



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**



Comportamento cromatográfico de polissacáridos de origem fúngica em quelatos de metal imobilizado.

LUÍS FILIPE SIMÕES MARQUES

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professor Doutor Amin Karmali
Professora Doutora Sónia Martins

Júri:

Professora Doutora Rita Pacheco (Presidente)
Professor Doutor Amin Karmali (Orientador)
Professora Doutora Magda Semedo (Arguente)

Fevereiro de 2017



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**



Comportamento cromatográfico de polissacáridos de origem fúngica em quelatos de metal imobilizado.

LUÍS FILIPE SIMÕES MARQUES

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professor Doutor Amin Karmali
Professora Doutora Sónia Martins

Júri:

Professora Doutora Rita Pacheco (Presidente)
Professor Doutor Amin Karmali (Orientador)
Professora Doutora Magda Semedo (Arguente)

Fevereiro de 2017

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi extremamente gratificante e não teria sido possível sem a colaboração e apoio de várias pessoas, a quem expresso os meus agradecimentos:

Ao Professor Doutor Amin Karmali, meu orientador e Responsável do Laboratório de Engenharia Bioquímica do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, pelo apoio e orientação prestados, e também a sua disponibilidade durante a realização deste projecto.

À Professora Doutora Sónia Martins, minha orientadora, pela disponibilidade, empenho, paciência, apoio e orientação demonstrados ao longo deste ano.

À Professora Doutora Magda Semedo e à Professora Doutora Patricia Barata, pelo apoio e disponibilidade demonstrados ao longo do trabalho.

À equipa da Gabinete de Apoio aos Laboratórios do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Eng.^a Carla Vespeira, Eng.^a Maria Graça Moutinho, Joaquim Godinho e Cristina Duarte, por todo o apoio, disponibilidade e ambiente de trabalho proporcionados.

Às minhas grandes amigas, Diana Dias, Lucinda Luís, Ana Mafalda Silva e Catarina Pereira por todo o apoio, compreensão, bons momentos e encorajamento que me proporcionaram.

Aos meus colegas e amigos, Jerson Veiga, Luís Gomes, Luís Silva, Marta Alexandre, Joana Calmeiro, Cláudia Carvalho e Iolanda Santos, por todo o companheirismo, apoio e bons momentos proporcionados.

Às minhas colegas e amigas Cláudia Ferreira, Inês Gonçalves e Catarina Dias por todo o apoio e bom ambiente proporcionados.

A toda a minha família pelo apoio e encorajamento ao longo da minha vida.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio, paciência, compreensão em toda a minha vida e especialmente durante este último ano.

Resumo

Os polissacáridos têm atraído enorme atenção, devido às propriedades biológicas que exibem, e destes compostos destacam-se os β -glucanos com importantes actividades anti-tumorais e imunomodeladoras. Existem diversos estudos que investigam as actividades biológicas dos β -glucanos, no entanto as suas características estruturais ainda não são totalmente conhecidas.

O presente trabalho teve como objecto de estudo os β -glucanos produzidos por basidiomicetos, em particular os que possuem estruturas terciárias em tripla hélice, pois são a estes compostos que têm sido atribuídos, por exemplo, efeitos de inibição de células tumorais. Neste contexto, foram cultivadas diversas espécies de basidiomicetos em meios contendo diferentes resíduos agro-industriais, tendo em vista a superprodução de β -glucanos. A utilização destes resíduos para o cultivo de basidiomicetos, conduziu à sua valorização e uma redução de custos associada ao desenvolvimento dos meios de cultivo.

Os resíduos que permitiram um crescimento mais rápido dos basidiomicetos estudados foram a tremocilha, borra de café, casca de banana e casca de aveia. Do estudo sistemático realizado, verificou-se que são factores significantes para a produção de β -glucanos extracelulares: a espécie de basidiomiceto, a concentração de resíduo agro-industrial e o tempo de cultivo. A concentração de β -glucanos mais elevada (141,16 mg/L), determinada pelo método do corante Congo red, foi obtida por fermentação submersa de *Lentinula edodes* em meio contendo 400 g/L de borra de café. Neste trabalho, foi também avaliada a emissão fluorescente e fosforescente das amostras de β -glucanos. No que respeita à fluorescência dos β -glucanos de *L. edodes*, verificou-se um aumento da intensidade de emissão com a concentração de β -glucanos. A sensibilidade desta técnica luminescente mostrou ser mais elevada com $\lambda_{exc} = 420$ nm e $\lambda_{em} = 528$ nm.

Tendo em vista o fraccionamento numa única etapa dos β -glucanos extracelulares de *L. edodes*, avaliou-se, num estudo pioneiro, o comportamento cromatográfico em quelatos de metais de transição imobilizados. A adsorção às matrizes de IMAC foi influenciada pelo comprimento do braço espaçador, tipo de ligando e metal, tendo a adsorção dos β -glucanos aos metais imobilizados seguido a seguinte ordem: $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$, utilizando o IDA como ligando. O perfil cromatográfico desses compostos numa coluna de IMAC, empacotada com Sepharose 4B-EDB-IDA- Cu^{2+} , a pH 8, demonstrou que é possível separar dois tipos distintos de β -glucanos, os que não são adsorvidos e os que ficam retidos na matriz, sendo estes últimos apenas eluídos com imidazole. Esta evidência sugeriu que os compostos retidos possuem grupos doadores de electrões, capazes de interagirem com o ião cobre. As amostras de β -glucanos fraccionadas revelaram também elevados valores de A_{280nm} , o que indicou a presença de proteínas livres ou de complexos proteína-polissacáridos. Algumas fracções cromatográficas foram também analisadas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, que permitiu identificar em todas as fracções estudadas bandas características dos β -glucanos, mas não uma das bandas típicas dos complexos proteína-polissacáridos.

Palavras chave: Basidiomicetos, fermentação submersa, resíduos agro-industriais, β -D-glucanos, IMAC, fluorescência, fosforescência, complexos proteína-polissacárido.

Abstract

The polysaccharides have drawn a huge attention, due to their biological properties, and from these compounds, the β -glucans stand out with their important antitumoral and immunomodulators activities. There are various studies, which investigate the β -glucans biological activities, however their structural characteristics aren't totally known yet.

The present work focuses on studying the β -glucans produced by basidiomycetes, with particular regard to those having triple helix tertiary structures, because it is to these compounds that for instance tumor cell inhibition effects have been attributed. Therefore seeking the overproduction of β -glucans several basidiomycete species were grown in media containing different agro-industrial wastes. The use of low-cost agro-industrial wastes for β -glucans production led to wastes valorization and reduces significantly production costs.

The wastes that allowed a faster growth of the studied basidiomycetes were yellow lupine, waste coffee, banana peel and oat husks. From the systematic study carried out, it was verified that the significant factors for the production of extracellular β -glucans are: the basidiomycete species, agro-industrial waste and incubation time. The highest concentration of β -glucans (141,16 mg/L), determined by the Congo Red dye method, was obtained by submerged fermentation of *Lentinula edodes* in medium containing 400 g/L of coffee grounds. In this work, the β -glucans samples fluorescence and phosphorescence emission was also evaluated. Regarding *L. edodes* β -glucans fluorescence, there was an increase in the emission intensity with β -glucans concentration. The sensitivity of this luminescent assay was shown to be higher with $\lambda_{exc}= 420$ nm and $\lambda_{em}= 528$ nm.

Pursuing the one-step fractionation of extracellular β -glucans from *L. edodes* the chromatographic behavior of those compounds on immobilized transition metal chelates was evaluated. Adsorption to IMAC matrices was affected by the length of the spacer arm, type of ligand and metal. In the case of IDA as ligand, the absorption of immobilized metals for β -glucans followed the order: $Cu^{2+}>Zn^{2+}>Ni^{2+}>Co^{2+}$. The chromatographic profile of these compounds on an IMAC column packed with Sepharose 4B-EDB-IDA- Cu^{2+} at pH 8, demonstrated that it is possible to separate two distinct types of β -glucans, those who aren't adsorbed and those that are retained in the chromatographic matrix, the latter being only eluted with imidazole. This evidence suggested that the retained compounds have electron donor groups, capable of interacting with the copper ion. The fractionated β -glucan samples also showed high $A_{280\text{ nm}}$ values, which indicates the presence of free proteins or protein-polysaccharides complexes. Some chromatographic fractions were also analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Several absorption bands in FTIR spectra were assigned to β -glucans, however bands due to protein-polysaccharides complexes were not observed.

Keywords: Basidiomycetes, submerged fermentation, agro-industrial wastes, β -D-glucans, IMAC, fluorescence, phosphorescence, protein-polysaccharide complexes.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Fungos.....	1
1.1.1. Filo Basidiomycota.....	1
1.2. Polissacáridos.....	9
1.2.1. Glucanos.....	9
1.3. Produção de Polissacáridos a partir de Fungos	11
1.3.1. Fermentação Submersa.....	11
1.3.2. Fermentação em estado sólido	12
1.4. Extração e Purificação de Polissacáridos	13
1.4.1. Métodos de Extração	13
1.4.2. Métodos de Purificação.....	13
1.5. Métodos de Doseamento de Polissacáridos.....	16
1.5.1. Métodos Colorimétricos	17
1.5.1.1. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico	17
1.5.1.2. Método do corante Congo red.....	17
1.5.1.3. Método do corante Alcian blue.....	18
1.5.2. Métodos de Luminescência.....	19
1.5.2.1. Fluorescência	19
1.5.2.2. Fosforescência.....	20
1.6. Técnicas de Análise Estrutural de Polissacáridos	21
1.6.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	21
2. Materiais e Métodos.....	23
2.1. Reagentes.....	23
2.2. Amostras de basidiomicetos	23
2.3. Resíduos agro-industriais.....	23
2.4. Métodos	24
2.4.1. Manutenção e cultivo dos basidiomicetos	24

2.4.2. Planeamento experimental para optimização da produção de β -D-glucanos extracelulares	24
2.4.3. Extracção e precipitação dos polissacáridos	25
2.4.4. Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado.....	25
2.4.5. Método Fenol-Ácido Sulfúrico	27
2.4.6. Método do corante Congo red.....	27
2.4.7. Método do corante Alcian Blue	28
2.4.8. Fluorescência.....	28
2.4.9. Fosforescência.....	28
2.4.10. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	29
3. Resultados e Discussão.....	31
3.1. Optimização das condições de cultivo para a superprodução de β -D-glucanos .	31
3.2. Fluorescência.....	37
3.3. Fosforescência.....	44
3.4. Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado.....	46
3.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	49
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	51
5. Referências bibliográficas	53

Índice de Figuras

Figura 1-	Ilustração de um basídio presente num basidiomiceto.....	2
Figura 2-	<i>Agaricus blazei</i>	3
Figura 3-	<i>Coriolus versicolor</i>	3
Figura 4-	<i>Fomes fomentarius</i>	4
Figura 5-	<i>Ganoderma applanatum</i>	4
Figura 6-	<i>Ganoderma carnosum</i>	5
Figura 7-	<i>Ganoderma lucidum</i>	5
Figura 8-	<i>Inonotus obliquus</i>	6
Figura 9-	<i>Irpex lacteus</i>	6
Figura 10-	<i>Lentinula edodes</i>	7
Figura 11-	<i>Phlebia rufa</i>	7
Figura 12-	<i>Piptoporus betulinus</i>	8
Figura 13-	<i>Pleurotus ostreatus</i>	8
Figura 14-	Representação dos modelos das pontes de hidrogénio para o composto curdlan: no plano(a) e ao longo da hélice (b).	10
Figura 15-	Fermentação submersa de <i>Rhizopus oligosporus</i>	11
Figura 16-	Fermentação em estado sólido de <i>P. ostreatus</i>	12
Figura 17-	Representação de alguns agentes quelantes (IDA, NTA, CM e TED) em coordenação com metais.	15
Figura 18-	Estrutura molecular do corante Congo red	18
Figura 19-	Estrutura molecular do corante Alcian blue.....	18
Figura 20-	Diagrama de Jablonski que ilustra o processo de fluorescência.	19
Figura 21-	Diagrama de Jablonski simplificado que ilustra o processo de fosforescência.	21
Figura 22-	Variação da concentração de β -D-glucanos extracelulares, em função do tempo de cultivo, nos sobrenadantes das culturas dos basidiomicetos cultivados em meio contendo borra de café (A) e tremocilha (B). O método de doseamento utilizado foi o do Congo red.....	32
Figura 23-	Comparação da concentração de β -D-glucanos e polissacáridos extracelulares, em função do tempo de cultivo, no sobrenadante da cultura de <i>Lentinula edodes</i> no meio contendo borra de café.....	33
Figura 24-	Representação tridimensional da interacção do tempo de cultivo e da concentração de borra de café na concentração de β -D-glucanos extracelulares produzidos por <i>G. applanatum</i>	36
Figura 25-	Representação tridimensional da interacção do tempo de cultivo e da concentração de borra de café na concentração de β -D-glucanos extracelulares produzidos por <i>L. edodes</i>	36
Figura 26-	Correlação da intensidade de fluorescência dos polissacáridos extracelulares de <i>L. edodes</i> com o comprimento de onda de emissão resultante da alteração do ganho obtida no leitor de microplacas. O comprimento de onda de excitação foi de 420 nm.	37
Figura 27-	Intensidade de fluorescência dos polissacáridos extracelulares de <i>L. edodes</i> . Os resultados foram obtidos num leitor de microplacas, a diferentes λ_{exc} e com os filtros de emissão de 480, 528, 542, 550 e 620 nm instalados.	38

Figura 28- Intensidade de fluorescência do β -D-glucano comercial de cevada. Os resultados foram obtidos num leitor de microplacas, a diferentes λ_{exc} e com os filtros de emissão de 480, 528, 542, 550 e 620 nm instalados.	38
Figura 29- Correlação da intensidade de fluorescência e o comprimento de onda de emissão resultante da alteração do intervalo do tempo de integração, obtida no leitor de microplacas, ($\lambda_{exc} = 420$ nm).....	39
Figura 30- Espectros de fluorescência 3D de polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i> (A e B) e do tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, pH 8 (C e D), variando o comprimento de onda de excitação entre 250-735 nm e o comprimento de onda de emissão entre 260-750 nm.	40
Figura 31- Espectros de fluorescência 3D de β -D-glucano comercial de cevada (A e B) e água desionizada (C e D), variando o comprimento de onda de excitação entre 250-735 nm e o comprimento de onda de emissão entre 260-750 nm.....	40
Figura 32- Representação por contorno (A) e espectros síncronos com $\Delta\lambda = 128$ nm (B) e $\Delta\lambda = 90$ nm (C) de polissacáridos de polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i>	41
Figura 33- Representação por contorno (A) e espectro síncrono com $\Delta\lambda = 130$ nm (B) de β -D-glucano de cevada.	42
Figura 34- Efeito da concentração dos β -D-glucanos da fracção de KOH de <i>L. edodes</i> na intensidade de fluorescência, obtida a diferentes comprimentos de onda, num leitor de microplacas ($\lambda_{exc} = 420$ nm).....	43
Figura 35- Espectro de fosforescência de polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i> ($\Delta\lambda = 20$ nm).....	44
Figura 36- Espectro de fosforescência de β -glucanos de cevada ($\Delta\lambda = 20$ nm).....	44
Figura 37- Curva de decaimento de fosforescência de polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i> ($\lambda_{exc} = 485$ nm).	45
Figura 38- Curva de decaimento de fosforescência de β -glucano comercial de cevada ($\lambda_{exc} = 490$ nm).	45
Figura 39- Perfil cromatográfico de polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i> . Os polissacáridos foram aplicados à coluna empacotada com Sepharose 4B-EDB-Cu(II) a pH 8 e foram eluídos com um gradiente linear de imidazole de 0-50 mM, seguido de 50 mM e 500 mM de imidazole, no sistema tampão descrito nos Materiais e Métodos. As fracções cromatográficas foram analisadas por fluorescência e a concentração de β -D-glucanos foi determinada pelo método do corante Congo red.	47
Figura 40- Perfil cromatográfico de polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i> . Os polissacáridos foram aplicados à coluna empacotada com Sepharose 4B-EDB-Cu(II) a pH 8 e foram eluídos com um gradiente linear de imidazole de 0-50 mM, seguido de 50 mM e 500 mM de imidazole, no sistema tampão descrito nos Materiais e Métodos. As fracções cromatográficas foram analisadas pelo método do corante Congo red e a presença de proteínas foi avaliada pela Abs 280nm.	48
Figura 41- Espectros de FTIR das fracções seleccionadas do IMAC dos polissacáridos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i>	49

Índice de Tabelas

Tabela 1- Características de alguns agentes quelantes utilizados em IMAC	16
Tabela 2- Resinas cromatográficas utilizadas com identificação do respectivo suporte, braço espaçador (EPI – epiclorigrina; EDB – epiclorigrina) e agente quelante (IDA - ácido iminodiacético; NTA - ácido nitrilotriacético).....	25
Tabela 3- Meios de cultura sólidos, espécies fúngicas que apresentaram crescimento e respectivos tempos de cultivo	31
Tabela 4- Concentrações dos β -glucanos extra e intracelulares, determinadas pelo método do corante Congo red.....	34
Tabela 5- Níveis dos parâmetros seleccionados, para a realização do estudo sistemático, sendo o nível superior (+) e o inferior (-).....	35
Tabela 6- Análise estatística de variância (ANOVA) para o modelo proposto de produção de β D-glucanos.	35
Tabela 7- Comportamento cromatográfico em quelatos de metal imobilizado dos β -D-glucanos extracelulares extraídos de <i>L. edodes</i> , cultivada em meio contendo borras de café.	46

Abreviaturas

CM-Asp	Ácido aspártico Carboximetilado
EDB	Éter Diglicidil Butan-1,4-diol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPI	Epicloridrina
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
Glc	Glucose
IDA	Ácido Iminodiacético
IMAC	Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado
NTA	Ácido Nitrilotriacético
PBS	Tampão Fosfato Salino 15 mM, pH 7,2
TED	Tris(carboximetil) Etilenodiamina

1. Introdução

1.1. Fungos

O reino *Fungi* é um dos reinos que constituem o Sistema de cinco reinos, e pertence ao domínio *Eucarya*, segundo a árvore filogenética universal, proposta por Carl Woese. O reino *Fungi* é constituído por organismos eucariotas, que produzem esporos, têm uma nutrição absorptiva, sem clorofila, e que se reproduzem sexuada e assexuadamente. (Prescott *et al.*, 2002)

Devido à sua nutrição absorptiva, os fungos degradam matéria orgânica, intervindo assim no ciclo do carbono, azoto, e outros elementos. Estes organismos são principalmente terrestres, sendo muitos deles patogénicos, infectando animais e plantas. (Prescott *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2010)

Encontram-se descritas cerca de 100 000 espécies de fungos, sendo que muitas conseguem estabelecer relações simbióticas com outros organismos, como plantas, algas ou cianobactérias. (Prescott *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2010)

Estes organismos são utilizados há vários séculos na alimentação humana, através do consumo directo de cogumelos ou no processamento de alimentos, e mais recentemente têm aplicação na produção de ácidos orgânicos e alguns fármacos. (Ferreira *et al.*, 2010)

1.1.1. Filo *Basidiomycota*

O filo *Basidiomycota* inclui todos os basidiomicetos ou *club fungi*, como são conhecidos, onde podem ser encontrados alguns exemplares como os *smut*, *jelly*, *rusts*, *shelf*, *stinkhorns*, *puffballs*, *toadstools*, cogumelos, e *bird's nest*. (Prescott *et al.*, 2002)

Os basidiomicetos obtiveram esta designação devido à estrutura que os caracteriza, o basídio, como ilustrado na Figura 1. Esta estrutura está envolvida na reprodução sexuada do basidiomiceto, onde se podem encontrar dois ou mais basidiósporos, sendo a sua forma uma das características importantes na classificação destes fungos. Os basídios podem localizar-se dentro dos corpos frutificantes, denominando-se esta estrutura de basidiocarpo, como acontece por exemplo nos cogumelos. (Prescott *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2010)

Estes fungos afectam os humanos de várias maneiras. A maioria são saprófitas que decompõem resíduos de plantas, especialmente a celulose e a lenhina, e muitos são usados como alimentos. Contudo, vários cogumelos produzem certos alcalóides específicos que actuam como veneno ou como alucinogénios. (Prescott *et al.*, 2002)

Os *smuts* e os *rusts* são conhecidos por serem patogénicos para as plantas, causando anualmente um grande prejuízo em culturas agrícolas. Nestes basidiomicetos não se formam grandes basidiocarpos, surgindo basídios à superfície da planta, a partir da hifa. (Prescott *et al.*, 2002)



Figura 1- Ilustração de um basídio presente num basidiomiceto (adaptado de www.mushrooms.com e www.botamynus.de)

Durante séculos os cogumelos comestíveis têm vindo a ser usados devido aos efeitos que exercem na saúde humana, como por exemplo no aumento da longevidade ou até mesmo como alucinogénios (Manzi *et al.*, 2000; Alquini *et al.*, 2004). Os cogumelos comestíveis são pobres em calorias e gorduras, mas ricos em proteínas e fibras, como as da parede celular que contém quitina, hemicelulose, mananos e entre os componentes funcionais mais interessantes, os β -glucanos (Manzi *et al.*, 2000). Os cogumelos são usados, há muitos anos, no combate do cancro na Coreia, China, Japão, Rússia, EUA e Canadá. Uma velha lenda Japonesa relata que os macacos selvagens raramente contraíam cancro, hipertensão ou diabetes. Esta lenda sugeria que estes efeitos ocorriam devido ao elevado consumo de cogumelos pelos macacos, o que deve ter estimulado a investigação do papel dos cogumelos na medicina. Vários cogumelos, demonstram efeitos anticancerígenos, apresentando efeitos em cancros como o dos pulmões, esófago, próstata, carcinoma de Ehrlich, entre outros. (Daba *et al.*, 2003)

1.1.1.1. *Agaricus blazei*

A espécie *Agaricus blazei* (Figura 2), conhecida como “cogumelo do sol”, é um basidiomiceto pertencente à família *Agaricaceae*, sendo encontrado nas regiões subtropicais do Brasil. Este cogumelo tem sido usado tradicionalmente na prevenção de cancro, diabetes, hiperlipidemia, arteriosclerose e hepatite crónica. O *A. blazei* hoje em dia é produzido numa escala industrial, especialmente no Brasil, China e Japão. (Padilha *et al.*, 2009)

Esta espécie é bastante rica em polissacáridos, entre os quais β -glucanos, que têm sido estudados pela sua acção imunoestimuladora e também antioxidante. (Angeli *et al.*, 2009; Padilha *et al.*, 2009)



