

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:**  
**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE**  
**PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DA BIOMASSA DE *DRECHSLERA***  
**(*HELMINTHOSPORIUM*) *MONOCERAS* OBTIDA POR**  
**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

**Salah Din Mahmud Hasan**  
Autor

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Andrade Santana**  
Orientadora

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – SP

Setembro, 2002

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 80  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
H27p  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 51513  
PROC 16.837/02  
C \_\_\_\_\_ OX \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 13/11/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00176579-3

BIB ID 267671

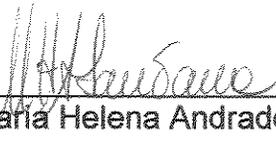
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

H27p Hasan, Salah Din Mahmud  
Produção, recuperação e caracterização de proteínas  
alergênicas da biomassa de *Drechslera*  
(*Helminthosporium*) *monoceras* obtida por fermentação  
em estado sólido / Salah Din Mahmud Hasan. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Engenharia bioquímica. 2. Fermentação. 3. Fungos  
– Extração de proteínas. 4. Alergia. I. Santana, Maria  
Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida por Salah Din Mahmud Hasan e aprovada em 03 de Setembro de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa



Prof. Dr. Walderez Gambale



Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

200254599

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, reading "M. H. Santana", positioned above a horizontal line.

Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)

Dedico este trabalho à minha mãe Fahima e  
ao meu Pai Mahmud (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, misericordioso, fonte de amor e sabedoria.

À Professora Maria Helena Andrade Santana pela amizade, confiança, paciência, e orientação segura durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela orientação e grande colaboração nos trabalhos de caracterização imunológica dos extratos fúngicos, realizados no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, juntamente com sua equipe técnica, em especial à Conceição, Rica, Gláucia, Daniela e Meg.

Ao Prof. Dr. Walderez Gambale, do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, pelo fornecimento do fungo e pelo apoio incondicional que sempre recebi.

À Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno, da FEQ, UNICAMP, pela confiança e orientação durante o estágio docente (PED) e pelas sugestões na identificação das proteínas por SDS-PAGE.

A todos os professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pelo auxílio sempre que preciso e, especialmente, ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda e ao Prof. César Costapinto Santana por permitirem a utilização dos seus laboratórios.

À minha querida Marilena, por ser essa pessoa maravilhosa, por todo o carinho, apoio, compreensão e por estar ao meu lado nos momentos alegres e também nos difíceis.

Aos amigos de laboratório: Adriano, Amós, Ana Paula, André, Antenor, Bérqson, Cláudia, Chrissana, Christiane, Cristiane Farinas, Eduardo, Elaine, Elcimar,

Fábio, Fernanda, Gilson, Gisele, Giuliana, Heron, Isa, José Antônio, Líbia, Lucimara, Marco Garcia, Marco Torres, Maria Helena, Oselys, Paulo de Tarso, Reinaldo, Rodrigo, Rosana, Sérgio, Sindélia e Vinícius.

A todas as pessoas que doaram sangue, necessário para a caracterização dos extratos alergênicos, incluindo os pacientes com sintomas de alergia respiratória, do ambulatório do Hospital das Clínicas, da UNICAMP, e também, em especial, as professoras Ângela, Sônia e Maria Helena e alunos de pós-graduação Elcimar, Celso e Luciana, da Faculdade de Engenharia Química, da Unicamp.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Pesquisa, pela bolsa de estudos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se realizasse.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO .....	xix
ABSTRACT .....	xx
NOMENCLATURA .....	xxi

### CAPÍTULO 1 - Introdução

1.1. Fungos como Alérgenos .....	1
1.2. Extratos Alergênicos Fúngicos.....	2
1.3. Extratos Alergênicos de <i>Drechslera (Helminthosporium) monoceras</i> .....	3
1.4. Fermentação em Estado Sólido.....	3
1.5. Objetivo.....	4
1.6. Colocação do Problema e Relevância .....	5

### CAPÍTULO 2 – Revisão da Literatura

2.1. Extratos Alergênicos .....	7
2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES) .....	11
2.2.1. Microrganismos Cultivados em Meio Sólido .....	15
2.2.1.1. <i>Drechslera (Helminthosporium) monoceras</i> .....	16
2.2.2. Substratos Usados na FES .....	16
2.2.3. Fatores que Influenciam a FES .....	17
2.2.3.1. Umidade e Atividade de Água ( $a_w$ ) .....	18
2.2.3.2. Temperatura.....	19
2.2.3.3. Troca de Gases.....	20
2.2.4. Biorreatores para a FES.....	21
2.3. Recuperação e Purificação de Bioprodutos Produzidos em FES .....	22
2.3.1. Extração de Bioprodutos em FES .....	22
2.3.2. Recuperação de Proteínas dos Extratos de FES .....	23

2.4. Caracterização dos Extratos Alergênicos.....	24
2.4.1. Caracterização <i>In vivo</i> dos Extratos alergênicos .....	25
2.4.2. Caracterização <i>In vitro</i> dos Extratos Alergênicos .....	25

## CAPÍTULO 3 – Material e Métodos

3.1. Material .....	29
3.2. Métodos .....	30
3.2.1. Métodos Analíticos .....	30
Determinação do conteúdo de biomassa.....	30
Determinação do teor de umidade (U) .....	31
Determinação da atividade de água ( $a_w$ ).....	31
Determinação do pH do meio.....	32
Determinação do conteúdo de polifenóis.....	32
Determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR) .....	32
Determinação do conteúdo de açúcares redutores totais (ART)...	33
3.2.2. Fermentação em Estado Sólido: Otimização e Cinética.....	33
Preparo do inóculo .....	33
Estudo micromorfológico do fungo.....	34
Substratos e nutrientes .....	34
Cultivo em estado sólido .....	35
Otimização das condições da fermentação .....	37
Obtenção do extrato fúngico bruto.....	40
3.2.3. Recuperação das Proteínas do Extrato Bruto .....	41
Obtenção do extrato com potencial alergênico .....	41
Remoção de sais e polifenóis .....	44
3.2.4. Caracterização dos Extratos com Potencial Alergênico .....	45
Identificação das proteínas .....	45
Determinação do ponto isoelétrico das proteínas .....	46
Testes cutâneos.....	47
Análise de Dot-blotting .....	48
Análise de Immunoblotting.....	50
Fracionamento das proteínas.....	52

## **CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussões I**

<b>Fermentação em Estado Sólido: Otimização e Cinética</b> .....	<b>55</b>
4.1. <i>Acompanhamento Micromorfológico do Fungo</i> .....	55
4.2. <i>Determinação Prévia das Condições de Fermentação</i> .....	57
4.3. <i>Otimização das Condições da FES</i> .....	60
4.3.1. <i>Determinação das Variáveis Significativas</i> .....	60
4.3.2. <i>Otimização das Variáveis da FES por Metodologia de Superfície de Resposta</i> .....	64
4.3.2.1. <i>Primeiro Planejamento Composto Central</i> .....	64
4.3.2.1.1. <i>Modelo Quadrático</i> .....	65
4.3.2.1.2. <i>Modelo Linear</i> .....	65
4.3.2.2. <i>Deslocamento de Máxima Inclinação</i> .....	69
4.3.2.3. <i>Segundo Planejamento Composto Central</i> .....	72
4.4. <i>Cinética de Crescimento da Biomassa Fúngica</i> .....	77
4.4.1. <i>Coeficiente de Rendimento <math>Y_{XS}</math></i> .....	80
4.4.2. <i>Alternativas para a Prevenção da Compactação do Meio Sólido</i> .....	81
4.4.3. <i>Considerações sobre a Variabilidade da Produtividade</i> .....	86

## **CAPÍTULO 5 – Resultados e Discussões II**

<b>Recuperação das Proteínas do Extrato Bruto</b> .....	<b>89</b>
5.1. <i>Recuperação das Proteínas do Extrato Bruto</i> .....	89
5.2. <i>Relação entre os Conteúdos de Proteína e Carboidrato nos Extratos</i> ...	92
5.3. <i>Considerações sobre a Quantificação de Proteínas nos Extratos</i> .....	94
5.4. <i>Remoção de Sais e Polifenóis</i> .....	95

## **CAPÍTULO 6 – Resultados e Discussões III**

<b>Caracterização dos Extratos com Potencial Alergênico</b> .....	<b>99</b>
6.1. <i>Identificação das Proteínas</i> .....	99
6.1.1. <i>Identificação das Proteínas dos Extratos com Potencial Alergênico Obtidos por Precipitação com EtOH</i> .....	100

6.1.2. Identificação das Proteínas dos Extratos com Potencial Alergênico Obtidos por Precipitação com SAm.....	102
6.2. <i>Ponto Isoelétrico das Proteínas</i> .....	106
6.3. <i>Reatividade dos Extratos com Potencial Alergênico</i> .....	107
6.3.1. Testes Cutâneos.....	107
6.3.2. Dot-blotting .....	107
6.3.3. Immunoblotting .....	108
6.4. <i>Fracionamento das Proteínas por Cromatografia de Permeação em Gel</i> .....	111
<b>CAPÍTULO 7 – Conclusões</b> .....	<b>117</b>
<b>CAPÍTULO 8 - Sugestões para Próximos Trabalhos</b> .....	<b>119</b>
<b>CAPÍTULO 9 - Referências Bibliográficas</b> .....	<b>121</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Esquema de montagem do processo FES em colunas de Raimbault (adaptado de Moraes, 1999) .....	36
<b>Figura 3.2.</b> Esquema das colunas de Raimbault (adaptado de Moraes, 1999) ...	38
<b>Figura 3.3.</b> Esquema do distribuidor e umidificador de ar primário (adaptado de Moraes, 1999) .....	39
<b>Figura 3.4.</b> Esquema do umidificador de ar secundário (adaptado de Moraes, 1999) .....	39
<b>Figura 3.5.</b> Diagrama esquemático da recuperação das proteínas do extrato bruto por precipitação mediante adição sucessiva de solventes orgânicos (EtOH e acetona), com posterior filtração em gel e diálise, para obtenção do extrato com potencial alergênico contendo as proteínas precipitadas e teor reduzido de sais e polifenóis .....	43
<b>Figura 3.6.</b> Esquema do sistema de agitação por tombamento (tanque agitado) para a adsorção de polifenóis (adaptado de Veredas, 2000) .....	45
<b>Figura 3.7.</b> Esquema de montagem dos géis de eletroforese e membranas de nitrocelulose para transferência dos antígenos, análise “Immunoblotting” .....	51
<b>Figura 4.1.</b> Micrografias do fungo <i>D. monoceras</i> obtidas após 4, 7, 10, 14, 18 e 21 dias de microcultivo em lâmina com ágar-Czapeck.....	56
<b>Figura 4.2.</b> Valores de produtividade P (mg proteína/gms/dia, onde gms = gramas de massa seca do meio fermentado) em função da concentração inicial do inóculo Co, para os diferentes substratos (S). .....	58
<b>Figura 4.3.</b> Valores de produtividade P (mg proteína/gms/dia, onde gms = gramas de massa seca do meio fermentado) em função do pH inicial do meio de fermentação, para os diferentes substratos (S).....	58
<b>Figura 4.4.</b> Valores de produtividade P (mg proteína/gms/dia, onde gms = gramas de massa seca do meio fermentado) em função da idade do inóculo (I), para diferentes concentrações de inóculo Co .....	59
<b>Figura 4.5.</b> Gráfico de Pareto, para intervalo de confiança de 95%, obtido para o planejamento fatorial fracionário $2^{5-2}_{III}$ .....	62
<b>Figura 4.6.</b> Gráfico de Pareto, para intervalo de confiança de 90%, obtido para o planejamento fatorial fracionário $2^{5-2}_{III}$ .....	63

<b>Figura 4.7.</b> Gráfico dos resíduos em função dos valores estimados de P, para o modelo linear obtido para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo) .....	68
<b>Figura 4.8.</b> Superfície de resposta para a produtividade (P) em função do pH e umidade (U) obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo) .....	69
<b>Figura 4.9.</b> Gráfico de contorno da produtividade em função do pH e umidade (U) obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo) .....	70
<b>Figura 4.10.</b> Curvas de nível do plano descrito pelo modelo linear. A linha tracejada preta é a trajetória de máxima inclinação partindo do ponto central do planejamento .....	71
<b>Figura 4.11.</b> Gráfico de Pareto, para intervalo de confiança de 95%, para o modelo quadrático obtido do segundo planejamento composto central.....	74
<b>Figura 4.12.</b> Gráfico de contorno do modelo quadrático (P em função de U e pH) obtido para o segundo planejamento composto central .....	75
<b>Figura 4.13.</b> Superfície de resposta do modelo quadrático (P em função de U e pH) obtido para o segundo planejamento composto central .....	75
<b>Figura 4.14.</b> Curvas de nível da superfície descrita pelo modelo quadrático. A seta corresponde ao ponto de máxima produtividade (valores codificados de U e pH).....	76
<b>Figura 4.15.</b> Perfis de proteína (mg/gms, —●—), atividade de água (—□—) e polifenóis (mM, —▼—) obtidos para o crescimento de <i>D. monoceras</i> nas condições otimizadas da FES .....	78
<b>Figura 4.16.</b> Perfis de ART (mg glicose/gms, —▲—), umidade (% , —●—) e AR (mg glicose/gms, —+—) obtidos para o crescimento de <i>D. monoceras</i> nas condições otimizadas da FES .....	78
<b>Figura 4.17.</b> Perfil de $Y_{XS}$ obtido para o crescimento de <i>D. monoceras</i> nas condições otimizadas da FES .....	81
<b>Figura 4.18.</b> Perfis de pH (—□—), proteína (mg/gms, —▲—), ART (mg glicose/gms, —●—), AR (mg glicose/gms, —x—) e umidade (% , —◆—) obtidos para o ensaio E1, para o crescimento de <i>D. monoceras</i> nas condições otimizadas da FES.....	83
<b>Figura 4.19.</b> Perfis de pH (—□—), proteína (mg/gms, —▲—), ART (mg glicose/gms, —●—), AR (mg glicose/gms, —x—) e umidade (% , —◆—) obtidos para o ensaio E2, para o crescimento de <i>D. monoceras</i> nas condições otimizadas da FES.....	83

**Figura 4.20.** Perfis de pH (— □ —), proteína (mg/gms, —▲—), ART (mg glicose/gms, —●—), AR (mg glicose/gms, —x—) e umidade (% , —◆—) obtidos para o ensaio E3, para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES..... 84

**Figura 4.21.** Perfis do coeficiente de produção  $Y_{X/S}$  obtidos para os ensaios E1 (—■—), E2 (—●—) e E3 (—▲—), para o crescimento de *D. monoceras*, nas condições otimizadas da FES. Os valores de  $Y_{X/S}$  são expressos em mg proteína/mg glicose ..... 85

**Figura 5.1.** Perfis de proteína (mg/mL) no extrato bruto (—■—) e no extrato com potencial alergênico (—●—), sendo este último obtido por precipitação com EtOH e acetona (primeiro ensaio)..... 91

**Figura 5.2.** Perfis de proteína (mg/mL) no extrato bruto (—■—) e no extrato com potencial alergênico (—●—), sendo este último obtido por precipitação com EtOH (segundo ensaio)..... 91

**Figura 5.3.** Perfis de proteína (mg/mL) no extrato bruto (—■—) e no extrato com potencial alergênico (—●—), sendo este último obtido por precipitação com SAm (terceiro ensaio) ..... 92

**Figura 5.4.** Perfis de ART (mg glicose/mL) no extrato bruto (—■—) e no extrato com potencial alergênico (—●—), sendo este último obtido por precipitação com EtOH..... 93

**Figura 5.5.** Perfis de proteína (mg/mL, —■—) e ART (mg glicose/mL, —●—) no extrato com potencial alergênico obtido por precipitação com EtOH..... 93

**Figura 5.6.** Perfis de concentração de sais dos extratos com potencial alergênico obtidos no processo de separação por filtração em gel e diálise, realizada após precipitação das proteínas do extrato bruto por adição sucessiva de EtOH e acetona. Antes da filtração em gel (—■—), após a filtração em gel (—●—) e após a diálise (—▲—)..... 97

**Figura 5.7.** Perfis de concentração de polifenóis dos extratos com potencial alergênico obtidos no processo de separação por filtração em gel e diálise, realizada após precipitação das proteínas do extrato bruto por adição sucessiva de EtOH e acetona. Antes da filtração em gel (—■—), após a filtração em gel (—●—) e após a diálise (—▲—) ..... 97

**Figura 6.1.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH, em gel com 15% poliacrilamida e marcadores (MM) de baixa massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas de baixa massa molecular identificadas no gel ..... 100

