

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Luciana Luft

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS A PARTIR DA
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Phoma dimorpha***

Santa Maria, RS
2021

Luciana Luft

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO
SUBMERSA DE *Phoma dimorpha***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Química.**

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS
2021

Luft, Luciana
PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS A PARTIR DA
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Phoma dimorpha* / Luciana Luft.-
2021.
173 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2021

1. Microrganismos 2. Concentração 3. Extração 4.
Compostos bioemulsificantes 5. Fitotoxicidade I.
Mazutti, Marcio Antonio II. Título.

Luciana Luft

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO
SUBMERSA DE *Phoma dimorpha***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Química.**

Aprovada em 29 de janeiro de 2021:



Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador



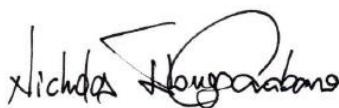
Giovani Leone Zobot, Dr. (UFSM)



Kátia Regina Kuhn, Dra. (UFSM)



Rogério Marcos Dallago, Dr. (URI)



Nicholas Islongo Canabarro, Dr. (USP)

Santa Maria, RS
2021

Aos meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

“- O que é mais importante - perguntou o Grande Panda - a viagem ou o destino?
- A companhia. - Disse o pequeno Dragão.”

Autor desconhecido

Seria impossível descrever em poucas linhas a importância de todas as pessoas que participaram desta jornada. Ainda assim, gostaria de registrar meu reconhecimento e minha eterna gratidão especialmente:

A Deus e ao meu Anjo da Guarda, que sempre estiveram ao meu lado, zelando e confortando nas horas mais difíceis. Obrigada por todos os sinais.

Aos meus mestres de vida, meus amados pais, Clério Luiz Luft e Elisete Dal Molin Luft, pelo amor incondicional e pelos valiosos ensinamentos. Obrigada por serem meu porto seguro.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcio Antonio Mazutti, pelo auxílio e por todas as oportunidades dadas durante este período de pós-graduação. Foi um privilégio desenvolver minha dissertação de mestrado e agora minha tese sob sua orientação e integrar seu grupo de pesquisa.

Ao professor Dr. Giovani Leone Zabot por estar sempre disposto a ajudar. Seu apoio e seus ensinamentos foram fundamentais para o meu progresso acadêmico e para o bom desempenho deste trabalho.

Ao professor Dr. Sergio Luiz Jahn por todas as sugestões e incentivos. Sua gentileza e solicitude são exemplos que seguirei na vida profissional e pessoal.

Aos bons amigos e colegas do laboratório Biotec Factory pelos bons momentos que passamos nesses seis anos de pós-graduação: Tássia Confortin, Izelmar Todero, Thiarles Brun, Roberto Chaves, Juliana Soares e Silvana Schmaltz. Acredito muito no sucesso profissional de vocês. Especialmente à minha grande amiga Tássia, muito obrigada pela ajuda, compromisso e amizade.

À toda minha família, avós, tios e primos pelas orações, comemorações e amizade. Ao meu avô que mesmo após partir continua me guiando. Aos meus amados afilhados e aos seus pais, obrigada por tornarem meus dias mais leves e por terem me escolhido. Vocês são meus maiores presentes.

À minha companheira inseparável de quatro patas, Bella. Afinal, graças a ela passei por este período sem ingerir ansiolíticos e antidepressivos.

Às técnicas da Central Analítica do departamento de Engenharia Química, Mariana Bassaco e Margiani Fortes, e ao Gustavo Ugalde, técnico do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, pela amizade e preciosa ajuda nas análises de caracterização estrutural e físico-química.

Ao Marcos Mello, secretário do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, pela dedicação e auxílio sempre que necessário.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-graduação em Engenharia Química, pelo incentivo e convivência agradável.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e correções que com certeza serão essenciais para o resultado final desta tese.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, pelo suporte e pela oportunidade cedida através do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós.”

Pequeno príncipe. Saint Exupéry

Gratidão.

RESUMO

PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Phoma dimorpha*

AUTORA: Luciana Luft

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Pesquisas com fungos estão crescendo devido aos possíveis bioprodutos oriundos de seu cultivo, bem como as suas diferentes aplicabilidades. Biopolímeros fúngicos podem ser produzidos a partir do processo de fermentação desses microrganismos. Estratégias alternativas para a obtenção desses compostos, os quais apresentam características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, são extremamente necessárias. Estudos demonstram que espécies do gênero *Phoma* são fontes de biopolímeros bioativos com diversas atividades específicas. A espécie *Phoma dimorpha* vem se destacando por apresentar relevante potencial herbicida, no entanto, pesquisas referentes à produção de biopolímeros por essa espécie não foram encontradas. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de produção de biopolímeros intra e extracelulares a partir da fermentação submersa do fungo *Phoma dimorpha*. As condições da fermentação (meio de cultivo e parâmetros do processo) foram definidas em estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa. A primeira etapa experimental consistiu na concentração (membranas e adsorção) e recuperação dos biopolímeros extracelulares (precipitação ácida). Na segunda etapa, a extração e a caracterização dos biopolímeros intracelulares foram realizadas. Diferentes métodos, tais como extração assistida por ultrassom (com sonicação direta e indireta) e extração com água quente pressurizada, foram avaliados em comparação com um método de extração convencional (água quente). A caracterização estrutural, a solubilidade, o índice de emulsificação e a capacidade de retenção foram realizadas. E na terceira etapa, a produção de biopolímeros extra e intracelulares foi avaliada com a adição de diferentes fontes de carbono na fermentação (glicerol bruto, farelo de arroz e resíduo de cervejaria), assim como o efeito nas propriedades do caldo bruto (pH, densidade, tensão superficial e atividade herbicida) e no índice de emulsificação dos compostos. A partir dos experimentos de concentração, verificou-se um aumento de aproximadamente 40% na concentração de biopolímeros e uma diminuição em torno de 35% na tensão superficial do caldo fermentado com a utilização da membrana de microfiltração. A membrana de ultrafiltração apresentou resultados inferiores de concentração, provavelmente devido ao mecanismo de incrustação. A adsorção dos biopolímeros com os diferentes adsorventes foi eficaz, principalmente com carvão ativado, onde uma recuperação de 98,5% foi alcançada. A partir desse estudo, foi possível concluir que o aumento na concentração de biopolímeros no caldo fermentado levou ao aumento da atividade herbicida e à diminuição da tensão superficial. Logo, os resultados são promissores para aplicações futuras, pois uma solução concentrada de biopolímeros pode aumentar o controle de ervas daninhas. Quanto aos biopolímeros intracelulares, a maior concentração (12,02%) foi obtida com o processo de extração assistida por ultrassom com sonicação direta. Os resultados para ultrassom com sonicação indireta foram inferiores (0,32-1,70%) aos da extração convencional com água quente (3,12-6,58%). A extração com água quente pressurizada apresentou resultados com maior variação (1,71-8,64%). E por último, a fonte de carbono adicional mais apropriada de acordo com o índice de emulsificação foi o glicerol bruto, o que levou a uma diminuição considerável na tensão superficial. Porém, as concentrações de biopolímeros intracelulares e extracelulares encontradas foram inferiores aos estudos anteriores. A partir dos resultados, concluiu-se que a espécie *Phoma dimorpha*, além de possuir potencial herbicida, pode ser considerada fonte promissora de biopolímeros com propriedades bioemulsificantes.

Palavras-chave: Microrganismos. Concentração. Extração. Compostos bioemulsificantes. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

PRODUCTION OF FUNGAL BIOPOLYMERS BY SUBMERGED FERMENTATION FROM *Phoma dimorpha*

AUTHOR: Luciana Luft

ADVISOR: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Research with fungi is growing due to the possible bioproducts from its cultivation, as well as its different applicability. Fungal biopolymers can be produced from the fermentation process of these microorganisms. Alternative strategies for obtaining these compounds, which have characteristics of biocompatibility and biodegradability, are extremely necessary. Studies show that species of genus *Phoma* are sources of bioactive biopolymers with several specific activities. The species *Phoma dimorpha* has stood out for having a relevant herbicidal potential, however, research regarding the production of biopolymers by this species has not been found. In view of this, the objective of this work was to investigate the potential for the production of intra and extracellular biopolymers by submerged fermentation from fungus *Phoma dimorpha*. The fermentation conditions (culture medium and process parameters) were defined in previous studies developed by the research group. The first experimental stage consisted of the concentration (membranes and adsorption) and recovery of extracellular biopolymers (acid precipitation). In the second stage, the extraction and characterization of intracellular biopolymers was performed. Different methods, such as ultrasound-assisted extraction (with direct and indirect sonication) and pressurized hot water extraction, were evaluated in comparison with a conventional extraction method (hot water). Structural characterization, solubility, emulsification index and holding capacity were carried out. And in the third stage, the production of extra and intracellular biopolymers was evaluated with the addition of different carbon sources in the fermentation (crude glycerol, rice bran and brewer's spent grain), as well as the effect on the properties of fermented broth (pH, density, surface tension, and herbicidal activity) and on the emulsification index of compounds. From the concentration experiments, there was an increase of approximately 40% in the concentration of biopolymers and a decrease of around 35% in the surface tension of fermented broth using microfiltration membrane. The ultrafiltration membrane showed lower concentration results, probably due to the fouling mechanism. The adsorption of biopolymers with different adsorbents was effective, mainly with activated carbon, where a recovery of 98.5% was achieved. From this study, it was possible to conclude that the increase at concentration of biopolymers in the fermented broth led to an increase in herbicidal activity and a decrease in surface tension. Therefore, the results are promising for future applications, as a concentrated solution of biopolymers can increase weed control. As for intracellular biopolymers, the highest concentration (12.02%) was obtained with the ultrasound-assisted extraction process with direct sonication. The results for ultrasound with indirect sonication were lower (0.32-1.70%) than for conventional extraction with hot water (3.12-6.58%). Extraction with pressurized hot water showed results with greater variation (1.71 to 8.64%). And finally, the most appropriate additional carbon source according to the emulsification index was crude glycerol, which led to a decrease in surface tension. However, concentrations of intracellular and extracellular biopolymers found were lower than previous studies. From the results, it was concluded that the species *Phoma dimorpha*, besides having herbicidal potential, could be considered a promising source of biopolymers with bioemulsifying properties.

Keywords: Microorganisms. Concentration. Extraction. Bioemulsifying compounds. Phytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO

Figura 1.1 - Representação esquemática das principais atividades realizadas nesta tese. 28

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1– Biopolímeros produzidos a partir de diferentes fontes biológicas. 29

Figura 2.2– Visão esquemática geral da composição da parede celular do fungo. 34

Figura 2.3– Taxonomia atual de *Phoma*. 43

Figura 2.4– Estratégias de produção e redução de custos de biopolímeros fúngicos. 57

Figura 2.5 – Vias metabólicas envolvidas na síntese de biopolímero emulsificante usando substrato de hidrocarboneto. Enzimas chave: (A) isocitrato liase; (B) malato sintase; (C) fosfoenolpiruvato; (D) frutose-1..... 60

Figura 2.6– Vias metabólicas envolvidas na síntese de biopolímero emulsificante usando um substrato solúvel em água. Enzimas principais: (A) fosfofrutocinase; (B) piruvato quinase; (C) isocitrato desidrogenase. 61

Figura 2.7– Sistemas ultrassônicos comumente usados (A: Banho de ultrassom, B: Sonda de ultrassom). 71

Figura 2.8– As partes principais dos sistemas de extração com água quente pressurizada: dinâmico (fluxo contínuo) (A) e estático (lote) (B). 74

CAPÍTULO 3 - ARTIGO I - DIFFERENT TECHNIQUES FOR CONCENTRATION OF EXTRACELLULAR BIOPOLYMERS WITH HERBICIDAL ACTIVITY PRODUCED BY *Phoma* sp.

Figure 1– Experimental apparatus for concentrating biomolecules obtained by submerged fermentation: (A) schematic diagram and (B) picture of the apparatus (reproduction with permission, [28]). 83

Figure 2– FTIR spectrum of extracellular biopolymers produced from *Phoma* sp. 88

Figure 3– Comparison of the lesions observed in leaves of *Cucumis sativus* using the concentration methods of membranes and adsorption. 93

CAPÍTULO 4 - ARTIGO II - EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDE-ENRICHED FRACTIONS FROM *Phoma dimorpha* MYCELIAL BIOMASS

Figure 1. Scheme for the extractions and characterization of the polysaccharides-enriched fractions (PEF) produced by the fungus *Phoma dimorpha*. 101

Figure 2. SEM images of mycelium before and after extraction: (A) fresh; (B) direct UAE; (C) indirect UAE; (D) PHWE; (E) HWE; (F) SPE. 111

Figure 3. Kinetic curves for the extraction of PEF from *Phoma dimorpha* mycelium using direct UAE. 113

Figure 4. The FTIR spectra of the PEF obtained by direct UAE 114

Figure 5. Structure characteristics of PEF obtained by direct UAE: XRD (A), TGA (B), and DrTGA (C). 116

Figure 6. SEM image of PEF obtained by direct UAE from *Phoma dimorpha* mycelium at 2000 X magnification. 117

Figure S1. Pareto chart expressing the effect of process variables on the extraction yield using hot water extraction; L/S: liquid/solid. 125

Figure S2. Pareto chart expressing the effect of process variables on the extraction yield using direct (a) and indirect (b) sonication. 125

Figure S3. Pareto chart expressing the effect of process variables on the extraction yield using pressurized hot water extraction. 126

CAPÍTULO 5 - ARTIGO III - AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES AS ADDITIONAL CARBON SOURCES ON PRODUCTION OF BIEMULSIFIER COMPOUNDS FROM *Phoma dimorpha*

Figure 1. Flowchart of bioemulsifying compounds production; EPS: extracellular polysaccharides-enriched fractions; IPS: intracellular polysaccharides-enriched fractions. . 131

Figure 2. Evolution of phytotoxicity in leaves of *Cucumis sativus* by soaking them with the fermented broth of *Phoma dimorpha* with three different additional carbon sources (at 5% concentration), negative control (distilled water), and positive control (fermented broth without additional carbon source); time course from 1 to 9 days. 141

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1– Lista parcial de biopolímeros.	30
Tabela 2.2– Polissacarídeos fúngicos: espécies produtoras, caracterização química e atividade potencial.	33
Tabela 2.3– Glucanas fúngicas: áreas de aplicação, fonte e funcionalidades.	37
Tabela 2.4– Quitosanas fúngicas: áreas de aplicação, origem e funcionalidades.	40
Tabela 2.5 – Resumo das espécies de <i>Phoma</i> relacionadas com atividades citotóxica, antimicrobiana e antiviral.	46
Tabela 2.6– Resumo das plantas nas quais espécies de <i>Phoma</i> foram relatadas como agentes de controle biológico.	51
Tabela 2.7– Trabalhos desenvolvidos com o fungo <i>Phoma dimorpha</i> no Laboratório "Biotec Factory".	53
Tabela 2.8– Características mais relevantes dos processos de separação por membranas.	65

CAPÍTULO 3 - ARTIGO I - DIFFERENT TECHNIQUES FOR CONCENTRATION OF EXTRACELLULAR BIOPOLYMERS WITH HERBICIDAL ACTIVITY PRODUCED BY *Phoma* sp.

Table 1. Fungal biopolymers (crude EPS) produced by different fungi species.	87
Table 2. Fatty acids composition of cell-free fermented broth produced by <i>Phoma</i> sp.	87
Table 3. Concentration of extracellular biopolymers (EPS) produced by <i>Phoma</i> sp. using the microfiltration and ultrafiltration membranes.	89
Table 4. Concentration of extracellular biopolymers produced by <i>Phoma</i> sp. using five adsorbents at two concentrations and evaluation of surface tension.	90
Table 5. Herbicidal activity of concentrated samples of EPS.	92

CAPÍTULO 4 - ARTIGO II - EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDE-ENRICHED FRACTIONS FROM *Phoma dimorpha* MYCELIAL BIOMASS

Table 1. Yields of extracts obtained from <i>Phoma dimorpha</i> mycelium using the three extraction methods.	109
Table 2. Water solubility index (WSI), water holding capacity (WHC), and emulsification index at 24 h (EI ₂₄) of PEF obtained from <i>Phoma dimorpha</i> and comparison with different microorganism species.	118

CAPÍTULO 5 - ARTIGO III - AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES AS ADDITIONAL CARBON SOURCES ON PRODUCTION OF BIEMULSIFIER COMPOUNDS FROM *Phoma dimorpha*

Tabela 1. Polysaccharides-enriched fractions and biomass production yield using different concentrations of additional carbon sources.	135
Table 2. Influence of additional carbon sources on the pH, density, and surface tension of fermented broth.	137
Table 3. Influence of each additional carbon source (at 5% concentration) on the emulsification index and pH of intra and extracellular polysaccharides-enriched fractions.	138
Table 4. Examples of fungi investigated for bioemulsifiers production.	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CADEQ	Central Analítica do Departamento de Engenharia Química
CNT	Nanotubos de carbono
EPS	Exopolissacarídeos
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector por Ionização de Chama
HWE	Extração com água quente
IE	Índice de emulsificação
IPS	Intrapolissacarídeos
LabMIP	Laboratório de Manejo Integrado de Pragas
LAPE	Laboratório de Engenharia de Processos Agroindustriais
MF	Microfiltração
MWCNTs	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NF	Nanofiltração
OR	Osmose reversa
PHWE	Extração com água quente pressurizada
PSM	Processos de separação por membrana
RMN	Ressonância magnética nuclear
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SPE	Extração pressurizada a vapor
SWCNTs	Nanotubos de carbono de parede simples
TGA	Análise Termogravimétrica
UAE	Extração assistida por ultrassom
UAE-D	Extração assistida por ultrassom com sonicação direta
UAE-I	Extração assistida por ultrassom com sonicação indireta
UF	Ultrafiltração
WHC	Capacidade de retenção de água
WSI	Índice de solubilidade em água
XRD	Difração de raios-X

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO	23
1.1 INTRODUÇÃO	23
1.2 OBJETIVOS.....	25
1.2.1 Objetivo geral	25
1.2.2 Objetivos específicos	26
1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO.....	26
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 BIOPOLÍMEROS.....	29
2.1.1 Biopolímeros fúngicos com propriedades bioemulsificantes.....	32
2.1.1.1 Polissacarídeos fúngicos	32
2.1.1.1.1 Glucanas	36
2.1.1.1.2 Quitina e quitosana.....	38
2.1.1.1.3 Exopolissacarídeos.....	41
2.2 GÊNERO PHOMA.....	42
2.2.1 <i>Phoma</i> como agente de controle biológico para ervas daninhas	48
2.2.1.1 <i>Phoma dimorpha</i>	52
2.2.2 <i>Phoma</i> como produtor de polissacarídeos.....	55
2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS	56
2.3.1 Seleção do meio de cultura.....	56
2.3.2 Definição dos parâmetros de cultivo.....	59
2.3.3 Recuperação, extração e purificação.....	61
2.3.3.1 Precipitação	63
2.3.3.1.1 Precipitação ácida	63
2.3.3.1.2 Precipitação alcoólica.....	63
2.3.3.2 Membranas	64
2.3.3.3 Adsorção.....	67
2.3.3.4 Extração com água quente.....	69
2.3.3.5 Extração assistida por ultrassom.....	70
2.3.3.6 Extração com água quente pressurizada.....	72
2.3.4 Aumento de escala	76
CAPÍTULO 3 – ARTIGO I	79
ABSTRACT	79
1 INTRODUCTION	80
2 MATERIAL AND METHODS.....	81
2.1 Microorganism and chemicals.....	81
2.2 Production of extracellular biopolymers	82
2.3 Recovery and quantification of extracellular biopolymers	82
2.4 Concentration of extracellular biopolymers	82
2.4.1 Membranes	82
2.4.2 Adsorption	83

2.5 Physical-chemical characterization of crude and concentrated extracellular biopolymers.....	84
2.5.1 Surface tension	84
2.5.2 Determination of fatty acids.....	85
2.5.3 Fourier transform infrared spectroscopy.....	85
2.6 Herbicidal activity	85
2.7 Statistical analysis	86
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	86
3.1 Chemical characterization of cell-free fermented broth.....	86
3.2 Concentration of EPS.....	89
3.3. Herbicidal activity.....	91
4 CONCLUSIONS	93
REFERENCES	94
CAPÍTULO 4 – ARTIGO II.....	97
ABSTRACT	97
Introduction	98
Materials and methods	100
Cultivation of <i>Phoma dimorpha</i> and biomass preparation	100
Extraction of polysaccharide-enriched fractions	100
Conventional extraction	102
Ultrasound-assisted extraction.....	102
Pressurized hot water extraction	103
Recovery of polysaccharide-enriched fractions	103
Structural characterization of polysaccharide-enriched fractions	104
Fourier transform infrared spectroscopy	104
X-ray diffraction	104
Thermogravimetric analysis	104
Scanning electron microscopy.....	105
Determination of water solubility index and water holding capacity	105
Determination of emulsification index.....	106
Characterization of residual mycelium	106
Results and discussion	106
Comparison of extraction processes in terms of extraction yield	106
Comparison of extraction processes in terms of mechanism	109
Kinetics of the direct ultrasound-assisted extraction.....	112
Structural characterization of PFE.....	113
FTIR spectrum	113
X-ray diffraction and thermogravimetric characterization.....	114
Scanning electron micrograph of PEF	117
Water solubility index, water holding capacity, and emulsification index	118
Conclusions	119
References	120
APPENDIX A	125
CAPÍTULO 5 – ARTIGO III.....	127

ABSTRACT	127
1. Introduction	128
2. Material and Methods	129
2.1. Microorganism	129
2.2. Additional carbon sources	130
2.3. Submerged fermentation.....	130
2.4. Isolation of polysaccharides-enriched fractions.....	130
2.4.1 Extraction of intracellular polysaccharides-enriched fraction.....	131
2.4.2 Recovery of polysaccharides-enriched fractions	132
2.5. Effects of different concentrations of additional carbon sources.....	132
2.5.1. Biomass	132
2.5.2. Density and pH	132
2.5.3. Surface tension.....	133
2.5.4. Emulsification index	133
2.6. Bioherbicidal activity	133
3. Results and discussion	134
3.1. Effect of additional carbon sources on polysaccharides-enriched fractions and biomass production	134
3.2. Effect of additional carbon sources on fermented broth properties	136
3.3. Effect of additional carbon sources on emulsifying capacity	137
3.4. Effect of additional carbon sources on bioherbicidal activity	140
4. Conclusion.....	142
REFERENCES	142
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
6.1 DISCUSSÃO GERAL	147
6.2 CONCLUSÕES GERAIS	150
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

Os biopolímeros, também chamados de polímeros naturais, são macromoléculas produzidas durante o crescimento de qualquer organismo vivo (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013). Existem dois tipos principais de biopolímeros, um derivado de organismos vivos (por exemplo, polissacarídeos e proteínas) e o outro produzido a partir de recursos renováveis por meio da polimerização (por exemplo, ácido polilático). Ao contrário dos polímeros sintéticos, os polímeros biológicos têm características estruturais bem definidas (WANG; MAJZOBI; FARAHNAKY, 2020). Do ponto de vista biotecnológico, os biopolímeros desempenham papéis importantes em diversas aplicações devido às suas propriedades funcionais, incluindo solubilidade em água, capacidade de retenção de água/óleo, intumescimento, porosidade, formação de espuma, emulsificação, densidade aparente, viscosidade e propriedades de gelificação (DEHNAD; JAFARI; AFRASIABI, 2016).

Os microrganismos são de grande importância na produção de biopolímeros. A utilização de produtos microbianos como alternativa aos produtos petroquímicos clássicos é possível devido às suas interessantes propriedades, como biodegradabilidade, baixa toxicidade e compatibilidade ambiental e humana (ATES, 2015). Pode-se citar como exemplo, a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes. Estes compostos são agentes tensoativos, ou seja, biopolímeros com estruturas anfipáticas, sintetizados por diversos microrganismos. Devido à sua natureza ambientalmente correta e menor toxicidade em comparação ao surfactante sintético, o interesse em pesquisa e aplicação de biossurfactantes e bioemulsificantes está ganhando força (SATPUTE et al., 2010).

Os biossurfactantes são geralmente compostos de baixo peso molecular, enquanto os bioemulsificantes são compostos de alto peso molecular. Ambos possuem algumas propriedades de superfície ativas que levam à redução da tensão superficial e da tensão interfacial. Os bioemulsificantes, mesmo em baixas concentrações, podem emulsionar com eficiência dois líquidos imiscíveis, mas são menos eficazes na redução da tensão superficial. A combinação de componentes de polissacarídeo, ácido graxo e proteína nesses compostos, confere a eles melhor potencial emulsificante (UZOIGWE et al., 2015). O grupo mais abundante de biopolímeros bioemulsificantes na natureza são polissacarídeos. Polissacarídeos são carboidratos complexos (cadeias de monossacarídeos ligados entre si por ligações

glicosídicas) com estruturas lineares ou ramificadas (CHAKRABORTY et al., 2019). Devido às suas estruturas químicas únicas e complexas e propriedades físico-químicas e reológicas interessantes, os polissacarídeos microbianos estão emergindo rapidamente como biomateriais novos e industrialmente importantes (ATES, 2015). As tecnologias relacionadas a polissacarídeos têm desempenhado um papel essencial no desenvolvimento de uma ampla gama de produtos adequados para aplicação em áreas distintas, como indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos, agrícola e têxtil (BAI et al., 2019; SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017).

Os fungos são vistos como uma importante fonte de polissacarídeos bioativos. A produção biotecnológica de polissacarídeos fúngicos ocorre por fermentação submersa intracelularmente (intrapolissacarídeos, IPS) ou extracelularmente (exopolissacarídeos, EPS) (AKILA, 2014). A classificação dos polissacarídeos é feita de acordo com sua localização no organismo produtor: polissacarídeos citosólicos, polissacarídeos da parede celular (IPS) e polissacarídeos secretados no meio extracelular durante o crescimento (EPS). As glucanas, as manoproteínas e as quitinas são os polissacarídeos encontrados nas paredes celulares dos fungos. O bloco de construção mais abundante das paredes celulares dos fungos é a β -glucana, que corresponde a 50-60% do peso seco, enquanto a quitina, apesar de ser um importante componente estrutural da parede celular, representa apenas 1-2% da massa seca das paredes celulares da levedura e 10-20% das paredes celulares dos fungos filamentosos (FESEL; ZUCCARO, 2016).

Quando comparada a outras fontes naturais, a produção de biopolímeros fúngicos costuma apresentar tempos de produção consideravelmente mais curtos e sua extração é muito mais simples (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Porém, uma das maiores dificuldades da produção em larga escala é o alto custo. Uma estratégia geralmente adotada para tornar a produção economicamente acessível é o uso de substratos baratos e resíduos agroindustriais para a formulação de meios de fermentação (AMORIM; FARINAS; MIRANDA, 2019; MOHD LUTHFI et al., 2020). Os processos de recuperação, extração e purificação dos biopolímeros fúngicos também são desafios da produção. A extração dos exopolissacarídeos normalmente envolve uma etapa de precipitação ácida ou alcoólica (COUTTE et al., 2017; OSÍNSKA-JAROSZUK et al., 2015). Para a purificação, diversas estratégias têm sido desenvolvidas, como técnicas de filtração por membrana e adsorção em resinas ou carvão ativado. A extração dos intrapolissacarídeos requerem métodos de extração mais drásticos. O método convencional é a extração com água quente, porém este apresenta algumas deficiências associadas ao uso de altas temperaturas, tempos de extração estendidos e baixa eficiência (SHANG et al., 2018). Técnicas

de extração avançadas, como extração assistida por ultrassom e extração com água quente pressurizada surgiram como tecnologias “verdes” durante as últimas décadas para melhorar a extração de polissacarídeos bioativos (MENA-GARCÍA et al., 2019). No entanto, a busca por alternativas para melhorar a produção em larga escala de polissacarídeos ainda é necessária (ZHENG H. et al., 2019).

Há um número crescente de relatos sobre novos polissacarídeos fúngicos secretados por produtores pertencentes a diferentes espécies que possuem atividades biológicas diversas (KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018; SONG et al., 2018) As espécies pertencentes ao gênero *Phoma* destacam-se por serem fontes promissoras de compostos bioativos que atuam como agentes citotóxicos (SANG et al., 2017), antimicrobianos (HUSSAIN et al., 2014), antivirais (HERATH et al., 2009) e agentes de controle biológico (RAI et al., 2009). A produção de antraquinonas e de exopolissacarídeos a partir de espécies deste gênero também tem sido explorada (RAI et al., 2009; YANG et al., 2005). A espécie *Phoma herbarum* é uma das espécies mais estudadas devido aos potenciais herbicida (VIKRANT et al., 2006), antimicrobiano e antitumoral (CUI; GUO; XIAO, 2011), e também é reconhecida pela produção de polissacarídeos bioativos (SELBMANN et al., 2002; YANG et al., 2005). Na maioria das vezes, os polissacarídeos estão relacionados a tais atividades biológicas (LI; JIANG; GUAN, 2010).

A espécie *Phoma dimorpha* vem se destacando por apresentar atividade bioherbicida contra plantas daninhas (CHAVES NETO et al., 2020a; TODERO et al., 2018). Os estudos mais recentes tiveram como objetivo principal aumentar os efeitos de toxicidade do caldo fermentado por meio de concentração por membranas (CHAVES NETO, 2019; TODERO et al., 2019). É importante ressaltar que não há conhecimento de outras atividades biológicas da espécie *Phoma dimorpha* até o momento, e apenas trabalhos referentes ao potencial bioherbicida desenvolvidos no Laboratório “Biotec Factory” foram encontrados na literatura. Com base nesse contexto, surge o grande interesse em investigar a produção de biopolímeros pela espécie *Phoma dimorpha*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o potencial de produção de biopolímeros intra e extracelulares a partir da fermentação submersa do fungo *Phoma dimorpha*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de biopolímeros extracelulares por meio de métodos convencionais de recuperação: precipitação ácida e precipitação alcoólica;
- Concentrar os biopolímeros extracelulares utilizando diferentes técnicas de concentração: filtração por membrana de fibra oca (micro e ultrafiltração) e adsorção (carvão ativado, sílica e nanotubos de carbono);
- Extrair os biopolímeros intracelulares utilizando diferentes metodologias de extração: convencional (água quente e autoclave), ultrassom (sonicação direta e indireta) e água quente pressurizada;
- Comparar os mecanismos de extração dos biopolímeros intracelulares por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das biomassas miceliais residuais;
- Caracterizar os biopolímeros intracelulares por meio das análises: espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (XRD), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e análise termogravimétrica (TGA);
- Determinar a fonte de carbono adicional mais apropriada para produção dos biopolímeros;
- Investigar a relação dos biopolímeros com a atividade bioherbicida do caldo fermentado, por meio de bioensaios em folhas de *Cucumis sativus*;
- Analisar o efeito dos biopolímeros na tensão superficial do caldo fermentado;
- Avaliar as propriedades de solubilidade, capacidade de retenção e índice de emulsificação dos biopolímeros.

1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO

Nesta tese de doutorado, as etapas de desenvolvimento do projeto estão apresentadas em 6 capítulos. Neste **Capítulo 1 – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO** – são apresentados, resumidamente, o tema principal do trabalho, os objetivos pretendidos e as etapas envolvidas para a sua realização. As principais atividades

realizadas são apresentadas na Figura 1.1. A parte experimental da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório “Biotec Factory” (Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química), com exceção dos experimentos de extração com água pressurizada desenvolvidos no LAPE (Laboratório de Engenharia de Processos Agroindustriais) e de algumas análises de caracterização desenvolvidas no LabMIP (Laboratório de Manejo Integrado de Pragas) e no CADEQ (Central Analítica do Departamento de Engenharia Química).

No **Capítulo 2** – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – encontra-se uma revisão da literatura, evidenciando os conceitos fundamentais que norteiam este trabalho.

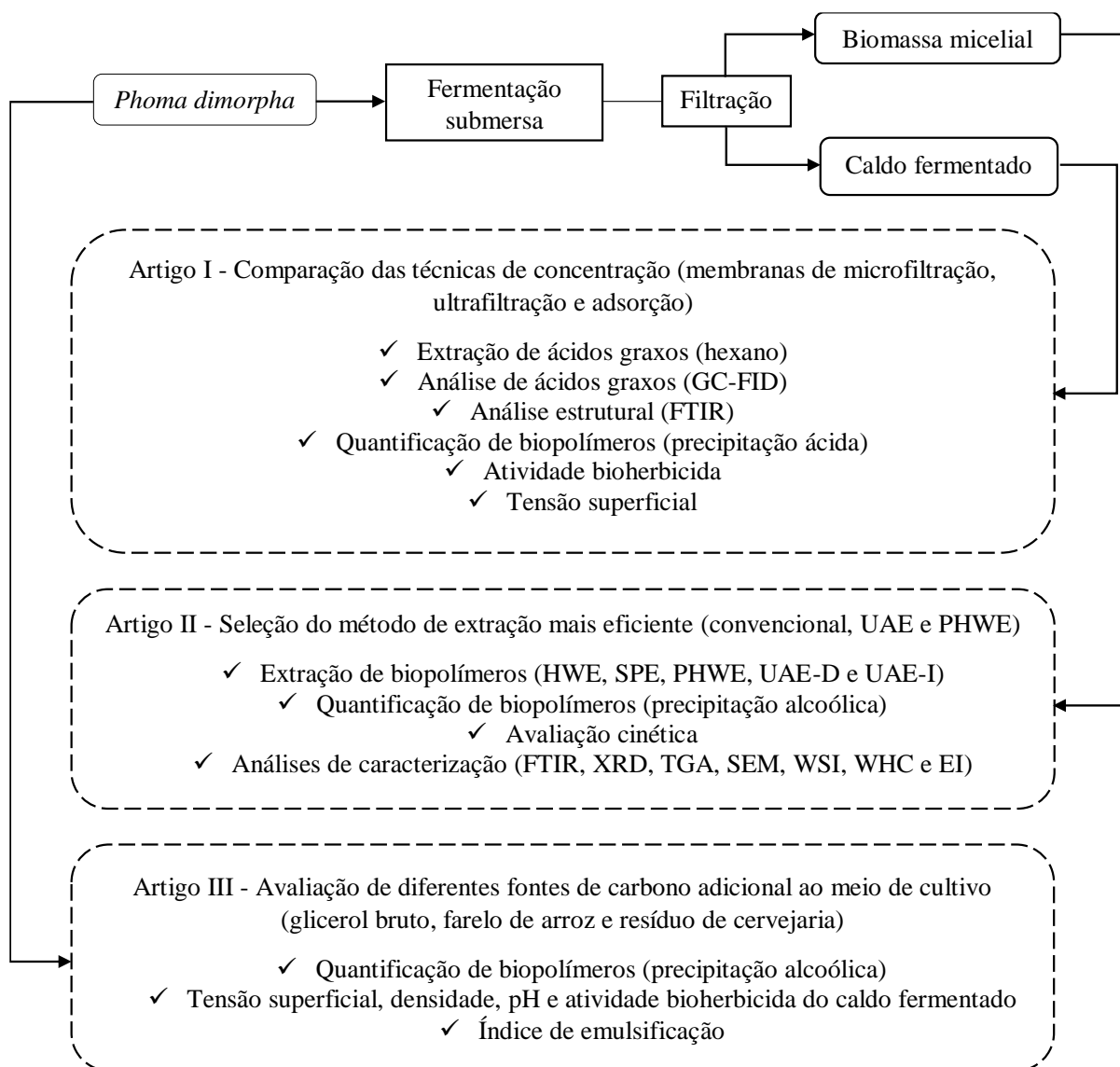
No **Capítulo 3** – ARTIGO I – são apresentados os resultados experimentais do artigo intitulado *Different techniques for concentration of extracellular biopolymers with herbicidal activity produced by Phoma sp.*, que teve como objetivo a utilização dos métodos de concentração com membranas e adsorventes para concentração de biopolímeros extracelulares com aplicação bioherbicida produzidos pelo fungo *Phoma sp.*

No **Capítulo 4** – ARTIGO II – são apresentados os resultados experimentais do artigo intitulado *Extraction and characterization of polysaccharide-enriched fractions from Phoma dimorpha mycelial biomass*, que teve como objetivo a utilização de diferentes métodos de extração na recuperação de biopolímeros presentes na biomassa micelial do fungo *Phoma dimorpha*.

No **Capítulo 5** – ARTIGO III – são apresentados os resultados experimentais do artigo intitulado *Agro-industrial residues as additional carbon sources on production of bioemulsifier compounds from Phoma dimorpha*, que teve como objetivo produzir biopolímeros intra e extracelulares com propriedades bioemulsificantes, usando resíduos agroindustriais como fonte adicional de carbono.

No **Capítulo 6** – CONSIDERAÇÕES FINAIS – são discutidos os principais resultados do trabalho. Esse capítulo reúne as informações mais relevantes obtidas nos capítulos 3 a 5, as conclusões gerais, bem como apresenta algumas sugestões de pesquisas futuras.

Figura 1.1 - Representação esquemática das principais atividades realizadas nesta tese.



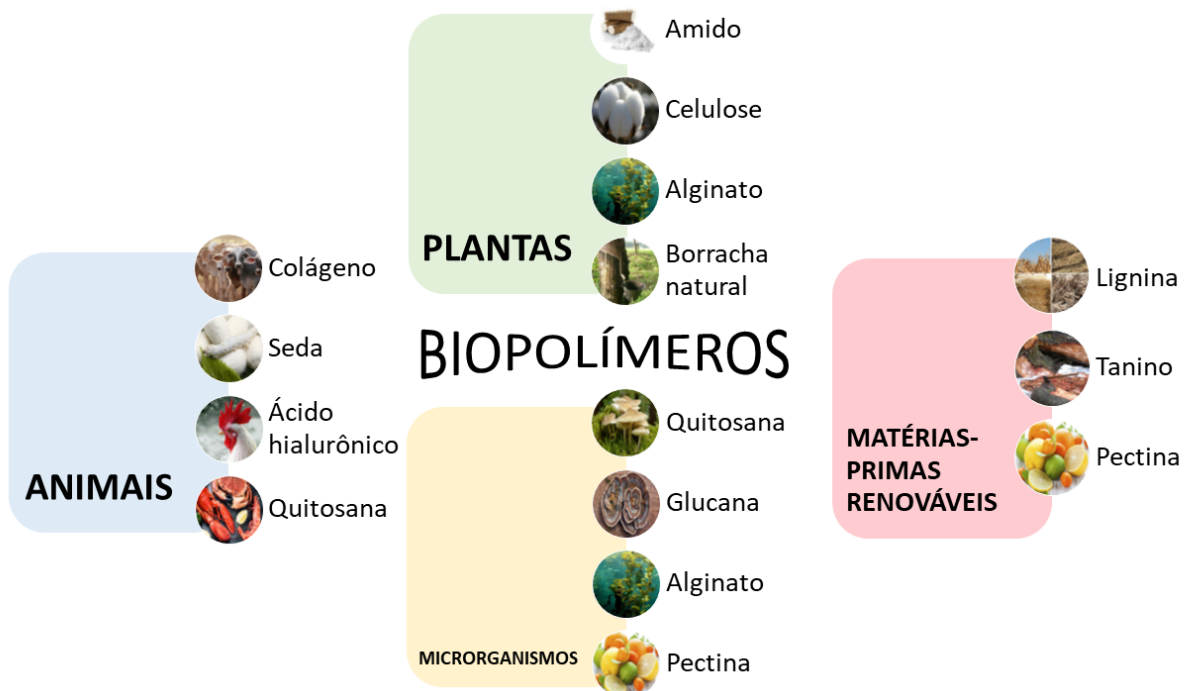
GC-FID: Cromatografia gasosa com detector por Ionização de Chama; FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; UAE: Extração assistida por ultrassom; PHWE: Extração com água quente pressurizada; HWE: Extração com água quente; SPE: Extração pressurizada a vapor; UAE-D: Extração assistida por ultrassom com sonicação direta; UAE-I: Extração assistida por ultrassom com sonicação indireta; XRD: Difração de raios-X; TGA: Análise termogravimétrica; SEM: Microscopia eletrônica de varredura; WSI: Índice de solubilidade em água; WHC: Capacidade de retenção de água; EI: Índice de emulsificação.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros naturais, ou seja, moléculas de natureza orgânica de alta massa molecular que contêm unidades monoméricas ligadas entre si por meio de ligações covalentes. Tais moléculas são produzidas por sistemas biológicos (Figura 2.1) como plantas (KORA; SASHIDHAR; ARUNACHALAM, 2012), animais (RANGANATHAN; BALAGANGADHARAN; SELVAMURUGAN, 2019), microorganismos (QUINTANA-QUIRINO et al., 2019) ou extraídas a partir de matérias-primas de fontes renováveis (JOYE, 2019). O termo "biopolímero" também é usado para descrever moléculas que são sintetizadas quimicamente, mas são derivadas de materiais biológicos de partida, como aminoácidos, açúcares, gorduras naturais ou óleos (CHANCHAL et al., 2014). Em síntese, uma grande variedade de materiais pode ser descrita como "biopolímeros" (Tabela 2.1).

Figura 2.1– Biopolímeros produzidos a partir de diferentes fontes biológicas.



Fonte: Adaptado de Luft et al. (2020).

O crescente interesse pelos biopolímeros é resultado de dois fatores. O primeiro, de caráter ambiental e socioeconômico, surgiu devido aos grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e de refino utilizados na produção dos polímeros provenientes do petróleo, como também o alto preço e escassez do mesmo. E o segundo fator preponderante é a biodegradabilidade que esses compostos apresentam, diferente dos polímeros produzidos a partir do petróleo (BRITO et al., 2011). Recentemente, a nova maneira de usar materiais à base de biopolímeros proporcionou um desenvolvimento progressivo para a bioeconomia e a biotecnologia sustentável (BILAL; IQBAL, 2019).

Tabela 2.1– Lista parcial de biopolímeros.

Biopolímeros	
Poliésteres	Polissacarídeos (plantas/algas)
Polihidroxicanoatos	Amido (amilose/amilopectina)
Ácido polilático	Celulose
Proteínas	Ágar
Sedas	Alginato
Colágeno/Gelatina	Carragenina
Elastina	Pectina
Resilina	Konjac
Adesivos	Gomas (por exemplo, guar)
Poli aminoácidos	Polissacarídeos (animal)
Soja, zeína, glúten de trigo, caseína	Quitina/quitosana
Albumina sérica	Ácido hialurônico
Polissacarídeos (bacterianos)	Lipídeos/surfactantes
Xantana	Acetoglicérides, ceras, surfactantes
Dextrana	Emulsana
Gelana	Polifenóis
Curdulana	Lignina
Poligalactosamina	Tanino
Celulose (bacteriana)	Ácido Húmico
Polissacarídeos (fúngicos)	Polímeros Especiais
Pululana	Goma-laca
Elsinana	Ácido poligamaglutâmico
Glucanas levedura	Borracha natural
	Polímeros sintéticos de gorduras e óleos naturais

Fonte: Adaptado de US CONGRESS (1993).

Os microrganismos são de grande importância na produção de biopolímeros. Em relação aos biopolímeros de origem vegetal e animal, os biopolímeros microbianos apresentam algumas vantagens, tais como a reprodutibilidade e estabilidade das propriedades físico-químicas, além

da possibilidade do uso de diferentes matérias-primas (VENDRUSCOLO et al. 2004). Os biopolímeros microbianos podem ser produzidos pelo cultivo de microrganismos (bactérias, leveduras ou fungos) ou, na sua ausência, por via enzimática, através de inativação e lise celular, utilizando enzimas purificadas (MOREIRA; DEL PINO; VENDRUSCOLO, 2003; MOREIRA et al., 2005). Os microrganismos sintetizam uma grande variedade de polímeros intracelulares, estruturais e extracelulares, também chamados de biopolímeros por sua função e sobrevivência (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013).

Os fungos ganharam reconhecimento global por seu uso disseminado em muitos setores industriais, como alimentos, agricultura, produtos químicos, medicamentos e energia. Algumas propriedades flexíveis de fungos, como biocompatibilidade e renovabilidade, oferecem funcionalidades significativas para aplicações polivalentes (BILAL; IQBAL, 2019). De acordo com Donot et al. (2012), alguns fungos são capazes de produzir biopolímeros em concentração superior a 40 g/L em condições simples de produção, competindo assim com os polissacarídeos tradicionais. Alguns biopolímeros podem substituir diretamente materiais sintéticos em aplicações clássicas, como a escleroglucana (CASTILLO; VALDEZ; FARIÑA, 2015) e a pululana (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017), enquanto outros têm propriedades únicas que podem abrir uma gama de novas oportunidades de negócios como o ácido poli(β ,L-málico) (ZOU et al., 2019).

O processo metabólico dos microrganismos para a produção desses compostos é a fermentação, que pode ser no estado sólido ou submersa. Tecnicamente, a fermentação submersa é mais viável para a produção industrial em larga escala porque o período de produção é mais curto, em torno de 1 a 2 semanas (ZHANG et al., 2019). Os biopolímeros microbianos obtidos por fermentação submersa incluem vários compostos e podem ser divididos em duas classes principais: compostos de alto peso molecular, como heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas, lipoproteínas ou complexos de componentes chamados coletivamente de bioemulsificantes (KOURMENTZA et al., 2019); e uma grande variedade de estruturas químicas de baixo peso molecular, incluindo glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos polissacarídeo-proteína poliméricos, ácidos graxos e fosfolipídeos, denominados biossurfactantes (KOPSAHELIS et al., 2018).

Os termos “bioemulsificante” e “biossurfactante” têm sido frequentemente usados indistintamente para descrever compostos tensoativos. No entanto, existem diferenças entre eles, especialmente com base em suas propriedades físico-químicas e funções fisiológicas. Ambas as classes são anfifílicas por natureza e exibem funções individuais na natureza (UZOIGWE et al., 2015). A primeira classe refere-se a polímeros polifílicos, que geralmente

são mais eficazes na estabilização de emulsões de óleo em água. A segunda classe inclui moléculas que podem reduzir de forma eficiente a tensão superficial nas interfaces ar/água e a tensão interfacial nas interfaces óleo/água (BANAT et al., 2010).

2.1.1 Biopolímeros fúngicos com propriedades bioemulsificantes

Emulsificantes podem ser produzidos por síntese química ou metabolismo microbiano (bioemulsificantes). Os bioemulsificantes são considerados compostos químicos versáteis capazes de estabilizar emulsões óleo em água e são muito importantes em diversas aplicações industriais (ALVAREZ et al., 2018). Eles também são conhecidos como biopolímeros ou polissacarídeos de alto peso molecular. Mesmo em baixas concentrações, essas moléculas podem emulsionar com eficiência dois líquidos imiscíveis, mas são menos eficazes na redução da tensão superficial. A combinação de componentes de polissacarídeo, ácido graxo e proteína em bioemulsificantes confere a eles melhor potencial emulsificante (UZOIGWE et al., 2015). O bioemulsificante mais estudado é o Liposan, produzido por *Candida lipolytica* (entre outros) (PESSÔA et al., 2019), o qual é composto por aproximadamente 83% de carboidratos e 17% de proteínas (complexo polissacarídeo-proteína). A porção de carboidrato é um heteropolissacarídeo que consiste em glicose, galactose, galactosamina e ácido galacturônico (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985).