Figura 2- *Agaricus blazei* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.1.1.2. *Coriolus versicolor*

A espécie *Coriolus versicolor* (Figura 3), conhecida no Japão por *kawaratake* (“cogumelo da margem do rio”) e na China por *Yun Zhi* (“fungo nuvem”), é um basidiomiceto pertencente à família *Polyporaceae*, crescendo em troncos de árvores. (Kidd, 2000)

Este cogumelo costuma ser usado na Ásia para prevenção de doenças infecciosas e nos Estados Unidos como um suplemento dietético para cirurgias, quimioterapia, radioterapia e reabilitação. Nesta espécie também podem ser encontrados polissacáridos biologicamente activos, como β -glucanos. (Jang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012)



Figura 3- *Coriolus versicolor* (extraído de www.mykoweb.com)

1.1.1.3. *Fomes fomentarius*

A espécie *Fomes fomentarius* (Figura 4), ou também conhecida como fungo *tinder* ou “fungo do Homem de Gelo”, é um basidiomiceto pertencente à família *Polyporaceae*, sendo um parasita de árvores folhosas. O corpo frutificante deste fungo assemelha-se a um casco de cavalo, aparecendo com vários tamanhos, e a sua cor varia de branco prateado e cinzento até quase preto. (Choe *et al.*, 2015; Papp *et al.*, 2015)

Este basidiomiceto tem sido usado na China e na Coreia como um medicamento herbal tradicional, tendo sido reportados efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antidiabéticos e anticancerígenos associados ao consumo desta espécie (Choe *et al.*, 2015). Foram identificados vários metabolitos primários, como proteínas, polissacáridos (β -glucanos), complexos proteína-polissacárido, e alguns metabolitos secundários, como glucosídeos triterpénicos, ésteres, lactonas, álcoois, entre outros. (Kolundžić *et al.*, 2016)



Figura 4- *Fomes fomentarius* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.1.1.4. *Ganoderma applanatum*

O organismo *Ganoderma applanatum* (Figura 5) é um basidiomiceto que pertence a família *Polyporaceae*. O corpo frutificante deste fungo tem sido usado na medicina chinesa como agente anticancerígeno, apesar de terem sido reportadas outras actividades biológicas, como antiviral e imunoestimuladora. (Lee *et al.*, 2007; Osińska-Jaroszuk *et al.*, 2014) Este cogumelo tem alguns ingredientes activos como polissacáridos, triterpenóides, aminoácidos e polipéptidos. (Zhong-hua *et al.*, 2015)



Figura 5- *Ganoderma applanatum* (extraído de www.first-nature.com)

1.1.1.5. *Ganoderma carnosum*

A espécie *Ganoderma carnosum* (Figura 6) é um basidiomiceto que foi caracterizado nos anos 80, sendo originário do centro-sul da europa, crescendo em coníferas mortas ou nas suas raízes. Este cogumelo é difícil de distinguir do *Ganoderma lucidum*, diferindo apenas no seu píleo escuro, esporos largos e diferente hospedeiro. (Simonić *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 2012)

O *G. carnosum* tem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, contudo não existem outras actividades biológicas reportadas até à data. (Simonić *et al.*, 2009; Čilerdžić *et al.*, 2016)



Figura 6- *Ganoderma carnosum* (extraído de www.gobice.com)

1.1.1.6. *Ganoderma lucidum*

A espécie *Ganoderma lucidum* (Figura 7), também conhecida como *Reishi*, é um basidiomiceto da família *Polyporaceae*, e tem sido usado na China, Japão e Coreia como um promotor da longevidade e saúde. Este cogumelo contém numerosos compostos activos, como polissacáridos, triterpenóides e proteínas imunomoduladoras, sendo usado no tratamento de cancro, bronquite crónica, hiperlipemia, hipertensão, diabetes, hepatite, disfunções dérmicas e urológicas como também em doenças virais e bacterianas. (Sone *et al.*, 1985; Fang *et al.*, 2002; Wasser, 2005b;)

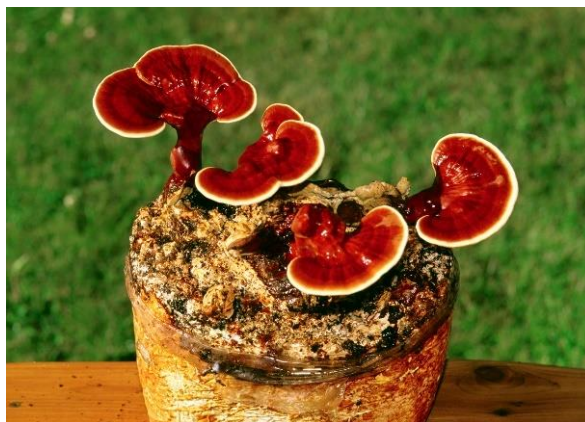


Figura 7- *Ganoderma lucidum* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.1.1.7. *Inonotus obliquus*

A espécie *Inonotus obliquus* (Figura 8), também conhecida como o “cogumelo Chaga”, é um basidiomiceto pertencente à família *Hymenochaetaceae*, crescendo preferencialmente nos troncos maduros de bétulas vivas. (Arata *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2016)

Os extractos deste cogumelo têm sido muito usados na Coreia, China, Rússia, Japão e Bálticos, devido aos seus benefícios no metabolismo dos lípidos, funções cardíacas e actividades antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (Glamočlija *et al.*, 2015; Arata *et al.*, 2016). Nos extractos de *I. obliquus*, tem sido identificado um diverso espectro de metabolitos secundários, desde compostos fenólicos, triterpenóides, polissacáridos, inotodiol e ácido trametenólico. (Niu *et al.*, 2016)



Figura 8- *Inonotus obliquus* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.1.1.8. *Irpex lacteus*

A espécie *Irpex lacteus* (Figura 9), é um basidiomiceto que pertence ao género *Polyporus tulipiferae* e cresce em troncos de árvores de folha caduca, causando a doença da podridão branca (*white-rot fungi*) (Novotný *et al.*, 2009; Na *et al.*, 2012). Por ser extremamente eficiente na degradação da lenhina, este fungo é um organismo promissor na biotecnologia enzimática e na biorremediação de poluentes orgânicos. (Novotný *et al.*, 2009)

Esta espécie é usada tradicionalmente na medicina chinesa no tratamento de glomerulonefrites crónicas. O micélio deste fungo contém muitos compostos importantes como proteínas, polissacáridos, adenosinas, glucoproteínas e ácido cordicéptico. Os polissacáridos extraídos desta espécie apresentam actividades antitumorais e antinefrite. (Na *et al.*, 2012)



Figura 9- *Irpex lacteus* (extraído de www.bachtelpilz.ch)

1.1.1.9. *Lentinula edodes*

A espécie *Lentinula edodes* (Figura 10), também conhecida como *Shiitake*, é a segunda maior produzida a nível mundial, tendo a sua produção iniciado há milhares de anos na China. (Wasser, 2005a; Kitzberger *et al.*, 2007)

Este cogumelo contém várias vitaminas, proteínas, gorduras, minerais, β -glucanos e outros polissacáridos. Esta espécie também apresenta várias propriedades nutricionais importantes como actividades antitumorais, hipocolesterolémicas e hipoglicémicas, como também propriedades antimicrobianas e antioxidantes. (Wasser, 2005a; Kitzberger *et al.*, 2007; Hearst *et al.*, 2009)



Figura 10- *Lentinula edodes* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.1.1.10. *Phlebia rufa*

A espécie *Phlebia rufa* (Figura 11) é um basidiomiceto, não comestível, que costuma aparecer em carvalhos em apodrecimento ou nouro tipo de folhosas, provocando a doença da podridão branca.

Não são conhecidas até à data muitas publicações que façam referência às propriedades medicinais e ao conteúdo em polissacáridos da *Phlebia rufa*, contudo já foram identificados glucanos e glucoproteínas para a *Phlebia radiata*. (Silva *et al.*, 2013)



Figura 11- *Phlebia rufa* (extraído de www.irishlichens.ie)

1.1.1.11. *Piptoporus betulinus*

A espécie *Piptoporus betulinus* (Figura 12) é um parasita, crescendo exclusivamente em bétulas mortas ou enfraquecidas, causando podridão castanha. Este cogumelo tem uma fragrância forte, mas agradável e só o corpo frutificante é comestível. (Papp *et al.*, 2015)

Encontra-se descrita a eventual utilização desta espécie, pelo Homem Neolítico, para fins medicinais e espirituais, tal como em hemorragias, inflamações e tumores (Papp *et al.*, 2015). Actualmente, foram identificados nos corpos frutificantes deste cogumelo, triterpenóides, ácidos gordos, piptamina, (4-hidroxi-3-metil-2-butenil) - hidroquinona, óleos essenciais e α - β -glucanos. Tendo sido reportadas actividades antibacterianas e anti-inflamatória. (Olennikov *et al.*, 2012)



Figura 12- *Piptoporus betulinus* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.1.1.12. *Pleurotus ostreatus*

A espécie *Pleurotus ostreatus* (Figura 13), ou também conhecida como “cogumelo ostra”, é um basidiomiceto comestível, bastante cultivado mundialmente. Este é um cogumelo saprófito que actua como decompositor primário e é usado industrialmente na micorremediação. (Hearst *et al.*, 2009)

Este fungo é conhecido pelas suas propriedades hipocolesterolémicas. Contudo alguns polissacáridos que foram isolados dos corpos frutificantes desta espécie, apresentam actividades imunomoduladora, antioxidante, antiproliferativa ou pré-biótica. (Zhang *et al.*, 2012; Radzki *et al.*, 2016)



Figura 13- *Pleurotus ostreatus* (extraído de www.medicalmushrooms.net)

1.2. Polissacáridos

Os hidratos de carbono, são as biomoléculas mais abundantes do planeta. As plantas utilizam por ano mais de 100 mil milhões de toneladas de CO₂ e H₂O para produzir hidratos de carbono (Lehninger *et al.*, 2008; Quintas *et al.*, 2008). Estas biomoléculas são usadas pelos seres vivos como fonte de energia, através da oxidação das mesmas, como suporte e protecção nas paredes celulares de plantas, bactérias e fungos, no reconhecimento e adesão de células animais, e lubrificação das articulações. (Lehninger *et al.*, 2008; Quintas *et al.*, 2008)

Existem também alguns hidratos de carbono que se conjugam com outro tipo de biomoléculas, como proteínas ou lípidos, adquirindo funções de mediadores de interacções específicas intercelulares, reconhecimento e adesão celular, coagulação do sangue, entre muitas outras funções. Os glucoconjugados mais importantes são as glucoproteínas, proteoglicanos e glucolípidos. (Quintas *et al.*, 2008)

Os hidratos de carbono mais abundantes na natureza têm um médio a elevado peso molecular, e são denominados de polissacáridos. Os homopolissacáridos resultam da polimerização de um único tipo de ose e os heteropolissacáridos podem ser formados a partir de dois ou mais tipos de oses.

Para que os polissacáridos se possam formar, as oses estabelecem uma ligação glicosídica, que consiste na ligação entre um hidroxilo de uma ose e um carbono anomérico de outra ose, com libertação de uma molécula de água. Esta reacção necessita da energia fornecida pela fosforilação de um carbono anomérico a partir de trifosfato de adenosina. A ligação glicosídica é termodinamicamente instável em meio aquoso, sofrendo hidrólise lenta a pH básico e neutro e hidrólise rápida a pH ácido (Lehninger *et al.*, 2008; Quintas *et al.*, 2008). Para denominar um determinado polissacárido, usa-se o nome abreviado e a configuração do anel das oses que se ligam, como por exemplo Glc(α 1 \rightarrow 4) Glc, para indicar a ligação da maltose. (Lehninger *et al.*, 2008; Quintas *et al.*, 2008)

1.2.1. Glucanos

Nos cogumelos pode ser encontrada uma grande variedade de compostos, como compostos fenólicos, esteróis, triterpenóides, ceramidas, proteínas, lípidos e polissacáridos, sendo estes últimos os principais compostos bioactivos encontrados nesses organismos. Dos polissacáridos bioactivos, a maioria são β -D-glucanos, variando as suas características consoante a sua fonte.

Os glucanos são polímeros de D-glucopirranose, constituídos por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4) entre os resíduos de glucose, com algumas ramificações formadas por ligações β (1 \rightarrow 6), variando no seu peso molecular e podendo mesmo formar estruturas terciárias complexas, que são estabilizadas através de pontes de hidrogénio e que serão descritas mais à frente. Estas biomoléculas podem ser distinguidas através da configuração das suas oses (α -D-glucanos, β -D-glucanos ou α - β -D-glucanos), da sua ligação glicosídica ((1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e/ou (1 \rightarrow 6)), do seu peso molecular, entre outras características (Synytsya *et al.*, 2009; Semedo, 2015a; Zhu *et al.*, 2015). Estes compostos têm sido integrados no grupo dos homopolissacáridos, heteropolissacáridos ou glucoconjugados. (Semedo, 2015a; Zhu *et al.*, 2015)

Introdução

Os β -1,3-D-glucanos podem adoptar algumas estruturas terciárias como hélice simples, tripla hélice ou espiral aleatória. Entre estas estruturas, as que apresentam actividade biológica são as de hélice simples e as de tripla hélice, sendo estruturas importantes no tratamento de cancro ou em factores de coagulação. Foram propostos dois modelos que explicam a estrutura em tripla hélice para o composto curdlan. Um dos modelos tem como base a estabilização da estrutura através de pontes de hidrogénio entre oxigénios no mesmo plano, unindo as três cadeias que compõem a hélice, como se encontra ilustrado na Figura 14a. O segundo modelo baseia-se na estabilização da estrutura por pontes de hidrogénio entre oxigénios ao longo da hélice, unindo as três cadeias que compõem a mesma, de acordo com a Figura 14b. (Falch *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000; Sakurai *et al.*, 2005)

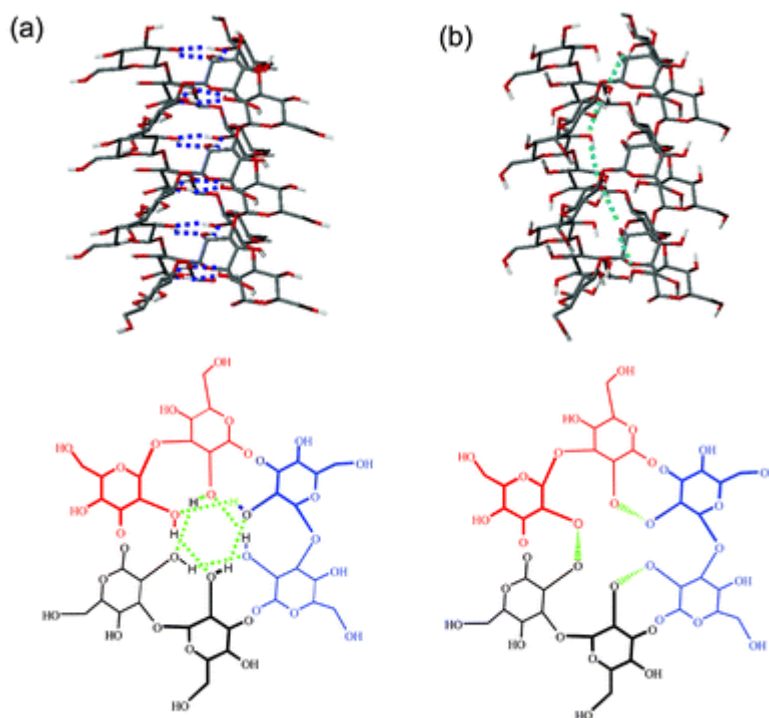


Figura 14- Representação dos modelos das pontes de hidrogénio para o composto curdlan: no plano(a) e ao longo da hélice (b). (extraído de Sakurai *et al.*, 2005)

Uma grande quantidade de β -D-glucanos isolados de cogumelos tem demonstrado um vasto espectro de efeitos biológicos, podendo actuar como antibióticos, antioxidantes, antitumorais e anticoagulantes. Estes compostos têm sido descritos por apresentarem importantes funções no sistema imunitário, fertilização, prevenção da patogénese, coagulação do sangue ou como Modificadores de Resposta Biológica (BRM's). No caso da actividade antitumoral, os β -D-glucanos actuam não só no combate directo do tumor promovendo a sua apoptose, mas também actuam na prevenção da formação de tumores, ou oncogénese e no aumento da imunidade contra tumores (Semedo, 2015a; Zhu *et al.*, 2015)

Alguns dos β -D-glucanos mais estudados são o Lentinan, o Pleuran e o Ganoderan que são extraídos de *L. edodes*, *P. ostreatus* e de *G. lucidum*, respectivamente. O Lentinan é um polissacárido ramificado, solúvel em água, que possui propriedades antitumorais, antivirais e antimicrobianas. O Pleuran é um polissacárido ramificado, que tem propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e antiproliferativas. O Ganoderan é um complexo proteína-polissacárido, constituído por 4% de proteínas e

que revela propriedades antitumorais. (Hearst *et al.*, 2009; Sobieralski *et al.*, 2012; Radzki *et al.*, 2016;)

A actividade antitumoral de polissacáridos extracelulares de *G. applanatum*, *G. carnosum*, *I. lacteus*, *L. edodes*, *P. ostreatus*, *Pleurotus eriinges*, *P. betulinus*, *Bjerkandera adjusta* foi avaliada em linhas celulares de carcinoma humano, tendo-se verificado uma inibição das linhas celulares testadas e um efeito inibitório 90-95 % para os polissacáridos de *G. applanatum*. (Martinho, 2012)

1.3. Produção de Polissacáridos a partir de Fungos

Tendo em vista a obtenção dos seus metabolitos, a biomassa micelial dos basidiomicetos pode ser produzida por fermentação submersa ou por fermentação em estado sólido.

1.3.1. Fermentação Submersa

A fermentação submersa utiliza um meio líquido, com os nutrientes necessários, para o cultivo do microrganismo desejado, como ilustrado na Figura 15, sendo o procedimento mais utilizado actualmente para a produção de produtos secundários de origem microbiana. Este método é fácil de controlar, requerendo apenas o controlo do pH, temperatura e nutrientes no meio, e sendo a separação da biomassa do caldo fermentativo também um processo simples. A fermentação submersa pode ser realizada em sistema contínuo, *batch* ou *fed-batch*, com micélio livre ou imobilizado num suporte. Alguns substratos mais utilizados são açúcares solúveis, melaços, meios líquidos, sumos de fruta ou vegetais ou águas residuais. (Singhania *et al.*, 2010; Subramaniyam *et al.*, 2012)



Figura 15- Fermentação submersa de *Rhizopus oligosporus*. (extraído de www2.hawaii.edu)

1.3.2. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido que ocorre na ausência de água em excesso, simula o crescimento dos microrganismos na natureza ou em sólidos húmidos, pelo que não é fácil controlar as condições do processo (Figura 16). Este tipo de fermentação apresenta várias vantagens em relação à fermentação submersa, designadamente tecnologia simples, baixo custo, necessidades energéticas reduzidas e permite a valorização de resíduos agro-industriais, contribuindo assim para a redução da sua acumulação. Na fermentação em estado sólido o resíduo sólido serve não só como suporte, mas também como fonte de nutrientes, sendo os mais usados o farelo de trigo, arroz ou palha de arroz, feno, resíduos vegetais ou de frutos, pasta de papel, bagaço, pó de coco ou meios sintéticos. (Pandey *et al.*, 2000; Pandey, 2003; Couto *et al.*, 2006; Subramaniyam *et al.*, 2012)



Figura 16- Fermentação em estado sólido de *P. ostreatus* (extraído de www.feedipedia.org)

Devido à baixa actividade de água disponível, a fermentação em estado sólido é mais adequada para o cultivo de fungos, contudo algumas bactérias também têm sido utilizadas neste tipo de processo. É possível obter neste tipo de fermentação, rendimentos dos produtos superiores aos da fermentação submersa, possivelmente pelo facto dos microrganismos se encontrarem num ambiente semelhante ao natural e assim aumentarem a sua actividade. (Pandey, 2003; Couto *et al.*, 2006)

A fermentação em estado sólido tem recebido recentemente uma atenção especial por exemplo a nível de gestão de resíduos, conservação energética da biomassa e sua aplicação para produção de metabolitos biologicamente activos, para além da sua aplicação na tradicional produção de alimentos, combustíveis e produtos químicos a granel. (Singhania *et al.*, 2009)

1.4. Extracção e Purificação de Polissacáridos

1.4.1. Métodos de Extracção

Os β -glucanos podem encontrar-se no meio extracelular ou intracelular, pelo que os processos de extracção dos polissacáridos são seleccionados consoante a sua localização.