**Figura 6.2.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH, em gel com 10% de poli-acrilamida e marcadores (MM) de alta massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas de alta massa molecular identificadas no gel..... 102

**Figura 6.3.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm, em gel com 15% poli-acrilamida e marcadores (MM) de baixa massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas identificadas no gel... 103

**Figura 6.4.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm, em gel com 10% de poli-acrilamida e marcadores (MM) de alta massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas identificadas no gel... 104

**Figura 6.5.** Análise de IEF das amostras dos extratos com potencial alergênico (0 a 240h) obtidas por precipitação com EtOH, em PhastGel gradiente 3-9 e marcador (MM) Pharmacia (pI 3-10)..... 106

**Figura 6.6.** Análise de IEF das amostras dos extratos com potencial alergênico (0 a 288 h) obtidas por precipitação com SAm, em PhastGel gradiente 3-9 e marcador (MM) Pharmacia (pI 3-10)..... 107

**Figura 6.7.** Análise de “Dot blotting” dos extratos com potencial alergênico de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, obtidos por precipitação com EtOH e com SAm, nos tempos de fermentação de 96 e 240 h, frente a oito soros de pacientes positivos aos testes cutâneos. P1-P8: pacientes; C: controle ..... 108

**Figura 6.8.** Análise de Immunoblotting dos extratos alergênicos de *D. monoceras*, obtidos por precipitação com EtOH, nos tempos de fermentação de 96 e 240 h, frente aos soros positivos dos pacientes (P1 e P2) aos testes cutâneos. C: controle. MM: marcador de alta massa molecular ..... 109

**Figura 6.9.** Análise de Immunoblotting dos extratos alergênicos de *D. monoceras*, obtidos por precipitação com SAm, nos tempos de fermentação de 96 e 240 h, frente aos soros positivos dos pacientes (P1 e P2) aos testes cutâneos. C: controle. MM: marcador de alta massa molecular ..... 110

**Figura 6.10.** Perfis de absorvância das frações coletadas durante a cromatografia de permeação em gel, para calibração da coluna Amicon com solução padrão de proteínas (IgG de 150 kDa, BSA de 67 kDa e  $\beta$ -lactoglobulina de 35 kDa), para os três géis testados: Sephadex G-100 (—■—), mistura Sephadex G100–G200 (2:1) (—●—) e Sephadex G-150 (—▲—)..... 111

**Figura 6.11.** Perfis de absorvância das frações coletadas durante a cromatografia de permeação em gel, para o extrato alergênico obtido por precipitação com

EtOH, após 144 h de fermentação, para os três géis testados: Sephadex G-100 (—■—), Sephadex G100–G200 (2:1) (—●—) e Sephadex G-150 (—▲—) ... 112

**Figura 6.12.** Perfil de proteína das frações coletadas durante o teste de cromatografia de permeação em gel com Sephadex G-150, para o extrato alergênico obtido por precipitação com EtOH, após 144 h de fermentação ..... 113

**Figura 6.13.** Eletroforetograma (SDS-PAGE em gel com 15% de poliacrilamida e marcadores (MM) de baixa massa molecular) obtido para as frações coletadas no 2° pico dos testes de cromatografia de permeação em gel. As raias 1, 2 e 3 referem-se a aplicação da solução de calibração da coluna para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente. As raias 4, 5 e 6 referem-se a amostra de extrato alergênico (após 144 h de fermentação), para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente ..... 114

**Figura 6.14.** Eletroforetograma (SDS-PAGE em gel com 10% de poliacrilamida e marcadores (MM) de alta massa molecular) obtido para as frações coletadas no 1° pico dos testes de cromatografia de permeação em gel. As raias 1, 2 e 3 referem-se a aplicação da solução de calibração da coluna para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente. As raias 4, 5 e 6 referem-se a amostra de extrato alergênico (após 144 h de fermentação), para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente ..... 115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Efeitos calculados para os planejamentos $3^2$ das variáveis concentração inicial do inóculo (Co), substrato (S), pH do meio e idade do inóculo (I) .....	57
<b>Tabela 4.2.</b> Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento fatorial fracionário $2^{5-2}_{III}$ .....	61
<b>Tabela 4.3.</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{5-2}_{III}$ com as variáveis codificadas e resultados obtidos de produtividade (P).....	61
<b>Tabela 4.4.</b> Estimativa dos efeitos, para intervalo de confiança de 95%, obtida para o planejamento fatorial fracionário $2^{5-2}_{III}$ .....	62
<b>Tabela 4.5.</b> Estimativa dos efeitos, para intervalo de confiança de 90%, obtida para o planejamento fatorial fracionário $2^{5-2}_{III}$ .....	63
<b>Tabela 4.6.</b> Especificação dos níveis das variáveis usadas no primeiro planejamento composto central .....	65
<b>Tabela 4.7.</b> Matriz do primeiro planejamento composto central com as variáveis codificadas e resultados obtidos de produtividade (P).....	66
<b>Tabela 4.8.</b> Estimativa dos efeitos para o modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o primeiro planejamento composto central .....	66
<b>Tabela 4.9.</b> Análise de variância do modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtido para o primeiro planejamento composto central .....	67
<b>Tabela 4.10.</b> Estimativa dos efeitos para o modelo linear, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo) .....	67
<b>Tabela 4.11.</b> Análise de variância do modelo linear, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo) .....	67
<b>Tabela 4.12.</b> Matriz do planejamento para a trajetória de máxima inclinação, com os valores das variáveis codificadas e reais .....	71
<b>Tabela 4.13.</b> Matriz do planejamento para a trajetória de máxima inclinação, com os valores das variáveis codificadas e reais, e resultados de produtividade (P) .	72
<b>Tabela 4.14.</b> Matriz do segundo planejamento composto central com as variáveis codificadas e resultados obtidos de produtividade (P).....	73
<b>Tabela 4.15</b> Estimativa dos efeitos para o modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o segundo planejamento composto central .....	73
<b>Tabela 4.16.</b> Análise de variância para o modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtido do segundo planejamento composto central.....	74
<b>Tabela 5.1.</b> Concentrações de polifenóis obtidas a partir dos diferentes métodos de separação, e suas respectivas % de remoção .....	98

<b>Tabela 6.1.</b> Proteínas de baixa massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH (gel de 15% de poliacrilamida) .....	101
<b>Tabela 6.2.</b> Proteínas de alta massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH (gel de 10% de poliacrilamida) .....	101
<b>Tabela 6.3.</b> Proteínas de baixa massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm (gel de 15% de poliacrilamida) .....	103
<b>Tabela 6.4.</b> Proteínas de alta massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm .....	104

## RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* cultivada em meio sólido, com vistas a obtenção de extrato alergênico fúngico para aplicação em diagnóstico de doenças alérgicas. Para a produção, foram usados biorreatores aerados de leito fixo do tipo colunas de Raimbault, sendo testados como substratos o bagaço de cana de açúcar e os farelos de trigo e milho. A otimização das variáveis do processo fermentativo foi feita através de planejamento estatístico de experimentos e análise de superfície de resposta, sendo os melhores resultados de produtividade obtidos com valores iniciais de pH 9,5 e umidade de 45,8%. As condições mais adequadas para o cultivo em estado sólido de *D. monoceras* foram com o uso de farelo de trigo como substrato com tamanho de partícula de 0,59 mm; concentração de inóculo de 0,4 mg/mL, vazão de ar de 2,0 L/h/coluna e 25°C. A cinética da produção de biomassa foi estudada nas condições otimizadas do processo. O extrato bruto foi obtido por extração das proteínas do meio fermentado usando água como solvente. A recuperação dessas proteínas foi feita mediante precipitação por solventes orgânicos e sulfato de amônio, seguida da remoção de sais e polifenóis, para a obtenção de extrato com potencial alergênico. A caracterização do extrato com potencial alergênico foi feita mediante eletroforese SDS-PAGE, IEF, cromatografia de permeação em gel e testes *in vivo* ("prick-test") e *in vitro* ("Dot-blotting" e "Immunoblotting") para a avaliação da alergenicidade das proteínas. Foram identificadas 12 proteínas nos extratos com potencial alergênico, entre 14 e 156 kDa. Nos testes cutâneos, feitos em pacientes com sintomas de alergia respiratória, foram observadas positivities em 24% dos casos, para formação de pápulas maiores que 4 mm de diâmetro. Nas análises de "Immunoblotting", seis proteínas apresentaram reatividade mais intensa, podendo ser consideradas alergênicas as de 155,9; 104,2; 44,2; 35,7; 27,8 e 14,3 kDa.

Palavras Chave: Proteínas alergênicas, *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, Fermentação em estado sólido, Produção, Caracterização.

## ABSTRACT

The purpose of this work was the production, recovery and characterization of allergenic proteins of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* biomass, cultivated by solid-state fermentation, for the obtainment of standardized mould allergenic extract, applicable to diagnosis of allergy diseases. Bioreactors based on Raimbault-type aerated fixed bed columns were used for solid-state fermentation, and sugar cane bagasse, wheat and maize bran were tested as substrate. The most important variables of solid fermentation were optimized by statistical experimental design and by surface response analysis, and the best results, in terms of productivity, were obtained at pH 9.5 and 45.8% moisture. The solid state fermentation conditions were determined for wheat bran used as substrate (with 0.59 mm dimension); 0.4 mg/mL of inoculum; 2.0 L/h of air and 25°C. The kinetic of biomass growth was determined under the optimized conditions of the process. Water was used as solvent for the obtainment of the crude extracts. Potentially allergenic extracts were obtained by protein precipitation from the crude extracts by the use of organic solvents and ammonium sulfate, followed by salt and polyphenols removal. Characterization of potentially allergenic extracts was done by SDS-PAGE electrophoresis, isoelectric focusing, gel permeation chromatography and by cutaneous "prick-tests", dot-blotting and immunoblotting analysis for the allergenic evaluation of extracts. Twelve proteins were identified from the potentially allergenic extracts, in the range of low and high molecular mass, between 14 and 156 kDa. From cutaneous tests, 24% of the patients with respiratory allergy symptoms showed positive reactions. The immunoblotting assays revealed six proteins with allergenic activity due to their stronger reactivity, with the following molecular masses: 155.9; 104.2; 44.2; 35.7; 27.8 and 14.3 kDa.

Keywords: Allergens, Proteins, *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, Solid state fermentation, Production, Characterization.

## NOMENCLATURA

**ACP** – anafilaxia cutânea passiva

**Alt-a** – fração protéica de *Alternaria alternata* identificada como alérgeno

**ANOVA** – análise de variância

**AR** – açúcar redutor (mg glicose/gms)

**ART** – açúcar redutor total (mg glicose/gms)

**Asp f** – fração protéica de *Aspergillus fumigatus* identificada como alérgeno

**Asp fl** – fração protéica de *Aspergillus flavus* identificada como alérgeno

**Asp o** – fração protéica de *Aspergillus oryzae* identificada como alérgeno

**a<sub>w</sub>** – atividade de água

**B** – ensaio de Bradford

**BCA** – ensaio do ácido bicinconínico

**Cla h** – fração protéica de *Cladosporium herbarum* identificada como alérgeno

**Co** – concentração inicial do inóculo (mg/mL)

**C<sub>Prot., t<sub>f</sub></sub>** - concentração de proteína (mg proteína/gms), após t<sub>f</sub> = 168h,

**C<sub>Prot., t<sub>i</sub></sub>** - concentração de proteína (mg proteína/gms), em t<sub>i</sub> = 0h

**DAB** – diaminobenzidina

**DNS** – ácido 3,5-dinitrosalicílico

**dp** – diâmetro de partícula do substrato (mm)

**Dre** – fração protéica de *Drechslera monoceras* identificada como alérgeno

**ELISA** – enzyme-linked immunosorbent assay

**EtOH** – etanol

**FES** – fermentação em estado sólido

**FSm** – fermentação submersa

**gms** – gramas de massa seca

**I** – idade do inóculo (dias)

**IEF** – “isoelectric focusing”

**kDa** - kiloDalton

**LM** – ensaio de Lowry modificado

**MBCA** – ensaio do ácido bicinconínico modificado

**MK** – ensaio de micro-Kjeldahl

**MM** – marcador de massa molecular

**P** – produtividade (mg proteína/gms/168h)

**PVPP** – polivinilpolipirrolidona

**Q** – vazão de ar (L/h)

**RAST** – “radioallergosorbent test”

**R<sub>f</sub>** – migração relativa das proteínas no gel de eletroforese

**S** – substrato

**SAm** – sulfato de amônio

**SDS-PAGE** – sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**S<sub>0</sub>** – concentração inicial de substrato (mg glicose/gms)

**S<sub>t</sub>** – concentração de substrato após tempo “t” de fermentação (mg glicose/gms)

**t<sub>f</sub>** – tempo de fermentação (h)

**U** – umidade (%)

**Y<sub>X/S</sub>** – coeficiente de produção de biomassa, relativo a conversão de substrato  
(mg proteína/mg glicose)

**X<sub>0</sub>** – concentração inicial de biomassa (mg proteína/gms)

**X<sub>t</sub>** – concentração de inoculo após tempo “t” de fermentação (mg proteína/gms)

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

#### 1.1. Fungos como Alérgenos

Aproximadamente 20% da população mundial apresenta problemas relacionados a algum tipo de alergia. A concentração das substâncias alergênicas (alérgenos) no meio ambiente varia com o tipo de clima, vegetação e qualidade do ar. Os alérgenos encontrados fora das residências (“outdoor allergens”) são constituídos geralmente de pólenes de plantas e propágulos (esporos de fungos) e os alérgenos encontrados dentro das residências (“indoor allergens”) são decorrentes de ácaros, baratas, cães, gatos, ratos e propágulos de fungos (Kurup et al., 2000).

A inalação de propágulos de fungos do ambiente produz sintomas de alergia respiratória em indivíduos sensibilizados, tais como rinite e asma brônquica. Desde 1873 tem-se o conhecimento desse fato, porém somente a partir de 1930 houve avanço para o conhecimento mais amplo do problema, com os estudos de Feinberg & Little (1935) e Prince (1944). Mas foi a partir de 1966, com o descobrimento da imunoglobulina E (IgE), como responsável pelos fenômenos atópicos (Ishizaka, 1966), que o estudo dos processos alérgicos, de maneira geral, teve grandes avanços (Basomba, 1982).

Os propágulos e fragmentos de micélio de fungos estão entre os mais ubíquos aeroalérgenos do mundo. O micélio e os propágulos de fungos contêm componentes bioquímicos que podem apresentar propriedades alergênicas. Os compostos alergênicos são proteínas, glicoproteínas ou carboidratos capazes de estimular o sistema imunológico e ligar-se especificamente ao anticorpo IgE produzido em resposta ao estímulo (Valenta et al, 1998).

Há acima de 300 alérgenos de plantas e animais já descritos na literatura e estes alérgenos incluem múltiplas moléculas de diferentes características físicas, químicas e funcionais. Muitos alérgenos de pólenes, ácaros e baratas já foram bem caracterizadas, o que não ocorre com os alérgenos de fungos (Scheiner & Kraft, 1995).

## 1.2. Extratos Alergênicos Fúngicos

Os extratos brutos obtidos da biomassa fúngica constituem-se de misturas heterogêneas de diferentes proteínas, carboidratos e outras substâncias não identificadas (Basomba, 1982). Segundo Achatz et al (1995), os propágulos de fungos são onipresentes e o número de espécies existentes é estimada em um milhão. De acordo com Menezes (1995), estão listados na literatura cerca de 340 fungos associados a alergias respiratórias, porém apenas quatro extratos fúngicos encontram-se caracterizados e padronizados para efeitos de diagnóstico e imunoterapia: os extratos de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Pesquisadores em todo o mundo estão caracterizando e padronizando extratos alergênicos de outros fungos envolvidos com alergia respiratória como *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Curvularia* e outros (Bush, 1994).

Gambale et al (1977) identificaram, na cidade de São Paulo, 45 gêneros de fungos anemófilos, potencialmente alergênicos, sendo os mais frequentes o *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Alternaria*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* e *Drechslera*.

Atualmente, o diagnóstico de doenças alérgicas é baseado principalmente nos sintomas clínicos dos pacientes, nas reações aos testes cutâneos, na detecção de anticorpos IgE específicos de fungos no soro (radioallergosorbent test – RAST e enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) e, em alguns casos, broncoprovocação com antígenos específicos (Kurup, 2000). A maioria desses testes depende da qualidade dos extratos alergênicos de fungos envolvidos com alergia. Extratos alergênicos bem caracterizados são, portanto, de fundamental importância para o diagnóstico de alergia e imunoterapia específica.