2.1.1.1 Polissacarídeos fúngicos

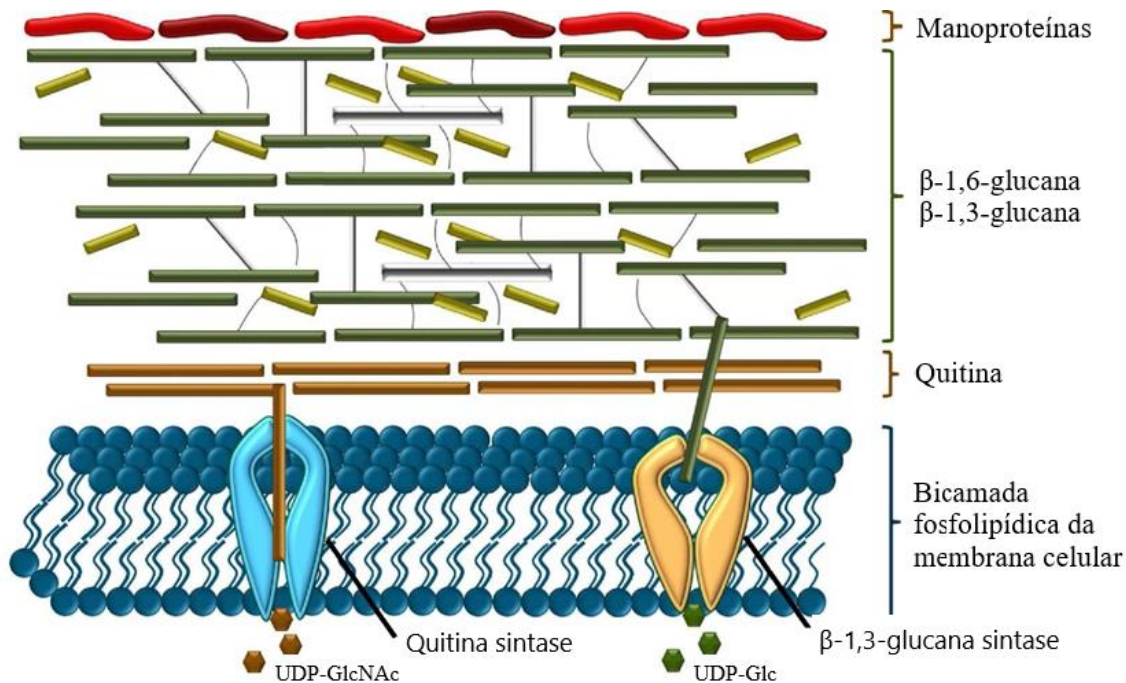
Polissacarídeos são importantes produtos naturais presentes em microrganismos, animais e plantas, e apresentam múltiplas estruturas bioquímicas (YILDIZ; KARATAS, 2018). Os polissacarídeos são o grupo mais abundante de biopolímeros e estão envolvidos em uma série de processos biológicos devido às suas características únicas (KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018). Polissacarídeos fúngicos, também chamados de gomas, são substâncias hidrofílicas capazes de se dissolver ou se dispersar em água e, como consequência, aumentar a viscosidade de um sistema (BARRETO et al., 2011). Há um número crescente de relatos recentes sobre novos polissacarídeos fúngicos secretados por produtores pertencentes a diferentes espécies que possuem atividades biológicas diversas, conforme listado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2– Polissacarídeos fúngicos: espécies produtoras, caracterização química e atividade potencial.

Cepas fúngicas	Tipo de polissacarídeo	Composição de açúcar	Atividade	Referência
Exopolissacarídeo				
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Heteroglucana	Ramnose, glicose	Antioxidante	Zhao et al. (2017)
<i>Aspergillus terreus</i>	Homopolissacarídeo	Manose	Antitumor	Li H. et al. (2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	Heteropolissacarídeo	Galactose, manose	Antioxidante	Wang et al. (2013)
<i>Diaporthe sp.</i>	Heteroglucana	Galactose, glicose, manose	Antitumor	Orlandelli et al. (2017)
<i>Fusarium equiseti</i> ANP2	Heteroglucana	Glicose, manose	Antioxidante	Prathyusha; Mohana Sheela; Bramhachari (2018)
<i>Lachnum YM405</i>	Heteroglucana	Galactose, glicose, manose, ramnose	Imunorreguladora	He et al. (2014)
<i>Lachnum YM240</i>	Heteropolissacarídeo	Galactose, manose	Antioxidante, hipoglicêmica	Wang et al. (2018)
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Heteroglucana	Glicose, manose	Antimicrobiana, antioxidante, imunomoduladora	Kumar; Mongolla; Pombala (2018)
<i>Lentinus giganteus</i>	Heteroglucana	Galactose, glicose, manose	Antitumor	Tian et al. (2016)
<i>Pleurotus geesteranus</i>	Heteroglucana	Arabinose, galactose, glicose, manose, ramnose, xilose	Anti-inflamatória, hepatoprotetiva, antioxidante	Song et al. (2018)
Intrapolissacarídeo				
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Heteroglucana	Galactose, glicose, manose, ramnose, xilose	Antioxidante	Hao et al. (2016)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Heteroglucana	Galactose, glucose, arabinose, manose, ramnose, xilose	Antioxidante	Li K. et al. (2016)
<i>Pleurotus eryngii</i> SI-04	Heteroglucana	Ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose	Antioxidante, hepatoprotetiva	Zhang et al. (2016)
<i>Termitomyces albuminosus</i>	Heteroglucana	Ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose	Anti-hiperlipidêmica, hepatoprotetiva, antioxidante	Zhao et al. (2016)
<i>Trametes versicolor</i>	Heteroglucana	Glicose, manose, galactose	Antitumor	Wang et al. (2017)
<i>Coprinus comatus</i>	Heteropolissacarídeo	Manose, galactose, xilose	Antioxidante, hipoglicêmica	Cao et al. (2019)
<i>Cordyceps kyushuensis</i> JY1A	Heteroglucana	Frutose, manose, ramnose, galactose, glicose, arabinose	Antioxidante	Zhang et al. (2015)

A produção biotecnológica de polissacarídeos ocorre por fermentação submersa intracelularmente (intrapolissacarídeos, IPS) ou extracelularmente (exopolissacarídeos, EPS). Isso acarreta diversas consequências quanto às limitações dos processos de produção e *downstream* para obtenção dos biopolímeros no estado purificado (AKILA, 2014). A síntese e o acúmulo ocorrem geralmente após a fase de crescimento ou quando o microrganismo se encontra em condições ambientais desfavoráveis, representando uma estratégia metabólica para sua sobrevivência (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Essas macromoléculas são classificadas de acordo com sua localização no organismo produtor: polissacarídeos citosólicos (fontes de carbono e energia para a célula), polissacarídeos da parede celular e polissacarídeos secretados no meio extracelular durante o crescimento chamados exopolissacarídeos (EPS). A parede fúngica (Figura 2.2) é uma estrutura heterogênea composta por lipídios e polissacarídeos como quitina, 1,3- β -glucana e 1,6- β -glucana (LEE et al., 2013). EPS e IPS são polissacarídeos de cadeia longa contendo unidades repetidas, ramificadas, de açúcar ou derivados de açúcar, como glicose, frutose, manose e galactose, entre outros (ISMAIL; NAMPOOTHIRI, 2010).

Figura 2.2– Visão esquemática geral da composição da parede celular do fungo.



A parede celular do fungo consiste principalmente em quitina (marrom) localizada perto da membrana celular, β -1,3- e β -1,6-glucana (verde) adjacente às fibras de quitina e manoproteínas (vermelho) como a parte mais externa da parede celular. A quitina é sintetizada pela transferência de resíduos de N-acetilglucosamina da uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc; hexágono marrom) para uma fibra em crescimento que é

transportada através da membrana celular pela quitina sintase transmembrana (azul claro). A β -1,3-glucana é sintetizada por uma β -1,3-glucana sintase (amarelo) que usa difosfato de uridina-N-glicose (UDP-Glc; hexágono verde) como um doador para transferir glicose para a fibra extrudada β -1,3 glucana (reproduzida com permissão). Fonte: Adaptado de Fesel; Zuccaro, (2016).

As propriedades e estruturas químicas dos polissacarídeos, como tipo de ligação, composição do monossacarídeo e peso molecular, são geralmente avaliadas por diferentes análises experimentais, incluindo tecnologias cromatográficas, como cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e cromatografia de permeação em gel, bem como análises de espectro, como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e espectroscopia de ressonância magnética nuclear 1D e 2D (LI H. et al., 2016, LI K. et al., 2016; ZHANG et al., 2015). A Tabela 2.2 mostra que os polissacarídeos são principalmente heteroglucanas, mas no caso dos homopolissacarídeos, a glicose e a manose são seus únicos monômeros. O conteúdo de açúcar é variado, enquanto glicose, manose e galactose são a maioria, outros monômeros de xilose, ramnose, arabinose e frutose também têm sido frequentemente encontrados em polissacarídeos de fungos.

Entre as principais propriedades bioativas desses polissacarídeos estão as atividades antioxidante, antitumoral, hepatoprotetora, imunomoduladora e hipoglicêmica. Tais atividades fornecem a esses compostos um grande potencial para aplicação medicinal (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015). Há apenas um relato na Tabela 2.2 que descreve a atividade antimicrobiana (KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018). Os autores identificaram uma cepa (*Lasiodiplodia* sp. B2) produtora de EPS (Lasiosan), caracterizada como glucomanana com resíduos de glicose e manose. Os resultados sugeriram que o Lasiosan exibiu atividades antibacterianas e antifúngicas de amplo espectro contra várias cepas bacterianas e fúngicas patogênicas testadas. As propriedades bioativas dos polissacarídeos são conhecidas por depender de uma variedade de fatores, incluindo a estrutura, componentes dos monossacarídeos, peso molecular, conformação, configuração das ligações glicosídicas e métodos de extração e isolamento (LI; JIANG; GUAN, 2010; ZHOU; CHEN, 2011).

2.1.1.1.1 Glucanas

As glucanas são polissacarídeos frequentemente presentes em organismos vivos e são os polissacarídeos mais abundantes nas paredes celulares dos fungos. São polímeros constituídos por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo alfa ou beta, com estruturas altamente variáveis. As glucanas têm estrutura química complexa (linear ou ramificada e amorfa ou microfibrilar) que desempenham várias funções fisiológicas (KHAN et al., 2018; RUIZ-HERRERA; ORTIZ-CASTELLANOS, 2019). Em geral, algumas α -glucanas são amorfas e solúveis em água quente (glicogênio em fungos e animais e amido em algas e plantas), mas aquelas presentes nas paredes dos fungos são insolúveis em água e microfibrilares. Na maioria dos fungos, o polissacarídeo mais abundante da parede celular é a β -glucana (estrutura mais complexa). A maioria das β -glucanas é insolúvel em água e quase todos os solventes, são preferencialmente cristalinas e podem formar microfibrilas (celulose nas plantas e diferentes β -1,3 glucanas nos fungos). Em contraste com α -glucanas, as classes de β -glucanas fúngicas são mais abundantes e suas estruturas são mais variáveis (RUIZ-HERRERA; ORTIZ-CASTELLANOS, 2019). Em fungos filamentosos, a síntese de β -glucana ocorre na ponta das hifas e nas laterais do crescimento e ramificação celular (FESEL; ZUCCARO, 2016). Algumas glucanas fúngicas foram modificadas quimicamente para obter derivados solúveis em água de potencial importância industrial ou medicinal (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

Recentemente, a β -glucana e a manoproteína, que são componentes da parede celular fúngica, têm recebido atenção considerável. A manoproteína demonstrou ser um bioemulsificante eficaz. Da mesma forma, a capacidade da β -glucana como bioemulsificante para formar emulsões estáveis com óleos vegetais sugere aplicações potenciais como aditivos alimentares e produtos farmacêuticos (DIKIT et al., 2010). Algumas funcionalidades fisiológicas das β -glucanas, como solubilidade em água, viscosidade e gelificação, foram confirmadas. Conseqüentemente, elas demonstram uma ampla gama de aplicações úteis (Tabela 2.3), principalmente na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BAI et al., 2019).

Tabela 2.3– Glucanas fúngicas: áreas de aplicação, fonte e funcionalidades.

Componente	Origem	Funcionalidade	Referência
<i>Alimentos</i>			
β -glucana	Cogumelo, Oakwood Mushrooms	Reduções de colesterol e resposta glicêmica	Brennan et al. (2013)
Escleroglucana	<i>Sclerotium rolfsii</i> ATCC 201126	Agente de preservação de retrogradação em pastas de amido cozidas Melhoria reológica sinérgica de pastas à base de amido (em água e leite)	Viñarta et al. (2006)
Pululana	<i>Auerobasidium pullulans</i> CJ001	Preparação de maltotriose	Wu; Chen (2014)
<i>Medicina</i>			
β -glucana	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adjuvantes de vacinas	Mirza et al. (2017)
Escleroglucana	Não especificado	Drogas, vacinas e imunopotenciadores (combináveis com quimioterapia)	Giavasis (2014)
Pululana	Pululana	Entrega de doxorubicina ao câncer de fígado humano e células de carcinoma cervical humano	Li H. et al. (2014)
<i>Cosméticos</i>			
β -glucana	Não especificado	Efeitos de promoção da saúde da pele	Du; Bian; Xu (2014)
Escleroglucana	<i>Sclerotium rolfsii</i> ATCC 201126	Propriedades de formação de gel e filme; propriedades de suspensão de partículas; atividade emulsificante	Viñarta et al. (2006)
Pululana	Não especificado	Composições para cicatrização de feridas	Rekha; Sharma, (2007)
<i>Outros</i>			
β -glucana	Não especificado	Imunoestimulante na aquicultura de peixes e camarões	Mohan et al. (2019)
Escleroglucana	Escleroglucana	Recuperação aprimorada de óleo	Sveistrup et al. (2016)
Pululana	Não especificado	Adesivo para revestimento de papel	Singh; Saini; Kennedy (2008)

As glucanas fúngicas relevantes produzidas industrialmente são a pululana e a escleroglucana. A pululana é uma α -glucana linear secretada pelo fungo preto *Aureobasidium pullulans*. A primeira produção de polissacarídeo por *A. pullulans* foi observada por Bauer em 1938, e seu isolamento e caracterização foi após 20 anos por Bernier (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). É um polímero não mutagênico, não tóxico, não higroscópico, insípido, inodoro, solúvel em água e comestível. Devido às suas valiosas propriedades, que incluem propriedades de formação de filme e propriedades reológicas típicas, é amplamente utilizada em diversas aplicações industriais que incluem alimentos, agricultura, têxteis, cosméticos e farmacêuticos (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017). Pululana é comercializada pela Hayashibara Co., Ltd. (Japão) desde 1976, como agente espessante e revestimento comestível (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Também é usada em purificadores de hálito ou produtos de higiene oral, como Listerine® (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Uma série de outras aplicações está resumida na Tabela 2.3.

A escleroglucana é um homopolímero neutro composto de β -glucana secretado por fungos filamentosos *Sclerotium* sp.. Desde sua primeira descrição no início dos anos 1960, a escleroglucana atraiu muita atenção da academia e da indústria (SCHMID; MEYER; SIEBER, 2011). A solubilidade em água, a capacidade de viscosificação e a ampla estabilidade em relação à temperatura, pH e salinidade, tornam a escleroglucana útil para diferentes aplicações biotecnológicas e biomédicas. Foi comercializada pela primeira vez na década de 70, estando atualmente disponível sob diferentes marcas comerciais (por exemplo, Clearogel, Polytetran, Polytran FS, Actigum), para uso em aplicações como recuperação aprimorada de óleo, alimentos, cosméticos e farmacêuticos (CASTILLO; VALDEZ; FARIÑA, 2015; FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Outras aplicações de escleroglucana estão resumidas na Tabela 2.3.

2.1.1.1.2 Quitina e quitosana

A quitina é um homopolímero de resíduos de N-acetil- β -(1,4)-D-glicosamina (GlcNAc), um dos compostos mais insolúveis na natureza, obtida principalmente de crustáceos, algas e invertebrados marinhos (ROCA et al., 2012). A quitina também é amplamente distribuída em fungos, ocorrendo em ascomicetos, basidiomicetos e ficomicetos, onde é um componente das paredes celulares e membranas estruturais de micélio, caules e esporos (AKILA, 2014). A quitina fúngica é um componente estrutural essencial que confere rigidez à parede celular fúngica, para suportar desafios químicos e físicos, como a pressão osmótica interna e umidade externa (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011). Embora a quitina seja um importante

componente estrutural da parede celular do fungo, ela representa apenas 1–2% da massa seca das paredes celulares da levedura e 10–20% das paredes celulares dos fungos filamentosos. O bloco de construção mais abundante das paredes celulares dos fungos é a β -glucana, que corresponde a 50-60% do peso seco (FESEL; ZUCCARO, 2016). Na parede celular do fungo, a quitina/quitosana ocorre em duas formas, como aminoglicosídeo livre e covalentemente ligado a β -glucana (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011).

A quitosana, derivado desacetilado da quitina, é biodegradável, biocompatível e não tóxica, tem propriedades filmogênicas e é capaz de formar matrizes para o transporte de substâncias ativas (COTA-ARRIOLA et al., 2013). Geralmente, o uso de quitosana fúngica como bioemulsificante é vantajoso em comparação às contrapartes químicas, pois é atóxico e biodegradável e pode ser produzido a partir de fontes renováveis e de baixo custo. Há uma demanda crescente para a produção de quitosana a partir de fungos, uma vez que fornece propriedades físico-químicas superiores (ABDEL-GAWAD et al., 2017). A quitosana comercial é obtida de fontes de crustáceos, como caranguejos, lagostas e camarões (AKILA, 2014). Este processo tem potencial limitado para aceitação industrial devido ao fornecimento sazonal e limitado de carapaças de crustáceos, alto custo e propriedades físico-químicas inconsistentes. A produção de quitosana a partir de fungos é feita em condições controladas e pode ser obtida por fermentação simples. A extração de quitosana do micélio fornece uma rota controlável e é considerada uma abordagem verde (ABDEL-GAWAD et al., 2017). No entanto, os processos de produção de quitosana a partir de fungos não são escalonados para o nível industrial. Resíduos miceliais de processos de fermentação como fonte de quitosana fúngica ofereceriam uma fonte estável e não sazonal de matéria-prima e seriam mais consistentes em caráter e de alta qualidade (ABDEL-GAWAD et al., 2017; AKILA, 2014). A quitosana fúngica possui excelentes propriedades biológicas e químicas que podem ser usadas em uma ampla variedade de aplicações (Tabela 2.4). Outro campo importante é o desenvolvimento de matrizes baseadas em quitosana para a liberação controlada de compostos ativos em áreas como alimentação e agricultura para o controle de bactérias, vírus e fungos (COTA-ARRIOLA et al., 2013).

Tabela 2.4– Quitosanas fúngicas: áreas de aplicação, origem e funcionalidades.

Área	Origem	Funcionalidade	Referência
<i>Alimentos</i>			
	<i>Aspergillus niger</i>	Conservante	Tayel et al (2014)
	<i>Agaricus bisporus</i>	Agentes bioativos de revestimento	Wu et al. (2019)
	<i>Aspergillus niger</i>	Agente antioxidante e emulsificante	Abdel-Gawad et al. (2017)
<i>Agricultura</i>			
	<i>Rhizopus sp.</i> ; <i>Trichoderma sp.</i>	Proteção de plantas; indução de resistência	Pereira et al. (2008)
	<i>Cunninghamella elegans</i>	Biorremediação de solo	Alsharari; Tayel; Moussa (2008)
	<i>Aspergillus niger</i>	Agente antimicótico	Alshubaily (2019)
	<i>Gongronella butleri</i>	Elicitores, estimulação do crescimento da planta	Nge et al. (2006)
<i>Tratamento de água</i>			
	<i>Aspergillus niger</i>	Floculante para tratamento de águas residuais de aquicultura	Mohd Nasir et al. (2019)
	<i>Cunninghamella elegans</i>	Remoção de íons metálicos	Alsharari; Tayel; Moussa (2008)
<i>Medicina</i>			
	<i>Amylomyces rouxii</i>	Antitumoral	Almutairi et al. (2019)
	<i>Cunninghamella elegans</i>	Cicatrização de feridas	Anbazhagan;Thangavelu (2018)
<i>Cosméticos</i>			
	<i>Mucor javanicus</i>	Higiene bucal (enxaguatórios bucais)	Farias et al. (2019)
<i>Biotecnologia</i>			
	<i>Aspergillus niger</i>	Sorvente para cromatografia	Kučera (2004)

2.1.1.1.3 Exopolissacarídeos

Os polissacarídeos extracelulares ou EPS podem ser heteropolissacarídeos ou homopolissacarídeos (HE et al., 2014) e sua síntese pode ser dividida em três fases: assimilação do substrato de carbono; síntese intracelular e exsudação de polissacarídeos para o ambiente extracelular (DONOT et al., 2012). A produção de EPS está associada ao metabolismo secundário dos fungos, e sua estrutura, assim como as propriedades físico-químicas, dependem de muitos fatores, como a composição do meio de cultura e as condições de cultivo (GIENKA et al., 2016).

A presença de EPS em cultura de fungos no meio extracelular pode ser explicada por duas hipóteses. A primeira está relacionada à polimerização do EPS no espaço extracelular, após a passagem dos monossacarídeos pela parede celular do fungo. A segunda refere-se à presença de vesículas, sintetizadas no interior da célula, capazes de carregar as macromoléculas no meio extracelular, através da parede celular. Embora o conceito de vesícula usada pelos fungos para transportar produtos através da parede celular seja recente, a ideia do transporte vesicular entre a membrana celular e a parede celular está bem estabelecida. As vias de transporte vesicular podem ser uma estratégia evolutiva para que a célula fúngica seja capaz de infectar o tecido do hospedeiro, causando alterações em sua fisiologia, o que caracteriza a patogenicidade (RODRIGUES et al., 2011, 2013).

Como mencionado anteriormente, os EPS são as classes mais estudadas e importantes de polissacarídeos microbianos, consideradas moléculas potencialmente bioativas com excelentes funções biológicas, incluindo atividades antioxidante (HU et al., 2019), antitumoral (KHENI; VYAS, 2017), anti-inflamatória (PAYNICH; JONES-BURRAGE; KNIGHT, 2017) e imunomoduladora (LIU et al., 2010). O grupo de EPS compreende uma grande variedade de moléculas, possuindo propriedades específicas como modificador de textura, estabilizantes e emulsificantes (ATES, 2015), para diversas aplicações industriais, especialmente na área alimentar e médica (PESSÔA et al., 2019). Além disso, devido ao seu papel fisiológico associado à proteção da célula contra condições adversas, com formação de biofilmes e agregados celulares, os EPS apresentam possibilidades relevantes de potenciais aplicações ambientais e agrícolas, como biofertilização, biorremediação solo/água, bioproteção vegetal, tratamento de solo e águas residuais, preservação do solo e prevenção da desertificação (CHANG et al., 2015; OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015; PESSÔA et al., 2019).

Seguindo na área de agricultura, além do uso de EPS como potenciais biofertilizantes e eliciadores da resistência sistêmica de plantas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015), estudos

recentes têm mostrado a capacidade do EPS em aumentar a atividade bioherbicida de alguns caldos fúngicos. O aumento da atividade bioherbicida do caldo bruto de *Fusarium fujikuroi* foi relacionado ao EPS concentrado no meio, sugerindo que esses compostos podem aumentar a toxicidade (TODERO et al., 2020). Anteriormente, Li; Jiang e Guan (2010) já haviam relacionado a atividade antimicrobiana do EPS produzido pelo fungo *Hirsutella* sp. com seu potencial biopesticida. No entanto, os polissacarídeos secretados praticamente não apresentam problemas de toxicidade conhecidos, tornando-os atraentes para uso biotecnológico (LEI; FENG EDMUND, 2017). Entretanto, a busca por alternativas para melhorar a produção em larga escala de EPS ainda é necessária devido aos baixos rendimentos obtidos nos modos tradicionais de fermentação (ZHENG H. et al., 2019).

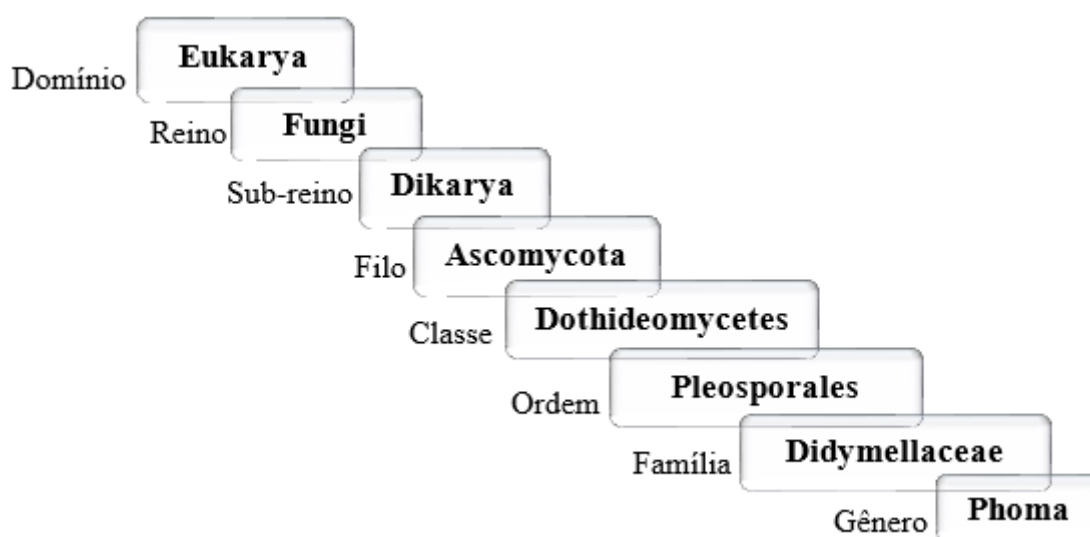
2.2 GÊNERO *PHOMA*

O gênero *Phoma* foi introduzido há cerca de 200 anos, com a primeira descrição remontando a 1821 (SUTTON, 1980). No entanto, o nome genérico foi introduzido oficialmente apenas em 1880 por Saccardo, e posteriormente publicado por Boerema e Bollen em 1975 (SACCARDO, 1880; BOEREMA; BOLLEN, 1975). No sistema Saccardo, o nome de gênero *Phoma* era aplicado a fungos filamentosos, os quais eram capazes de formar picnídios asseptados, conídios hialinos que poderiam habitar caules de plantas (AVESKAMP; GRUYTER; CROUS, 2008). Nos dias atuais, as espécies de *Phoma* podem ser identificadas como fungos filamentosos com características morfológicas, como a formação de conídios (esporos assexuados), picnídios (corpos de frutificação assexuados) e clamidosporos (células vegetativas aumentadas de parede espessa dentro das hifas ou nas pontas das hifas) (BOEREMA et al., 2004).

Phoma é um gênero polifilético de organismos fúngicos pertencentes ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família Didymellaceae (BENNETT; PONDER; GARCIA-DIAZ, 2018; VALENZUELA-LOPEZ et al., 2018). A taxonomia atual é mostrada na Figura 2.3. Normalmente, ela é considerada pelos micologistas como taxonomicamente problemática devido à natureza assexuada da maioria das espécies, a alta variabilidade morfológica *in vivo* e a vaga circunscrição genérica de acordo com o sistema Saccardo. Classicamente, tem sido agrupado na classe Coelomycetes. No entanto, esta classificação é considerada obsoleta, mas ainda é usada no ambiente clínico (VALENZUELA-LOPEZ et al., 2018). O controverso gênero está atualmente ligado a três diferentes gêneros teleomorfos. Se os teleomorfos são conhecidos, eles residem em *Didymella*, *Leptosphaeria* ou

ocasionalmente Pleospora. Essa complexidade na taxonomia é um fator complicador adicional para a identificação e diferenciação de membros do gênero *Phoma* (AVESKAMP; GRUYTER; CROUS, 2008). Embora o sistema convencional de identificação seja funcional, ele tem suas limitações. Para a classificação e identificação desses fungos, estudos morfológicos, quimiotaqueonomia, perfis de metabólito secundário e de proteína devem ser avaliados (RAI et al., 2014). Em geral, a classificação de fungos como um todo está sob revisão dinâmica devido à disponibilidade de técnicas moleculares modernas para análise de fungos no nível genômico, transcriptômico e proteômico (BENNETT; PONDER; GARCIA-DIAZ, 2018; AVESKAMP; GRUYTER; CROUS, 2008; JONES et al., 2011).

Figura 2.3– Taxonomia atual de *Phoma*.



Fonte: A autora.

Até o momento, *Phoma* é um dos maiores gêneros de fungos, com mais de 3000 nomes registrados no MycoBank, com espécies ocorrendo em mais de 25 famílias (VALENZUELA-LOPEZ et al., 2018) e o último manual de identificação publicado descreve 223 específicos e infra táxons específicos (BOEREMA et al., 2004). *Phoma* spp. constitui um grupo diverso de organismos que são onipresentes; geralmente encontrado no solo, matéria orgânica, plantas e fontes de água; incluindo numerosos patógenos de plantas, espécies endofíticas associadas a uma ampla gama de hospedeiros, sapróbios e como patógenos oportunistas de humanos e animais (BENNETT; PONDER; GARCIA-DIAZ, 2018; RAI et al., 2009).

Como mencionado, muitas das espécies do gênero *Phoma* podem ser definidas como patógenos e/ou endófitos (microbianos assintomáticos). Segundo a definição mais recente reformulada por Orlando Petrini, “todos os organismos que habitam os órgãos das plantas que em algum momento do seu ciclo de vida podem colonizar os tecidos internos das plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro”. Isso explica os organismos endofíticos que têm uma fase epifítica mais ou menos longa e os patógenos latentes que podem viver sem sintomas em seus hospedeiros por algum tempo na vida (PETRINI, 1991). Além disso, é bem conhecido que algumas cepas de microrganismos pertencentes a uma espécie patogênica bem conhecida de uma planta hospedeira específica podem até ter efeitos de promoção de crescimento em outra planta (HARDOIM et al., 2015).

Uma característica importante do metabolismo simbiótico fungo-planta é a capacidade do fungo endofítico de biossintetizar metabólitos originalmente produzidos pela planta hospedeira. Dessa forma, os fungos endofíticos podem substituir alternativamente as plantas como fontes de fármacos e produtos agroquímicos, considerando as vantagens da produção biotecnológica (CANUTO et al., 2012). As investigações químicas de *Phoma* têm revelado uma grande diversidade de metabólitos (Tabela 2.5). A maioria desses metabólitos exibe bioatividade específica, como efeitos citotóxicos (SANG et al., 2017), antimicrobianos (HUSSAIN et al., 2014) e antivirais (HERATH et al., 2009). Enquanto outras, como as fitotoxinas, apresentam grande potencial para o controle biológico de plantas daninhas, que podem ser exploradas para a produção de agrotóxicos (RAI et al., 2009). A produção de antraquinonas e de exopolissacarídeos a partir de espécies deste gênero também têm sido exploradas (RAI et al., 2009; YANG et al., 2005).

Algumas espécies endofíticas de *Phoma* são fontes promissoras de novos metabólitos com potencial citotóxico contra diversos tipos de câncer, como melanoma maligno, câncer gástrico, câncer colorretal, câncer de fígado, câncer de mama, leucemia de células T, entre outros. Wang et al. (2012) obtiveram a partir de *Phoma* (ZJWCF006) quatro compostos bioativos incluindo atividades antitumorais *in vitro* contra HT-29, SMMC-772, MCF-7, HL linhas celulares -60, MGC80-3 e P388. Entre os compostos estão a cercosporamida e a tricodermina, que têm se mostrado candidatos valiosos para a descoberta de novos fármacos na terapia do câncer. A mesma cepa apresentou atividade antimicrobiana contra quatro fungos fitopatogênicos e duas bactérias patogênicas de plantas.

Muitas investigações acerca da atividade antimicrobiana de espécies de *Phoma* têm sido realizadas. Devido ao surgimento de cepas resistentes aos tratamentos atuais de infecções microbianas e às mudanças na epidemiologia, a busca por novos medicamentos

antimicrobianos com amplo espectro e mecanismos de ação distintos vem sendo intensificada (RAI et al., 2018). Em relação à atividade antiviral, apesar da abundância de compostos potencialmente ativos isolados de fungos, nenhum destes encontra-se disponível no mercado (HYDE et al., 2019). Compostos fúngicos com atividades antivirais são menos estudados, mas o número de pesquisas está aumentando. Um grupo de fungos que tem sido foco de interesse, além dos cogumelos comestíveis e medicinais, são os fungos endofíticos, principalmente aqueles que crescem em habitats marinhos (LINNAKOSKI et al., 2018). A maioria dos estudos não está focada apenas na atividade antiviral dos compostos e a principal limitação para a descoberta do composto antiviral está provavelmente relacionada à ausência de sistemas de triagem antiviral (RAJAMANIKYAM; VADLAPUDI, 2017). Alguns compostos antivirais isolados de diferentes espécies de *Phoma* sp., como sirodesmina PL (ROUXEL et al., 1988), aphidicolin (OIKAWA et al., 1999, 2001) e Brefeldin A (BETINA, 1992) também apresentam outras atividades, como antifúngica, antibacteriana ou bioherbicida.

Algumas espécies do gênero *Phoma* destacam-se também pelo potencial na produção de pigmentos. A demanda por corantes naturais aumenta a cada dia devido aos efeitos prejudiciais de alguns corantes sintéticos. Os fungos filamentosos fornecem uma fonte alternativa disponível de pigmentos derivados naturalmente, que apresentam enormes vantagens, incluindo crescimento rápido e fácil processamento. Além do corante, os pigmentos fúngicos têm muitas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana e anticâncer (RAO; XIAO; LI, 2017). Uma gama extraordinária de pigmentos é produzida por fungos filamentosos e inclui várias classes químicas, como quinonas, carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas, monascinas, violaceína e índigo (DUFOSSÉ et al., 2014). As antraquinonas fúngicas, como metabólitos secundários derivados de policetídeos, ocorrem amplamente em muitos gêneros de fungos (HOBSON; EDWARDS; WALES, 1997). Várias espécies de *Phoma* são conhecidas por produzir pigmentos de antraquinona, que têm propriedades de tingimento de corantes e potencial para serem utilizados comercialmente (RAI et al., 2009). As cores dos pigmentos podem variar de acordo com as condições de cultivo. De acordo com Bick e Rhee (1966), a espécie *P. exigua* var. *foveata* produz pigmentos de cor amarela em meio ácido e vermelha em meio alcalino. Quando exposta à amônia, a mesma espécie produz pigmentos rosa (LOGAN; KHAN, 1969). Em ambos estudos, as antraquinonas identificadas foram paquibasina, crisofanol, emodina e fomarina.

Tabela 2.5 – Resumo das espécies de *Phoma* relatadas com atividades citotóxica, antimicrobiana e antiviral.

Espécie	Origem	Composto bioativo	Atividade	Referência
<i>Phoma</i> sp.	<i>Ectyplasia perox</i>	Epoxifomalina A e B	Citotóxica	Mohamed et al. (2009)
<i>Phoma betae</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina, (22E,24R)-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	Citotóxica	Gallo et al. (2009)
<i>Phoma herbarum</i> <i>Phoma medicaginis</i>	<i>Aquilaria sinensis</i>	Brefeldina A	Citotóxica	Cui et al. (2011)
<i>Phoma</i> ZJWCF006	<i>Arisaema erubescens</i>	Cercosporamida e tricolormina	Citotóxica	Wang et al. (2012)
<i>Phoma</i> sp.	<i>Nemopilema nomurai</i>	Derivados da citocalasina e citocalasina B	Citotóxica	Kim et al. (2012)
<i>Phoma betae</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Taxol	Citotóxica	Kumaran et al. (2012)
<i>Phoma</i> sp.	<i>Cinnamomum mollissimum</i>	5-hidroxiramulosina	Citotóxica	Santiago et al. (2012)
<i>Phoma</i> sp. PT01	<i>Mitragyna javanica</i>	-	Citotóxica	Pharamat et al. (2013)
<i>Phoma</i> sp. OUCMDZ-1847	<i>Kandelia candel</i>	Fomazinas A-C	Citotóxica	Kong et al. (2014)
<i>Phoma multirostrata</i> EA-12	<i>Eupatorium adenophorum</i>	Multirostratina A, 20-oxo-desoxafomina	Citotóxica	Chen et al. (2015)
<i>Phoma</i> sp. YN02-P-3	<i>Sumbaviopsis</i> J. J. Smith	3,4-dihidronaftalen-1 (2H) -ona com espiro-butirilactona fomol	Citotóxica	Sang et al. (2016)
<i>Phoma</i> sp. CZD-F11	Sediment (unidentified)	Ciperin-2-O-@-D- glucosídeo	Citotóxica	Wu X. et al. (2018)
<i>Phoma</i> sp.	Depth of Bering Sea	Ergosterol, peróxido de ergosterol e peróxido de 9,11-desidroergosterol	Citotóxica	Wu H. et al. (2018)

<i>Phoma</i> sp. NG-25	<i>Saurauia scaberrinae</i>	Ácido úsnico, cercosporamida, fomodiona, ácido e θ - pseudoplacodiólico	Antifúngica	Hoffman et al. (2008)
<i>Phoma</i> sp. 8874	<i>Lycium intricatum</i>	Pirenoforol (macrodiolida), (-) - dihidropirenoforina	Antifúngica e antibacteriana	Zhang et al. (2008)
<i>Phoma</i> sp. F-224,939	Solo	Fomafungina (lipodepsipeptídeo cíclico)	Antifúngica	Herath et al. (2009)
<i>Phoma herbarum</i> VB7	Mangrove plant	Dibutil ftalato, mono (2etilhexil) ftalato	Antibacteriana	Bhimba et al. (2012)
<i>Phoma</i> sp.	<i>Cinnamomum mollisimum</i>	5-hidroxiramulosina (policetida)	Antifúngica e antibacteriana	Santiago et al. (2012)
<i>Phoma</i> sp. ZJWCFOO6	<i>Arisaema erubescens</i>	(3S) -3,6,7-trihidroxi- α -tetralona, cercosporamida, β -sitosterol e tricodermina	Antifúngica	Wang et al. (2012)
<i>Phoma</i> sp. 6282	<i>Fucus serratus</i>	Fomafuranol (dihidrofurano), fomalactona, (3R) -5-hidroximelina e emodina	Antifúngica e antibacteriana	Hussain et al. (2014)
<i>Phoma</i> sp.	<i>Cinnamomum mollisimum</i>	4-hidroximelina (policetídeo), 4,8-di-hidroxi-6-metoxi-3- metil-3,4-di-hidro-1H-isocromen-1-ona (benzopirano) e 1- (2,6-di-hidroxifenil) etanona (policetídeo)	Antifúngica e antibacteriana	Santiago et al. (2014)
<i>Phoma</i> sp. 7133	<i>Senecio kleinii</i>	Esclerodina, 8,9-di-hidro-3,5,7-tri-hidroxi-1,8,8,9-tetrametil-5- (2-oxopropil) -4H-fenaleno [1, 2-b] furano-4,6 (5H) -diona, atrovenetinona e esclerodiona	Antifúngica e antibacteriana	Hussain et al. (2015)
<i>Phoma</i> sp. L28	<i>Myoporum bontioides</i> A. Gray (mangrove plant)	7- (γ , γ) -dimetilaliloximacrosporina (antraquinona), macrosporina, 7-metoximacrosporina, tetrahidroaltersolanol B, altersolanol L e ampelanol	Antifúngica	Huang et al. (2017)
<i>Phoma</i> sp.	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	Fomanolida (sesquiterpenóide do tipo 14-nordrimane), 7 hidroxi-3, 5-dimetil-isocromen-1-ona	Antiviral	Liu et al. (2019)
<i>Phoma multirostrata</i> XJ2-1	<i>Parasenecio albus</i>	Ergocitocalasina A	Antiviral	Peng et al. (2020)

2.2.1 *Phoma* como agente de controle biológico para ervas daninhas

Vários fungos fitopatogênicos produzem toxinas metabólicas secundárias como parte de uma estratégia multifacetada para obter nutrientes de plantas. Em alguns casos, tais toxinas induzem a morte de células vegetais para liberar nutrientes ou subverter o metabolismo vegetal em benefício do fungo. Muitas toxinas seletivas do hospedeiro desempenham um papel na virulência, enquanto o papel das toxinas não seletivas do hospedeiro na virulência é mais complexo e a produção de toxinas nem sempre se correlaciona com a virulência (ELLIOT et al., 2007). Normalmente, os fungos produtores de toxinas não dependem do crescimento de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. A vantagem mais provável dos metabólitos secundários para organismos que produzem tais moléculas é que eles aumentam a sobrevivência (HOWLETT et al., 2010). De acordo com Rai et al. (2009), algumas espécies de *Phoma* secretam fitotoxinas como metabólitos secundários, os quais apresentam grande potencial para o controle biológico de plantas daninhas, podendo ser exploradas para a produção de micopesticidas e agrofitoquímicos.

Um grande número de fitotoxinas (específicas e não específicas) foram identificadas do gênero *Phoma*. Fomalida é um exemplo de fitotoxina específica (seletiva) produzida pelo agente causador da doença da perna preta de sementes oleaginosas de Brassica, uma das espécies de *Phoma* bastante estudada, *Phoma lingam* (PEDRAS; BIESENTHAL, 1998). Outra fitotoxina seletiva produzida por *Phoma lingam* também foi relatada, a fomalairdenona (PEDRAS et al., 1999). Esta espécie também produziu fitotoxinas importantes e metabólitos relacionados incluem sirodesmina PL, fomamida, desacetilsirodesmina PL, fomapirona A e anidrido de L-valil-L-triptofano (PEDRAS; BIESENTHAL, 2000). Sirodesmina PL é uma fitotoxina não seletiva e é a principal fitotoxina produzida por *Phoma lingam* (PEDRAS; SÉGUIN-SWARTZ; 1992), a qual causa lesões cloróticas nas folhas das plantas (ROUXEL et al. 1988). Outros metabólitos ativos podem ser isolados alterando a composição do meio de cultura, como 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzaldeído (PEDRAS; CHUMALA; YU, 2007) e dois substituintes 2-isociano-3-metil-2-butenoil, que foi denominada maculansina A e maculansina B (PEDRAS; YU, 2008). A maculansina A causou lesões maiores nas folhas da mostarda marrom resistente (*Brassica juncea* L.) do que na canola suscetível. Além disso, 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzaldeído foi isolado e mostrou apresentar atividade inibitória do crescimento significativa em raízes de canola e mostarda (PEDRAS; YU, 2008).

Ziniol, paquibasina e epoxidon são importantes fitotoxinas produzidas por *Phoma macdonaldii*, *Phoma foveata* e *Phoma sorghina*, respectivamente. *P. macdonaldii* é o agente

causal da doença do caule preto do girassol, uma doença amplamente observada em muitos países, responsável por danos econômicos, que causam a queima das folhas e do caule e o murchamento de mudas cortadas de plantas de girassol (ROUSTAEI et al., 2000; SUGAWARA; STROBEL, 1986). *Phoma foveata* é uma espécie que causa gangrena, que é uma lesão nos tubérculos da batata (*Solanum tuberosum*) (STRANGE, 1997). *Phoma sorghina* é a espécie causadora da necrose quando observada nas folhas da erva daninha e outras oito espécies de ervas daninhas, indicando uma natureza não específica. Além do epoxidon, cinco outros compostos fitotóxicos foram isolados, ácido 6-metilsalicílico, desoxiepoxidon, filostina, 2,3'-dihidroxi-4-metoxi-5', 6-dimetil difeniléter e éster de 6-metilsalicilato de epoxidon. Todas as seis toxinas causaram necrose, enquanto o ácido 6-metilsalicílico, epoxydon e o difeniléter também inibiram o crescimento da raiz do sorgo (VENKATASUBBAIAH et al., 1992). Essa espécie também produz ácido tenuazônico (TeA), um derivado do ácido tetrâmico, na forma de quelatos de Mg e Ca (STEYN; RABIE, 1976). Zhou e Qiang (2008) estudaram o efeito deste composto no crescimento e conteúdo de clorofila total de *Chlamydomonas reinhardtii*. A inibição do crescimento e do conteúdo de clorofila foi observada com o aumento das concentrações de TeA (> 100 µg/mL).

Putaminoxina, a principal fitotoxina isolada de *Phoma putaminum*, foi caracterizada como (5S) 5-hidroxi-9-propil-6-nonen-9-olídeo, um macrolídeo com uma ampla faixa de toxicidade (EVIDENTE et al., 1995). Os autores investigaram a toxicidade da putaminoxina contra espécies de ervas daninhas e em plantas cultivadas não hospedeiras. Mostrou uma gama de toxicidades, *Ocimum basilicum* e *Citrus aurantium* estando entre os menos sensíveis e *Mercurialis annua* o mais sensível. No entanto, a toxicidade observada em *Annual fleabane* foi a mais severa. Posteriormente, novos nonenolídeos, isolados de *Phoma putaminum*, juntamente com alguns de seus análogos naturais e derivados sintéticos, foram usados em um estudo de relação estrutura-atividade. A putaminoxina provou ser o composto mais tóxico entre os análogos e derivados da putaminoxina (EVIDENTE et al., 1998).

Devido ao grande número de fitotoxinas produzidas pelas espécies de *Phoma*, este gênero é um dos mais citados nas pesquisas científicas sobre bioherbicidas (15%), igualmente o gênero *Fusarium* sp. (15%) e após *Colletotrichum* sp. (30%) (KLAIC et al., 2015). O processo de desenvolvimento de um bioherbicida é complexo e os grupos de pesquisa em proteção de cultivos devem considerar várias questões. Uma propriedade desejável das fitotoxinas microbianas é a seletividade de espécies embutida devido ao seu isolamento de patógenos de plantas específicos e hospedeiros de ervas daninhas (SAXENA; PANDEY, 2001). Algumas tentativas de avaliar essas fitotoxinas como bioherbicidas têm sido relatadas (Tabela 2.6).

Phoma exigua, *Phoma macrostoma* e *Phoma herbarum* são três espécies extensivamente estudadas como agentes herbicidas eficazes. *P. exigua* var. *exigua* e *P. exigua* var. *heteromorpha* produz várias citocalasinas fitotóxicas, como exemplo, ascocalasina, deoxafomina, proxifomina, profomina, citocalasinas A, B, C, D, E, F, H, J, T, U, V, W, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 e 7-O-acetilcitocalasina B (BINDER; TAMM, 1973; CAPASSO; EVIDENTE; VURRO, 1991; EVIDENTE et al., 1992; 1996; 2003, SCOTT et al., 1975). As citocalasinas constituem um grande grupo de metabólitos produzidos por uma variedade de espécies de fungos e, embora o primeiro metabólito tenha sido descoberto há mais de 30 anos, esses compostos ainda são amplamente estudados por suas atrativas propriedades biológicas e aplicações potenciais como antibióticos, farmacêuticos ou produtos herbicidas (EVIDENTE et al., 2003). O potencial micoherbicida desses agentes de biocontrole foi estudado por Cimmino et al. (2008). As fitotoxinas produzidas foram p-hidroxibenzaldeído, citocalasinas B, F, Z2 e Z3 e deoxafomina, e seu efeito contra ervas daninhas perenes, como *Cirsium arvense* e *Sonchus arvensis*, foram verificados. O p-hidroxibenzaldeído foi inativo quando testado nas folhas de *C. arvense* e *S. arvensis*, enquanto a citocalasina Z2 pareceu ser a citocalasina menos tóxica em ambas as plantas, e a deoxafomina demonstrou ser a citocalasina mais tóxica nas folhas de *S. arvensis*.