Os polissacáridos extracelulares, encontram-se no caldo fermentativo, sendo assim necessária uma etapa inicial de separação da biomassa, para que se possa proceder à extracção posterior dos polissacáridos. Esta extracção é realizada através da adição de álcool etílico à amostra, obrigando os polissacáridos a precipitarem. (Wasser *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007)

Os polissacáridos intracelulares encontram-se principalmente na parede celular do fungo, e podem ser obtidos através dos corpos frutificantes e do micélio do organismo. A forma convencional de realizar a extracção destes polissacáridos é através de extracções com água quente, seguidas de extracções com soluções alcalinas, obtendo-se polissacáridos solúveis em água e insolúveis em água, dependendo das extracções. A extracção de todos os polissacáridos insolúveis em água pode ser difícil, para tal, podem se usar soluções ácidas, de forma a conseguir extrair os polissacáridos restantes. Estes métodos podem alterar o peso molecular dos polissacáridos, o que afecta as suas propriedades. (Wasser *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Ruthes *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015)

Recentemente, têm sido desenvolvidos novos métodos de extracção dos polissacáridos, como por exemplo extracção com água pressurizada, extracção com fluídos supercríticos, extracção assistida por microondas e extracção assistida por ultrassons. Estas técnicas tornam a extracção de polissacáridos mais rápida e eficiente do que as extracções convencionais, contudo a obrigatoriedade do uso de equipamentos específicos, eleva bastante os custos desses procedimentos. (Villares *et al.*, 2012; Semedo, 2015a)

1.4.2. Métodos de Purificação

Após as extracções, os polissacáridos são obtidos juntamente com proteínas, compostos fenólicos, monossacáridos, aminoácidos ou outras moléculas relacionadas, que importa remover utilizando métodos de purificação adequados. (Villares *et al.*, 2012; Ruthes *et al.*, 2015)

O método mais vulgar é precipitar os polissacáridos através da adição de etanol. Para se separar os D-glucanos, pode-se utilizar soluções de hidróxido de sódio com diferentes concentrações, pois estas vão interferir com a conformação tridimensional dos D-glucanos, e assim separá-los dos restantes contaminantes. No caso de se querer separar os β -D-glucanos pode-se utilizar dimetilsulfóxido, visto estes serem mais solúveis em solventes apolares, e assim é possível isolar os β -D-glucanos de outros polissacáridos e até de D-glucanos que sejam solúveis em água. (Zhang *et al.*, 2007; Ruthes *et al.*, 2015)

O *freeze-thawing* é uma técnica que consiste no repetido congelamento e descongelamento do extracto, à temperatura ambiente. Depois deste procedimento, centrifuga-se o extracto e repete-se o processo, até não se formar mais precipitado, e

assim são obtidos os polissacáridos lineares no precipitado e os polissacáridos ramificados dissolvidos na solução aquosa (Smiderle *et al.*, 2006; Ruthes *et al.*, 2015). Para fraccionar os polissacáridos em solução, obtidos por *freeze-thawing*, foi descrito um método que usa a solução de Fehling, apesar de não ser muito usado. Esse método consiste no uso de uma solução de sulfato de cobre (II) e uma solução de tartarato de potássio e sódio tetrahidratado, que devido à presença do ião metálico Cu^{2+} , conduz à formação de complexos de D-glucanos, facilitando assim a sua posterior separação. (Ruthes *et al.*, 2015)

Para purificar os extractos, foram ainda reportadas técnicas de diálise ou de ultrafiltração, também com uma utilização limitada. (Ruthes *et al.*, 2015)

Os polissacáridos também podem ser purificados por técnicas cromatográficas. O método mais utilizado neste âmbito é a cromatografia por exclusão molecular, que possibilita o fraccionamento dos polissacáridos de acordo com o seu tamanho. Uma aplicação que se encontra descrita desta técnica cromatográfica é para fraccionamento de dextrano (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2007; Villares *et al.*, 2012; Ruthes *et al.*, 2015). No entanto, a cromatografia de troca iónica também foi utilizada para purificação de α -D-glucanos, tendo sido usada uma matriz de DEAE-celulose. A cromatografia de afinidade em matrizes desenvolvidas pela Sigma-Aldrich também se encontra descrita. Destes estudos, destaca-se a matriz L4018, que tem lectina extraída de *Lens culinaris* imobilizada como ligando. Esta matriz cromatográfica tem grande afinidade com os resíduos de α -D-manosilo e α -D-glucosilo, sendo usada para separar α - e β -glucanos combinada com cromatografia por exclusão molecular. (Smiderle *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2007; Ruthes *et al.*, 2015)

1.4.2.1. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado

Um outro tipo de cromatografia de afinidade é a cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). Esta técnica foi desenvolvida em 1975 por Porath e colaboradores, que reportaram o uso de iões de cobre e zinco para o fraccionamento de proteínas do soro humano, tendo por base a afinidade das proteínas pelos metais de transição (Karmali, 2000; Chaga, 2001). Em relação às restantes cromatografias de afinidade, esta técnica possui algumas vantagens como a estabilidade do ligando, a elevada concentração de proteína que se pode aplicar na coluna, as condições suaves de eluição, a regeneração simples da matriz e o seu baixo custo. (Karmali, 2000; Chaga, 2001; Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

Esta técnica cromatográfica baseia-se na coordenação dos átomos de azoto, enxofre e oxigénio e o ião metálico imobilizado num suporte sólido, contudo para haver coordenação com o metal, esses átomos têm que se encontrar à superfície da biomolécula que se pretende fraccionar. Os iões metálicos mais adequados para o fraccionamento dos átomos referidos são o Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} . (Karmali, 2000; Chaga, 2001;)

A resina de IMAC consiste numa matriz cromatográfica, ligada a um braço espaçador, que por sua vez liga um agente quelante, como é ilustrado na Figura 17 (Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

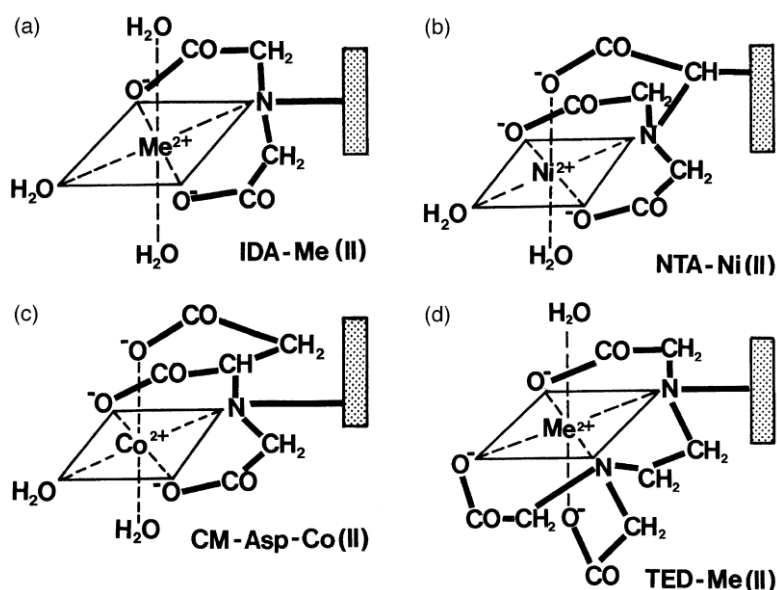


Figura 17- Representação de alguns agentes quelantes (IDA, NTA, CM e TED) em coordenação com metais. (imagem extraída de Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

As matrizes cromatográficas mais usuais são constituídas por agarose ou dextrano com ligações cruzadas, tais como Sepharose 6B, Sepharose 4B e Sephadex G100. Estas matrizes são facilmente activadas, mas têm uma baixa resistência mecânica e uma elevada quebra de pressão, já o uso de sílica proporciona boas propriedades mecânicas, mas adsorve irreversivelmente proteínas. (Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

O braço espaçador é utilizado para que haja uma boa acessibilidade do metal para se coordenar com as proteínas. Este braço espaçador é hidrófilo e pode variar em tamanho e na composição, sendo factores que influenciam a própria cromatografia. Dois braços espaçadores que podem ser utilizados são a epicloridrina (EPI) e o Éter Diglicidil Butan-1,4-diol (EDB) (Karmali, 2000; Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

O IMAC implica a utilização de um agente quelante ao qual é imobilizado um metal. O agente quelante que tem sido mais utilizado é um composto tridentado, o ácido iminodiacético (IDA). Quando se utiliza IDA, a afinidade dos metais para as proteínas varia da seguinte forma: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+}$. Nos últimos anos, tem-se assistido ao desenvolvimento de novos agentes quelantes, como o ácido nitrilotriacético (NTA), o TALON (ou ácido aspártico carboximetilado, CM-Asp), o tris(carboximetil)etilenodiamina (TED), entre outros. O NTA e o TALON são compostos tetradentados e o TED é um composto pentadentado, o que indica que ao se coordenarem com o metal deixam menos centros disponíveis para o metal se ligar com o alvo, apesar do NTA e o TALON terem uma maior afinidade com o metal do que o IDA. A Tabela 1 reúne algumas características dos agentes quelantes mais utilizados em IMAC. (Karmali, 2000; Chaga, 2001; Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

Tabela 1- Características de alguns agentes quelantes utilizados em IMAC (adaptado de Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

Composto quelante	Coordenação	Iões metálicos
Ácido aminohidroxâmico	Bidentado	Fe(III)
Salicilaldeido	Bidentado	Cu(II)
IDA	Tridentado	Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II)
Dipicolilamina	Tridentado	Zn(II), Ni(II)
TALON	Tetradentado	Ca (II), Co(II)
NTA	Tetradentado	Ni(II)
TED	Pentadentado	Cu(II), Zn(II)

Uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado inicia-se com o carregamento do metal na coluna, seguida do equilíbrio da fase estacionária, aplicação da amostra, recolha das fracções de lavagem e eluição do biomolécula alvo. Esta eluição pode ser realizada por protonação, extracção do metal ou como é mais frequente por competição do ligando. Para se regenerar a resina depois da sua utilização, remove-se o metal utilizando um composto quelante forte como EDTA. As soluções tampão utilizadas durante o processo cromatográfico, necessitam de ter uma força iónica relativamente grande, (0,1-1 M de NaCl) para que não ocorram interacções electrostáticas com o metal. A eluição do composto alvo pode ser feita a pH baixo ou usando um gradiente de pH, contudo para compostos sensíveis a pH ácidos é preferível a utilização de um composto competitivo, como o imidazole. Quando se utiliza o imidazole, é necessário garantir que este não se encontra protonado, trabalhando-se a pH neutros ou ligeiramente básicos, o que não causa alterações nos compostos sensíveis ao pH. (Karmali, 2000; Gaberc-Porekar *et al.*, 2001)

Esta técnica, como já foi referido, tem inúmeras vantagens na separação e purificação de proteínas e derivados, como anticorpos ou glucoproteínas, e tem sido esse o foco da investigação em IMAC. Contudo, esta técnica começa a ser usada para purificação de polissacáridos, tendo sido desenvolvido um método que utiliza lantanídeos tridentados, como metais de transição, e se sintetiza a resina através da reacção radicalar de ácido vinilfosfórico com dimetacrilato de 1,4-butanodiol, usando como iniciador de radicais o azo-bis-isobutironitrilo. Esta técnica baseia-se na capacidade de os lantanídeos conseguirem coordenar-se com os grupos hidroxilo dos polissacáridos, a valores de pH elevados. (Schemeth *et al.*, 2014)

1.5. Métodos de Doseamento de Polissacáridos

É importante poder quantificar os polissacáridos nas fracções de extracção e purificação, pelo que foram desenvolvidos métodos como cromatografias, electroforese capilar, espectroscopia de infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), entre outros. No entanto, estes métodos envolvem elevados investimentos e capacidades analíticas avançadas, portanto é importante que se desenvolvam técnicas alternativas rápidas e precisas, como métodos colorimétricos, fluorimétricos, enzimáticos, entre outros. (Semedo, 2015a)

1.5.1. Métodos Colorimétricos

Os métodos colorimétricos baseiam-se na alteração da absorvância ou transmitância de um determinado composto quando misturado com a amostra, podendo esta alteração ser desencadeada por uma reacção com a amostra ou através de interacções entre o composto aplicado e a amostra. Estes métodos são selectivos, sendo necessário utilizar um composto diferente, consoante a substância que se pretende quantificar.

1.5.1.1. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

Um dos métodos mais utilizados para determinação de polissacáridos, consiste em fazer reagir o polissacárido hidrolisado e um reagente que desenvolve cor detectável na região do visível do espectro electromagnético. Os reagentes usados nesta reacção podem ser o fenol, o ferrocianeto alcalino e a antrona. Apesar deste método ser sensível e simples, os reagentes utilizados são bastante tóxicos para a pele e vias respiratórias e apresentam sérios riscos para o meio ambiente, como tal continuam a ser investigados outros métodos de quantificação de polissacáridos. (Masuko *et al.*, 2005; Albalasmeh *et al.*, 2013)

Contudo, o método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico tem sido muito utilizado para doseamento de polissacáridos, sendo bastante fiável e podendo ser usado em diversas áreas científicas. Este método consiste na hidrólise, na presença de ácido sulfúrico, dos hidratos de carbono a derivados de furfural e posterior reacção com o fenol, resultando na formação de complexos com cor, que absorvem a luz visível e têm um máximo de absorvância a 490 nm. Apesar das vantagens deste método, este também apresenta algumas desvantagens. Para além da toxicidade associada ao fenol, já referida anteriormente, este método apresenta os resultados em equivalentes de glucose, o que limita a sua aplicabilidade na quantificação de heteropolissacáridos. Adicionalmente, os hidratos de carbono catiónicos não reagem com o ácido sulfúrico, afectando assim os coeficientes de absorção molar e a respectiva quantificação. (Dubois *et al.*, 1956; Masuko *et al.*, 2005; Albalasmeh *et al.*, 2013)

1.5.1.2. Método do corante Congo red

O método do corante Congo red é outro método utilizado para quantificação e caracterização de polissacáridos, em particular de β -glucanos. O corante diazóico (Figura 18) estabelece interacções electrostáticas, pontes de hidrogénio e também interacções de Van der Waals com a estrutura terciária em tripla hélice do β -glucano, provocando assim um desvio batocrómico de 488 nm para 516 nm. Devido às interacções com a estrutura terciária, este método detecta apenas β -glucanos com um peso molecular superior a 250 kDa, o que o torna bastante específico. O método do corante Congo red foi recentemente adaptado para microplacas de 96 poços, facilitando assim a sua aplicação, aumentando a sua sensibilidade e diminuindo o seu limite de detecção, para 1,51 μ g de β -glucanos por poço. A sensibilidade foi testada para diferentes polissacáridos e apenas se observou o desvio batocrómico nas amostras que continham β -D-glucanos com uma estrutura terciária em tripla hélice. Este método permite o rápido doseamento de β -glucanos extracelulares e

intracelulares de várias espécies de basidiomicetos. (Nitschke *et al.*, 2011; Semedo *et al.*, 2015b; Kupetz *et al.*, 2015)

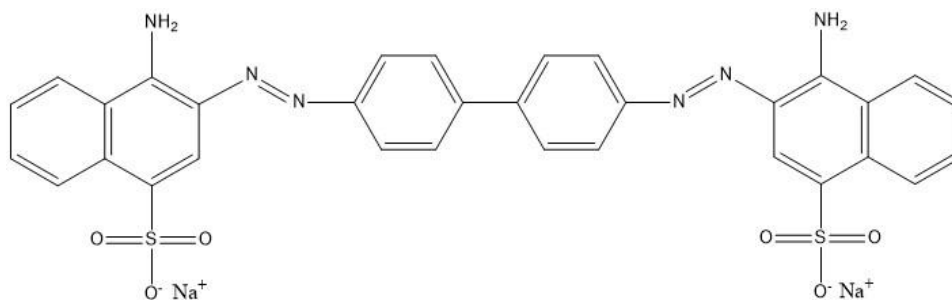


Figura 18- Estrutura molecular do corante Congo red

1.5.1.3. Método do corante Alcian blue

Outro método também desenvolvido recentemente, para quantificação de β -D-glucanos isolados de espécies de basidiomicetos, faz uso do corante Alcian blue (Figura 19). Este corante começou por ser usado em investigação nas áreas da medicina e biologia, para coloração de mucosas internas e externas, glucosaminas, polissacáridos intra e extracelulares, entre outros. Este corante tem propriedades catiónicas, complexando-se assim com grupos carboxilo ou halfester-sulfatos, podendo também formar complexos com grupos ácidos dos polissacáridos, resultando num pigmento não iónico insolúvel. A selectividade do Alcian Blue pode ser alterada por variação do pH ou da concentração de sal na solução do corante. No método microcolorimétrico recentemente desenvolvido para microplacas de 96 poços, os β -D-glucanos são quantificados através da diminuição da absorvância a 620 nm, devido à formação do complexo entre os β -D-glucanos e o corante. O complexo também foi detectado por análise espectral, tendo-se observado um desvio hipsocrómico do máximo do espectro de absorção do corante de 620 para 606 nm, Semedo e colaboradores reportaram para este método uma alta sensibilidade e um baixo limite de detecção, sendo necessário apenas 0,017 μ g de β -D-glucano por poço para ser possível a sua detecção. (Passow *et al.*, 1995; Semedo *et al.*, 2015c;)

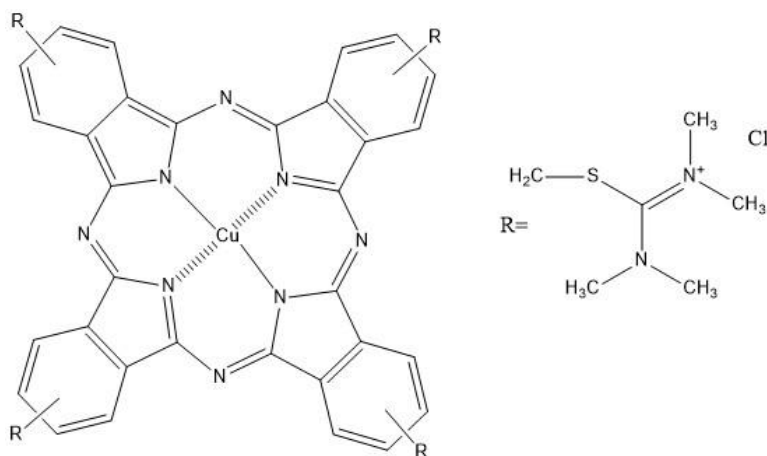


Figura 19- Estrutura molecular do corante Alcian blue

1.5.2. Métodos de Luminescência

1.5.2.1. Fluorescência

A fluorescência é um dos dois casos particulares de luminescência e consiste na emissão de fótons realizada por uma espécie que após absorção de luz ficou excitada electronicamente. (Valeur, 2012)

A primeira observação reportada de fluorescência ocorreu em 1565 pelo físico espanhol, Nicolas Monardes, que descreveu uma cor azul numa infusão de madeira. Este fenómeno foi investigado por várias pessoas, até que Sir George Gabriel Stokes demonstrou que o efeito era provocado pela absorção de luz e posterior emissão de luz, noutra comprimento de onda. Stokes descreveu este fenómeno num artigo e intitulou-o de fluorescência. (Valeur, 2012)

Quando um fluoróforo ou fluorocromo absorve um fóton, os seus electrões passam do seu estado fundamental de singuleto, S_0 , para orbitais de energia mais elevada, ou S_1 ou S_2 . Nestes estados excitados, o electrão na orbital excitada tem *spin* contrário ao electrão na orbital do estado fundamental. Os electrões ao perderem energia e regressarem ao seu estado fundamental libertam um fóton, como ilustrado na Figura 20, no entanto este processo não é simples, podendo ocorrer diversas transferências de energia enquanto os electrões se encontram no estado excitado, e assim, influenciar o tipo de luminescência. Estas transferências de energia podem ocorrer por conversão interna, cruzamento inter-sistemas, transferência energética intramolecular (ou *quenching*) e alteração conformacional. (Valeur, 2012)

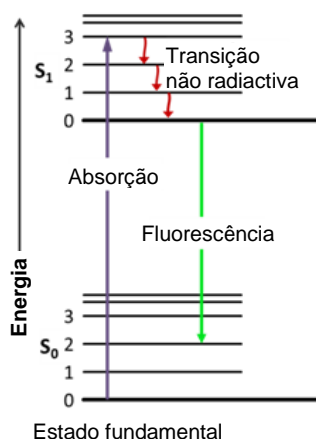


Figura 20- Diagrama de Jablonski que ilustra o processo de fluorescência. (adaptado de www.princetoninstruments.com)

A fluorescência ocorre tipicamente em moléculas aromáticas, sendo intituladas de fluoróforos. Existem essencialmente duas classes de fluoróforos, os intrínsecos e os extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos ocorrem naturalmente, enquanto que os extrínsecos são fluoróforos que são adicionados a uma amostra que não demonstra as propriedades espectrais desejadas. (Lakowicz, 2006)

Na espectroscopia fluorescente convencional, podem ser obtidos dois tipos de espectros. O espectro de emissão, que resulta do registo da intensidade de emissão em função do comprimento de onda de emissão λ_{em} , quando a amostra é excitada a

um comprimento de onda fixo λ_{ex} ; e o espectro de excitação obtido com um λ_{em} fixo em função do λ_{ex} (Lakowicz, 2006)

Para o estudo de amostras complexas, foi desenvolvida a espectroscopia de fluorescência síncrona (*synchronous fluorescence spectroscopy*). Esta técnica é bastante usada na análise multi-componente, sem necessidade de realizar os procedimentos prévios de separação. Os espectros são obtidos pelo varrimento simultâneo dos monocromadores de excitação e emissão, sempre com uma diferença de comprimento de onda fixo (ou síncrono). A sensibilidade que se obtém em relação aos espectros de fluorescência convencional é idêntica, mas as bandas espectrais são mais estreitas, o que permite reduzir as interferências por sobreposição e possibilita a identificação de cada composto fluorescente numa gama espectral específica. Adicionalmente, o tempo de aquisição é menor. (Pacheco *et al.*, 2013)

Os métodos fluorimétricos, que se encontram reportados para quantificação de polissacáridos, são de fluorescência convencional e utilizam fluorocromos extrínsecos, que se ligam ou interactivam com o composto a quantificar, provocando uma alteração no máximo de emissão do corante fluorescente. Estes métodos foram utilizados para quantificação de β -D-glucanos de várias espécies de basidiomicetos e também de alguns cereais. Os fluorocromos mais utilizados são o Aniline blue e o Calcofluor. Desta forma, não se conhece até à data qualquer trabalho de fluorescência de polissacáridos, que não faça uso desses fluorocromos. (Schmitt *et al.*, 2009; Mölleken *et al.*, 2011)

1.5.2.2. Fosforescência

O termo fósforo significa “que tem luz”, sendo usado desde a idade média para materiais que brilham no escuro depois de expostos à luz. O composto fosforescente mais conhecido é o fósforo bolonhês, descoberto por Vincenzo Cascariolo em 1602. Quando este calcinou com carvão umas pedras invulgares, que tinha encontrado na zona de Monte Paterno, observou que as pedras começaram a brilhar no escuro depois de expostas à luz. Posteriormente, descobriu-se que a calcinação transformava sulfato de bário, presente nas pedras, em sulfito de bário, um composto fosforescente. (Valeur, 2012)

A fosforescência é o outro caso particular de luminescência e consiste na emissão de luz a partir do estado excitado de tripleto, no qual o electrão na orbital excitada tem a mesma orientação de *spin* do electrão que está no estado fundamental. (Valeur, 2012)

Quando uma molécula absorve um fotão, os seus electrões passam do seu estado fundamental, ou S_0 , para orbitais de energia mais elevada, ou S_1 . No caso da fosforescência, estes electrões não retornam imediatamente a S_0 , sofrendo em primeiro lugar um fenómeno denominado cruzamento inter-sistema, que consiste numa transição não radiativa de electrões entre dois níveis electrónicos isoenergéticos, e que pode ser suficientemente rápida para competir com outro tipo de transições, como ilustrado na Figura 21. Após esta transição, os electrões voltam ao seu estado fundamental, libertando assim radiação durante segundos, ou até mesmo minutos, isto porque esta transição para S_0 é proibitiva e as constantes de velocidade das emissões de fosforescência são muito baixas. (Valeur, 2012)

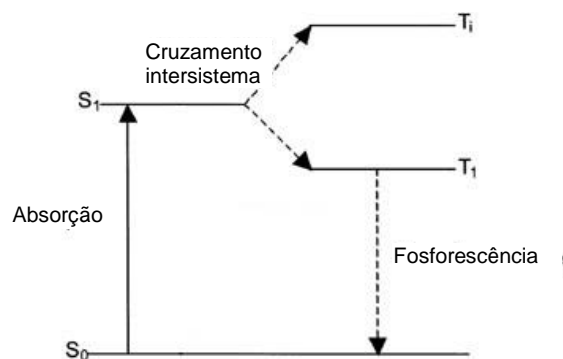


Figura 21- Diagrama de Jablonski simplificado que ilustra o processo de fosforescência. (adaptado de www.globalspec.com)

Actualmente, os métodos de fosforescência utilizados para análise de polissacáridos baseiam-se na adição de fosforóforos à amostra e na detecção de alteração de intensidade de fosforescência, quando o composto interacciona com o composto a quantificar. Dois dos compostos que têm sido utilizados com esse fim são a tetraiodo fluoresceína (eritrosina B) e o 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), tendo sido aplicados em filmes de maltose e glucose, respectivamente. Até à data, não é conhecida qualquer publicação que descreva a fosforescência de polissacáridos sem o uso desses corantes. (Shirke *et al.*, 2005; Tiwari *et al.*, 2010)

1.6. Técnicas de Análise Estrutural de Polissacáridos

Estão disponíveis vários métodos para análise estrutural de polissacáridos, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão e carbono, difracção de raios-X, refractometria, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), entre outros (Gonzaga *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2009; Gomba *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi utilizada a técnica de FTIR.