### **1.3. Extratos Alergênicos de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras***

Mohovic et al (1988), trabalhando com extratos da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*<sup>1</sup> cultivada em meio líquido com crescimento em superfície, mostraram que os mesmos apresentavam maior positividade em relação à intensidade de reação cutânea em pacientes alérgicos, quando comparados aos extratos dos demais fungos isolados em São Paulo.

A partir desses resultados, Menezes et al. (1995), através da caracterização dos extratos, mostraram a presença de três alérgenos importantes constituídos de uma proteína de massa molecular 60 kDa, uma glicoproteína de 36 kDa e uma proteína de 14,4 kDa, que foram designadas como Dre 1, Dre 2 e Dre 3, respectivamente. A presença e a proporção dessas proteínas no extrato fúngico dependeu do meio e tempo de cultivo e das frações do fungo na forma de micélio ou esporo, dentre outras variáveis, estando, portanto, a qualidade dos extratos alergênicos diretamente associada ao processo de produção da biomassa fúngica. Apesar de obtidas em pequena quantidade, essas proteínas foram usadas com sucesso no diagnóstico de alergia em pacientes do Hospital das Clínicas, da Universidade de São Paulo.

### **1.4. Fermentação em Estado Sólido**

Fungos da espécie *D. monoceras* estão presentes no solo onde vivem como saprófitas, são parasitas de cereais e vegetais sendo localizados também no ar ambiente. Assim, o meio sólido apresenta-se promissor como meio de crescimento de fungos filamentosos como o *D. monoceras* devido a semelhança com o seu *habitat* natural.

Atualmente, a técnica de fermentação em estado sólido (FES) tem sido extensamente explorada devido às vantagens oferecidas principalmente no cultivo de fungos filamentosos, quando comparada à fermentação submersa (FSm). As principais vantagens da FES são a de poder ser conduzida sob condições não estéreis e sem problemas de contaminação, melhor transferência de oxigênio e menor degradação do produto, comuns aos processos submersos.

<sup>1</sup> Nota: O nome *Helminthosporium* refere-se a denominação antiga dada ao fungo do gênero *Drechslera*, como é atualmente conhecido.

Segundo Pandey et al (2000), nos últimos dez anos tem havido crescente desenvolvimento da FES com aplicação em diversas áreas como bioremediação e biodegradação de compostos tóxicos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais tóxicos, biotransformação de resíduos de plantações para enriquecimento nutricional, etc., e para a obtenção de produtos biologicamente ativos como metabólitos secundários, incluindo micotoxinas (aflatoxina e ocratoxina), biopesticidas (endotoxinas bacterianas), hormônio de crescimento de plantas (ácido giberélico), promotor de crescimento (zearalenona), antibióticos (penicilina, cefalosporina, cefamicina C, oxitetraciclina, iturin, surfactin, monorden), drogas imunossupressivas (ciclosporina A), ácidos orgânicos, compostos aromáticos alimentares e diversas enzimas, variedade esta que faz da FES uma tecnologia do futuro. A maioria das aplicações citadas envolvem a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, apesar de alguns usarem meios inertes como bagaço de cana de açúcar e ágar.

Os mesmos autores concluíram que, devido às dificuldades de manuseio com biorreatores de grande porte usados na FES para produtos com menor valor agregado, torna-se mais interessante explorar essa tecnologia para a obtenção de produtos mais caros e cujo aumento de escala não seja da ordem de toneladas ou kilos, mas de gramas como os biofarmacêuticos, incluindo os antibióticos e hormônios de crescimento, etc. No caso particular das enzimas, as mesmas tem apresentado, para alguns casos, elevados níveis de produtividade, comparativamente a sua obtenção por FSm.

### 1.5. Objetivo

O objetivo deste trabalho é a produção e caracterização de extrato alergênico da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, cultivada por FES. O estudo abrangeu três etapas:

1. Cultivo da biomassa e produção de extrato bruto, abordando os seguintes aspectos:

- Seleção do substrato.
- Otimização das variáveis de processo da FES para obtenção da maior produtividade em biomassa.

- Caracterização da cinética de crescimento do fungo no ponto ótimo de produção.

2. Recuperação das proteínas e remoção de sais e polifenóis do extrato bruto para obtenção dos extratos com potencial alergênico, abrangendo:

- Precipitação das proteínas com solventes orgânicos e com sulfato de amônio.
- Remoção de sais e de polifenóis.

3. Caracterização dos extratos com potencial alergênico por meio de:

- Identificação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE e IEF.
- Provas cutâneas para demonstração da sensibilização (“prick-test”).
- Análises de “Dot-blotting” e “Immunoblotting”.
- Fracionamento das proteínas dos extratos com potencial alergênico por meio de cromatografia de permeação em gel.

### 1.6. Colocação do Problema e Relevância

Um aspecto econômico interessante da FES é que a maioria dos substratos usados nesse processo são resíduos agroindustriais. No Brasil, portanto, o desenvolvimento de processos de FES aparece como alternativa muito promissora para a produção de proteínas, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos entre outros produtos.

Diante da importância em diagnóstico e imunoterapia específica dos extratos obtidos da biomassa de *D. monoceras*, surge a necessidade de desenvolvimento de um processo escalonável para a produção da sua biomassa e dos extratos alergênicos associados. Nesse contexto, justifica-se o estudo da FES como uma alternativa a ser explorada para a produção da biomassa de *D. monoceras*. Paralelamente ao processo FES há a necessidade da extração e recuperação das proteínas alergênicas, bem como da caracterização das mesmas em termos de identificação e de testes imunológicos *in vivo* e *in vitro*, o que confere características interdisciplinares ao estudo.

O diagnóstico de alergia respiratória a fungos depende de extratos alergênicos bem caracterizados e padronizados. Essa padronização, em nível mundial, é dificultada por uma série de procedimentos, tais como: meios de cultivo diferentes, tempo de crescimento do fungo para extração, líquidos extratores, entre outros fatores. Poucos fungos já foram estudados nesses aspectos em que diferentes meios de cultivo e condições de extração foram testadas. Neste sentido, esse trabalho também vem a ser uma contribuição em termos da padronização do extrato alergênico de *D. monoceras*.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO DA LITERATURA

O presente capítulo tem o intuito de apresentar revisão sobre os extratos alergênicos, sua problemática e os principais extratos estudados. Apresenta também revisão sobre a fermentação em estado sólido, com suas aplicações e comparação com a fermentação submersa, uma breve descrição dos substratos, microrganismos e biorreatores usados, bem como os principais fatores que influenciam a FES. Finalmente são apresentadas informações sobre a recuperação de proteínas da FES e métodos utilizados para a caracterização dos extratos com potencial alergênico.

#### 2.1. Extratos Alergênicos

Os extratos brutos constituem-se de substâncias extraídas da biomassa fúngica mediante processos em que se empregam líquidos extratores como as soluções de Tris-HCl, Evans, Coca, Frugoni, soluções bicarbonatadas, e outras. Por serem misturas heterogêneas de diferentes proteínas, carboidratos, sais, entre outras substâncias, a utilização dos extratos brutos em diagnóstico definitivo de alergia deve ser vista com reservas, o que tem motivado os pesquisadores a tentativas de fracionamento e padronização desses extratos (Basomba, 1982; Menezes, 1995).

Os extratos alergênicos utilizados para fins diagnósticos são preparados a partir de propágulos e do micélio vegetativo do fungo. Essa questão tem sido pesquisada desde 1942 quando Pratt & Grossman observaram que propágulos e não o micélio vegetativo de *Alternaria tenuis* eram os grandes responsáveis por sintomas alérgicos. Por outro lado, Yunginger (1988) através de estudos com

*Alternaria*, observou que o micélio vegetativo também é responsável por sintomas alérgicos. Gambale et al. (1988) e Croce et al. (1990) estudando fungos não esporulados detectaram casos de asma brônquica provocados por esses fungos, demonstrando que o micélio também é alergênico.

A caracterização e padronização dos extratos fúngicos é cercada de dificuldades devido a uma série de motivos: variações entre extratos obtidos das mesmas espécies de fungo; variações nos meios de cultivo; tempo de crescimento; frações do fungo constituídas pelo micélio ou propágulos; determinantes antigênicos comuns entre espécies ou entre gêneros (Ford, 1982; 1983).

Segundo Horner et al (1995), nos Estados Unidos havia em torno de 200 extratos fúngicos produzidos por várias indústrias e disponíveis comercialmente em vários países, sendo que nenhum deles era devidamente padronizado, constituindo-se de misturas de múltiplos componentes alergênicos e antigênicos. Por esse motivo, a utilização em diagnóstico desses extratos apresentava restrições, o que tem motivado pesquisadores quanto a sua caracterização e padronização. Em busca recente à página da "WHO" (World Health Organization) na Internet ([www-nt.who.int/vaccines/biologicals/All.asp](http://www-nt.who.int/vaccines/biologicals/All.asp)) foi verificado que somente os alérgenos de pólen, poeira e pêlo de cachorro foram padronizados para efeitos de utilização em diagnóstico e imunoterapia de alergia.

Conforme Kurup & Banerjee (2000), já são conhecidas as seqüências de aminoácidos de aproximadamente 80 alérgenos e o número de substâncias alergênicas devidamente caracterizadas está aumentando rapidamente. Ainda assim, há uma grande quantidade de alérgenos clinicamente relevantes que não foram identificados, purificados e caracterizados. Os extratos alergênicos mais importantes já estudados e caracterizados para efeitos de diagnóstico e imunoterapia são referentes aos fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*.

Atualmente, os alérgenos de *Alternaria alternata*, fungo da subdivisão *Deuteromycotina*, tem sido purificados e caracterizados tanto por fracionamento convencional como pelas técnicas de biologia molecular. Alt a 1 é o alérgeno mais freqüentemente reconhecido, por ligar-se ao IgE de mais de 80% dos pacientes

asmáticos (Bush & Sanchez, 1997). Paris et al (1991) relataram a existência de uma glicoproteína estável termicamente, de 31 kDa, localizada no citoplasma tanto das hifas como dos propágulos do fungo. Várias isoformas de Alt a 1 e variantes isoelétricas já foram identificadas.

Yunginger et al. (1980) isolaram um alérgeno de *Alternaria alternata*, denominando-o de Alt-1. O fungo foi cultivado em FSm a temperatura de 25°C em meio Czapeck suplementado com maltose, dextrose e tripticase. O extrato bruto obtido a partir de micélios e propágulos, secos e desengordurados, foi obtido com Tris-HCl, fracionado por precipitação seqüencial com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, focalização isoelétrica e filtração em gel Sephadex G-100. As principais frações alergênicas de *Alternaria alternata* foram representadas por proteínas e carboidratos de massas moleculares que variaram de 10 a 150 kDa. Os autores concluíram que o Alt-1 tem alta especificidade no diagnóstico da asma por *Alternaria* através da técnica de "RAST".

*Aspergillus* sp. é detectado em praticamente todos os países. Recentemente, a descoberta de proteinases séricas alcalinas com propriedades alergênicas, tais como Asp f 13, Asp fl 13 e Asp o 13, de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. oryzae*, respectivamente, foram descritas por alguns pesquisadores. As enzimas amiloglicosidase, celulase e hemicelulase de *A. niger* também mostraram ser alergênicas mediante testes cutâneos e reatividade em análises de "Immunoblotting" (Shen et al, 1998).

Vários alérgenos com massas moleculares diversas têm sido identificados e purificados para *Aspergillus* sendo que o mais estudado é o Asp f I, uma proteína de massa molecular de 18 kDa identificada em *A. fumigatus* e em *A. restrictus*, mas não em outras espécies de *Aspergillus* (Bush, 1993). Extratos de várias espécies de *Aspergillus* têm sido estudados visando principalmente a produção de reagentes para diagnóstico da aspergilose broncopulmonar, para controle de produção de toxinas (Hoffman, 1984) e para imunoterapia de pacientes sensíveis a esse gênero de fungo (Longbottom, 1992).

Espécies de *Penicillium* sp. foram isoladas dos mais variados ambientes, principalmente do ar atmosférico, sendo consideradas a maior fonte de alérgenos do interior de residências. Shen et al. (1999) mostraram que as proteinases

séricas alcalinas de 32 a 34 kDa eram os principais alérgenos de *P. citrinum*, *P. brevicompactum*, *P. notatum* e *P. oxalicum*. Estes alérgenos apresentaram reatividade cruzada com outros alérgenos de diferentes espécies de *Penicillium* e de *Aspergillus*. Shen et al (1993), por meio das técnicas de “Western blotting” e “RAST” analisaram frações alergênicas de *Penicillium notatum* e encontraram duas frações importantes, uma de 68 kDa, mais potente indutora de IgE, e outra de 64 kDa.

Fungos do gênero *Cladosporium* sp. são anemófilos, mais freqüentes em regiões de clima temperado. Várias espécies são importantes em alergia, sendo as mais estudadas a *C. herbarum* e a *C. cladosporioides*. Breitenbach et al (1997) descreveram a purificação de uma enolase recombinante de *Cladosporium*, Cla h 6, de 48 kDa, a qual apresentava ligações de afinidade com anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos, por meio de “Immunoblotting”. Duas frações alergênicas de *Cladosporium herbarum* foram purificadas e padronizadas: a Cla h I de 13 kDa e a Cla h II, de 25 kDa (Bush, 1993).

Para cada cepa de fungo, a quantidade e a qualidade das frações alergênicas estão associadas com os substratos, condições de cultivo e o líquido extrator. O estabelecimento criterioso desses parâmetros de processo representa uma condição básica para a padronização dos extratos alergênicos de fungos (Marques, 1997).

Os únicos estudos apresentados na literatura sobre os antígenos e alérgenos de *D. monoceras* foram realizados por Menezes et al. (1995). Os autores determinaram a composição bioquímica, antigenicidade e alergenicidade de extratos brutos do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* (cepas ICB USP K-1-16 e CBS 154.26), obtidos por extração com Tris-HCl. O objetivo do trabalho foi estabelecer condições básicas de produção de *D. monoceras* para futura utilização em diagnóstico e imunoterapia de alergias causadas por fungos. O fungo foi cultivado a 25°C em meio submerso contendo caldo Czapeck. O extrato de *D. monoceras* apresentou três alérgenos importantes, proteínas de massas moleculares de 60,0; 36,0 e 14,4 kDa, designadas por Dre 1, Dre 2 e Dre 3 respectivamente, sendo a Dre 2 identificada como glicoproteína.

Os mesmos autores mostraram, através de dados da curva de crescimento e estudos morfológicos, que o cultivo de *D. monoceras* pode ser caracterizado por cinco períodos distintos: fases vegetativa e exponencial até o 4º dia, vegetativa e estacionária até o 16º dia, fases conidial e estacionária do 16º ao 22º dia e conidial e de declínio do 28º dia em diante. As quantidades totais de carboidratos e proteínas nos extratos aumentaram com o tempo de crescimento, e os valores máximos de proteínas totais e lipídios foram verificados no extrato bruto obtido no 28º dia de crescimento. A caracterização por SDS-PAGE (“Sodium Dodecil Sulphate – Polyacrylamide Gel Eletrophoresis”) mostrou que os extratos obtidos do 4º ao 10º dia apresentaram proteínas de massa molecular entre 60 e 67 kDa. Os extratos obtidos da biomassa no 16º ao 22º dia de cultivo apresentaram 5 bandas identificadas como 18,5; 30,0; 36,0; 60,0 e 67,0 kDa e o extrato do 28º dia apresentou, além de componentes com essas cinco massas, outras duas bandas de 14,4 e 20,1 kDa.

Nestes extratos brutos foram verificadas antigenicidades por meio de reação de imunodifusão em ágar contra soro hiperimune de coelho. Nenhuma reação foi observada com os extratos obtidos de culturas do 4º ao 10º dia. Os outros extratos (de 16 a 28 dias) apresentaram reações e o aparecimento de 4 bandas de precipitação, indicando populações antigênicas diferentes. Baseado no extrato com o mais alto conteúdo de proteínas, o tempo de 28 dias foi escolhido para os testes de indução de anticorpos do tipo IgE em ratos. Os resultados mostraram que as linhagens de *D. monoceras* induziram mais intensamente a produção de IgE que as linhagens de *Cladosporium cladosporioides* nas mesmas condições (Menezes, 1995).

## **2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES)**

A busca de novas fontes de alimentos e medicamentos, como enzimas e antibióticos determinou nas últimas décadas, o aparecimento de vários processos para a produção de biomassa microbiana. Os microrganismos são capazes de sintetizar rapidamente grandes quantidades de protoplasma e material energético,

e de excretar uma grande variedade de metabólitos desejáveis, tais como álcoois, ácidos orgânicos, vitaminas, antibióticos, proteínas e enzimas.