Cerca de duas décadas atrás, descobriu-se que dez isolados de *Phoma macrostoma* Montagne tinham efeitos bioherbicidas (clorose e morte de mudas) em várias pragas de ervas daninhas de folha larga, incluindo cardo do Canadá, dente de leão, erva-de-bico e camomila sem cheiro (BAILEY; DERBY, 2001). Mais tarde, *P. macrostoma* 94-44B foi testado contra diversas espécies não-alvo e economicamente importantes na agricultura, horticultura, silvicultura e jardinagem, bem como ervas daninhas-alvo em potencial (BAILEY et al., 2011). Novamente, os autores concluíram que *P. macrostoma* era patogênico para muitas espécies de plantas dicotiledôneas, mas não patogênico para monocotiledôneas. As famílias de plantas mais resistentes foram Poaceae, Pinaceae e Linaceae, enquanto as plantas mais suscetíveis pertenciam a Asteraceae, Brassicaceae e Fabaceae. Sob certas condições, *P. macrostoma* produz fitotoxinas pelo micélio, conhecidas como macrocidinas, que causam retardo de crescimento de brotos e raízes juntamente com fotodegradação severa (GRAUPNER et al., 2003, 2006).

Tabela 2.6– Resumo das plantas nas quais espécies de *Phoma* foram relatadas como agentes de controle biológico.

Espécies	Planta alvo	Modo de aplicação	Efeitos	Referência
<i>P. chenopodicola</i>	<i>Mercurialis annua, Cirsium arvense, Setaria viridis</i>	Pós-emergência (punção da folha)	Lesões necróticas circulares	Cimmino et al. (2013)
<i>P. commelinicola</i>	<i>Commelina diffusa</i>	Inundativo	Mortalidade (~70%) e redução de peso seco (>80%)	Boyette; Hoagland; Stetina (2015)
<i>P. exigua var. exigua</i>	<i>Sonchus arvensis, Cirsium arvense</i>	Pós-emergência (punção da folha)	Necrose	Cimmino et al. (2008)
<i>P. exigua var. exigua</i>	<i>Gaultheria shallon</i>	Pós-emergência	Supressão de crescimento e 56% da morte da biomassa total	Zhao; Shamoun (2006)
<i>P. herbarum</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Placa de Petri	Inibição do crescimento da radícula	Rivero-Cruz et al. (2003)
<i>P. herbarum</i>	<i>Taraxacum officinalis</i>	Pós-emergência	100% doença severa	Neumann; Boland (2002)
<i>P. herbarum</i>	<i>Parthenium hysterophorus, Lantana camara, Hyptis suaveolens, Sida acuta</i>	Pós-emergência (folha destacada)	Clorose, ondulação e colapso completo	Kalam; Khan; Singh (2014)
<i>P. macrostoma</i>	<i>Lactuca sativa, Brassica rapa, Taraxacum officinale, Gnaphalium pensylvanicum, Sinapis arvensis, Oxalis stricta, Polygonum convolvulus</i>	Pre e pós-emergência	81, 91, 92, 100, 61, 79, 95% mortalidade	Bailey et al. (2011)
<i>P. macrostoma</i>	<i>Senecio vulgaris, Lamium amplexicaule</i>	Pre e pós-emergência	>80% clorose e >87% redução	Neal; Shew; Schiavone (2013)
<i>P. macrostoma</i>	<i>Taraxacum officinale, Aster subulatus, Malva neglecta, Portulaca oleracea, Medicago polymorpha, Sonchus oleraceus</i>	Pós-emergência (foliar granular)	Alguma extensão de clorose e necrose	Smith et al. (2015)
<i>P. macrostoma</i>	<i>Taraxacum officinale, Rorippa palustres, Cardamine flexuosa</i>	Pré-emergência (tratamento granular)	100% redução de crescimento	Wolfe; Neal; Harlow (2016)
<i>P. macrostoma</i>	<i>Taraxacum officinale, Senecio vulgaris, Cicer arietinum</i>	Pós-emergência (pulverizador)	Clorose e mortalidade	Hubbard et al. (2016)

Uma cepa de *P. herbarum* causou mais de 90% de inibição na germinação de sementes, mortalidade de plântulas e danos foliares, seguido por redução na altura da erva *Parthenium* (PANDEY et al., 1991). O fungo *P. herbarum*, isolado de uma variedade especial de milho (*Zea mays*), produziu dois novos nonenolídeos fitotóxicos, herbarumina I e herbarumina II, os quais causaram inibição significativa do crescimento da radícula de *Amaranthus hypochondriacus* (RIVERO-CRUZ et al., 2000). Vikrant et al. (2006) relataram fitotoxicidade pronunciada do filtrado de cultura livre de células de *P. herbarum* FGCC #75 contra *Parthenium hysterophorus* L., devido a um ácido 3-nitro-1,2 benzenodicarboxílico (ácido 3-nitroftálico).

2.2.1.1 *Phoma dimorpha*

Em contraste com essas espécies amplamente estudadas, algumas investigações estão surgindo sobre novas espécies com potencial bioherbicida. Há alguns anos, o Laboratório de bioprocessos “Biotec Factory”, localizado no prédio 09B e pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), vem investigando o potencial bioherbicida de uma cepa do fungo *Phoma* sp., atualmente identificada como *Phoma dimorpha*. Os estudos realizados até o momento podem ser observados na Tabela 2.7. Recentemente, Chaves Neto et al. (2020a) avaliaram a ação bioherbicida do caldo fermentado de *Phoma dimorpha* (NRRL 43879) na pré-emergência e pós-emergência de *Senna obtusifolia*. Os resultados mostraram na aplicação em pré-emergência uma inibição da germinação das sementes em 100%, enquanto nas folhas destacadas, necrose foliar e morte no nono dia após a aplicação. Na pós-emergência, a aplicação causou sintomas moderados, como manchas foliares e redução do tamanho da planta daninha. Antes da identificação da espécie, outros trabalhos foram desenvolvidos com a mesma linhagem. Primeiro, a produção de bioherbicida da cepa NRRL 43879 por fermentação em estado sólido foi otimizada. Os resultados dos bioensaios demonstraram que o bioherbicida apresentou atividade para *Cucumis sativus*, e o modo de ação foi baseado na inibição da biossíntese de carotenóides (KLAIC et al., 2017). Posteriormente, a produção de bioherbicida foi desenvolvida por fermentação submersa, resultando em inibição de 100% das sementes de *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* (TODERO et al., 2019). A redução de 100% na germinação de sementes de *Sorghum bicolor* também foi observada. Os autores sugeriram que o composto bioativo provável seria o pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3- (2-metilpropil) (BRUN et al., 2016).

Tabela 2.7– Trabalhos desenvolvidos com o fungo *Phoma dimorpha* no Laboratório “Biotec Factory”.

Título	Tipo	Objetivos	Referência
Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo <i>Phoma</i> sp.	Dissertação	Otimizar a fermentação submersa e em estado sólido de um bioherbicida a partir de <i>Phoma</i> sp. e avaliar a atividade no controle de <i>Cucumis sativus</i>	Klaic (2014)
Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator	Dissertação	Otimizar a produção de um bioherbicida por fermentação submersa em biorreator, desenvolver formulações em conjunto de adjuvantes e avaliar a atividade das formulações no controle de <i>Cucumis sativus</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Lactuca sativa</i> L. e <i>Allium cepa</i> L.	De Almeida (2014)
Produção de herbicida por fermentação submersa a partir do fungo <i>Phoma</i> sp. em biorreator	Dissertação	Produzir um herbicida por fermentação submersa em biorreator, caracterizar os compostos presentes por cromatografia gasosa e avaliar a atividade no controle de <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i>	Brun (2016)
Production of bioherbicide by <i>Phoma</i> sp. in a stirred-tank bioreactor	Artigo científico	Produzir um bioherbicida em biorreator de tanque agitado, variando a taxa de agitação e a aeração. Avaliar o potencial fitotóxico a partir de bioensaios em pré-emergência, pós-emergência e em folhas destacadas de <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i> . Posteriormente, realizar a caracterização química com cromatografia gasosa.	Brun et al. (2016)
Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by <i>Phoma</i> sp.	Artigo científico	Otimizar a composição do meio para a produção de bioherbicida de <i>Phoma</i> sp. por fermentação em estado sólido, empregando resíduos agroindustriais como bagaço, soja e licor de maceração de milho como substrato. A fitotoxicidade foi avaliada em <i>Cucumis sativus</i>	Klaic et al. (2017)
Desenvolvimento de um bioherbicida a partir de metabólitos de <i>Phoma</i> sp. para o manejo de plantas daninhas	Dissertação	Concentrar e formular um bioherbicida a base de <i>Phoma</i> sp. com efeito sobre plantas bioindicadoras (<i>Cucumis sativus</i>) e plantas daninhas (<i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Bidens pilosa</i> e <i>Conyza canadensis</i>)	Todero (2017)

Formulation of a bioherbicide with metabolites from <i>Phoma</i> sp.	Artigo científico	Formular um bioherbicida com metabólitos secundários produzidos por <i>Phoma</i> sp. e avaliar a fitotoxicidade em <i>Cucumis sativus</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> e <i>Conyza canadensis</i>	Todero et al. (2018)
Concentration of metabolites from <i>Phoma</i> sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity	Artigo científico	Concentrar o caldo bruto obtido por fermentação submersa de <i>Phoma</i> sp. através de uma membrana de microfiltração de fibra oca, e avaliar a fitotoxicidade em <i>Cucumis sativus</i> (absorção em folha) e nas plantas daninhas <i>Bidens pilosa</i> e <i>Amaranthus retroflexus</i> (câmara de germinação e germinação em substrato)	Todero et al. (2019)
Desenvolvimento de formulações para potencializar a ação de metabólitos de <i>Phoma dimorpha</i> no controle biológico de plantas daninhas	Tese	Desenvolver formulações para potencializar a ação do caldo fermentado proveniente do fungo <i>Phoma dimorpha</i> concentrado por processos de separação por membranas no controle biológico de plantas daninhas (<i>Echinochloa</i> spp., <i>Amaranthus cruentus</i> , <i>Bidens pilosa</i> e <i>Senna obtusifolia</i>)	Chaves Neto (2019)
Efeito de metabólitos secundários produzidos por <i>Phoma dimorpha</i> sobre a germinação e crescimento de sementes de diferentes espécies vegetais	Artigo científico	Avaliar o efeito de metabólitos secundários presentes no caldo fermentado de <i>Phoma dimorpha</i> na germinação, crescimento, massa fresca e seca de mudas e em folhas destacadas das espécies de <i>Cucumis sativus</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Amaranthus cruentus</i> , <i>Bidens pilosa</i> e <i>Echinochloa</i> sp.	Chaves Neto et al., (2020b)
Avaliação de diferentes métodos de preservação do fungo <i>Phoma dimorpha</i>	Artigo científico	Avaliar a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolados do fungo <i>Phoma dimorpha</i> (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro)	Chaves Neto et al. (2019)
Bioherbicidal action of <i>Phoma dimorpha</i> fermented broth on seeds and plants of <i>Senna obtusifolia</i>	Artigo científico	Avaliar a ação bioherbicida de um caldo fermentado produzido a partir do fungo <i>Phoma dimorpha</i> na pré-emergência e pós-emergência de <i>S. obtusifolia</i>	Chaves Neto et al. (2020a)

2.2.2 *Phoma* como produtor de polissacarídeos

Em geral, os fungos produzem vários compostos com atividade superficial que podem ser divididos em compostos de alto peso molecular, como heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas, lipoproteínas ou complexos de componentes e uma ampla variedade de estruturas químicas de baixo peso molecular, incluindo glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos polissacarídeo-proteína poliméricos, ácidos graxos e fosfolipídios (LUFT et al., 2020). Os exopolissacarídeos (EPS) são os polissacarídeos fúngicos mais frequentemente estudados, além dos polissacarídeos da parede celular e dos polissacarídeos citosólicos intracelulares. Os EPS obtidos de culturas de fungos Ascomycota são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, imunoestimulantes, antitumorais e antimicrobianas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015).

YCP (acrônimo de Yancheng polissacarídeo) foi isolado do micélio do fungo filamentoso marinho *Phoma herbarum* YS4108 (YANG et al., 2005). Os autores relataram a capacidade do YCP de aumentar a atividade fagocítica de camundongos *in vitro* e *in vivo*, indicando que pode ser um polissacarídeo imunomodulador, que estimula a resposta imune por ação sobre macrófagos do compartimento imune sistêmico. A resposta proliferativa de anticorpos IgM em células B por YCP foi estudada e demonstrou a função imunomoduladora eficiente de YCP na imunoterapia oncológica por meio da ativação mediada por TLR de vias de sinalização como MAPK e NF- κ B (ZHANG et al., 2013). Chen et al. (2009) descreveram que o YCP foi responsável pela indução da produção de NO em macrófagos por meio da ligação do YCP às vias TLR 4 e CR3. Posteriormente, um estudo demonstrou que o YCP atua como um segundo sinal para a ativação, proliferação e produção de IFN- γ das células T através da ligação ao receptor “toll-like” (TLR-) 2 e TLR-4, e pode ser considerado um bom candidato para tumor-imunoterapia específica para melhorar os sinais do processo de apresentação do antígeno, proliferação de células T específicas do antígeno, indução de citocinas Th1 e morte específica do tumor (CHEN S. et al., 2014). Em resumo, este polissacarídeo microbiano é um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de drogas antitumorais e que aumentam a imunidade (SUN et al., 2016).

Apesar de o YCP ser o polissacarídeo mais estudado da espécie *Phoma herbarum*, outros estudos foram desenvolvidos. Uma cepa de *Phoma herbarum* identificada como CCFEE 5080 foi isolada de solo continental da Antártica e testada para produção de EPS. A produção de EPS foi de até 13,6 g/L em uma variedade de fontes de carbono, e foi máxima quando a fonte de nitrogênio foi NaNO₃ e a temperatura de incubação foi de 28 °C. Os autores levantaram

a hipótese de uma possível relação entre a produção de EPS pelo fungo Antártico e seu envolvimento na sobrevivência sob o clima mais severo do mundo (SELBMANN et al., 2002). Embora os EPS sejam considerados biofertilizantes potenciais e eliciadores da resistência sistêmica das plantas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015), a partir da presente pesquisa foi possível relacionar o potencial bioherbicida até então apresentado (Tabela 2.6) com a produção de biopolímeros produzidos pelo fungo *Phoma dimorpha*.

2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS FÚNGICOS

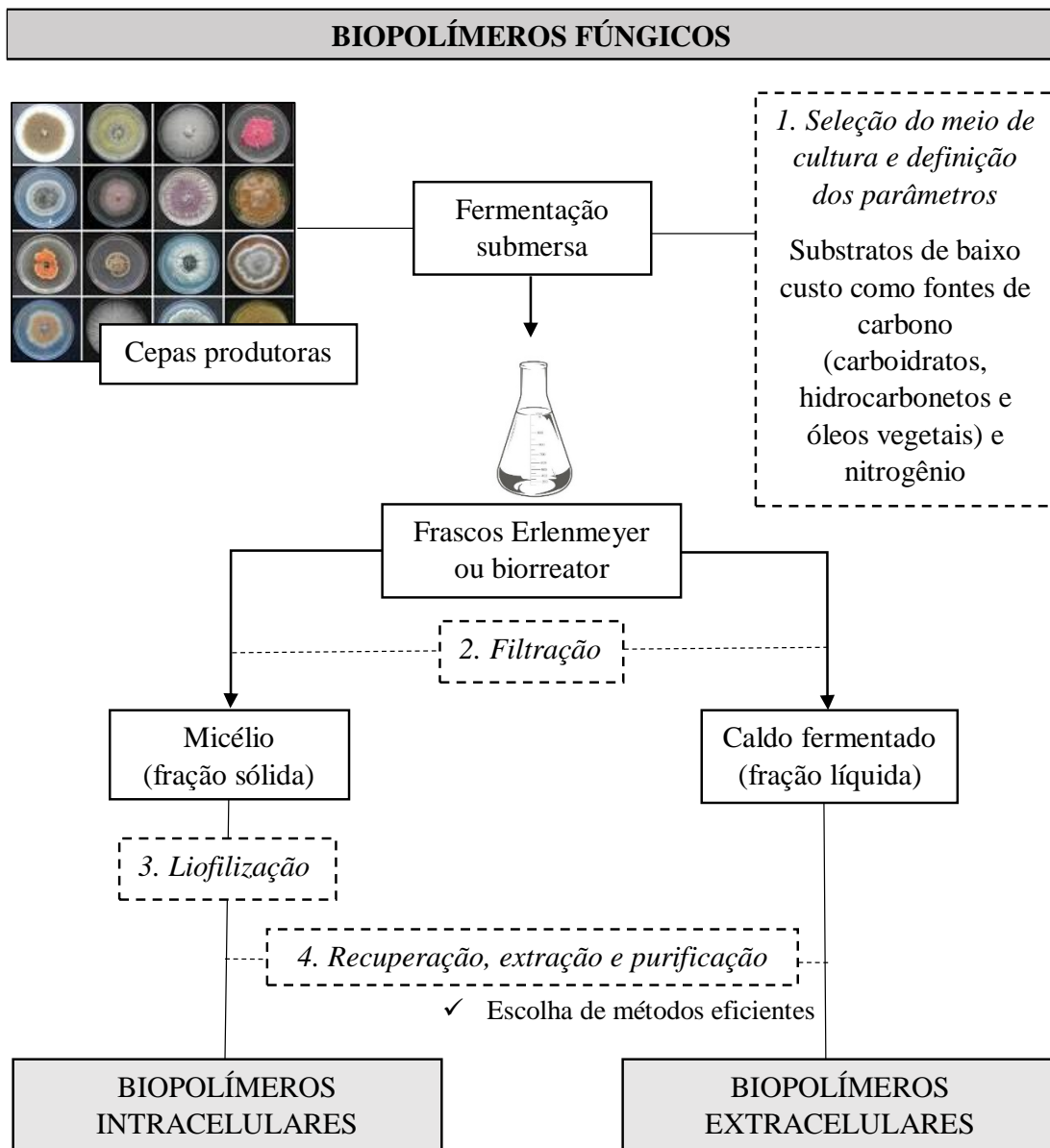
Uma das maiores dificuldades na produção de biopolímeros fúngicos em larga escala é o alto custo. Por este motivo, os biopolímeros microbianos são objeto de investigação em várias áreas científicas, com especial enfoque na otimização dos seus processos de produção. Outra dificuldade atual é a falta de monitoramento durante a fase de fermentação. A fim de compreender melhor o processo de produção de biopolímeros fúngicos, as etapas envolvidas na escala de laboratório da produção e as diferentes estratégias de redução de custos são apresentadas na Figura 2.4.

O primeiro passo após a escolha da cepa produtora deve ser a seleção do meio de cultura e a definição dos parâmetros. É importante definir esses fatores porque a produção de biopolímeros fúngicos é altamente afetada pelas condições nutricionais e ambientais. No entanto, não há condições gerais de cultivo adequadas para todos os microrganismos que garantam altas produtividades dos biopolímeros. A produção de biopolímeros fúngicos, quando comparada à outras fontes naturais, costuma apresentar tempos de produção consideravelmente mais curtos e sua extração é muito mais simples (FREITAS; TORRES; REIS, 2017).

2.3.1 Seleção do meio de cultura

A escolha de um substrato adequado é muito importante, tanto no aspecto fisiológico como fonte de energia e carbono quanto no aspecto econômico, pois representa um grande percentual do custo do processo. As fontes de carbono e nitrogênio, bem como a presença de minerais, influenciam na composição e características dos biopolímeros. Um excesso de carbono e uma limitação de nitrogênio geralmente favorecem a síntese (FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

Figura 2.4– Estratégias de produção e redução de custos de biopolímeros fúngicos.



Fonte: Adaptado de Luft et al. (2020).

Fontes convencionais de carbono, como glicose, glicerol, acetatos e outros ácidos orgânicos, bem como n-alcanos puros, são bastante caras. Considerando que os custos de meio representam até 30% dos custos totais dos processos fermentativos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017), uma estratégia geralmente adotada para tornar a produção de biopolímeros econômica é o uso de substratos baratos e residuais para a formulação de meios de fermentação (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2012). É possível utilizar resíduos e subprodutos agroindustriais como matéria-prima suplementar para a produção de biopolímeros microbianos

de alto valor agregado, além de reduzir seu preço, como também superar o problema de destinação final (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013). No entanto, as condições específicas de processamento devem ser conhecidas a fim de não causarem impacto negativo no rendimento, produtividade e composição do biopolímero sintetizado (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). A fonte mais ampla de nitrogênio utilizada é o extrato de levedura, mas várias outras fontes de nitrogênio também têm sido utilizadas, como uréia, peptona, sulfato de amônio e extrato de malte. Embora a presença de nitrogênio extra favoreça o crescimento celular, geralmente resulta em uma produção pobre de biopolímero. Outros elementos, como fósforo, potássio e cátions metálicos, também são necessários para o crescimento microbiano e a síntese de biopolímeros (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). No entanto, deve-se ter cuidado ao otimizar a concentração de sais fornecidos como nutrientes no meio, uma vez que cátions podem afetar as propriedades reológicas de soluções de polímeros (AKILA, 2014). A suplementação de certos substratos hidrofóbicos (gorduras ou óleos vegetais) no meio também aumenta substancialmente a produção de compostos bioemulsificantes e o crescimento micelial (PARK et al., 2002). Esses substratos são usados para a produção da porção hidrofóbica do biopolímero, enquanto os substratos hidrofílicos são usados principalmente por microrganismos para o metabolismo celular e a síntese da fração hidrofílica, substratos solúveis em água, como grupos de carboidratos, geralmente estão sendo utilizados (DESAI; BANAT, 1997). As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para a produção de bioemulsificantes são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono usada no meio de cultura (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

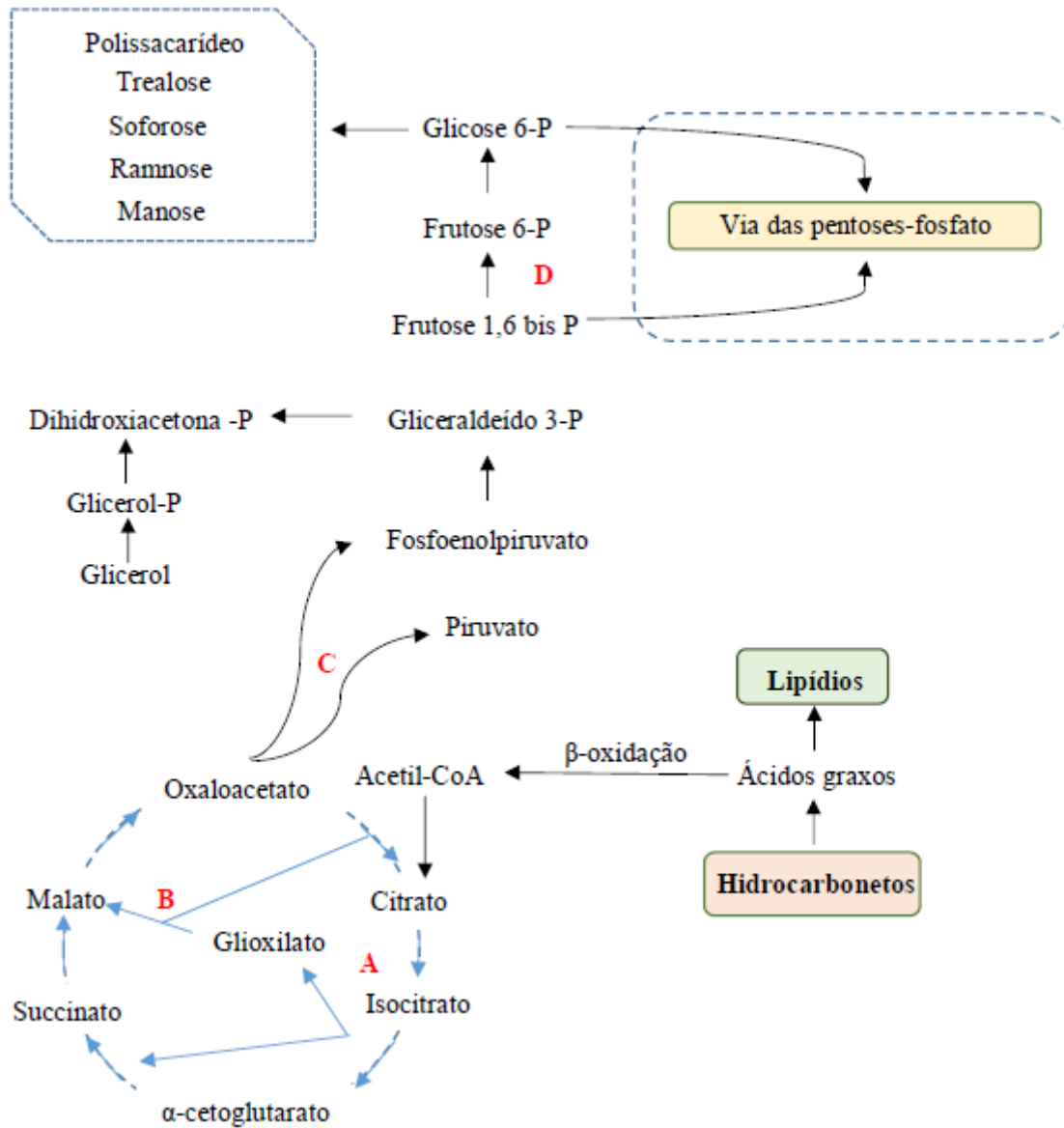
Quando um hidrocarboneto é usado como fonte de carbono, o metabolismo microbiano usa principalmente a via lipolítica e a gliconeogênese, que podem ser usados na produção de ambas as frações hidrofóbicas (ácidos graxos) e hidrofílica (sacarídeos) (Figura 2.5). Para a produção de sacarídeos, a via da gliconeogênese é ativada. Consiste na oxidação de ácidos graxos via β -oxidação em acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação de acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese de precursores de polissacarídeos, como a glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. No entanto, as reações catalisadas pelo piruvato quinase e pela fosfofrutocinase-1 são irreversíveis; portanto, outras enzimas, que são exclusivas da gliconeogênese, são necessárias para contornar essas reações. As principais reações são mostradas na Figura 2.5, até a formação da glicose 6-fosfato, que é o principal precursor dos polissacarídeos a serem formados para a produção da porção hidrofílica dos biopolímeros (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; NURFARAHIN; MOHAMED; PHANG, 2018; SANTOS et al., 2016).

Por outro lado, quando os carboidratos são a única fonte de carbono para a produção de biopolímero, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas e a formação da fração hidrofílica pela via glicolítica são suprimidas pelo metabolismo microbiano (Figura 2.6). Um substrato solúvel em água, como a glicose, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato (G6P), que é um dos principais precursores de carboidratos encontrados na parte hidrofílica do biopolímero, catalisada por uma série de enzimas. Para a formação da porção hidrofóbica (lipídio), a glicose é oxidada a piruvato através da glicólise e o piruvato é então convertido em acetil-CoA, que produz malonil-CoA quando combinado com oxaloacetato, seguido pela conversão em um ácido graxo (precursores) para a síntese de lipídios (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; NURFARAHIN; MOHAMED; PHANG, 2018; SANTOS et al., 2016).

2.3.2 Definição dos parâmetros de cultivo

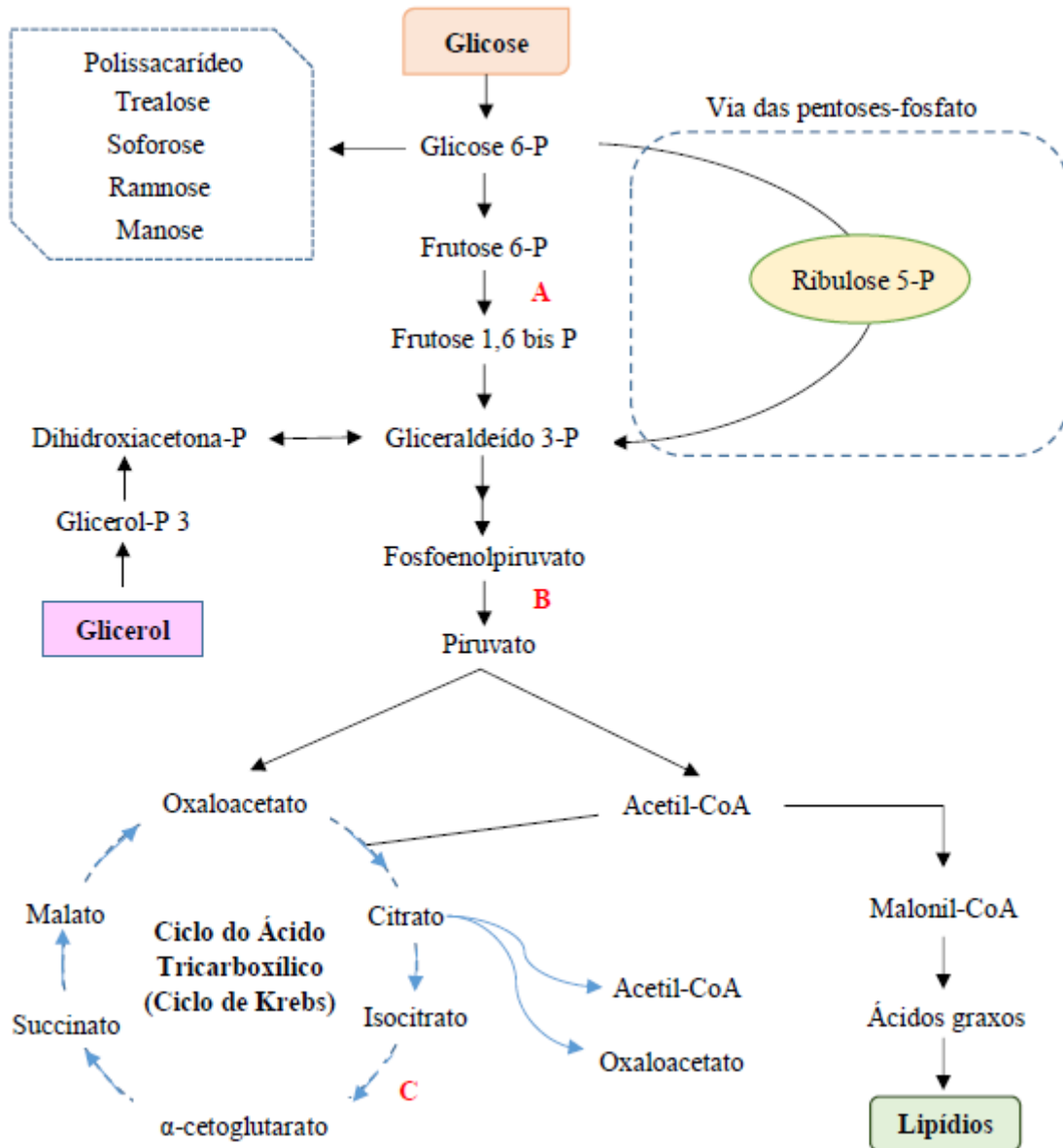
Para garantir um desempenho de bioprocesso estável e reprodutível, parâmetros de cultivo, como concentração de oxigênio dissolvido (OD), velocidade do agitador, pH e temperatura são frequentemente monitorados e/ou controlados dentro de intervalos definidos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). A temperatura geralmente é crítica na síntese de biopolímeros. Em geral, a maioria dos produtores de biopolímeros são mesofílicos, e a temperatura ideal para o crescimento celular também é ótima para a formação do produto (AKILA, 2014). O pH inicial do meio pode afetar a função da membrana celular, morfologia e estrutura celular, solubilidade dos sais, estado iônico dos substratos, absorção de vários nutrientes e biossíntese do produto (FANG; ZHONG, 2002a), e deve ser mantido em um nível neutro (6,0–7,0), pois o pH ácido pode inibir a produção dos biopolímeros ou causar sua precipitação (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ; JANEK, 2017). Outro fator importante é o fornecimento de oxigênio, cujas condições de aeração adequadas são essenciais durante o crescimento exponencial (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Foi relatado que agitação e/ou aeração vigorosas favorecem a alta produção de EPS por alguns microrganismos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Grande quantidade de ar quente e altos níveis de agitação são aplicados durante a fermentação para combater a transferência de massa ineficiente devido à alta viscosidade (AKILA, 2014). O processo de produção não é necessariamente completo sem um meio eficiente e econômico para o processamento posterior, mesmo que a produção ótima seja obtida usando condições otimizadas (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2012).

Figura 2.5 – Vias metabólicas envolvidas na síntese de biopolímero emulsificante usando substrato de hidrocarboneto. Enzimas chave: (A) isocitrato liase; (B) malato sintase; (C) fosfoenolpiruvato; (D) frutose-1.



Fonte: Adaptado de Luft et al. (2020).

Figura 2.6– Vias metabólicas envolvidas na síntese de biopolímero emulsificante usando um substrato solúvel em água. Enzimas principais: (A) fosfofrutocinase; (B) piruvato quinase; (C) isocitrato desidrogenase.



Fonte: Adaptado de Luft et al. (2020)

2.3.3 Recuperação, extração e purificação

Após o término da fermentação, a operação de filtração é a próxima etapa do processo para separar o micélio do caldo fermentado. A filtração é um processo aparentemente simples,

que pode ser complementado com um processo de centrifugação. Após centrifugação, a recuperação dos biopolímeros do caldo bruto é comumente realizada por procedimentos que envolvem precipitação e secagem (liofilização) dos polímeros precipitados. A intensa formação de espuma produzida dificulta a recuperação e purificação desses compostos do caldo bruto, sendo um obstáculo para sua comercialização (COUTTE et al., 2017). No entanto, um grande investimento financeiro é necessário para esses processos. Na maioria dos casos, o processamento posterior dos produtos é responsável por aproximadamente 60% do custo total e deve ser escolhido com base na demanda de pureza para a aplicação desejada. Os procedimentos de purificação dos biopolímeros a serem extraídos são determinados de acordo com a localização, solubilidade e carga iônica (SATPUTE et al., 2010).

Técnicas de purificação e extração de biopolímeros têm sido estudadas intensivamente (COUTTE et al., 2017). A recuperação de biopolímeros normalmente envolve uma etapa opcional de precipitação e o uso de diferentes solventes orgânicos de acordo com a hidrofobicidade e o valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) dos compostos. Os biopolímeros geralmente são extraídos do caldo de cultura por precipitação com sulfato de amônio e purificados por diálise (BANAT et al., 2010). Outras técnicas de recuperação são precipitação ácida, precipitação de TCA/acetona, precipitação alcoólica, fracionamento de espuma, extração por solvente e extração por ultrassom (COUTTE et al., 2017; OSÍNSKA-JAROSZUK et al., 2015; ZHENG Z. et al., 2019). Para a purificação, diversas estratégias foram desenvolvidas, como cromatografia de troca iônica, técnicas de ultrafiltração por membrana e adsorção-dessorção em resinas ou carvão ativado. Além disso, técnicas desenvolvidas como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia de interação hidrofóbica e filtração em gel são bastante utilizadas para fracionar e purificar esses compostos. Em alguns casos, uma estratégia de recuperação de várias etapas, usando uma sequência de etapas de concentração e purificação, é eficaz para obter o produto em qualquer grau de pureza necessário (MNIF; GHRIBI, 2015). A recuperação dos biopolímeros do micélio ocorre após a etapa de liofilização. As técnicas de extração de micélio requerem métodos de extração mais drásticos, como com água quente (LI et al., 2015; ZHAO et al., 2016), solventes inorgânicos (FANG; ZHONG, 2002b; TANG; ZHONG, 2002) ou orgânicos (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Portanto, atualmente, a extração assistida por ultrassom está sendo apresentada como um dos métodos mais eficientes, uma vez que é um método simples, rápido e econômico que encurta o tempo de extração em comparação com os métodos convencionais (SOURKI; KOOCHKEKI; ELAHI, 2017; ZHANG et al., 2014). Hoje em dia, a escolha de qual método deve ser utilizado para realizar a extração depende do equilíbrio entre a eficiência e reprodutibilidade

da extração juntamente com considerações de custo, tempo e segurança. Rendimentos de purificação, escalabilidade, uso ou não de solventes tóxicos e preço de implementação são alguns exemplos de desvantagens que precisam ser superadas. Algumas técnicas inovadoras e frequentemente usadas para recuperação destas macromoléculas estão resumidas abaixo.

2.3.3.1 Precipitação

Em termos simples, precipitação significa remover os sólidos solúveis de uma solução e convertê-los em uma forma insolúvel que pode ser posteriormente separada por filtração e centrifugação. Esta estratégia de pré-tratamento melhora a recuperação de biopolímeros em termos de acessibilidade e filtrabilidade. Este método de pré-tratamento para recuperação de biopolímero é geralmente usado na fase preliminar (JHA; KUMAR, 2019).

2.3.3.1.1 Precipitação ácida

A precipitação ácida é a técnica convencional mais usada na recuperação de biopolímero (CHITARRA et al., 2003; HADDAD et al., 2008). Além de ser um método barato, é prontamente disponível para recuperar biopolímero bruto. O método consiste em uma hidrólise ácida, realizada com ácido clorídrico (HCl) concentrado para baixar o pH para 2,0, neutralizando as cargas negativas do biopolímero e tornando-o menos solúvel na fase aquosa (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ; JANEK, 2017). Após a precipitação a 4 °C em repouso durante a noite, o caldo contendo biopolímero pode ser centrifugado, geralmente a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, para ser facilmente coletado como produto bruto (SATPUTE et al., 2010). No entanto, este método é indicado somente para aplicações laboratoriais, já que a utilização de HCl levanta facilmente a questão da insegurança devido aos reagentes químicos residuais. No entanto, a precipitação ácida apesar de resultar em alto rendimento de recuperação, frequentemente apresenta baixa pureza (<60%), um problema a ser resolvido combinando este método a outros, como processos de filtração por membrana (CHEN; CHEN; JUANG, 2007).

2.3.3.1.2 Precipitação alcoólica

Normalmente, para recuperação do biopolímero bruto, o caldo fermentado é precipitado pela redução da constante dielétrica da solução pela adição de etanol (absoluto ou 95%) ou um

solvente equivalente a uma temperatura de 4 °C por um período de 12–24 h. Ao adicionar etanol à uma solução que contém moléculas ligadas e agregadas de polissacarídeos (devido as ligações de hidrogênio intermoleculares em solução aquosa), tais moléculas inicialmente desidratam, após mudam de conformação e agregam, devido ao aumento da ligação de hidrogênio intramolecular (WANG S. et al., 2019). De acordo com Osińska-Jaroszuk et al. (2015), o principal método de extração de EPS obtido em culturas das cepas Ascomycota e Basidiomycota é a precipitação com etanol 95% utilizando diferentes proporções de suspensão de caldo e álcool. Phetrong, H-Kittikun e Maneerat (2008) descobriram que a precipitação do emulsificante de *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 com etanol foi o método mais eficiente quando comparado a outros métodos de precipitação. Definitivamente, o etanol é um dos solventes mais populares para a obtenção de biopolímeros do sobrenadante de cultura de microrganismos, pois favorece o alto rendimento. No entanto, não é um processo ideal na produção em larga escala, porque é um processo caro e demorado.

2.3.3.2 Membranas

Os processos de separação por membrana (PSM) abrangem um grupo de processos de separação em que as características de uma membrana (porosidade, seletividade, carga elétrica) são utilizadas para separar os componentes de uma solução ou suspensão. Nestes processos, o fluxo de alimentação é separado em dois: a fração que permeia através da membrana, chamada de permeado ou filtrado, e a fração contendo os componentes que não foram transportados através da membrana, geralmente chamada de retido ou concentrado. Os produtos de interesse podem estar no retido ou no permeado ou em ambos os fluxos (DHINESHKUMAR; RAMASAMY, 2017). Em outros termos, a membrana atua como uma barreira seletiva que separa uma mistura de um ou mais componentes em duas frações.

A principal força motriz para a separação é a pressão transmembrana, que é a discrepância de pressão entre os lados do retido e o lado do permeado. Os quatro tipos de PSM em fase líquida que utilizam essa força para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas são microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose reversa (OR), os quais são caracterizados em função das massas e tamanhos moleculares das substâncias de interesse (Tabela 2.8). No entanto, o princípio de separação também é baseado em outras forças motrizes como gradientes de concentração (diálise), temperatura e elétrico (eletrodiálise). Especialmente em UF e NF a carga das moléculas/solutos e sua afinidade pela membrana filtrante também são importantes (DHINESHKUMAR; RAMASAMY, 2017).

Entre as tecnologias de separação por membrana acionada por pressão, MF, UF e NF têm sido amplamente aplicadas em muitas indústrias, pois permitem que as separações se tornem mais eficientes em termos de energia e corretas ecologicamente (XU et al., 2016). As membranas de MF e UF são usadas para purificação de fluxos aquosos, concentração e recuperação do produto de interesse, superando as limitações das técnicas tradicionais (JHA; KUMAR, 2019). As características da filtração por membranas que a torna excelente para muitas aplicações incluem a minimização do dano físico de biomoléculas por efeitos de cisalhamento, desnaturação mínima, alto rendimento de recuperação (única etapa), a prevenção de problemas de ressolubilização (solutos são retidos na fase de solução), alto rendimento, eficácia de custos (CHEN; CHEN; JUANG, 2007), ausência de produtos químicos, alto nível de pureza e automação simples (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ; JANEK, 2017).

Tabela 2.8– Características mais relevantes dos processos de separação por membranas.

Processo	Força motriz ($\delta p - \delta \pi$) ¹	Principal mecanismo de ação (DP ² , nm)	Material retido	Aplicações
Microfiltração	GP ³ 0,5–2 bar	Exclusão por tamanho (100–1000)	Partículas em suspensão, bactérias MM ⁴ > 5000 Da	Clarificação de vinho/cerveja Esterilização bacteriana
Ultrafiltração	GP 1–5 bar	Exclusão por tamanho (2–10)	Coloides, macromoléculas MM > 2000 Da	Concentração de proteínas Recuperação de pigmentos Recuperação de óleos
Nanofiltração	GP 15–20 bar	Exclusão por tamanho/Difusão (1–3)	Moléculas de MM média entre 500 e 2000 Da	Purificação de proteínas Separação de compostos orgânicos e sais divalentes Dessulfatação de água marinha
Osmose Reversa	GP 10–100 bar	Difusão (<0,5)	Material solúvel ou em suspensão (íons monovalentes)	Dessanilização de águas Concentração de sucos

¹ $\Delta\pi$ = diferença de pressão osmótica; ²DP= diâmetro de poros; ³GP = gradiente de pressão; ⁴MM = massa molecular

Fonte: Adaptado de Cassano et al. (2020)

Existem duas configurações diferentes para operação de separação por membranas: (1) filtração frontal (sem saída, “*dead-end*”) e (2) filtração tangencial (fluxo cruzado, “*crossflow*”). Na primeira, o plano da membrana é normal ao fluxo de alimentação, enquanto no segundo é

tangencial. As vantagens e desvantagens do tipo de configuração dependem das características de alimentação. Suspensões altamente concentradas não são adequadas para tratamento *dead-end*, uma vez que as partículas separadas se acumulam rapidamente na membrana, aumentando a resistência à filtração por formar um bolo e/ou obstruir a membrana. Na filtração *crossflow*, o fluxo é paralelo à membrana e as forças de arrasto próximas à parede da membrana reduzem a quantidade de material particulado depositado na membrana. Portanto, o primeiro é usado para suspensões diluídas, enquanto o último pode lidar com as concentradas (DHINESHKUMAR; RAMASAMY, 2017).

Em relação aos biopolímeros, atualmente, a maioria dos processos de purificação são realizados com métodos geralmente limitados à escala laboratorial ou que levantam a questão do reagente residual, dificultando assim a aplicação futura desses compostos. Por meio de processos de separação por membranas, a recuperação dos biopolímeros torna-se mais eficaz, apresentando alta eficiência e baixo custo, além ser uma tecnologia verde de operação (TANG et al., 2020). Considera-se o processo de separação por membrana como tecnologia verde devido à sua maior eficiência no uso de energia e a eliminação de produtos químicos e aditivos, o que é melhor para o meio ambiente e para a saúde humana (DHINESHKUMAR; RAMASAMY, 2017).

Para purificação de grandes volumes de extrato, os PSM, têm sido usados de forma eficiente para purificar β -D-glucanas e outros polissacarídeos fúngicos. Recentemente, Tang et al. (2020) avaliaram a separação de polissacarídeo do extrato aquoso do macro-fungo *Lentinus edodes* (cogumelo shiitake) com MF, UF e NF. A estratégia de separação por membrana de purificação de polissacarídeo do extrato aquoso de *Lentinus edodes* forneceu um procedimento potencial mais ecológico e mais eficiente para a purificação destes compostos em larga escala, preparando as frações as quais podem ser usadas para o desenvolvimento de alimentos ou medicamentos. Um processo em escala piloto combinando a extração de pó de *Lentinula edodes* em água (98 °C, 1 h), MF de fluxo cruzado e OR/NF foi realizado para obter extratos ricos em β -glucana, os quais podem ser usados em novos alimentos funcionais devido ao seu alto conteúdo em compostos hipocolesterolêmicos (MORALES et al., 2019a). Notavelmente, os PSM surgiram como uma alternativa favorável a outros métodos de recuperação de polissacarídeos e útil para concentração de grandes volumes. Liu et al. (2015) obtiveram sucesso ao utilizarem uma membrana de UF para purificar o polissacarídeo de *Tricholoma lobayense*. A UF combinada com o método de coordenação de sal de amônio quaternário exibiu maior eficiência, menor consumo e melhor facilidade na purificação em larga escala de polissacarídeos do que a troca iônica DEAE (dietilaminoetil) combinada com coluna de gel.

Apesar da purificação de biopolímeros com membranas ser considerada uma tecnologia madura que encontra aplicações em escala industrial, esse método apresenta alguns desafios. A incrustação da membrana é frequentemente uma questão chave a ser resolvida, principalmente para a filtração de soluções com altas concentrações de polissacarídeos. De fato, os exopolissacarídeos exibem alta viscosidade e propensão a formar géis viscosos que podem sujar gravemente as membranas, mesmo em baixas concentrações. Portanto, as condições operacionais da filtração por membrana, notadamente as condições hidrodinâmicas dentro do lúmen da membrana, devem influenciar a intensidade de incrustação (BALTI et al., 2018; MENG et al., 2018, 2020).