1.6.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Hoje em dia, uma das técnicas analíticas mais importantes é a espectroscopia de infravermelho, tendo como principal vantagem o uso das amostras em qualquer estado físico. (Stuart, 2004)

Esta técnica está disponível desde da década de 40, apesar de na altura os espectrómetros serem baseados em prismas que actuavam como elementos dispersivos. Na década de 50, foram introduzidos filtros de difracção nos aparelhos existentes. Contudo, os maiores progressos que esta técnica sentiu deveram-se à introdução dos espectrómetros da transformada de Fourier, que utilizam um interferómetro e a transformada de Fourier para melhorar a qualidade do espectro e o tempo de análise. (Stuart, 2004)

A espectroscopia de infravermelho é baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula, que resultem numa alteração do seu momento dipolar, depois desta ter sido irradiada com radiação infravermelha. Cada banda de um espectro de infravermelho corresponde à frequência de vibração de determinada ligação da molécula. (Stuart, 2004)

Apesar do espectro de IV ser característico para cada molécula, com esta técnica é possível identificar algumas das ligações principais e grupos funcionais. No caso dos β -glucanos, algumas bandas características situadas entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ correspondem às vibrações de extensão dos grupos O-H e às vibrações de extensão simétricas e assimétricas da ligação N-H; a ligação C-H apresenta uma banda perto dos 2900 cm^{-1} ; a banda característica do grupo carbonilo (amida I) e da amida II, das proteínas, situam-se aproximadamente nos 1600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} , respectivamente; a banda de extensão da ligação C-O dos grupos C-O-C e a banda C-O do álcool terciário situa-se na região dos $1000\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$. Para as piranoses estão descritas várias bandas relativas às vibrações de extensão das ligações C-C e C-O, entre os $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Foram também reportadas bandas correspondentes aos anómeros α e β perto dos 900 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , respectivamente. (Zheng et al., 2005; Israilides et al., 2008; Kozarski et al., 2012; Martinho, 2012; Semedo *et al*, 2015b; Semedo *et al*, 2015c)

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Ácido acético (CH₃COOH) a 100% da Fisher Chemical. Ácido clorídrico (HCl) a 37% proveniente da Fisher Chemical. Ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 96% proveniente da Panreac. Agar purificado proveniente da Oxoid. Alcian blue 8GX da Sigma. Cloreto de cobalto (II) (CoCl₂) a 99% proveniente da Merck. Cloreto de níquel (II) (NiCl₂) a 98% proveniente da Merck. Cloreto de sódio (NaCl) a 100% da VWR Chemicals. Cloreto de zinco (II) (ZnCl₂) a 98% proveniente da Merck. Congo Red da Sigma. D-Glucose Anidra proveniente da Scharlau. Di-Hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) a 99,5% da Merck, SA. Di-Hidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄.H₂O) a 98% proveniente da Panreac. Hidrogenofosfato disódico (Na₂HPO₄.7H₂O) a 98% da Panreac. Fenol (C₆H₆O) a 99,5% proveniente da VWR prolabo. Hidróxido de potássio (KOH) a 85% proveniente da Panreac. Imidazole a 99% da Sigma Aldrich. Sulfato de amónia ((NH₄)₂SO₄) a 99,5% proveniente da Merck. Sulfato de cobre (II) anidro (CuSO₄) a 99% proveniente da Merck. Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) a 99,5% proveniente da Carlo Erba Reagents. Titriplex (EDTA) a 99% da Merck. β-D-1,3-glucano de *Euglena gracilis* a 95% proveniente da Fluka. β-D-glucano de cevada a 95% proveniente da Sigma.

2.2. Amostras de basidiomicetos

Os basidiomicetos utilizados foram, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*, disponíveis no Laboratório de Biotecnologia da Área Departamental de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, o *Ganoderma carnosum*, *Ganoderma lucidum* violeta, *Irpex lacteus*, *Phlebia rufa* e *Piptoporus betulinus* fornecidos pelo Departamento de Agronomia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. As culturas de basidiomicetos foram mantidas em agar de dextrose de batata a 4 °C.

Neste trabalho, também foram utilizados corpos frutificantes jovens em pó de *Agaricus blazei*, *Coriolus versicolor* e *Lentinula edodes*, obtidos no Gourmet Mushrooms, Inc. e o *Inonotus obliquus* do Mycology Research Laboratory, Ltd., preservados à temperatura ambiente.

2.3. Resíduos agro-industriais

Tendo em vista o desenvolvimento de meio para o cultivo dos fungos e produção de polissacáridos, foram testados diversos resíduos agro-industriais.

Os resíduos agro-industriais secos utilizados foram o carolo de milho, a casca de arroz, a casca de aveia, a serradura e a tremocilha, fornecidos pelo Departamento de Agronomia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Como resíduos agro-industriais húmidos foram usados a borra de café, a casca de abacaxi, a casca de banana, a casca de manga e a casca de pêra.

2.4. Métodos

2.4.1. Manutenção e cultivo dos basidiomicetos

Antes de se dar início aos ensaios de fermentação submersa, os basidiomicetos foram todos cultivados em meio sólido. Os meios sólidos de cultivo apresentaram a seguinte composição: 1 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g/L de agar purificado e 4 g/L de resíduo seco ou 40 g/L de resíduo húmido, com um pH final de 5,5-5,8. O meio foi esterilizado em autoclave e inoculado com um quadrado de meio sólido colonizado com micélio. As culturas foram incubadas a 25 °C, até o micélio ocupar toda a superfície do meio.

Numa segunda fase, as culturas de basidiomicetos que apresentaram crescimento nos meios acima descritos foram inoculadas em meio líquido. Os meios líquidos preparados tinham composição idêntica aos sólidos, mas sem incluírem o agar purificado. Após esterilização, os meios foram inoculados. O micélio que se desenvolveu no meio sólido foi raspado e recolhido para um tubo *ependorf*, contendo soro fisiológico estéril. Após ressuspensão do micélio, este foi usado como inóculo dos meios líquidos. As culturas foram incubadas a 25 °C numa incubadora com agitação orbital a 150 rpm, durante 14 dias.

2.4.2. Planeamento experimental para optimização da produção de β -D-glucanos extracelulares

Tendo em vista a superprodução de β -D-glucanos extracelulares, a partir da fermentação submersa dos basidiomicetos em meios com resíduos agro-industriais, foram recolhidas amostras das culturas e os sobrenadantes foram doseados pelos Métodos do Congo red (descrito em 2.4.6). Tendo por base os resultados dos ensaios preliminares, desenvolveu-se um estudo sistemático para maximizar a produção de β -D-glucanos. O planeamento experimental foi conduzido utilizando três factores e dois níveis com duplicados, sendo estes: espécie de basidiomiceto (*L. edodes* e *G. applanatum*), concentração de resíduo agro-industrial (40 g/L e 400 g/L para resíduos húmidos ou 4 g/L e 40 g/L para resíduos secos) e tempo de cultivo (3 e 7 dias). Os níveis superior (+) e inferior (-) foram definidos a partir dos resultados preliminares. A matriz do planeamento experimental foi obtida com o software Design Expert versão 10 e os resultados obtidos foram ajustados à seguinte equação do modelo factorial:

$$y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \beta_{AB} x_A x_B + \beta_{AC} x_A x_C$$

onde y representa a concentração de β -D-glucanos, β_0 é a média de todas as concentrações, β_s são os coeficientes de regressão e x_s são os factores utilizados. A análise estatística do modelo foi avaliada segundo a metodologia ANOVA.

2.4.3. Extracção e precipitação dos polissacáridos

Após fermentação, a biomassa micelial foi separada do caldo fermentativo através de centrifugação durante 30 min, 4500 rpm a 4 °C.

A extracção dos polissacáridos intracelulares foi realizada em quatro etapas. Numa primeira etapa adicionou-se 2 volumes de água desionizada à biomassa e agitou-se durante 5 min, separando-se o sobrenadante da biomassa por centrifugação durante 5 min, 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante recolhido foi designado por *fracção água fria*. De seguida adicionou-se 1 volume de água desionizada à biomassa e colocou-se num banho a 100 °C durante 3 h, recolhendo-se depois o sobrenadante, que se identificou como *fracção água quente*, por centrifugação durante 5 min, 10.000 rpm e 4 °C. Ao sedimento obtido, juntou-se 3 volumes de uma solução de KOH 1 M e incubou-se num banho agitado a 60 °C durante 20 min, recolhendo-se o sobrenadante após centrifugação durante 5 min, 10.000 rpm e 4 °C. Este sobrenadante foi denominado por *fracção KOH* e o sedimento obtido foi neutralizado com 2 volumes de água desionizada sendo recolhido o sobrenadante através de centrifugação posterior durante 5 min, 10.000 rpm e 4 °C. De seguida, realizou-se uma última extracção misturando o sedimento com 2 volumes de HCl 0,6 M e incubando a 100 °C durante 1 h. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação e foi identificado como *fracção HCl*. O sedimento foi neutralizado seguindo-se o procedimento anteriormente descrito.

Para precipitação dos polissacáridos extracelulares, adicionou-se ao sobrenadante obtido após centrifugação da cultura celular, 4 volumes de etanol 95%, deixando-se a precipitar durante a noite, a 4 °C. De seguida recolheu-se o precipitado após centrifugação durante 5 min, 10.000 rpm e 4 °C. No final dissolveu-se o sedimento em tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, pH 8.

2.4.4. Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado

Numa fase inicial, testaram-se várias resinas cromatográficas com diferentes metais imobilizados de maneira a se poder seleccionar a resina e o metal mais adequados para a separação dos polissacáridos. Este estudo foi realizado com os polissacáridos extracelulares de *L. edodes* cultivada em meio contendo borras de café e com este propósito, utilizaram-se as resinas indicadas na Tabela 2 com os metais Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ ou Zn²⁺ imobilizados. Todas as corridas cromatográficas foram conduzidas a pH 8, por ter sido o valor de pH que, em estudos anteriores a este, permitiu obter melhores resultados.

Tabela 2- Resinas cromatográficas utilizadas com identificação do respectivo suporte, braço espaçador (EPI – epiclorigrina; EDB – epiclorigrina) e agente quelante (IDA - ácido iminodiacético; NTA - ácido nitrilotriacético).

Resina	Suporte	Braço espaçador	Agente quelante
R1	Sepharose 6B	EDB	IDA
R2	Sepharose 6B	EPI	IDA
R3	Sepharose 4B	EDB	IDA
R4	Sepharose 4B	EPI	IDA
R5	Sepharose 6B	EDB	NTA
R6	Sepharose 4B	EPI	NTA

Os testes referidos anteriormente, foram realizados em tubos *ependorf*, contendo 500 µL da resina a testar. Para a preparação de cada uma das matrizes cromatográficas, adicionou-se a cada resina no tubo *ependorf* uma solução de EDTA 50 mM, agitou-se ressuspendendo a resina e centrifugou-se durante 5 min, à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento até a resina ter sido tratada com 3 volumes da solução de EDTA. Posteriormente, as resinas foram lavadas com 2 volumes de água desionizada. Para a imobilização dos metais, adicionaram-se às resinas sedimentadas 3 volumes da solução do metal a testar numa concentração de 50 mM, ressuspenderam-se e centrifugaram-se. Seguiu-se nova lavagem para a remoção do excesso de metal. O último passo da preparação das matrizes consistiu no seu equilíbrio, e para tal pipetou-se para os tubos *ependorf* tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, pH 8, agitaram-se e centrifugaram-se os tubos, descartando-se no final o sobrenadante. Repetiu-se este procedimento até as resinas estarem equilibradas com 3 volumes da solução tampão. Após esta preparação, adicionaram-se a cada matriz 400 µL de polissacáridos extracelulares de *L. edodes*, tendo sido realizada uma diluição prévia da amostra no tampão de equilíbrio, para garantir que eram aplicados a cada resina 16 µg de β-D-glucanos. A adsorção dos polissacáridos à matriz cromatográfica foi promovida por incubação dos tubos *ependorf* à temperatura ambiente, durante 15 min, com agitação. Depois desta etapa, recolheu-se, após centrifugação, a primeira fracção da lavagem. Seguiu-se a adição de 500 µL de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl e pH 8, agitação, centrifugação e recolha da 2ª fracção de lavagem. O procedimento foi repetido, de forma a serem recolhidas mais 3 fracções de lavagem. De seguida, deu-se início à desadsorção dos polissacáridos adsorvidos na matriz. Para tal, adicionaram-se 500 µL de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, 30 mM imidazole pH 8, agitaram-se e centrifugaram-se os tubos, de modo a serem recolhidas as 4 primeiras fracções de eluição. Para finalizar a desadsorção, adicionaram-se 500 µL de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, 500 mM imidazole e pH 8 e seguiu-se o procedimento já descrito até se obterem as 3 últimas fracções de eluição. Após doseamento de todas as fracções pelo método do corante Congo Red (descrito em 2.4.6), foi seleccionada a resina com o metal imobilizado que permitiu uma maior separação e recuperação dos polissacáridos. Essa resina foi empacotada numa seringa até se obter aproximadamente 5 mL de resina sedimentada e foi seguido um procedimento muito idêntico ao descrito para as resinas nos tubos *ependorf*.

Como descrito por Karmali, o primeiro passo para realizar uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado, consiste na preparação da fase estacionária. Para tal, fizeram-se passar pela coluna de IMAC aproximadamente 3 volumes de uma solução de EDTA 50 mM, lavando-se posteriormente a coluna com água desionizada, para remover o EDTA remanescente. De seguida, fez-se passar pela coluna aproximadamente 3 volumes de uma solução de sulfato de cobre 50 mM, lavando-se depois com água desionizada, para remover o sulfato de cobre em excesso. Por último, a coluna foi equilibrada com aproximadamente 3 volumes de uma solução de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, pH 8 e o caudal foi regulado para 15 mL/h. (Karmali, 2000)

Após o equilíbrio da coluna, aplicaram-se 2,5 mL da amostra de polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes* cultivada em meio contendo borras de café, diluída 1:2,6 no tampão de equilíbrio, aplicando na coluna aproximadamente 100 µg

de β -D-glucanos. A aplicação da amostra na coluna foi realizada com o caudal previamente estabelecido de 15 mL/h e a recolha das fracções cromatográficas foi iniciada de imediato. A fase de lavagem prosseguiu com um caudal de 40 mL/h e até ter sido passado pela coluna um volume equivalente a 2 volumes da fase estacionária. A etapa de desadsorção dos polissacáridos adsorvidos na fase anterior foi realizada utilizando um gradiente de 0-50 mM de imidazole. Para o efeito, utilizou-se um sistema de vasos comunicantes, tendo-se pipetado para um dos vasos 15 mL de solução de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, pH 8 e para o outro vaso igual volume da mesma solução tampão mas contendo 50 mM imidazole. De seguida, passou-se na coluna solução de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, 50 mM imidazole, pH 8, num volume correspondente a 2 volumes da fase estacionária. Por último, para garantir a eluição de todos os polissacáridos, foram recolhidas 8 fracções cromatográficas com solução de tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.

2.4.5. Método Fenol-Ácido Sulfúrico

Para determinação dos polissacáridos totais utilizou-se o método fenol-ácido sulfúrico no formato de microplaca de 96 poços (Masuko *et al.*, 2005), que permitiu o doseamento simultâneo de várias amostras. Conforme descrito por Masuko e colaboradores, pipetaram-se 50 μ L de amostra a analisar para um poço de uma microplaca NUNC 96. De seguida, adicionaram-se 150 μ L de ácido sulfúrico concentrado e 30 μ L de uma solução de fenol 5% (m/v). A placa foi incubada num banho de água a 90 °C, durante 5 min. Após arrefecimento da mistura à temperatura ambiente, obtiveram-se os valores de absorvância a 490 nm num leitor de microplacas (Bio-rad modelo 680). As amostras foram analisadas em triplicado e os ensaios em branco foram realizados nas mesmas condições, mas com 50 μ L de água desionizada em substituição do volume de amostra. Previamente, obteve-se uma curva de calibração na gama de 0-1,5 g/L, tendo sido utilizada a glucose como padrão.

2.4.6. Método do corante Congo red

O método do corante Congo red foi utilizado para quantificação de β -glucanos com estrutura em tripla hélice. Este método colorimétrico também foi realizado em microplacas de 96 poços, conforme descrito por Semedo e colaboradores (Semedo *et al.*, 2015b). Pipetaram-se 140 μ L de amostra para um poço de uma microplaca NUNC 96 e adicionaram-se 140 μ L de uma solução de corante Congo red 0,017% (m/v) em PBS 15 mM. A absorvância da mistura foi obtida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA-BMG Labtech), a 510 nm. As amostras foram analisadas em triplicado e foram realizados ensaios em branco com a seguinte constituição: 140 μ L de água desionizada e igual volume de solução de corante; e 140 μ L de amostra e 140 μ L de PBS. Inicialmente, foi obtida uma curva de calibração, na gama de 0-0,6 μ g/mL, tendo sido utilizado como padrão um β -D-glucano de cevada comercial, dissolvido em NaOH e posteriormente neutralizado.

2.4.7. Método do corante Alcian Blue

Os β -glucanos presentes nas diversas amostras também foram quantificados pelo método do corante Alcian Blue, recentemente publicado (Semedo *et al.*, 2015c). Num poço de uma microplaca NUNC 96, misturaram-se 100 μ L de amostra e 100 μ L da solução do corante Alcian blue 0,017% (m/v) em ácido acético a 2% (v/v) e pH 3. A absorvância da mistura foi obtida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA-BMG Labtech), a 620 nm. As amostras foram analisadas em triplicado e os ensaios em branco foram realizados nas mesmas condições, mas com 100 μ L de água desionizada em substituição da amostra. As absorvâncias das amostras foram subtraídas às absorvâncias dos respectivos ensaios em branco. A curva de calibração foi obtida para soluções de 0-0,4 μ g/mL de um β -1,3-D-glucano comercial de *Euglena gracilis*, dissolvido em NaOH e posteriormente neutralizado.

2.4.8. Fluorescência

Para os ensaios de fluorescência medida em estado estacionário e resolvida no tempo, pipetaram-se 100 μ L de amostra para um poço de uma microplaca NUNC 96. As amostras estudadas foram de polissacáridos extracelulares extraídos de cultura *L. edodes* e também o β -D-glucano comercial de cevada, para efeitos comparativos. As amostras foram analisadas em triplicado e para cada microplaca foram realizados ensaios em branco constituídos unicamente por água desionizada. A fluorescência foi obtida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA-BMG Labtec), tendo sido utilizados filtros de excitação correspondentes aos comprimentos de onda de 380, 400, 420, 430, 485 ou 510 nm e filtros de emissão correspondentes a 480, 528, 542, 550 ou 620 nm. A fluorescência resolvida no tempo foi obtida nas condições acima descritas e com um tempo de integração da leitura de 12-1500 μ s.

As amostras foram também analisadas num espectralfluorímetro (JASCO JP-8300), em cuvetes de quartzo com 1 cm de percurso óptico, tendo sido utilizado o software Spectra Manager para aquisição e tratamento dos espectros. Para obtenção dos espectros de fluorescência foram definidos os seguintes parâmetros: comprimento de onda de excitação de 250-735 nm; comprimento de onda de emissão de 260-750 nm; larguras das fendas de excitação e de emissão de 5 nm; incrementos nos comprimentos de onda na excitação de 5 nm; incrementos nos comprimentos de onda de emissão de 0,5 nm.; e velocidade de varrimento de 10.000 nm/min.

2.4.9. Fosforescência

A fosforescência das amostras de polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes* e do β -D-glucano comercial de cevada foi analisada num espectralfluorímetro (JASCO JP-8300), em cuvetes de quartzo com 1 cm de percurso óptico, tendo sido utilizado o software Spectra Manager para a aquisição e tratamento dos espectros. Para a obtenção dos espectros de fosforescência foram definidos os seguintes parâmetros: comprimento de onda de emissão de 210-750 nm; largura das fendas de excitação e de emissão de 5 nm; incrementos nos comprimentos de onda na excitação de 10, 20 e 30 nm; incrementos nos comprimentos de onda de emissão de 0,5 nm; e tempo de integração de 65 ms. A fosforescência resolvida no tempo das amostras foi investigada com comprimentos de onda de excitação 280-540 nm, num intervalo de 0-75 ms e um Δt de 0,1 ms.

2.4.10. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise por FTIR permitiu caracterizar parcialmente os polissacáridos presentes nas fracções obtidas no IMAC. Para tal secaram-se previamente as amostras e obtiveram-se os espectros num espectrómetro Bruker Tensor 27 em pastilhas de KBr, com uma resolução de 4 cm^{-1} , 64 varrimentos, e na gama de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. O software utilizado para aquisição e tratamento dos espectros foi o OPUS 5.5.

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização das condições de cultivo para a superprodução de β -D-glucanos

Antes de se iniciar o cultivo em fermentação submersa, os basidiomicetos foram inoculados em meio sólido suplementado com diferentes resíduos agro-industriais, de acordo com os materiais e métodos. No entanto, devido ao elevado número de espécies fúngicas e resíduos agro-industriais disponíveis, não foi possível testar todos os resíduos no cultivo de todas as espécies. Na Tabela 3, relacionaram-se as diferentes espécies com os resíduos utilizados e o tempo de cultivo necessário para a obtenção de biomassa micelial na totalidade da superfície do meio sólido.