A FES é considerada como o mais antigo processo fermentativo usado pelo homem e remonta do ano 2600 a.C. com a produção de pão pelos egípcios, seguindo-se de queijo por *Penicillium roqueforti*; "Koji" no Japão; "Tempeh" na Indonésia e etc. (Pandey, 1992). Entretanto, após a segunda Guerra Mundial, o método da fermentação submersa (FSm) tornou-se bastante popular devido ao impulso na produção industrial de antibióticos, como a penicilina. Por outro lado, o já tradicional método de fermentação em estado sólido (FES), apresentou poucos avanços tecnológicos se comparado ao FSm. Nos últimos dez anos, com o desenvolvimento acelerado da engenharia bioquímica, a técnica FES tem sido extensamente explorada devido as vantagens oferecidas com o cultivo principalmente de fungos filamentosos (Lonsane et al, 1992).

O processo FES é, geralmente, definido como o crescimento de microrganismo em materiais sólidos umedecidos na ausência ou perto da ausência de água livre (Pandey, 1992; Lonsane et al., 1992). Os substratos sólidos úmidos, como os resíduos agroindustriais (farelos de trigo, arroz, etc.), possuem uma característica polimérica e insolubilidade em água, agindo como fonte de carbono, nitrogênio, minerais, água e outros nutrientes, bem como de suporte para os microrganismos (Lonsane et al., 1992).

Vários autores têm comparado as vantagens e as desvantagens entre os processos FES e FSm (Lonsane et al, 1992; Pandey, 1991; Gutierrez-Rojas & Torres, 1992; Cannel & Moo-Young, 1980). As vantagens da FES que justificam seu uso são o menor espaço ocupado pela planta e fermentadores para uma mesma produção; a pequena quantidade de efluentes para tratamento; a obtenção de produtos concentrados, ou seja, menor quantidade de solvente para extração; a possibilidade da exclusão das etapas de concentração e/ou extração; a redução dos problemas de contaminação; o uso de substratos simples e de baixo custo; a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária; a ausência de espuma; a eliminação da necessidade de solubilização do substrato e a eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação.

As desvantagens mais significativas da FES apresentadas na literatura (Lonsane et al, 1992; Pandey, 1991; Gutierrez-Rojas & Torres, 1992) são o uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade; as dificuldades para remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo; a dificuldade na medida e no controle dos níveis de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados; a escassez de dados de engenharia e de projeto para fermentadores; a necessidade de grandes quantidades de inóculo e pré-tratamento do substrato.

Atualmente, na indústria de fermentação, a FES é aplicada para a obtenção de vários produtos. No quadro 1 são apresentadas algumas dessas aplicações. Balakrishnan & Pandey (1996) relatam a produção do antibiótico iturin por FES, usando farelo de trigo como substrato, e apresentam resultados de produtividade de 6 a 8 vezes maior do que a FSm. Yang & Swei (1996), produzindo tetraciclinas a partir de substratos celulósicos em FES, obtiveram 10 a 11 mg de oxitetraciclinas por grama de substrato, em 8 dias. Nakayama et al (1997) e Ohno et al (1995) produziram o antibiótico surfactin por FES e obtiveram produtividades 4 a 5 vezes maior que na FSm.

**Quadro 1.** Aplicações industriais da FES.

<b>Aplicação</b>	<b>Exemplos</b>
Alimentos fermentados	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos
Bioconversão de resíduos	Bagaço de cana, polpa de café
Aditivos de alimentos	Flavorizantes, corantes, óleos essenciais
Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Trichoderma</i>
Crescimento de plantas, hormônios	<i>Rhizobium</i> , <i>Trichoderma</i> , Giberelina
Produção de enzimas	Amilases, celulasas, proteases, pectinases, xilanases
Fármacos	Penicilina e probióticos
Produção de ácidos orgânicos	Ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico, giberélico
Fermentação alcoólica	<i>Schwanniomyces</i> sp., malteação
Metabólitos fúngicos	Hormônios e alcalóides

Fonte: Raimbault (1997)

A FES apresenta grande potencial para a produção de enzimas. Atualmente, a produção industrial da maioria das enzimas é feita por FSm, usando cepas de microrganismos geneticamente modificadas (Pandey et al, 2000). O custo de produção em FSm é elevado tornando necessário o uso de alternativas viáveis como a FES. Tengerdy (1998) relata a produção de celulase por FSm comparativamente a FES. Em FSm, a produção de celulase foi de aproximadamente 10 g/L, e o custo médio de fermentação em um biorreator (tanque agitado) foi cerca de U\$ 200/m<sup>3</sup>. Assim, o custo de produção por FSm foi de U\$ 20/kg. Em FES, o nível médio de produção foi de 10 mg/g de substrato, com custo médio de fermentação de somente U\$ 25/m<sup>3</sup> e custo de produção de aproximadamente U\$ 0,2/kg.

Algumas publicações recentes relatam a aplicação da FES para os mais diversos produtos como ácido L-glutâmico, pigmentos, carotenóides, goma xantana, vitaminas, biosurfactantes, entre outros (Pandey et al, 2000; Soares et al, 2000; Larroche et al, 1999; Makkar & Cameotra, 1999; Nampoothiri & Pandey, 1996; Deshpande, 1999; Kiransree et al, 1999; Christen et al, 1997; Daigle et al, 1998).

Exopolissacarídeos, tais como a xantana e os sucinoglicanos são considerados os produtos do futuro da FES (Pandey, 2000). Em trabalho recente, Stredansky & Conti (1999) descreveram a produção de goma xantana por FES usando uma cultura de *Xantomonas campestris* em substratos como casca de cítricos e resíduos de grãos de malte. Os resultados obtidos de produção são de 2 a 4 vezes maiores que em FSm.

A produção de ácidos orgânicos está diretamente ligada ao próprio desenvolvimento histórico da FES. O ácido cítrico vem sendo produzido por FES há muitos anos ao passo que os ácidos láctico, fumárico e oxálico vem sendo produzidos somente a partir da década de 90. O ácido cítrico é produzido principalmente por FSm usando *Aspergillus niger* e *Candida* sp. a partir de diferentes fontes de carboidratos, tais como melaços e meios a base de amido. Entretanto, o processo FES com a utilização de resíduos agroindustriais tornou-se um grande potencial para a produção de ácidos orgânicos. A produção de ácido láctico em FES tem sido realizada usando diferentes cepas de fungos e de

bactérias. Soccol et al. (1994) usaram uma cepa de *Rhizopus* sp. para a produção de ácido láctico L(+) por FSm e por FES e verificaram que ambos os níveis de produção e produtividade foram maiores para a FES.

Segundo Pandey et al (2000), a FES não deve ser encarada como uma tecnologia que simplesmente irá substituir a FSm. A FSm apresenta muitas características que a tornam um processo preferível no caso em que ambos os processos (FES e FSm) apresentam custos semelhantes. A maior homogeneidade no sistema FSm torna o processo mais fácil de controlar. A enorme quantidade de pesquisa em FES em nível laboratorial, para os mais variados produtos, comparativamente com o reduzido número de processos FES explorados em nível comercial, é uma confirmação deste fato. Entretanto, para certos produtos como enzimas e alguns ácidos orgânicos, a FES apresenta-se reconhecidamente superior. Em consequência disso, uma apreciável quantidade de processos FES começaram a operar industrialmente. Existe, portanto, a necessidade de desenvolvimento da FES como tecnologia, de tal forma a explorar todo o seu potencial.

### **2.2.1. Microrganismos Cultivados em Meio Sólido**

Muitos grupos de microrganismos podem crescer em substratos sólidos. Fungos filamentosos, entretanto possuem melhor capacidade de crescer na ausência de água livre. As bactérias e as leveduras crescem preferencialmente na superfície enquanto que os fungos filamentosos penetram nas partículas do substrato (Frazier, 1976).

Segundo Pandey (1992), dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são *Phycomycetes* (*Mucor* e *Rhizopus*), *Ascomycetes* (*Aspergillus* e *Penicillium*) e *Basidiomycetes* (*Polysporus*).

Viniegra & Augur (1997) citam que culturas de fungos em substratos sólidos comportam-se de modo distinto à fermentação submersa (FSm). A repressão catabólica, geralmente observada na fermentação submersa, pode ser contornada pelo uso da fermentação semi-sólida. No caso, por exemplo, de *Aspergillus niger* as cepas podem crescer em FES com a vantagem de que as

atividades enzimáticas e a produtividade geralmente são maiores, havendo tendência à secreção mais rápida de enzimas se comparada com a técnica FSm.

#### **2.2.1.1. *Drechslera (Helminthosporium) monoceras***

O gênero *Helminthosporium* é muito amplo e todas as espécies são bem conhecidas por serem parasitas de cereais e vegetais e muitas delas crescem bem como saprófitas. Algumas espécies de *Helminthosporium* crescem rapidamente em cultura, com hifas de coloração escura e conídios típicos. Outras parecem ser estéreis e tendem a produzir apenas quantidades consideráveis de micélio hialino de coloração clara. Certas espécies, quando crescem em meio Czapeck dextrose, sintetizam pigmento marrom avermelhado (hidroxiantraquinona) (Smith & Berry, 1974 e Barron, 1972).

As principais características da espécie *Helminthosporium monoceras* são os conídios reunidos em cachos ou grupos, situados sobre conidióforos que terminam com superfície pregueada e irregular, lembrando cachos de bananas. Os conídios são ovalados, escuros, apresentando septos transversais. Ao se destacarem do conidióforo observam-se pequenas áreas escuras sobre seu ponto de implantação (Ellis, 1971 e Lacaz, 1991).

*Helminthosporium* sp. é isolado do escarro e da pele, mas raramente é assinalado como responsável por doenças infecciosas (Menezes, 1995). Dolan et al. (1970), constataram apenas dois casos de infecção pulmonar crônica por esse tipo de fungo. A dispersão de *Drechslera (Helminthosporium)* sp. se dá através do ar atmosférico. Por esta razão esse fungo é encontrado nos mais diversos ambientes, podendo desempenhar importante papel como elemento alergizante das vias respiratórias.

#### **2.2.2. Substratos Usados na FES**

Geralmente, os substratos para FES são compostos ou produtos heterogêneos da agricultura ou subprodutos da agroindústria. Suas estruturas macromoleculares básicas (celulose, amido, pectina, lignocelulose, fibras) conferem as propriedades de sólido aos substratos. Geralmente, a macromolécula

estrutural serve de matriz sólida e fornece o carbono e as fontes de energia (açúcares, lipídios, proteínas, ácidos orgânicos).

A importância do uso de materiais agroindustriais como os farelos de cereais, bagaços de cana de açúcar e mandioca, polpa de café entre outros, é devida às seguintes características (Costa, 1996):

- são recursos naturais renováveis;
- sua produção depende de outra atividade produtiva;
- são produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema de disposição regional.

A preparação e o pré-tratamento do substrato sólido são etapas importantes para a transformação do substrato cru em uma forma utilizável na FES. Essas etapas incluem:

- diminuição e homogeneização do tamanho da partícula através de moagem e peneiramento;
- hidrólise físico-química ou enzimática dos polímeros para aumentar a disponibilidade do substrato ao microrganismo;
- suplementação com nutrientes (fósforo, nitrogênio, sais etc.) e adequação do pH e umidade;
- cozimento ou tratamento a vapor para pré-degradação da estrutura macromolecular e eliminação da maioria dos contaminantes.

Os principais problemas associados aos substratos na FES são a heterogeneidade devido a sua estrutura não-uniforme (mistura de amido, lignocelulose, pectina) e variação entre bateladas, o que limita a reprodutibilidade, e a dificuldade de mistura da massa sólida durante a fermentação a fim de evitar a compactação do meio e a ocorrência de gradientes de crescimento microbiano, temperatura, pH e de umidade, dificultando a coleta de amostras representativas do processo (Raimbault, 1997).

### **2.2.3. Fatores que Influenciam a FES**

De acordo com Saucedo-Castañeda et al (1992), o sistema FES é afetado por diversos fatores, que incluem: (a) pré-tratamento do sólido; (b) composição do

meio; c) pH inicial do meio; (d) condições de autoclavagem; (e) forma, quantidade e idade do inóculo; (f) agitação; (g) aeração; (h) temperatura; (i) umidade do meio; (j) umidade no fermentador e (l) densidade aparente do meio. Dentre os principais fatores que influenciam o processo FES quanto ao controle do crescimento microbiano e produção de metabólitos estão a umidade, a atividade de água ( $a_w$ ), a temperatura e a troca de gases.

### **2.2.3.1. Umidade e Atividade de Água ( $a_w$ )**

A atividade de água, representada por  $a_w$ , é expressa através da sua capacidade de retenção de água pelo substrato. A atividade de água é definida como a razão entre a pressão de vapor da água nas condições do ensaio e a sua pressão de vapor nas condições padrões. A atividade  $a_w$  necessária para a germinação dos propágulos de alguns fungos pode variar de 0,62 a 0,93, porém cada fungo possui atividade de água ótima e intervalo de atividade no qual pode crescer. A atividade de água máxima presente no meio é função da capacidade de retenção de água dos suportes, que em geral varia de 30 a 80% de umidade (Frazier, 1976).

Em decorrência das características do processo, o conteúdo de água dos substratos para FES é limitado a pequenas quantidades. De acordo com Lonsane et al. (1992), a existência de valor ótimo para a umidade deve ser bem estabelecida, já que valores acima ou abaixo do ótimo podem afetar significativamente a produtividade do processo. Pandey (1992) cita a importância do conteúdo adequado de umidade para cada processo, uma vez que a alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato, dificultando a penetração de oxigênio e facilitando a contaminação por bactérias. Ao contrário, baixos níveis de umidade levam a crescimento pobre e pequena acessibilidade ao nutriente. Com relação ao crescimento de fungos filamentosos, o mesmo autor cita que altos valores para atividade de água ( $a_w$ ) do meio favorecem a esporulação, enquanto que valores baixos de  $a_w$  estimulam a germinação de propágulos ou o crescimento micelial.

Berovic & Logar-Derencin (1993) observaram que conteúdos de umidade acima de 50% resultavam em menor produção de pectinase a partir de *Aspergillus niger* em meio sólido e que, a conteúdos abaixo de 38%, o tempo de fermentação era demasiadamente longo. Como a perda de água do meio, decorrente da aeração forçada em reatores de coluna, constitui um sério problema nos sistemas FES, Saucedo-Castañeda et al. (1992) alertam para a importância do controle de umidade durante o curso da fermentação, citando o uso de um sistema integrado de controle de temperatura-umidade, no qual a vazão de aeração e um sistema de aspersão de água do tipo “spray” poderiam se usados para repor umidade ao meio e serem controlados por computador. Os mesmos autores apontam também a umidificação do ar antes de sua alimentação no fermentador como o método mais prático, eficiente e seguro de manter o valor da umidade dentro dos valores estipulados.

#### **2.2.3.2. Temperatura**

O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos microrganismos. Uma das grandes dificuldades dos processos de FES é a remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria fermentada.

Para a FES em larga escala, o problema se agrava e, os equipamentos para refrigeração convectivos ou condutivos mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico, resultando no meio fermentativo um gradiente de temperatura que influi negativamente na produtividade do processo.

A geração e a transferência de calor em fermentadores de coluna com leito fixo pode ser avaliada por meio de modelagem matemática, através de números adimensionais como Biot e Peclet. Saucedo-Castañeda et al. (1990) e Hasan et al. (1998) mostraram que a transferência de calor ocorre preferencialmente por meio de convecção devido ao fluxo de ar axial e que a condução de calor radial através do leito fixo é a principal resistência à transferência de calor.

### 2.2.3.3. Troca de Gases

O ar que introduz o oxigênio necessário para o desenvolvimento do microrganismo no interior do biorreator, deve fluir com uma pressão relativamente baixa e misturar-se uniformemente por todas as partes da massa fermentativa (Viniestra-Gonzales, 1988). A área de contato sólido/gás deve ser favorecida uma vez que a fase gasosa é muito importante para manter a temperatura do substrato, o nível de umidade e as condições aeróbias do meio.

A interface sólido/gás deve permitir trocas gasosas, pois o consumo de oxigênio e a formação de dióxido de carbono são muito elevados em FES, favorecendo um rápido desenvolvimento de culturas de fungos.

Um importante fator, que encontra-se associado a troca de gases e que, por conseqüência, afeta o crescimento microbiano, é o tamanho de partícula do substrato. Geralmente, substratos com menor tamanho de partícula fornecem maior área de contato, favorecendo o crescimento do microrganismo e sendo, dessa forma, um parâmetro desejável. Por outro lado, partículas de substrato muito pequenas podem resultar, na maioria dos casos, em aglomeração do meio fermentativo, o que pode afetar a condição respiração/aeração resultando em crescimento microbiano pobre. Ao mesmo tempo, maiores tamanhos de partícula oferecem melhores condições de respiração/aeração (devido ao maior espaço entre as partículas), mas fornecem também superfície limitada para o crescimento do microrganismo. Logo, é importante determinar-se o tamanho de partícula mais adequado para um determinado substrato, de modo a melhor satisfazer a condição respiração/aeração e o conseqüente crescimento microbiano.