2.3.3.3 Adsorção

Em termos simples, a adsorção é um fenômeno superficial de acúmulo de moléculas na superfície da fase líquida ou sólida. A adsorção é geralmente usada para separar, concentrando o produto de interesse na superfície em vez de no volume. Com base no tipo de ligações de interação, esta técnica é classificada em fisissorção (física) e quimissorção (química). Quando as forças de atração na superfície são forças de van der Waals fracas, então a adsorção é a fisissorção, enquanto as ligações químicas representam a quimissorção (JHA; KUMAR, 2019). Na fisissorção, as forças de Vander Waals existentes entre o adsorbato e o adsorvente são fracas. Portanto, ao diminuir ou aumentar a pressão, o processo pode ser facilmente revertido. Em comparação, na quimissorção, conhecida como adsorção de Langmuir, as ligações químicas existentes entre o adsorbato e o adsorvente são fortes e não podem ser revertidas facilmente. A quimissorção é limitada a uma monocamada, enquanto a fisissorção pode ser multicamadas (SAHOTA et al., 2018).

Assim como PSM, o uso de adsorventes é uma das técnicas mais utilizadas para recuperação e/ou pré-concentração de biopolímeros (KUHN; FILHO, 2010a). As principais vantagens dessa técnica são a fácil operação, recuperação rápida em uma etapa e a obtenção de biopolímero purificado de alta qualidade. No entanto, sua eficiência é afetada principalmente pelo tipo de adsorvente. Um dos adsorventes mais comuns e baratos utilizado nesse processo é o carvão ativado. O processo de adsorção–dessorção em carvão ativado oferece bons exemplos de recuperação contínua de biopolímeros tanto do caldo de fermentação quanto da espuma concentrada, por meio de um método de “recuperação *in situ*” que evita a inibição do produto final. Em última análise, isso reduz o uso de solventes de alto custo e resulta em menos degradação do produto (SATPUTE et al., 2010). Outras vantagens da adsorção com carvão

ativado são a possibilidade de reutilização do adsorvente e a capacidade de melhorar a propriedade de superfície ativa (concentração micelar crítica) do biopolímero em comparação aos métodos clássicos de recuperação (DUBEY; JUWARKAR; SINGH, 2005). Kuhn e Maugeri Filho (2010b) avaliaram a eficácia de uma coluna de leito fixo de carvão ativado na separação da mistura de açúcares, especialmente fruto-oligossacarídeos e glicose e fruto-oligossacarídeos e frutose. O processo mostrou-se interessante, aumentando a pureza dos fruto-oligossacarídeos sintetizados. O grau final de purificação e recuperação de fruto-oligossacarídeos foram cerca de 80% e 97,8%, respectivamente.

Outro adsorvente comumente utilizado em processos de separação de macromoléculas é a sílica. A sílica é amplamente utilizada devido à sua boa resistência mecânica, alta estabilidade química e térmica, estrutura de poros, área de superfície e grupos de silanol na superfície. Polissacarídeos e materiais de sílica porosa modificados com polissacarídeos vêm ganhando imensa atenção nas tecnologias de separação e cromatografia. Materiais de sílica porosa modificados oferecem grandes possibilidades e potencial em escala industrial, como na separação óleo-água e adsorção de metais pesados (HETTEGGER; LINDNER; ROSENAU, 2020).

Novos adsorventes, como os nanotubos de carbono (CNT), uma das principais áreas da nanotecnologia, têm sido amplamente investigados devido às suas excelentes propriedades físico-químicas, condutividade elétrica e térmica, resistência mecânica e durabilidade química (SALEEMI; YONG; WONG, 2020) e são comumente classificados em nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs, *Single Wall Carbon Nanotubes*) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, *Multi Wall Carbon Nanotubes*) (ARUNKUMAR et al., 2020). As nanoestruturas ocas e em camadas dos MWCNTs fornecem uma área de superfície inerentemente grande e uma capacidade potencial correspondentemente alta de adsorção (CHEN P. H. et al., 2014). Além disso, esses nanotubos podem ser funcionalizados e adquirir propriedades substancialmente diferentes daqueles não funcionalizados (PADILHA et al., 2018). De acordo com Gao et al. (2016), biopolímeros de cadeia de carbono alifática mais longa e estrutura aromática podem ser facilmente removidos usando MWCNTs por causa de sua forte interação hidrofóbica e interação π - π . Os autores concluíram que os MWCNTs com diâmetros externos menores possuem maior capacidade de remoção de biopolímeros não iônicos e aniônicos em relação àqueles com diâmetros maiores, e os MWCNTs não tratados apresentam melhor desempenho do que os funcionalizados com OH (hidroxila) e COOH (carboxila). Assim, MWCNTs pode ser considerada uma técnica eficaz e econômica na remoção de biopolímeros.

2.3.3.4 Extração com água quente

Embora alguns polissacarídeos fúngicos sejam polares e facilmente extraíveis com água, muitos requerem tratamentos agressivos, como água quente ou soluções alcalinas e outros permanecem no resíduo insolúvel (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015). A extração convencional com água quente é uma técnica de extração fácil de operar e ecologicamente correta. No entanto, apresenta desvantagens como longos tempos de operação, altas temperaturas de extração, degradação de polissacarídeos termolábeis e baixos rendimentos de extração (SHANG et al., 2018). A repetição exaustiva do procedimento de extração contribui para aumentar o rendimento das frações polissacarídicas, além de diminuir a mistura de polissacarídeos em relação aos diferentes extratos (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015), porém os polissacarídeos solúveis extraídos geralmente são precipitados com etanol, e o resíduo frequentemente descartado após este método leva ao acúmulo de resíduos biológicos e perda de polissacarídeos bioativos (WANG et al., 2014).

Para obtenção dos biopolímeros menos solúveis, tratamentos mais drásticos são necessários. Tecnologias avançadas, como extrações assistidas por ultrassom ou extração de água subcrítica facilitam a extração desses polissacarídeos usando água como solvente não poluente (ROSELLÓ-SOTO et al., 2016). Kang et al. (2019) compararam a caracterização de polissacarídeos de *Ganoderma lucidum* extraídos pelos métodos de extração assistida por ultrassom e extração com água quente. Os resultados obtidos apresentaram diferenças no peso molecular, composição dos monossacarídeos e atividade antioxidante dos polissacarídeos. Os autores concluíram que a extração com água quente pode ter maiores aplicações industriais em alimentos funcionais como um antioxidante ativo.

Em comparação às extrações convencionais, Morales et al. (2019) avaliaram as tecnologias de ultrassom e de água subcrítica para a obtenção de extratos enriquecidos com β -glucana de *Lentinula edodes*. Para melhorar os rendimentos, os autores investigaram protocolos inovadores de pré-tratamentos com ultrassom e com dióxido de carbono supercrítico. Os métodos combinados foram mais eficazes na extração de β -glucana e retiveram parcialmente as propriedades imunomoduladora dos extratos. Estas e outras técnicas avançadas surgiram durante as últimas décadas, a fim de melhorar a extração verde de carboidratos bioativos substituindo a extração convencional com água quente e suas principais deficiências (MENA-GARCÍA et al., 2019).

2.3.3.5 *Extração assistida por ultrassom*

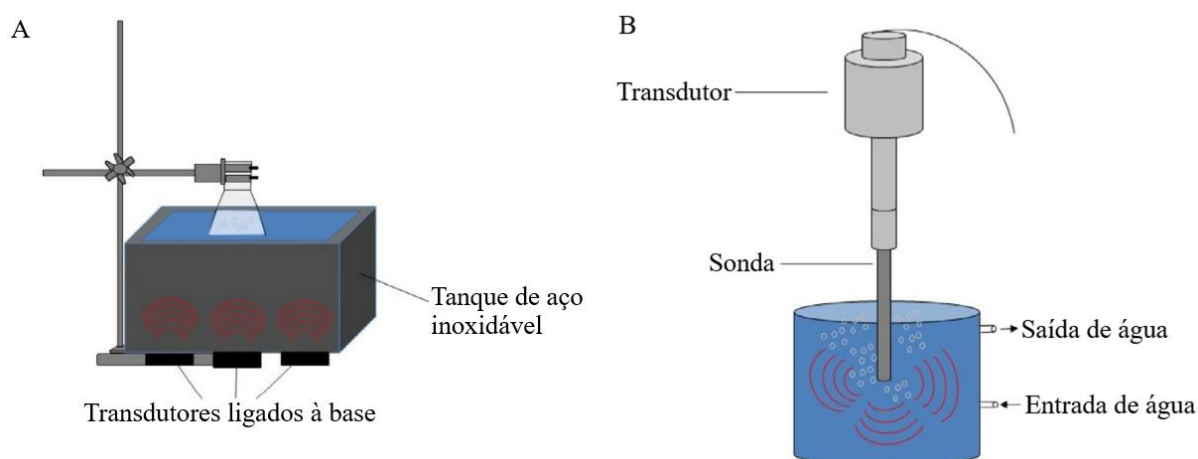
Além de ser uma das técnicas mais eficientes na extração de biopolímeros, a extração assistida por ultrassom é uma das técnicas mais baratas, rápidas e simples (maior rendimento e menor tempo de extração) em comparação com a extração convencional. A extração assistida por ultrassom tem sido aplicada para extrair compostos bioativos de diferentes materiais devido à sua alta reprodutibilidade, aplicabilidade a uma variedade de tamanhos de amostra, redução considerável no tempo necessário para realizar extrações altamente eficientes, menor produção de energia e extração eficiente de compostos orgânicos polares (PRAKASH MARAN; PRYA, 2014).

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas com frequências que excedem os limites da audição humana (20 Hz a 20 kHz). A aplicação de ultrassom pode ser dividida em duas categorias distintas: ultrassom de alta frequência e baixa intensidade ($f > 100$ kHz, < 1 W/cm²), que não altera as propriedades físico-químicas do material por meio do qual a onda ultrassônica se propaga, usado para análise ou caracterização de compostos; e ultrassom de baixa frequência e alta intensidade (20–100 kHz, 10–100 W/cm²), também considerado como ultrassom de potência, amplamente utilizado em algumas indústrias, como indústria alimentícia, química e de materiais (WANG; MAJZOBI; FARAHNAKY, 2020). O ultrassom de alta intensidade gera pressões intensas, cisalhamento e gradiente de temperatura devido à bolha de cavitação induzindo a maioria dos efeitos ultrassônicos dentro de um material, que podem produzir efeitos físicos, químicos e mecânicos (PLAZA et al., 2012). Esse mecanismo resulta na ruptura da matriz do material, facilitando a liberação de compostos extraíveis e aumentando a transferência de massa de solvente para a amostra, aumentando a liberação de compostos alvo da matriz para o solvente (MENA-GARCÍA et al., 2019). Além disso, a implosão de bolhas de cavitação em um meio líquido leva a macroturbulências e a uma micro-mistura. Ou seja, a extração de ultrassom não atua com um mecanismo, mas através de diferentes mecanismos independentes ou combinados incluindo fragmentação, erosão, capilaridade, detexturação e sonoporação (CHEMAT et al., 2017).

O ultrassom de alta potência pode ser aplicado usando dois tipos de dispositivos, banho ultrassônico ou equipamento de ultrassom do tipo sonda (Figura 2.7). Ambos os sistemas são baseados em um transdutor como fonte de energia de ultrassom (CHEMAT et al., 2017). Em relação à extração assistida por ultrassom de polissacarídeos bioativos, a maioria das aplicações têm se concentrado no desenvolvimento de métodos baseados no uso de banhos ultrassônicos com controle de temperatura e utilizando água como solvente de extração (MENA-GARCÍA et

al., 2019). Eles são baratos, estão disponíveis e um grande número de amostras pode ser tratado simultaneamente. No entanto, em comparação com os sistemas de sonda, a baixa reprodutibilidade e a baixa potência do ultrassom fornecido diretamente à amostra são as principais desvantagens. O sistema da sonda é mais potente devido à intensidade ultrassônica fornecida através de uma superfície menor (apenas a ponta da sonda), quando comparado ao banho ultrassônico (CHEMAT et al., 2017). O aumento na transferência de massa e na superfície de contato efetiva entre o sólido e o líquido resulta em melhores rendimentos com a introdução da sonda ultrassônica (ROSELLÓ-SOTO et al., 2016).

Figura 2.7– Sistemas ultrassônicos comumente usados (A: Banho de ultrassom, B: Sonda de ultrassom).



Fonte: Adaptado de Chemat et al. (2017), (reproduzida com permissão).

Cheung e Wu (2013) analisaram os modelos cinéticos e os parâmetros de processo para extração de polissacarídeos com sonda ultrassônica a partir do fungo medicinal *Cordyceps sinensis* Cs-HK1. A extração assistida por ultrassom promoveu a extração de moléculas maiores em comparação com as da extração com água quente. De acordo com a análise de modelagem, o ultrassom melhorou principalmente a etapa de difusão lenta de extração e apenas afetou ligeiramente a etapa de lavagem inicial. Quando comparada aos métodos convencionais, Soxhlet e extração com água quente, a extração com sonda ultrassônica do fungo *Ganoderma lucidum*, resultou em um maior rendimento de polissacarídeos com maior teor de β -D-glucana em um tempo de extração mais curto e, mais importante, o processo de extração se manteve em estado de baixa temperatura o tempo todo (ALZORQI et al., 2017). Considerando o uso de

grande quantidade de solvente e recipientes de extração volumosos dos métodos convencionais, a extração assistida por ultrassom pode ser considerada um método limpo. E em termos de energia e tempo, o impacto ambiental reduzido da extração assistida por ultrassom é claramente vantajoso. A extração assistida por ultrassom é, portanto, proposta como um método de extração "amigo do ambiente" adequado para extração em escala de laboratório, mas também pode ser transposto para escala piloto e industrial (CHEMAT et al., 2017).

Além de todas as vantagens citadas da tecnologia de ultrassom, também é importante salientar sua capacidade de melhorar as propriedades funcionais dos biopolímeros, principalmente por meio de seus efeitos de degradação e pela despolimerização induzida pelo mecanismo de cavitação. O processo de despolimerização envolve principalmente dois mecanismos possíveis: degradação mecânica das moléculas de biopolímero derivadas de bolhas de cavitação colapsadas e degradação química causada por reações químicas entre moléculas de biopolímero e moléculas de alta energia, por exemplo, os radicais livres hidroxila gerados do fenômeno da cavitação. Acredita-se que, apesar dos processos de decomposição química ou térmica, a degradação ultrassônica é um processo não aleatório, com a quebra ocorrendo provavelmente no centro das moléculas e com moléculas maiores se degradando mais rapidamente. Logo, a exposição prolongada de soluções de biopolímero a ultrassom induz mudanças significativas em suas propriedades funcionais (como propriedade de gelificação, propriedades estruturais e texturais, propriedade de emulsificação, propriedades reológicas e de viscosidade, solubilidade, estabilidade térmica, atividade biológica, capacidade de formação de espuma e estabilidade de formação de espuma). Portanto, um melhor entendimento do complexo mecanismo físico-químico de ação do ultrassom de alta intensidade, juntamente com a relação entre a duração, intensidade e frequência das ondas ultrassônicas e seus efeitos nas propriedades tecnológicas e funcionais dos biopolímeros, seria fundamental para o desenvolvimento novos biopolímeros com novas funcionalidades físicas e biológicas para diversos fins industriais no futuro (WANG; MAJZOBI; FARAHNAKY, 2020).

2.3.3.6 Extração com água quente pressurizada

A extração com água quente pressurizada, também chamada de extração com água subcrítica, extração com água superaquecida, extração com líquido pressurizado ou extração acelerada por solvente usando água como solvente, consiste no emprego de água submetida a altas temperaturas e pressões suficientes para manter a água no estado líquido durante todo o processo de extração. Sob as condições de temperaturas acima do ponto de ebulição atmosférico

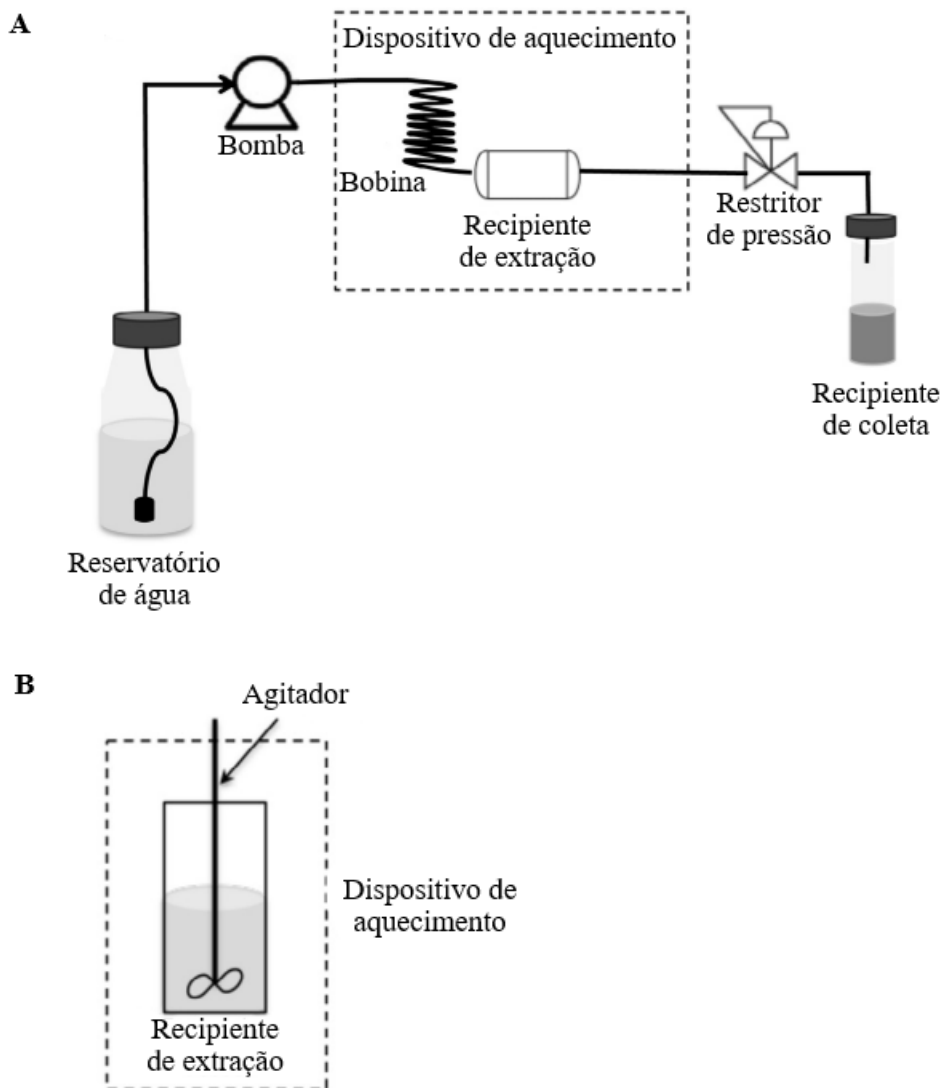
(100 °C, 0,1 MPa) e abaixo do ponto crítico (374 °C, 22,1 MPa), as propriedades físico-químicas da água mudam drasticamente. Nesta área, conforme a temperatura e a pressão aumentam, os coeficientes de dissociação e autodifusão aumentam, e a densidade, a viscosidade dinâmica e a tensão superficial diminuem (PLAZA; TURNER, 2015).

Todas essas propriedades permitem uma transferência de massa mais rápida e melhoram o umedecimento da matriz. Além disso, a alta temperatura reduz as interações intermoleculares que ligam o analito à matriz melhorando sua dessorção à água. Isso, por sua vez, pode levar a uma extração mais completa e um processo de extração mais rápido. Temperatura, pressão, tempo de extração e taxa de fluxo são os principais parâmetros que afetam a solubilidade, a transferência de massa e o efeito de matriz. Entre todos esses parâmetros, a temperatura é o mais importante, pois está envolvida na eficiência e seletividade da extração (GILBERT-LÓPEZ et al., 2017). No entanto, o uso de alta temperatura pode apresentar algumas desvantagens, como o aumento da solubilidade de outros compostos além dos desejados, degradação de compostos termolábeis e outras reações como Maillard e caramelização na matriz. Assim, nessa técnica é de grande importância conhecer a temperatura ótima de extração de cada analito, a fim de aumentar a solubilidade e transferência de massa e diminuir a degradação, reações químicas indesejáveis e perda de seletividade (PLAZA; MARINA, 2019). Ou ainda, minimizar esses efeitos usando pequenos tempos de residência realizando, por exemplo, uma extração em modo de fluxo contínuo com uma taxa de fluxo de água alta o suficiente (GILBERT-LÓPEZ et al., 2017).

Alguns relatos sugerem que a pressão tem muito pouca influência nas propriedades da água, desde que permaneça no estado líquido. No entanto, uma pressão mais alta pode ajudar a molhar a matriz da amostra, resultando em uma melhor eficiência de extração (PLAZA; TURNER, 2015). Outro parâmetro crítico a ser considerado é o tempo de extração, que começa com a água em contato com a matriz na temperatura e pressão de extração desejadas. A extração com água quente pressurizada pode ser realizada em sistemas de fluxo contínuo (dinâmicos) e sistemas em lote, onde o solvente não é substituído durante a extração (estáticos) (Figura 2.8). Ambos sistemas apresentam vantagens e desvantagens. O sistema estático é mais simples e fácil de usar, pois não são necessários bomba e restritor de pressão. No entanto, o tempo de residência dos analitos é muito maior do que no sistema dinâmico, o que pode causar a degradação dos analitos termolábeis. Além disso, no sistema estático, a eficiência da extração depende da proporção de distribuição dos analitos na água, uma vez que o volume do extratante é constante. No entanto, no sistema dinâmico, o tempo de residência dos analitos na água de alta temperatura é menor, uma vez que o solvente é continuamente bombeado através do recipiente de extração

e para fora do recipiente de coleta, tornando mais fácil o controle de degradação. A desvantagem é que este sistema é mais caro e existe o risco de entupimento dentro da tubulação durante a extração (PLAZA; TURNER, 2015).

Figura 2.8– As partes principais dos sistemas de extração com água quente pressurizada: dinâmico (fluxo contínuo) (A) e estático (lote) (B).



Fonte: Adaptado de Plaza e Turner (2015), (reproduzida com permissão).

Outro parâmetro a ser estudado em modo de fluxo contínuo é a taxa de fluxo. O processo de extração neste modo é controlado pela solubilidade ou pela dessorção. Se a extração for controlada por solubilidade, taxas de fluxo mais altas irão melhorar o rendimento de extração por unidade de tempo, enquanto se for controlada por dessorção, o rendimento de extração por

unidade de tempo não mudará com a taxa de fluxo. A vazão influencia diretamente no tempo de extração necessário para completar o processo. Uma taxa de fluxo apropriada permite um tempo curto de contato entre a amostra e o solvente, permitindo a solubilização dos analitos de interesse. O estado físico da amostra, o teor de umidade e a proporção de solvente para amostra no sistema estático são outros parâmetros que devem ser levados em consideração para obter maiores rendimentos de extração. Além disso, o uso de alguns modificadores orgânicos e inorgânicos, surfactantes e aditivos podem promover a solubilidade dos compostos no solvente de extração e afetar as propriedades físicas da matriz e a dessorção dos analitos da matriz (GILBERT-LÓPEZ et al., 2017).

Em geral, o uso da extração com água quente pressurizada oferece uma série de vantagens sobre as técnicas tradicionais de extração, como tempo de extração, maior qualidade dos extratos, menor custo do agente extrator e técnica ecologicamente correta (GIL-CHÁVEZ et al., 2013). Nos últimos anos, devido a capacidade desta tecnologia na extração de compostos hidrofóbicos e também polissacarídeos insolúveis, como β -glucanas lineares e quitinas (PLAZA; TURNER, 2015), muitas investigações têm sido desenvolvidas a partir de diferentes fontes fúngicas (ROSELLÓ-SOTO et al., 2016; SMIDERLE et al., 2017). Frequentemente, as condições ideais de extração para alcançar o maior teor de polissacarídeos variam entre 120 a 150 °C para temperatura e tempos curtos de 4 a 20 min. Porém, quando o objetivo é modificar e/ou hidrolisar os polissacarídeos, a temperatura e o tempo aumentam até 220 °C e 30 min, respectivamente (PLAZA; MARINA, 2019).

Benito-Román et al. (2016) otimizaram o processo de extração de β -glucana com água quente pressurizada do macro-fungo *Ganoderma lucidum*. O efeito de diferentes parâmetros de processo (temperatura (135–175 °C); taxa de fluxo (0.7–1.3 mL/min) e razão solvente/biomassa (20–60 mL/g)) foi estudado e concluiu-se que a temperatura de extração desempenhou um papel dramático no desempenho da extração: quanto maior a temperatura, maior o rendimento da extração; entretanto, altas temperaturas levaram a uma diminuição do conteúdo em β -glucanas do extrato final. Em baixas temperaturas (135 °C), apenas as β -glucanas facilmente acessíveis para o solvente foram extraídas e a solubilidade controlou o processo. Temperaturas mais altas produziram um aumento na taxa de extração de β -glucanas. As condições de extração que maximizaram o rendimento de extração de β -glucanas ($64,9 \pm 0,8\%$) e levaram ao maior teor de β -glucanas no produto final ($61,7 \pm 1,0\%$) foram 158 °C, 1,3 mL/min e 60 mL/g, com tempo de extração em torno de 92 min.

Palanisamy et al. (2014) desenvolveu um método de extração com água quente pressurizada a fim de extrair frações enriquecidas em β -glucanas a partir dos cogumelos

comestíveis *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. Os rendimentos de extração foram maiores em extrações individuais do que em extrações sequenciais sendo os parâmetros de extração ideais: 200 °C, 5 ciclos de 5 min cada a 10,3 MPa. As frações de polissacarídeo bruto isoladas dos extratos continham principalmente β -glucanas (incluindo quitooligossacarídeos derivados da hidrólise de quitina), α -glucanas e outros polissacarídeos (hetero/proteo-glucanas), dependendo da temperatura de extração e da cepa de cogumelo considerada.

2.3.4 Aumento de escala

Após realizar a seleção da cepa de produção, a manipulação do meio de cultura e a otimização dos parâmetros de processo, é necessário aumentar a escala do processo (*scale up*). Este é o grande desafio do processo de fermentação, pois as condições seguidas durante a fermentação em laboratório podem não apresentar o mesmo comportamento no cultivo de alto volume. Esta estratégia não é feita com base em um modelo de processo matemático ou usando projetos de experimentos. No entanto, normalmente se baseia em uma abordagem bastante empírica (FORMENTI et al., 2014), usando a regra dos polegares para aumento de escala hidráulica, incluindo a taxa de cisalhamento máxima ou velocidade da ponta do impulsor, valor do coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico ($k_L a$), saturação de oxigênio, entrada de energia volumétrica e tempo de mistura (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013). A escolha dos critérios de aumento de escala é difícil devido à resposta sensível e diversa das células a cada um dos fenômenos de transporte influenciados pelo projeto do impulsor, geometria do sistema, escala, propriedades do fluido e parâmetros operacionais (POLLARD et al., 2006).

O processo reverso, chamado de redução de escala (*scale down*), também é um desafio na tecnologia de fermentação industrial. Embora nos últimos anos os sistemas de fermentação de alto rendimento tenham demonstrado enorme progresso em termos de operação, análise, monitoramento e controle (TAJSOLEIMAN et al., 2019), a maioria dos processos biotecnológicos são projetados para os equipamentos existentes. Conseqüentemente, antes de um novo processo, as faixas de processo disponíveis precisam ser conhecidas. Com requisitos para um desenvolvimento e otimização de processo rápido e econômico, um bom entendimento dos parâmetros críticos do processo é importante para obter um gargalo potencial em avanços futuros (FORMENTI et al., 2014).

Outros desafios importantes de engenharia são a influência da morfologia na reologia do caldo e na transferência de massa. Geralmente, na maioria dos processos de produção

microbiana de biopolímeros ocorre um aumento na viscosidade aparente do caldo, devido ao aumento do crescimento celular, alterações na morfologia celular e/ou acúmulo de biopolímero. Essas mudanças na reologia do caldo afetam a transferência de massa e calor no biorreator, bem como a tensão de cisalhamento e a eficiência da mistura. Uma complexidade adicional surge quando a cultura microbiana em produção é filamentosa (ISHAQ et al., 2015; SEVIOUR et al., 2011). Os fungos filamentosos são os sistemas de expressão mais desafiadores em termos de reologia e transferência de massa devido à sua morfologia (filamentos de hifas livremente dispersos). Além disso, dependendo da fermentação e da cepa empregada, pode ocorrer a formação de pellets (agregados). O processo de formação do pellet pode começar em alguns minutos, tornando os métodos de análise para documentar a mudança de morfologia bastante exigentes. Em suma, a relação complexa entre todas as variáveis torna o aumento/redução da escala uma tarefa difícil (FORMENTI et al., 2014).

Sem dúvida, a produção em larga escala de biopolímeros microbianos apresenta muitos desafios técnicos. É nítido que muito trabalho ainda precisa ser feito antes de um melhor entendimento do comportamento altamente complexo das culturas submersas na produção de biopolímeros fúngicos. De acordo com Singh, Patil e Rale (2019), outras estratégias promissoras que podem ter importância no estudo e no aumento do rendimento em larga escala de biopolímeros são o uso de processo de fermentação em estado sólido, aumento específico de rendimento por modulações de meio, coprodução para economia de processo e imobilização celular como uma ferramenta para aumentar o crescimento.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO I

Neste Capítulo é apresentado o artigo sobre as diferentes técnicas (membranas de micro e ultrafiltração e adsorventes variados) para a concentração de biopolímeros extracelulares com atividade bioherbicida produzidos pelo fungo *Phoma* sp.

DIFFERENT TECHNIQUES FOR CONCENTRATION OF EXTRACELLULAR BIOPOLYMERS WITH HERBICIDAL ACTIVITY PRODUCED BY *PHOMA* sp.

This is an ‘Accepted Manuscript’ of an article published by Taylor & Francis Group in Environmental Technology on 27 Sep 2019, available online at: <https://www.tandfonline.com/10.1080/09593330.2019.1669720>

ABSTRACT

The natural ability of microorganisms to secrete high levels of bioactive compounds make them potentially attractive hosts for producing novel compounds. Microbial biopolymers have potential applications in all sectors of the economy. They present some advantages, such as biodegradability, reproducibility, and stability based on physicochemical properties. Based on this context, the objective of this work was to evaluate different methods for concentration and characterization of extracellular biopolymers produced by *Phoma* sp. Extracellular biopolymers were produced by submerged fermentation and were concentrated by hollow fiber membranes and by adsorption. The structural characterization of purified biopolymers was determined by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Phytotoxic effects were assessed through absorption assays in detached leaves of *Cucumis sativus* and evaluated on the seventh day after application. The surface tension was evaluated for each sample. Hollow-fiber microfiltration membrane presented a higher purification factor than hollow-fiber ultrafiltration membrane. EPS was identified in permeate and retentate fractions, but in higher concentration in the retentate fractions. Adsorption process was efficient to recovery more than 88% of EPS from cell-free fermented broth. The best performance was obtained using silica and activated carbon as adsorbent, with recovery higher than 93%. As high as the EPS concentration in the sample higher was the herbicidal activity. The results obtained here are very promising for

future applications. Membrane process may be used to development a liquid formulation of bioherbicide, whereas adsorption for the development of a solid formula.

Keywords: Submerged fermentation; extracellular biopolymers; membranes; phytotoxicity; adsorption.

1 INTRODUCTION

The searching for alternatives against the classic petrochemical products has instigated novel researches for producing natural products due to their interesting properties, such as simple biodegradability, low ecotoxicity, and both environmental and human compatibility [1,2]. The use of these products in various environmental and biotechnological fields, like food, chemical, textile, cosmetics, pharmaceutical, agriculture, and medicine [2], also contribute to the important researches. Based on this context, biopolymers produced from fungi have emerged as such important bioactive compounds [3–6].

Biopolymers are natural polymers or copolymers, that is, they are molecules of organic nature of high molecular weight produced from raw materials from renewable sources [7] or by microorganisms [8]. Several microorganisms are identified as microbial biopolymer producers and these polymers can be found either as attached to the cell surface or extracted from the fermentation medium [2].

The microbial biopolymers obtained by fermentation include various compounds, such as lipids, proteins, heteropolysaccharides, glycolipids, and lipopolysaccharides, among others. Both polysaccharides and compounds with biosurfactant properties, such as glycolipids, are the subject of various researches and are commercially produced, such as xanthan gum [9] and emulsan emulsifier [10]. Due to their biological functions, microbial polysaccharides can be classified as intracellular or extracellular biopolymers [11]. Extracellular biopolymers (EPS) have been classified in categories based on their functionalities as structural (act on the matrix water retention and cell protection), sorptive (compose of charged polymers), surface-active (present molecules with amphiphilic behavior), active, informative, nutritive, and redox-active functionalities [12].

Compared to biopolymers obtained from other natural sources, many microbial EPS have a high technological potential due to their novel and distinct properties, such as the reproducibility and physicochemical stability. Among the microorganisms, bacteria have the

best-established studied biosynthetic pathway. However, the number of studies of EPS produced by fungi is constantly rising [13–15], being of great importance since their biological activities are still not sufficiently studied.

One of the new applications for EPS is in the weed control. In a recent study was verified that the herbicidal activity of a culture filtrate was related to the increase of the concentration of EPS in the sample [41]. The possibility of EPS produced by fungi will bring many benefits to agriculture, since the environmental impacts of the excessive use of chemicals needs dramatically reduced. Current efforts focused on the search for efficient alternatives for weed control are being taken to avoid high damages to the environment [22,23].

One of the challenges encompasses the production of bioherbicides is the recovery of biomolecule from fermented broth aiming future steps of stabilization and formulation. So, in order to reduce development costs compared to conventional herbicides, cheaper concentration and purification techniques are required. The use of microfiltration (MF) membrane to concentrate metabolites from *Phoma* sp. was efficient to increase the herbicidal activity and the removal of unnecessary compounds [28]. The membranes filtration and the use of adsorbents are among the most used techniques for extraction and/or pre-concentration of bioactive compounds [25–27]. However, there is few reports focusing on the recovery of EPS to use them as bioherbicides [28].

Based on these aspects, the aim of this study was to recovery EPS from liquid fermentation of *Phoma* sp. and determinate the herbicidal activity of concentrated samples. Among the techniques used for recovery of EPS are microfiltration and ultrafiltration hollow-fiber membranes and adsorption. The adsorbents tested were silica, activated carbon, multi-walled carbon nanotubes, functionalized (-OH) multi-walled carbon nanotubes and functionalized (-COOH) multi-walled carbon nanotubes.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism and chemicals

The strain of *Phoma* sp. (NRRL 43879) was obtained from the National Center for Agricultural Utilization Research – EUA (ARS). Glucose, peptone, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and MgSO_4 were obtained from Sigma-Aldrich (Brazil). Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q Advantage water purifier system (Millipore, Bedford, USA).

2.2 Production of extracellular biopolymers

The production of EPS was performed in a 250 mL Erlenmeyer flask containing the fungus and fermentation medium composed by (g/L): potato (200), glucose (20), peptone (10), yeast extract (2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1) and MgSO_4 (0.5). The flasks were maintained under stirring at 120 rpm and 28°C for 7 days in a rotational incubator shaker (New Brunswick, Innova 44R, EUA). At the end of submerged fermentation, the biomass was separated from the crude broth by filtration using a filter paper (Whatman, number 2, Brazil) [28].

2.3 Recovery and quantification of extracellular biopolymers

The method based on acid precipitation [31] was used for EPS extraction. Cell-free broth obtained by centrifugation of the culture at 5000 rpm for 20 min was used for EPS extraction and the supernatant was filtered with a 0.22 μm membrane. Acid precipitation method involved the steps of adjusting the pH of the cell-free broth to 2.0 with hydrochloric acid (HCl) 6 N and incubating it at 4°C overnight. The precipitate (crude EPS) was collected by centrifugation (Eppendorf, model 5804R) at 5000 rpm for 30 min and transferred out to a dried filter paper at 40°C and dried until constant mass.

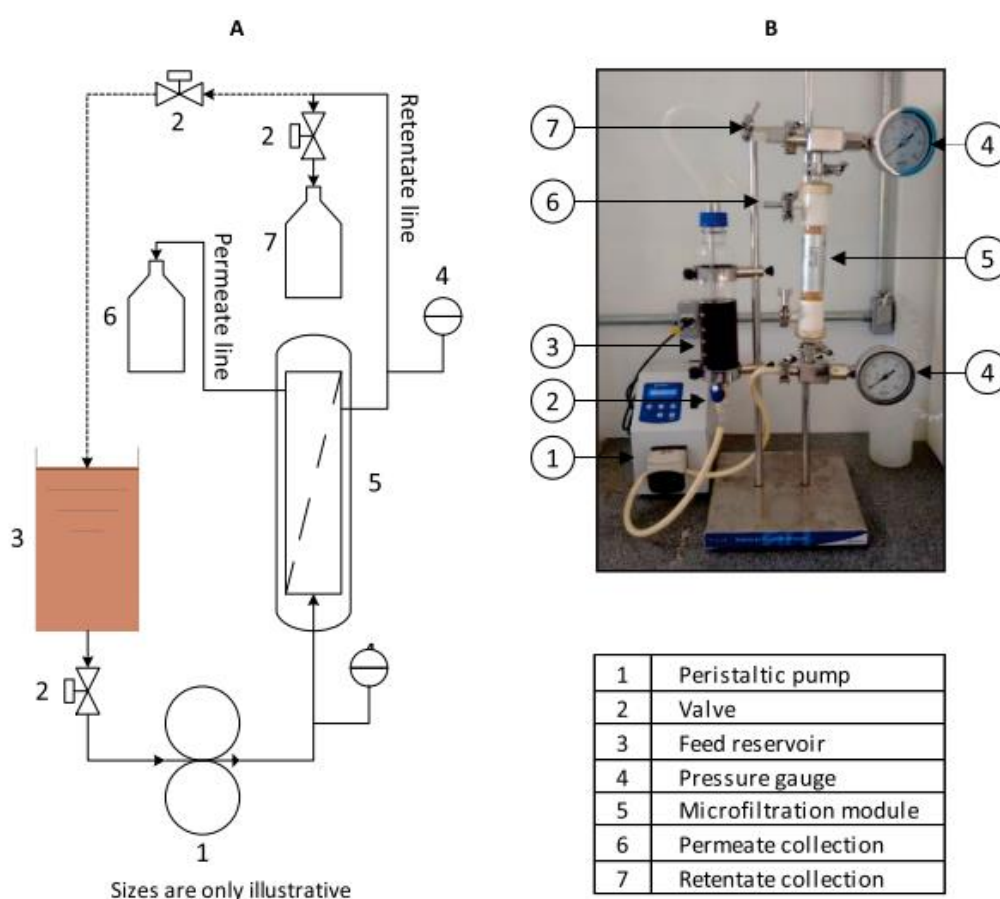
2.4 Concentration of extracellular biopolymers

2.4.1 Membranes

A hollow fiber membrane module of microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) was used to concentrate the crude broth. The experimental apparatus (Fig. 1, [28]) consisted of a peristaltic pump (Tecnal, TE-198, Brazil), a tubular glass reservoir of 1 L, two manometers, a tubular module containing a hollow fiber membrane of polyvinylidene difluoride (PVDF) (Microza, model UMP 1047Re model SLP 1053, Japan), valves and reservoirs. The MF tubular module is formed by a 0.2 μm of nominal pore size and 0.09 m^2 of filtration area [16], and the UF tubular module is formed by a nominal pore size of 0.34 μm and 0.12 m^2 of filtration area. The 500 mL capacity reservoir was filled by the crude broth (cell-free). Thereafter, the pump was turned on under pressure of 0.1 MPa at room temperature (25°C). The MF was developed based on the best result of previous studies of our Research Group [28], that was a concentration

of 30% (retentate). For the UF, the fraction obtained on the MF (30% retentate) was used for a second filtration. The concentration of biomolecules started when the system reached a steady-state condition and was performed until reaching 50% of concentration. The concentration was based on the initial volume of crude broth, which means the fraction collected after the filtration by filter paper. The retentate and permeate samples from both membranes were separated and stored to perform acid precipitation, surface tension, and bioassays of herbicidal activity.

Figure 1. Experimental apparatus for concentrating biomolecules obtained by submerged fermentation: (A) schematic diagram and (B) picture of the apparatus (reproduction with permission, [28]).



2.4.2 Adsorption

Adsorption experiments were conducted to investigate the performance of five commercial adsorbents to concentrate on EPS. The characteristics of the adsorbents are listed in Table 1. Two dosages of each adsorbent (0.5 g and 2 g) were added in 50 mL of fermentative broth. The solutions were shaken at a constant agitation rotation of 120 rpm for 4 h at room

temperature (25°C). The assays were performed in duplicate. After the adsorption, solid–liquid separation was performed by centrifugation (Eppendorf, model 5804R) at 4000 rpm for 10 min. The supernatant was used for assays of acid precipitation, surface tension, and bioassays of herbicidal activity.

Table 1. Characteristics of adsorbents used in this work.

Adsorbent	Trademark	Purity (%)	Length (µm)	Diameter
Activated carbon	<i>Éxodo® Científica</i>	91.8	-	50-100 µm
Silica	Sigma-Aldrich	99.8	-	7-15 µm
Multi-walled carbon nanotubes (MWNT)	Nanostructure & Amorphous Materials Inc.	95.0	5-15	60-100 nm
Functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWNT-OH)	Nanostructure & Amorphous Materials Inc.	88.0	10-20	50-80 nm
Functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWNT-COOH)	Nanostructure & Amorphous Materials Inc.	88.0	10-20	50-80 nm

2.5 Physical-chemical characterization of crude and concentrated extracellular biopolymers

2.5.1 Surface tension

The surface tension was determined according to the procedures described by Todero et al. [28]. The analyses were performed in triplicate using a KRÜSS DSA25 drop form analyzer (KRÜSS, Germany) at 25°C and determined with the dropping drop method.

2.5.2 Determination of fatty acids

The cell-free supernatant was extracted with liquid-liquid extraction with n-hexane solvent to obtain fatty acids. The content of fatty acids was analyzed by gas chromatography coupled to the flame ionization detector (GC-FID). For the determination, 10 μ L of each sample of oil was solubilized in 1 mL of n-hexane and 250 μ L of a 4 mg/mL solution of methyl tridecanoate (C23:0 Me) in isooctane. The solvents were evaporated at 40°C under vacuum. The fatty acids methyl esters (FAME) derivatizations were performed according to the method described elsewhere [32]. The FAME was analyzed in the GC-FID system (Shimadzu, GCMS-QP2010 Ultra, Japan) by injecting 1 μ L into a capillary column Rtx-5MS (Restek-USA) (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m). The carrier gas (Helium, purity > 99%, White Martins, Brazil) flowed at a constant pressure of 103.4 kPa. The following column temperature gradient was used: 3°C/min from 50°C to 140°C (10 min). The injector and detector temperatures were maintained at 140°C and the split ratio was 60:1. The compositions were expressed as milligram of each fatty acid per gram of oil (mg/g).

2.5.3 Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier transform infrared spectra of the EPS sample was obtained by using an FTIR spectrophotometer (Shimadzu, IR PRESTIGE-21, Japan). The sample was mixed with KBr and pressed into a tablet form. The FTIR spectra were then recorded [33].

2.6 Herbicidal activity

The herbicidal activity of concentrated samples were assessed through absorption assays in detached leaves of *Cucumis sativus* [34]. In order to carry out the test of the application on a leaf, young leaves of *C. sativus* were collected, cutting at the base of their petiole, and arranged in gerbox boxes previously disinfected with 70% of ethanol and lined with two sheets of moistened filter paper. The petiole leaves were wrapped in cotton and soaked with 2 mL of concentrated broth at different concentrations (using separately both retentate and permeate fractions). After the application, the leaves were maintained at 28°C in a climatic chamber (POL-EKO, model KK 350, Poland) with a photoperiod of 12 h [28].

The herbicidal activity was evaluated on the seventh day after the application based on the software Compu Eye Leaf & Symptom Area [35]. The leaves were collected and scanned

individually on a white background. The image files were opened and analyzed by the software, where the percentage of symptom area for each leaf image was calculated separately. Samples of cell-free fermented broth and water were used as the controls. A completely randomized design with three replicates of five leaves for each assay plus negative control (only water) and positive control (crude broth) was performed.

2.7 Statistical analysis

The statistical analysis of the experimental data was carried out using the Statistica 8.0® software (Statsoft Inc., USA). The Tukey's test was applied and a significance level of 95% (p -value < 0.05) was set for all analyses.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical characterization of cell-free fermented broth

The EPS are a group of structurally diverse molecules produced by different microorganisms and are mainly classified according to their chemical structure and their microbial origin. They are made up of a hydrophilic moiety, comprising an acid, peptide cations, or anions, mono-, di- or polysaccharides and a hydrophobic moiety of unsaturated or saturated hydrocarbon chains or fatty acids [28]. The concentration of EPS in the cell-free fermented broth was 6.62 g/L that is a very promising result when compared to other biopolymers of fungal origin (Table 2). In addition, the cell-free fermented broth was characterized by GC-FID and FTIR analyses. In the chromatography analysis was identified 10 molecules (Table 3) that can be correlated with the fatty acid pattern showed in the FAME mix standard chromatogram. The most abundant fatty acid was tricosanoic acid with a concentration of 78.84 mg/g oil, followed by octadecanoic and hexadecanoic acids with concentrations of 6.61 mg/g oil and 5 mg/g oil, respectively. The other fatty acids were minor in concentrations. The presence of fatty acids may be related to EPS with hydrophobic properties attributed to substituents such as polysaccharide-linked lipids and methyl and acetyl groups [12]. Additional analyses such as MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) and FITR are needed to confirm further details about the structure of the biopolymers.

Table 2. Fungal biopolymers (crude EPS) produced by different fungi species.