Tabela 3- Meios de cultura sólidos, espécies fúngicas que apresentaram crescimento e respectivos tempos de cultivo

Resíduos	Tempo de cultivo (dias)						
	Casca Aveia	Tremocilha	Borra Café	Casca Banana	Casca Pêra	Casca Abacaxi	Casca Manga
<i>F. fomentarius</i>	11	11	11	+60	11	28	28
<i>G. applanatum</i>	+60	56	9	12	12	12	12
<i>G. carnosum</i>	37	11	11	11	11	14	14
<i>G. lucidum violeta</i>	37	16	9	13	14	14	14
<i>I. lacteus</i>	5	5	13	13	13	9	13
<i>L. edodes</i>	18	16	18	18	11	14	11
<i>P. rufa</i>	37	30	15	30	15	14	30
<i>P. betulinus</i>	50	18	18	18	+60	45	45
<i>P. ostreatus</i>	37	31	23	18	18	28	28

Após análise da Tabela 3 foram identificados os quatro resíduos que originaram um crescimento mais rápido das culturas. Esses resíduos foram tremocilha, borra de café, casca de banana e casca de aveia. Assim, as culturas, desenvolvidas nos meios sólidos contendo estes resíduos, foram inoculadas em meio líquido contendo o mesmo resíduo agro-industrial. Destes quatro resíduos agro-industriais testados, a borra de café foi o que permitiu obter concentrações mais elevadas de β -D-glucanos. No

Resultados e discussão

decurso deste trabalho, detectou-se que os meios líquidos de cultura com os resíduos apresentavam coloração, o que interferia com o método do corante Congo Red. Por essa razão, foi também subtraída a absorvância da mistura do meio contendo o resíduo com igual volume da solução de corante. As Figuras 22 e 23 apresentam os resultados obtidos em culturas em meio líquido contendo borra de café e tremocilha.

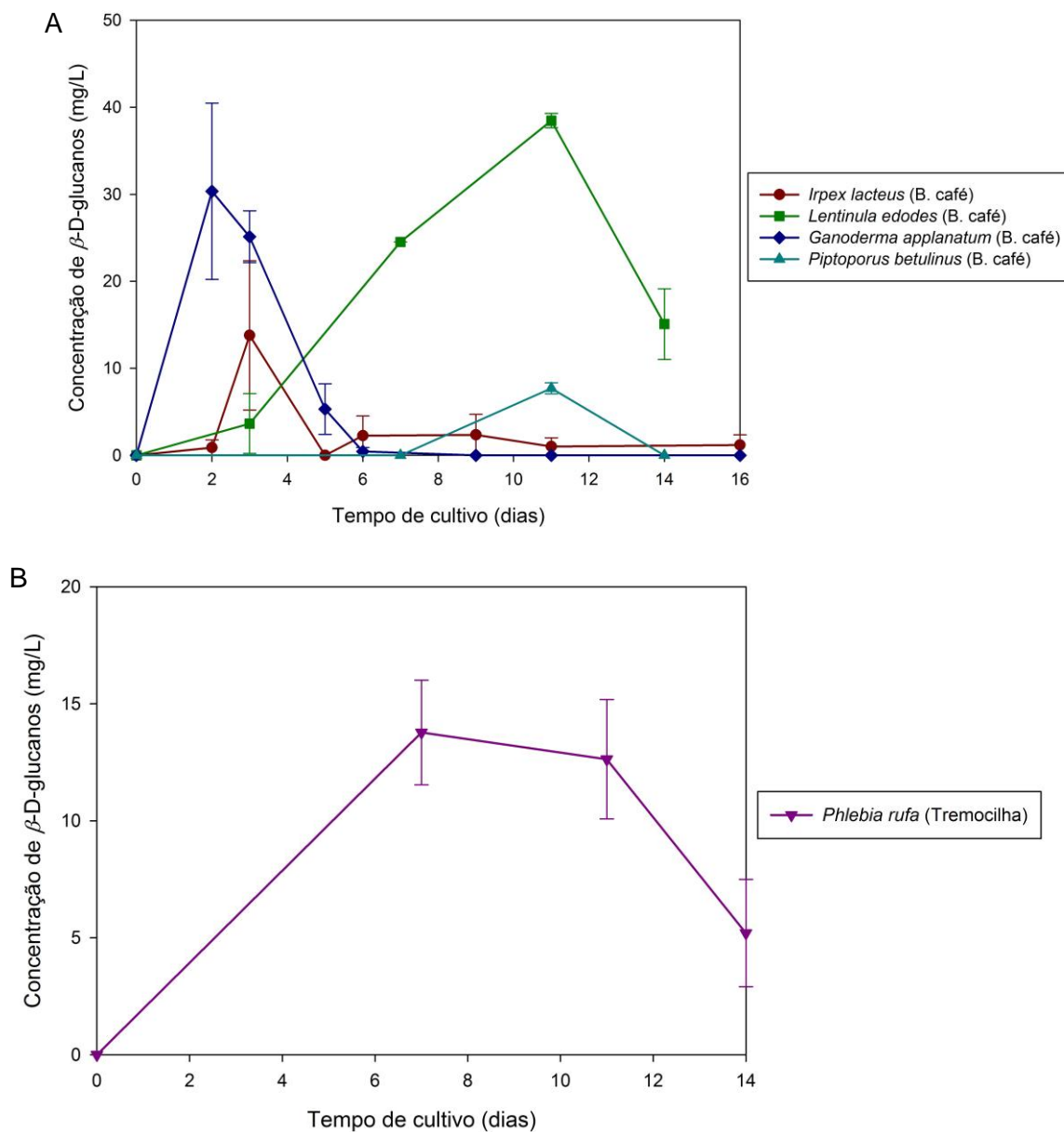


Figura 22- Variação da concentração de β -D-glucanos extracelulares, em função do tempo de cultivo, nos sobrenadantes das culturas dos basidiomicetos cultivados em meio contendo borra de café (A) e tremocilha (B). O método de doseamento utilizado foi o do Congo red.

Através da análise da Figura 22, pode-se observar que as espécies *L. edodes* e *G. applanatum* são as que apresentam melhores resultados quando cultivadas em meio suplementado com borra de café, apesar de serem apresentados perfis distintos de produção dos β -D-glucanos ao longo do tempo de cultivo de cada espécie. A única espécie que produziu β -D-glucanos, quando cultivada em meio suplementado com tremocilha, foi a *P. rufa*. No entanto, as concentrações de β -D-glucanos obtidas neste meio são inferiores às obtidas a partir das culturas em meio com borra de café; razão

pela qual se prosseguiu o trabalho com os meios suplementados com borra de café. De referir também os erros consideráveis associados a algumas determinações, que podem ter sido devido à dificuldade sentida na separação do sobrenadante da cultura da borra de café, podendo esta última ter interferido no doseamento.

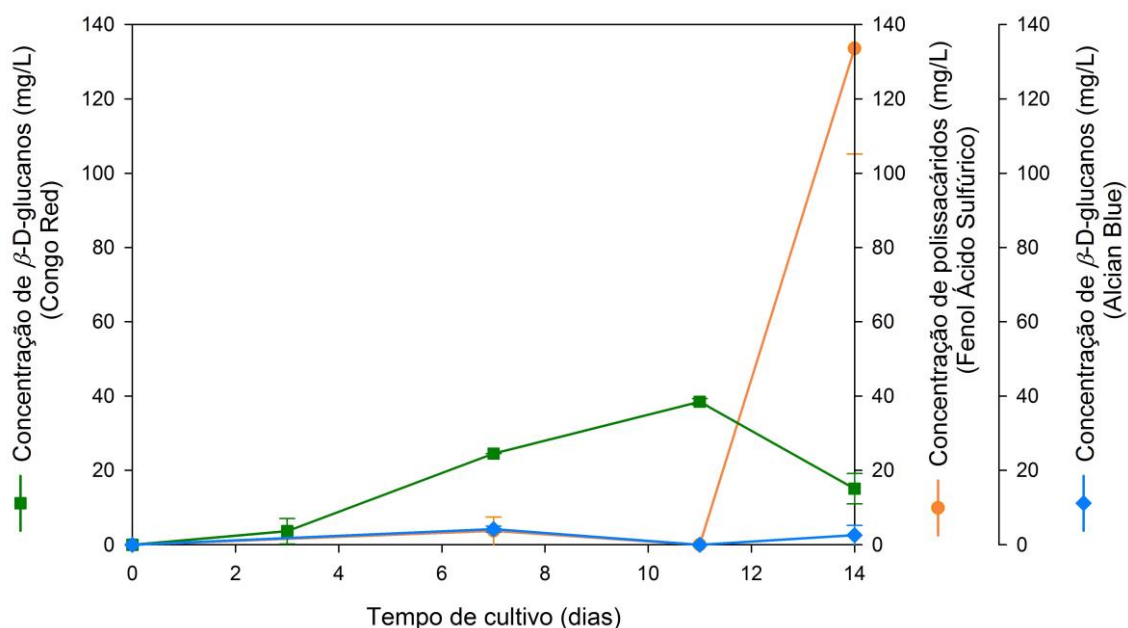


Figura 23- Comparação da concentração de β -D-glucanos e polissacáridos extracelulares, em função do tempo de cultivo, no sobrenadante da cultura de *Lentinula edodes* no meio contendo borra de café.

Na Figura 23, consegue-se observar que a relação entre a concentração de β -D-glucanos, determinada pelo método do corante Congo Red, não segue a mesma variação ao longo do tempo de cultivo que a concentração de polissacáridos totais, obtida através do método do fenol-ácido sulfúrico. A concentração máxima de β -D-glucanos é alcançada ao 11º dia de cultivo, enquanto que os polissacáridos totais atingem o seu valor mais elevado no 14º dia, sugerindo que neste último dia foram produzidos muitos polissacáridos, que a serem β -D-glucanos são destituídos de conformação em tripla hélice. A concentração de β -D-glucanos, determinada através do método do corante Alcian Blue, apresenta um perfil ligeiramente semelhante ao perfil obtido usando o corante Congo Red, contudo com valores inferiores e com uma concentração máxima de β -D-glucanos ao 7º dia e não ao 11º dia de cultivo. Segundo Semedo e colaboradores, o método colorimétrico do Congo Red doseia β -D-glucanos com estrutura em tripla hélice, e segundo os mesmos autores o método do corante Alcian Blue é mais sensível e quantifica β -D-glucanos, independentemente da conformação apresentada (Semedo *et al.*, 2015b; Semedo *et al.*, 2015c). No presente estudo, as concentrações obtidas pelo método do corante Alcian Blue para o sobrenadante de *Lentinula edodes* são surpreendentemente inferiores às obtidas pelo Congo Red. Nos estudos sobre β -D-glucanos intracelulares de basidiomicetos, as concentrações reportadas usando o corante Alcian Blue são apenas para algumas amostras inferiores às obtidas com o corante Congo Red. Estes resultados podem indicar que, nessas amostras das extracções intracelulares, bem como no sobrenadante de *P. rufa* analisado neste trabalho, a concentração de β -D-glucanos acídicos, sulfatados ou neutros é baixa, uma vez que o corante Alcian Blue liga-se a este tipo de compostos. (Semedo *et al.*, 2015b; Semedo *et al.*, 2015c)

Resultados e discussão

Ao mesmo tempo que se determinaram os β -D-glucanos e polissacáridos extracelulares, foram também realizadas extracções dos polissacáridos a partir da biomassa de forma a concluir se os β -D-glucanos se acumulam em concentrações mais elevadas no exterior ou no interior das células. A Tabela 4 apresenta a comparação das concentrações de β -D-glucanos extra e intracelulares produzidos pelas três espécies de basidiomicetos que permitiram obter os melhores resultados, indicando que as concentrações de β -glucanos são superiores no meio extracelular do que intracelularmente.

Tabela 4- Concentrações dos β -glucanos extra e intracelulares, determinadas pelo método do corante Congo red

Espécie	Resíduo agro-industrial	Concentração de β -glucanos (mg/L)				
		Meio de cultura	Fracção água Fria	Fracção água quente	Fracção KOH	Fracção HCL
G. <i>applanatum</i>	Casca Banana	0	0	0	0	0
	Borra Café	2,96x10 ¹ ± 5,79x10 ⁻¹	0	8,04x10 ⁻¹ ± 2,57x10 ⁻¹	1,38± 2,82x10 ⁻¹	3,16± 5,19x10 ⁻¹
G. <i>carosum</i>	Casca Banana	0	0	1,83x10 ⁻¹ ± 1,24x10 ⁻²	4,16± 1,69x10 ⁻¹	9,76± 1,88
	Borra Café	4,26± 1,91	0	1,57± 1,31x10 ⁻²	1,03x10 ¹ ± 8,64	1,83x10 ¹ ± 1,27
L. <i>edodes</i>	Casca Banana	0	0	0	3,46± 4,02x10 ⁻²	7,56± 5,19x10 ⁻¹
	Borra Café	3,85x10 ¹ ± 4,41	0	9,14x10 ⁻¹ ± 2,99x10 ⁻³	1,48x10 ¹ ± 2,97	1,56± 1,96x10 ⁻¹

Comparando os resultados da Tabela 4 com as concentrações de β -glucanos publicadas e determinadas após extracções que foram realizadas segundo o procedimento seguido neste trabalho, a partir de corpos frutificantes ou de micélio fermentado, verifica-se que também que os resultados obtidos são semelhantes aos publicados por Semedo e colaboradores. Estes autores reportaram a produção de β -D-glucanos no micélio de *G. carosum* cultivado em meio suplementado com casca de laranja e nos corpos frutificantes de *L. edodes* (Semedo *et al.*, 2015b). Como os valores apresentados nesse trabalho se encontram em mg/g de biomassa, foi necessário a conversão dos resultados obtidos no presente estudo para essas unidades. Nos meios com borra de café, obtiveram-se as seguintes concentrações de β -D-glucanos: 38,2 e 43,6 mg/ g de biomassa para o *G. carosum* e *L. edodes*, respectivamente, na fracção de água quente; 222,8 e 311,3 mg/g de biomassa para o *G. carosum* e *L. edodes*, respectivamente, na fracção de KOH; e 13,7mg/g de

biomassa para o *G. carnosum* na fracção de HCl, não tendo sido detectados β -D-glucanos nesta fracção para a *L. edodes*.

Tendo em vista a superprodução de β -D-glucanos extracelulares, a partir da fermentação submersa dos basidiomicetos, desenvolveu-se um estudo sistemático para análise dos diferentes factores que afectavam a produção desses compostos (Tabela 5). O planeamento experimental foi conduzido segundo um *design* factorial completo 2^3 , num total de oito ensaios em duplicado. Após a realização dos ensaios experimentais, foi avaliada a significância estatística, o efeito de cada variável e a interacção multivariável na concentração de β -D-glucanos (Tabela 6).

Tabela 5- Níveis factoriais para o *design* completo 2^3 , sendo o nível superior (+) e o inferior (-)

Factores	Níveis	
Espécie de basidiomiceto	<i>L. edodes</i>	+
	<i>G. applanatum</i>	-
Concentração de resíduo	400 g/L	+
	40 g/L	-
Tempo de cultivo	7 dias	+
	3 dias	-

Tabela 6- Análise estatística de variância (ANOVA) para o modelo proposto de produção de β D-glucanos.

Fonte	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	Estatística f (f-value)	Valor de prova (p-value prob>f)
Modelo	3,87x10 ⁴	7	5,53x10 ³	1,34x10 ⁴	<0,0001
A- Espécie	1,13x10 ⁴	1	1,13x10 ⁴	2,74x10 ⁴	<0,0001
B- Concentração do resíduo	1,10x10 ⁴	1	1,10x10 ⁴	2,66x10 ⁴	<0,0001
C- Tempo de cultivo	1,41x10 ²	1	1,41x10 ²	3,41x10 ²	<0,0001
AB	1,30x10 ⁴	1	1,30x10 ⁴	3,16x10 ⁴	<0,0001
AC	2,56x10 ¹	1	2,56x10 ¹	6,21x10 ¹	<0,0001
BC	4,40x10 ¹	1	4,40x10 ¹	1,07x10 ²	<0,0001
ABC	3,23x10 ³	1	3,23x10 ³	7,83x10 ³	<0,0001
Residual	3,30	8	4,10x10 ⁻¹		
Total corrigido	3,87x10 ⁴	15			

R²= 0,9999; CV= 1,62 %; *adequate precision*= 310,74; contribuição de A= 29,17 %; contribuição de B= 28,31 %; e contribuição de C= 0,36 %

Os dados na Tabela 6 resumem a análise estatística de variância (ANOVA) e o *F-value* de 1,34x10⁴ indica que o modelo é significativo e que só existe 0,01% de probabilidade de um *F-value* destes ocorrer por ruído. O coeficiente de determinação R² = 0,9999 indica que existe uma correlação estatística entre a resposta e as variáveis consideradas e que apenas 0,01 % da variação total não é explicada pelo modelo. A análise estatística mostra que os factores significantes para a produção de β -D-glucanos são todos os que foram considerados: a espécie de basidiomiceto (variável A), a concentração de resíduo agro-industrial (variável B), o tempo de cultivo (variável C) e as interacções entre as variáveis AB, AC, BC e ABC. No entanto, a espécie de basidiomiceto, a concentração de resíduo e a interacção entre a espécie e

Resultados e discussão

o resíduo agro-industrial são as exercem maior efeito. Foi ainda obtida a seguinte equação empírica, que possibilitou estimar a concentração de β -D-glucanos:

$$y = 39,77 - 26,57x_A + 26,18x_B - 2,97x_C - 28,53x_{AB} + 1,27x_{AC} - 1,66x_{BC} + 14,21x_{ABC}$$

sendo: y a concentração de β -D-glucanos, A a espécie de basidiomiceto, B a concentração de resíduo agro-industrial e C o tempo de cultivo. Esta equação permitiu obter os gráficos de superfície representados nas Figuras 24 e 25.

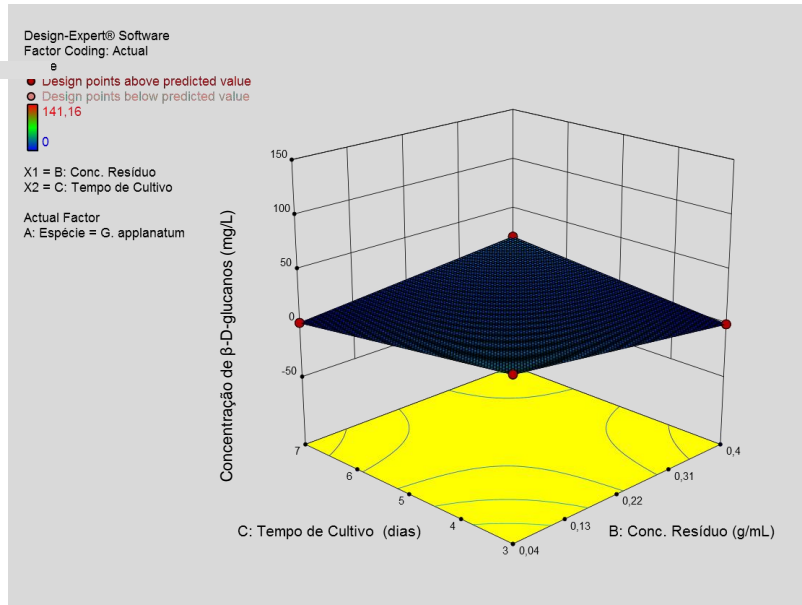


Figura 24- Representação tridimensional da interação do tempo de cultivo e da concentração de borra de café na concentração de β -D-glucanos extracelulares produzidos por *G. applanatum*

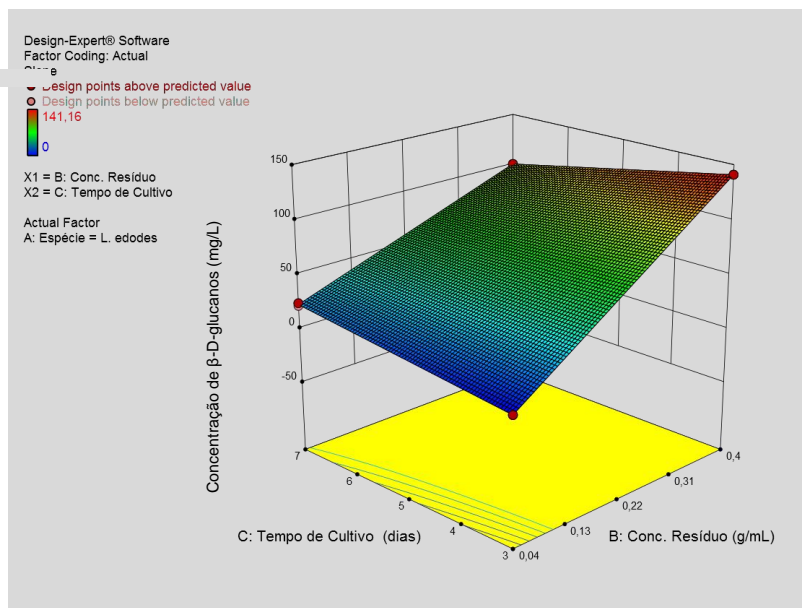


Figura 25- Representação tridimensional da interação do tempo de cultivo e da concentração de borra de café na concentração de β -D-glucanos extracelulares produzidos por *L. edodes*

As representações das Figuras 24 e 25 reflectem o efeito que os factores otimizados exercem na produção de β -D-glucanos durante a fermentação.

A cultura de *L. edodes* em meio com 400 g/L de borra de café foi a que permitiu obter o valor mais elevado de concentração de β -glucanos extracelulares (141,16 mg/L), ao 3º dia de fermentação, como tal foi a cultura seleccionada para os estudos seguintes.

3.2. Fluorescência

Atendendo à falta de publicações sobre fluorescência de polissacáridos, isolados de basidiomicetos, sem o recurso a fluorocromos extrínsecos, decidiu-se investigar a fluorescência intrínseca dos compostos produzidos.

Para tal, inicialmente foi avaliada a sensibilidade ou ganho (*gain*) do leitor de microplacas. Nestes ensaios, utilizou-se uma amostra de polissacáridos extracelulares extraídos de cultura de *L. edodes* cultivada em 400 g/L de borra de café, seguindo-se o procedimento descrito na secção dos Materiais e Métodos. O ganho do equipamento foi analisado entre os 1800 e 2200 e os resultados encontram-se representados na Figura 26.

