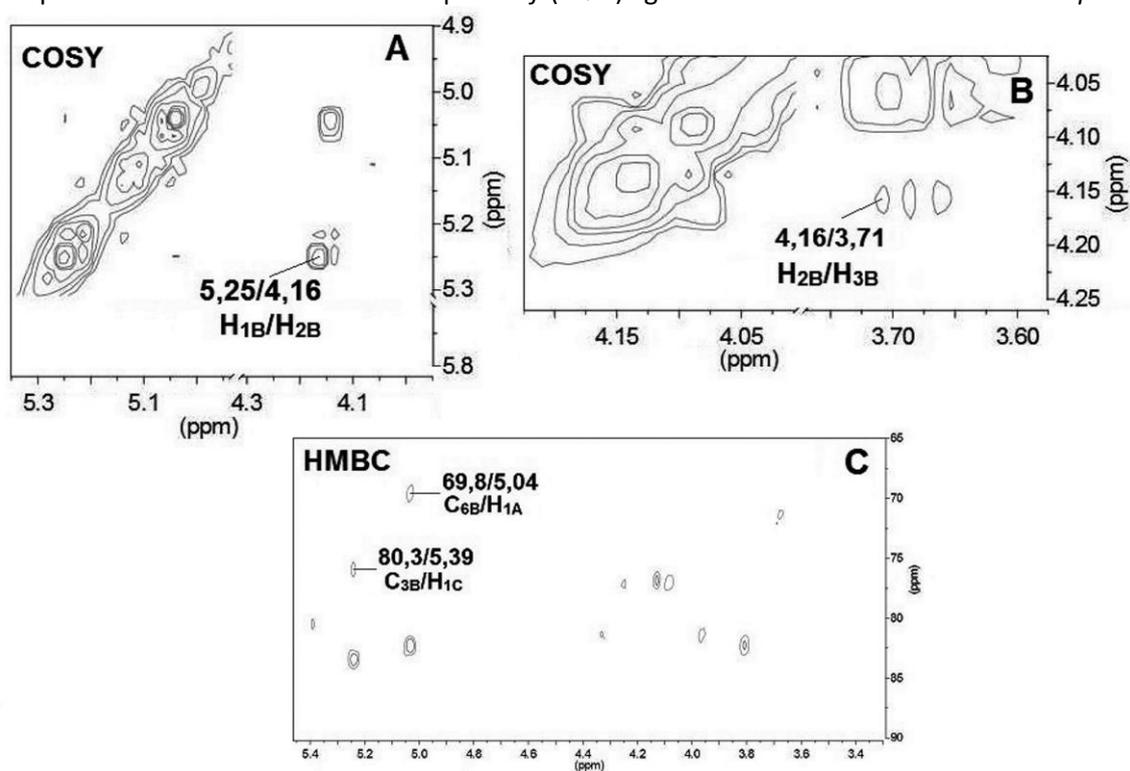
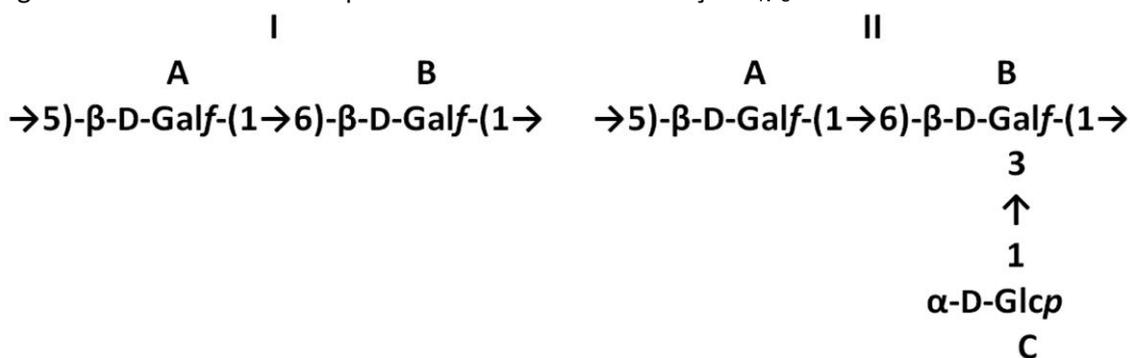


Tabela 6- Assinalamentos de C/H da fração P_{IV-C} obtida do extrato aquoso do *Colletotrichum gloeosporioides*.

Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ)	Assinalamentos
108,3/5,04	C ₁ /H ₁ \rightarrow 5)- β -D-Galf-(1 \rightarrow
107,4/5,25	C ₁ /H ₁ \rightarrow 6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow
107,4/5,25	C ₁ /H ₁ \rightarrow 3,6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow
99,8/5,39	C ₁ /H ₁ α -D-Glcp-(1 \rightarrow
80,3/3,71	C ₃ /H ₃ \rightarrow 3,6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow
60,8/3,88/3,85	C ₆ /H ₆ \rightarrow 5)- β -D-Galf-(1 \rightarrow
61,5/3,82/3,81	C ₆ /H ₆ α -D-Glcp-(1 \rightarrow
69,8/3,99/3,91	C ₆ /H ₆ \rightarrow 6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow
69,8/3,99/3,91	C ₆ /H ₆ \rightarrow 3,6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow

Com esses resultados, podemos sugerir que P_{IV-C} é um polímero de cadeia principal constituída por unidades β -D-galactofuranosídicas (1 \rightarrow 5) e (1 \rightarrow 6) ligadas, sendo algumas das unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 6) substituídas em O-3 por unidades α -D-glucopiranosídicas. A Figura 22 ilustra as possíveis sequências de ligações encontradas na fração P_{IV-C}.

Figura 22- Possíveis resíduos presentes na estrutura da fração P_{IV-C}.



Fonte: (ALEXANDRE et al., 2019)

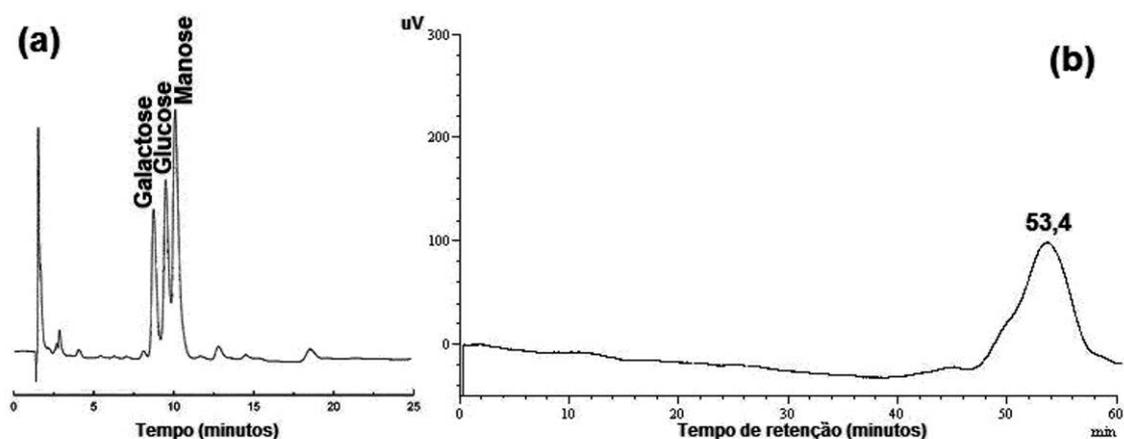
5.3.2 Resultados referentes ao precipitado etanólico do extrato aquoso do *Fusarium* sp (PE_{H2O-F})

5.3.2.1 Análise da composição monossacarídica e do grau de homogeneidade do PE_{H2O-F}

A análise da composição monossacarídica por HPAEC/PAD do produto de hidrólise do PE_{H2O-F} (Figura 23a) apresentou galactose (25%), glucose (26%) e manose (48%).

Para conhecer o grau de homogeneidade do PE_{H2O-F}, a análise por HPSEC/RID foi efetuada e o perfil observado foi de um único pico assimétrico (Figura 23b), sugerindo que se trata de um material heterogêneo. Além disso, a presença de um ombro e a base larga do pico sinalizam que PE_{H2O-F} pode conter diferentes polissacarídeos com massas moleculares próximas, tornando-se necessário procedimentos de purificação. Assim, como para o PE_{H2O-C}, a cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B, também foi selecionada para purificar o PE_{H2O-F}.