Fungal strain	Fermentation time (days)	Concentration (g/L)	Reference
<i>Phoma sp.</i>	7	6.62	This work
<i>Antrodia camphorata</i>	9	0.47	[29]
<i>Cryptococcus laurentii DSMZ</i>	6	4.3	[30]
<i>Fusarium equiseti ANP2</i>	7	4.9	[15]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	7	5.94	[16]
<i>Fusarium oxysporum</i>	14	0.21	[31]
<i>Fusarium solani SD5</i>	13.7	2.28	[32]
<i>Penicillium commune</i>	10	0.43	[33]
<i>Penicillium sp.</i>	9	0.55	[34]
<i>Penicillium griseofulvum</i>	30	0.25	[35]
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	18	0.42	[36]
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	20	0.94	[37]
<i>Trametes versicolor</i>	2	0.95	[38]

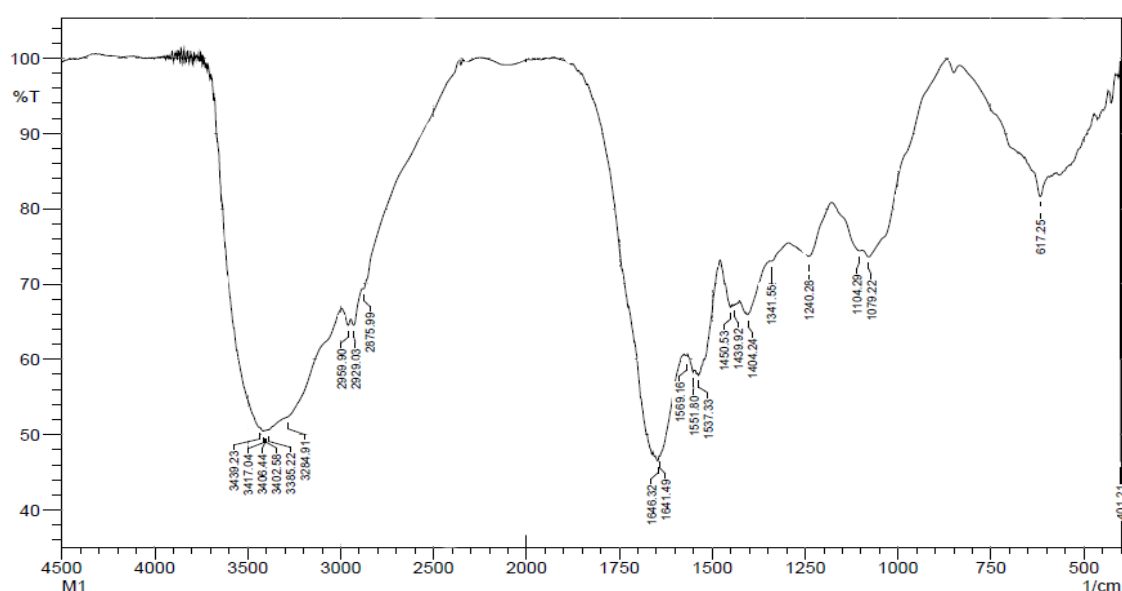
Table 3. Fatty acids composition of cell-free fermented broth produced by *Phoma sp.*

Fatty acids	Concentration (mg/g oil)
Hexanoic acid (C6)	0.294
Dodecanoic acid (C12)	0.360
1-tetradecanoic acid (C14)	0.368
Hexadecanoic acid (C16)	5.002
(Z)-heptadec-10-enoic acid (C17:1)	0.158
Octadecanoic acid (C18)	6.611
(Z)-octadec-9-enoic acid (C18:1 n9 cis)	1.327
(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid (C18:2 n6 cis)	0.160
(Z)-icos-9-enoic acid (C20:1 n9)	1.701
Tricosanoic acid (C23 pi)	78.84
SFA	91.48
MUFA	3.186
PUFA	0.160
Total	94.83

SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids

The FTIR spectra of free-cell fermented broth in KBr showed numerous peaks from 3439 cm^{-1} to 617 cm^{-1} , a pattern similar to other polysaccharides (Fig. 2). The polysaccharides contained a significant number of hydroxyl groups, which exhibited an intensive broad stretching peak at approximately 3400 cm^{-1} (3439 cm^{-1} , 3417 cm^{-1} , 3406 cm^{-1} , 3403 cm^{-1} , 3385 cm^{-1} and 3285 cm^{-1}). This peak is the characteristic absorption band of carbohydrate ring, which is responsible for the water solubility of EPS [39]. The band at approximately 2900 cm^{-1} (2959 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} , 2876 cm^{-1}) was attributed to the C–H stretching and bending vibrations. The absorption peaks at 1643 cm^{-1} and 1641 cm^{-1} appeared due to the presence of bound water and the asymmetric stretching vibration of COO^- [40], and peaks at 1569 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} and 1537 cm^{-1} could be assigned to N–H bending of amides II of protein [39]. The bands at 1450 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} and 1404 cm^{-1} were most likely the stretching vibration of C–O within COOH and the absorption peak at 1377 cm^{-1} appeared due to the symmetric stretching of the COO^- group [41]. In addition, the peaks 1240 cm^{-1} , 1104 cm^{-1} and 1079 cm^{-1} were dominated by ring vibrations overlapped with stretching vibrations of (C–O–H) side groups and the (C–O–C) glycosidic band vibration [40]. The weak absorption band at 617 cm^{-1} is indicative of a glycosidic linkage peak for polysaccharide [42].

Figure 2. FTIR spectrum of extracellular biopolymers produced from *Phoma* sp.



3.2 Concentration of EPS

Although the production of EPS was high in comparison with other studies, its concentration in the fermented broth is low for an industrial application, being necessary to select the appropriated process in order to concentrate the EPS. Table 4 presents the results obtained after the concentration using micro and ultrafiltration membranes. The maximum level of EPS obtained was 9.18 g/L for the retentate fraction of the MF membrane (30%), corresponding to a purification factor of 1.39. At this condition, the EPS recovery was 41.6%. The UF membranes presented lower values of concentration when compared to the MF membrane. For UF, the highest value of EPS was 6.22 g/L (retentate fraction) and the lowest value of EPS was 3.10 g/L (permeate fraction) obtained for the concentration of 90%. These lower values probably can be attributed to membrane fouling. Membrane fouling is considered the most significant problem of UF membrane technology. Particulate matter that is larger than the pores of UF (pore radius 2–10 nm) membranes forms a cake at the membrane surface [43]. In the case of the current study, the membrane fouling may have been caused by bioactive components found in the broth. The broth comprises feed components, cells, microbial metabolites, extracellular polymeric substances, among others [44].

Table 4. Concentration of extracellular biopolymers (EPS) produced by *Phoma* sp. using the microfiltration and ultrafiltration membranes.

Assays	Surface tension (mN/m)	EPS (g/L)	Volume (mL)	Purification factor	EPS recovery (%)
Negative control (water)	71.62 ^a	0.00		-	-
Positive control (crude fermentative broth)	54.25 ^f	6.62 ^e	500	1	100.0
Microfiltration (30%)					
Permeate	46.01 ^c	6.84 ^e	350	1.03	72.3
Retentate	40.14 ^d	9.18 ^a	150	1.39	41.6
Ultrafiltration (10%)					
Permeate	53.08 ^f	4.56 ^f	450	0.69	62.0
Retentate	54.48 ^f	4.01 ^c	50	0.61	6.1
Ultrafiltration (50%)					
Permeate	55.69 ^{ef}	4.46 ^f	250	0.67	33.7
Retentate	54.28 ^f	4.36 ^f	250	0.66	32.9
Ultrafiltration (90%)					
Permeate	58.22 ^f	3.10 ^d	50	0.47	45.9
Retentate	50.15 ^b	6.22 ^b	450	0.94	18.8

Purification factor = concentration of EPS after concentration / concentration of EPS in crude fermentative broth.
 EPS recovery = (total mass of EPS in the concentrated sample / total mass of EPS in crude extract) × 100.

^{a-f} Different letters in the same column indicate a significant difference at a confidence level of 95% (p -value < 0.05 – Tukey’s test) for the assays of each analysis.

Another technique used in the current research for EPS concentration was the adsorption. The adsorption is widely used because it has an easy operation. However, its efficiency is mainly affected by adsorbents. In addition to fumed silica and activated carbon, carbon nanotubes (CNTs) were also used as adsorbents (Table 5). CNTs have been extensively investigated because of their excellent structures and unique properties [45]. Independent of the adsorbent tested, the recovery of EPS from cell-free fermented broth was higher than 88.5% (using 1% of MWNT) reaching value of 99.8% (using 1% of silica). Activated carbon, that was an adsorbent with lower cost in comparison with nanotubes of carbon and silica presented satisfactory results, since the recovery was 93.5 and 98.5% using 1 and 4 wt% of adsorbent, respectively. In a general way, the use of 1 wt% of adsorbent was enough to recovery EPS from free-cell fermented broth, since the increase in the recovery obtained using 4 wt% did not compensate (in mean 5-6% higher) the cost associated with a higher adsorbent concentration.

Table 5. Concentration of extracellular biopolymers produced by *Phoma* sp. using five adsorbents at two concentrations and evaluation of surface tension.

Assays	Surface tension (mN/m)	EPS (g/L)	Recovery (%)
Negative control (water)	71.62 ⁱ	0.00	-
Positive control (crude fermentative broth)	54.25 ^g	6.62 ^a	100
Silica 1% (wt.%)	68.57 ^d	0.01 ^e	99.8
Silica 4% (wt.%)	65.57 ^e	0.01 ^e	99.8
Activated carbon 1% (wt.%)	66.17 ^j	0.43 ^f	93.5
Activated carbon 4% (wt.%)	64.97 ^f	0.10 ^{de}	98.5
<i>Multi-walled carbon nanotubes (MWNT)</i>			
MWNT 1% (wt.%)	46.23 ^h	0.76 ^b	88.5
MWNT 4% (wt.%)	66.31 ^j	0.24 ^d	96.4
MWNT-OH 1% (wt.%)	72.2 ^a	0.50 ^f	92.4
MWNT-OH 4% (wt.%)	69.8 ^c	0.54 ^{cf}	91.8
MWNT-COOH 1% (wt.%)	71.58 ⁱ	0.70 ^{bc}	89.4
MWNT-COOH 4% (wt.%)	70.22 ^b	0.50 ^f	92.4

^{a-j} Different letters in the same column indicate a significant difference at a confidence level of 95% (p -value < 0.05 – Tukey’s test) for the assays of each analysis.

Regarding the surface tension analysis, the broth and water tensions were 54.25 mN/m and 71.62 mN/m, respectively. When comparing the values of surface tension obtained in both membrane methods (Table 4), it is possible to verify a decrease in the values due to the increase of the concentration of EPS. The lowest values of tension were 40.14 mN/m and 46.01 mN/m, obtained for the retentate and permeate fractions of MF membrane, respectively, indicating a high concentration of EPS. The surface tension values obtained for adsorption were higher than those found for membranes, remaining between 72.2 mN/m and 65.57 mN/m, except that found in MWNT 1% (46.23 mN/m). These values were expected due to the low EPS concentration in the samples, indicating that adsorption was efficient to recovery the EPS from the cell-free fermented broth. The values of surface tension after the adsorption of free-cell fermented broth was close to the water, indicating that the molecules of EPS were withdrawn from the media.

3.3. Herbicidal activity

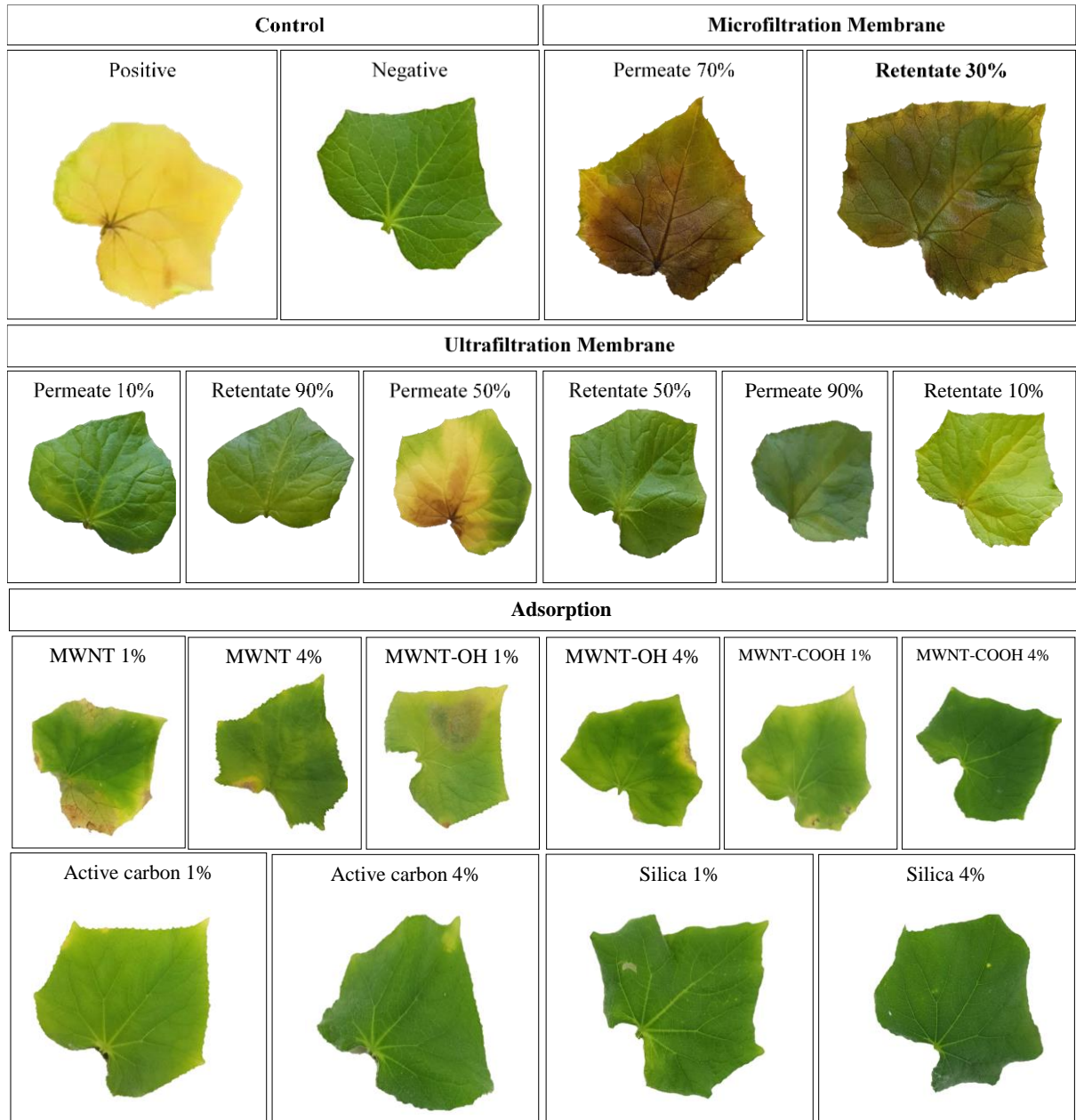
The application of crude cell-free fermented broth developed 100% of yellowing in *C. sativus* leaves. However, when evaluating the different concentration methods, the best results were obtained using the retentate fraction of MF membrane. In this method, the leaf presented symptoms of chlorosis (30.4%), necrosis (48.2%), and yellowing (21.4%) (Table 6 and Figure 3). These results led to the destruction of the leaf, without any further recovery. Regarding the membranes, the lowest concentration of EPS was obtained to permeate fraction of UF membrane (3.10 g/L), which presented low phytotoxicity and 81.2% of the leaf was healthy. There was verified a direct correlation between EPS concentration and herbicidal activity, demonstrating that EPS produced by *Phoma sp.* has potential to be used as a natural herbicide. Other studies also reported similar activity for EPS from fungi [16,19].

When evaluating the herbicidal activity of solid-free aliquots after adsorption, none leaf showed necrosis symptom. The application for the assays with silica and for MWNT-COOH 4% presented little herbicidal activity, where more than 95% of the leaf was healthy. For others adsorbents, the percent of healthy leaf ranged from 3.85 to 27.07%. However, in these assays, the most pronounced symptoms verified was a slight depigmentation of the leaf. When analyzing the corresponding picture in Figure 3, little visual difference between control and assays is seen. The results obtained in the bioassays using the solid-free samples after the adsorption experiments were expected due to the low residual EPS concentration in the supernatant (Table 5). This demonstrated that adsorption was efficient to recovery EPS from cell-free fermented broth and that EPS from *Phoma sp.* has herbicidal activity.

Table 6. Herbicidal activity of concentrated samples of EPS.

Assay	Symptoms (%)				
	Slight depigmentation	Chlorosis	Necrosis	Yellowing	Healthy
Negative control	-	-	-	-	100
Positive control				100	
Hollow fiber membrane					
Microfiltration (30%)					
Permeate	-	43.2	15.8	41.1	-
Retentate	-	30.4	48.2	21.4	-
Ultrafiltration (10%)					
Permeate	5.0	-	-	-	95.0
Retentate	56.7	-	-	-	43.3
Ultrafiltration (50%)					
Permeate	18.8	20.2	-	45.9	15.2
Retentate	4.8	-	-	-	95.2
Ultrafiltration (90%)					
Permeate	18.8	-	-	-	81.2
Retentate	7.0	-	-	-	93.0
Adsorption					
Silica 1%	5.91	-	-	-	94.09
Silica 4%	0.24	-	-	-	99.76
Activated carbon 1%	91.24	-	-	1.15	7.61
Activated carbon 4%	82.79	-	-	4.65	12.56
MWNT 1%	55.24	15.81	-	25.10	3.85
MWNT 4%	70.34	1.74	-	6.92	21.0
MWNT-OH 1%	80.25	7.17	-	5.94	6.64
MWNT-OH 4%	71.26	0.59	-	1.08	27.07
MWNT-COOH 1%	71.27	0.43	-	6.06	22.24
MWNT-COOH 4%	2.10	-	-	-	97.9

Figure 3. Comparison of the lesions observed in leaves of *Cucumis sativus* using the concentration methods of membranes and adsorption.



4 CONCLUSIONS

In this study was investigated two processes (membranes and adsorption) to concentrate EPS with herbicidal activity from cell-free fermented broth of *Phoma sp.* For membrane process, hollow-fiber microfiltration membrane presented a higher purification factor than

hollow-fiber ultrafiltration membrane. EPS was identified in permeate and retentate fractions, but in higher concentration in the retentate fractions. The herbicidal activity was related to concentration of EPS in the sample. As high as the EPS concentration, higher was the herbicidal activity. Adsorption process was efficient to recovery more than 88% of EPS from cell-free fermented broth. The best performance was obtained using silica and activated carbon as adsorbent, with recovery higher than 93%. The herbicidal activity of solid-free supernatant after the adsorption was not relevant, indicating that adsorption was efficient to recovery EPS and that EPS has herbicidal activity. The preliminary characterization of the structure of the extracellular biopolymer demonstrates the presence of a significant number of carboxyl and hydroxyl groups, a pattern similar to other polysaccharides. The results obtained here are very promising for future applications. Membrane process may be used to development a liquid formulation of bioherbicide, whereas adsorption for the development of a solid formula.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

FUNDING

The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarships and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for financial support. G. L. Zabet (304882/2018-6) and M. A. Mazutti thank the CNPq for the productivity grants.

REFERENCES

- [1] Geys R, Soetaert W, Van Bogaert I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014;30:66–72.
- [2] Ates O. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015;3:1–16.
- [3] Hu X, Pang X, Wang PG, et al. Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. *Carbohydr. Polym.* 2019;204:9–16.
- [4] Kheni K, Vyas TK. Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Ganoderma* sp TV1 and Its Potential as Antioxidant and Anticancer Agent. *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* 2017;7:72–80.

- [5] Liu C, Lu J, Lu L, et al. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour. Technol.* 2010;101:5528–5533.
- [6] Paynich ML, Jones-Burrage SE, Knight KL. Exopolysaccharide from *Bacillus subtilis* Induces Anti-Inflammatory M2 Macrophages That Prevent T Cell–Mediated Disease. *J. Immunol.* 2017;160:1641.
- [7] Joye IJ. Cereal biopolymers for nano- and microtechnology: A myriad of opportunities for novel (functional) food applications. *Trends Food Sci. Technol.* 2019;83:1–11.
- [8] Mohapatra S, Maity S, Dash HR, et al. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochem. Biophys. Reports.* 2017;12:206–213.
- [9] BeMiller J. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists.* Elsevier: Cambridge. 2018, 440p.
- [10] Yildiz H, Karatas N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochem.* 2018;72:41–46.
- [11] Donot F, Fontana A, Baccou JC, et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 2012;87:951–962.
- [12] Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Publ. Gr.* 2010;8:623–633.
- [13] Tian Y, Zhao Y, Zeng H, et al. Structural characterization of a novel neutral polysaccharide from *Lentinus giganteus* and its antitumor activity through inducing apoptosis. *Carbohydr. Polym.* 2016;154:231–240.
- [14] Orlandelli RC, Corradi da Silva M de L, Vasconcelos AFD, et al. β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-D-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;94:431–437.
- [15] Prathyusha AMVN, Mohana Sheela G, Bramhachari P V. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. *Biotechnol. Reports* 2018;19:e00277.
- [16] Todero I, Confortin TC, Luft L, et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. *Environ. Technol.* 2019; DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1580775>.
- [17] Jabran K, Mahajan G, Sardana V, et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Prot.* 2015;72:57–65.
- [18] Cordeau S, Triolet M, Wayman S, et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Prot.* 2016;87:44–49.
- [19] Todero I, Confortin TC, Soares JF, et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. *Environ. Technol. (United Kingdom).* 2018; DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441330>.
- [20] Pacheco-Ruiz S, Heaven S, Banks CJ. Effect of mean cell residence time on transmembrane flux, mixed-liquor characteristics and overall performance of a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Environ. Technol. (United Kingdom).* 2017;38:1263–1274.
- [21] Kuhn RC, Mazutti MA, Filho FM. Separation and purification of fructooligosaccharides on a zeolite fixed-bed column. *J. Sep. Sci.* 2014;37:927–933.
- [22] Sala L, Figueira FS, Cerveira GP, et al. Kinetics and adsorption isotherm of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* on ion-exchange resins. *Braz. J. Chem. Eng.* 2014;31:1013–1022.
- [23] Jha SS, Joshi SJ, Geetha SJ. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian J. Microbiol.* 2016;47:955–964.
- [24] Visentainer JV. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. *Quim. Nova.* 2012;35:274–279.
- [25] Jenny Angel S, Vidyadharani G, Santhosh S, et al. Optimization and Characterisation of Thermo Stable Exopolysaccharide Produced from *Bacillus licheniformis* WSF-1 Strain. *J. Polym. Environ.* 2018;26:3824–3833.
- [26] Pedras MSC, Ahiahonu PWK. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Chem. Ecol.* 2004;30:2163–2179.

- [27] Bakr E. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *J. Appl. Entomol.* 2005;129:173–175.
- [28] Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;87:427–444.
- [29] Mmanywa MS, Wang G. Production of Exopolysaccharides from Submerged Culture of *Antrodia Camphorata* S-29. *J. Nat. Sci. Res.* 2017;7(6):1–7.
- [30] Smirnou D, Hrbošová D, Kulhánek J, et al. *Cryptococcus laurentii* Extracellular Biopolymer Production for Application in Wound Management. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014;174:1344–1353.
- [31] Li P, Luo H, Meng J, et al. Effects of oligosaccharides from endophytic *Fusarium oxysporum* Dzf17 on activities of defense-related enzymes in *Dioscorea zingiberensis* suspension cell and seedling cultures. *Electron. J. Biotechnol.* 2014;17:156–161.
- [32] Mahapatra S, Banerjee D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydr. Polym.* 2013;97:627–634.
- [33] Chen Y, Mao W, Wang J, et al. Preparation and structural elucidation of a glucomannogalactan from marine fungus *Penicillium commune*. *Carbohydr. Polym.* 2013;97:293–299.
- [34] Sun K, Chen Y, Niu Q, et al. An exopolysaccharide isolated from a coral-associated fungus and its sulfated derivative activates macrophages. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;82:387–394.
- [35] Chen Y, Mao W, Wang B, et al. Preparation and characterization of an extracellular polysaccharide produced by the deep-sea fungus *Penicillium griseofulvum*. *Bioresour. Technol.* 2013;132:178–181.
- [36] Smiderle FR, Olsen LM, Ruthes AC, et al. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydr. Polym.* 2012;87:368–376.
- [37] Silveira MLL, Smiderle FR, Agostini F, et al. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. *Int. J. Biol. Macromol.* [Internet]. 2015;75:90–96.
- [38] Wang KF, Sui KY, Guo C, et al. Quorum sensing molecule-farnesol increased the production and biological activities of extracellular polysaccharide from *Trametes versicolor*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;104:377–383.
- [39] Wang J, Zhao X, Tian Z, et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.* 2015;125:16–25.
- [40] Wang W, Wang X, Ye H, et al. Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;82:979–988.
- [41] Zhu Y, Wang C, Jia S, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of the exopolysaccharide from *Weissella cibaria* SJ14 isolated from *Sichuan paocai*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;115:820–828.
- [42] Saravanan C, Shetty PKH. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;90:100–106.
- [43] Wibisono Y, Cornelissen ER, Kemperman AJB, et al. Two-phase flow in membrane processes : A technology with a future. 2014;453:566–602.
- [44] Guo W, Chi Y. Purification and fermentation characteristics of exopolysaccharide from *Fomitopsis castaneus* Imaz. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;105:213–218.
- [45] Alayan HM, Alsaadi MA, AlOmar MK, et al. Growth and optimization of carbon nanotubes in powder activated carbon for an efficient removal of methylene blue from aqueous solution. *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 2018; DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441911>.

CAPÍTULO 4 – ARTIGO II

Neste Capítulo é apresentado o artigo sobre as diferentes metodologias (água quente, água quente pressurizada e ultrassom) para a extração de biopolímeros intracelulares com atividade bioemulsificante produzidos pelo fungo *Phoma dimorpha*.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDE-ENRICHED FRACTIONS FROM *PHOMA DIMORPHA* MYCELIAL BIOMASS

This is an ‘Accepted Manuscript’ of an article published by Springer Nature in Bioprocess and Biosystems Engineering on 16 Nov 2020, available online at: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02486-3>

ABSTRACT

Ultrasound-assisted extraction (UAE) and pressurized hot water extraction (PHWE) were tested as advanced clean methods to obtain polysaccharides from *Phoma dimorpha* mycelial biomass. These methods were compared to conventional extraction (hot water extraction, HWE) in terms of polysaccharides-enriched fractions (PEF) yield. A central composite rotational design was performed for each extraction method to investigate the influence of independent variables on the yield and to help the selection of the condition with the highest yield, using water as an extraction solvent. The best extraction condition of PEF yielded 12.02 wt% and was achieved when using UAE with direct sonication for 30 min, under the intensity of 75.11 W/cm² and pulse factor of 0.57. In the kinetic profiles, the highest yield (15.28 wt%) was obtained at 50°C under an ultrasound intensity of 75.11 W/cm² and a pulse factor of 0.93. Structural analysis of extracted polysaccharide was performed using Fourier-transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, and thermal property. The water solubility index, water holding capacity, and emulsification index of PEF were 31.3 ± 1.5%, 138.1 ± 3.2%, and 62.9 ± 2.3%, respectively. The submerged fermentation demonstrates the huge potential of *Phoma dimorpha* to produce polysaccharides with bioemulsifying properties as a biotechnologically cleaner alternative if compared to commercial petroleum-derived compounds. Furthermore, UAE and PHWE are green technologies, which can be operated at an industrial scale for PEF extraction.

Keywords Mycelium; pressurized hot water; submerged fermentation; ultrasound

Introduction

Biopolymers are the large molecules derived from living organisms (plants, animals, and microorganisms) and from renewable resources through polymerization. They are also named as natural polymers, because are polymers produced during the growth of any living organism [1]. Polysaccharides are the most abundant group of biopolymers and have several special biological functions. They exist in almost all organisms for supporting structure and storing energy and act as antigenic determinants [2]. Their synthesis occurs generally after the growth phase or when the microorganism is in unfavorable environmental conditions, representing a metabolic strategy for its survival [3].

Microbial polysaccharides present some advantages, such as biodegradability, reproducibility, biocompatibility, stability based on physicochemical properties, and environmentally friendlier than their fossil fuel-derived counterparts. Based on those features, they have potential applications in all sectors of the economy [1, 4]. Polysaccharides have functional properties that are beneficial for human health, such as acting as an antitumor [5], anti-inflammatory [6] and antioxidant [7] agents. They have organoleptic characteristics and nutritional value to foods [8].

Fungi have been globally recognized for their widespread use in many industrial sectors, such as chemicals, food, medicine, and agriculture [9]. Fungal polysaccharides, also called gums, are hydrophilic substances able to form viscous solutions and gels in an aqueous medium, increasing the viscosity of a system [10]. This property characterizes them as bioemulsifiers and/or biosurfactants compounds [11], which are extensively applied in oil recovery, pharmaceutical materials, anti-cancer drug carriers [12], cosmetics formulations, bioremediation [13], among others.

Phoma is one of the largest fungal genus, with more than 3000 names recorded in MycoBank [14]. Several *Phoma* species can produce a variety of polymeric materials such as exopolysaccharides with novel structures and interesting applicabilities within the biological purpose [15]. For example, from the *Phoma herbarum* species, it is possible to isolate the YCP (acronym of Yancheng polysaccharide), a (1,4)- α -d-glucan, which is a promising polysaccharide for the development of antitumor and immunity-enhancing drugs [16, 17]. A recent study showed the polysaccharide ability to increase the bioherbicidal activity of fermentative broth of *Phoma* sp.[4]. In summary, many species of *Phoma* have useful beneficial

traits, including bioactive microbial compounds that could be incorporated into biotechnology areas.

The biotechnological production of fungal polysaccharides occurs by submerged fermentation intracellularly or extracellularly [18]. The polysaccharides are obtained from mycelium (intrapolysaccharides) or crude broth (exopolysaccharides), respectively. The techniques of recovery of these compounds from mycelium require methods of extraction more drastic, such as using hot water [19], organic [20] or inorganic [21] solvents. To overcome major shortcomings of the conventional hot water method, mainly associated with the use of high temperatures, extended extraction times and low efficiency, advanced extraction techniques such as ultrasound-assisted extraction (UAE) and pressurized liquid extraction (PLE) have emerged during the last decades for improved green extraction of bioactive carbohydrates [8, 22, 23].

UAE is being reported as one of the most efficient methods of polysaccharides extraction since is a rapid, cost-effective, and simple method that shortens the extraction time compared to conventional methods [24]. Furthermore, the bioactivity preservation of extract products is higher due to lower extraction temperatures [25]. The sonication mechanism generates ultrasonic waves, thus provoking implosions of the generated cavitation bubbles [22]. This phenomenon is called cavitation and causes physical, chemical, and mechanical changes, disrupting fungal cell walls, favoring the cell membrane permeability (greater penetration capability of solvent into the matrix), and enhancing the release of target compounds. Consequently, the mass transfer in the extraction process is accelerated [26].

PLE, including pressurized hot water extraction (PHWE), has been developed as a novel and simpler extraction technique, which provides shorter extraction times, can be automated, and usually does not require toxic organic solvents compared to other traditional extraction processes. It can be defined as an environmentally friendly method [27]. PHWE has been established as a special extraction technique employed in obtaining bioactive compounds such as polysaccharides from natural sources [28]. Pressurized hot water is a term that refers to water at temperatures above the atmospheric boiling point (100°C, 0.1 MPa), but below the critical point of water (374°C, 22.1 MPa), which remains in the liquid phase due to the application of pressure [29]. In this area, as pressure and temperature increase, the dissociation and self-diffusion coefficients increase, and density, dynamic viscosity, and surface tension decrease [30].

Therefore, this study aimed to extract polysaccharides-enriched fractions from *Phoma dimorpha* by different technologies (pressurized hot water and direct and indirect ultrasound).

The structural characterization was evaluated using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermal property (TGA), scanning electron microscopy (SEM), and X-ray diffraction (XRD). The water solubility index (WSI), water holding capacity (WHC), and emulsifying index (EI) were also determined. To the authors' knowledge, this is the first report for the extraction of polysaccharides from *Phoma dimorpha* mycelial biomass using such approaches and focusing on cleaner methods.

Materials and methods

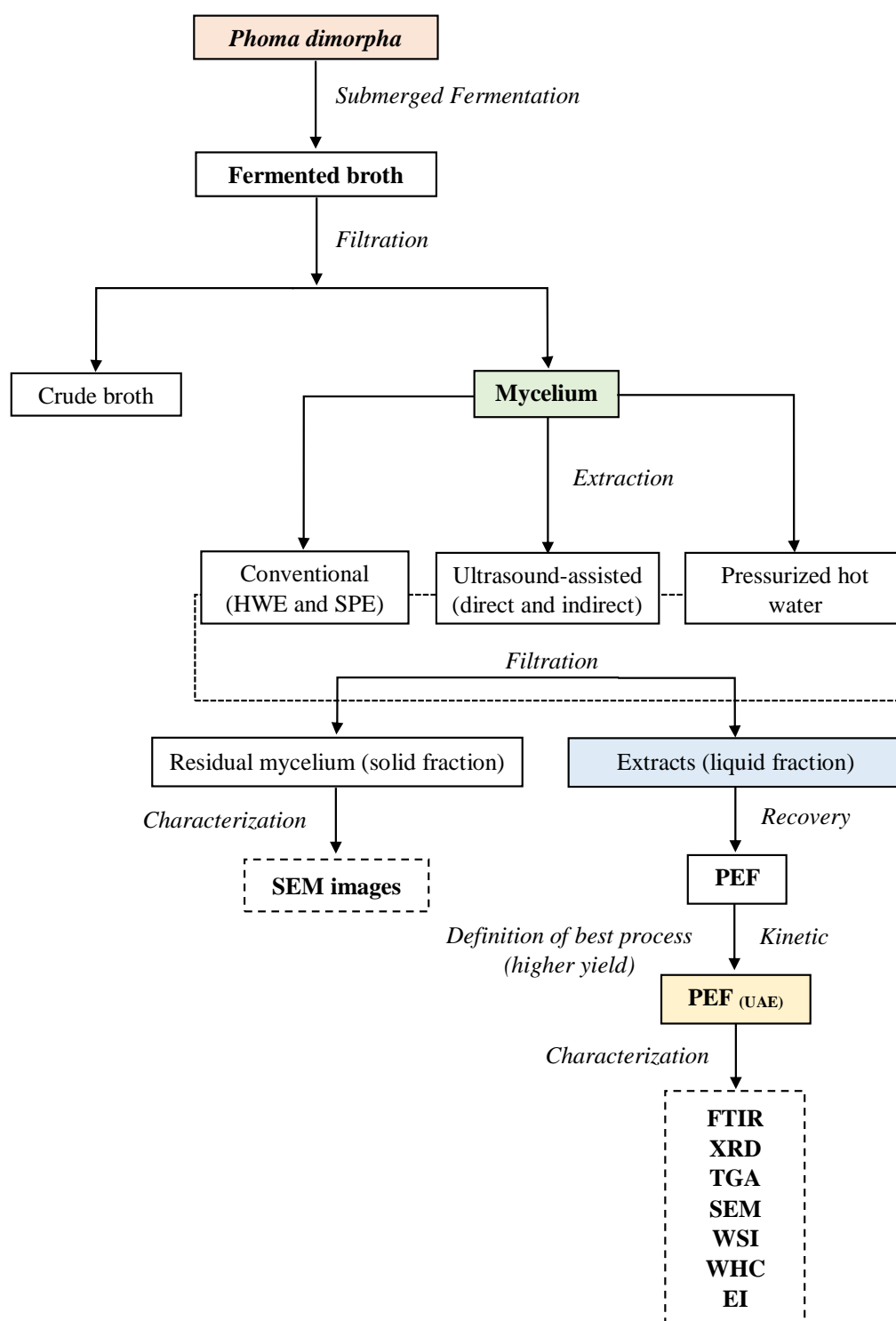
Cultivation of *Phoma dimorpha* and biomass preparation

The cultivation of *Phoma dimorpha* was performed according to the method described by Luft et al. [4]. The production of intracellular polysaccharides was performed in a 250 mL Erlenmeyer flask containing the fungus and the fermentation medium was composed by (g/L): potato (200), glucose (20), peptone (10), yeast extract (2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), and MgSO_4 (0.5). The flasks were maintained under stirring at 120 rpm and 28°C for 7 days in an orbital incubator shaker (New Brunswick, Innova 44R, EUA). At the end of fermentation, the mycelial biomass was separated from the crude broth by filtration in a gauze, washed thrice with distilled water, lyophilized (L 101, Liotop, Brazil) at -55°C using a vacuum pump (D.V.P Vacuum Technology, RC.8D, Brazil), and pestled in a mortar.

Extraction of polysaccharide-enriched fractions

Three methods were tested for the extraction of polysaccharide-enriched fractions (PEF) from *Phoma dimorpha* mycelial biomass: (1) conventional extraction (hot water extraction and steam pressurized extraction), (2) ultrasound-assisted extraction, and (3) pressurized hot water extraction. A scheme of the steps applied in the study and the analysis performed for each fraction is presented in Fig.1.

Figure 1 Scheme for the extractions and characterization of the polysaccharides-enriched fractions (PEF) produced by the fungus *Phoma dimorpha*.



HWE: hot water extraction; SPE: steam pressurized extraction; SEM: scanning electron microscopy; PEF: polysaccharides-enriched fractions; PEF_(UAE): polysaccharides-enriched fractions obtained by direct ultrasound-assisted extraction; FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy; XRD: X-ray diffraction; TGA: thermal property; WSI: water solubility index; WHC: water holding capacity; EI: emulsifying index

Conventional extraction

Two conventional extraction procedures were tested to compare the results with the other two methods investigated in this work. The first one was the conventional hot water extraction (HWE), which is widely cited in the literature for the extraction of polysaccharides from microorganisms [31–33]. Dried mycelium (0.5 g) was mixed with distilled water (40 mL), placed into a water bath, and stirred at 230 rpm. Water was chosen as a solvent because it effectively extracts polysaccharides [34]. The experimental variables were temperature (50, 70 and 90°C) and extraction time (60, 120 and 180 min). Afterward, the obtained mixtures were vacuum filtrated. The extracts were submitted to recovery and the residual mycelia were freeze-dried to further analysis. The second one is frequently used to obtain polysaccharides using an autoclave (steam pressurized extraction, SPE). Similarly, the sample mixture (0.5 g dried mycelium/ 40 mL distilled water) was heated at 121°C for 20 min in an autoclave and cooled down to 4°C, following the method reported by Morales et al. [22]. After performing SPE, the mixture was also submitted to vacuum filtration and the extract was submitted to recovery.

Ultrasound-assisted extraction

A description of the experimental apparatus for UAE has been reported by Luft et al. [35]. The bioreactor was composed of a glass jacketed vessel (250 mL of useful capacity) connected to a thermostatic water bath. Ultrasound equipment consisted of a high-intensity ultrasound processor of 400 W and a frequency of 24 kHz with pulse factor adjustable between 0 and 100 and amplitude adjustable from 20 to 100% (UP400S, Hielscher, Germany). The processor is connected to a titanium probe of 22 mm (H22L2D, Hielscher, Germany), presenting a maximum ultrasound intensity of 85 W/cm².

In the direct sonication, the ultrasonic probe was placed at the center of the bioreactor containing 0.5 g of dried mycelium and 40 mL of distilled water. While processing, the temperature was maintained at 50°C ± 2°C by circulating water through the jacket. In the indirect sonication, the ultrasound probe was placed at the center of the stirred bath (New Brunswick, Innova 3100, USA) at 100 rpm and 50°C. Erlenmeyers of 250 mL were the reaction vessels, which were arranged in a circle surrounding the probe (radius of 10 cm) containing 0.5 g dried mycelium and 40 mL of distilled water. All assays were carried out for 30 min at specified ultrasound intensity and pulse factor, according to the levels presented in Table 1.

After the extraction, the samples were submitted to vacuum filtration (through Whatman filter paper no. 1) to separate the extract (soluble fraction) from the residual mycelium (insoluble fraction). The extracts were stored at 4°C until further analysis of the recovery of polysaccharides-enriched fractions obtained by direct UAE (PEF_{UAE}). The residual mycelia were freeze-dried (L 101, Liotop, Brazil) and stored at -20°C until further analysis. The effects of ultrasound intensity (17-85 W/cm²) and pulse factor (0.5-1.0) on matrix extraction yields were evaluated through a central composite rotational design (CCRD). Thereafter, a kinetic curve was carried out to validate the results.

Pressurized hot water extraction

The description of the experimental apparatus for PHWE has been reported by Abaide et al. [36]. The system consists of a high-pressure pump (PU4087, Jasco, Japan) for pumping water, a thermostatic bath (SL-152, Solab, Brazil) for water preheating, a non-return flow valve, a stainless steel reactor with a useful volume of 50 mL, a ceramic band heater (1500 W) equipped with a thermocouple for temperature measurement (with a control panel), 316L stainless steel pipes (3.175 mm external diameter), pressure gauges, blocking valves, and a micrometering valve (3125GY, Hoke, USA).

Dried mycelium (5 g) was mixed with glass beads and placed in an extraction cell of 25 mL of useful volume. Distilled water was pumped with a constant flow rate (5 mL/min). The influence of temperature and pressure on the extract recovery was evaluated following the levels presented in Table 1. The effects of temperature (120-200 °C) and pressure (2.0-10 MPa) on matrix extraction yields were evaluated through a CCRD. After 20 min of extraction, the extracts were collected, cooled, and stored at 4 °C for the recovery of polysaccharides according to the procedure described in the next section. The pressurized material remaining in the extraction cell (residual mycelium) was separated from the glass beads, freeze-dried (L 101, Liotop, Brazil) and stored at -20 °C until further analysis.

Recovery of polysaccharide-enriched fractions

The recovery of PEF was done according to the procedure reported by Cho et al. [2]. The extracts (soluble fractions) were mixed with cold absolute ethanol (one part of extracts and three parts of ethanol, volume basis), for inducing polysaccharide precipitation, and left incubating overnight at 4°C. Subsequently, the precipitates were collected by centrifugation

(Eppendorf, model 5804R, Germany) at 5000 rpm for 20 min and 10°C and were dried in an oven at 45 °C until reaching constant mass (approximately 24 h). The obtained PEF was stored at -20 °C until further analysis. The PEF yield was expressed as a percent weight (wt%) of the initial material used in the study, which was determined as Eq. (1).

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{PEF content (g)}}{\text{Dried mycelium weight (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Structural characterization of polysaccharide-enriched fractions

The PEF_{UAE} were structurally characterized by FTIR, XRD, and SEM. The TGA of the intrapolysaccharides was also performed.

Fourier transform infrared spectroscopy

FTIR of the PEF_{UAE} was obtained by using an infrared spectrophotometer (Shimadzu, IR PRESTIGE-21, Japan). The spectra were obtained with a nominal resolution of 4 cm⁻¹ and within the spectral range between 4000 and 400 cm⁻¹. The samples were mixed with KBr and pressed into a tablet form. Therefore, the FTIR spectra were recorded.

X-ray diffraction

XRD patterns of the PEF were determined by a Rigaku D/max 2550PC diffractometer (Rigaku Inc., Tokyo, Japan). The operating conditions of the diffractometer were: Cu K radiation, 30 kV, 10 mA, and the scattering angles (2θ) of 5–99.98° with the scan rate 0.5°/min.

Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric measurements were carried out with a thermogravimetric analyzer (DTG60/60H, Shimadzu, Japan) under a non-oxidizing atmosphere (N₂, 99.997% purity) at 50 mL/min. The analysis consisted of loading 10 mg material into a covered alumina cell and heating at a linear heating rate of 10°C/min over a temperature range of 25-600°C. Thermogravimetric data were converted into derivative thermograms (DrTGA).

Scanning electron microscopy

The morphology of the samples was observed using a scanning electron microscope (Tescan, VEGA-3 G, Czech Republic) coupled to a secondary electron detector to obtain the images. For this analysis, the samples were covered with Au (sputtering metallization process, using a current of 20 mA for 90 s).

Determination of water solubility index and water holding capacity

The WSI and WHC of PEF were determined in duplicate following the method reported by Ye et al. [37], with some modifications. To determination of WSI, the dried PEF sample (0.2 g) was dissolved with 2 mL distilled water in a centrifuge tube. The suspension was centrifuged at 5000 rpm for 40 min and the precipitant was dried at 105°C for 4 h to obtain the dry solid weight. The WSI was calculated as Eq. (2).

$$\text{WSI (\%)} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

where M_0 is the mass (g) of total dry PEF sample and M_1 is the mass (g) of precipitant.

For WHC determination, the dried PEF (0.2 g) was dissolved with 10 mL pure water in a vortex mixer. The dispersed sample was centrifuged at 5000 rpm for 60 min and the supernatant, which was not held, was discarded. The precipitant was dropped on pre-weight filter paper for complete drainage of water and the mass of PEF precipitated was recorded. The WHC was calculated as Eq. (3).

$$\text{WHC (\%)} = \frac{M_2}{M_0} \times 100 \quad (3)$$

where M_0 is the mass (g) of total dry PEF sample and M_2 is the mass (g) of the total sample after water absorption.

Determination of emulsification index

According to the method described by Ye et al. [37], 3 mL of sunflower oil was mixed with 2 mL of PEF aqueous solution (0.5%, w/v) in a glass tube with a screw top (100 mm × 13 mm) and stirred in a vortex for 3 min for determination of emulsification index (EI). The mixture was stored at 25°C for 24 h and the EI₁ (at 1 h) and EI₂₄ (at 24 h) were calculated as Eq. (4). The analysis was done in duplicate.

$$EI (\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (4)$$

where H₀ is the full height of the mixture and H₁ is the height of the emulsifying layer.

Characterization of residual mycelium

After extractions and definition of the best assay of each method in terms of extraction yield, the morphology of the residual mycelium was observed using a scanning electron microscope (Tescan, VEGA-3 G, Czech Republic) coupled to a secondary electron detector.

Results and discussion

Comparison of extraction processes in terms of extraction yield

Table 1 presents the extractions yields obtained for each method as a function of independent variables investigated herein. PEF yields from *Phoma dimorpha* obtained by conventional method ranged from 3.12 to 6.58 wt%. The highest yield was obtained in assay 4 (90°C and 180 min), while the lowest yield (3.12 wt%) was obtained at the central point (70°C and 120 min). Statistical analysis of the results is summarized in Fig. S1 in the Supplementary data. The three linear parameters (temperature, liquid to solid ratio (L/S) and time) and the quadratic parameters (temperature and the interactions between temperature and time and between liquid to solid ratio and time) were significant for the extraction yield (p-value < 0.1), all with positive effect. The value obtained using SPE, also considered a conventional extraction method, was 2.86 wt%. The results for conventional extraction obtained in the current work

corroborate with the literature. A higher temperature combined with longer extraction time makes conventional extraction more efficient. Conventional extraction has disadvantages of longer extraction times, lower yields and extraction efficiency, and higher extraction temperature, which incorporates the risk of thermal degradation of thermolabile active compounds [25]. Regarding the alternative methods of extraction, higher extraction yields were obtained within a shorter time than conventional extraction.

UAE with direct sonication seems to be the most efficient method. PEF extraction yield was approximately two times higher than the conventional method in a shorter time (30 minutes). The amount of fractions PEF released ranged from 6.22 to 12.02 wt% and from 0.32 to 1.7 wt%, in direct and indirect sonications, respectively. The use of indirect sonication led to a significant decrease in the PEF yield, approximately seven times if compared to direct sonication. Data of Table 1 were used to determine the effects of the studied variables on PFE yield. The effects were expressed in the Pareto chart, which were presented in Figs. S2(a-b) in the Supplementary data. For direct sonication extraction (Fig. S2a), only the linear effect of the ultrasound intensity variable was statistically significant in the evaluated range. The linear effect of pulse factor, although not significant, affected negatively the extraction efficiency, since the PEF can be degraded under high sonication power. For indirect sonication extraction (Fig. S2b), the significant ultrasound intensity variable presented a negative quadratic effect, whereas the linear effect of intensity was not significant, but also negative, indicating that increasing the ultrasound intensity decreases the yield. The negative signs of the quadratic term indicate the presence of a maximum point for the ultrasound intensity in the evaluated range, showing that it would be interesting to optimize this variable before performing larger-scale extractions [38], thus being able to reduce the costs of energy [39]. The pulse factor and the interaction between pulse factor and intensity were not significant and presented positive linear effects. In general, low yields were obtained in these experiments, not exceeding 1.7 wt%.