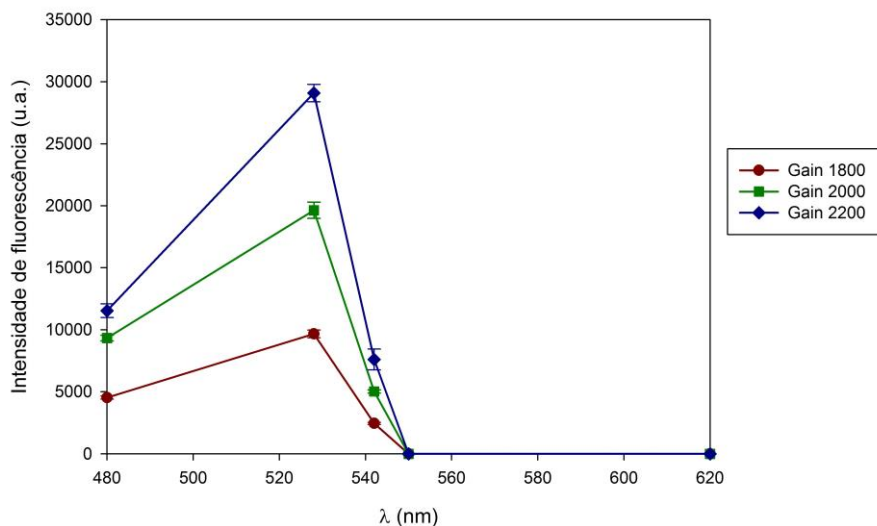


Figura 26- Correlação da intensidade de fluorescência dos polissacáridos extracelulares de *L. edodes* com o comprimento de onda de emissão resultante da alteração do ganho obtida no leitor de microplacas. O comprimento de onda de excitação foi de 420 nm.

Nesta figura, pode-se observar um aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da sensibilidade, sendo que a sensibilidade que permitiu obter valores mais elevados de intensidade de fluorescência foi a de 2200, pelo que foi seleccionada para os ensaios seguintes.

Posteriormente, foram analisadas amostras de polissacáridos extracelulares, previamente extraídos de *L. edodes* e para efeitos comparativos foi também analisado o β -D-glucano de cevada, de origem comercial. Os resultados de fluorescência destas amostras encontram-se representados nas Figuras 27 e 28.

Resultados e discussão

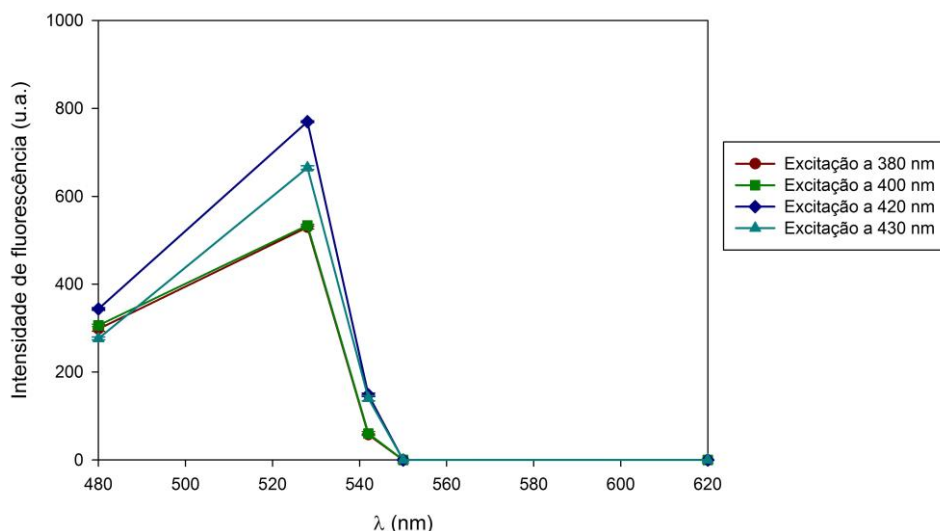


Figura 27- Intensidade de fluorescência dos polissacarídeos extracelulares de *L. edodes*. Os resultados foram obtidos num leitor de microplacas, a diferentes λ_{exc} e com os filtros de emissão de 480, 528, 542, 550 e 620 nm instalados.

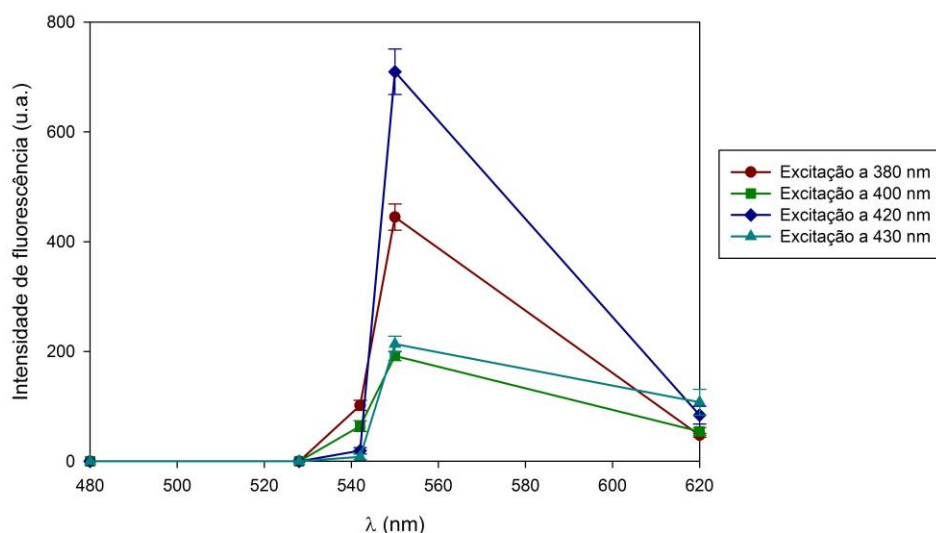


Figura 28- Intensidade de fluorescência do β -D-glucano comercial de cevada. Os resultados foram obtidos num leitor de microplacas, a diferentes λ_{exc} e com os filtros de emissão de 480, 528, 542, 550 e 620 nm instalados.

Através da análise destas figuras, verifica-se um máximo de emissão fluorescente da amostra de polissacarídeos extracelulares extraídos de *L. edodes* a 528 nm com excitação a 420 nm. Enquanto que o β -D-glucano de cevada apresenta após excitação a 420 nm um máximo de emissão a 550 nm. Esta diferença de emissão das duas amostras analisadas, pode ser explicada pelo facto dos β -glucanos presentes em cada uma das amostras serem distintos, o que se traduz em intensidades máximas de emissão detectadas a comprimentos de onda diferentes quando excitadas a igual comprimento de onda.

Estudou-se também num leitor de microplacas, a fluorescência resolvida no tempo dos polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes* e do β -glucano de cevada. O tempo de integração de leitura foi variado, conforme a representação da Figura 29.

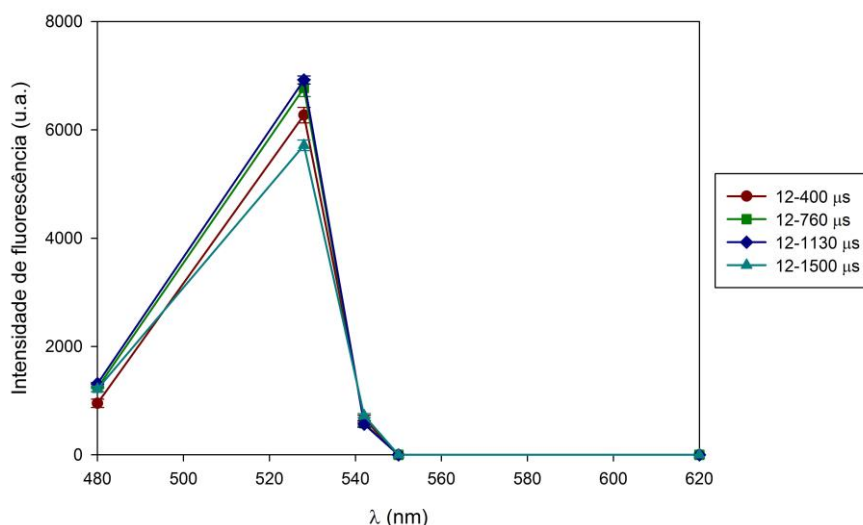


Figura 29- Correlação da intensidade de fluorescência e o comprimento de onda de emissão resultante da alteração do intervalo do tempo de integração, obtida no leitor de microplacas, ($\lambda_{exc} = 420$ nm).

Como se pode observar na figura anterior, a intensidade de fluorescência máxima de emissão mantém-se a 528 nm, como verificado anteriormente, e também não há diferenças significativas na intensidade de fluorescência com a alteração do intervalo de integração. Como não se verificam quaisquer diferenças entre os resultados obtidos por este método com os da medição da intensidade de fluorescência directa, pelo que não se utilizou mais este método nas determinações posteriores.

Adicionalmente, estas amostras foram analisadas por espectroscopia de fluorescência síncrona, num espectrofluorímetro. Os espectros de fluorescência síncrona (espectros 3D) obtidos relacionam comprimentos de onda de emissão, de excitação e intensidade de fluorescência (Figuras 30 e 31). As figuras seguintes incluem também os espectros dos respectivos ensaios em branco, por não ter sido possível obter os espectros 3D corrigidos.

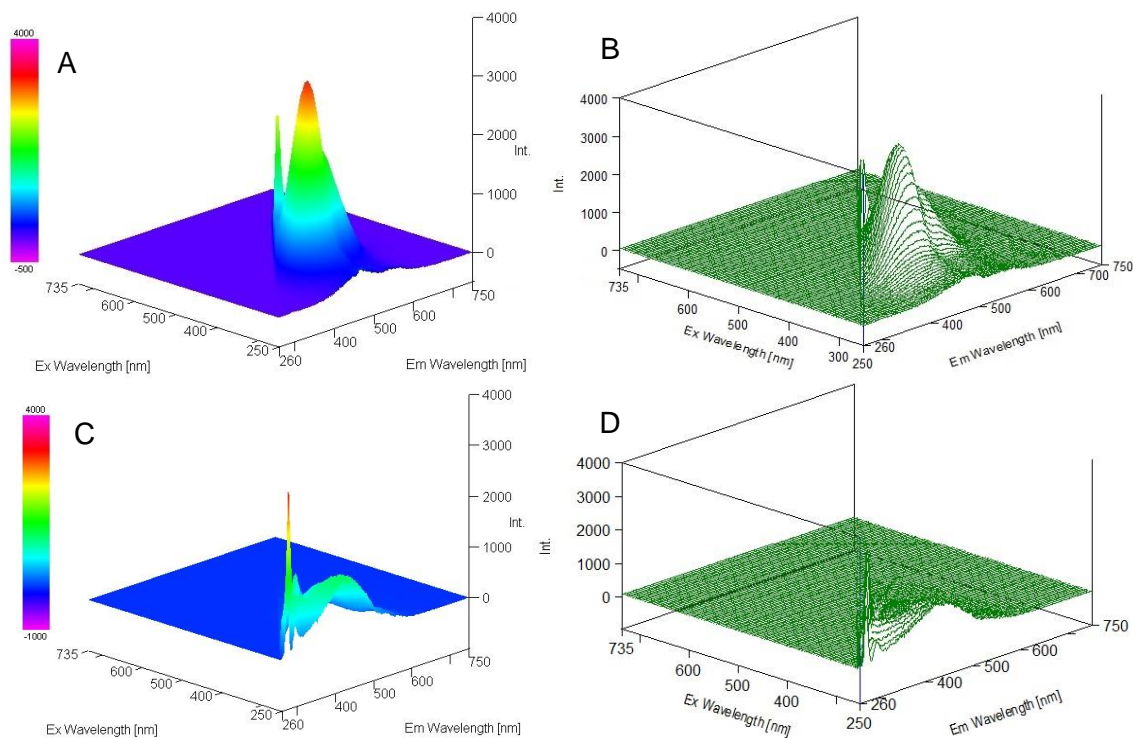


Figura 30- Espectros de fluorescência 3D de polissacarídeos extracelulares extraídos de *L. edodes* (A e B) e do tampão fosfatos 50 mM, 1 M NaCl, pH 8 (C e D), variando o comprimento de onda de excitação entre 250-735 nm e o comprimento de onda de emissão entre 260-750 nm.

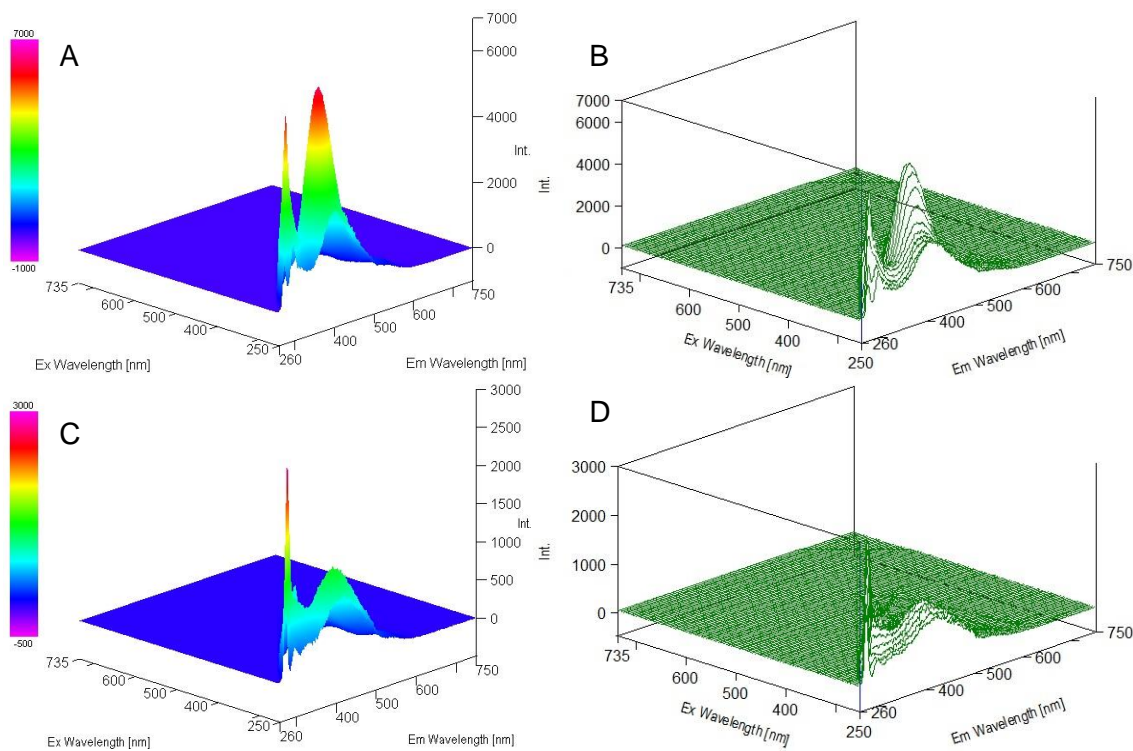


Figura 31- Espectros de fluorescência 3D de β -D-glucano comercial de cevada (A e B) e água desionizada (C e D), variando o comprimento de onda de excitação entre 250-735 nm e o comprimento de onda de emissão entre 260-750 nm.

Numa primeira análise, observa-se que o tampão fosfatos não interfere significativamente no espectro dos polissacáridos de *L. edodes*, pelo facto da solução tampão exibir emissão a comprimentos de onda diferentes dos polissacáridos. No que respeita ao espectro do β -D-glucano de cevada, a emissão a 300 nm e a 420 nm, com excitação entre 290 e 380 nm, parece estar claramente afectada pela presença da água.

Tendo em vista, a comparação dos resultados de fluorescência adquiridos no leitor de microplacas com os do espectrofluorímetro, a partir dos espectros anteriores extraíram-se os espectros síncronos, com $\Delta\lambda = 90$ nm, $\Delta\lambda = 128$ nm e $\Delta\lambda = 130$ nm (Figura 32 e 33)

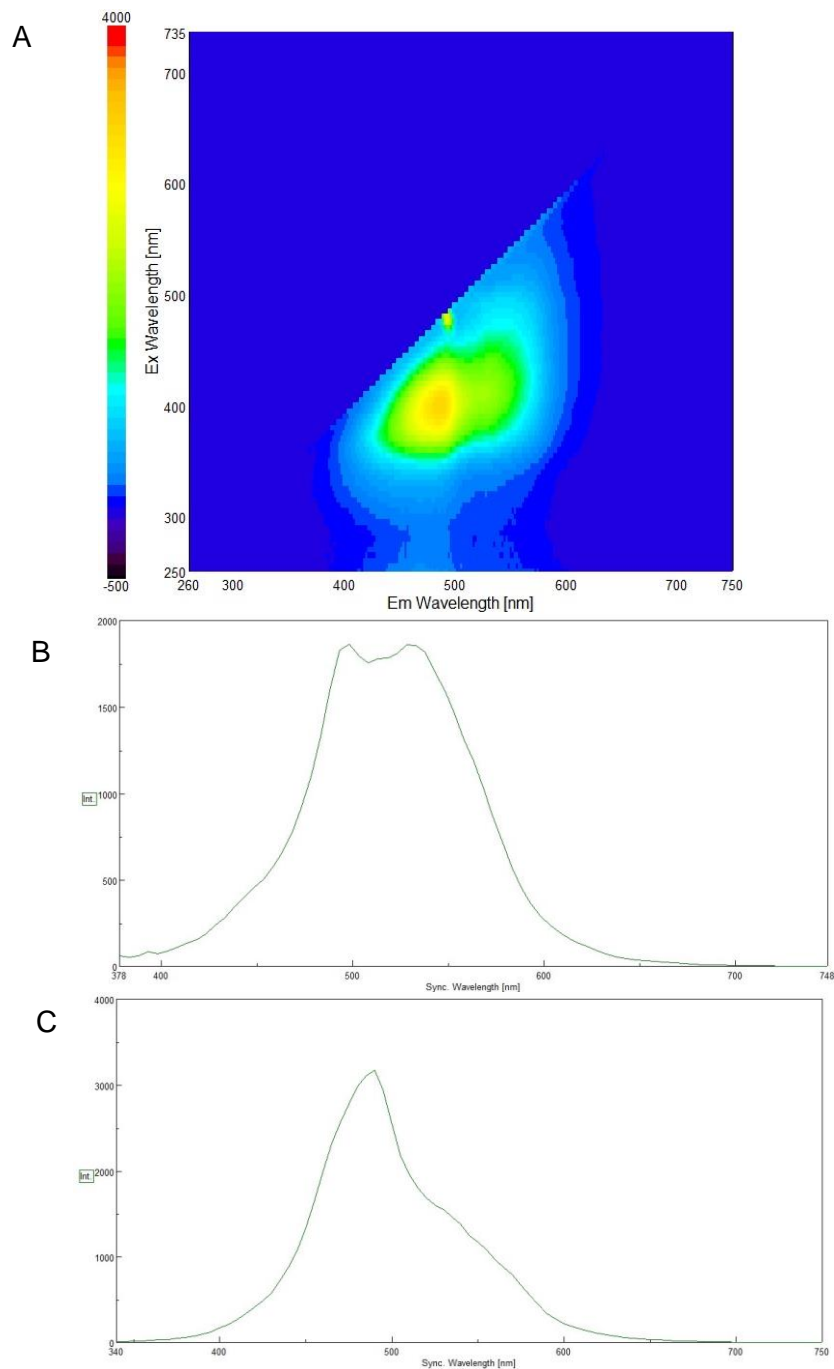


Figura 32- Representação por contorno (A) e espectros síncronos com $\Delta\lambda = 128$ nm (B) e $\Delta\lambda = 90$ nm (C) de polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes*.

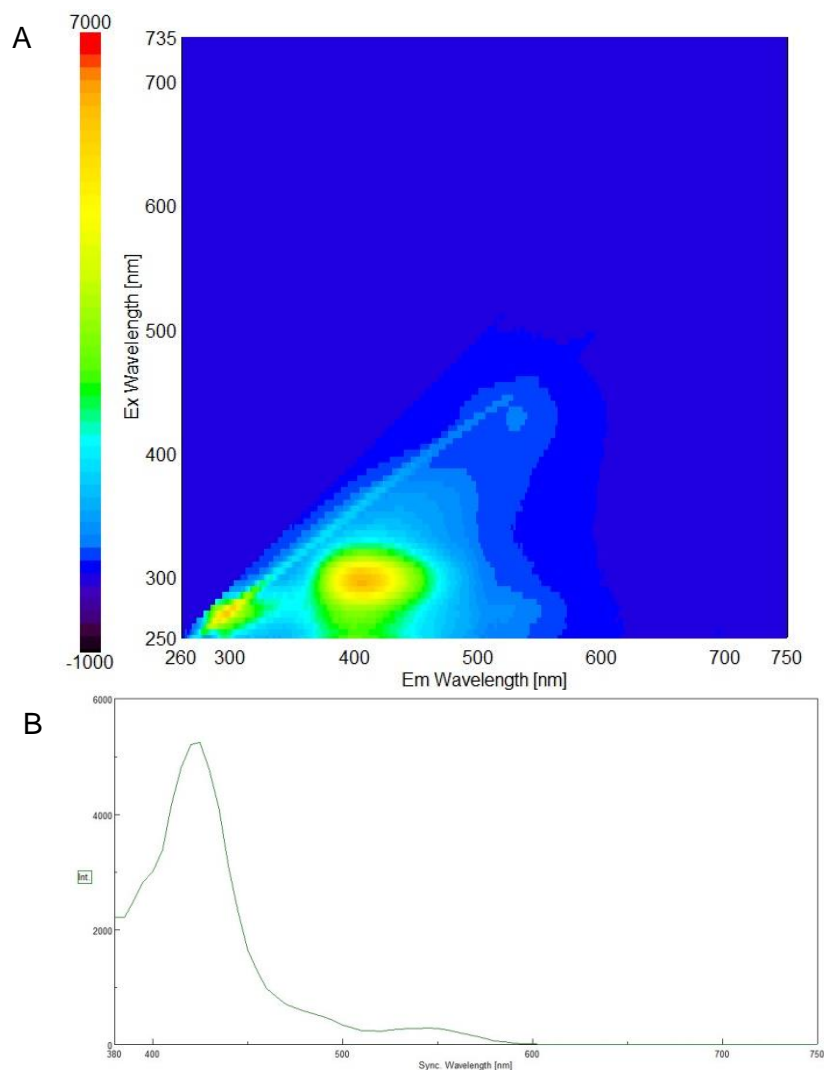


Figura 33- Representação por contorno (A) e espectro síncrono com $\Delta\lambda = 130$ nm (B) de β -D-glucano de cevada.