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: NaNO₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,03%.

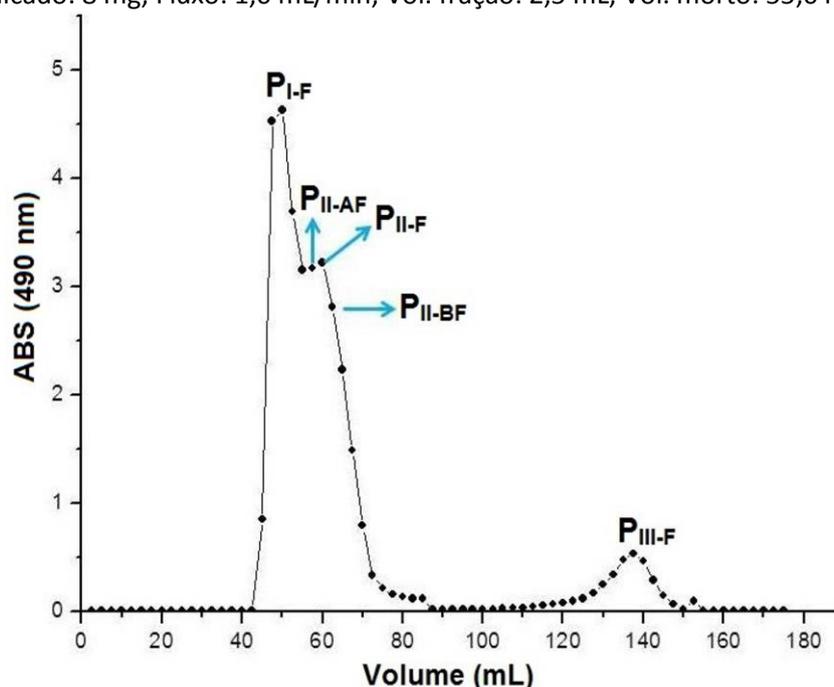


5.3.2.2 Purificação do PE_{H2O-F} por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B

PE_{H2O-F} foi separado em 3 picos na cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B (Figura 24), indicando a presença de pelo menos três moléculas com massas moleculares diferentes.

Para evitar possíveis contaminações entre polissacarídeos de composições químicas diferentes, porém com massas moleculares muito próximas, optou-se por separar em alíquotas o primeiro tubo que antecede (chamado de P_{II-AF}) e o primeiro tubo que sucede (chamado de P_{II-BF}) o ponto de maior absorbância do P_{II-F}. A Figura 24 ilustra esses pontos. Várias colunas foram realizadas e as frações correspondentes reunidas, concentradas e analisadas por HPSEC/RID.

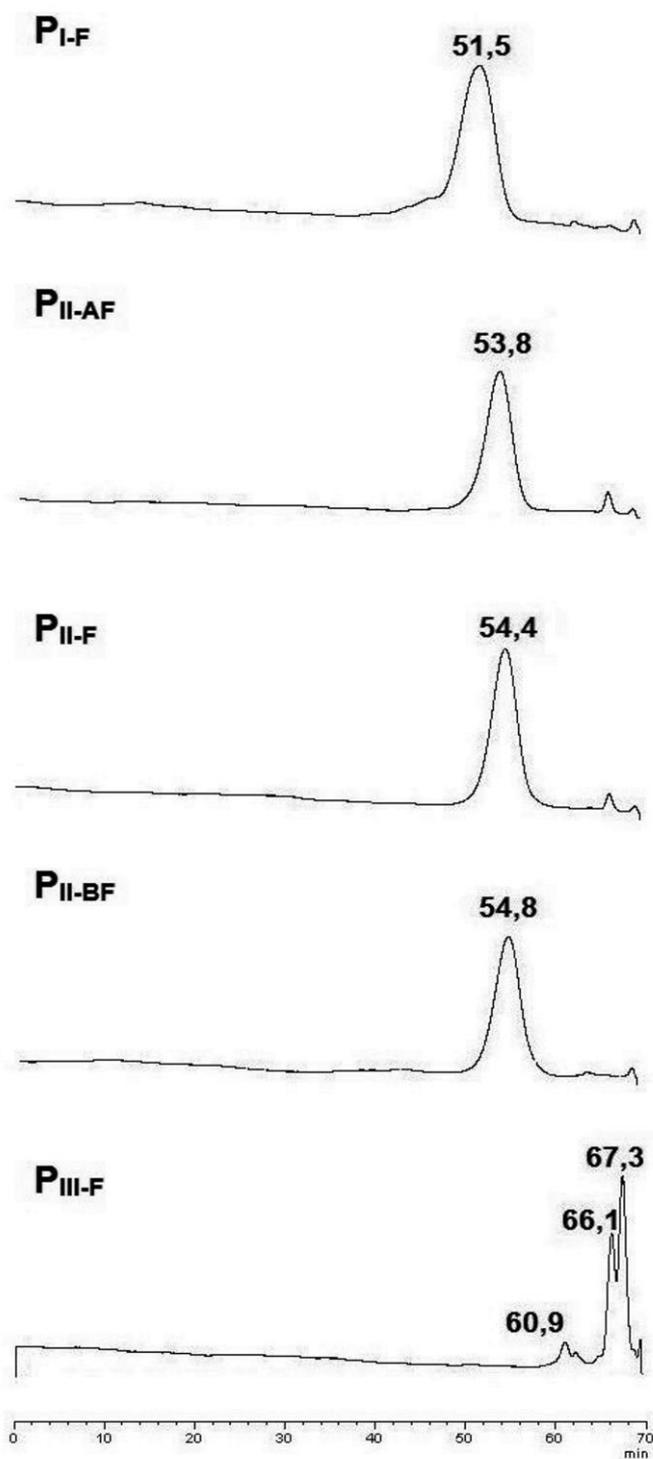
Figura 24- Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do PE_{H2O-F}. Vol. coluna: 173 mL, Material aplicado: 8 mg; Fluxo: 1,0 mL/min; Vol. fração: 2,5 mL; Vol. morto: 55,0 mL.



Os resultados (Figura 25) evidenciam que, com exceção de P_{III-F}, todas as demais frações comportaram-se como moléculas homogêneas, sendo as P_{II-F}, P_{II-AF} e P_{II-BF} menos polidispersas que a P_{I-F}, o que pode ser comprovado pelos valores dos índices de polidispersividade (Tabela 7). A heterogeneidade e o tempo de eluição elevado (> 60 min) indicam que P_{III-F} deve ser produto de degradação, uma vez que eluiu em

tempos maiores que o de um padrão de dextrana de massa molecular aparente de 9.000 Da (~57 min), analisado sob as mesmas condições.

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 $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da. Total de material aplicado: 200 μ g em 200 μ L; Fluxo: 0,6 mL/min a 37 °C; Eluente: NaNO₃ 0,1 mol/L contendo azida sódica 0,03%.



A partir desse resultado, as frações consideradas puras: P_{I-F}, P_{II-F}, P_{II-AF} e P_{II-BF}, tiveram a sua composição em açúcares totais (DUBOIS et al., 1956) e proteínas (BRADFORD, 1976) determinadas. Também tiveram suas massas moleculares estimadas através da curva de calibração com padrões de dextranas (HPSEC/RID), bem como seus respectivos índices de polidispersividade calculados (Tabela 7).

Tabela 7- Quantificações de açúcares totais, proteínas, massas moleculares aparentes e índices de polidispersividade das frações obtidas na purificação do PE_{H₂O-F}.