Direct sonication produced the highest extraction yield because its cavitation effect is stronger, thus causing an intensification of mass transfer [40]. The highest yields were found in assays at high ultrasound intensity (assays 2 and 4). The results might suggest that the propagation of ultrasonic waves was more effective to dissolve and extract fungal compounds than the other methods. According to Zheng et al. [41], the high-intensity sonication generates strong transient cavitation in the medium. The transient cavitation bubbles generate intense shock waves that disrupt the microbial cells with the release of intracellular granules in the medium, acting as a pre-treatment. Due to strong microturbulence created in the liquid medium, the polysaccharides released from the cell wall get completely dissolved in the aqueous phase

[40]. In addition to presenting higher yields, shorter extraction time (30 min) at lower temperatures (50°C) makes UAE methodology attractive in large-scale applications, since the reduction in extraction time can favor the economic efficiency of the extraction process [24].

For PHWE, amongst the tested temperatures and pressures in this work, the best PHWE condition was 188 °C and 3.2 MPa, resulting in a PEF yield of 8.64 wt%. From the analysis of effects, temperature presented a higher influence on yield than pressure, as shown in Fig.S3 in the Supplementary data. Both effects of temperature, linear and quadratic, and the interaction between temperature and pressure were significant. However, the interaction presented a negative effect. The linear effect of pressure was negative and not significant. Although some references stated that high pressure improves extraction efficiency, the pressure is commonly described as having minimal effect on the solvent strength of pressurized hot liquid water or extraction efficiency. It is mainly applied to maintain water in its liquid state [30].

At lower temperatures, the yields were lower. The yields obtained followed a typical behavior in which the mass transfer from the sample to the solvent is significantly increased when the extraction temperature is raised [27]. The extraction time was kept constant (20 min) since this factor has demonstrated to have a negligible influence on extraction yield. Instead, the excessive extraction time can block the filters from the extraction cell affecting negatively the extraction [27]. According to Morales et al. [42], excessive time induces hydrolysis and degradation of polysaccharides into lower molecular weight products that are not precipitated. This behavior may have been due to the decomposition of thermally labile compounds, resulting in the production of highly-volatile compounds, low-molecular-weight species, and/or gaseous products [42].

If long periods of extraction are required, an alternative is using extraction cycles, which result in slightly higher yields [43]. The same tendency occurs with increasing temperature, which could result in the extraction of depolymerized polysaccharide species [42]. These small molecules are more susceptible to react with each other. For example, Maillard, caramelization, and thermo-oxidation reactions may occur during PHWE in glycation model systems and real natural samples [30]. When compared to other methods, the PHWE, despite being performed in a relatively short time (20 min), requires higher temperatures (188 °C). It provides water penetration into the mycelium similar to conventional methodologies using lower temperatures, but with longer times (90 °C/180 min and 120 °C/20 min, respectively).

Table 1 Yields of extracts obtained from *Phoma dimorpha* mycelium using the three extraction methods.

Assay	Coded variable levels		Yield (wt%)			
	X_1	X_2	HWE	Indirect UAE	Direct UAE	PHWE
1	(-1)	(-1)	3.46	1.02	10.66	3.98
2	(1)	(-1)	4.98	0.50	12.02	8.64
3	(-1)	(1)	3.70	0.98	6.40	4.94
4	(1)	(1)	6.58	0.92	11.42	6.01
5	(-1.41)	(0)	-	0.82	6.46	5.26
6	(1.41)	(0)	-	0.32	9.84	3.36
7	(0)	(-1.41)	-	1.08	6.22	5.66
8	(0)	(1.41)	-	1.62	9.22	1.71
9	(0)	(0)	3.44	1.60	7.64	3.19
10	(0)	(0)	3.12	1.44	9.30	3.45
11	(0)	(0)	3.16	1.70	9.38	2.68

Ultrasound technology with direct sonication was the best alternative to obtain PEF, probably due to its ability to act as a pretreatment of cell wall rupture. Conventional extraction and extraction with pressurized hot water resulted in similar yields. These findings can be attributed to the low solubility of PEF obtained from extraction with ultrasound. In the absence of sonication, extractions were not so effective in extracting more insoluble polysaccharides. Traditionally, water is not considered as a suitable extraction fluid for non-polar or organic compounds at room temperature. In the case of PHWE, there is a steady decrease in its permittivity, viscosity, and surface tension, but an increase in its diffusivity characteristics. Therefore, water behaves like certain organic solvents which can dissolve a wide variety of medium and low polarity analytes [44].

Comparison of extraction processes in terms of mechanism

Surface analysis of residual mycelium particles was performed before and after extractions to correlate the results with the physical changes. The powder was analyzed by SEM before (Fig. 2A) and after (Fig. 2B - 2F) extraction. Although porosity is observed in all images, it can be concluded from these pictures that all materials have different microstructures. Before

extraction, it is assumed these highly open network structures can originate from the lyophilization process. Stems structured with interconnected macropores are observed as a result of the formation of ice crystals [45]. The most significant difference is the rupture of these stems after the extraction processes, unlike HWE (Fig. 2E). This observation is in agreement with the results of extraction yields obtained by conventional extraction, which are lesser than other extraction methods. Images obtained for samples from HWE exhibited a different microstructure with some granules in the micron range, that is, spores with a smooth surface fixed on a porous membrane. This difference in structure can be attributed to a longer extraction time (180 min) at high temperature (90°C) and in the absence of pressure. The long time of extraction at high temperatures may have separated the soluble fractions from the mixture of insoluble solids and the absence of pressure in the medium resulted in their aggregation.

Fig. 2D represents the samples obtained after performing the steps involving PHWE. The first step is the desorption of solutes, followed by the diffusion of the extraction fluid in the matrix and elution of solutes. The enhancement of the extraction efficiency of PHWE can be attributed to (1) an improvement in the solubility and mass transfer effects and (2) an increased disruption of surface equilibria. The presence of pressure could facilitate extraction from samples where analytes are trapped in the matrix pores. The pressure forces water into areas of the matrices which are not normally covered if water at atmospheric pressure is used [44]. The pressure exerted in the process was not sufficient to destroy the cell wall. Despite a decrease in the surface, it is not possible to observe many ruptures.

Figure 2 SEM images of mycelium before and after extraction: (A) fresh; (B) direct UAE; (C) indirect UAE; (D) PHWE; (E) HWE; (F) SPE.

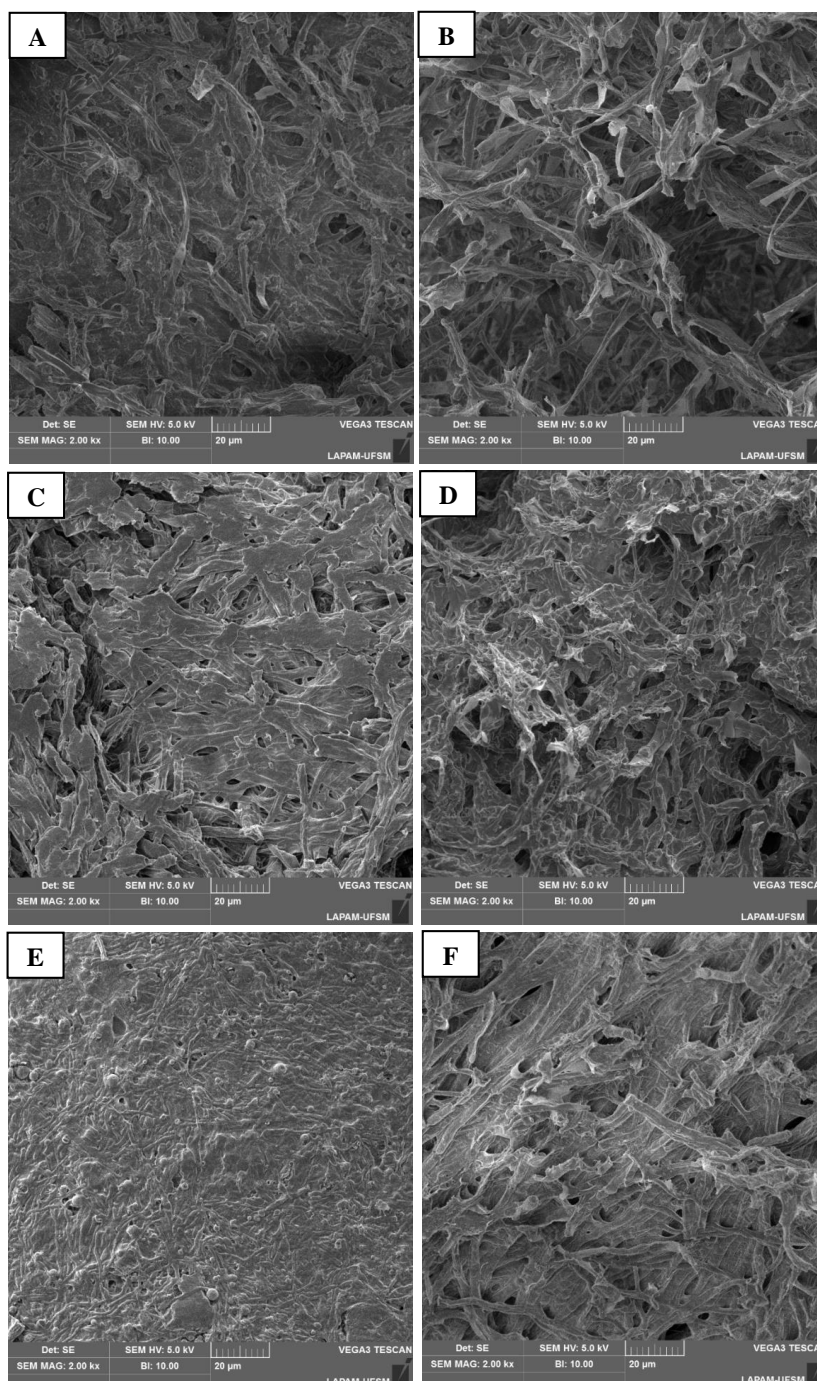


Fig. 2B shows drastic changes in residual mycelium particles after direct UAE. Hollow openings were seen in the cell structures, which could be correlated to explosive disruption. This behavior can be associated with cavitation phenomena [46], which occurred and facilitated the overall extraction process. These observations confirm the effects of ultrasound in the extraction process. According to Meullemiestre et al. [47], the cavitation bubble generated close

to the material surface collapses during a compression cycle and a micro-jet directed toward the surface is created. The high pressure and temperature destroyed the cell walls of microorganisms and delivered PEF into the medium. The cell disruption step (to break and/or open the cell wall) makes ultrasound technology more efficient than other extraction methods.

Kinetics of the direct ultrasound-assisted extraction

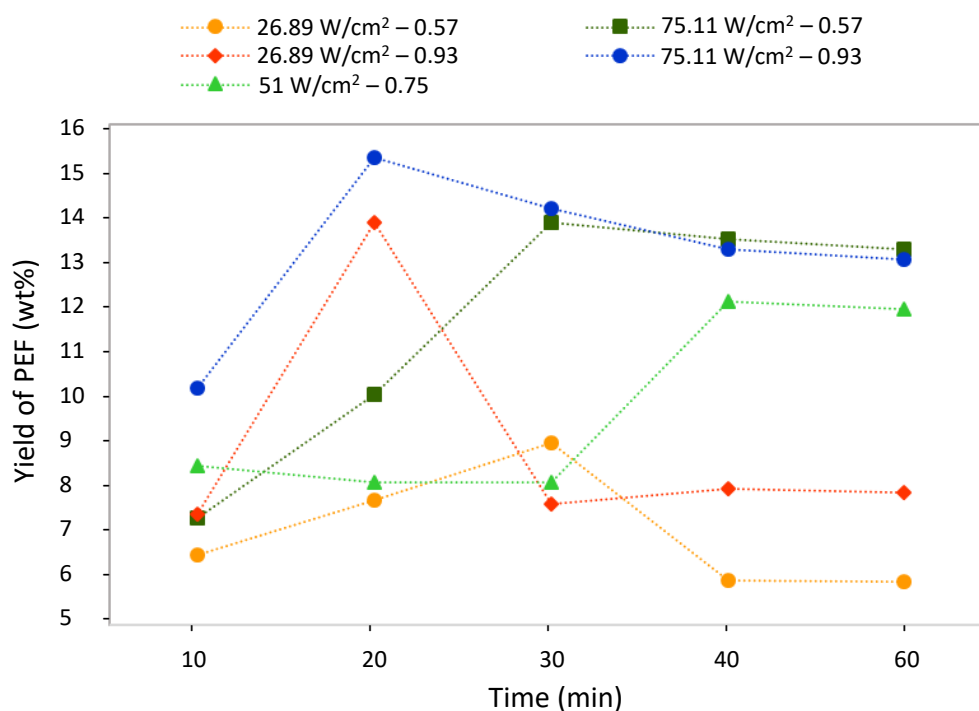
To select the optimum extraction time in direct UAE, kinetic curves (Fig. 3) were built after measuring the extraction yield (wt%) produced at different extraction times (from 10 to 60 min) for all assays of the CCRD, with exception of the axial points (assays 5-8) at 50°C. In assays 1 (26.89 W/cm²/0.57) and 2 (75.11 W/cm²/0.57), the highest yields were obtained in 30 min. The difference between these experiments was only the ultrasound intensity, while both were performed at the same pulse factor value (0.57). For assays 3 (26.89 W/cm²/0.93) and 4 (75.11 W/cm²/0.93), with pulse factor maintained at 0.93, the highest yields were obtained in 20 min. Based on the kinetic curves, 20 min was selected as the optimum extraction time, with a PEF yield of 15.28 wt% (assay 4), demonstrating that a long time of UAE is not necessary.

The second group of highest yields was obtained in assays 2 and 3. The value was the same for both, 13.84 wt%, but at different times (30 and 20 min, respectively). The yields of assay 2 remain approximately constant at 40 min (13.48 wt%) and 60 min (13.26 wt%). However, in assay 3, there was an abrupt drop in yield after 20 min. The value found at 20 min dropped by half after 10 min (7.66 wt%), remaining approximately constant until 60 min (7.92 wt%). The assay 9 (central point) returned constant yields up to 30 min (approximately 8 wt%), but it showed a sharp increase up to 40 min (12.12 wt%). The lowest yields were obtained in assay 1, showing values between 6.54 wt% and 9.02 wt% in the first 30 min, and after 40 min, they reduced to constant values of approximately 5.9 wt%.

There was an increase in the PEF extraction until the ideal time for each assay and, thereafter, a reduction in yield with increasing time was reached. Better performance of extraction with ultrasound in the shortest times is due to the effects of the disruption of the solid material caused by cavitation, accelerating the penetration of the solvent and the release of polysaccharides. The reduction in yield can be explained by the heating effect and overexposure to ultrasound treatment for a longer extraction time, which leads to structural destruction and polysaccharide decomposition during the prolonged extraction time, as reported elsewhere [48]. With increasing ultrasound time, more and more large-sized aggregates were broken into small-

sized granules, or polymer chains were degraded into small-sized molecules by the collapse of cavitation bubbles, as stated by Zheng et al. [41].

Figure 3 Kinetic curves for the extraction of PEF from *Phoma dimorpha* mycelium using direct UAE.



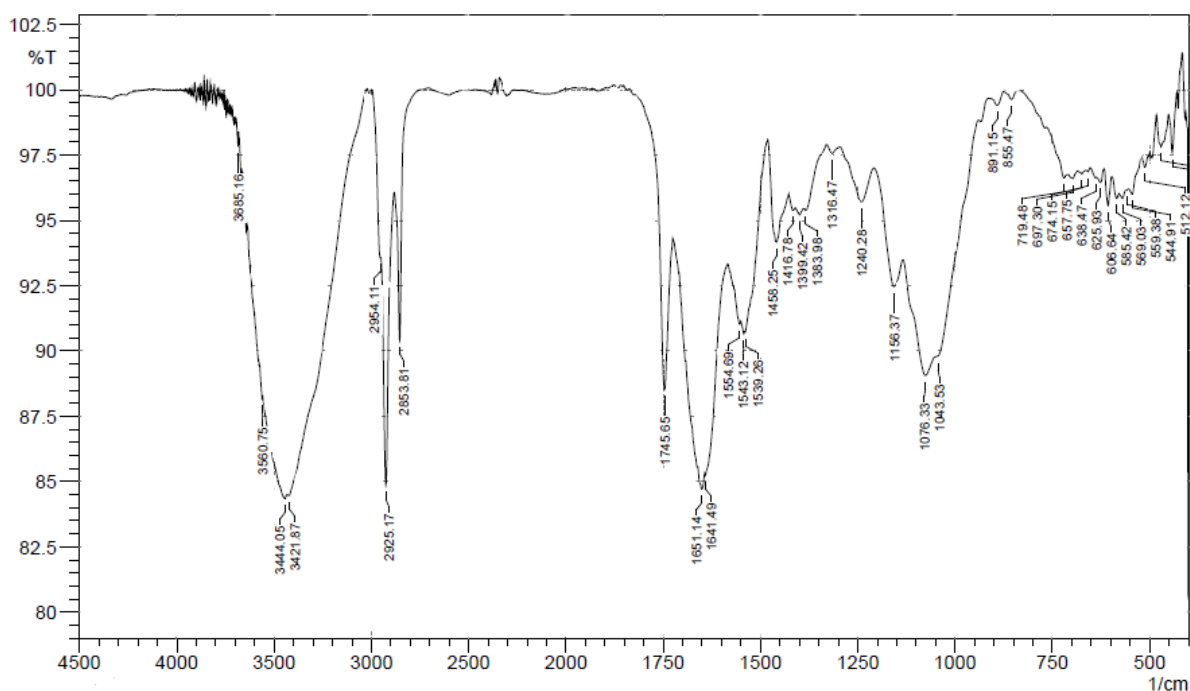
Structural characterization of PFE

FTIR spectrum

The FTIR spectroscopy was conducted to investigate the functional groups and characterizing the covalent bonding of the PEF. The FTIR spectrum of PEF is shown in Fig. 4 and presents the typical absorption of polysaccharides. The peak in the region of 3400 cm^{-1} was due to the hydroxyl (O-H) stretching vibration of the polysaccharide as reported earlier [49]. This peak is the characteristic absorption band of the carbohydrate ring, which is responsible for the water solubility of polysaccharide [50]. The absorption peaks near to 2900 cm^{-1} were attributed to the C-H bond. Bands at 1650 cm^{-1} are quite wide and intense, probably generated by C=O stretching vibration, which suggests that bands observed are generated by amides (proteins) impurities [51].

The peaks near to 1400 cm^{-1} indicate the presence of chitin, a minor component of the cell wall, and probably some products of protein degradation [52]. The presence peaks in the $1044\text{--}1156\text{ cm}^{-1}$ region was a finger-print region for all polysaccharides. Each particular polysaccharide has a specific band in the $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ region and the position and intensity of the bands in this region were specific for each polysaccharide [53]. The vibration bands near to 890 cm^{-1} and 855 cm^{-1} are sensitive to anomeric structure around glycosidic bonds and confirmed, respectively, β and α configuration of the polysaccharides [52]. Ultimately, the weak absorption band at 600 cm^{-1} is indicative of a glycosidic linkage peak for polysaccharide [54].

Figure 4 The FTIR spectra of the PEF obtained by direct UAE.



X-ray diffraction and thermogravimetric characterization

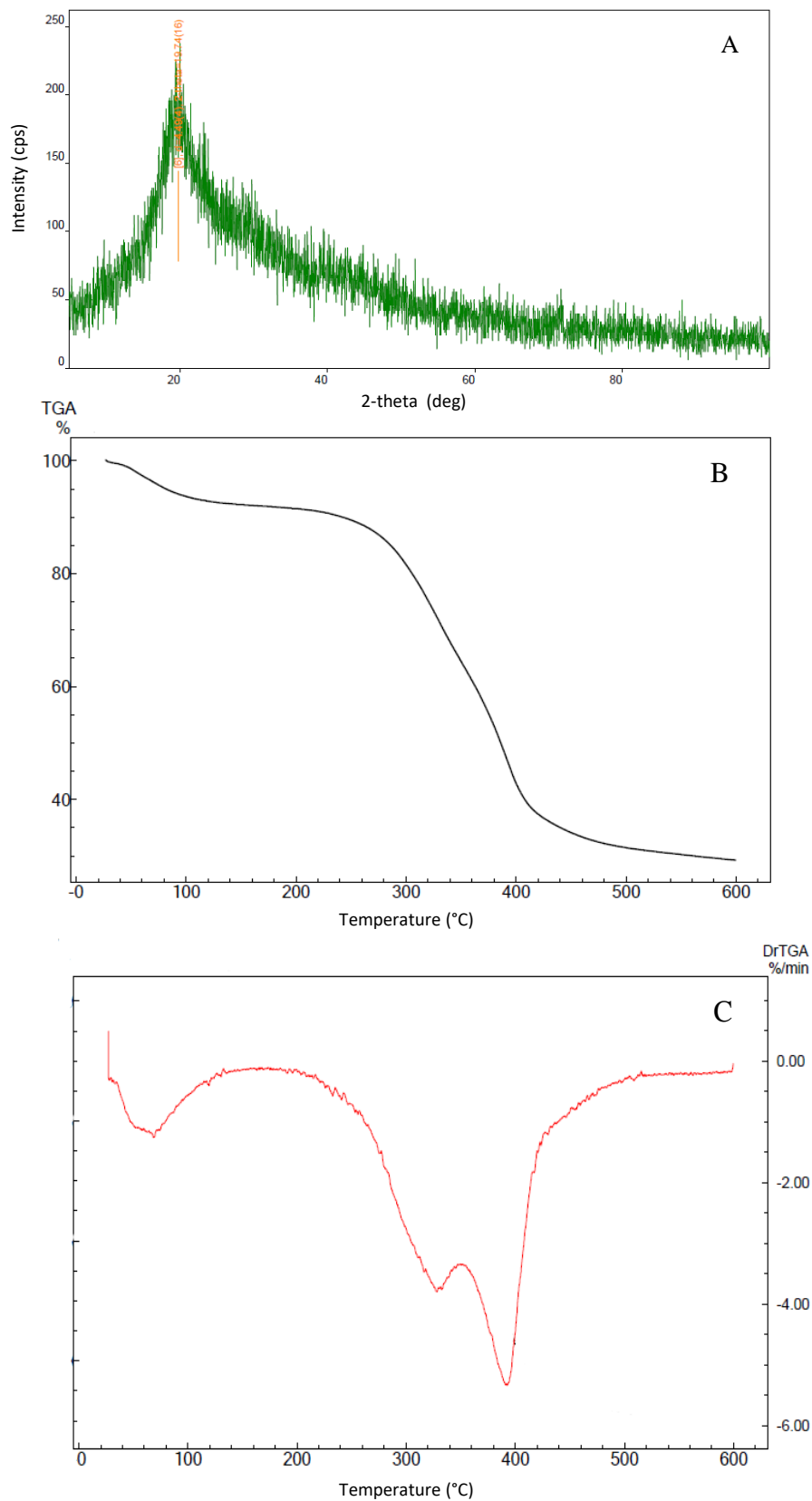
XRD pattern is determined by the structural properties of the polysaccharides, which could directly influence functional properties, such as WHC and water swelling capacity [55]. The crystalline material has a unique diffraction pattern and crystallinity, which can determine the mass ratio of the crystal part of PEF [2]. Fig. 5A suggests that PEF was a semicrystalline polymer (amorphous materials with the crystalline region). The crystalline region was observed

at the angle (2θ) 19.74° . This result was similar to the one obtained by Cho et al. [2], who reported polysaccharides from *Achatina fulica*.

The amorphous component of PEF prevailed over the crystalline organized one. According to Wang et al. [56], the crystallization capacity of polysaccharides is generally poor under normal circumstances, leading to “bun-shaped” X-ray diffraction curves. This structural arrangement is known to directly affect various properties, including stability, flexibility, chemical resistance, solubility, strength, swelling, or opaqueness of the polymer [57]. Indeed, physical properties are dependent on the degree of order within the material [58].

TGA of PEF was performed dynamically (weight loss versus temperature) and Fig. 5B shows the results. An initial weight loss of approximately 8% was observed between 25-135°C, which was previously associated with the moisture loss and suggested to be related to the high carboxyl group content of PEF [59]. The first stage of degradation occurred slowly (2.5%) from 145 to 245°C. The second stage occurred from 245 to 350°C (25.3%) with the evolution of the volatile matter mainly occurring between 350 and 440°C, losing approximately 29.4%. The further increasing temperature could lead to dehydration of materials, including physical and chemical bonded water, and then break apart and restructure the chemical bonds in compounds, forming volatile or non-volatile compounds [60]. Last, the fourth stage started near to 450°C and was upheld up to 600°C. When the temperature achieved 600°C, the weight loss was approximately 70%, which is attributed to the thermal decomposition of the polysaccharides. Fig. 5C presents the derivative (DrTGA curve) that denotes the rate of change of mass loss. This PEF type showed relatively high resistance to the thermal process (over 245°C) which reveals its potential to be used in products exposed to the high thermal process, such as in the food industry [61].

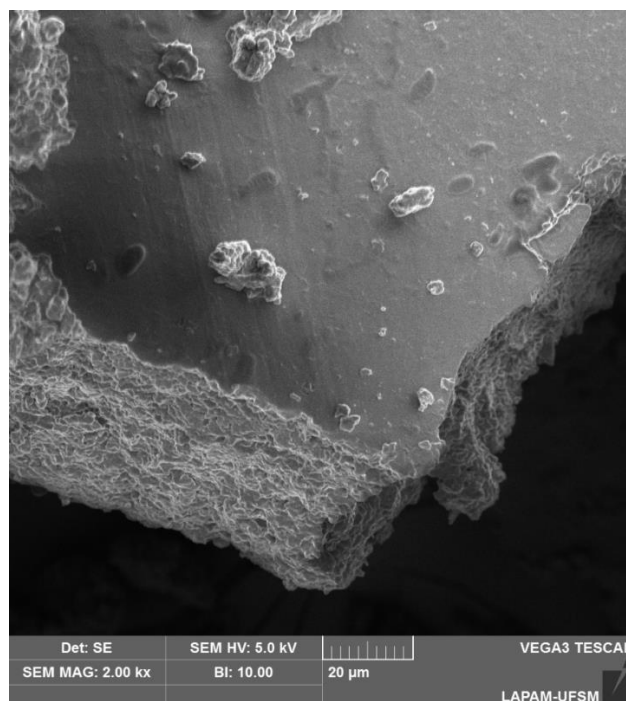
Figure 5 Structure characteristics of PEF obtained by direct UAE: XRD (A), TGA (B), and DrTGA (C).



Scanning electron micrograph of PEF

For a better understanding of the physical and functional characteristics of polysaccharides, the SEM image serves as a powerful indicator of the surface micromorphology of biomacromolecules [37]. SEM images of PEF_{UAE} sample (Fig. 6) revealed the smooth and compact surface with some irregular lumps and lateral porous structure, similar to α -glucan produced by *Lactobacillus reuteri* E81 [62]. According to studies reported elsewhere, this morphology is essential for the WHC and favorable to make plasticized biofilms [54]. The smooth compact structure forms a hydrated polymer consistent matrix, therefore giving mechanical stability to bio-films. The weak physicochemical interactions between molecules are due to various binding forces such as Van der Waals, electrostatic, repulsive, ionic attractive and hydrogen forces [54]. The porous structure is suitable for forming a hydrated polymer consistent matrix, being applied in cosmetics and foods as gelling, thickening, and emulsifying to maintain rheological properties during storage [63].

Figure 6 SEM image of PEF obtained by direct UAE from *Phoma dimorpha* mycelium at 2000 X magnification.



Water solubility index, water holding capacity, and emulsification index

The results for WSI and WHC of PEF were 31.3 ± 1.5 and $138.1 \pm 3.2\%$, respectively (Table 2), which are higher than those of PEF obtained from *Lactobacillus plantarum* 70810 [64]. It is difficult to compare the solubility of polysaccharides in water as it is affected by their structure, including the lengths of the main and branched chains, the arrangements of glycosidic bonds, and the degrees of polymerization. The structure changes according to the extraction method. Indeed, the water solubility of fungal polysaccharides increased by more than fourfold when treated with ultrasonic at higher amplitude [65]. Despite that, the results indicate that PEF has good solubility and also considerable potential to hold a large amount of water through hydrogen bonding.

Table 2 Water solubility index (WSI), water holding capacity (WHC), and emulsification index at 24 h (EI₂₄) of PEF obtained from *Phoma dimorpha* and comparison with different microorganism species.

Microorganism strain	WSI (%)	WHC (%)	EI₂₄ (%)	Reference
<i>Phoma dimorpha</i>	31.3 ± 1.5	138.1 ± 3.2	62.9 ± 2.3	This work
<i>Weissella cibaria</i> YB-1	95.2 ± 4.5	287.8 ± 16.2	84.4 ± 3.7	[37]
<i>Leuconostoc lactis</i> KC117496	14.2 ± 0.2	117.0 ± 7.5	-	[54]
<i>Lactobacillus plantarum</i> 70810	-	$88.3 \pm <0.1$	-	[64]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> DRP-5	98.6 ± 3.6	296.8 ± 18.9	79.5 ± 3.8	[66]
<i>Leuconostoc citreum</i> N21	92.0	-	63.4 ± 0.9	[67]
<i>Pleurotus djamor</i>			45.7 ± 4.0	[68] ¹
<i>Aspergillus flavus</i> AF612	-	-	64.0 ± 2.1	[69]
<i>Halomonas saliphila</i> LCB169T	98.0 ± 0.3	19.3 ± 6.5	58.7 ± 0.6	[70]
<i>Lactobacillus kefirianofaciens</i> ZW3	14.2	496.0	-	[71]

The EI of PEF was measured by its capacity to maintain a hydrocarbon emulsion in water. An effective emulsifier should have the ability to keep at least 50% of the primal volume of an emulsion for 24 h after formation [37]. The PEF possessed an EI of $65.7 \pm 1.7\%$ after 1 h and a slight decrease to $62.9 \pm 2.3\%$ was observed at 24 h. Similar results could be observed

with YB-1 dextran produced by *Weissella cibaria* YB-1 [37], DRP-5 dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* [66], and with dextran produced by *Leuconostoc Citreum* N21 that possessed an EI of 66.7% after 1 h and a slight decrease to 63.4% after 24 h [67]. It was suggested that PEF had a significant emulsifying property.

Conclusions

Different extraction methods were studied for polysaccharide-enriched fractions (PEF) recovery from *Phoma dimorpha*. Direct ultrasound appears as the best extraction method for PEF extraction from mycelium, with a yield two times higher than conventional extraction. Kinetic study of extraction by direct ultrasound demonstrated that breaking the wall of fungi cell permits to enhance mass transfer of PEF from mycelium to solvent in a short time. Structural analysis was also carried out on the PEF, which was compared with other works found in the literature. The expressive results of WHC and EI of the PEF suggest its applications as stabilizer agents.

Declarations

Funding

The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarships, and Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for the financial support.

Conflicts of interest/Competing interests

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Availability of data and material

Supplementary data to this article can be found online (insert URL).

Code availability

Not applicable.

References

1. Jha A, Kumar A (2019) Biobased technologies for the efficient extraction of biopolymers from waste biomass. *Bioprocess Biosyst Eng* 42:1893–1901
2. Cho YJ, Getachew AT, Saravana PS, Chun BS (2019) Optimization and characterization of polysaccharides extraction from Giant African snail (*Achatina fulica*) using pressurized hot water extraction (PHWE). *Bioact Carbohydrates Diet Fibre* 18:100179
3. Mahapatra S, Banerjee D (2013) Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications, *Microbiol. Insights*. 6:1–16
4. Luft L, Confortin TC, Todero I, et al (2019) Different techniques for concentration of extracellular biopolymers with herbicidal activity produced by *Phoma* sp. *Environ Technol*. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1669720>
5. Wang KF, Sui K yan, Guo C, Liu CZ (2017) Improved production and antitumor activity of intracellular protein-polysaccharide from *Trametes versicolor* by the quorum sensing molecule-tyrosol. *J Funct Foods* 37:90–96
6. Silveira MLL, Smiderle FR, Agostini F, et al (2015) Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. *Int J Biol Macromol* 75:90–96
7. Yang X, Yang Y, Zhang Y, et al (2020) Enhanced exopolysaccharide production in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* by Tween 80 supplementation. *Bioprocess Biosyst Eng*. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02418-1>
8. Mena-García A, Ruiz-Matute AI, Soria AC, Sanz ML (2019) Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *TrAC Trends Anal Chem* 119:115612.
9. Zhu F, Du B, Xu B (2016) A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocoll* 52:275–288
10. Barreto M do CS, Figueiredo M do VB, Burity HA, et al (2011) Production and rheological behavior of biopolymers produced by rhizobia and genetic characterization. *Rev Bras Agrociência* 17:221–227
11. Luft L, Confortin TC, Todero I, et al (2020) An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Crit Rev Biotechnol*. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805405>
12. Alizadeh V, Abbas S, Seyed S, Zamir M (2020) Enhancement of schizophyllan production in *Schizophyllum commune* using microparticles in medium. *Bioprocess Biosyst Eng*. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02444-z>
13. Bhaumik M, Dhanarajan G, Chopra J, et al (2020) Production , partial purification and characterization of a proteoglycan bioemulsifier from an oleaginous yeast. *Bioprocess Biosyst Eng* 43:1747–1759

14. Valenzuela-Lopez N, Cano-Lira JF, Guarro J, et al (2018) Coelomycetous *Dothideomycetes* with emphasis on the families *Cucurbitariaceae* and *Didymellaceae*. *Stud Mycol* 90:1–69
15. Sun K, Chen Y, Niu Q, et al (2016) An exopolysaccharide isolated from a coral-associated fungus and its sulfated derivative activates macrophages. *Int J Biol Macromol* 82:387–394
16. Yang XB, Gao XD, Han F, et al (2005) Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. *Biochimie* 87:747–754
17. Chen S, Ding R, Zhou Y, et al (2014) Immunomodulatory effects of polysaccharide from marine fungus *Phoma herbarum* YS4108 on T cells and dendritic cells. *Mediators Inflamm* 2014: 738631
18. Akila RM (2014) Fermentative production of fungal Chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications). 5:157–170
19. Zhao H, Li S, Zhang J, et al (2016) The antihyperlipidemic activities of enzymatic and acidic intracellular polysaccharides by *Termitomyces albuminosus*. *Carbohydr Polym* 151:1227–1234
20. Van Bogaert INA, Zhang J, Soetaert W (2011) Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem* 46:821–833
21. Fang QH, Zhong JJ (2002) Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 37:769–774
22. Morales D, Smiderle FR, Villalva M, et al (2019) Testing the effect of combining innovative extraction technologies on the biological activities of obtained β -glucan-enriched fractions from *Lentinula edodes*. *J Funct Foods* 60:103446
23. Zhang R, Parniakov O, Grimi N, et al (2019) Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae *Nannochloropsis* sp . *Bioprocess Biosyst Eng* 42:173–186
24. Sourki AH, Koocheki A, Elahi M, (2017) Ultrasound-assisted extraction of β -d-glucan from hull-less barley: Assessment of physicochemical and functional properties. *Int J Biol Macromol* 95:462–475
25. Sun Y, Zhang M, Fang Z (2019) Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review. *Trends Food Sci Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.026>
26. Naveena B, Armshaw P, Tony Pembroke J (2015) Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. *Biotechnol Biofuels* 8:1–13
27. Plaza M, Santoyo S, Jaime L, et al (2012) Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Sci Technol* 46:245–253
28. Plaza M, Marina ML (2019) Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC - Trends Anal*

Chem 116:236–247

29. Benito-Román, Alonso E, Cocero MJ (2013) Pressurized hot water extraction of β -glucans from waxy barley. *J Supercrit Fluids* 73:120–125
30. Plaza M, Turner C (2015) Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends Anal Chem* 71:39–54
31. Kang Q, Chen S, Li S, et al (2019) Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *Int J Biol Macromol* 124:1137–1144
32. Li SC, Yang XM, Ma H Le, et al (2015) Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. *Carbohydr Polym* 133:24–30
33. Zhang G, Yin Q, Han T, et al (2015) Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*. *Ind Crops Prod* 69:485–491
34. Smiderle FR, Morales D, Gil-Ramírez A, et al (2017) Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β -D-glucans from mushrooms. *Carbohydr Polym* 156:165–174
35. Luft L, Confortin TC, Toderó I, et al (2018) Ultrasound technology applied to enhance enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain and its potential for production of fermentable sugars. *Waste Biomass Valor* 10:2157–2164
36. Abaide ER, Mortari SR, Ugalde G, et al (2019) Subcritical water hydrolysis of rice straw in a semi-continuous mode. *J Clean Prod* 209:386–397
37. Ye G, Chen Y, Wang C, et al (2018) Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. *Int J Biol Macromol* 120:1315–1321
38. Kulkarni VM, Rathod VK (2014) Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves. *Ultrason Sonochem* 21:606–611
39. Sallet D, Souza PO, Fischer LT, et al (2019) Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Mortierella isabellina*. *J Food Eng* 242:1–7
40. Pourfarzad A, Najafi MBH, Hassanzadeh MK (2014) Characterization of fructan extracted from *Eremurus spectabilis* tubers: a comparative study on different technical conditions. *J Food Sci Technol* 52:2657–2667
41. Zheng Z, Huang Q, Luo X, et al (2019) Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast β -glucan. *Bioresour Technol* 273:394–403
42. Myint AA, Aregay MG, Kang M, et al (2020) Comprehensive study on the formation mechanism of highly bioactive compounds from *Allium hookeri* root using subcritical water and their antioxidant and anticancer effects. *J Supercrit Fluids* 157:104709
43. Palanisamy M, Aldars-García L, Gil-Ramírez A, et al (2014) Pressurized water extraction of β -glucan enriched fractions with bile acids-binding capacities obtained from edible mushrooms.

- Biotechnol Prog 30:391–400
44. Teo CC, Tan SN, Yong JWH, et al (2010) Pressurized hot water extraction (PHWE). J Chromatogr A 1217:2484–2494
 45. Hassainia A, Satha H, Boufi S (2018) Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. Int J Biol Macromol 117:1334–1342
 46. Patil DM, Akamanchi KG (2017) Ultrasound-assisted rapid extraction and kinetic modelling of influential factors: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant. Ultrason Sonochem 37:582–591
 47. Meullemiestre A, Breil C, Abert-Vian M, Chemat F (2016) Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. Bioresour Technol 211:190–199
 48. Maran JP, Priya B (2014) Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Nephelium lappaceum* L. Fruit peel. Int J Biol Macromol 70:530–536
 49. He Y, Ye M, Du Z, et al (2014) Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM405. Carbohydr Polym 105:169–176
 50. Wang J, Zhao X, Tian Z, et al (2015) Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. Carbohydr Polym 125:16–25
 51. Bzducha A, Piotr W, Stanisław K, et al (2019) Valorization of deproteinated potato juice water into β -glucan preparation of *C. utilis* origin: Comparative study of preparations obtained by two isolation methods. Waste Biomass Valor 11:3257–3271
 52. Novák M, Synytsya A, Gedeon O, et al (2012) Yeast β -(1-3),(1-6)-d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. 87:2496–2504
 53. Shao L, Wu Z, Zhang H, et al (2014) Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. Carbohydr Polym 107:51–56
 54. Saravanan C, Shetty PKH (2016) Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. Int J Biol Macromol 90:100–106
 55. Ghribi AM, Sila A, Przybylski R (2015) Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.). J Funct Foods 12:516–525
 56. Wang K, Wang J, Li Q, et al (2014) Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*. Food Res Int 62:223–232
 57. Ghribi AM, Sila A, Gafsi IM, et al (2015) Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water-soluble polysaccharides from chickpea flours. Int J Biol Macromol 75:276–282
 58. Mazeau K, Rinaudo M (2004) The prediction of the characteristics of some polysaccharides from molecular modeling. Comparison with effective behavior. Food Hydrocoll 18:885–898
 59. Yang Y, Feng F, Zhou Q, et al (2018) Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste.

Int J Biol Macromol 114:529–535

60. Li X, Wang L, Wang Y, et al (2016) Effect of drying method on physicochemical properties and antioxidant activities of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides. *Process. Biochem.* 51:1100–1108
61. Nambiar RB, Sellamuthu PS, Perumal AB, et al (2018) Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochem* 73:15–22
62. İspirli H, Sagdic O, Yilmaz MT, Dertli E (2019) Physicochemical characterisation of an α -glucan from *Lactobacillus reuteri* E81 as a potential exopolysaccharide suitable for food applications. *Process Biochem* 79:91–96
63. Feng F, Zhou Q, Yang Y, et al (2018) Characterization of highly branched dextran produced by *Leuconostoc citreum* B-2 from pineapple fermented product. *Int J Biol Macromol* 113:45–50
64. Li C, Li W, Chen X, et al (2014) Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT - Food Sci Technol* 57:477–485
65. Wang Z, Cheung Y, Leung P, Wu J (2010) Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus. *Bioresour Technol* 101:5517–5522
66. Du R, Qiao X, Zhao F, et al (2018) Purification, characterization and antioxidant activity of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* from homemade wine. *Carbohydr Polym* 198:529–536
67. Yang Y, Feng F, Zhou Q, et al (2018) Isolation, purification, and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc Citreum* N21 from dried milk cake. *Trans Tianjin Univ* 25:161–168.
68. Velioglu Z, Ozturk Urek R (2015) Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. *J Biosci Bioeng* 120:526–531
69. Ishaq U, Akram MS, Iqbal Z, et al (2015) Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*, *J Appl Microbiol* 119:1035–1045
70. Gan L, Li X, Zhang H, et al (2020), Preparation, characterization and functional properties of a novel exopolysaccharide produced by the halophilic strain *Halomonas saliphila* LCB169T, *In. J Biol Macromol* 156:372–380
71. Ahmed Z, Wang Y, Anjum N, et al (2013) Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II, 30:343–350

APPENDIX A

Supplementary data

Fig. S1 Pareto chart expressing the effect of process variables on the extraction yield using hot water extraction; L/S: liquid/solid.

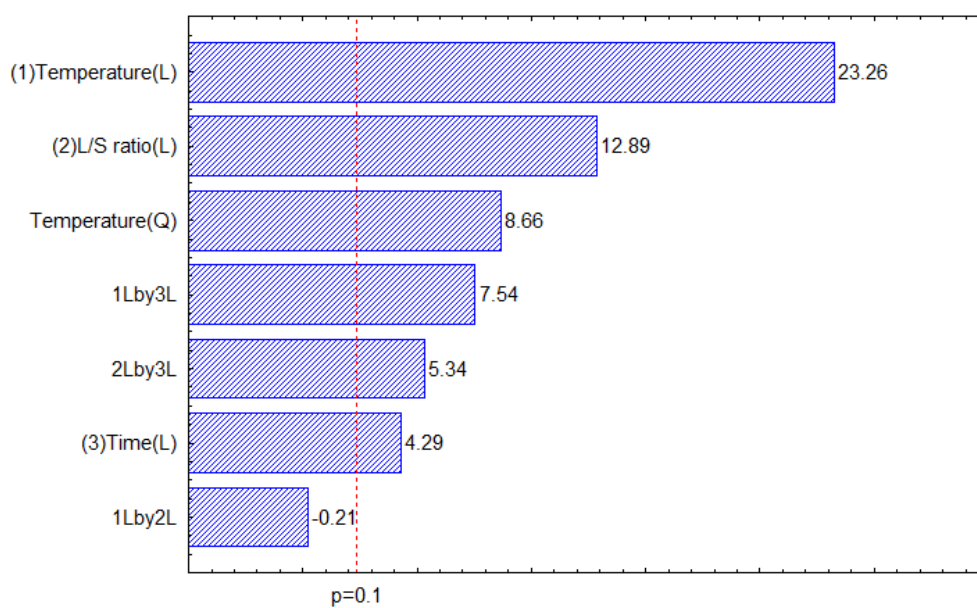
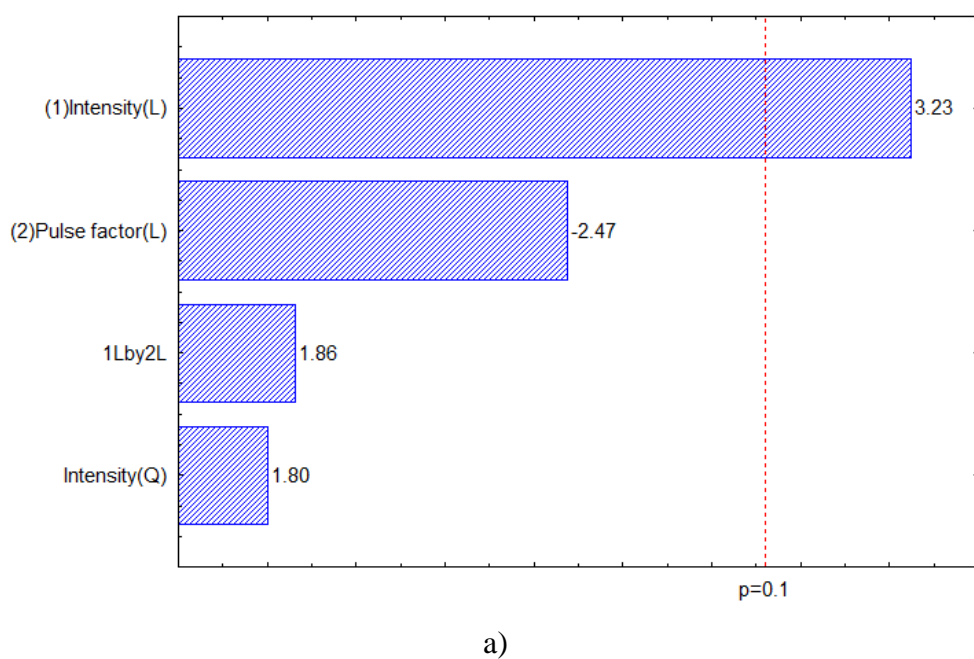


Fig.S2. Pareto chart expressing the effect of process variables on the extraction yield using direct (a) and indirect (b) sonication.