Saucedo-Castañeda et al. (1992) relatam que o gradiente de biomassa formado a diferentes alturas do leito de um biorreator de coluna poderia ser eliminado através do controle da taxa de aeração do sistema. A estratégia de controle utilizada foi manter a concentração de gás carbônico na saída da coluna em torno de 2%. Os resultados para o crescimento de *Schwanniomyces castellii* CBS2863, em um fermentador com leito de 900 mm altura, mostraram a grande eficiência do controle proposto.

#### 2.2.4. Biorreatores para a FES

Pandey (1991) apresenta os principais tipos de biorreatores usados em FES, citando uma série de estudos realizados em nível laboratorial em frascos Erlenmeyer, béqueres e garrafas de Roux. A maior ênfase é dada aos fermentadores dos tipos bandejas, tambor, coluna e leite fluidizado gás-sólido.

O fermentador de bandejas é o tipo mais simples usado nos processos FES, podendo ser de madeira, metálico ou plástico. O fundo é perfurado de tal modo que suporta o substrato e permite a aeração. Geralmente as bandejas são arranjadas uma sobre a outra a uma certa distância. A fermentação ocorre em uma câmara onde se propicia uma atmosfera úmida. A temperatura do substrato é controlada circulando-se ar frio ou quente.

O fermentador de tambor consiste de um reator horizontal, de forma cilíndrica, equipado com dispositivo de rotação e com entrada e saída de ar. Esse sistema emprega aeração forçada (Pandey, 1991, Mitchel et al, 2000). O crescimento do microrganismo neste tipo de biorreator é considerado melhor e mais uniforme que nos fermentadores de bandeja. A mistura do substrato em um reator tipo tambor é obtida através de rotação e por detalhes construtivos do equipamento. Uma desvantagem quanto ao uso de altas rotações é a danificação do micélio. Outra grande desvantagem é a agregação das partículas úmidas.

O fermentador de coluna, como o próprio nome sugere, esse equipamento consiste de um tubo dotado de placa para sustentação do substrato, e dispositivo para alimentação de ar em uma das extremidades. O controle de temperatura pode ser feito através de jaqueta térmica, ou em laboratório, a coluna inteira pode ser colocada em um banho termostático. A própria aeração permite o controle da temperatura ao forçar a evaporação da água presente no substrato (Durand, 1997).

Raimbault & Alazard (1980) descreveram o crescimento de *Aspergillus niger* em farinha de mandioca usando para tal um conjunto de 24 fermentadores de coluna de leite fixo, sendo cada coluna com 210 mm de altura e 22 mm de diâmetro, com capacidade para 20 g de material sólido. As colunas eram imersas em banho de água a 25°C para controle da temperatura e cada coluna era aerada com 4 a 6 L/h de ar saturado. De acordo com Saucedo-Castañeda et al. (1992),

entre os vários tipos de fermentadores disponíveis para FES, o fermentador de coluna é o que mais se adapta ao aumento de escala e controle de processos.

Nos reatores de leito fluidizado gás-sólido, o gás é soprado ascendentemente através da base perfurada a uma velocidade suficiente para fluidizar as partículas do substrato, podendo ser utilizados dispositivos que quebrem possíveis aglomerados. A coluna é alta o bastante para promover a expansão do leito e a velocidade do fluxo de ar deve permitir uma eficiente transferência de calor e massa através das partículas de substrato e a fase gasosa (Mitchell et al, 2000).

### **2.3. Recuperação e Purificação de Bioprodutos Produzidos em FES**

A pequena quantidade de água presente na FES traz dois benefícios para a recuperação e purificação dos bioprodutos: a obtenção de altas concentrações do produto de interesse, sendo essa característica muito atrativa comercialmente, e a redução do volume de efluentes gerados (Ramesh & Lonsane, 1987).

De uma maneira geral, a purificação de bioprodutos de processos de FSm envolve as seguintes etapas: separação de células e sólidos suspensos, recuperação e purificação do produto sendo que, para a extração de produtos intracelulares, é requerida a etapa adicional de rompimento de células.

A extensão e o tipo de recuperação e purificação de bioprodutos varia com a natureza e a qualidade desejada do produto final, a qual é influenciada pela aplicação e requerimentos de mercado. Portanto, a estratégia usada deve atender a essas necessidades (Doelle et al., 1992). Nesse contexto, os produtos são classificados em: produtos sem necessidade de processamento, com necessidade de processamento simples e aqueles que requerem processamentos extensivos. Produtos como proteínas e enzimas utilizados para aplicações médicas requerem processamentos extensivos para a sua utilização.

#### **2.3.1. Extração de Bioprodutos em FES**

Para a FES, a recuperação e purificação dos bioprodutos envolve a operação de lixiviação do produto associado ao sólido, em relação a FSm. Uma vez que o produto é recuperado em solvente adequado, o extrato bruto obtido é

semelhante ao caldo líquido produzido no processo FSm. Diferentes fatores influenciam significativamente no processo de lixiviação e, por conseqüência, na sua eficiência, dentre os quais podem ser citados o pré-tratamento do sólido fermentado, a seletividade do solvente, a difusividade do soluto no solvente, a retenção do solvente pelo sólido, a mistura de sólidos e solventes, a relação sólido:solvente, o tempo de contato sólido solvente, o efeito da temperatura de contato e o efeito do pH (Doelle et al, 1992).

O processo de lixiviação das proteínas produzidas pelo cultivo do *D. monoceras* em FES foi estudado por Saraiva (2001), abordando os aspectos de seleção das variáveis importantes e determinação das faixas operacionais que conduzem à maximização da massa de proteína total nos extratos. A extração dos componentes da biomassa de *D. monoceras* foi testada por meio de diferentes líquidos. Concluiu-se que os melhores resultados de extração das proteínas foram verificados usando-se água como líquido extrator a uma relação sólido:solvente 1:15, com o pH entre 8,3 e 9,0 à temperatura de 30°C. Constatou também que a utilização de inibidores de proteases nos líquidos extratores não influenciava significativamente os resultados obtidos, e portanto as proteínas não sofrem degradação durante o processo de extração.

### **2.3.2. Recuperação de Proteínas dos Extratos de FES**

Proteínas e enzimas produzidas por FES são inicialmente recuperadas do meio de lixiviação empregando-se técnicas de precipitação por solventes, remoção de interferentes e secagem (Ramakrishna et al., 1982). Se for necessário um elevado grau de pureza do produto, torna-se necessária a utilização de técnicas de purificação mais sofisticadas (Takur et al., 1990).

Proteínas podem interagir com moléculas de tamanho pequeno que estejam presentes no extrato bruto. Estas moléculas pequenas, tais como os compostos fenólicos, quinonas e certos carboidratos são provenientes do substrato sólido, visto que são comumente encontradas em extratos provenientes de plantas (Gegenheimer, 1990). Outras moléculas podem interagir com proteínas tais como os taninos e polissacarídeos aniônicos que também estejam presentes. Estes compostos interagem com as proteínas por meio de pontes de hidrogênio,

ligações iônicas, interação hidrofóbica, e também por ligações covalentes. Em processos de purificação, estas substâncias devem ser removidas antes de etapas de cromatografia, caso sejam utilizadas (Loomis, 1974).

Polifenóis são classificados como ácidos fenólicos (e derivados), taninos e flavonóides (Salunkhe et al., 1981). Segundo Fernández-Lahore et al (1998), os polifenóis, e outros materiais inibidores, podem ser removidos do extrato cru através de diversas técnicas como a complexação com polivinilpolipirrolidona (PVPP) e a adsorção em resinas tais como a Amberlite XAD-2 (resina macroreticular não iônica, que adsorve espécies iônicas através de interações polares e hidrofóbicas) e Dowex 1x8 (resina de troca aniônica altamente básica). Esses pesquisadores observaram uma maior eficiência de remoção de polifenóis com o uso da resina Dowex 1x8.

#### **2.4. Caracterização dos Extratos Alergênicos**

O diagnóstico de doenças alérgicas é geralmente baseado nos sintomas clínicos dos pacientes, nas reações que surgem dos testes cutâneos, na detecção de anticorpos IgE alérgeno-específicos de soros de pacientes e, em alguns casos, testes de bronco-provocação (Kurup et al., 1993). A eficiência dos diagnósticos *in vivo* e *in vitro* de alergias a fungos depende de extratos alergênicos bem caracterizados. Os gêneros de fungos mais comuns apresentam grande número de espécies associadas às mais diversas cepas. Alguns problemas de reprodutibilidade surgem mesmo quando se trabalha com cepas bem definidas, devido a habilidade inerente do microrganismo de variar em resposta as condições de crescimento. Segundo Kurup et al. (2000), os fatores que contribuem para a variabilidade dos extratos comerciais e aqueles preparados em laboratório são: (a) variação nas cepas em estoque usadas para preparar extratos alergênicos e na sua própria identificação, (b) condições de crescimento dos fungos e modo de preparo dos extratos, (c) estabilidade dos extratos e (d) os métodos empregados para o controle da qualidade dos extratos de modo a permitir a comparação entre os mesmos.

A estabilidade de extratos alergênicos depende da natureza química e qualidade dos alérgenos e da temperatura de estocagem dos mesmos. Para

alguns extratos a liofilização é o melhor método para manter o potencial alergênico, porém alguns alérgenos podem ser alterados irreversivelmente e inativados por esse processo. Além disso, o extrato reconstituído após a liofilização deverá conter agentes estabilizadores como o soro de albumina humana, glicerol, fenol ou ácido  $\epsilon$ -aminocapróico para preservar a sua integridade (Weber, 1989).

#### **2.4.1. Caracterização *In vivo* dos Extratos Alergênicos**

A alergenicidade de um extrato pode ser avaliada por testes cutâneos de puntura (“prick-test”) ou por teste intradérmico, sendo que ambos envolvem a formação de pápulas, características da sensibilização atópica. Pacientes são considerados sensíveis a um certo extrato alergênico se a pápula for formada em seguida ao teste e a mesma apresentar um diâmetro de no mínimo 4 mm (Menezes, 1995).

#### **2.4.2. Caracterização *In vitro* dos Extratos Alergênicos**

Os métodos *in vitro* tais como “RAST”, “ELISA”, “Dot-Blotting” e “Western blotting” (“Immunoblotting”) detectam o anticorpo IgE, presente no soro dos pacientes atópicos, contra os alérgenos específicos dos extratos.

O teste de “Dot-blotting”, assim como o “ELISA”, é um ensaio que pode ser empregado preliminarmente a análise de “Immunoblotting” e tem como finalidade identificar entre os soropositivos aqueles que são mais reativos com os antígenos presentes nas amostras de extratos. Dessa forma, é feita a triagem dos soros mais reativos que serão submetidos à análise posterior de “Immunoblotting” para identificação especificamente das frações protéicas (antígenos) mais reativas presentes nos extratos.

A análise de “Immunoblotting” envolve inicialmente a separação de antígenos em gel de poliacrilamida e, posteriormente, a transferência destes antígenos para uma membrana de nitrocelulose. As posições dos antígenos na membrana são uma reprodução fiel das suas posições no gel. As bandas dos antígenos na membrana podem ser identificadas usando anticorpos específicos.

Após a exposição dos antígenos aos anticorpos presentes no soropositivo dos indivíduos atópicos, é adicionado um segundo anticorpo (conjugado enzimático, anti-IgE-humana) para detectar a banda que contém o antígeno-anticorpo. A enzima causa uma reação colorida localizada que revela a posição da banda do antígeno (Paul, 1999).

Menezes (1995) caracterizou os extratos brutos de *D. monoceras*, obtidos por FSM, por meio dos testes cutâneos de puntura em 248 pacientes obtendo reações atópicas positivas em 13 pacientes (5,2% dos casos). Estes 13 pacientes foram então submetidos a testes intradérmicos apresentando todos reação positiva. Os soros desses pacientes foram então submetidos a ensaios de "Western blotting" onde foram identificadas 3 proteínas com potencial alergênico, de massas moleculares de 14,4, 36 e 60 kDa. Os extratos brutos haviam sido inicialmente fracionados por SDS-PAGE obtendo-se 7 bandas de proteínas de massa molecular 67,0; 60,0; 36,0; 30,0; 20,1; 18,5 e 14,4 kDa. Essas frações foram separadas por eletroeluição e inoculadas em camundongos Balb/c, para verificar a capacidade de indução de anticorpo IgE. O conteúdo de IgE foi detectado pelo teste *in vivo* de anafilaxia cutânea passiva (ACP) em ratos Wistar, sendo que duas frações de massas moleculares de aproximadamente 14,4 e 36 kDa tiveram títulos de ACP de 320 e 80 respectivamente.

Marques (1997) obteve em laboratório extratos brutos de *Pleurotus ostreatus* (cogumelo comestível) após crescimento de 40 dias da fase vegetativa e extratos de propágulos. Análise de proteínas por SDS-PAGE revelou a presença de proteínas na faixa de 15,6 a 112 kDa. A caracterização dos extratos foi realizada com testes cutâneos de puntura em pacientes com alergias respiratórias, obtendo reações positivas em 10% dos casos. Os soros dos indivíduos positivos foram submetidos à reação de "Western blotting" para verificação de presença de IgE específica, havendo reatividade com dois antígenos em duas bandas de massas moleculares de aproximadamente 76 e 101 kDa.

Yunginger (1980) obteve uma fração protéica de grande potencial alergênico a partir de extratos de *Alternaria alternata*. Essa fração foi denominada de Alt I e apresenta proteínas e carboidratos em sua composição, que variam de

10 a 150 kDa. Essa fração foi obtida por meio de precipitação seqüencial com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel com Sephadex G-100. A fração Alt I foi caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e por focalização isoelétrica, onde foram reveladas 12 bandas de proteínas de ponto-isoelétrico entre 4,0 e 4,5. A análise *in vitro* da fração obtida foi feita por meio de "RAST".

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos o material e as metodologias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. A seção de metodologia foi subdividida em quatro tópicos, procurando-se agrupar as metodologias comuns referentes a cada capítulo de resultados. Os tópicos são: I) Métodos Analíticos, II) Fermentação em Estado Sólido: Otimização e Cinética, III) Recuperação das Proteínas do Extrato Bruto e IV) Caracterização dos Extratos com Potencial Alergênico.

#### 3.1. Material

Foi utilizada a cepa ICB USP K-1-16 do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. Essa cepa é a mesma que foi utilizada no trabalho de Menezes et al. (1995), sendo gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Walderez Gambale, do Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

Como substratos foram testados os farelos de milho e de trigo (Moinho Paulista Ltda) e o bagaço de cana de açúcar (resíduo obtido de comerciantes da região de Campinas - SP). Para a composição dos nutrientes foram usados o  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ , dextrose e  $\text{FeSO}_4$ , da Synth (Brasil), o KCl e o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , da Ecibra (Brasil), a maltose, da Difco (Brasil), a peptona de farinha de soja obtida por digestão papaínica, o  $\text{CuSO}_4$  e o  $\text{ZnSO}_4$ , da Merck (Alemanha).

Para a recuperação das proteínas dos extratos brutos, além da precipitação com solventes orgânicos (etanol e acetona, da Merck, Brasil) e com sulfato de amônio (Synth, Brasil), foi usado o gel Sephadex G-25 (da Amersham-Pharmacia, EUA) e a membrana de diálise "Dialysis tubing, benzoylated" (da

Sigma, EUA). Para a ressolubilização das proteínas precipitadas, foi usado tampão fosfato de sódio, preparado a partir de fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico heptahidratado, da Synth (Brasil). Ainda, para a remoção de polifenóis (por meio de adsorção), foram testados o Dowex 1x8-100 (resina de troca aniônica altamente básica, efetiva na faixa de pH de 0 a 14), a Amberlite XAD-4 (resina macrorreticular não iônica que adsorve espécies iônicas através de interações polares e hidrofóbicas) e o PVPP (polivinilpolipirrolidona), da Sigma (EUA). Para o fracionamento das proteínas por cromatografia de permeação em gel, foram testados os géis Sephadex G-100, G-150 e G-200, da Pharmacia Biotech (EUA) e, para a curva de calibração, foram usadas as proteínas albumina de soro bovino,  $\beta$ -lactoglobulina e IgG de soro bovino, da Sigma (EUA).