Frações	Açúcar Total (%)	Proteína (%)	Massa Molecular Aparente (Da)	Índice de Polidispersividade (Mw/Mn)
P _{I-F}	96,2	3,8	55.058	2,54
P _{II-F}	99,7	0,3	21.707	1,22
P _{II-AF}	98,0	2,0	27.865	1,24
P _{II-BF}	98,4	1,6	18.395	1,27

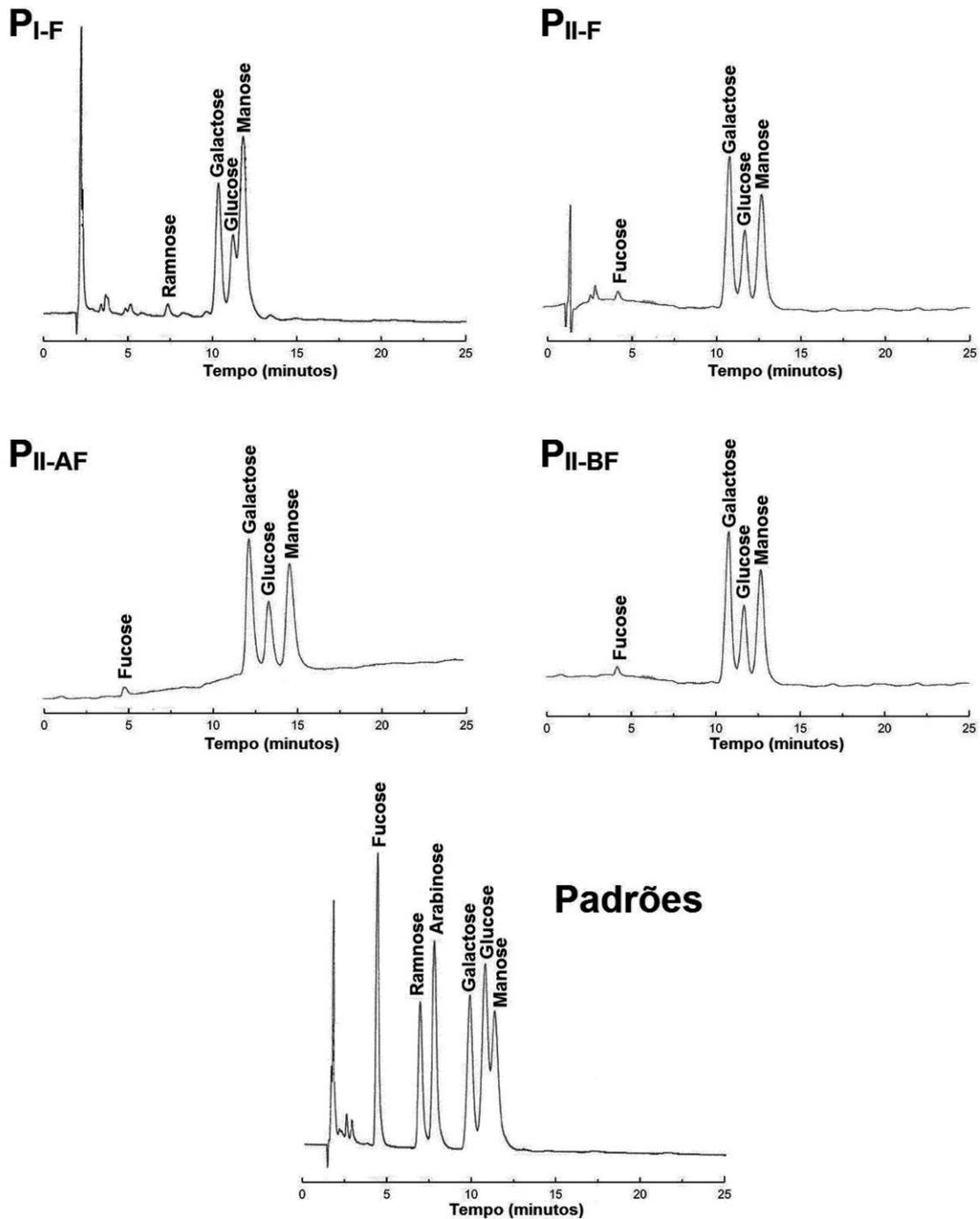
A composição monossacarídica de cada fração foi determinada após hidrólise (TFA 4 mol/L, 100 °C, 6 h) e análise por HPAEC/PAD. Os resultados mostraram que manose é o açúcar majoritário em todas as frações (Tabela 8 e Figura 26). A semelhança na composição pode sinalizar que se trata de um único polímero com diferentes graus de ramificação. É importante observar que o princípio da separação para o HPSEC e a chamada cromatografia de filtração em gel ou peneira molecular é o mesmo, entretanto, o desempenho do segundo procedimento foi mais eficiente, provavelmente pelo tamanho da coluna e tempo de corrida, ainda que a pressão normal.

Tabela 8- Análise da composição monossacarídica (%) por HPAEC/PAD após hidrólise ácida das frações consideradas puras do PE_{H₂O-F}.

Frações Polissacarídicas	Monossacarídeos				
	Galactose	Glucose	Manose	Ramnose	Fucose
P _{I-F}	33	08	59	Traços*	-
P _{II-F}	33	08	59	-	Traços*
P _{II-AF}	33	09	58	-	Traços*
P _{II-BF}	33	13	54	-	Traços*

* <2%.

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.



Considerando os resultados citados: menor proporção de proteína (< 1%), menor índice de polidispersividade (Mw/Mn 1,22) e composição monossacarídica

semelhante às demais, a fração P_{II-F} foi selecionada para dar prosseguimento aos estudos de caracterização química e para os ensaios de atividade biológica.

5.3.2.3 Determinação das posições das ligações glicosídicas da fração P_{II-F} por CG-EM

A análise por cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados da fração P_{II-F} mostrou a presença de oito derivados que foram identificados de acordo com seus tempos de retenção (T_R) e espectros de massa (Tabela 9).

Tabela 9- Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da fração P_{II-F}.

Tempo de retenção (min)	Derivados Metilados	Tipo de ligação	% dos derivados	Principais Fragmentos de massa (m/z)
16,04	2,3,4,6-Me ₄ -Manp	Manp-(1→	27,0	101, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205
16,12	2,3,4,6-Me ₄ -GlcP	GlcP-(1→	1,7	101, 102, 118, 129, 145, 162, 205
16,16	2,3,5,6-Me ₄ -GalF	GalF-(1→	1,4	101, 117, 161, 205, 277, 278
17,3	3,4,6-Me ₃ -Manp	→2)-Manp-(1→	32,0	129, 130, 161, 190
17,5	3,5,6-Me ₃ -GalF	→2)-GalF-(1→	3,8	101, 118, 130
17,8	2,3,4-Me ₃ -Manp	→6)-Manp-(1→	1,2	102, 118, 129, 162, 189
18,2	2,3,5-Me ₃ -GalF	→6)-GalF-(1→	8,0	102, 118, 129, 159, 233
20,4	3,5-Me ₂ -GalF	→2,6)-GalF-(1→	25,5	117, 118, 130, 190

A presença de derivados de galactose metilados na posição 5 e a ausência do metilado em O-4 indicam que todos os resíduos desse açúcar presentes no polissacarídeo estão na forma furanosídica e a maioria em ligação 1→6, sendo 75% deles ramificados no carbono 2. O derivado tetrametilado de manose (27%)

corresponde a praticamente o mesmo valor da ramificação nas unidades galactofuranosídicas (25,5%). Considerando que há um derivado de manose 2-O-substituído (32,0%), é provável que esses resíduos estejam ligados à cadeia principal e a esses, ligados em O-2, os terminais não redutores de manose (2,3,4,6-Me₄-Manp). Os 5% restantes do 2-O- substituído de manose podem estar ligados aos demais tetrametilados [Glc_p-(1→ e Gal_f-(1→)]. Há ainda a possibilidade que em algumas dessas ramificações haja mais de um resíduo de manose entre a cadeia de galactofuranana e o terminal não redutor de manose [Man_p-(1→)]. Se lembrarmos que a maioria dos fungos ascomicetos tem a parede celular formada por mananas e/ou galactomananas, prevalecendo os resíduos de galactose na forma furanosídica (ZHOU et al, 2019), os derivados encontrados nessa análise são condizentes com aqueles presentes nas estruturas descritas na literatura.