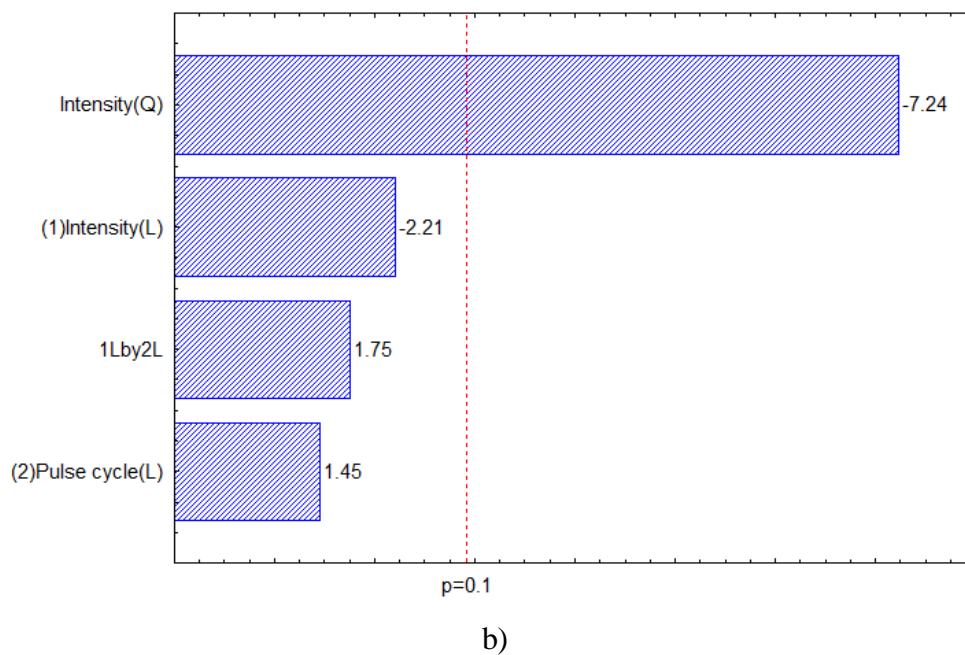
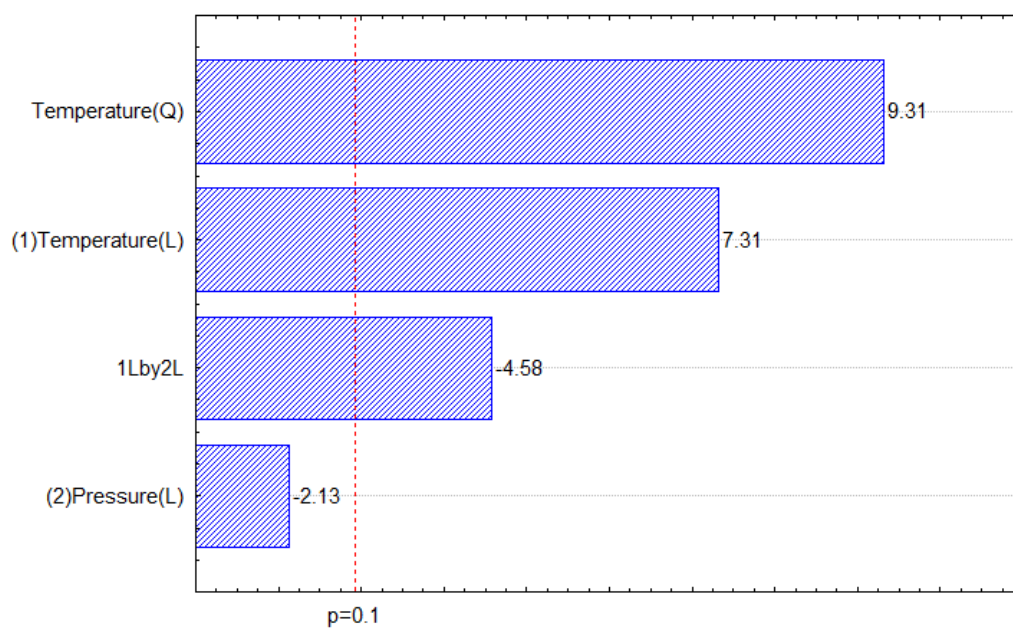


Fig. S3 Pareto chart expressing the effect of process variables on the extraction yield using pressurized hot water extraction.



CAPÍTULO 5 – ARTIGO III

Neste Capítulo é apresentado o artigo sobre a produção de biopolímeros intra e extracelulares com atividade bioemulsificante por meio de fermentação submersa do fungo *Phoma dimorpha* usando diferentes fontes de carbono adicionais (glicerol bruto, bagaço de malte e farelo de arroz).

AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES AS ADDITIONAL CARBON SOURCES ON PRODUCTION OF BIEMULSIFIER COMPOUNDS FROM *PHOMA DIMORPHA*

O presente artigo foi submetido para periódico internacional da área.

ABSTRACT

Bioemulsifying compounds are intracellular (IPS) and extracellular (EPS) biopolymers produced naturally by microorganisms during their growth and have been the interest of many researchers due to their biodegradability and potential to replace conventional emulsifiers. Large-scale production of bioemulsifying compounds is still limited because of the high processing cost. Therefore, this study focuses on the production of such compounds using the fungus *Phoma dimorpha* supplemented with low-cost substrates. Agroindustrial residues were used as the additional carbon source in submerged fermentation, such as glycerol from the biodiesel industry, brewer's spent grain, and rice bran. The effects of these carbon sources were evaluated on intracellular and extracellular production, biomass concentration, pH, density, surface tension, emulsifying index, and bioherbicidal activity. In general, the best results were found for the fermented broth obtained when crude glycerol at 5% concentration was supplemented. The main findings in this condition were the highest EPS yield of 5.48 g/L, IPS yield of 0.072 g/L, biomass concentration of 12.8 g/L, highest emulsifying index of 70% and lowest surface tension of 51.85 mN/m. The supplementation with glycerol increased the concentration of EPS in the medium and the emulsification index without affecting IPS production and biomass concentration. It also showed faster and more satisfactory results for bioherbicidal activity.

Keywords: Brewer's spent grain; Exopolysaccharides; Glycerol; Intrapolysaccharides; Rice bran; Submerged fermentation.

1. INTRODUCTION

Bioemulsifiers are compounds able to stabilize oil-in-water emulsions [1]. Even at low concentrations, these molecules can efficiently emulsify two immiscible liquids but are less effective at surface tension reduction. The combination of polysaccharide, fatty acid and protein components in bioemulsifying compounds confers upon them better emulsifying potential [2]. The search for bioemulsifying compounds from different sources is a continuous process because the availability of such compounds for commercial purposes is limited. Various advantages over synthetic emulsifiers are presented and the biodegradability of compounds from the microbial origin is one of the most important [3,4]. Hence, bioemulsifying compounds has gained the interest of many researchers as an alternative to synthetic emulsifier.

Currently, increasing attention has been paid to microbial polysaccharides and a wide number of microbial strains have been shown to produce polymers with diversified composition and functionalities [3]. There are potential applications in medicine, food, cosmetic and chemical industries [5,6]. Although there is more research on bacteria and mushrooms, endophytic fungi also have potential in the production of bioactive compounds [7–9]. Most endophytic fungi belong to the Ascomycota phylum and Fungi imperfecti [10].

Fungi biopolymers are mainly composed of carbohydrates synthesized by intracellular or extracellular pathway during the process of growth and metabolism, for their function and survival [11]. The biotechnological production of fungal biopolymers occurs by submerged fermentation intracellularly or extracellularly and one of the major difficulties in their production at a large scale is the high cost. A strategy generally adopted to make the production cost-effective is the use of cheap and waste substrates for the formulation of fermentation media [12,13]. It is possible to use residues and agroindustrial by-products as feedstocks. It not only reduces their price but also overcomes the disposal problem [11,14].

Crude glycerol is the by-product that is generated during the production of biodiesel [15]. For every 10 kg of biodiesel produced, approximately 1 kg of crude glycerol is generated during the trans-esterification reaction. According Kumar et al. (2020), it is estimated that the crude glycerol production will achieve 2.7 million tons for 2020. Although crude glycerol is considered a waste from the biodiesel industry, it can replace expensive carbon substrates required for bioactive compounds production by microorganisms [16]. The utilization of the crude glycerol to produce any valuable product (via fermentation) could be an effective way of reusing the low-grade glycerol [15].

Brewer's spent grain is considered the most important byproduct of beer brewing, representing approximately 85% of the total by-products obtained. It is constituted by the barley grain husks obtained as a solid residue after the wort production but also can be derived from a mixture of barley malt with adjuncts (other cereal grains) [17]. In the past, brewer's spent grain has been disposed in landfills or used as animal feed (mainly cattle), but in recent years, due to its abundance and valuable chemical composition [18], brewer's spent grain has great potential for the sugar platform for bioconversions in energy production and biotechnological processes [19,20].

Rice bran, the outer layer of milled rice, is produced as a major co-product in the rice milling industry with a global potential of 29.3 million tons annually [21]. Due to its composition rich in protein, fat, carbohydrates, and many other active compounds, this co-product, also traditionally used for animal feed, in recent years has been widely used in human food and nutrition [22]. In addition to its nutrient-rich composition, rice bran is gaining high attention due to its easy availability, low cost, high antioxidant potential, and promising effects against several metabolic ailments [21,23].

The purpose of this work was to evaluate the feasibility of using crude glycerol, brewer's spent grain, and rice bran as additional carbon sources in the submerged fermentation using the fungus *Phoma dimorpha* for polysaccharides-enriched fractions (PEF) production. To the authors' knowledge, this is the first study assessing wastes as the additional carbon source for producing bioemulsifying compounds by the filamentous fungus *Phoma dimorpha*. A study was carried out to evaluate the effects on PEF production, pH, surface tension, density, emulsifying index, and bioherbicidal activity.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism

The *Phoma dimorpha* (NRRL 43879) strain was cultivated according to the method described by Luft et al. [24]. The strain was maintained at -4 °C in a potato dextrose agar (PDA) medium subcultured every 15 days.

2.2. Additional carbon sources

The crude glycerol was provided by *Olfar S/A - Alimento e Energia* (Erechim, Brazil). The brewer's spent grain (average diameter of 2.0 mm) was kindly donated by a local brewery (*Santamate Ind and Com Import and Export*, Santa Maria, Brazil). The rice bran (average diameter of 300 μm) was provided by *Primo Berleze & Cia Ltda* (Santa Maria, Brazil). Both brewer's spent grain and rice bran were dried and stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

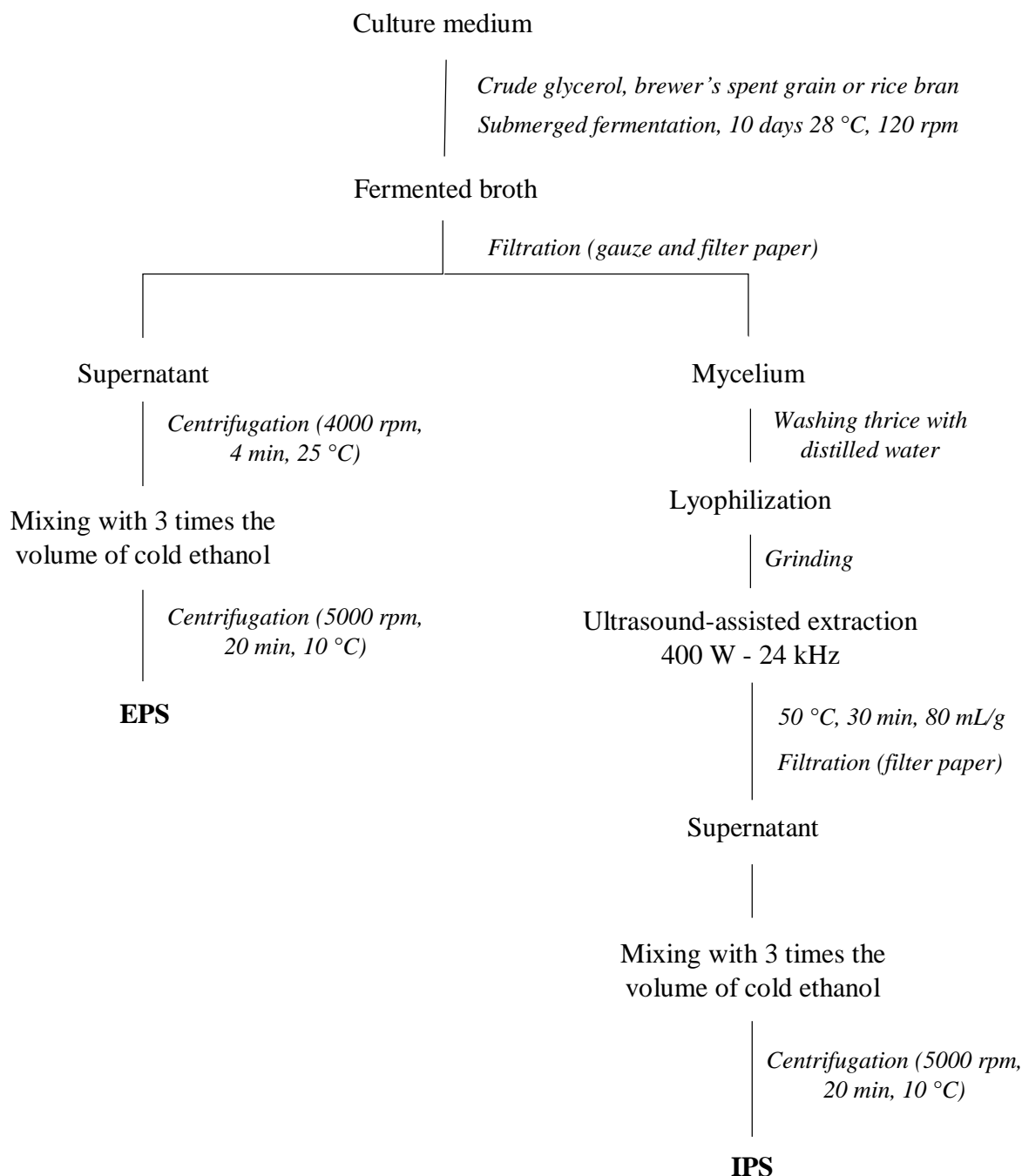
2.3. Submerged fermentation

The inoculum was prepared by the addition of two 6 mm disks of fungal mycelium from a plate subcultured for 7 days at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a bacteriological oven and transferred to Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 125 mL of culture medium [24] supplemented with three different carbon sources (crude glycerol, brewer's spent grain, and rice bran). Each carbon source was evaluated in three concentrations (5%, 10%, and 20%, w/v). The media were sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 150 kPa for 30 min. The inoculated media were kept at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 120 rpm for 10 days (New Brunswick, Innova 44R, USA). At the end of fermentation, the mycelial biomass was separated from the crude broth by filtration in a gauze and filter paper (Whatman, number 2, Brazil). The filtrate crude broth was stored until further analysis. The mycelial biomass was washed thrice with distilled water, lyophilized (L 101, Liotop, Brazil) at $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$, coupled to a vacuum pump (D.V.P Vacuum Technology, RC.8D, Brazil), and stored ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) until further analysis.

2.4. Isolation of polysaccharides-enriched fractions

The extracellular polysaccharides-enriched fractions (EPS) and intracellular polysaccharides-enriched fractions (IPS) were isolated from the fermented broth of *P. dimorpha* (Fig. 1). Briefly, the separation process was based on centrifugation and ethanol precipitation. The EPS was isolated from the supernatant and the IPS was obtained from the mycelium.

Figure 1. Flowchart of bioemulsifying compounds production; EPS: extracellular polysaccharides-enriched fractions; IPS: intracellular polysaccharides-enriched fractions.



2.4.1 Extraction of intracellular polysaccharides-enriched fraction

Data about experimental apparatus have been described by Luft et al. [25]. The bioreactor was composed of a glass jacketed vessel (250 mL of capacity) connected to a thermostatic water bath. Ultrasound equipment consisted of a high-intensity sonication

processor of 400 W, having a frequency of 24 kHz with adjustable pulse factor between 0 and 1 and amplitude from 20 to 100% (UP400S, Hielscher, Germany). It is connected to a titanium probe of 22 mm (H22L2D, Hielscher, Germany), presenting a maximum ultrasound intensity of 85 W/cm². The ultrasonic probe was placed at the center of the bioreactor containing 0.5 g of lyophilized and milled mycelium and 40 mL of distilled water, at an ultrasound intensity of 75.11 W/cm² and a pulse factor of 0.93. During processing, the temperature was maintained at 50 ± 2 °C by circulating water through the jacket. After the extraction, the samples were submitted to vacuum filtration (Whatman filter paper no. 1) to separate the extract (soluble fraction) from the residual mycelium (insoluble fraction). The extracts were stored at 4 °C until further IPS recovery analysis.

2.4.2 Recovery of polysaccharides-enriched fractions

The EPS and IPS recovery was done according to the procedures reported by Cho et al. [26]. The supernatants were mixed with three times the volume of cold absolute ethanol (120 mL) to induce polysaccharide precipitation and left incubating overnight at 4 °C. Subsequently, the precipitates were collected by centrifugation (Eppendorf, model 5804R, Germany) at 5000 rpm for 20 min and 10 °C, and the precipitate was dried in an oven at 45 °C until constant mass (approximately 24 h). The precipitates obtained were stored at -20 °C until further analysis.

2.5. Effects of different concentrations of additional carbon sources

2.5.1. Biomass

After fermentation, the fermented culture medium was filtered (gauze and filter paper) and the mycelial biomass was washed three times in distilled water for the complete removal of medium components. Thereafter, the mycelium was lyophilized (L 101, Liotop, Brazil) at -55°C, coupled to a vacuum pump (D.V.P Vacuum Technology, RC.8D, Brazil), and weighed.

2.5.2. Density and pH

The densities of crude broths were measured in triplicate using the DDM 2911 Plus digital density meter (Rudolph Research Analytical, USA) at 20 °C. The samples were inserted into the device through a syringe, using 3 mL of each sample. The pH of the crude broths was

determined in triplicate using a digital (DM-22, Digimed, Brazil). Before the measurements, the pH meter was calibrated using technical buffer solutions of pH 4.01 ± 0.02 and 7.00 ± 0.02 .

2.5.3. Surface tension

The surface tension was measured in triplicate using a KRÜSS DSA25 drop form analyzer (KRÜSS, Germany) at 25°C and determined with the dropping drop method (10 drops per solution of samples).

2.5.4. Emulsification index

The PEF obtained was dissolved in 3 mL of distilled water (0.5%, w/v) and mixed with 3 mL of sunflower oil in a test tube (100 mm× 13 mm). The tubes were vortexed to homogeneity and left to stand for 24 h at 25 °C. The emulsification index (EI) was expressed as the percentage of total height occupied by the emulsion [27]. The EI₁ (emulsifying index after 1 h) and EI₂₄ (emulsifying index after 24 h) was calculated according to Eq. (2):

$$EI (\%) = \frac{M1}{M0} \times 100 \quad (1)$$

where M0 was the full height of the mixture and M1 was the height of the emulsifying layer. The analysis was done in triplicate.

2.6. Bioherbicidal activity

The phytotoxic effects of most of the suitable additional carbon sources were assessed through absorption assays in detached leaves of *Cucumis sativus* [28]. Leaves of fifteen-days-old *Cucumis sativus* plants grown in a greenhouse were sectioned at the base of their petiole. The sectioned parts were wrapped in cotton and soaked with 2 mL of each fermented broth resulting from submerged fermentation supplemented with crude glycerol, brewer's spent grain, and rice bran (at 5% concentration). After the application, the leaves were maintained at 28 °C in a climatic chamber (POL-EKO, model KK 350, Poland) with a photoperiod of 12 h. The phytotoxicity was evaluated at 1, 3, 6, and 9 days after the application based on the Frans and Crowley scale. This scale is estimated as a percent of injury by comparison to untreated

controls. For example, 100% means complete leaf phytotoxic effect (injury or lesion), while 0% means no effect. A completely randomized design with three replicates of five leaves plus negative control (only distilled water) and positive control (fermented broth without additional carbon source) was performed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of additional carbon sources on polysaccharides-enriched fractions and biomass production

Phoma dimorpha is an important phytopathogen [29] and a filamentous fungus that produces biopolymers [24]. In this work, glucose complemented with agroindustrial residues (crude glycerol, brewer's spent grain, and rice bran) was used to evaluate the effects of different concentrations on bioemulsifying compounds production from submerged fermentation using the fungus *P. dimorpha*. The influences of additional carbon sources on IPS, EPS, and biomass production of *P. dimorpha* were evaluated (Table 1). The presence of additional carbon sources in the medium enhanced the IPS and EPS production compared to non-supplemented. Compared with crude glycerol and rice bran, a lower IPS yield (0.045 g/L) was obtained when brewer's spent grain was used. The maximum level of IPS of 0.112 g/L was obtained at a concentration of 10% when rice bran was used as supplement. Unlike the use of rice bran as a supplement, crude glycerol and brewer's spent grain showed lower IPS yields than the fermentation with glucose as the only carbon source (0.086 g/L). In a previous report on fermentation using *Phoma dimorpha*, glucose was used as sole carbon source and an IPS yield of 12.02 wt.% was obtained [25].

For EPS production, the use of brewer's spent grain and rice bran resulted in much lower yields compared to the fermentation without supplementation, 0.5 g/L and 0.2 g/L, respectively. The addition of crude glycerol at a concentration of 5% was the only experimental assay that showed an increase in EPS production. When glucose was used as a single carbon source, the EPS yield was 3.83 g/L. When crude glycerol was used as an additional source, a yield of 5.48 g/L was obtained. A similar result was previously reported using *Phoma dimorpha* in submerged fermentation without additional carbon sources, with an EPS yield of 6.6 g/L [24].

Tabela 1. Polysaccharides-enriched fractions and biomass production yield using different concentrations of additional carbon sources.

Submerged fermentation	IPS (g/L)	EPS (g/L)	Biomass (g/L)
Control – culture medium without additional carbon source	0.086	3.83	11.1
<i>Crude glycerol</i>			
5%	0.072	5.48	12.8
10%	0.074	2.16	18.6
20%	0.069	0.73	14.6
<i>Brewer's spent grain</i>			
5%	0.054	1.58	14.2
10%	0.070	0.54	44.6
20%	0.045	0.5	5.0
<i>Rice bran</i>			
5%	0.097	1.4	10.6
10%	0.112	1.0	15.4
20%	0.078	0.14	7.1

IPS: intracellular polysaccharides-enriched fractions; EPS: extracellular polysaccharides-enriched fractions

The presence of additional carbon sources in the medium also enhanced the biomass concentration. Indeed, biomasses revealed different increases depending on the concentration of the supplements, ranging from 12.8 to 18.6 g/L for crude glycerol, from 14.2 to 44.6 g/L for brewer's spent grain, and from 10.6 to 15.4 g/L for rice bran. Biomasses in submerged fermentation supplemented with carbon sources increased as the concentration increased from 0 to 10%. By the contrary, biomasses supplemented with brewer's spent grain or rice bran at a concentration of 20% changed negligibly in submerged fermentation. According to Posh et al. [30], the morphological life cycle of filamentous fungi includes branching, extending, and entanglement of single hyphae introducing hyphal networks. Probably, the filamentous fungus *P. dimorpha* grew in the media for 10 days and, thereby, was not able to utilize brewer's spent grain and rice bran as the substrate in general. Unlike crude glycerol, the brewer's spent grain and rice bran are solids residues that contain high amounts of hemicellulose and cellulose. Perhaps, both residues should have been pre-treated before fermentation to decrease the crystallinity of cellulose and to solubilize the hemicellulose for enabling sufficient time for the fungus growth in all experimental assays [31]. If compared to a study reported by Hassan et al.

[32], the values for EPS and biomass found in this work were relevant. The authors optimized the production of mycelial biomass and EPS from *Ganoderma lucidum*, in which the highest yield of mycelial biomass production and the highest yield of EPS were 3.12 g/L and 1.98 g/L, respectively.

Crude glycerol was favorable for EPS production and did not affect the IPS and biomass production, while rice bran and brewer's spent grain were the best for the IPS and biomass production, respectively, but both inhibited strongly the EPS production. Also, more EPS can be obtained at a lower crude glycerol concentration (5%) in the fermentation using *P. dimorpha*. According to Kourmentza et al [33], the simultaneous production of extracellular and intracellular materials may be more frequent than expected. For this reason, it is important to identify such polymers to better understand the metabolic pathways and ways to promote their individual or parallel production based on the application and the importance of the product.

3.2. Effect of additional carbon sources on fermented broth properties

Fermented broth properties (pH, density, and surface tension) of bioemulsifying compounds produced in controlled conditions with three different residues as carbon sources were analyzed to determine the suitable substrate for fermentation (Table 2). The pH of the crude broth without supplementation (control) was 6.35, while the values of pH of the fermented broths obtained with the additional carbon sources were found to decline with increasing concentration. In general, the pH values ranged between 4.6 and 7.2 (Table 2). The lowest pH (4.6) was found in 20% of brewer's spent grain. Significant differences were seen, demonstrating that the additional carbon sources contribute to significantly modify the pH.

There was a significant difference between the values of density for additional carbon sources, regardless of the concentration. The lowest and highest densities were found when the medium was supplemented with crude glycerol, at 5% (1.0005 g/cm³) and 20% (1.0417 g/cm³) concentrations, respectively. The density found for control (1.0054 g/cm³) was similar to fermentations with supplements at 10% concentration.

Considering the surface tension analysis, the culture medium and distilled water presented tensions of 63.23 mN/m and 79.95 mN/m, respectively. When comparing the surface tension obtained in the fermented broth of supplemented fermentations, an increase is seen as a consequence of the addition of supplements in the culture medium. This behavior must be associated with the amount of EPS found. In previous studies (Luft et al., 2019b; Todero et al., 2020), the increase in EPS in the fermented broth also resulted in a decrease in surface tension.

Compounds with emulsifying properties (bioemulsifiers) are generally more effective in stabilizing oil-in-water emulsions but are also able to decrease surface tension, even though less efficiently compared to biosurfactants (Banat et al., 2010). The minimum surface tension value (51.85 mN/m) was obtained in submerged fermentation supplement with crude glycerol at 5% concentration, and a significant difference between the values of surface tension was reached.

Table 2. Influence of additional carbon sources on the pH, density, and surface tension of fermented broth.

Fermented broth	pH	Density (g/cm³)	Surface tension (mN/m)
Control A – distilled water	6.50 ^a	0.9991 ^a	70.95 ^k
Control B – culture medium without additional carbon source	6.35 ^a	1.0054 ^f	63.23 ^j
<i>Crude glycerol</i>			
5%	7.20 ^d	1.0005 ^b	51.85 ^a
10%	4.75 ^b	1.0020 ^d	59.10 ^f
20%	6.34 ^a	1.0417 ^k	61.50 ⁱ
<i>Brewer's spent grain</i>			
5%	5.82 ^c	1.0015 ^c	58.65 ^e
10%	4.60 ^b	1.0052 ^e	59.82 ^g
20%	4.80 ^b	1.0194 ^j	60.73 ^h
<i>Rice bran</i>			
5%	6.36 ^a	1.0084 ^h	56.76 ^b
10%	5.74 ^c	1.0080 ^g	57.07 ^c
20%	6.22 ^a	1.0158 ⁱ	58.27 ^d

^{a-k} Different letters in the same column represent a significant difference at 95% ($p < 0.05$ - Tukey test)

3.3. Effect of additional carbon sources on emulsifying capacity

In the present study, the emulsion forming and stabilizing capacity of PEF was studied. Sunflower oil was used as the hydrophobic substance to study the emulsion-stabilizing capacity of the EPS and IPS as a function of polymer obtaining with different carbon sources. The emulsion-stabilizing capacity of an emulsifier consists of evaluating its capacity to maintain at least 50% of the original emulsion volume 24 h after its formation [27]. Considering this principle, the EPS and IPS produced by *P. dimorpha* has demonstrated to possess an emulsion-stabilizing capacity for sunflower oil, as shown by emulsification indexes higher than 50%

(Table 3). The best results were 65.71% and 70%, for IPS and EPS produced with the addition of crude glycerol, respectively. The lowest results were 54.29% for IPS produced with the addition of brewer's spent grain and 53.33% for EPS produced with the addition of rice bran. These findings corroborate with other published results in the literature, which averaged at 24.4 - 93% of the emulsifying index as shown in Table 4. Despite the abundance of reports on bioemulsifying compounds produced by fermentations with various substrates, it is hard to compare them as often different culture conditions or medium compositions are used. Nevertheless, the production of a bioemulsifier through submerged fermentation using agroindustrial residues as a substrate is shown to be feasible. The values of pH (Table 3) suggest that IPS and EPS are neutral substances, which are stable in weak acid solutions. There was a significant difference between the values of pH for additional carbon sources and emulsifying index.

Table 3. Influence of each additional carbon source (at 5% concentration) on the emulsification index and pH of intra and extracellular polysaccharides-enriched fractions.

Additional carbon source	IPS			EPS		
	EI ₁ (%)	EI ₂₄ (%)	pH	EI ₁ (%)	EI ₂₄ (%)	pH
Control – culture medium without additional carbon source	65.71 ^c	64.29 ^c	6.83 ^c	60.00 ^b	56.67 ^b	6.75 ^a
Crude glycerol	68.57 ^d	65.71 ^d	6.08 ^a	83.33 ^d	70.00 ^d	6.06 ^b
Brewer's spent grain	60.00 ^a	54.29 ^a	6.47 ^b	63.33 ^c	63.33 ^c	6.39 ^c
Rice bran	62.86 ^b	62.29 ^b	6.89 ^d	53.33 ^a	53.33 ^a	6.73 ^a

Table 4. Examples of fungi investigated for bioemulsifiers production.

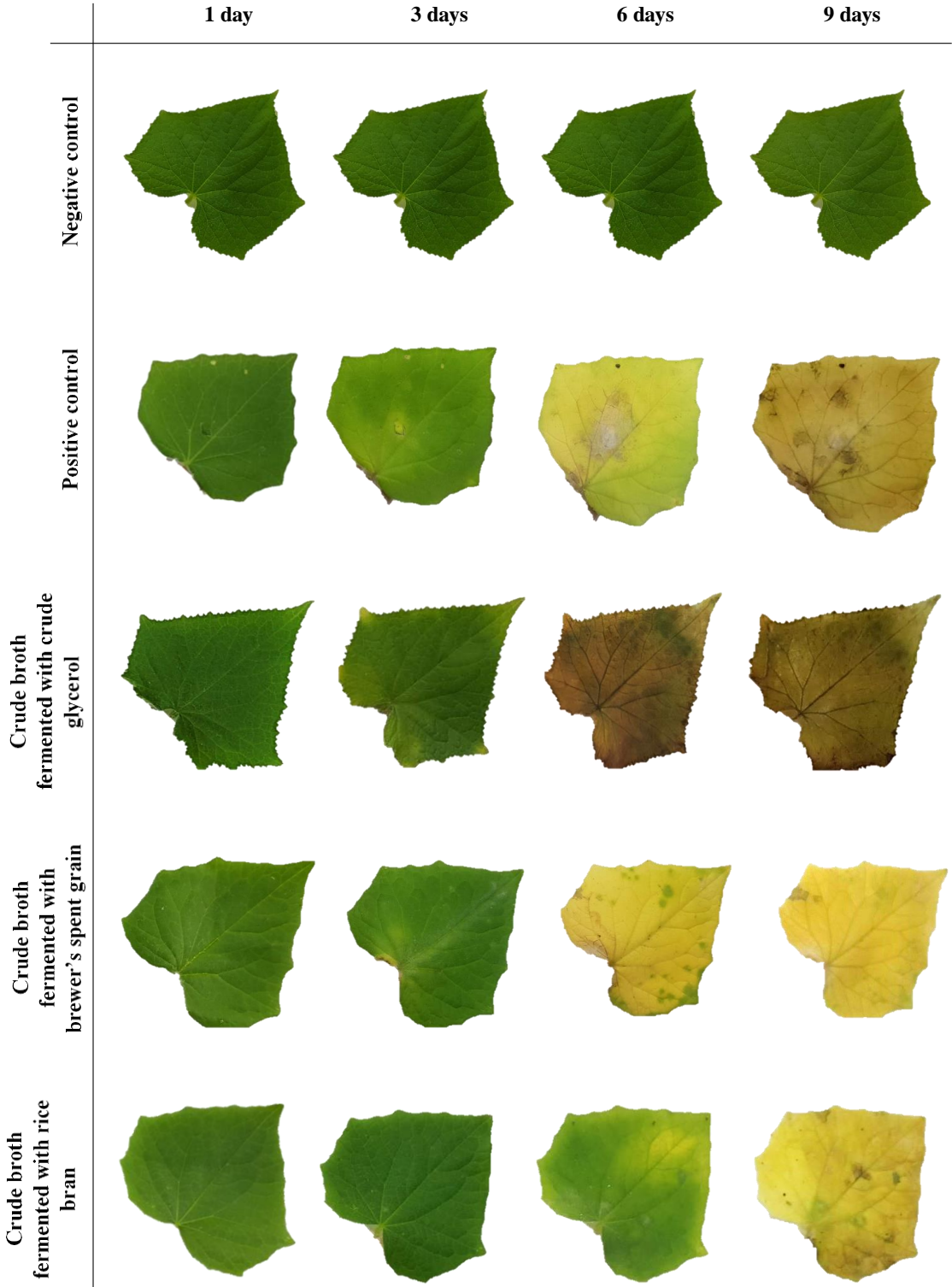
Fungal strain	Carbon sources	Manufacturing process	Emulsifying index (EI₂₄)	Reference
<i>Phoma dimorpha</i>	Glucose supplemented with crude glycerol	SmF in Erlenmeyer flasks containing 125 mL medium	83.3	This work
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Soybean post-frying oil	SmF in Erlenmeyer flasks containing 100 mL medium	82.6	Pele et al. [38]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Glucose	SmF in Erlenmeyer flasks containing 50 mL medium	24.4	Reis et al. [39]
<i>Fusarium</i> sp. BS-8	Sucrose	SmF in Erlenmeyer flasks containing 2 L medium	70.0	Qazi et al. [40]
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNP5	Soyabean oil	Solid state fermentation	56.0	Gautam et al. [41]
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Soybean waste oil	SmF in Erlenmeyer flasks containing 100 mL medium	80.0	Silva et al. [42]
<i>Penicillium</i> sp.	Glucose supplemented with phenanthrene	SmF in Erlenmeyer flasks containing 30 mL medium	60.0	Luna-Velasco et al. [43]
<i>Penicillium citrinum</i>	Olive oil	SmF in Erlenmeyer flasks containing 50 mL medium	77.0	Camargo-De-Morais et al. [44]
<i>Curvularia lunata</i> IM 2901	Glucose	SmF in Erlenmeyer flasks containing 60 mL medium	93.0	Paraszkiewicz et al.[45]

SmF: submerged fermentation

3.4. Effect of additional carbon sources on bioherbicidal activity

In recent years, a strain of *Phoma* sp. (NRRL 43879), recently identified as *Phoma dimorpha* [29], has shown great potential for bioherbicidal production [36,37]. A recent study showed the relationship between bioherbicidal activity and the production of extracellular biopolymers of this fungus [24]. From that study, which micro and ultrafiltration membranes were used for the concentration of the fermented broth, it was possible to identify that the concentration of EPS in the fermented broth increased its phytotoxicity, that is, the EPS showed the ability to increase herbicidal activity. Bioassays have been developed to assess whether supplementation with additional carbon sources in the culture medium influences this behavior. They were performed for additional carbon sources at a concentration of 5% due to higher EPS yields. Lesions in leaves of *Cucumis sativus* after 9 days of treatment are presented (Figure 2). Plant damage was estimated visually in comparison with control plants at 15 days after soak and the evaluation that defined the toxicity was based on applied concepts of the Brazilian Society of Weed Science (SBCPD). As observed in the images, all applications caused 100% of yellowing in *C. sativus* leaves at different times. The positive control (fermented broth without supplementation) and the fermented broth from the addition of brewer's spent grain showed similar yellowing results on the sixth day of treatment, being of moderate injury to brewer's spent grain, but on the ninth day the positive control showed symptoms of necrosis. For fermented broth with addition of rice bran, slight injury was observed until the sixth day, but symptoms of complete destruction on the ninth day were presented. The results observed for fermented broth with addition of crude glycerol presented complete destruction on the sixth day after application. From these results, it is possible to conclude that the concentration of EPS in the fermented broth directly influences the bioherbicidal activity, corroborating with the works aforementioned [24,34]. The addition of crude glycerol in the culture medium also showed results that are more satisfactory in bioherbicidal activity, in addition to increasing the concentration of EPS in the fermented broth associated to its emulsifying index.

Figure 2. Evolution of phytotoxicity in leaves of *Cucumis sativus* by soaking them with the fermented broth of *Phoma dimorpha* with three different additional carbon sources (at 5% concentration), negative control (distilled water), and positive control (fermented broth without additional carbon source); time course from 1 to 9 days.



4. CONCLUSION

This work advances the current knowledge on the use of additional carbon sources in submerged fermentation using *Phoma dimorpha* for an enhanced polysaccharides-enriched fractions (PEF) production. The highest yield of extracellular polysaccharides (EPS) production was obtained with crude glycerol supplementation in the cellular growth environment, while the highest yield of intracellular polysaccharides (IPS) and biomass concentration were obtained with rice bran and brewer's spent grain, respectively. However, these last two residues strongly inhibited the EPS production. From the evaluation of effects on the fermented broth, the lowest surface tension was reached when using crude glycerol at a concentration of 5%, corroborating the results obtained for EPS. The highest emulsification rates and phytotoxicity on *Cucumis sativus* leaves were also achieved with crude glycerol availability in the cellular growth environment. Therefore, crude glycerol can be a potential candidate as an additional carbon source in submerged fermentation when the bioemulsifying compounds are desired, mainly in the development of bioherbicides.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarships and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for financial support. G. L. Zobot (304882/2018-6) and M. A. Mazutti thank the CNPq for the productivity grants.

REFERENCES

- [1] Alvarez VM, Jurelevicius D, Serrato RV, et al. Chemical characterization and potential application of exopolysaccharides produced by *Ensifer adhaerens* JHT2 as a bioemulsifier of edible oils. *Int J Biol Macromol*. 2018;114:18–25.
- [2] Uzoigwe C, Burgess JG, Ennis CJ, et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiol*. 2015;6:1–6.
- [3] Vidhyalakshmi R, Valli Nachiyar C, Narendra Kumar G, et al. Production, characterization and emulsifying property of exopolysaccharide produced by marine isolate of *Pseudomonas*

- fluorescens*. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018;16:320–325.
- [4] Luft L, Confortin TC, Todero I, et al. An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Crit Rev Biotechnol*. 2020; 40(8):1059–1080.
- [5] Zhu F, Du B, Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocoll*. 2016;52:275–288.
- [6] Chakraborty I, Sen IK, Mondal S, et al. Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;22:101425.
- [7] Orlandelli RC, Corradi da Silva M de L, Vasconcelos AFD, et al. β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-D-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. *Int J Biol Macromol*. 2017;94:431–437.
- [8] Srikanth S, Swathi M, Tejaswini M, et al. Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2014;3:7–12.
- [9] Segaran G, Sathiavelu M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;21:101284.
- [10] Huang Y, Wang J, Li G, et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;31:163–167.
- [11] Vijayendra SVN, Shamala TR. Film forming microbial biopolymers for commercial applications — A review. 2013;8551:1–20.
- [12] Amorim CC, Farinas CS, Miranda EA. Liquefied wheat bran as carbon source and inducer in high-solids submerged cultivation of *Aspergillus niger* for xylanase production. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;21:101346.
- [13] Mohd Luthfi WNS, Alias H, Tay GS, et al. Production and characterization of bioflocculant via solid state fermentation process using oil palm empty fruit bunch fibers as substrate. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2020;23:101454.
- [14] Rustiguel CB, Jorge JA, Guimarães LHS. Characterization of a thermo-tolerant mycelial β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2015;4:362–369.
- [15] Gayathri G, Srinikethan G. Crude glycerol as a cost-effective carbon source for the production of cellulose by *K. saccharivorans*. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018;16:326–330.
- [16] Kumar V, Kumar S, Singh D. Microbial polyhydroxyalkanoates from extreme niches: Bioprospection status, opportunities and challenges. *Int J Biol Macromol*. 2020;147:1255–1267.
- [17] Mussatto SI. Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *J Sci Food Agric*. 2014;94:1264–1275.
- [18] Nigam PS. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery

and brewery. *Waste Manag.* 2017;62:255–261.

- [19] Luft L, Confortin TC, Todero I, et al. Ultrasound Technology Applied to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Brewer's Spent Grain and its Potential for Production of Fermentable Sugars. *Waste and Biomass Valorization.* 2019; 10:2157–2164.
- [20] Luft L, Confortin TC, Todero I, et al. Transformation of residual starch from brewer's spent grain into fermentable sugars using supercritical technology. *J Supercrit Fluids.* 2018;140:85–90.
- [21] Sohail M, Rakha A, Butt MS, et al. Rice Bran Nutraceuticals: A Comprehensive Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017; 57(17):3771-3780.
- [22] Liu Q, Cao X, Zhuang X, et al. Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: Antioxidant activities and effects on the production of NO. *Food Chem.* 2017;223:49–53.
- [23] Luft L, da Silva JRF, Kuhn RC, et al. Second generation bioethanol production from residual biomass of the rice processing industry. In *Lignocellulosic Biomass Production and Industrial Applications* (eds A. Kuila and V. Sharma). 2017; 6:111–133.
- [24] Luft L, Confortin TC, Todero I, et al. Different techniques for concentration of extracellular biopolymers with herbicidal activity produced by *Phoma* sp. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1669720>.
- [25] Luft L, Confortin TC, Todero I, et al. Extraction and characterization of polysaccharide - enriched fractions from *Phoma dimorpha* mycelial biomass. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2021; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02486-3>.
- [26] Cho YJ, Getachew AT, Saravana PS, et al. Optimization and characterization of polysaccharides extraction from Giant African snail (*Achatina fulica*) using pressurized hot water extraction (PHWE). *Bioact Carbohydrates Diet Fibre.* 2019;18:100179.
- [27] Ye G, Chen Y, Wang C, et al. Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. *Int J Biol Macromol.* 2018;120:1315–1321.
- [28] Todero I, Confortin TC, Soares JF, et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp . using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. *Environ. Technol.* 40(18):2364-2372.
- [29] Chaves Neto JR, Antonio Mazutti M, Leone Zabet G, et al. Bioherbicidal action of *Phoma dimorpha* fermented broth on seeds and plants of *Senna obtusifolia*. *Pesqui Agropecu Trop.* 2020;50:1–8.
- [30] Posch AE, Herwig C, Spadiut O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 2013; 31:37–44.
- [31] Wolters N, Schabronath C, Schembecker G, et al. Efficient conversion of pretreated brewer's spent grain and wheat bran by submerged cultivation of *Hericium erinaceus*. *Bioresour Technol.* 2016;222:123–129.
- [32] Hassan NA, Supramani S, Azzimi Sohedein MN, et al. Efficient biomass-exopolysaccharide

- production from an identified wild-Serbian *Ganoderma lucidum* strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;21:101305.
- [33] Kourmentza C, Araujo D, Sevrin C, et al. Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains valorizing crude glycerol by-product. *Bioresour Technol*. 2019;281:31–40.
- [34] Todero I, Confortin TC, Luft L, et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. *Environ Technol*. 2020; 41(21): 2742-2749.
- [35] Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87:427–444.
- [36] Brun T, Rabuske JE, Todero I, et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. *3 Biotech*. 2016;6. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>
- [37] Todero I, Confortin TC, Luft L, et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. *Sci Hort*. 2018; 241: 285–292.
- [38] Pele MA, Montero-Rodriguez D, Rubio-Ribeaux D, et al. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. *African J. Biotechnol*. 2018; 17:150–157.
- [39] Reis CBL dos, Morandini LMB, Bevilacqua CB, et al. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian J Microbiol*. 2018;1–8.
- [40] Qazi MA, Kanwal T, Jadoon M, et al. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. *Biotechnol Prog*. 2014;30:1065–1075.
- [41] Gautam G, Mishra V, Verma P, et al. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *J Bioprocess Biotech* 4, 177.
- [42] Silva NRA, Luna MAC, Santiago ALCMA, et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the Northeast of Brazil. *Int J Mol Sci*. 2014;15:15377–15395.
- [43] Luna-Velasco MA, Esparza-García F, Cañízares-Villanueva RO, et al. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochem*. 2007;42:310–314.
- [44] Camargo-De-Morais MM, Ramos SAF, Pimentel MCB, et al. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2003;19:191–194.
- [45] Paraszkiwicz K, Kanwal A, Długoński J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol*. 2002;92:287–294.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 DISCUSSÃO GERAL

A busca por novos produtos para os diversos setores industriais é um processo contínuo que requer constante adaptação e uso de novos conhecimentos e tecnologias. Os compostos naturais produzidos pelos microrganismos surgiram como alternativas atraentes aos compostos sintéticos e apresentam grande potencial para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, suplementos alimentares e agroquímicos (DEMAIN, 2014; SAXENA; PANDEY, 2001; ZHU; DU; XU, 2016). Neste contexto, os biopolímeros fúngicos têm recebido considerável atenção da comunidade científica, pois apresentam potencial para diversas aplicações devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Estudos recentes revelaram novas rotas, parâmetros otimizados, maiores rendimentos e outras abordagens relacionadas a fim de otimizar a produção e aplicação dos biopolímeros. A seleção dos meios de cultura, a definição dos parâmetros de cultivo e os métodos de extração, recuperação e purificação também são etapas cruciais para o aumento de escala da produção desses compostos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; WANG Y. et al., 2019). O interesse na aplicação desses compostos em diversas áreas tem ampliado o conhecimento na produção de biopolímeros a partir de diversas fontes fúngicas (RUIZ-HERRERA; ORTIZ-CASTELLANOS, 2019).

Os fungos pertencentes ao gênero *Phoma* destacam-se por serem uma fonte promissora de compostos bioativos com diversos potenciais., e as espécies não se limitam a apenas um tipo de aplicação. Um exemplo é a espécie *Phoma herbarum*, uma das espécies mais estudadas como fonte de compostos com potencial herbicida (RIVERO-CRUZ et al., 2000; VIKRANT et al., 2006), mas que também apresenta potencial antimicrobiano e antitumoral (CUI; GUO; XIAO, 2011), além de ser produtora de biopolímeros bioativos (SELBMANN et al., 2002; YANG et al., 2005). A espécie *Phoma dimorpha* vem se destacando por apresentar atividade bioherbicida contra plantas daninhas. Em um dos trabalhos desenvolvidos no Laboratório “Biotec Factory”, a concentração de metabólitos desta espécie usando membrana de microfiltração aumentou a atividade bioherbicida do caldo fermentado. A maior atividade herbicida foi 80,7%, obtida para uma concentração de 30% na fração retido (TODERO et al., 2019). No presente trabalho, observou-se que o fungo *Phoma dimorpha*, além de apresentar atividade bioherbicida, também é um notável produtor de biopolímeros. Em uma busca na literatura, verificou-se que os trabalhos com fungo *Phoma dimorpha* referem-se somente à produção de metabólitos

secundários com atividade bioherbicida, sendo este o primeiro trabalho realizado com os biopolímeros tensoativos produzidos por este fungo.