Para os métodos analíticos foram usados os seguintes reagentes: Dye Reagent Concentrate, da Biorad (Brasil); BSA, Conjugado peroxidase Anti-IgE humana, ácido bicinconínico, ácido 3,5-dinitrosalicílico e D-catequina, da Sigma (EUA);  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , sacarose, tartarato duplo de sódio-potássio anidro, Tween-20, sulfatos de níquel e de cobre, da Synth (Brasil); SDS, Tris, glicina e poliacrilamida, da Pharmacia Biotech (EUA).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Métodos Analíticos**

**Determinação do conteúdo de biomassa:** A biomassa de *D. monoceras* obtida na FES foi estimada através da determinação do conteúdo total de proteínas do extrato. Para isso foi usado o ensaio de Bradford (1976), o qual utiliza o reagente "Dye Reagent Concentrate" (da BioRad). Este reagente é preparado a partir do corante azul de "Coomassie" que apresenta uma absorção máxima a 465 nm, porém, quando ligado a proteínas, a absorção é deslocada para 595 nm. O método é baseado na reação da proteína com o corante em meio ácido formando um complexo de coloração azul. Pode ser conduzido como ensaio padrão e como microensaio, dependendo da concentração da amostra a ser analisada. Para o ensaio padrão, pode apresentar faixas de sensibilidade de 0,2 a 0,9 mg/mL (para

BSA, como proteína padrão) e 0,2 a 1,5 mg/mL (para IgG, como proteína padrão). Inicialmente o reagente foi diluído (1:4) e filtrado em papel Whatman 1. Para cada 30  $\mu$ L de amostra foi então adicionado 1,5 mL do reagente diluído, sendo após 5 min efetuadas as leituras de absorvância em 595 nm.

O microensaio pode apresentar faixas de sensibilidade de 1,2 a 10,0  $\mu$ g/mL (para BSA, como proteína padrão) e 1,2 a 25  $\mu$ g/mL (para IgG, como proteína padrão). Para 800  $\mu$ L de amostra, foram adicionados 200  $\mu$ L do reagente concentrado (sem filtrar) e efetuadas as leituras de absorvância em 595nm.

O ensaio do ácido bicinoninico (BCA), o qual baseia-se na redução dos íons cobre em decorrência da formação de um complexo com as ligações peptídicas das proteínas, em pH alcalino, e que, na presença do ácido bicinonínico, forma coloração púrpura proporcional à concentração de proteínas em solução, foi testado como método alternativo para determinação de proteínas. O kit BCA, fornecido pela Sigma (EUA), é composto por duas soluções: solução de ácido bicinonínico e uma solução de sulfato de cobre penta-hidratado. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque, adicionando a 1 parte da solução de sulfato de cobre penta-hidratado, 50 partes da solução de BCA. Em seguida, misturou-se, a 1 mL da solução estoque, 50  $\mu$ L da amostra. A mistura foi aquecida por 15 min a 60°C. A absorvância foi medida a 562 nm, tendo a solução estoque como referência. A curva padrão foi feita com BSA, na faixa de 0,2 a 1,0 mg/mL.

**Determinação do teor de umidade (U):** O teor de umidade em base úmida das amostras do meio fermentado foi determinado por método gravimétrico e foi baseado na perda de massa após secagem em estufa, à temperatura de 105 °C, por 3h ou mais, até massa constante, medido em balança analítica após resfriamento das amostras em dessecador.

**Determinação da atividade de água ( $a_w$ ):** A atividade de água dos meios fermentados foi medida através do equipamento AquaLab CX-2 – Decagon. O princípio de funcionamento do aparelho se dá através da determinação da umidade relativa de equilíbrio do ar, quando em presença da amostra sólida.

**Determinação do pH do meio:** O pH do meio foi medido de forma indireta. Foi feita uma suspensão da amostra de meio sólido em água a uma razão 1:10 (m/v) em frascos Erlenmeyer e, após, medido o pH em pHmetro da marca Oakton.

**Determinação do conteúdo de polifenóis:** A concentração de polifenóis foi determinada segundo o método azul da Prússia descrito por Price e Butler (1977). A 0,2 mL de extrato adicionou-se 1,4 mL de água deionizada (relação de diluição 1:8), agitou-se e adicionou-se 80  $\mu$ L de  $\text{FeCl}_3$  0,1M em HCl 0,1N, agitou-se e adicionou-se em seguida 80  $\mu$ L de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,008M, agitou-se e mediu-se a absorbância a 720 nm após 10 min. Os resultados foram expressos em termos de concentração de polifenóis tomando como padrão soluções diluídas contendo D-catequina (Sigma).

**Determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR):** O método de determinação da concentração de açúcares redutores usado neste trabalho foi baseado no método proposto por Miller (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g/L de açúcar redutor expresso como glicose.

A análise foi realizada misturando-se 0,1 mL da amostra, convenientemente diluída, com 0,1 mL do reagente DNS e levando ao banho-maria à 100°C por 5 min. Após o resfriamento adicionou-se 1,6 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio anidro à 12,3 g/L. Mediu-se, então, a absorbância em espectrofotômetro à 540 nm. O branco foi realizado pela reação de 0,1 mL de água deionizada substituindo a amostra. A curva padrão de glicose, na faixa de 0,1 a 1,0 g/L, foi construída nas mesmas condições.

O reagente DNS foi preparado obedecendo a seguinte sequência: 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de NaOH, 1416 mL de água destilada, dissolver à quente, 7,6 mL de fenol (fundido à 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

**Determinação do conteúdo de açúcares redutores totais (ART):** Para a medida dos açúcares redutores totais, uma alíquota de 2,0 mL da amostra, convenientemente diluída, foi misturada com 2,0 mL de HCl 2N, sendo a hidrólise ácida dos carboidratos realizada em banho à 100°C por 5 min. Após resfriamento, a mistura foi neutralizada pela adição de 2,0 mL de NaOH 2N e os açúcares redutores quantificados pelo método do reagente DNS, como descrito no item anterior. O branco foi realizado pela reação de 2,0 mL de água deionizada substituindo a amostra. A curva padrão para a análise de ART foi feita com soluções de sacarose com concentrações na faixa de 0 a 3,0 g/L, sendo construída nas mesmas condições de hidrólise e neutralização (Miller, 1959).

### **3.2.2. Fermentação em Estado Sólido: Otimização e Cinética**

São apresentadas neste tópico as metodologias utilizadas para o preparo do inóculo, o estudo de acompanhamento micromorfológico do fungo (ao longo do seu crescimento), o modo de condução da fermentação, a metodologia de otimização utilizada e o modo de obtenção do extrato bruto.

**Preparo do inóculo:** A cepa mãe de *D. monoceras* em tubo com meio inclinado era repicada em 12 tubos de ensaio contendo meio de ágar-batata (PDA) e mantida em estufa a 25°C. A preservação dos repiques era feita utilizando óleo mineral (Nujol) previamente esterilizado, sobre o meio sólido. Este método mostrou-se mais eficaz na manutenção da viabilidade dos fungos quando comparado à liofilização. A partir destes tubos eram feitos sucessivos repiques a cada 6 meses. Para cada fermentação, o inóculo era preparado a partir de 1 tubo.

Para o preparo do inóculo, a cultura foi propagada à 25°C em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 600 mL de meio inclinado de ágar-Czapeck modificado por Yunginger et al. (1980), por um período de 7 a 14 dias. Após esse tempo, o micélio e propágulos (esporos) eram suspensos em água destilada estéril e raspados, assépticamente, com bastão de vidro. A concentração celular no inóculo foi determinada através de curva-padrão de massa celular seca, sendo as absorbâncias medidas a 550 nm para as diversas diluições de massa celular.

O meio de cultura ágar-Czapeck usado neste trabalho, modificado por Yunginger et al. (1980), tinha a seguinte composição: 2,0 g de NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g de KCl; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub> ; 15,0 g de maltose; 15,0 g de dextrose; 10,0 g de peptona bacteriológica; 15,0 g de ágar-ágar e 1000 mL H<sub>2</sub>O destilada. A esse meio foi ainda adicionado 40 g/L de substrato sólido para adaptação prévia do fungo ao meio final de fermentação. O meio de cultura foi então autoclavado a 121°C, durante 20 min.

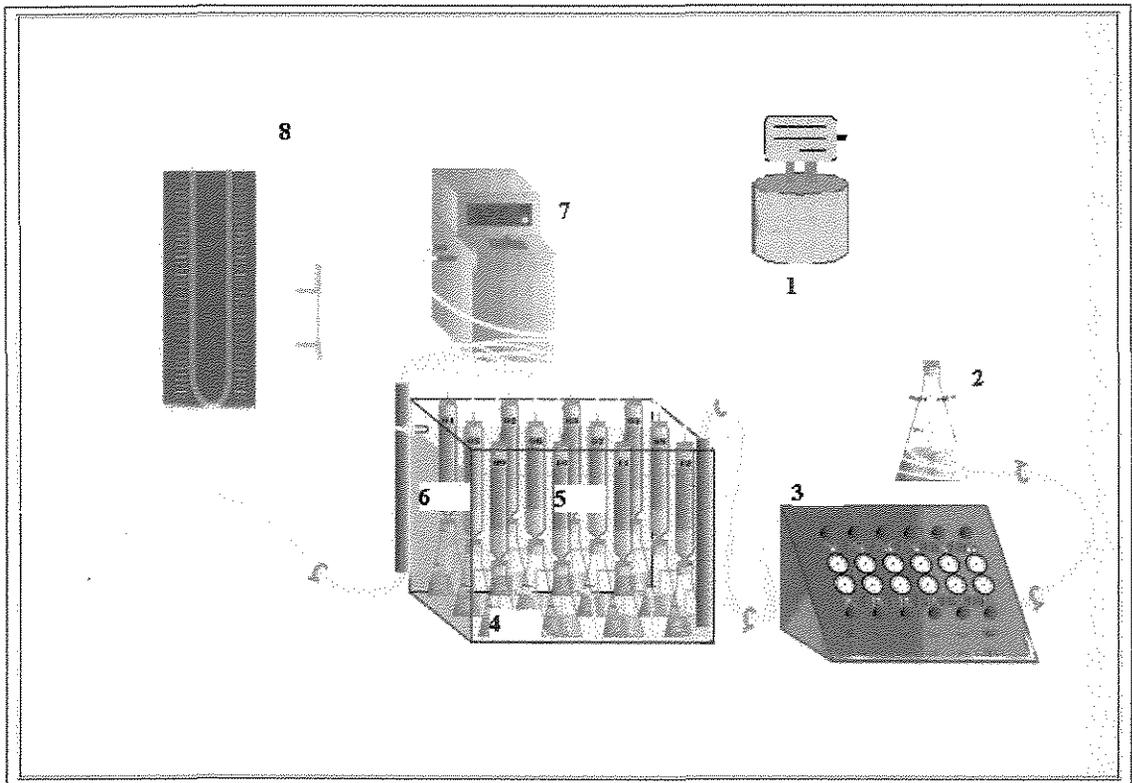
**Estudo micromorfológico do fungo:** O estudo micromorfológico do *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* foi realizado por meio de microcultivo em lâmina contendo meio de ágar-Czapeck modificado por Yunginger et al (1980), sendo as observações feitas em microscópio após 4, 7, 10, 14, 18 e 21 dias. Nessa técnica de microcultivo, uma pequena porção do ágar-Czapeck (uma tira de 1x1 cm, com 2 mm de espessura) é posicionada sobre a lâmina de vidro sendo então agregados pequenos fragmentos do fungo, com auxílio de uma alça de platina, nas quatro bordas laterais da tira. Após, é colocada uma lamínula sobre a tira de ágar-Czapeck inoculada, sendo o conjunto então colocado dentro de uma placa de Petri, contendo pequena quantidade de água destilada estéril de modo a saturar a atmosfera que envolve a lâmina. É feita a incubação em estufa de cultura a 25°C, sendo toda a operação realizada sob condições assépticas. Foram preparadas 6 placas de Petri contendo as lâminas com os meios inoculados, sendo uma placa retirada para cada dia especificado para a observação em microscópio. Essa observação é feita diretamente na lamínula (sem o ágar), uma vez que o fungo, ao crescer, fica impregnado em grande quantidade na mesma, permitindo boas condições de visualização do fungo, a qual fica mais facilitada ainda pela adição do corante azul de algodão (diluição 1:3).

**Substratos e nutrientes:** Além dos farelos de trigo e milho, foi utilizada a polpa do bagaço de cana de açúcar, a qual foi seca em estufa a 50°C. Todos os substratos foram moídos e classificados por meio de peneiramento, obtendo-se,

para cada substrato, três frações granulométricas, retidas nas peneiras: Tyler 42 (0,35 mm), Tyler 28 (0,59 mm) e Tyler 20 (0,84 mm). As três frações de substrato foram estocadas a 4°C em quantidade suficiente para manter-se a uniformidade de utilização dos mesmos ao longo dos sucessivos experimentos. Além dos substratos (bagaço de cana de açúcar e farelos de milho e trigo), foi determinada também a composição adequada de nutrientes no meio, contendo fontes de nitrogênio, carbono, fósforo, potássio, magnésio e enxofre, baseado no meio Czapeck, usado por Menezes (1995).

**Cultivo em estado sólido:** Para a fermentação em meio sólido os constituintes dos meios (substrato e nutrientes) foram inicialmente pesados e misturados uniformemente em embalagens flexíveis de polipropileno. As embalagens contendo os meios foram seladas e autoclavadas a 121°C, por 20 min. Após resfriamento, o meio teve sua umidade ajustada com água estéril e seu pH corrigido com solução de NaOH 0,5 N ou HCl 0,5 N, sendo após isto inoculado com a suspensão de microrganismos previamente padronizada (Costa, 1996; Hasan, 1998). A inoculação foi realizada próxima a chama do bico de Bunsen, para prevenir contaminação. Após, os meios inoculados foram transferidos para os biorreatores (colunas de Raimbault), a temperatura do banho termostático ajustada para 25°C, sendo o tempo de fermentação de no mínimo 7 dias.

A fermentação em estado sólido foi conduzida em biorreatores de leito fixo do tipo colunas de Raimbault. A instalação era composta basicamente dos sistemas de reação, saturação, medida e controle da vazão de ar, como pode ser observado no esquema da Figura 3.1. O sistema de reação era composto por um conjunto de doze colunas sendo cada coluna de 200 mm de comprimento, 30 mm de diâmetro e volume útil de aproximadamente 85 mL de substrato sólido úmido. As colunas eram localizadas dentro de um tanque cuja temperatura da fermentação era controlada por circulação de água de um banho termostatizado.



**Figura 3.1.** Esquema de montagem do processo FES em colunas de Raimbault, onde: 1) compressor de ar odontológico, 2) distribuidor e umidificador primário de ar, 3) conjunto de válvulas de controle de vazão de ar, 4) conjunto de umidificadores secundários, 5) conjunto de colunas de Raimbault, 6) tanque contendo doze colunas imersas, 7) banho termostatizado para controle da temperatura das colunas, 8) capilar medidor de vazão acoplado a manômetro inclinado em forma de U (adaptado de Moraes, 1999).

A Figura 3.2 apresenta os detalhes construtivos do reator de coluna. O sistema de saturação era constituído de um distribuidor-umidificador primário (Figura 3.3) e de um conjunto de doze umidificadores secundários (Figura 3.4). O ar proveniente de um compressor odontológico entrava no distribuidor primário através de um tubo de vidro e era borbuhlado em 500 mL de água destilada. A saída do ar era distribuída para doze tubos de vidro soldados próximos à extremidade superior do distribuidor. Os umidificadores secundários, os quais eram encaixados na parte inferior as colunas de Raimbault, eram frascos Erlenmeyers de 200 mL, dotados de entrada lateral e borbujador. O ar alimentado era borbuhlado em 100 mL de água destilada.

**Otimização das condições da fermentação:** A otimização das condições de fermentação foi feita por planejamento estatístico de experimentos, o qual foi dividido em duas etapas:

- Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-2}_{III}$  de Resolução 3
- Metodologia de Superfície de Resposta.

Na primeira etapa foi verificado, através de planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$  (de Resolução 3), os efeitos de 5 variáveis sobre a produtividade do processo fermentativo. As variáveis estudadas foram: umidade do meio (U), pH do meio, concentração inicial de inóculo ( $C_0$ ), vazão de ar (Q) e diâmetro de partícula do substrato ( $d_p$ ). Nesta etapa, as variáveis menos significativas foram descartadas.

A etapa de otimização do processo por Metodologia de Superfície de Resposta consistiu das seguintes fases:

- Primeiro Planejamento Composto Central
- Deslocamento de Máxima Inclinação
- Segundo Planejamento Composto Central

Em todos os casos, a resposta estudada foi a produtividade (P) do processo fermentativo, a qual foi definida como a concentração de proteína total obtida para 7 dias fermentação, ou seja,

$$P = (C_{prot.,tf} - C_{prot.,ti}) / 7$$

onde,

$P$  = Produtividade (mg proteína/gms/dia),

$C_{prot.,tf}$  = Concentração de proteína em  $t_f = 7$  dias (mg proteína/gms),

$C_{prot.,ti}$  = Concentração de proteína em  $t_i = 0$  (mg proteína/gms).