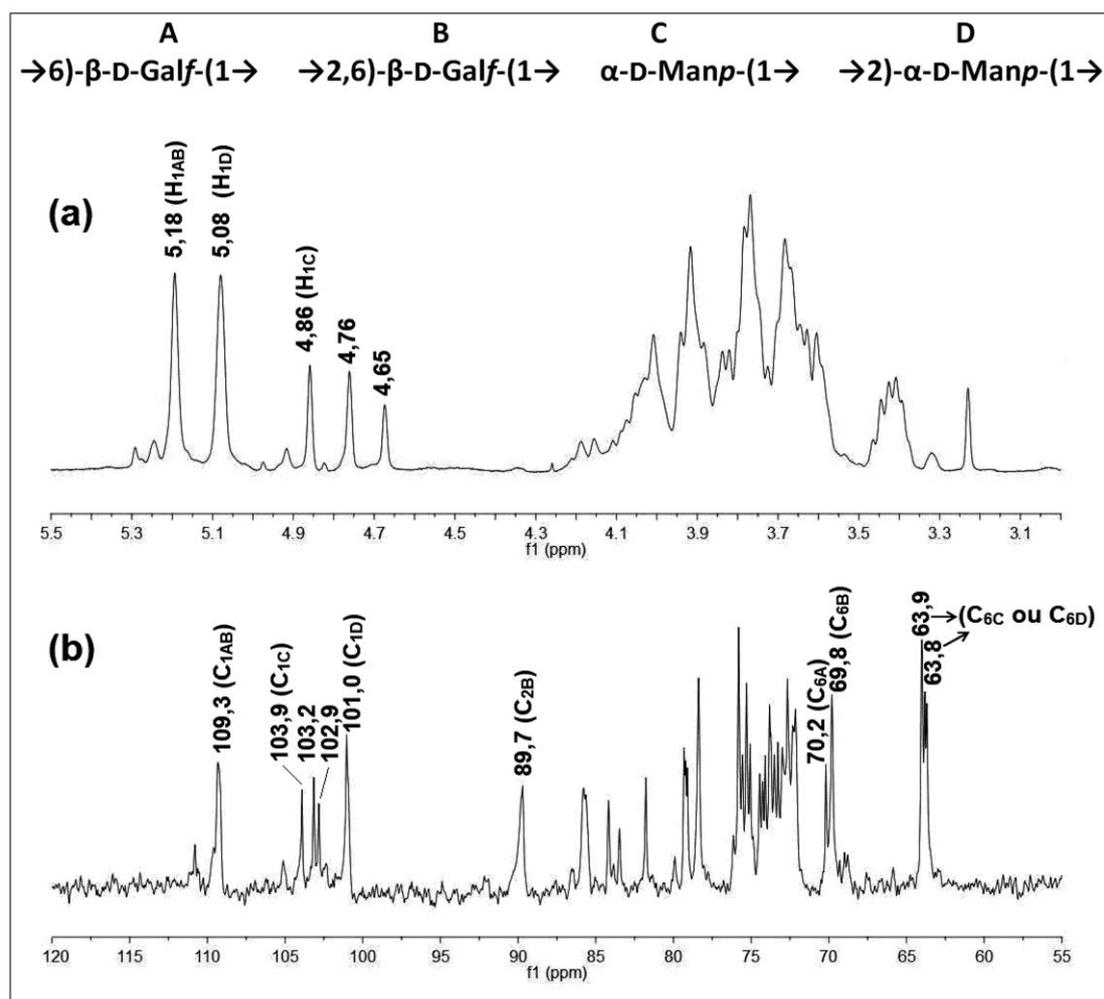
Embora a técnica da metilação seja importante para orientar a posição da ligação glicosídica na estrutura polissacarídica, o fato de envolver várias etapas químicas no processo de derivatização (metilação, hidrólise, redução e acetilação), pode levar a reações de degradação, ainda que cuidados sejam tomados. Para os polissacarídeos ramificados pode ocorrer a submetilação, por impedimento estérico, mesmo que a técnica seja repetida. Isso significa que os percentuais encontrados para os derivados metilados não se fecham totalmente, apesar disso, o método continua sendo importante para auxiliar na determinação da estrutura da molécula.

5.3.2.4 Caracterização química por RMN da fração P_{II-F}

Para confirmar os resultados da metilação, espectros de ¹H e ¹³C mono- e bidimensionais foram efetuados. O espectro de próton apresentou 5 sinais na região de H-1: em δ 5,18, 5,08, 4,86, 4,76 e 4,65 (Figura 27a) e na região anomérica do espectro de ¹³C também foram observados cinco sinais, em δ 109,3, 103,9, 103,2, 102,9 e 101,0 (Figura 27b). O sinal em campo baixo em δ 109,3 observado no espectro de ¹³C (Figura 27b), é característico de carbono anomérico de estrutura furanosídica (GORIN, BARRETO-BERGTER, CRUZ, 1981). Considerando que na composição da molécula há cerca de 33% de galactose e que esse monossacarídeo, das três hexoses

detectadas, é o único que pode ser encontrado nessa conformação, esse deslocamento químico pode ser atribuído às unidades de galactofuranose. Esses dados foram confirmados pelos resultados da metilação com os derivados galactofuranosídicos. O sinal em campo baixo (δ 109,3) sinaliza configuração β para essas unidades (AHRAZEM et al., 2001; CORDEIRO et al., 2012).

Figura 27- Espectros de: (a) RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (b) da fração P_{II-F}, obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do *Fusarium* sp.



Para correlacionar os sinais de carbono anomérico aos seus respectivos prótons, uma análise bidimensional heteronuclear, HSQC-DEPT, foi efetuada (Figura 28). Os prótons anoméricos δ 5,18 e 5,08 foram correlacionados aos carbonos δ 109,3 e 101,0, correspondendo, respectivamente, às unidades β -D-Galf-(1 \rightarrow 6), β -D-Galf-(1 \rightarrow 2,6) e às unidades α -D-Manp-(1 \rightarrow 2), cujas áreas relativas no espectro de ^1H foi de

1:1,1. A correlação δ 103,9/4,86 corresponde aos terminais não redutores manopiranosídicos (GORIN, 1973) e os demais em δ 103,2/4,76 e δ 102,9/4,65, estão relacionadas aos C-1 dos derivados presentes em menor proporção na estrutura do polissacarídeo.

A correlação de um sinal intenso em δ 89,7/4,18 (Figura 28) corresponde ao C-2/H-2 dos resíduos galactofuranosídicos 2,6-di-*O*-substituídos. Essa afirmação pode ser comprovada pelo HSQC-TOCSY (Figura 29), dado que as conectividades observadas nesse espectro podem auxiliar na atribuição de carbonos e prótons dos resíduos presentes no polímero. Através da correlação C1/H1 (δ 109,3/5,18) foi possível observar a conexão com o H-2 da mesma unidade (δ 4,18 - horizontal) se conectando com seu respectivo C-2 (δ 89,7 - na vertical), que é o carbono envolvido na substituição em *O*-2 das unidades galactofuranosídicas (1 \rightarrow 6) ligadas. Na região de C-6 substituído (Figura 27b), os dois sinais intensos em δ 70,2 e 69,8 correspondem, respectivamente, aos C-6 das unidades \rightarrow 6)-Gal f -(1 \rightarrow e \rightarrow 2,6)-Gal f -(1 \rightarrow , cuja relação molar no espectro de carbono 13 é de 1:3. Esses sinais encontram-se invertidos no HSQC-DEPT (Figura 28), entretanto os valores são diferentes (δ 72,3/3,91/3,66) porque as análises foram realizadas em condições distintas. As correlações em δ 63,9/3,92/3,76 e 63,8/3,88/3,77 correspondem aos C-6/H-6 livres das unidades α -D-Man p -(1 \rightarrow , α -D-Man p -(1 \rightarrow 2) e aos demais resíduos sem substituição em *O*-6 (Figura 28).