A metodologia clássica de cultivo para obtenção dos metabólitos bioativos foi utilizada nesse trabalho, sem alterações e sem direcionamento para obtenção de biopolímeros, pois um dos objetivos foi justamente investigar se a atividade bioherbicida do caldo fermentado apresentava relação com esses compostos. Logo, as condições de cultivo para a obtenção dos biopolímeros não foram otimizadas. Os métodos de concentração por membranas desenvolvidos nesse trabalho apresentaram eficácia na concentração de compostos com potencial para controle biológico e na concentração de biopolímeros extracelulares do fungo *Phoma dimorpha*. As amostras obtidas após o processo de concentração com membrana de ultrafiltração adicional à microfiltração apresentaram menor teor de biopolímeros, provavelmente devido à incrustação da membrana, sendo a principal desvantagem da membrana de ultrafiltração (GUO; CHI, 2017). Logo, um processo único de concentração por membrana de microfiltração foi suficiente para aumentar a concentração de biopolímeros no caldo fermentado. Os resultados obtidos para concentração por adsorção mostraram que o carvão ativado, comparado à sílica e aos nanotubos de carbono, além de ser um adsorvente de baixo custo, também foi eficaz na recuperação de biopolímeros do caldo fermentativo, não sendo necessária uma alta concentração de adsorvente (93,5% utilizando 1% em peso de adsorvente). Considerando os resultados obtidos tanto para concentração por membranas quanto por adsorção, verificou-se que a concentração de biopolímeros extracelulares no caldo fermentado influenciou diretamente a atividade bioherbicida e a tensão superficial das amostras. O mesmo comportamento foi observado para o fungo *Fusarium fujikuroi* (TODERO et al., 2020). Quanto à caracterização do caldo fermentado, um espectro de FTIR padrão de polissacarídeos foi encontrado e um número considerável de ácidos graxos foi observado, justificando as propriedades hidrofóbicas atribuídas aos biopolímeros (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

No **Capítulo 3**, a extração dos biopolímeros a partir do caldo fermentado (fração líquida) foi realizada através de uma técnica simples de precipitação ácida. Porém, a extração de biopolímeros do micélio (fração sólida) requer métodos de extração mais drásticos, como a extração com água quente (WANG et al., 2017). Sendo assim, a extração com água quente (convencional) foi realizada para extração dos biopolímeros do micélio de *Phoma dimorpha* em comparação a outros métodos de extração mais modernos (ultrassom e água quente pressurizada) (**Capítulo 4**). Apesar de ser uma técnica de extração fácil de operar, a extração com água quente apresenta algumas desvantagens como os baixos rendimentos de extração e a possibilidade de degradação dos polissacarídeos devido às altas temperaturas (SHANG et al.,

2018). Morales et al. (2019b) testaram o efeito da combinação de tecnologias de extração inovadoras (ultrassom e água subcrítica) nas atividades biológicas das frações enriquecidas com β -glucana obtidas de *Lentinula edodes*. Os autores observaram que tais tecnologias facilitaram a extração dos polissacarídeos solúveis e também dos menos solúveis. Os resultados obtidos no presente trabalho, a partir de um planejamento experimental para os diferentes métodos sugeriram que a propagação das ondas ultrassônicas foi mais eficaz para dissolver e extrair os biopolímeros do que os outros métodos, já que a sonicação direta produz efeito de cavitação mais forte, causando uma intensificação da transferência de massa (POURFARZAD; NAJAFI; HASSANZADEH, 2014). De fato, a superfície das partículas residuais de micélio após extração com ultrassom apresentou um número maior de rupturas. Além de apresentar rendimentos mais elevados, o menor tempo de extração em temperaturas mais baixas torna esse método mais atrativo em aplicações em larga escala, uma vez que a redução do tempo de extração pode favorecer a eficiência econômica do processo de extração (SOURKI; KOOCHEKI; ELAHI, 2017). Além dos resultados obtidos a partir da caracterização estrutural apresentarem similaridade a outros biopolímeros descritos na literatura, as análises de solubilidade, capacidade de retenção de água e de emulsificação sugeriram que o biopolímero encontrado pode ter aplicação como agente estabilizador.

A utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como matéria-prima para a produção de biopolímeros microbianos de valor agregado possibilita a diminuição dos custos de processo, além de superar o problema de destinação de resíduos (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013). No **Capítulo 5**, os experimentos realizados avaliaram a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultivo e não a substituição das principais fontes (extrato de batata e glicose), pois tratou-se de um estudo preliminar, onde as condições específicas de processamento ainda não foram totalmente conhecidas. O uso desses substratos em bioprocessos sob condições específicas desconhecidas podem causar impacto negativo no rendimento, na produtividade e na composição do biopolímero sintetizado (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). No presente trabalho, a utilização de glicerol bruto como fonte adicional de carbono apresentou um aumento na concentração de biopolímeros extracelulares e nenhuma interferência relevante na produção dos biopolímeros intracelulares. Já os outros dois resíduos agroindustriais avaliados, apresentaram interferência negativa na produção de biopolímeros extracelulares. A adição de glicerol bruto também apresentou efeitos significativos na redução da tensão superficial e no aumento do índice de emulsificação. De acordo com Park et al. (2002), a suplementação de certos substratos hidrofóbicos no meio aumenta substancialmente a produção de bioemulsificantes.

6.2 CONCLUSÕES GERAIS

A revisão bibliográfica apresentada no **Capítulo 2** foi fundamental para o desenvolvimento desta tese, servindo como base para o planejamento dos experimentos e abordando os mais diversos temas dentro da proposta do projeto. Além disso, essa revisão serviu como fundamento para o desenvolvimento de um artigo de revisão intitulado *An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production*, publicado na revista *Critical Reviews in Biotechnology* (2020, v. 40, n. 8, 1059–1080), e de um capítulo de livro intitulado *Genus Phoma: A Review of its Potential Bioactivities, Implications and Prospects*, que será publicado pela Springer Verlag no livro intitulado *Diversity, Taxonomy, Bioactivities and Nanotechnology* (Eds: Mahendra Rai, Zimowska Beata e G.J. Kovics). Com base nas informações obtidas durante o desenvolvimento da revisão, indica-se que a tese aborda um tema inovador, pois até o momento pesquisas relacionadas à produção de biopolímeros a partir do fungo *Phoma dimorpha* não foram desenvolvidas. Os únicos estudos encontrados na literatura para esta espécie foram conduzidos no Laboratório “Biotec Factory”, relatando apenas o potencial bioherbicida do caldo bruto resultante da fermentação submersa do fungo.

Assim, a pesquisa experimental desenvolvida com diferentes técnicas de concentração/purificação apresentada no **Capítulo 3**, proporcionou melhor entendimento relacionado à produção de biopolímeros extracelulares e à atividade bioherbicida do caldo fermentado de *Phoma dimorpha*. Apesar do teor de biopolímeros no caldo bruto ser considerado alto (6,62 g/L) quando comparado a outros biopolímeros de origem fúngica, maior concentração foi obtida com o uso de membrana de microfiltração (9,18 g/L). Já a concentração por membrana de ultrafiltração apresentou valores inferiores (3,10 a 6,22 g/L) ao valor encontrado para caldo bruto, enquanto a concentração por adsorção mostrou-se eficaz, principalmente com carvão ativado como adsorvente (recuperação de 98,5%). Os resultados obtidos na caracterização foram semelhantes a outros descritos na literatura para biopolímeros no que diz respeito às ligações químicas dos polissacarídeos e aos seus substituintes ligados, neste caso os ácidos graxos. Em geral, concluiu-se que o aumento da concentração de biopolímeros resultou na diminuição superficial e no aumento da atividade bioherbicida do caldo fermentado. Os processos de concentração testados poderiam ser implementados na produção de bioherbicidas em larga escala, sendo o processo com membrana de microfiltração indicado para formulações líquidas e o processo de adsorção para formulações sólidas.

Como citado anteriormente, os estudos desenvolvidos até o momento para esta espécie de fungo envolvem apenas o caldo fermentado resultante da fermentação submersa, ou seja, apenas a fração líquida. Por isso, os processos de extração desenvolvidos no **Capítulo 4** mostraram-se apropriados para a quantificação de biopolímeros presentes na fração sólida (biomassa micelial ou micélio) resultante da fermentação. Os métodos extrativos (ultrassom com sonicação direta e indireta, água quente pressurizada e água quente) diferenciaram-se nos rendimentos dos biopolímeros intracelulares (frações enriquecidas com polissacarídeos). O método de extração com maior rendimento (duas vezes maior que a extração convencional) foi o ultrassom com sonicação direta e a análise de superfície das partículas residuais de micélio realizada antes e após as extrações mostrou mudanças físicas mais drásticas para esse método. O estudo cinético demonstrou que o efeito físico de ruptura da parede celular do fungo permitiu aumentar a transferência de massa de biopolímeros do micélio para a água em um curto espaço de tempo. A partir das análises de caracterização (FTIR, XRD, SEM e TGA) foi possível observar alto nível de similaridade com outros biopolímeros descritos na literatura. Além disso, as análises de solubilidade, capacidade de retenção de água e de emulsificação, demonstraram boa solubilidade em água, considerável retenção e significativa propriedade bioemulsificante, respectivamente, do biopolímero produzido a partir do fungo *Phoma dimorpha*.

O desenvolvimento da pesquisa apresentada no **Capítulo 5** permitiu concluir que o uso de fontes adicionais de carbono na fermentação submersa do fungo *Phoma dimorpha* aprimorou a produção de biopolímeros (frações enriquecidas com polissacarídeos). O maior rendimento da produção de biopolímeros extracelulares foi obtido com a suplementação de glicerol bruto no meio de cultivo, enquanto os maiores rendimentos de biopolímero intracelular e biomassa foram obtidos com farelo de arroz e grãos gastos da cervejaria, respectivamente. No entanto, esses dois últimos resíduos inibiram fortemente a produção de biopolímeros extracelulares, enquanto a adição de glicerol bruto apresentou efeitos positivos significativos na tensão superficial e no índice de emulsificação, além de relevante fitotoxicidade nas folhas de *Cucumis sativus*. Portanto, o glicerol bruto foi considerado como a melhor fonte adicional de carbono na fermentação submersa de *Phoma dimorpha* para produção de compostos bioemulsificantes.

Sendo assim, o desenvolvimento da tese contribuiu para o avanço no conhecimento relacionado à produção de biocompostos tensoativos de grande interesse industrial a partir de um processo simples de fermentação, trazendo informações sobre a influência destes biocompostos no potencial herbicida referido para a espécie *Phoma dimorpha*, pouco explorada até o momento. Além de tratar-se de tecnologias verdes, os diferentes métodos de recuperação, concentração/purificação e extração desenvolvidos mostraram resultados satisfatórios, o que os

torna promissores no desenvolvimento biotecnológico de novos produtos a partir de microrganismos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após o desenvolvimento dos experimentos e conclusões atingidas, a lista a seguir foi elaborada a fim de incentivar novas pesquisas no assunto:

- Otimizar a produção de biopolímero sintetizado por *Phoma dimorpha*, por meio de planejamento experimental, para um meio de cultivo com glicerol, em biorreator;
- Purificar os biopolímeros por meio de diálise e de técnicas cromatográficas;
- Determinar a composição de monossacarídeos por meio de técnicas cromatográficas;
- Elucidar a estrutura química dos biopolímeros por meio de técnicas cromatográficas e RMN;
- Determinar o peso molecular dos biopolímeros por meio de técnicas cromatográficas;
- Analisar o comportamento reológico dos biopolímeros;
- Avaliar outras atividades biológicas dos biopolímeros produzidos pelo fungo *Phoma dimorpha* (como por exemplo, atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, etc).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GAWAD, K. M. et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 593–601, 2017.
- AKILA, R. M. Fermentative production of fungal Chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications). **Advances in Applied Science Research**, v. 5, n. 4, p. 157–170, 2014.
- ALMUTAIRI, F. M. et al. Augmented anticancer activity of curcumin loaded fungal chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 861–867, 2019.
- ALSHARARI, S. F.; TAYEL, A. A.; MOUSSA, S. H. Soil emendation with nano-fungal chitosan for heavy metals biosorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 2265–2268, 2018.
- ALSHUBAILY, F. A. Enhanced antimycotic activity of nanoconjugates from fungal chitosan and *Saussurea costus* extract against resistant pathogenic *Candida* strains. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 499–503, 2019.
- ALVAREZ, V. M. et al. Chemical characterization and potential application of exopolysaccharides produced by *Ensifer adhaerens* JHT2 as a bioemulsifier of edible oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 18–25, 2018.
- ALZORQI, I. et al. Ultrasonically extracted β -D -glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 36, p. 531–540, 2017.
- AMORIM, C. C.; FARINAS, C. S.; MIRANDA, E. A. Liquefied wheat bran as carbon source and inducer in high-solids submerged cultivation of *Aspergillus niger* for xylanase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101346, 2019.
- ANBAZHAGAN, S.; THANGAVELU, K. P. Application of tetracycline hydrochloride loaded-fungal chitosan and *Aloe vera* extract based composite sponges for wound dressing. **Journal of Advanced Research**, v. 14, p. 63–71, 2018.
- ARUNKUMAR, T. et al. Synthesis and characterisation of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). **International Journal of Ambient Energy**, v. 41, n. 4, p. 452–456, 2020.
- ATES, O. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1–16, 2015.
- AVESKAMP, M. M.; GRUYTER, J. D., CROUS, P. W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 1–18, 2008.
- BAI, J. et al. Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. **Trends in Food**

Science and Technology, v. 88, p. 57–66, 2019.

BAILEY, K.L.; DERBY, J. **Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds**. Patent US7772155, 2001.

BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**, v. 58, n. 3, p. 379–386, 2011.

BALTI, R. et al. Concentration and purification of *Porphyridium cruentum* exopolysaccharides by membrane filtration at various cross-flow velocities. **Process Biochemistry**, v. 74, p. 175–184, 2018.

BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.

BARRETO, M. DO C. S. et al. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 2–4, p. 221–227, 2011.

BENITO-ROMÁN, Ó. et al. β -Glucan recovery from *Ganoderma lucidum* by means of pressurized hot water and supercritical CO₂. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 21–28, 2016.

BENNETT, A.; PONDER, M. M.; GARCIA-DIAZ, J. *Phoma* Infections: Classification, Potential Food Sources, and Their Clinical Impact. **Microorganisms**. v. 6, p. 2–13, 2018.

BETINA, V. Biological Effects of the Antibiotic Brefeldin A (Decumbin, Cyanein, Ascotoxin, Synergisidin): a Retrospective. **Folia Microbiologica**. v. 37, n. 1, p. 3–11, 1992.

BHIMBA, V. et al. Phthalate derivatives from the marine fungi *Phoma herbarum* VB7. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 4, p. 507–512, 2012.

BICK, I. R. C.; RHEE, C. Anthraquinone Pigments from *Phoma foveata* Foister. **Biochemical Journal**, v. 98, p. 112–116, 1966.

BILAL, M.; IQBAL, M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 130, p. 462–482, 2019.

BINDER, M.; TAMM, C. Proxiphomin und Protophomin, zwei neue Cytochalasane. **Helvetica Chimica Acta**. v. 56, n. 7, p. 2387–2396, 1973.

BINIARZ, P.; ŁUKASZEWICZ, M.; JANEK, T. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 393–410, 2017.

BOEREMA, G. H., BOLLEN, G. J. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. **Persoonia**, v. 8, p. 111–144, 1975.

BOEREMA, G. H. et al. *Phoma* Identification manual: Differentiation of species and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, CAB International Wallingford, Oxfordshire, UK, 470p., 2004.

BOYETTE, C. D.; HOAGLAND, R. E.; STETINA, K. C. Biological control of spreading dayflower (*Commelina diffusa*) with the fungal pathogen *phoma commelinicola*. **Agronomy**, v. 5, n. 4, p. 519–536, 2015.

BRENNAN, M. A. et al. Integration of β -Glucan Fibre Rich Fractions from Barley and Mushrooms to Form Healthy Extruded Snacks. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 68, n.1, p. 78–82, 2013.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 2, p. 127–139, 2011.

BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 230, 2016.

BRUN, T. **Produção de herbicida por fermentação submersa a partir do fungo *Phoma* sp. em biorreator**. 2016. 55p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)– Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

CANUTO, K. M. et al. Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184, 1542012.

CAO, H. et al. Comparative study on the monosaccharide compositions, antioxidant and hypoglycemic activities in vitro of intracellular and extracellular polysaccharides of liquid fermented *Coprinus comatus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1–7, 2019.

CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; VURRO, M. Cytochalasins from *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Phytochemistry**. v. 30, n. 12, p. 3945–3950, 1991.

CASTILLO, N. A.; VALDEZ, A. L.; FARIÑA, J. I. Microbial production of scleroglucan and downstream processing. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–19, 2015.

CHAKRABORTY, I. et al. Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101425, 2019.

CHANCHAL, A. et al. Gelatin Biopolymer: A Journey from Micro to Nano. **Journal of Pharmacy Research**, v. 8, n. 10, p. 1387–1397, 2014.

CHANG, I. et al. Geoderma Soil treatment using microbial biopolymers for anti-desertification purposes. **Geoderma**, v. 253–254, p. 39–47, 2015.

CHAVES NETO, J. R. **Desenvolvimento de formulações para potencializar a ação de metabólitos de *Phoma dimorpha* no controle biológico de plantas daninhas**. 2019. 190p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)– Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,

2019.

CHAVES NETO, J. R. et al. Avaliação de diferentes métodos de preservação do fungo *Phoma dimorpha*. **Colloquium Agrariae**, v. 15, n. 4, p. 1–10, 2019.

CHAVES NETO, J. R. et al. Bioherbicidal action of *Phoma dimorpha* fermented broth on seeds and plants of *Senna obtusifolia*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, p. 1–8, 2020a.

CHAVES NETO, J. R. et al. Efeito de metabólitos secundários produzidos por *Phoma dimorpha* sobre a germinação e crescimento de sementes de diferentes espécies vegetais. **Acta Iguazu**, v. 9, n. 2, p. 109–121, 2020b.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. **Journal of Membrane Science**, v. 299, n. 1–2, p. 114–121, 2007.

CHEN, P. H. et al. Adsorption of mercury from water by modified multi-walled carbon nanotubes: Adsorption behaviour and interference resistance by coexisting anions. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, n. 15, p. 1935–1944, 2014.

CHEN, S. et al. Macrophage receptors of polysaccharide isolated from a marine filamentous fungus *Phoma herbarum*. v. 30, p. 1008–1014, 2009.

CHEN, S. et al. Immunomodulatory effects of polysaccharide from marine fungus *Phoma herbarum* YS4108 on T cells and dendritic cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

CHEN, Z. et al. Cytochalasins from cultures of endophytic fungus *Phoma multirostrata* EA-12. n. March 2014, p. 23–26, 2015.

CHEUNG, Y.; WU, J. Kinetic models and process parameters for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from a medicinal fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 214–220, 2013.

CHITARRA, G. S. et al. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 159–166, 2003.

CIMMINO, A. et al. Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6304–6309, 2008.

CIMMINO, A. et al. Chenopodolin: A phytotoxic unrearranged ent -pimaradiene diterpene produced by *Phoma chenopodicola*, a fungal pathogen for *Chenopodium album* biocontrol. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1291–1297, 2013.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846–850, 1985.

COTA-ARRIOLA, O. et al. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: Development of new strategies for microbial control in agriculture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1525–1536, 2013.

COUTTE, F. et al. Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, p. 1–10, 2017.

CUI, J.; GUO, S.; XIAO, P. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**. v. 12, n. 5, p. 385–392, 2011.

DE ALMEIDA, T. C. **Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator**. 2014. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)– Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

DEHNAD, D.; JAFARI, S. M.; AFRASIABI, M. Influence of drying on functional properties of food biopolymers: From traditional to novel dehydration techniques. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 116–131, 2016.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185–201, 2014.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DIKIT, P. et al. Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 465–470, 2010.

DHINESHKUMAR, V.; RAMASAMY, D. V. Review on Membrane Technology Applications in Food and Dairy Processing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 3, n. 5, p. 399–407, 2017.

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

DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Skin health promotion effects of natural β -Glucan derived from cereals and microorganisms: A review. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 2, p. 159–166, 2014.

DUBEY, K. V.; JUWARKAR, A. A.; SINGH, S. K. Adsorption - Desorption Process Using Wood-Based Activated Carbon for Recovery of Biosurfactant from Fermented Distillery Wastewater. p. 860–867, 2005.

DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

ELLIOT, C. E. et al. Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. **Molecular plant pathology**, v. 8, n. 6, p. 791–802, 2007.

EVIDENTE, A. et al. Putaminoxin, a phytotoxic nonenolide from *Phoma putaminum*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1637–1641, 1995.

EVIDENTE, A. et al. Cytochalasin W, a new 24-Oxa[14]cytochalasan from *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Natural Toxins**, v. 4, p. 53–57, 1996.

EVIDENTE, A. et al. Structure-activity relationship studies of putaminoxins and pinolidoxins: Phytotoxic nonenolides produced by phytopathogenic *Phoma* and *Ascochyta* species. **Natural Toxins**, v. 6, n. 5, p. 183–188, 1998.

EVIDENTE, A. et al. Cytochalasins Z4, Z5, and Z6, Three New 24-Oxa [14] cytochalasans produced by *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Natural Toxins**, v. 76, p. 1540–1544, 2003.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 769–774, 2002a.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites - Ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 1, p. 61–65, 2002b.

FARIAS, J. M. et al. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 853–860, 2019.

FESEL, P. H.; ZUCCARO, A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53–60, 2016.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.

FORMENTI, L. R. et al. Challenges in industrial fermentation technology research. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 6, p. 727–738, 2014.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388–398, 2011.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674–1683, 2017.

GALLO, M. B. C. et al. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic**

Microbiology, v. 49, p. 142–151, 2009.

GAO, Q. et al. Surfactant removal with multiwalled carbon nanotubes. **Water Research**, v. 106, p. 531–538, 2016.

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

GIENTKA, I. et al. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 31–37, 2016.

GIL-CHÁVEZ, G. J. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

GILBERT-LÓPEZ, B. et al. Subcritical Water Extraction and Neof ormation of Antioxidants. In: GONZÁLEZ, H. D.; MUÑOZ, M. J. G., **Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development**, p. 109–130, 2017.

GRAUPNER, P. R. et al. The Macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1558–1561, 2003.

GRAUPNER, P. R. et al. Chlorosis inducing phytotoxic metabolites : New herbicides from *Phoma macrostoma*. **Natural Products for Pest Management**, p. 37–47, 2006.

GUO, W.; CHI, Y. Purification and fermentation characteristics of exopolysaccharide from *Fomitopsis castaneus* Imaz. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 213–218, 2017.

HADDAD, N. I. A. et al. Surfactin isoforms from *Bacillus subtilis* HSO121: separation and characterization. **Protein and peptide letters**, v. 15, p. 265–269, 2008.

HAO, L. et al. Characterization and antioxidant activities of extracellular and intracellular polysaccharides from *Fomitopsis pinicola*. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 54–59, 2016.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HE, Y. et al. Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM405. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n. 1, p. 169–176, 2014.

HERATH, K. et al. Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a widespread tropical *Phoma* sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1361–1369, 2009.

HETTEGGER, H.; LINDNER, W.; ROSENAU, T. Derivatized polysaccharides on silica and hybridized with silica in chromatography and separation—A mini review. In: RAUTER, A. P.

et al. **Recent Trends in Carbohydrate Chemistry: Synthesis, Structure and Function of Carbohydrates**, v. 1, p. 441–462, 2020.

HOBSON, D. K.; EDWARDS, L.; WALES, D. S. Cynodontin: A secondary metabolite and dyestuff intermediate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 70, p. 343–348, 1997.

HOFFMAN, A. M. et al. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1049–1056, 2008.

HOWLETT, B. J. et al. The role of the toxin sirodesmin in virulence of the blackleg fungus. Disponível em: <<https://www.gcirc.org/fileadmin/documents/Bulletins/B26/B26%20TheRoleBarbara.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2020.

HU, X. et al. Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, p. 9–16, 2019.

HUANG, S. et al. Identification and Antifungal Activity of Metabolites from the Mangrove Fungus *Phoma* sp. L28. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 53, n. 2, p. 237–240, 2017.

HUBBARD, M. et al. The dominant modes of action of macrocidins, bioherbicidal metabolites of *Phoma macrostoma*, differ between susceptible plant species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 132, p. 80–91, 2016.

HUSSAIN, H. et al. Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 9, p. 699–702, 2014.

HUSSAIN, H. et al. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of an endophytic fungus *Phoma* sp. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 1, p. 92–95, 2015.

HYDE, K. D. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1–136, 2019.

ISHAQ, U. et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1035–1045, 2015.

ISMAIL, B.; NAMPOOTHIRI, K. M. Exopolysaccharide production and prevention of syneresis in starch using encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 484–489, 2010.

JHA, A.; KUMAR, A. Biobased technologies for the efficient extraction of biopolymers from waste biomass. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 12, p. 1893–1901, 2019.

JONES, M. D. M. et al. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. **Nature**, v. 474, p. 200–205, 2011.

JOYE, I. J. Cereal biopolymers for nano- and microtechnology: A myriad of opportunities for novel (functional) food applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 1–11, 2019.

KALAM, S.; KHAN, N. A.; SINGH, J. A novel phytotoxic phenolic compound from *Phoma herbarum* FGCC#54 with herbicidal potential. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 4, p. 559–561, 2014.

KANG, Q. et al. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1137-1144, 2019.

KHAN, A. A. et al. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 16, p. 1–13, 2018.

KHENI, K.; VYAS, T. K. Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Ganoderma* sp TV1 and Its Potential as Antioxidant and Anticancer Agent. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 7, n. 2, p. 72–80, 2017.

KIM, E. LA et al. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3126–3129, 2012.

KLAIC, R. Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma* sp. 2014. Dissertação. 92 p. (Mestrado em Engenharia de Processos)– Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

KLAIC, R. et al. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**, p. 183–199, 2015.

KLAIC, R. et al. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 377–384, 2017.

KONG, F. et al. Thiodiketopiperazines from the Marine-Derived Fungus *Phoma* sp. OUCMDZ-1847. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 132–137, 2014.

KOPSAHELIS, A. et al. Gate-to-gate life cycle assessment of biosurfactants and bioplasticizers production via biotechnological exploitation of fats and waste oils. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 10, p. 2833–2841, 2018.

KORA, A. J.; SASHIDHAR, R. B.; ARUNACHALAM, J. Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): A reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1516–1520, 2012.

KOURMENTZA, C. et al. Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains valorizing crude glycerol by-product. **Bioresource Technology**, v. 281, n. February, p. 31–40, 2019.

KUČERA, J. Fungal mycelium - The source of chitosan for chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 808, n. 1, p. 69–73, 2004.

KUHN, R. C.; FILHO, F. M. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 22, p. 2023–2028, 2010a.

KUHN, R. C.; FILHO, F. M. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 862–869, 2010b.

KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; POMBALA, S. Lasiosan, a new exopolysaccharide from *Lasioidiplodia* sp. strain B2 (MTCC 6000): Structural characterization and biological evaluation. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 162–169, 2018.

KUMARAN, R. S. et al. Isolation of taxol, an anticancer drug produced by the endophytic fungus, *Phoma betae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 950–960, 2012.

LEE, C. M. et al. Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Calculations of β -Glucans and Chitins in Fungal Cell Walls. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 943–945, 2013.

LEI, S.; FENG EDMUND, T. Polysaccharides, Microbial. **Reference Module in Life Sciences**, p. 482–494, 2017.

LI, H. et al. High drug loading pH-sensitive pullulan-DOX conjugate nanoparticles for hepatic targeting. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 1, p. 150–159, 2014.

LI, H. et al. Structural identification and antitumor activity of the extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1714–1720, 2016.

LI, K. et al. Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 247, p. 30–38, 2016.

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

LI, S. C. et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 24–30, 2015.

LINNAKOSKI, R. et al. Antiviral Agents From Fungi: Diversity , Mechanisms and Potential Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, 2018.

LIU, C. et al. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5528–5533, 2010.

LIU, L. et al. A novel process for isolation and purification of the bioactive polysaccharide TLH-3 from *Tricholoma lobayens*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1146–1151, 2015.

LIU, S. et al. A new antiviral 14-nordrimane sesquiterpenoid from an endophytic fungus. **Phytochemistry Letters**, v. 29, p. 75–78, 2019.

- LOGAN, C.; KHAN, A. A. Comparative studies of *Phoma* sp associated with potato gangrene in Northern Ireland. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 52, n. 1, p. 9–17, 1969.
- LUFT, L. et al. An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 8, 1059-1080.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 627–634, 2013.
- MARAN, J. P.; PRIYA, B. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Nephelium lappaceum* L. Fruit peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 530–536, 2014.
- MENA-GARCÍA, A. et al. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 115612, 2019.
- MENG, S. et al. Intermolecular interactions of polysaccharides in membrane fouling during microfiltration. **Water Research**, v. 143, Pages 38-46, 2018.
- MENG, S. et al. The role of transparent exopolymer particles (TEP) in membrane fouling: A critical review. **Water Research**, v. 181, p. 115930, 2020.
- MNIF, I.; GHRIBI, D. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 2015.
- MIRZA, Z. et al. Beta-Glucan Particles as Vaccine Adjuvant Carriers. In: WALKER, J. M. **Methods in Molecular Biology**, v. 1625, p. 143–157, 2017.
- MOHAMED, I. E. et al. Epoxyphomalins A and B, Prenylated Polyketides with Potent Cytotoxicity from the Marine-Derived Fungus *Phoma* sp. **Organic Letters**, v. 11, n. 21, p. 514–517, 2009.
- MOHAN, K. et al. Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 500, p. 250–263, 2019.
- MOHD LUTHFI, W. N. S. et al. Production and characterization of bioflocculant via solid state fermentation process using oil palm empty fruit bunch fibers as substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101454, 2020.
- MOHD NASIR, N. et al. Subtopic: Advances in water and wastewater treatment harvesting of *Chlorella* sp. microalgae using *Aspergillus niger* as bio-flocculant for aquaculture wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 249, p. 109373, 2019.
- MORALES, D. et al. Production of a β -d-glucan-rich extract from Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by an extraction/microfiltration/reverse osmosis (nanofiltration) process. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 51, p. 80–90, 2019a.

MORALES, D. et al. Testing the effect of combining innovative extraction technologies on the biological activities of obtained β -glucan-enriched fractions from *Lentinula edodes*. **Journal of Functional Foods**, v. 60, n. May, p. 103446, 2019b.

MOREIRA, A. N. et al. Comportamento Reológico e Composição Química do Biopolímero da Bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 Produzido por Via Enzimática. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n.2, p. 135-142, 2005.

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.2, p.300-305, 2003.

NEAL, J. C.; SHEW, B; SCHIAVONE, R. Temperature and Dose influence *Phoma macrostoma* efficacy on seedling broadleaf weeds. Proc. IXth International Bioherbicide 511 Group Workshop. Beijing, China, p. 29-33, 2011.

NEUMANN, S.; BOLAND, G. J. Influence of host and pathogen variables on the efficacy of *Phoma herbarum*, a potential biological control agent of *Taraxacum officinale*. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, n. 4, p. 425–429, 2002.

NGE, K. L. et al. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. **Plant Science**, v. 170, n. 6, p. 1185–1190, 2006.

NURFARAHIN, A. H., MOHAMED, M. S., PHANG, L. Y. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—An Overview. **Molecules**, v. 23, n. 1049, p. 1–26, 2018.

NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides: Chitosan and Glucan. **Advances in Polymer Science**, v. 244, p. 187–207, 2011.

OIKAWA, H. et al. Biosynthesis of Diterpenoid Aphidicolin: Isolation of Intermediates from P-450 Inhibitor Treated Mycelia of *Phoma betae*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 7541–7554, 1999.

OIKAWA, H. et al. Diversity of diterpene hydrocarbons in fungus *Phoma betae*. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 2329–2332, 2001.

ORLANDELLI, R. C. et al. β -(1→3,1→6)-d-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 431–437, 2017.

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

PADILHA, G. S. et al. Multi-walled carbon nanotubes used as support for lipase from *Burkholderia cepacia*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 2, p. 1021–1029, 2018.

- PALANISAMY, M. et al. Pressurized Water Extraction of β -glucan Enriched Fractions with Bile Acids-Binding Capacities Obtained from Edible Mushrooms. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 2, p. 391–400, 2014.
- PANDEY, A.K. et al. Pathogenicity of some fungi to *Parthenium*, an obnoxious weed in Madhya Pradesh. **Journal of Biological Control**, v. 5, p. 113–115, 1991.
- PANDEY, S.; PANDEY, A. K. Mycoherbicidal potential of some fungi against *Lantana camara* L: A preliminary observation. **Journal of Tropical Forestry**, v. 16, p. 28–32, 2000.
- PARK, J. P. et al. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 250–255, 2002.
- PAYNICH, M. L.; JONES-BURRAGE, S. E.; KNIGHT, K. L. Exopolysaccharide from *Bacillus subtilis* Induces Anti-Inflammatory M2 Macrophages That Prevent T Cell–Mediated Disease. **The Journal of Immunology**, p. 1601641, 2017.
- PEDRAS, M. S. C.; SÉGUIN-SWARTZ, G. The blackleg fungus: phytotoxins and phytoalexins. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.14, p. 67–75, 1992.
- PEDRAS, M. S. C.; BIESENTHAL, C. J. Production of the host-selective phytotoxin phomalide by isolates of *Leptosphaeria maculans* and its correlation with sirodesmin PL production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 547–553, 1998.
- PEDRAS, M. S. C. et al. Phomalairdenone: A new host-selective phytotoxin from a virulent type of the blackleg fungus *Phoma lingam*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 23, p. 3291–3294, 1999.
- PEDRAS, M. S. C.; BIESENTHAL, C. J. HPLC analyses of cultures of *Phoma* spp.: Differentiation among groups and species through secondary metabolite profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 685–691, 2000.
- PEDRAS, M. S. C.; CHUMALA, P. B.; YU, Y. The phytopathogenic fungi *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*: chemotaxonomical characterization of isolates and metabolite production in different culture media. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 364–371, 2007.
- PEDRAS, M. S. C.; YU, Y. Phytochemistry Structure and biological activity of maculansin A, a phytotoxin from the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 17, p. 2966–2971, 2008.
- PENG, X. et al. Cytochalasins from an endophytic fungus *Phoma multirostrata* XJ-2-1 with cell cycle arrest and TRAIL-resistance-overcoming activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104317, 2020.
- PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.2, p.171-178, 2008.

PESSÔA, M. G. et al. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 319–339, 2019.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J. H., HIRANA, S. S. **Microbial Ecology of leaves**. Springer Verlag, New York. USA, pp. 179–197, 1991.

PHARAMAT, T. et al. Antimicrobial and anticancer activities of endophytic fungi from *Mitrajyna javanica* Koord and Val. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 49, p. 5565–5572, 2013.

PHETRONG, K.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. **Songklanakar Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 297–305, 2008.

PLAZA, M. et al. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 245–253, 2012.

PLAZA, M.; MARINA, M. L. Pressurized hot water extraction of bioactives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 236–247, 2019.

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015.

POLLARD, D. J. et al. Scale Up of a Viscous Fungal Fermentation: Application of Scale-Up Criteria With Regime Analysis and Operating Boundary Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, N. 2, 2007.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2013.

POURFARZAD, A.; NAJAFI, M. B. H.; HASSANZADEH, M. K. Characterization of fructan extracted from *Eremurus spectabilis* tubers: a comparative study on different technical conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2657–2667, 2015.

PRAKASH MARAN, J.; PRYA, B. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70; p. 530–536, 2014.

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

QUINTANA-QUIRINO, M. et al. Bacterial cellulose grows with a honeycomb geometry in a solid-state culture of *Gluconacetobacter xylinus* using polyurethane foam support. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 1–9, 2019.

RAI, M. et al. Phoma saccardo: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications phoma saccardo: Distribution, secondary metabolite production

and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 182–196, 2009.

RAI, M. K. et al. Advances in taxonomy of genus *Phoma*: polyphyletic nature and role of phenotypic traits and molecular systematics. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 123–128, 2014.

RAI, M. et al. Marine-derived *Phoma* — the gold mine of bioactive compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9053–9066, 2018.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V. Endophytic Fungi Therapeutics as Novel Resources of natural. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1–26, 2017.

RANGANATHAN, S.; BALAGANGADHARAN, K.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 354–364, 2019.

RAO, M. P. N., XIAO, M., LI, W. J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

REKHA, M. R.; SHARMA, C. P. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: A perspective. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 20, n. 2, p. 111–116, 2007.

RIVERO-CRUZ, Â. F. et al. Conformational Behavior and Absolute Stereostructure of Two Phytotoxic Nonenolides from the Fungus *Phoma herbarum*. **Tetrahedron**, v. 56, p. 5337–5344, 2000.

RIVERO-CRUZ, J. F. et al. A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 511–514, 2003.

ROCA, C. et al. Production of yeast chitin-glucan complex from biodiesel industry byproduct. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 1670–1675, 2012.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular secretion systems in fungi. **Future Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1371–1381, 2011.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 414–420, 2013.

ROSELLÓ-SOTO, E. et al. Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. **Food Engineering Reviews**, v. 8, p. 214–234, 2016.

ROUSTAEI, A. et al. Ultrastructural Studies of the Mode of Penetration by *Phoma macdonaldii* in Sunflower Seedlings. v. 90, n. 8, p. 915–920, 2000.

ROUXEL, T. et al. Biological effects of sirodesmin PL, a phytotoxin produced by *Leptosphaeria maculans*. **Plant Science**, v. 57, p. 45–53, 1988.

RUIZ-HERRERA, J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L. Cell wall glucans of fungi. A review. **The Cell Surface**, v. 5, p. 100022, 2019.

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

SACCARDO, P. A. Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate sporologico dispositorum. **Michelia**, v. 2, p. 1–38, 1880.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, p. 1–14, 2012.

SAHOTA, S. et al. Review of trends in biogas upgradation technologies and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 1, p. 79–88, 2018.

SALEEMI, M. A.; YONG, P. V. C.; WONG, E.H. Investigation of antimicrobial activity and cytotoxicity of synthesized surfactant-modified carbon nanotubes/polyurethane electrospun nanofibers. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 24, p. 100612, 2020.

SANG, X. et al. A novel 3, 4-dihydronaphthalen-1 (2H) -one with spiro-butyrolactone and a new isocoumarin isolated from the endophytic fungus *Phoma* sp. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 6020, p. 1–8, 2016.

SANG, X. et al. α -Pyrone derivatives with cytotoxic activities, from the endophytic fungus *Phoma* sp. YN02-P-3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, p. 3723–3725, 2017.

SANTIAGO, C. et al. Cytotoxic and antifungal activities of 5-hydroxyramulosin, a compound produced by an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollissimum*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

SANTIAGO, C. et al. Polyketide and benzopyran compounds of an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollissimum*: biological activity and structure. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 8, p. 627–632, 2014.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants : Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 401, p. 1–31, 2016.

SATPUTE, S. K. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.

SAXENA, S.; PANDEY, A. K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 395–403, 2001.

SCHMID, J.; MEYER, V.; SIEBER, V. Scleroglucan: biosynthesis , production and application of a versatile hydrocolloid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 937–947, 2011.

- SCOTT, P. M. et al. Cytochalasins A and B from Strains of *Phoma exigua* var. *exigua* and Formation of Cytochalasin B in Potato Gangrene. **Journal of General Microbiology**, v. 87, p. 177-180, 1975.
- SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 9, p. 585–592, 2002.
- SEVIOUR, R. J. et al. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 170–185, 2011.
- SHANG, H. et al. Influences of extraction methods on physicochemical characteristics and activities of *Astragalus cicer* L. polysaccharides. **Process Biochemistry**, v. 73, n. 2888, p. 220–227, 2018.
- SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019.
- SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. v. 73, p. 515–531, 2008.
- SMIDERLE, F. R. et al. Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β -D-glucans from mushrooms. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 165–174, 2017.
- SMITH, J. et al. Weed control spectrum and turfgrass tolerance to bioherbicide *Phoma macrostoma*. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 2, p. 91–98, 2015.
- SONG, X. et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of enzymatic and acidic-hydrolysis of *Pleurotus geesteranus* mycelium polysaccharides on alcoholic liver diseases. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 75–86, 2018.
- SOURKI, A. H.; KOOCHEKI, A.; ELAHI, M. Ultrasound-assisted extraction of β - d -glucan from hull-less barley: Assessment of physicochemical and functional properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 462–475, 2017.
- STRANGE, R. N. Phytotoxin associated with Ascochyta species In: **Toxin in Plant Disease Development and Evolving Biotechnology** (UPADHAYAY, R. K.; MUKHERJEE, K. G.), 167–181 Oxford and IBH Publishing Co Pvt Ltd, New Delhi, India, 1997.
- STEYN, P. S.; RABIE, C. J. Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. **Phytochemistry**. v. 15, p. 1977–1979, 1976.
- SUGAWARA, F.; STROBEL, G. Zinniol, a phytotoxin, is produced by *Phoma macdonaldii*. **Plant Science**, v. 43, p. 19–23, 1986.
- SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Review on production , downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 573–591, 2017.
- SUN, K. et al. An exopolysaccharide isolated from a coral-associated fungus and its sulfated

derivative activates macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 387–394, 2016.

SUTTON, B.C. **The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 696p., 1980.

SVEISTRUP, M. et al. Viability of Biopolymers for Enhanced Oil Recovery. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 1160–1169, 2016.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 2013.

TAJSOLEIMAN, T. et al. An Industrial Perspective on Scale-Down Challenges Using Miniaturized Bioreactors. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 697–706, 2019.

TANG, W. et al. Purification of polysaccharide from *Lentinus edodes* water extract by membrane separation and its chemical composition and structure characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105851, 2020.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1–2, p. 20–28, 2002.

TAYEL, A. A. et al. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 471–475, 2014.

TIAN, Y. et al. Structural characterization of a novel neutral polysaccharide from *Lentinus giganteus* and its antitumor activity through inducing apoptosis. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 231–240, 2016.

TODERO, I. **Desenvolvimento de um bioherbicida a partir de metabólitos de *Phoma* sp. para o manejo de plantas daninhas**. 2017. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)– Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, p. 285–292, 2018.

TODERO, I. et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, v. 40, n. 18, p. 2364–2372, 2019a.

TODERO, I. et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. **Environmental Technology**, v. 41, n. 21, p. 2742–2749, 2020.

U.S. CONGRESS, Office of Technology Assessment, **Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper**, OTA-BP-E-102 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, September, 1993).

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–6, 2015.

VALENZUELA-LOPEZ, N. et al. Coelomycetous *Dothideomycetes* with emphasis on the families *Cucurbitariaceae* and *Didymellaceae*. **Studies in Mycology**, v. 90, p. 1–69, 2018.

VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011.

VENDRUSCOLO, C. T. et al. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 327–332, 2004.

VENKATASUBBAIAH, P. et al. Phytotoxic Metabolites of *Phoma sorghina*, A New Foliar Pathogen of Pokeweed. **Mycologia**, v. 84, n. 5, p. 715–723, 1992.

VIJAYENDRA, S. V. N.; SHAMALA, T. R. Film forming microbial biopolymers for commercial applications — A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 1–20, 2013.

VIKRANT, P. et al. Characterization of a phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 7–8, p. 461–468, 2006.

VIÑARTA, S. C. et al. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii*. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 5, p. 619–629, 2006.

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

WANG, K. F. et al. Improved production and antitumor activity of intracellular protein-polysaccharide from *Trametes versicolor* by the quorum sensing molecule-tyrosol. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 90–96, 2017.

WANG, L. et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231–1239, 2012.

WANG, S. et al. Rheological properties and chain conformation of soy hull water-soluble polysaccharide fractions obtained by gradient alcohol precipitation. **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 34–39, 2019.

WANG, X.; MAJZOABI, M.; FARAHNAKY, A. Ultrasound-assisted modification of functional properties and biological activity of biopolymers: A review. **Ultrasonics-Sonochemistry**, v. 65, 105057, 2020.

WANG, Y. et al. Structure characterization, modification through carboxymethylation and sulfation, and in vitro antioxidant and hypoglycemic activities of a polysaccharide from *Lachnum* sp. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 177–187, 2018.

WANG, Y. et al. Extracellular polysaccharides of endophytic fungus *Alternaria tenuissima* F1 from *Angelica sinensis*: Production conditions, purification, and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 172–183, 2019.

WANG, Z. BIN et al. Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 49–55, 2014.

WOLFE, J. C.; NEAL, J. C.; HARLOW, C. D. Selective Broadleaf Weed Control in Turfgrass with the Bioherbicides *Phoma macrostoma* and Thaxtomin A. **Weed Technology**, v. 30, n. 3, p. 688–700, 2016.

WU, H. et al. Ergosterol peroxide from marine fungus *Phoma* sp. induces ROS-dependent apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 17956, p. 1–14, 2018.

WU, S. et al. Safe and efficient gene delivery based on rice bran polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 1041–1049, 2019.

WU, S.; CHEN, J. Preparation of maltotriose from fermentation broth by hydrolysis of pullulan using pullulanase. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 94–97, 2014.

WU, X. et al. Chemical constituents of the fermentative extracts of marine fungi *Phoma* sp. CZD-F11 and *Aspergillus* sp. CZD-F18 from Zhoushan Archipelago, China. **Natural Product Research**, v. 32, n. 13, p. 1562–1566, 2018.

XU, L. et al. A wide range and high resolution one- filtration molecular weight cut-off method for aqueous based nanofiltration and ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 525, p. 304–311, 2017.

YANG, X. B. et al. Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 747–754, 2005.

YILDIZ, H.; KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41–46, 2018.

ZHANG, B. et al. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 541–554, 2019.

ZHANG, C. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus eryngii* SI-04. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 568–577, 2016.

ZHANG, G. et al. Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 485–491, 2015.

ZHANG, H. et al. Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 380–

387, 2014.

ZHANG, W. et al. Diversity of Antimicrobial Pyrenophorol Derivatives from an Endophytic Fungus, *Phoma* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2008, n. 25, p. 4320–4328, 2008.

ZHANG, X. et al. Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of B Cells by a Polysaccharide from Marine Fungus *Phoma herbarum* YS4108. **PLoS One**, v. 8, n. 3, e60781, 2013.

ZHAO, H. et al. The antihyperlipidemic activities of enzymatic and acidic intracellular polysaccharides by *Termitomyces albuminosus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1227–1234, 2016.

ZHAO, H. et al. Purification, in vitro antioxidant and in vivo anti-aging activities of exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 351–357, 2017.

ZHAO, S.; SHAMOUN, S. F. Effects of culture media, temperature, pH, and light on growth, sporulation, germination, and bioherbicidal efficacy of *Phoma exigua*, a potential biological control agent for salal (*Gaultheria shallon*). **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 1043–1055, 2006.

ZHENG, H. et al. Foam fractionation for the concentration of exopolysaccharides produced by repeated batch fermentation of *Cordyceps militaris*. **Separation and Purification Technology**, v. 210, p. 682–689, 2019.

ZHENG, Z. et al. Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast β -glucan. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 394–403, 2019.

ZHOU, B.; QIANG, S. Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1151–1156, 2008.

ZHOU, L. B.; CHEN, B. Bioactivities of water-soluble polysaccharides from Jisongrong mushroom: Anti-breast carcinoma cell and antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 1–4, 2011.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of β -glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275–288, 2016.

ZOU, X. et al. Biosynthesis of polyamic acid in fermentation: advances and prospects for industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 408–421, 2019.