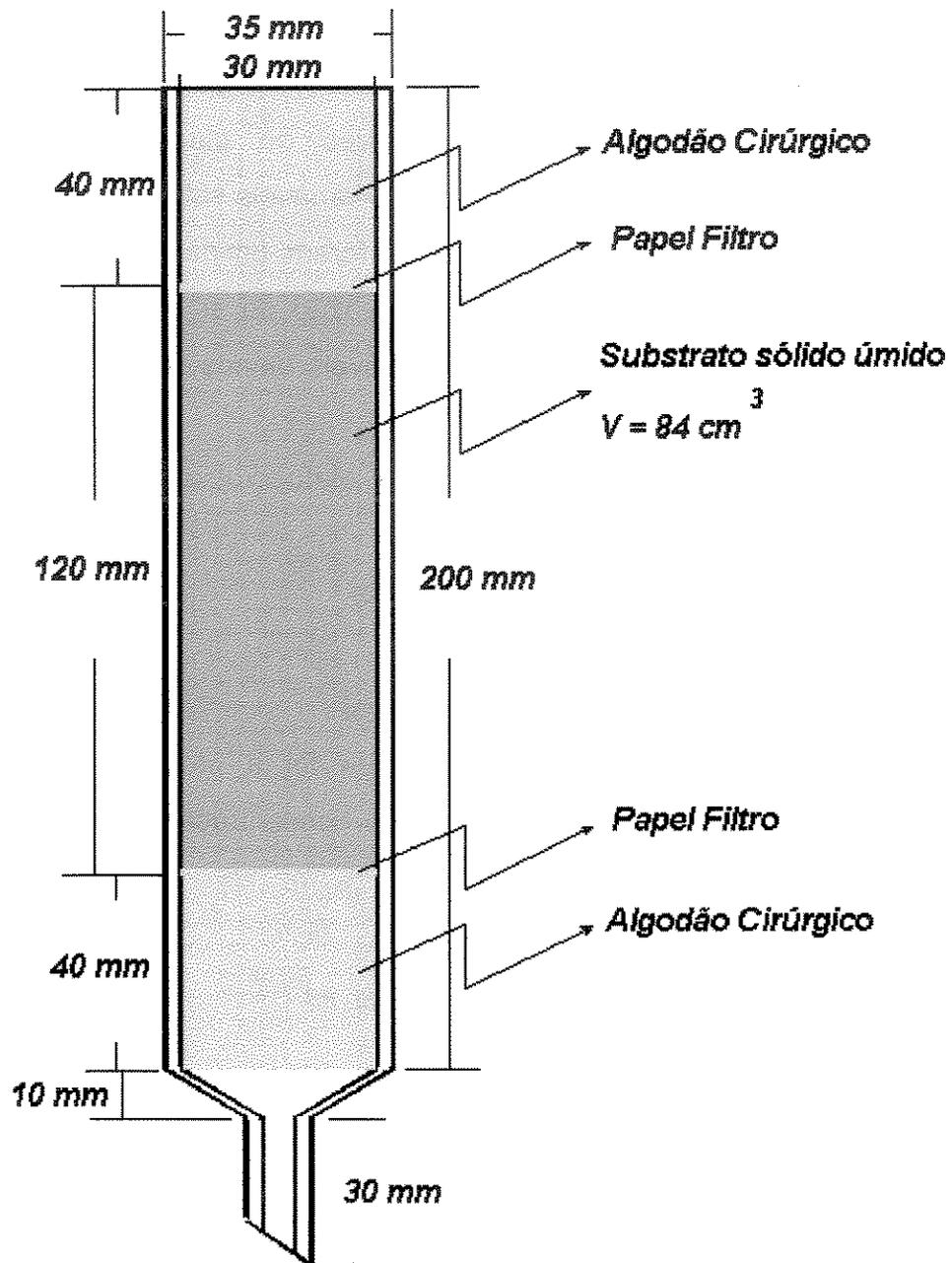
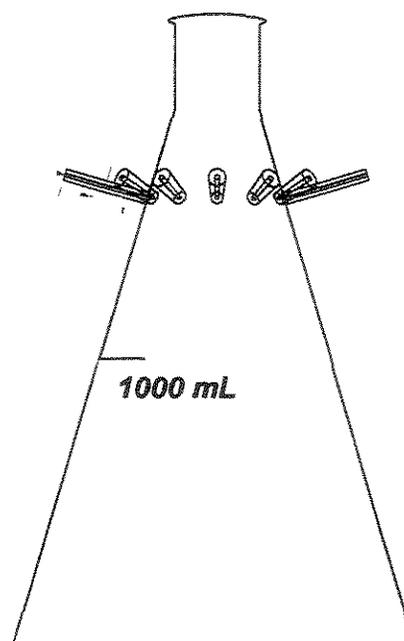
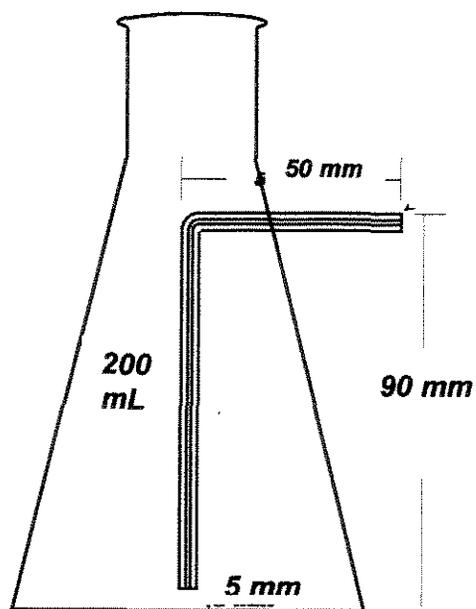


Figura 3.2. Esquema das colunas de Raimbault (adaptado de Moraes, 1999).



**Figura 3.3.** Esquema do distribuidor e umidificador de ar primário (adaptado de Moraes, 1999).



**Figura 3.4.** Esquema do umidificador de ar secundário (adaptado de Moraes, 1999).

Para a execução de um fatorial completo  $2^5$  seriam necessários 32 experimentos. Porém, com o uso de um planejamento fatorial fracionário do tipo  $2^{5-2}_{III}$ , conforme descrito por Box et al. (1978), o número de experimentos foi reduzido para 8 ensaios, sendo acrescentados mais três ensaios (triplicata) para o ponto central.

Foi usado o programa computacional STATISTICA (versão 5.0, da StatSoft Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos a Análise de Variância (ANOVA). Os efeitos são descritos como a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior de uma determinada variável. Para se determinar a influência de um efeito no sistema, compara-se a magnitude do valor deste efeito ao erro experimental.

A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições da FES e para fornecer um modelo matemático adequado para a produtividade do processo. A modelagem foi feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais do tipo Composto Central. Com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada, usou-se o deslocamento ao longo do caminho de máxima inclinação do modelo especificado, que é a trajetória na qual a resposta (produtividade) variou de forma mais pronunciada.

**Obtenção do extrato fúngico bruto:** O extrato bruto de *D. monoceras* foi obtido conforme metodologia utilizada por Menezes et al. (1995), a qual foi adaptada para as condições da FES e baseada nos estudos de Saraiva (2001), da seguinte forma:

- 1) Ao término da fermentação, a massa fermentada foi seca em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h e, após, pesada em balança analítica;
- 2) Triturou-se o meio fermentado seco com água deionizada (na proporção 1:15) em almofariz, sendo após a mistura transferida para frasco Erlenmeyer e incubada por 16h a  $30^{\circ}\text{C}$  em agitador recíproco a 130 rpm. O pH da extração foi previamente ajustado em 9,0 por adição de

NaOH 1 N ou HCl 1 N. Em seguida o extrato foi filtrado, centrifugado a 10.000xg durante 15 min e o sobrenadante obtido (extrato bruto) conservado a 4°C.

### 3.2.3. Recuperação das Proteínas do Extrato Bruto

O extrato bruto apresenta, em sua composição, os mais variados elementos químicos que, por sua vez, podem interferir nos testes de alergenicidade *in vivo* e *in vitro*. Em alguns casos, os extratos brutos não possuem especificidade e podem induzir positividade nos pacientes. Assim sendo, as proteínas, que são os principais componentes alergênicos, devem ser recuperadas do extrato bruto e os demais contaminantes devem ser removidos.

Visa-se, portanto, neste tópico, apresentar as metodologias para a obtenção de extrato protéico, a partir da recuperação das proteínas presentes no extrato bruto e a remoção de sais e polifenóis. O extrato protéico obtido foi denominado de extrato com potencial alergênico, o qual foi usado posteriormente para fins de caracterização alergênica.

**Obtenção do extrato com potencial alergênico:** As proteínas foram recuperadas do extrato bruto através de precipitações com uso de solução saturada de sulfato de amônio (SAm), ou com etanol (EtOH), ou com precipitações sucessivas de EtOH e acetona. As concentrações finais do agente precipitante com o extrato foram de 70% (v/v) para o SAm (Harris, 1995), 70% (v/v) para o EtOH e 50% (v/v) para a acetona (Pereira, 1999).

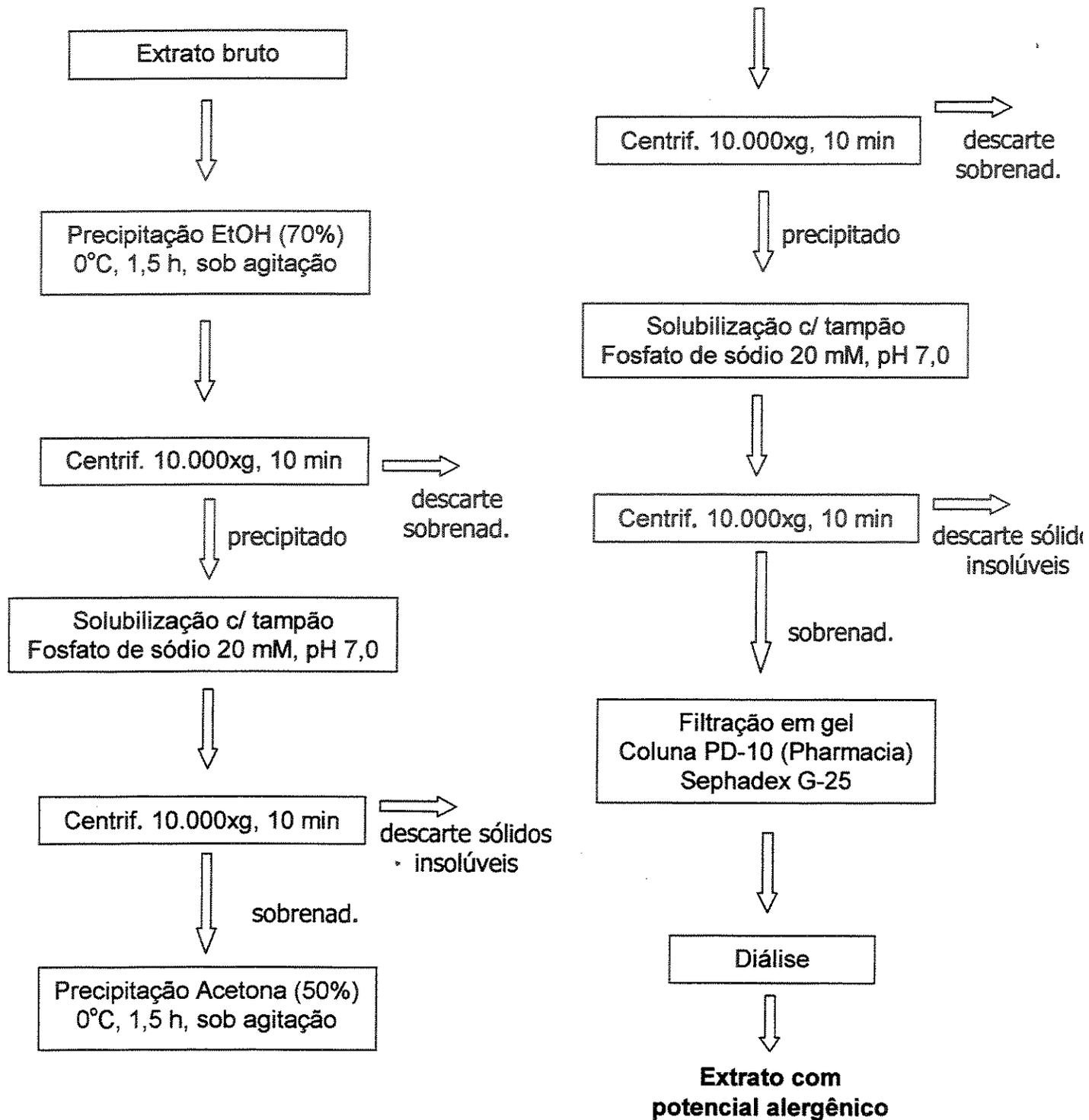
A precipitação das proteínas por SAm ocorre devido ao aumento provocado na força iônica ("salting-out") da solução. A precipitação por solventes orgânicos miscíveis em água (EtOH e acetona) ocorre devido a diminuição provocada na constante dielétrica da solução e, por consequência na força de solvatação, o que diminui a solubilidade das proteínas permitindo a agregação das mesmas através de atrações eletrostáticas (Harris, 1995).

O esquema da Figura 3.5 ilustra as etapas de precipitação mediante adição sucessiva de solventes orgânicos (EtOH e acetona), com posterior filtração em

gel e diálise para obtenção do extrato com potencial alergênico contendo as proteínas precipitadas e teor reduzido de sais e polifenóis. A precipitação com SAM foi similar, porém ocorreu em uma etapa apenas. Inicialmente o extrato bruto foi mantido a 0°C em banho de gelo, sendo, após, feitas 3 adições sucessivas do agente precipitante, mantido a 0°C, até a concentração final pré-determinada, sob constante agitação, por um período final de 1,5 horas. Para cada 50 mL de extrato bruto, foram adicionados 117 mL de EtOH (p.A.), ou 50 mL de acetona (p.A.), ou 117 mL de solução saturada de SAM. Após a primeira precipitação, as proteínas foram centrifugadas e depois redissolvidas em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, sendo esta solução centrifugada para remoção de sólidos insolúveis. Após a segunda precipitação (acetona 50%), as proteínas foram recuperadas por centrifugação e depois redissolvidas em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, e a solução obtida também centrifugada.

O processo de precipitação de proteínas visava também promover a remoção parcial de sais e polifenóis presentes no extrato bruto. Para uma remoção mais completa destes sais e polifenóis, realizou-se uma cromatografia de permeação em gel por meio de coluna contendo Sephadex G-25. Em seguida foi feita uma diálise no líquido eluído da coluna.

A membrana utilizada na diálise, em forma de tubo, serve para separar compostos com massa molecular menores ou igual a 1200 Da de compostos com massa molecular maior que 2000 Da. Assim, não haveria perdas de proteínas com potencial alergênico de baixa massa molecular. Para a diálise foi usado tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, na proporção 1:50 de solução a dialisar / solução dialisante, sendo feitas 3 trocas do mesmo em intervalos de 24h. Após diálise, o extrato com potencial alergênico obtido foi estocado a 4°C.



**Figura 3.5.** Diagrama esquemático da recuperação das proteínas do extrato bruto por precipitação mediante adição sucessiva de solventes orgânicos (EtOH e acetona), com posterior filtração em gel e diálise, para obtenção do extrato com potencial alergênico contendo as proteínas precipitadas e teor reduzido de sais e polifenóis.

**Remoção de sais e polifenóis:** Visando uma remoção dos polifenóis residuais, após a precipitação das proteínas, foram testados os processos de adsorção em resinas. Os polifenóis foram removidos por meio da técnica de adsorção em sistema de tanque agitado usando as resinas Dowex 1x8, XAD-4 e PVPP (Fernández-Lahore et al, 1998). Cada resina foi colocada em uma seringa de plástico (volume de 3 mL de capacidade) equipada com um filtro para conter a resina. A resina, uma vez colocada na coluna, foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. As colunas foram mantidas sob agitação no equipamento cujo esquema é mostrado na Figura 3.6, o qual simula um tanque agitado. Foram usadas as concentrações de 2% (m/v); 2,5% (m/v) e 1,5% (m/v), respectivamente para as resinas Dowex 1x8, XAD-4 e PVPP.