Ao C-2/H-2 das unidades α -D-Man p -(1 \rightarrow 2) é atribuído o sinal em δ 81,7/4,21 (Observado nos espectros de HSQC-DEPT e HSQC-TOCSY). Esses valores são condizentes com aqueles encontrados na literatura (GALINARI et al., 2017; GORIN, 1973; ZHOU et al., 2019). Embora na parede celular de leveduras e fungos ascomicetos seja possível encontrar resíduos manopiranosídicos 6-*O*- substituídos como principais constituintes da cadeia principal, nesse trabalho, segundo a análise de metilação, foi detectado apenas 1,2% do derivado correspondente às unidades Man p -(1 \rightarrow 6), bem como a ausência de um sinal intenso e invertido ao redor de δ 72,0, no HSQC-DEPT (Figura 28). O derivado de Gal f -(1 \rightarrow 2) encontrado na metilação (Tabela 9) numa composição de 3,8% pode fazer parte da estrutura do polissacarídeo, entretanto parece não haver nenhum sinal possível nas análises de ressonância que possa a ele ser atribuído.

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 *Fusarium* sp.

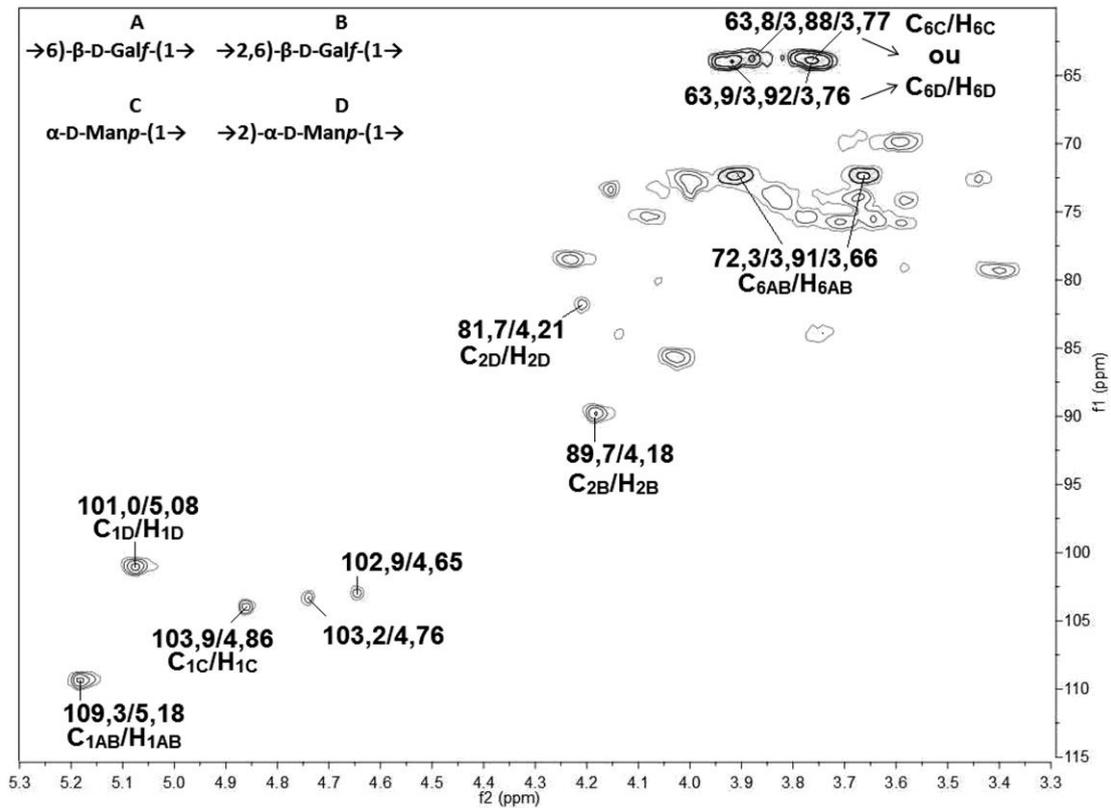
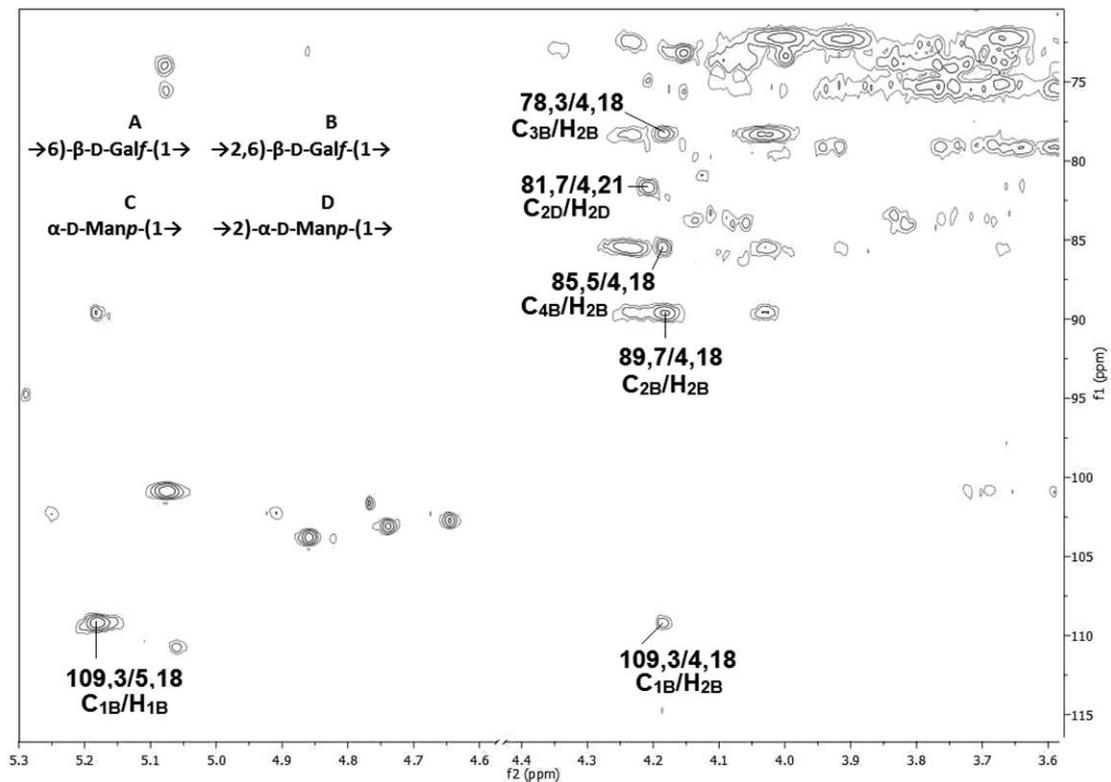


Figura 29- Espectro de HSQC-TOCSY (editado) da fração P_{II-F}, obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do *Fusarium* sp.