No espectro da Figura 32B, consegue-se observar um máximo de intensidade de fluorescência ao comprimento de onda de emissão de 528 nm. Como o $\Delta\lambda$ de 128 nm, correspondente a esse espectro, indica que num comprimento de onda de 528 nm a excitação é realizada a 400 nm, estes resultados estão de acordo com os obtidos no leitor de microplacas para os polissacáridos de *L. edodes*.

Posteriormente, modificou-se o $\Delta\lambda$ do espectro da amostra até se obter o espectro com o valor mais elevado de intensidade de fluorescência, tendo sido verificado com um $\Delta\lambda$ de 90 nm (Figura 32C). Neste espectro, observa-se um máximo de intensidade de fluorescência ao comprimento de onda de emissão de 490 nm, correspondendo a uma excitação de 400 nm, o que sugere que a emissão máxima de fluorescência com excitação a 400 nm devia ter sido detectada no leitor de microplacas a 480 nm.

Ao analisar o espectro da Figura 33B entre 470-630 nm de emissão observa-se um máximo de intensidade de fluorescência a 550 nm, o que corresponde a um comprimento de onda de excitação de 420 nm, e que confirma os resultados no leitor de microplacas. Contudo, quando se analisa o espectro na sua globalidade, o máximo de emissão verifica-se a 425 nm, que corresponde a uma excitação a 295 nm. Pelo facto de não existirem no laboratório os filtros correspondentes a esses comprimentos

de onda, não foi possível comparar estes resultados com os obtidos no leitor de microplacas.

De seguida, foi estudada a dependência da fluorescência em função da concentração de β -glucanos presentes na amostra. Devido à quantidade limitada de polissacáridos extracelulares de *L. edodes* obtida a partir das fermentações realizadas, optou-se por realizar este estudo com as amostras das fracções de KOH, extraídas dos corpos frutificantes *A. blazei*, *C. versicolor*, *I. obliquus* e *L. edodes*. As fracções de KOH foram as seleccionadas para estes ensaios por serem as que exibiam concentrações de polissacáridos mais elevadas em relação às restantes fracções. (Semedo *et al.* 2015b).

A Figura 34 ilustra a dependência linear da intensidade de fluorescência em relação à concentração de β -D-glucano na fracção KOH de *L. edodes*.

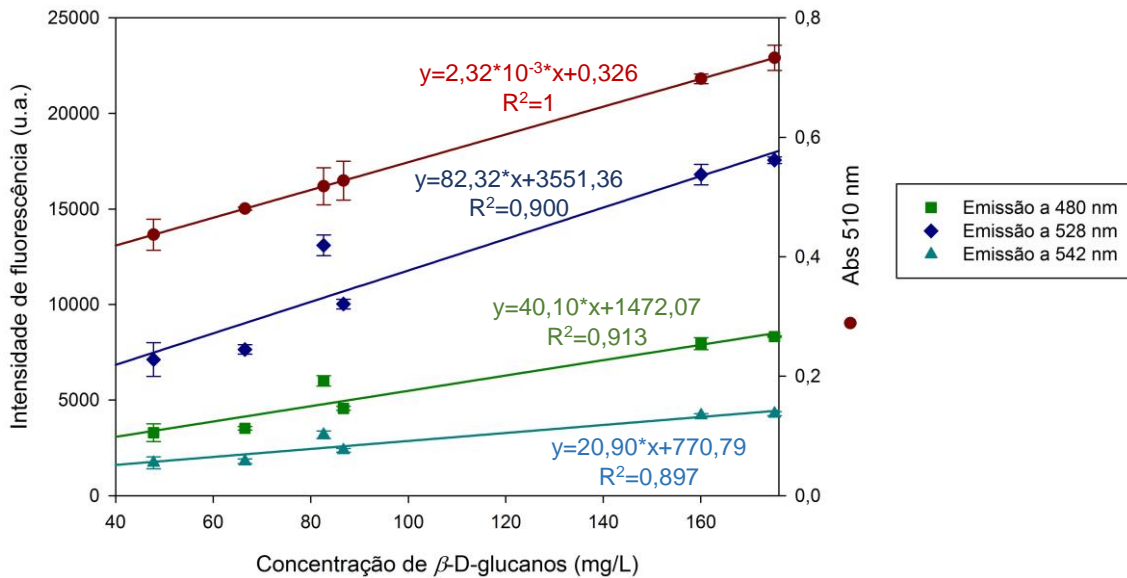


Figura 34- Efeito da concentração dos β -D-glucanos da fracção de KOH de *L. edodes* na intensidade de fluorescência, obtida a diferentes comprimentos de onda, num leitor de microplacas ($\lambda_{exc} = 420$ nm).

Na Figura 34, pode-se observar um aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de β -glucanos, indicando assim que neste caso a intensidade de fluorescência é dependente da concentração dos β -glucanos. Na mesma figura, está também representada a variação da absorvância a 510 nm, obtida pelo método do corante Congo red, com a concentração de β -glucanos para se comparar a linearidade dos ensaios.

Os ensaios de emissão a 480 nm são os que permitiram obter maior linearidade da intensidade de fluorescência com a concentração de β -D-glucanos de *L. edodes* e os ensaios de emissão a 528 nm são os que resultaram num maior declive da recta ajustada, portanto numa maior sensibilidade para a detecção dos β -D-glucanos.

Para as amostras de *A. blazei*, *C. versicolor* e *I. obliquus* não se verificou um aumento da intensidade de fluorescência com a concentração de β -glucanos, o que indicia que não existem polissacáridos com fluorescência presentes na fracção estudada. Esses polissacáridos podem eventualmente existir noutras fracções da extracção intracelular e/ou do meio extracelular, ou não serem de todo produzidos pelas espécies fúngicas em análise.

3.3. Fosforescência

Como não são conhecidos estudos de fosforescência de polissacáridos, sem recurso a corantes fosforescentes, analisou-se também a fosforescência das amostras anteriormente estudadas por fluorescência. As Figuras 35 e 36 apresentam os espectros de fosforescência dos polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes*, cultivada por fermentação submersa com uma concentração de 400 g/L de borra de café, e do β -D-glucano de cevada, de origem comercial.

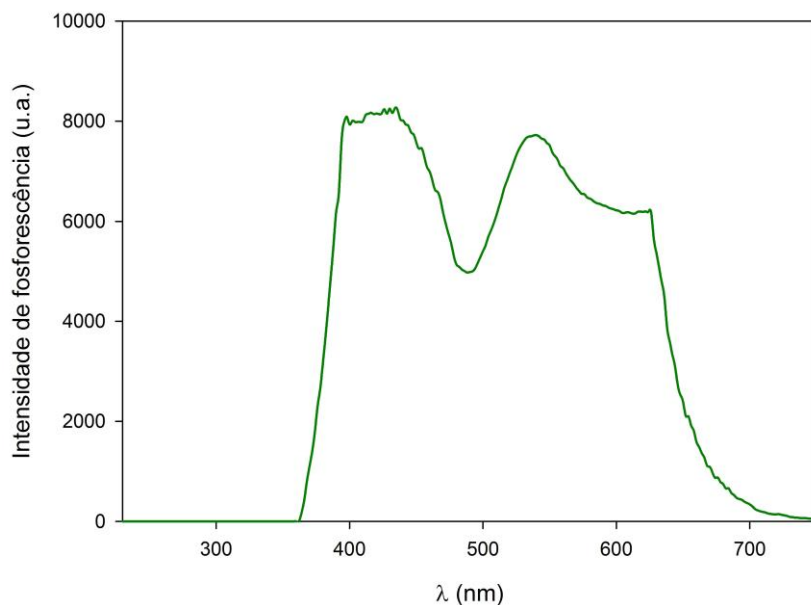


Figura 35- Espectro de fosforescência de polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes* ($\Delta\lambda= 20$ nm).

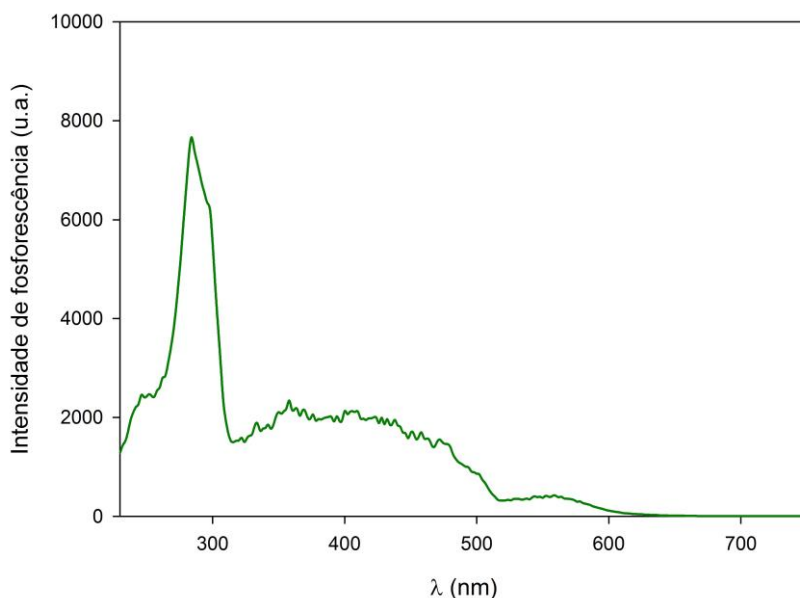


Figura 36- Espectro de fosforescência de β -glucanos de cevada ($\Delta\lambda= 20$ nm).

Como se pode observar, ambas as amostras emitem fosforescência. O espectro dos polissacáridos precipitados de *L. edodes* apresenta intensidades máximas de fosforescência próximas de 400 nm e de 518 nm, enquanto que o espectro do β -D-glucano de cevada exibe uma intensidade máxima a 284 nm.

Foi também realizada a medição da fosforescência resolvida no tempo (Figuras 37 e 38).

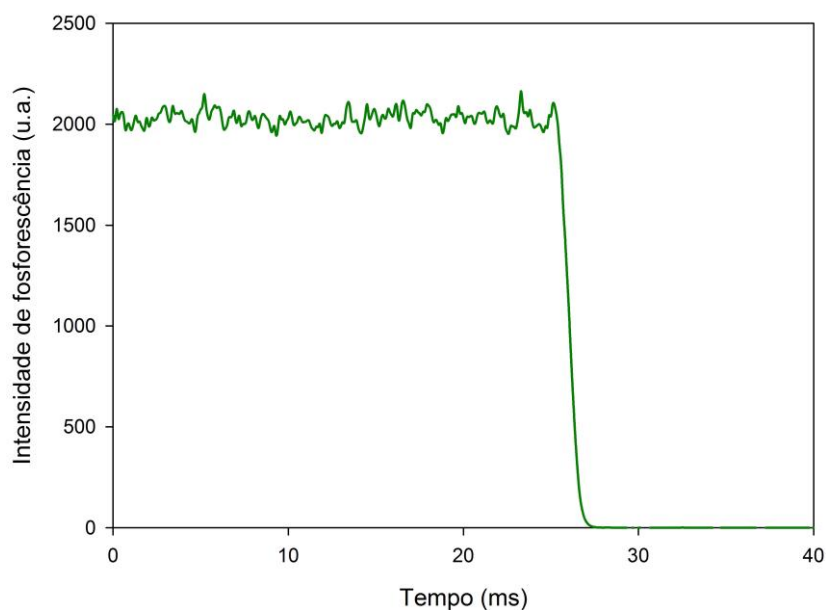


Figura 37- Curva de decaimento de fosforescência de polissacarídeos extraídos de *L. edodes* ($\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$).

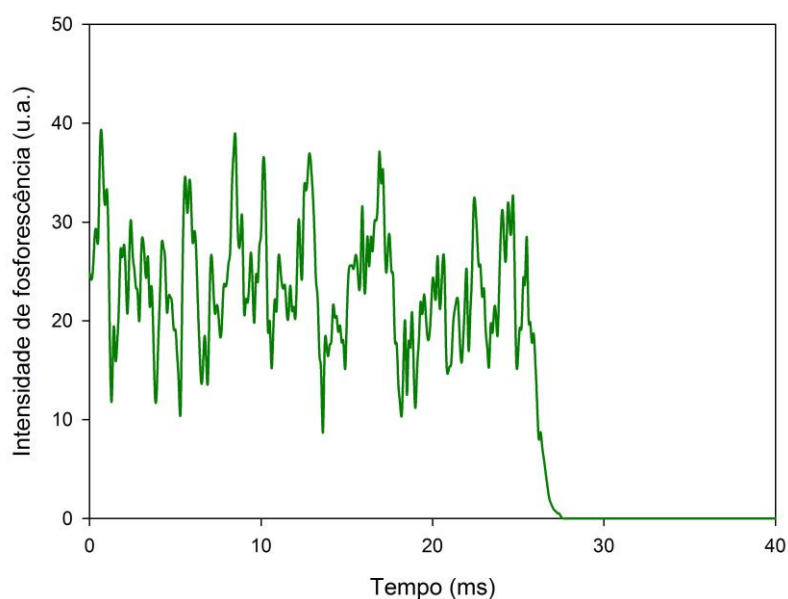


Figura 38- Curva de decaimento de fosforescência de β -glucano comercial de cevada ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$).

Verifica-se que as curvas de decaimento de fosforescência dos polissacarídeos extracelulares de *L. edodes* e do β -D-glucano comercial de cevada são semelhantes, diferindo apenas nas intensidades de fosforescência.

3.4. Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado

Numa primeira fase foram testadas diversas resinas cromatográficas com diferentes metais de transição imobilizados, a pH 8, tendo sido obtidos os resultados apresentados na Tabela 7. O comportamento cromatográfico dos β -D-glucanos extracelulares extraídos de *L. edodes*, cultivada em meio suplementado com 400 g/L de borras de café, demonstra que a adsorção desses β -D-glucanos às colunas de IMAC é afectada por diversos factores tais como: o tamanho do braço espaçador, o ligando e o metal.

Tabela 7- Comportamento cromatográfico em quelatos de metal imobilizado dos β -D-glucanos extracelulares extraídos de *L. edodes*, cultivada em meio contendo borras de café.

Fase estacionária	pH da coluna	Cu(II)-IDA	Ni(II)-IDA	Co(II)-IDA	Zn(II)-IDA
Sepharose 6B- EDB (R1)	8	±	-	-	±
Sepharose 6B- EPI (R2)	8	-	-	-	±
Sepharose 4B- EDB (R3)	8	±/-	-	-	±
Sepharose 4B- EPI (R4)	8	+	±	-	±
Fase estacionária	pH da coluna	Cu(II)-NTA	Ni(II)-NTA	Zn(II)-NTA	Co(II)-NTA
Sepharose 6B- EDB (R5)	8	-	-	-	-
Sepharose 6B- EPI (R6)	8	±	-	-	-

(+) representa adsorção dos β -D-glucanos na resina;

(±) representa adsorção parcial dos β -D-glucanos na resina;

(-) representa a não adsorção dos β -D-glucanos na resina, uma vez que a massa total de β -D-glucanos foi recuperada nas quatro fracções de lavagem.

O sombreado indica que o metal não ficou imobilizado na fase estacionária.

Os β -D-glucanos foram determinados pelo método do corante Congo red e as corridas cromatográficas foram conduzidas de acordo com o descrito nos Materiais e Métodos.

Até à data, não são conhecidos estudos que reportem o uso de metais de transição nem destas fases estacionárias para o fraccionamento de polissacáridos, apenas se tem conhecimento do uso recente de colunas de IMAC com iões lantanídeos imobilizados (Schemeth *et al.*, 2013).

Os braços espaçadores longos, como o éter diglicidil butan-1,4-diol (EDB) aumentam a adsorção de anticorpos monoclonais bem como de proteínas contaminantes (Martins *et al.*, 2006). No caso dos β -D-glucanos e com Cu(II) imobilizado na matriz, também se verifica uma adsorção mais elevada em R1 comparativamente com R2 que tem um braço espaçador de epicloridrina, portanto mais curto. No entanto, obtém-se um resultado contrário quando se compara R3 com R4; e R5 com R6. Neste estudo, foram analisados dois ligandos, um tridentado, o IDA e outro tetradentado, o NTA. Segundo Gaberc-Poreka e colaboradores, o IDA é o agente quelante mais utilizado em IMAC e o NTA, que tem maior afinidade para os metais, apresenta menor capacidade de ligação das proteínas, devido à perda de um centro de coordenação. De acordo com a Tabela 6, surpreendentemente não foi possível imobilizar na fase estacionária os metais Ni(II), Zn(II) e Co (II) quando se utilizou o NTA como ligando (Gaberc-Porekar *et al.*, 2001).

Através da análise da mesma tabela, pode-se observar que os metais que adsorvem melhor os polissacáridos são $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$, o que não é concordante com o reportado para a adsorção de proteínas, quando o ligando usado é o IDA (Gaberc-Porekar *et al.*, 2001).

Os β -D-glucanos de *L. edodes* demonstraram adsorção à fase estacionária Sepharose 4B-EPI- Cu^{2+} (pH 8). Quando foi utilizada esta fase estacionária com Cu (II) imobilizado, não foram detectados β -D-glucanos nas fracções da lavagem, contudo só foram recuperados nas fracções da eluição aproximadamente 60% dos β -D-glucanos inicialmente aplicados. Para o IMAC em coluna, seleccionou-se então a resina R3 de Sepharose 4B-EDB-IDA com Cu(II) imobilizado, por ser das fases estacionárias testadas, a que permitiu uma recuperação total dos β -D-glucanos, apesar da sua adsorção parcial.

A resina seleccionada foi empacotada numa coluna e após imobilização do metal Cu(II) e equilíbrio, os β -D-glucanos extracelulares de *L. edodes* foram fraccionados, como descrito nos Materiais e Métodos. Durante a corrida cromatográfica foram recolhidas fracções de 2 mL, que foram analisadas pelo método do corante Congo red, por fluorescência e absorvância a 280 nm. As Figuras 39 e 40 apresentam os perfis cromatográficos obtidos.

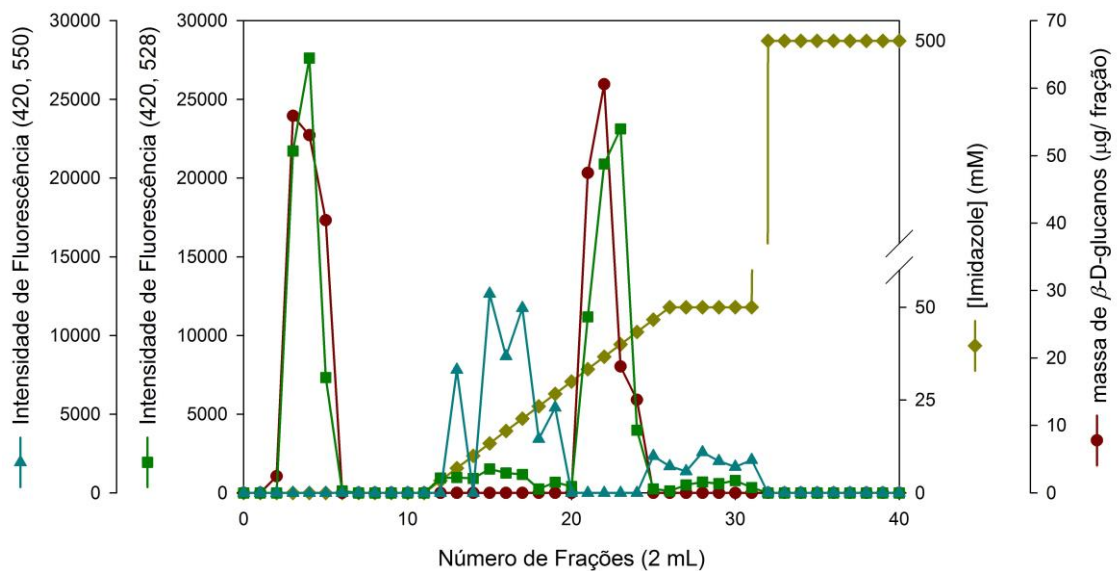


Figura 39- Perfil cromatográfico de polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes*. Os polissacáridos foram aplicados à coluna empacotada com Sepharose 4B-EDB-Cu(II) a pH 8 e foram eluídos com um gradiente linear de imidazole de 0-50 mM, seguido de 50 mM e 500 mM de imidazole, no sistema tampão descrito nos Materiais e Métodos. As fracções cromatográficas foram analisadas por fluorescência e a concentração de β -D-glucanos foi determinada pelo método do corante Congo red.

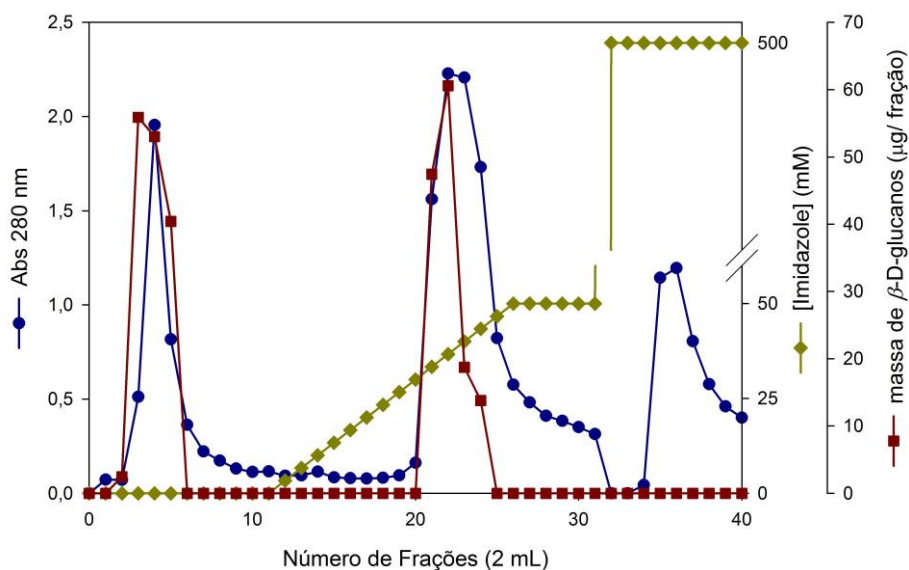


Figura 40- Perfil cromatográfico de polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes*. Os polissacáridos foram aplicados à coluna empacotada com Sepharose 4B-EDB-Cu(II) a pH 8 e foram eluídos com um gradiente linear de imidazole de 0-50 mM, seguido de 50 mM e 500 mM de imidazole, no sistema tampão descrito nos Materiais e Métodos. As frações cromatográficas foram analisadas pelo método do corante Congo red e a presença de proteínas foi avaliada pela Abs 280nm.

Através da análise de ambos os cromatogramas, consegue-se observar que os β -D-glucanos foram detectados tanto nas frações de lavagem como nas frações de eluição, o que está de acordo com os resultados do comportamento cromatográfico discutidos anteriormente. Verifica-se também que o gradiente de imidazole de 0-50 mM foi suficiente para eluir os β -D-glucanos adsorvidos. Desta forma, e devido à existência de dois picos bem separados, parece ser possível fracionar β -D-glucanos por IMAC com Cu(II) imobilizado. De referir, que as frações referentes aos dois picos considerados apresentam absorvância a 280 nm, indicando a presença de proteínas e que sugere que esses β -D-glucanos estão na forma de complexos proteína-polissacáridos ou na presença de proteínas livres contaminantes.

Numa análise mais detalhada do cromatograma da Figura 39, pode-se observar um perfil da intensidade de fluorescência a 528 nm diferente do da massa de β -D-glucanos. A intensidade de fluorescência a 528 nm é maior nas frações de lavagem, enquanto que a massa de β -D-glucanos é ligeiramente superior nas frações de eluição. Observa-se também emissão fluorescente a 550 nm das frações do início do gradiente de eluição, frações essas que não apresentam β -D-glucanos. Uma possível explicação pode dever-se à eventual presença de algumas proteínas contaminantes que emitam fortemente nesse comprimento de onda.

No cromatograma da Figura 40, a absorvância a 280 nm apresenta um perfil semelhante ao da massa de β -D-glucanos, reforçando a hipótese da presença de complexos proteína-polissacárido.

3.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Após a realização da cromatografia de afinidade com Cu(II) imobilizado dos polissacáridos extracelulares de *L. edodes*, verificou-se a necessidade de complementar a caracterização de algumas fracções cromatográficas por espectroscopia de FTIR. Os espectros obtidos encontram-se na Figura 41.

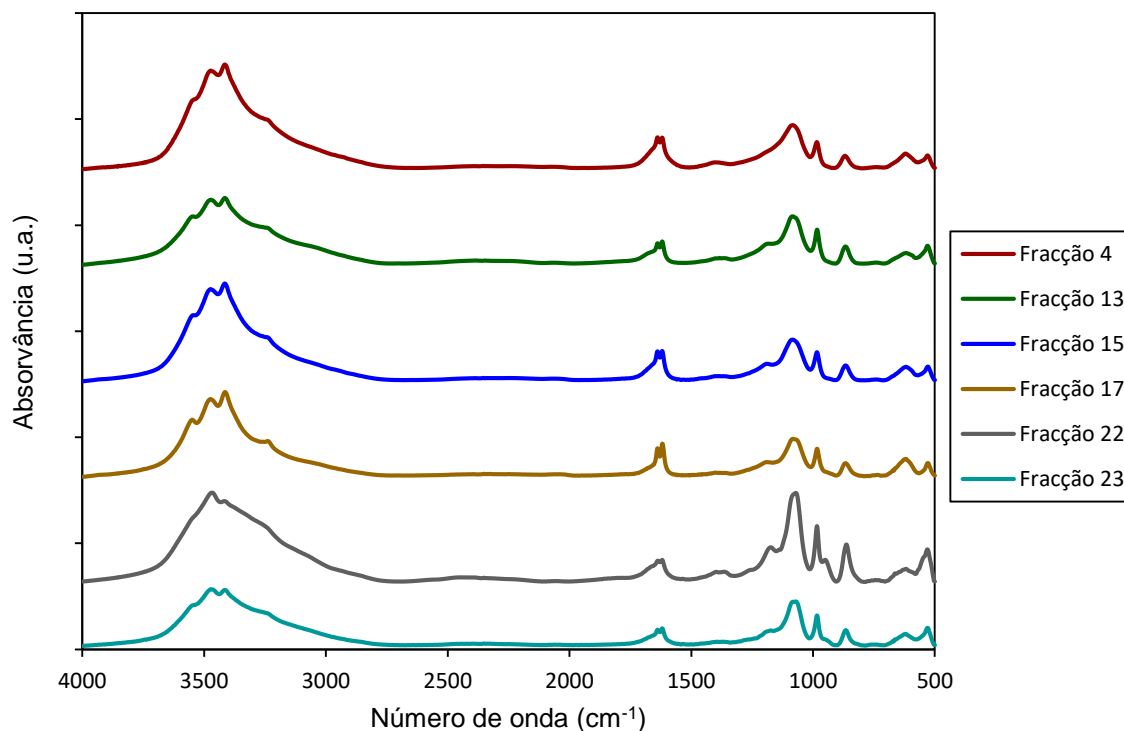


Figura 41- Espectros de FTIR das fracções seleccionadas do IMAC dos polissacáridos extracelulares extraídos de *L. edodes*.

As fracções analisadas apresentam algumas bandas de absorção características dos polissacáridos. A banda forte a 3474 cm^{-1} é devida à vibração de extensão da ligação O-H. Esta banda larga centrada próximo dos 3300 cm^{-1} é particular dos hidratos de carbono. Kozarski e colaboradores descreveram no espectro de *Ganoderma applanatum* uma banda larga a $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, relativa à vibração de extensão O-H nas ligações de hidrogénio e à vibração de N-H (Kozarski et al., 2012).

Também são observadas nos espectros, uma banda a 1638 cm^{-1} , referente à vibração de alongamento do grupo C=O da amida I e a banda a 1619 cm^{-1} de deformação da ligação NH e da extensão C-N da amida II, que sugerem a presença de proteínas. Destacam-se ainda as bandas de absorção características da deformação C-O-C (1180 cm^{-1}), da vibração do C anomérico dos hidratos de carbono (1080 cm^{-1}) e da conformação β dos hidratos de carbono (865 cm^{-1}), que evidenciam a existência de β -D-glucanos em todas as fracções. Nos espectros da Figura 41, não se observa a banda característica das proteínas conjugadas com glucanos, próxima de 1250 cm^{-1} , sugerindo que as proteínas e os polissacáridos existentes nas fracções se encontram na forma livre.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho envolveu a otimização de meios de cultivo, contendo resíduos agro-industriais, para maximizar a produtividade de β -glucanos intra e extracelulares de basidiomicetos. A concentração de β -glucanos mais elevada (141,16 mg/L), determinada pelo método do corante Congo red, foi obtida após extração dos polissacáridos do caldo fermentativo da cultura de *Lentinula edodes* em meio contendo 400 g/L de borra de café. Estes compostos foram detectados em maiores concentrações nas amostras precipitadas a partir do caldo fermentativo do que nas amostras das extrações da biomassa micelial. Como trabalho futuro, será de grande interesse o cultivo de *Lentinula edodes* no meio contendo borra de café num sistema controlado, como um fermentador de laboratório, para superprodução de β -glucanos.

Tendo em vista a caracterização estrutural dos β -glucanos produzidos, é de extrema importância desenvolver um esquema de purificação adequado para estes compostos. Desta forma, neste trabalho, foi estudado o comportamento cromatográfico dos β -glucanos de *L. edodes* em quelatos de metais de transição imobilizados. A cromatografia de afinidade com metal imobilizado é uma técnica poderosa que apresenta diversas vantagens tais como baixo custo, facilidade de regeneração e elevada estabilidade, pelo que tem sido vastamente utilizada para purificação de proteínas, contudo é de todo o interesse alargar esta técnica cromatográfica também à purificação de β -glucanos. A adsorção dos β -glucanos às matrizes de IMAC foi influenciada pelo tamanho do braço espaçador, tipo de ligando e metal. O perfil cromatográfico desses compostos numa coluna de IMAC, empacotada com Sepharose 4B-EDB-IDA- Cu^{2+} , a pH 8, demonstrou que é possível fraccionar os β -glucanos extracelulares de *Lentinula edodes*. As fracções recolhidas foram analisadas pelo método do corante Congo red, por espectroscopia de absorção UV-Vis, fluorescência e FTIR. No entanto, a caracterização dos β -glucanos fraccionados deverá ser complementada com estudos futuros por ELISA, HPLC, GC-MS e NMR. Por último, as propriedades de fluorescência e fosforescência dos β -glucanos observadas neste trabalho devem também ser investigadas.

5. Referências bibliográficas

- Albalasmeh, A., Berhe, A., Ghezzehei, T. (2013), "A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry", *Carbohydrate Polymers*, 97, 253-261
- Alquini, G., Carbonero, E. R., Rosado, F. R., Cosentino, C., Iacomini, M. (2004), "Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr", *FEMS Microbiology Letters*, 230, 47-52
- Angeli, J., Ribeiro, L., Camelini, C., Mendonça, M., Mantovani, M. (2009), "Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and β -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay", *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 699-703
- Arata, S., Watanabe, J., Maeda, M., Yamamoto, M., Matsushashi, H., Mochizuki, M., Kagami, N., Honda, K., Inagaki, M. (2016), "Continuous intake of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice", *Heliyon*, 2, e00111
- Chaga, G. (2001), "Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 313-334
- Choe, J., Yi, Y., Lee, M., Seo, D., Yun, B., Lee, S. (2015), "Methyl 9-Oxo-(10E,12E)-octadecadienoate Isolated from *Fomes fomentarius* Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Blocking Phosphorylation of STAT3 in Murine Macrophages", *Mycobiology*, 43, 319-326
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J. (2016), "Potencial of Submergedly Cultivated Mycelia of *Ganoderma* spp. As Antioxidant and Antimicrobial Agents", *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17, 275-282
- Couto, S., Sanromán, M. (2006), "Application of solid-state fermentation to food industry-A review", *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302
- Daba, A., Ezeronye, O. (2003), "Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms", *African Journal of Biotechnology*, 12, 672-678
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, J., Smith, F. (1956), "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Analytical Chemistry*, 28, 350-356
- Falch, B., Espevik, T., Ryan, L., Stokke, B. (2000), "The cytokine stimulating activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation", *Carbohydrate Research*, 329, 587-596
- Fang, Q., Zhong, J. (2002), "Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic and polysaccharide", *Biochemical Engineering Journal*, 10, 61-65
- Ferreira, W., Sousa, J., Lima, N. (2010), "Microbiologia", 1ª Edição, Lidel - Edições Técnicas, Lda

Referências bibliográficas

- Gaberc-Porekar, V., Menart, V. (2001), "Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 335-360
- Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Fernandes, Â., Barros, L., Calhelha, R., Ferreira, I., Soković, M., Griensven, L. (2015), "Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal "mushroom", *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 323-332
- Gomba, G., Synytsya, A., Švecová, P., Coimbra, M., Čopíková, J. (2015), "Distinction of fungal polysaccharides by N/C ratio and mid infrared spectroscopy", *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 271-281
- Gonzaga, M., Ricardo, N., Heatley, F., Soares, S. (2005), "Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill", *Carbohydrate Polymers*, 60, 43-49
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B., Maeda, Y., Goldsmith, C., Rooney, P., Loughrey, A., Rao, J., Moore, J. (2009), "Na examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms", *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15, 5-7
- Israilides, C., Kletsas, D., Arapoglou, D., Philippoussis, A., Pratsinis, H., Ebringerová, A., Hřibalová, V., Harding, S. (2008), "*In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*", *Phytomedicine*, 15, 512-519
- Jang, S., Kang, S., Sohn, E. (2011), "Phagocytic Effects of β -Glucans from the Mushroom *Coriolus versicolor* are Related to Dectin-1, NOS, TNF- α Signaling in Macrophages", *Biomolecules & Therapeutics*, 19, 438-444
- Karmali, A. (2000), "Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes", *Boletim de Biotecnologia*, 67
- Kidd, P. (2000), "The Use of Mushroom Glucans and Proteoglycans in Cancer Treatment", *Alternative Medicine Review*, 5, 4-27
- Kim, T., Kim, Y., Sohn, E. (2012), "Effects of Beta-glucan from *Coriolus versicolor* on Scavenger Receptor B1 Expression and their Involvement of Dectin-1 and Casein Kinase 2", *Korean Journal of Plant Resources*, 25, 664-669
- Kitzberger, C., Jr., A., Pedrosa, R., Ferreira, S. (2007), "Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids", *Journal of Food Engineering*, 80, 631-638
- Kolundžić, M., Grozdanić, N., Dodevska, M., Milenković, M., Sisto, F., Miani, A., Farronato, G., Kundaković, T. (2016), "Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Polyporaceae*", *Industrial Crops and Products*, 79, 110-115
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvic, M., Todorović, N., Jakovljević, D., Griensven, L. (2012), "Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*", *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 144-153

- Kupetz, M., Procopio, S., Sacher, B., Becker, T. (2015), "Critical review of the methods of β -glucan analysis and its significance in the beer filtration process", *European Food Research and Technology*, 241, 725-736
- Lakowicz, J. (2006), "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 3ª edição, Springer
- Lee, W., Park, Y., Ahn, J., Ka, K., Park, S. (2007), "Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*", *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 249-254
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M. (2008), "Principles of Biochemistry", 5th Edition, W. H. Freeman and Company
- Manzi, P., Pizzoferrato, L. (2000), "Beta-glucans in edible mushrooms", *Food Chemistry*, 68, 315-318
- Martinho, D. (2012), "Effect of mushroom polysaccharides and olive phenolic compounds on human carcinoma cells" (Tese de Mestrado), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal
- Martins, S., Karmali, A., Andrade, J., Serralheiro, M. (2006), "Immobilized metal affinity chromatography of monoclonal immunoglobulin M against mutant amidase from *Pseudomonas aeruginosa*", *Molecular Biotechnology*, 33, 103-113
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., Lee, Y. (2005), "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in a microplate format", *Analytical Biochemistry*, 339, 69-72
- Mölleken, H., Nitschke, J., Modick, H., Malolepszy, T., Altenbach, H. (2011), "A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans and a method to quantify chitin in edible mushrooms", *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*
- Na, Z., Yan, L., Jia-hui, L., Juan, W., Shuang, Y., Nan, Z., Qing-fan, M., Li-rong, T. (2012), "Isolation, Purification and Bioactivities of Polysaccharides from *Irpex lacteus*", *Chemical Research in Chinese Universities*, 28, 249-254
- Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Rekowski, R., Altenbach, H., Mölleken, H. (2011), "A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms", *Food Chemistry*, 127, 791-796
- Niu, H., Song, D., Um, H., Zhang, W., Sun, F., Duan, J. (2016), "Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus*", *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 587-593
- Novotný, C., Cajthaml, T., Svobodová, K., Šušla, M., Šašek, V. (2009), "*Irpex lacteus*, a White-Rot Fungus with Biotechnological Potential-review", *Folia Microbiologia*, 54, 375-390
- Olennikov, D., Agafonova, S., Rokhin, A., Penzina, T., Borovskii, G. (2012), "Branched Glucan from the Fruiting Bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr) Karst", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 65-70
- Ozińska-Jaroszuk, M., Wlizo, K., Szalapata, K., Jarosz-Wilkolazka, A. (2014), "World Journal of Microbiology and Biotechnology", 30, 3065-3074

Referências bibliográficas

- Pacheco, M., Bruzzone, L. (2013), "Synchronous fluorescence spectrometry: Conformational investigation or inner filter effect?", *Journal of Luminescence*, 137, 138-142
- Padilha, M., Avila, A., Sousa, P., Cardoso, L., Perazzo, F., Carvalho, J. (2009), "Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Alkaline Extracts from Mushrooms (*Agaricus blazei* Murill)", *Journal of Medicinal Food*, 12, 359-364
- Pandey, A. (2003), "Solid-state fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84
- Pandey, A., Soccol, C., Mitchell, D. (2000), "New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products", *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169
- Papp, N., Rudolf, K., Bencsik, T., Czégényi, D. (2015), "Ethnomycological use of *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. in Transylvania, Romania", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 101-111
- Papp, V., Geösel, A., Erös-Honti, Zs. (2012), "Native *Ganoderma* species from the carpathian basin with the perspective of cultivation review", *Acta alimentaria*, 41, 160-170
- Passow, U., Alldredge, A. (1995), "A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP)", *Limnology and Oceanography*, 40, 1326-1335
- Prescott L., Harley J., Klein D. (2002), "Microbiology", 5th Edition, The McGraw-Hill Companies
- Qian, J., Chen, W., Zhang, W., Zhang, H. (2009), "Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach", *Carbohydrate Polymers*, 78, 620-625
- Quintas, A., Freire, A., Halpern, M. (2008), "Bioquímica Organização Molecular da Vida", 1ª Edição, LIDEL- edições técnicas, Lda
- Radzki, W., Ziaja-Soltys, M., Nowak, J., Rzymowska, J., Topolska, J., Slawińska, A., Michalak-Majewska, M., Zalewska-Korona, M., Kuczumow, A. (2016), "Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom", *Food Science and Technology*, 66, 27-33
- Ruthes, A., Smiderle, F., Iacomini, M. (2015), "D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches", *Carbohydrate Polymers*, 117, 753-761
- Sakurai, K., Uezu, K., Numata, M., Hasegawa, T., Li, C., Kaneko, K., Shinkai, S. (2005), "β-1,3-Glucan polysaccharides as novel one-dimensional hosts for DNA/RNA, conjugated polymers and nanoparticles", *Chemical Communications*, 35, 4383-4398
- Schemeth, D., Rainer, M., Messner, C., Rode, B., Bonn, G. (2014), "Lanthanide-IMAC enrichment of carbohydrates and polyols", *Biomedical Chromatography*, 28, 412-418
- Schmitt, M., Budde, A. (2009), " Calcofluor Fluorescence Assay for Wort β-Glucan in a Microplate Format", *Cereal Chemistry*, 86, 33-36

- Semedo, M. (2015a), "β-Glucans from Basidiomycete Strains: Isolation, Purification, Characterization and Production of Monoclonal Antibodies" (Tese de Doutoramento), Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
- Semedo, M., Karmali, A., Fonseca, L. (2015b), "A high throughput colorimetric assay of β-1,3-D-glucans by Congo red dye", *Journal of Microbiological Methods*, 109, 140-148
- Semedo, M., Karmali, A., Fonseca, L. (2015c), "A Novel Colorimetric Assay of β-D-Glucans in Basidiomycete Strains by Alcian Blue Dye in a 96-Well Microtiter Plate", *Biotechnology Progress*, 31, 1526-1535
- Shirke, S., Takhistov, P., Ludescher, R. (2005), "Molecular Mobility in Amorphous Maltose and Maltitol from Phosphorescence of Erythrosin B", *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 16119-16126
- Silva, A., Miranda, A., Fernandes, E., Santos, S., Fraga, I., Santos, D., Dias, A., Bezerra, R. (2013), "Endopolysaccharides from *Ganoderma resinaceum*, *Phlebia rufa*, and *Trametes versicolor* Affect Differently the Proliferation Rate of HepG2 Cells", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 1919-1926
- Simonić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Glamočlija, J. (2009), "Effect of cultivation conditions on ligninolytic enzyme production by *Ganoderma carnosum*", *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 116, 289-295
- Singhania, R., Patel, A., Soccol, C., Pandey, A. (2009), "Recent advances in solid-state fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13-18
- Singhania, R., Sukumaran, R., Patel, A., Larroche, C., Pandey, A. (2010), "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases", *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 541-549
- Smiderle, F., Carbonero, E., Mellinger, C., Sasaki, G., Gorin, P., Iacomini, M. (2006), "Structural characterization of a polysaccharide and a β-glucan isolated from edible mushroom *Flammulina velutipes*", *Phytochemistry*, 67, 2189-2196
- Smiderle, F., Sasaki, G., Arkel, J., Iacomini, M., Wichers, H., Griensven, L. (2010), "High Molecular Weight Glucan of the Culinary Medicinal Mushroom *Agaricus bisporus* is an α-Glucan that Forms Complexes with Low Molecular Weight Galactan" *Molecules*, 15, 5818-5830
- Sobieralski, K., Siwulski, M., Lisiecka, J., Jędryczka, M., Sas-Golak, I., Frużyńska-Jóźwiak, D. (2012), "Fungi-derived β-glucans as a component of functional food", *Hortorum cultus*, 11, 111-128
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., Misaki, A. (1985), "Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharides Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Mycelium of *Ganoderma lucidum*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 2641-2653
- Stuart, B. (2004), "Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications", John Wiley & Sons, Ltd

Referências bibliográficas

- Subramaniam, R., Vimala, R. (2012), "Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: a Comparative Study", *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J. (2009), "Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potencial prebiotic activity", *Carbohydrate Polymers*, 76, 548-556
- Tiwari, R., Ludescher, R. (2010), "Vanillin Phosphorescence as a Probe of Molecular Mobility in Amorphous Sucrose", *Journal of Fluorescence*, 20, 125-133
- Valeur, B. (2012), "Molecular Fluorescence Principles and Applications", Wiley-VCH Verlag GmbH, 2^o edição
- Villares, A., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E. (2012), "Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms", *Agriculture*, 2, 452-471
- Wasser, P. (2005a), "Shiitake", *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 2, 719-726
- Wasser, P. (2005b), "Reishi", *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 2, 680-690
- Wasser, S. (2002), "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274
- Young, S., Dong, W., Jacobs, R. (2000), "Observation of a Partially Opened Triple-helix Conformation 1→3-β-Glucan by Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy", *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 11874-11879
- Zhang, L., Zhou, J., Yang, G., Chen, J. (1998), "Preparative fractionation of polysaccharides by columns packed with regenerated cellulose gels", *Journal of Chromatography A*, 816, 131-136
- Zhang, M., Cui, S., Cheung, P., Wang, Q. (2007), "Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity", *Trends in Food Science & Technology*, 18, 4-19
- Zhang, Y., Dai, L., Kong, X., Chen, L. (2012), "Characterization and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*", *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 259-265
- Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., Moucheng, W. (2005), "Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*", *International Immunopharmacology*, 5, 811-820
- Zhong-hua, L., Xiao-ge, H., Jin-hui, Z., Le, H. (2015), "Liquid Fermentation of *Ganoderma applanatum* and Antioxidant Activity of Exopolysaccharides", *The Open Biomedical Engineering Journal*, 9, 224-227
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B. (2015), "Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities", *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 165-173

Endereços Web:

www.bachtelpilz.ch, consultado a 06 de Setembro de 2016

www.botamynus.de, consultado a 09 de Setembro de 2016

www.feedipedia.org, consultado a 16 de Setembro de 2016

www.first-nature.com, consultado a 08 de Setembro de 2016

www.globalspec.com, consultado a 23 de Setembro de 2016

www.gobice.com, consultado a 07 de Setembro de 2016

www.irishlichens.ie, consultado a 08 de Setembro de 2016

www.medicalmushrooms.net, consultado a 06 de Setembro de 2016

www.mushrooms.com, consultado a 10 de Setembro de 2016

www.mykoweb.com, consultado a 07 de Setembro de 2016

www.princetoninstruments.com, consultado a 22 de Setembro de 2016

www2.hawaii.edu, consultado a 15 de Setembro de 2016