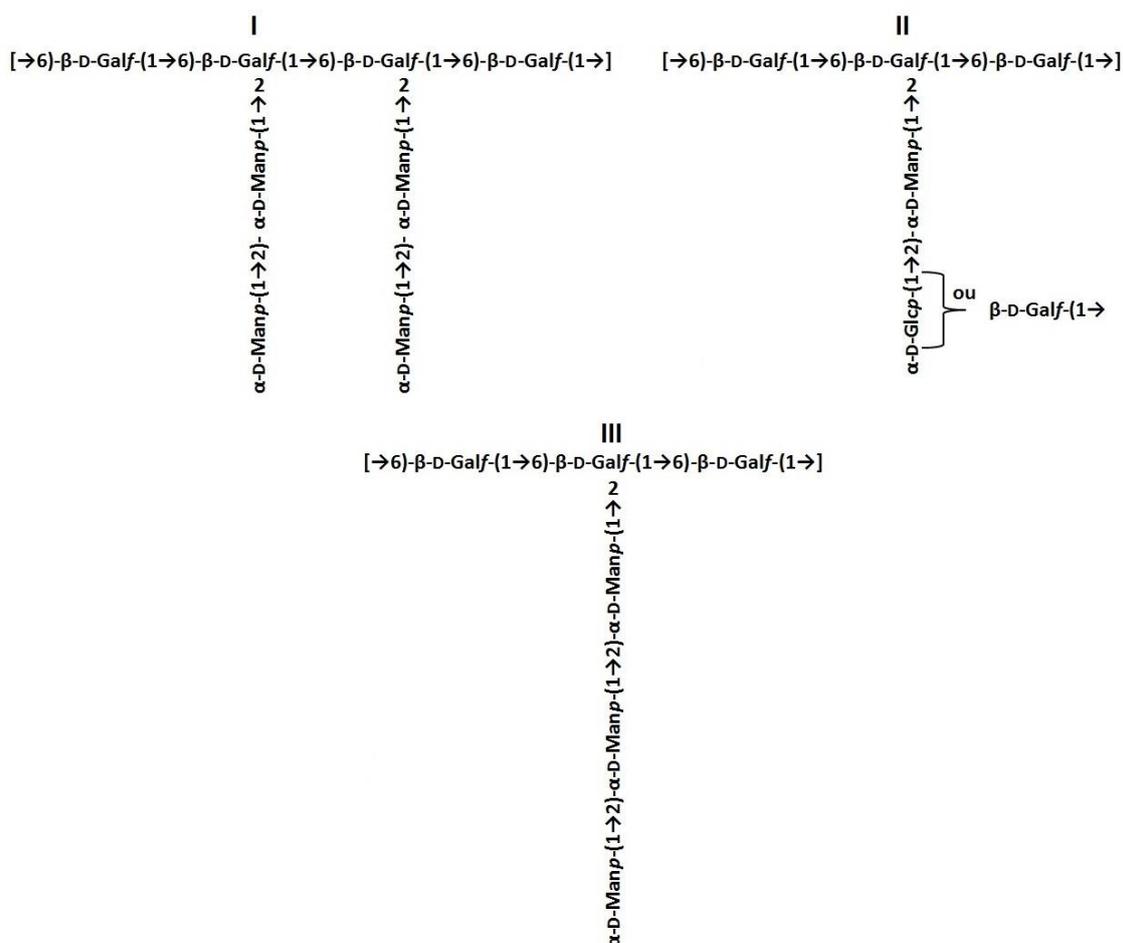
Outros sinais podem ser atribuídos no espectro de HSQC-TOCSY (Figura 29). As correlações em δ 78,3/4,18 e δ 85,5/4,18 correspondem, respectivamente, ao H-2 das unidades \rightarrow 2,6)-Gal β f-(1 \rightarrow , com o C-3 e C-4 desta mesma unidade (ZHOU et al., 2019)

Com os resultados da metilação, espectros de ^1H e ^{13}C mono- e bidimensionais e os dados da literatura (AHRAZEM et al., 2001; GALINARI, et al., 2017; GORIN, 1973; CORDEIRO et al., 2012; ZHOU et al., 2019) podemos sugerir que P_{II-F} é um polímero com cadeia principal constituída por resíduos β -D-galactofuranosídicos (1 \rightarrow 6) ligados, sendo 75% deles substituídos em O-2 por resíduos de α -D-Man β p-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow e mais raramente por α -D-Glc β p-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow , β -D-Gal β f-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow e α -D-Man β p-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man β p (Figura 30). A Tabela 10 mostra os principais sinais discutidos.

Tabela 10- Assinalamentos de C/H da fração P_{II-F} obtida do extrato aquoso do *Fusarium* sp.

Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ)	Assinalamentos
109,3/5,18	C ₁ /H ₁ \rightarrow 6)- β -D-Gal β f-(1 \rightarrow
109,3/5,18	C ₁ /H ₁ \rightarrow 2,6)- β -D-Gal β f-(1 \rightarrow
103,9/4,86	C ₁ /H ₁ α -D-Man β p-(1 \rightarrow
101,0/5,08	C ₁ /H ₁ \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow
89,7/4,18	C ₂ /H ₂ \rightarrow 2,6)- β -D-Gal β f-(1 \rightarrow
81,7/4,21	C ₂ /H ₂ \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow
72,3/3,91/3,66	C ₆ /H ₆ \rightarrow 6)- β -D-Gal β f-(1 \rightarrow
72,3/3,91/3,66	C ₆ /H ₆ \rightarrow 2,6)- β -D-Gal β f-(1 \rightarrow
63,9/3,92/3,76	C ₆ /H ₆ α -D-Man β p-(1 \rightarrow
63,8/3,88/3,77	C ₆ /H ₆ \rightarrow 2)- α -D-Man β p-(1 \rightarrow

Figura 30- Possíveis resíduos presentes na estrutura da fração P_{II-F}.



5.4 TESTES BIOLÓGICOS

5.4.1 Atividade citotóxica - Ensaio do MTT

5.4.1.1 Teste de viabilidade celular da fração P_{IV-C} obtida do extrato aquoso do *C. gloeosporioides*

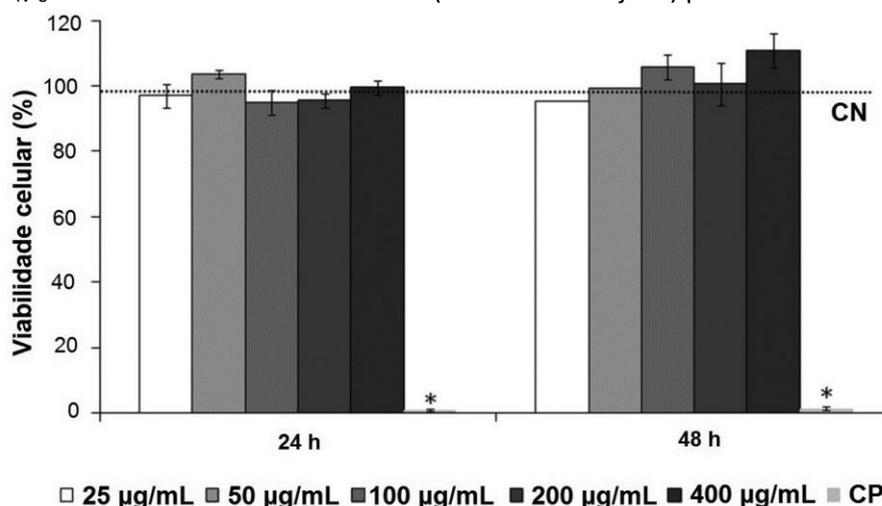
A avaliação da toxicidade é um dos principais parâmetros utilizados para se medir a biocompatibilidade, que é uma característica fundamental para materiais que entrarão em contato com sistemas biológicos e testes screening *in vitro* são continuamente realizados para rastrear e caracterizar efeitos potencialmente nocivos de um material (KEONG, HALIM, 2009).

Muitos polissacarídeos naturais biocompatíveis estão sendo estudados como biomateriais para uma infinidade de utilizações, como veículos de entrega de drogas e *scaffolds* de tecidos (BALDWIN, KIICK, 2010; REIS et al., 2008).

Estudos do potencial citotóxico *in vitro* de extratos de fermentação (PACKIARAJ et al., 2016), de micélio (PALEM, KURIAKOSE, JAYABASKARAN, 2015) e de metabólitos liberados no meio de cultivo por fungos do gênero *Colletotrichum* (GANGADEVI, MUTHUMARY, 2007; YANG et al.; 2013) são encontrados na literatura científica, porém o potencial citotóxico de polissacarídeos extraídos da biomassa do *Colletotrichum gloeosporioides*, em linhagens celulares, ainda não foi relatado. Desta forma, este é o primeiro estudo que avalia a citotoxicidade *in vitro* de um polissacarídeo extraído da biomassa deste micro-organismo.

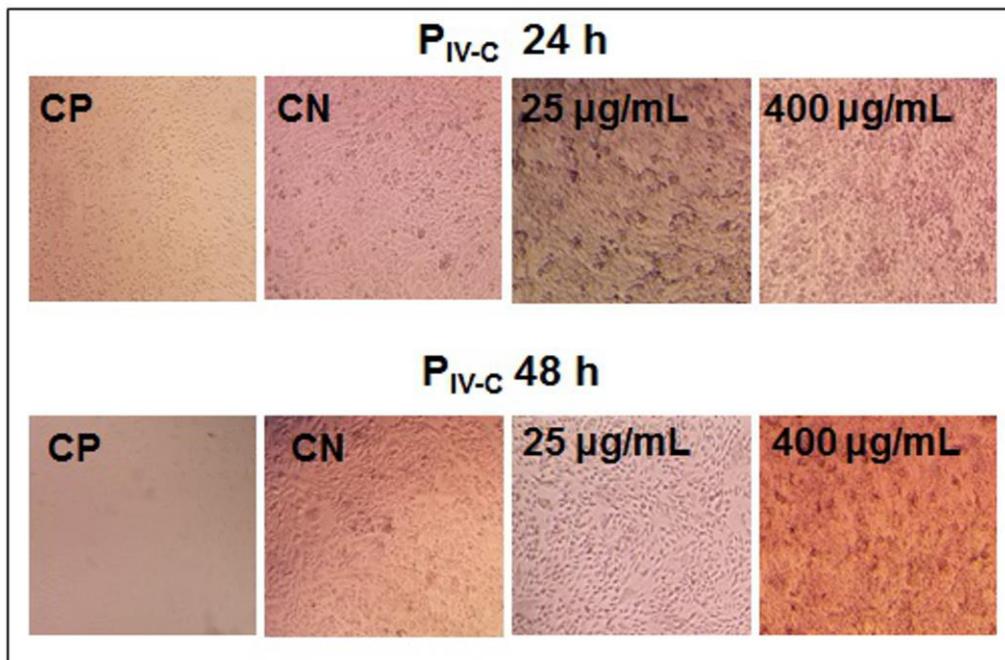
Nesse estudo, os resultados obtidos pelo ensaio do MTT indicam que a viabilidade das células CHO-K1, expostas às diferentes concentrações do heteropolissacarídeo, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a viabilidade do controle negativo (CN), nos tempos experimentais de 24 e 48 horas (Figura 31). A Figura 32 mostra algumas imagens do ensaio.

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.



* indica diferença significativa comparada com CN, que foi considerado 100% (p<0,05).

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.



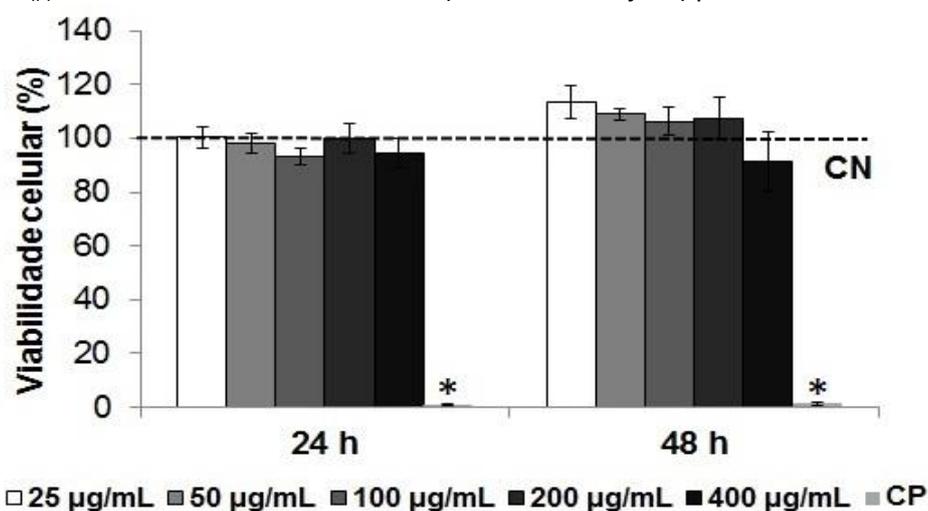
Kim e colaboradores (2006) avaliaram a citotoxicidade de endopolissacarídeos extraído dos micélios do fungo *Inonotus obliquus* e observaram que a maioria das células tumorais e das células normais testadas não tiveram a sua viabilidade celular afetada, mesmo expostas as altas concentrações do polissacarídeo.

A ausência de citotoxicidade apresentada pelo heteropolissacarídeo do *C. gloeosporioides* nas células CHO-K1, que é uma linhagem normal, pode ser interpretada como positiva, abrindo novas perspectivas para futuros estudos toxicológicos tanto em outras linhagens celulares normais, quanto em células cancerosas, avaliando seu potencial como agente antitumoral. A ausência de citotoxicidade dos compostos em células normais é uma característica fundamental, mas difícil de ser encontrada, isso tem se tornado um grande desafio para a medicina, na busca de novas drogas antitumorais.

5.4.1.2 Teste de viabilidade celular da fração P_{II-F} obtida do extrato aquoso do *Fusarium* sp

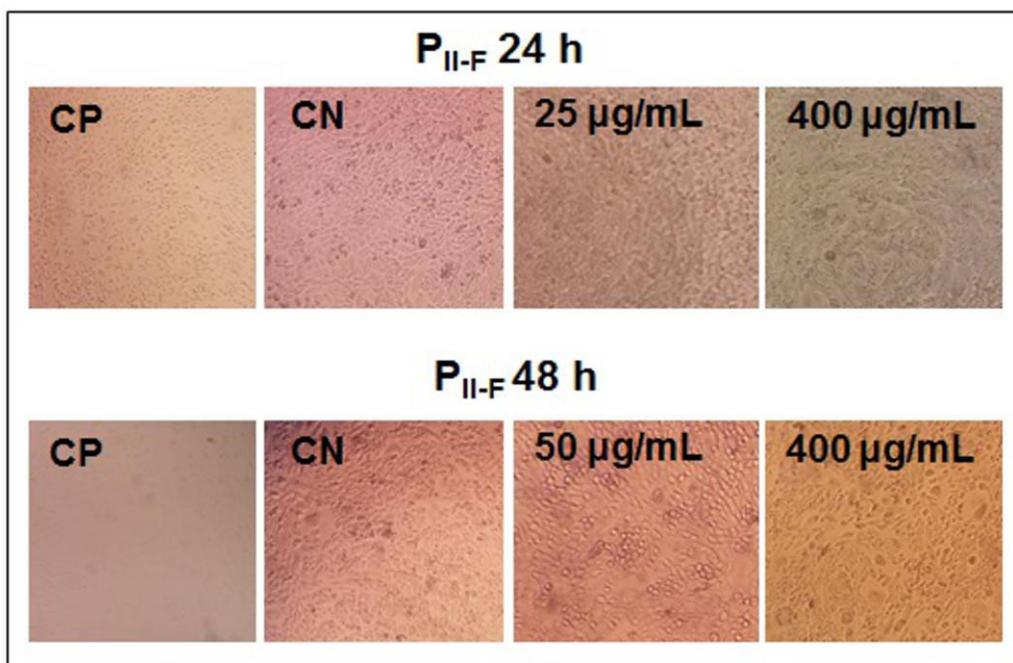
Observando os resultados encontrados (Figuras 33 e 34) é possível inferir que o polissacarídeo extraído da biomassa do fungo *Fusarium* sp não mostrou potencial citotóxico para as células CHO-K1 nas diferentes concentrações testadas, quando comparado com o comportamento do controle negativo em ambos tempos experimentais.

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.



* indica diferença significativa comparada com CN, que foi considerado 100% (p<0,05).

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.



Este estudo complementa os estudos de Salehi e colaboradores (2018), que até o presente momento era o único trabalho na literatura científica que avaliou o efeito citotóxico de um polissacarídeo extraído da biomassa do *Fusarium* sp pelo ensaio MTT, neste caso, em duas linhagens de células cancerígenas humanas. Esses autores encontraram que o polissacarídeo foi citotóxico para a linhagem tumoral LCL, mas não para a linhagem tumoral HeLa. Não foi avaliada a citotoxicidade do polissacarídeo em linhagem celular normal, desta forma, esta tese é o primeiro trabalho na literatura que avalia a citotoxicidade de um polissacarídeo extraído do *Fusarium* sp em células normais, mostrando que o mesmo não apresentou efeitos citotóxicos sobre CHO- K1.

Assim, os resultados encontrados neste trabalho não descartam a possibilidade do polissacarídeo extraído da biomassa do *Fusarium* sp ser biocompatível, abrindo novas possibilidades de estudos que abrangem tanto as áreas de biocompatibilidade deste material quanto possíveis estudos de aplicações e atividades biológicas. Propriedades bioativas de extrato de polissacarídeos da biomassa do *Fusarium oxysporium* foram relatadas por Li e colaboradores (2011b), que encontraram efeitos estimulantes deste extrato sobre o crescimento de cultura de células vegetais de

Dioscorea zingiberensis, assim como indução no aumento da produção de diosgenina, que é um fitoquímico bioativo usado em fármacos para o tratamento de várias doenças, como o câncer.

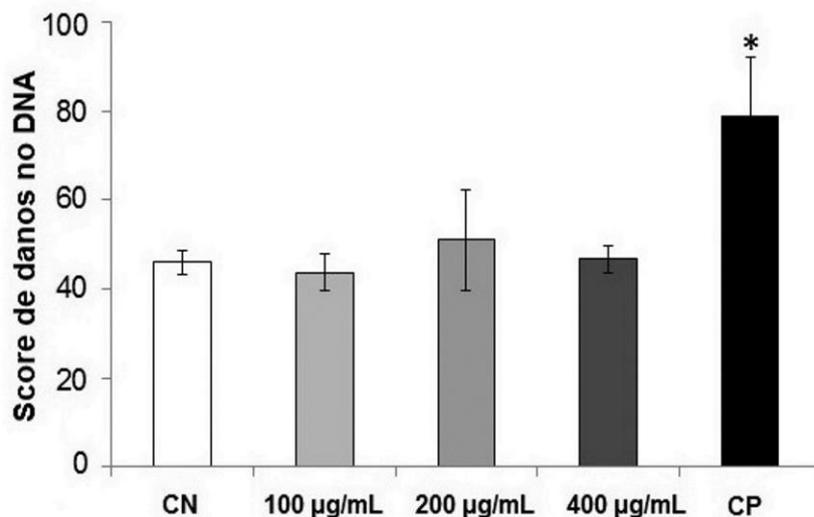
5.4.2 Atividade genotóxica - Ensaio do cometa

Propriedades biológicas, como efeito quimiopreventivo sobre danos no DNA e atividade antitumoral estão sendo descritas para diversos polissacarídeos derivados de fungos (JOSEPH et al., 2012, LIU et al., 2018; MALINI et al., 2016). Em ambas propriedades biológicas, o polissacarídeo não ser genotóxico para as células normais é uma característica primordial.

Para investigar o efeito genotóxico do polissacarídeo da fração P_{II-F} extraída da biomassa do *Fusarium* sp, frente às células normais CHO-K1, foi selecionado o ensaio do cometa, cujos resultados informam se o material tem potencial genotóxico para as células (SINGH et al., 1988). A genotoxicidade é um efeito provocado por agentes que possuem a capacidade de promover danos no material genético (IZQUIERDO-VEGA et al., 2017). Além da toxicidade, a avaliação do potencial genotóxico também é um parâmetro importante quando se pretende aplicar um material como agente terapêutico. É importante destacar que este é o primeiro estudo na literatura que avalia a genotoxicidade de um polissarídeo derivado de *Fusarium* sp.

Os resultados de escore observados no experimento (Figura 35) mostraram que a fração P_{II-F} não provocou danos ao DNA das células CHO-K1. Os dados mostram que estatisticamente não há diferença entre os resultados de escore obtidos nas três concentrações de P_{II-F}, quando comparado com o resultado do controle negativo. Validando o experimento, no controle positivo, onde as células foram expostas à ciclofosfamida, um agente comprovadamente genotóxico, foi observado um maior escore de danos no DNA quando se compara com as demais condições, sendo estatisticamente diferente do CN.

Figura 35- Genotoxicidade da fração P_{II-F} sobre as células CHO-K1.

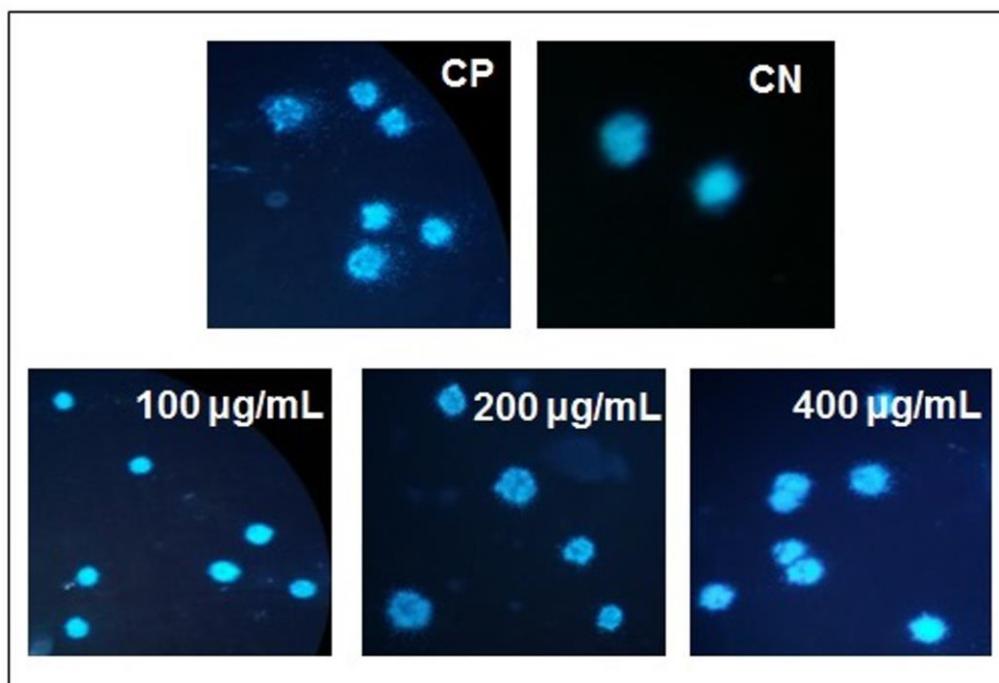


* indica diferença significativa comparada com CN ($p < 0,05$).

Liu e colaboradores (2018) realizaram estudos sobre a ação de uma glucana, obtida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, nas células de medula óssea de ratos, que foram expostos a radiações. Os resultados obtidos através do ensaio do cometa mostraram que o polissacarídeo foi capaz de diminuir os danos provocados no DNA das células de medula óssea (LIU et al., 2018). Este efeito protetor também foi observado anteriormente, quando um complexo de proteína e polissacarídeo demonstrou diminuir danos no DNA de células expostas a raios gama (JOSEPH et al., 2012). Em ambas as pesquisas os autores observaram a ação protetora dos polissacarídeos sobre as células normais.

Os ensaios realizados neste trabalho (Figura 36) com o polissacarídeo extraído do *Fusarium* sp revelaram que a fração P_{II-F} não provocou efeitos genotóxicos nas células normais CHO-K1. Esses primeiros resultados abrem possibilidades para futuros estudos onde se poderá investigar, por exemplo, se essa fração possui a capacidade de proteger células que estão expostas a agentes genotóxicos como radiações, assim como possuir atividade antitumoral.

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.



Glucanas, mananas e galactomananas compreendem os principais polissacarídeos da parede celular das células de fungos e leveduras. A alguns desses polímeros têm sido atribuídas importantes atividades biológicas que estão relacionadas com suas estruturas químicas. Os polissacarídeos extraídos dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp, mostraram-se quimicamente distintos, entretanto, em ambos, a galactose apresentou-se na forma furanosídica. Este tipo de molécula esta presente em vários fungos patogênicos e o fato dela não ser sintetizada por mamíferos e, ao mesmo tempo, ser reconhecida pelo sistema imune desses organismos, torna-a uma molécula atrativa para o diagnóstico de infecções, podendo ser utilizada na síntese de antígenos (MARINO et al., 2017). Considerando que ambos os polissacarídeos obtidos neste trabalho são ricos em galactose furanosídica e não apresentaram citotoxicidade, confirmada pelos ensaios do MTT, abre-se também a possibilidade futura de serem aplicados, com esse propósito, na indústria farmacêutica.

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.; LÖNNINGREN, 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 oxysporium* 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 Letters*, 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.