Após o condicionamento da resina, removeu-se o tampão de condicionamento e, então, adicionou-se, a cada coluna com resina, 1 mL do extrato com potencial alergênico com teor inicial conhecido de proteínas e polifenóis. As colunas foram mantidas sob agitação à temperatura de 4°C (em incubadora do tipo “Shaker”) por 12 h (Fernández-Lahore et al, 1998). Após a adsorção, passou-se a suspensão para recipientes do tipo “Eppendorf” e centrifugou-se. Foram analisados os teores de polifenóis e de proteína total no sobrenadante.

Para a remoção de sais e polifenóis por ultrafiltração foi usada uma célula da Amicon (volume útil de 70 mL). Foi introduzido um volume de 10 mL de extrato com potencial alergênico na célula e feitos 3 ciclos de ultrafiltração usando 40 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, para cada ciclo. Foi usada membrana de celulose “YM Series” (45 mm de diâmetro), de massa molecular de corte de 10.000 Da, da Millipore (EUA).

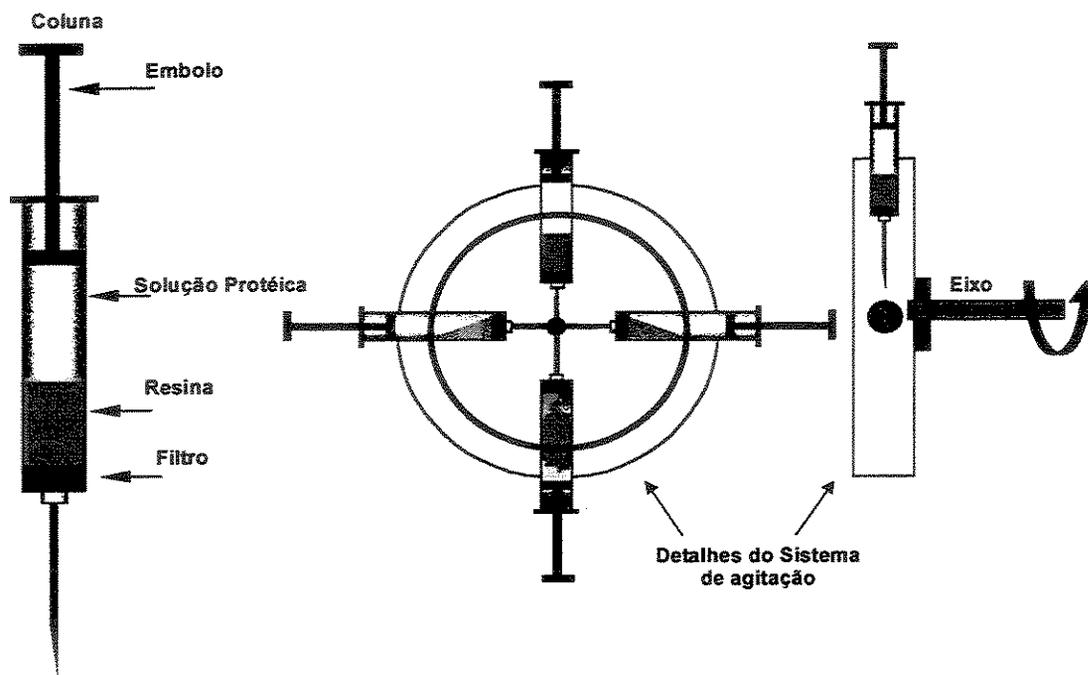


Figura 3.6. Esquema do sistema de agitação por tombamento (tanque agitado) para a adsorção de polifenóis (adaptado de Veredas, 2000).

### 3.2.4. Caracterização dos Extratos com Potencial Alergênico

**Identificação das proteínas:** A identificação das proteínas nos extratos com potencial alergênico foi feita pela determinação de suas massas moleculares por eletroforese SDS-PAGE, sendo utilizado o gel de 15% de poliacrilamida para a determinação das proteínas de massas moleculares na faixa de 14,4 a 94 kDa e o gel de 10% de poliacrilamida para a determinação mais precisa das proteínas de massas moleculares na faixa de 53 a 212 kDa, de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). Para o gel de 15% foi usado marcador de baixa massa molecular, da Pharmacia (EUA), o qual contém as seguintes proteínas e enzimas padrão: Fosforilase b (94 kDa), Albumina (67 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (20,1 kDa) e Alfa-Lactalbumina (14,4 kDa).

Para o gel de 10% foi usado marcador de alta massa molecular, da Pharmacia (EUA), o qual contém as seguintes proteínas e enzimas padrão: Miosina (212 kDa),  $\alpha_2$ -Macroglobulina (170 kDa),  $\beta$ -Galactosidase (116 kDa), Transferrina (76 kDa) e Desidrogenase glutâmica (53 kDa).

As proteínas das amostras foram desnaturadas por aquecimento à 100°C na presença de SDS e reduzidas na presença de β-mercaptoetanol. As eletroforeses foram realizadas utilizando-se o Sistema “Mini-Protean II” da Bio-Rad (1988), aplicando, a partir de uma fonte independente, uma tensão de 190 volts, por 45 min. A revelação das proteínas no gel foi feita com nitrato de prata de acordo com o protocolo descrito por Morrissey (1981).

A primeira raia de cada gel foi reservada para o marcador de massa molecular (MM) e as demais raias para as amostras de extrato de 0, 48, 96, 144, 192 e 240 h de fermentação previamente desnaturadas e reduzidas. Foi aplicado, em cada raia, 15 µL de amostra devidamente diluída, de modo a ter-se uma massa final aplicada de 1µg de proteína para cada raia. Para o marcador, foi aplicado um volume de 12 µL. Foram usadas as mesmas condições, tanto para os extratos com potencial alergênico obtidos por precipitação com EtOH como para os obtidos por precipitação com SAM.

A identificação das massas moleculares das proteínas foi feita a partir do uso da curva de calibração de massas moleculares das proteínas do marcador. Ou seja, foram graficados os logaritmos decimais das massas moleculares das proteínas do marcador,  $\log_{10}(\text{MM})$ , com os valores de  $R_f$  (migração relativa) que correspondem, para cada proteína do marcador, a relação entre a distância percorrida pela mesma após o término da corrida eletroforética e a distância total percorrida no gel, até a frente corante.

**Determinação do ponto isoeletrico das proteínas:** A determinação do ponto isoeletrico das proteínas presentes no extrato com potencial alergênico foi feita por focalização isoeletrica (IEF) em equipamento PhastSystem, da Pharmacia (EUA), segundo protocolo de preparação e revelação do fabricante (“Development Technique File No. 210”). O gel utilizado foi o “PhastGel<sup>®</sup> IEF gradient media 3-9” e o marcador “Pharmacia LKB Calibration kit IEF (pH 3-10)”, o qual contém o seguinte espectro de proteínas e enzimas padrão:

pl (24°C ± 1,5°C)

- Amiloglicosidase.....3,50
- Inibidor de tripsina de soja.....4,55
- $\beta$ -lactoglobulina A.....5,20
- Anidrase Carbônica B bovina.....5,85
- Anidrase Carbônica B humana.....6,55
- Mioglobina ácida de cavalo.....6,85
- Mioglobina básica de cavalo.....7,35
- Lecitina ácida de lentilha.....8,15
- Lecitina média de lentilha.....8,45
- Lecitina básica de lentilha.....8,65
- Tripsinogênio.....9,30

**Testes cutâneos:** Foram realizados 33 testes cutâneos no total, incluindo os pacientes com sintomas de alergia respiratória do ambulatório do Hospital das Clínicas e os voluntários da Faculdade de Engenharia Química, da Unicamp, sendo os testes coordenados pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner. O teste cutâneo por punctura de leitura imediata foi feito na região volar do antebraço (utilizando punctores descartáveis estéreis), com extrato com potencial alergênico estéril, sendo testadas amostras obtidas por precipitação com etanol e com sulfato de amônio. O teste foi realizado de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia, da Faculdade de Ciências Médicas, da UNICAMP, segundo a técnica de Pepys (1975), utilizando como controle positivo de reação cutânea local (pápula) histamina 10 mg/ml e como controle negativo tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH 7,0 (solução usada como veículo do extrato com potencial alergênico). Os resultados foram avaliados 20 minutos após a aplicação e considerados positivos quando a pápula cutânea ao teste foi igual ou maior que 3 mm. O controle negativo foi definido como ausência de resposta cutânea ao teste. No caso em que houve pequena reação local com aparecimento de pápula, esta medida foi subtraída do controle positivo e da reação cutânea ao antígeno. Estavam disponíveis medidas para tratar as possíveis

reações adversas ao teste, como a presença de médico, materiais e drogas indicadas ao tratamento de reações alérgicas agudas.

**Análise de “Dot-blotting”:** Os testes de “Dot-blotting” foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LICA), da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), da UNICAMP e coordenados pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner. Nos testes, foram usadas as seguintes soluções:

Solução de Bloqueio:

- Soro fetal bovino.....10 mL
- Gelatina..... 1 g
- PBS diluído s/ azida qsp.....1000 mL

Solução concentrada de PBS [10xx]:

- NaCl.....80 g
- KCl..... 2 g
- Fosfato de potássio monobásico.....2 g
- Fosfato bibásico de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....11,5 g
- Água destilada qsp.....1000 ml
- pH ajustado para 7,4

PBS diluído: diluição com água deionizada 1:10 a partir da solução concentrada acima.

Solução do Substrato Cromógeno:

- Diaminobenzidina (DAB).....20 mg
- PBS diluído.....40 mL

Solução Fixadora da Reação:

- Sulfato de Níquel.....1%
- Sulfato de Cobre.....1%
- Água destilada.....qsp

Solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ :

- $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrada (30 v).....100  $\mu\text{L}$
- Água deionizada.....6 mL

O Protocolo era composto das seguintes etapas:

- Foram recortadas 10 tiras de 1x10 cm de membranas de nitrocelulose, sendo as mesmas colocadas em uma cuba apropriada, contendo 10 canaletas de 1,5x11 cm, sendo cada tira colocada em uma canaleta;
- Foram aplicados, em cada tira, 10  $\mu$ L das soluções de cada extrato, contendo os antígenos, sendo que o espaço entre os “dots” na mesma tira foi de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm; cada tira serviu para testar no máximo 6 extratos para apenas um soropositivo. No total, para cada cuba, haviam 6 extratos (antígenos) testados em 10 soropositivos;
- Depois de secos os “dots” foram adicionados, para cada tira, 4 mL de solução de bloqueio sem diluição e incubados por 1 h à temperatura ambiente sob agitação;
- Após a remoção da solução de bloqueio, foram feitas 6 lavagens com solução de PBS diluído (5 min por lavagem);
- Após as lavagens, adicionou-se o soro ( $\pm$  4 mL) a ser testado, em cada tira, devidamente identificada. O soro estava diluído em solução de bloqueio. A mistura foi incubada durante uma noite (aproximadamente 12 h) sob refrigeração;
- No dia seguinte, foram retirados os soros e lavadas as membranas por 6 vezes com PBS diluído (5 min/lavagem);
- Adicionou-se  $\pm$  4 mL de solução do conjugado peroxidase anti-IgE humana, devidamente diluída em solução de bloqueio (1:1000), e incubou-se por 2 h em câmara escura sob refrigeração;
- Após a remoção do Conjugado, foram feitas 6 lavagens com solução de PBS diluído (5 min por lavagem);
- Foram adicionados 5 mL por tira de substrato diaminobenzidina (DAB) e 5  $\mu$ L por tira da solução de sulfato de níquel e cobre (fixador da reação) e incubadas por 15 min sob agitação em câmara escura;
- Adicionou-se a solução de água oxigenada, com cuidado para não danificar a membrana, sendo que, para cada 100 mL de substrato usado, foi adicionado 100  $\mu$ L da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

- Esperou-se alguns segundos e lavou-se as tiras com água destilada. A seguir as tiras foram colocadas para secar em papel de filtro e após arquivadas.

**Análise de “Immunoblotting”:** Os testes de “Immunoblotting” foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LICA), da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), da UNICAMP e coordenados pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner. Nos testes foram usadas as seguintes soluções:

Solução Tampão de corrida:

- Glicina.....14,41 g
- Tris..... 30,27 g
- SDS.....0,375 g
- Metanol.....15%
- Água destilada qsp.....1000 ml

Solução Tampão Tris (pH 8,3):

- Tris.....30,27 g
- Tween 20.....0,05%
- Água destilada qsp.....1000 mL
- pH ajustado para 8,3

Solução de Bloqueio:

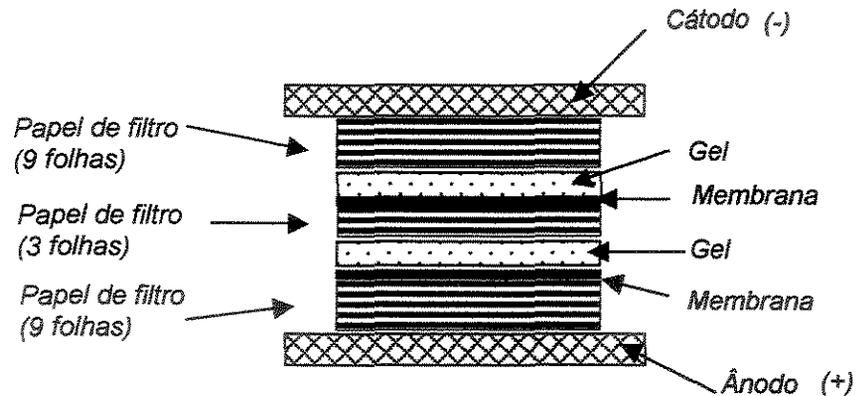
- Leite em pó desnatado.....8,3%
- Solução Tampão Tris (pH 8,3) qsp.....1000 mL

O Protocolo, adaptado de Tobwin (1989), era composto das seguintes etapas:

- Foram preparados dois géis de 10% de poliacrilamida onde foram aplicadas as amostras de extratos com potencial alergênico e feita corrida em cuba de eletroforese (Sistema “Mini-Protean II”, da Bio-Rad), conforme descrito no item 3.2.4.
- Após a corrida eletroforética, os dois géis, contendo os antígenos fracionados, foram removidos da cuba e colocados em contato com

duas membranas de nitrocelulose, de mesmo tamanho do gel, para a transferência dos antígenos, conforme montagem da Figura 3.7.

- Antes da montagem, os géis, membranas e papéis de filtro foram imersos em solução tampão de corrida (mesma usada na eletroforese, porém contendo metanol), para permitir condução de corrente.



**Figura 3.7.** Esquema de montagem dos géis de eletroforese e membranas de nitrocelulose para a transferência dos antígenos, na análise de "Immunoblotting".

- Após a montagem, foram conectados os eletrodos e aplicada uma corrente constante de 60 mA por 1,5 h, sendo que as proteínas migram do gel em direção a membrana de nitrocelulose, obedecendo a mesma posição anterior no gel.
- Após a transferência dos antígenos, os géis foram removidos e submetidos a processo de coloração por nitrato de prata / ditiotrietol, para a verificação da presença de proteína residual (não transferida).
- As membranas foram colocadas em cubas separadas e em contato com solução de bloqueio por 1 h, sob agitação.
- A solução de bloqueio foi removida sendo então feitas 3 lavagens com tampão Tris (pH 8,3).
- Após as lavagens, as membranas contendo os antígenos transferidos foram colocadas em um aparelho da BioRad ("Mini-Protean II Multiscreen Apparatus"), o qual tem a função de colocar em contato os antígenos aos soros e ao conjugado anti-IgG humana. Este aparelho

apresenta 40 canais onde podem ser adicionados, lado a lado, os soros que ficarão em contato com os mesmos antígenos, para efeitos de comparação.

- Foram adicionados 600  $\mu$ L de cada soro (diluído 1:4), dentre os que resultaram positivos no teste de “Dot-blotting”, por canal, sendo após incubadas por uma noite (aproximadamente 12 h), sob agitação.
- Após incubação, foram removidos os soros (por sucção a vácuo) e efetuadas três lavagens com tampão Tris (pH 8,3), sendo posteriormente adicionados 600  $\mu$ L/canal de conjugado peroxidase anti-IgE humana (da Sigma), devidamente diluído em solução de bloqueio (1:1000), e incubou-se por 2 h em câmara escura.
- Três lavagens com tampão Tris (pH 8,3) foram feitas após remoção do conjugado, sendo então as membranas retiradas do aparelho e colocadas em cubas para a revelação das bandas.
- Foi adicionado, para cada cuba contendo a membrana, 30 mL de solução DAB e 30  $\mu$ L da solução de sulfato de níquel e cobre (fixador da reação) sendo incubadas sob agitação em câmara escura por 15 min.
- Adicionou-se, lentamente, a solução de água oxigenada até o surgimento das bandas. Após, as membranas foram lavadas com água destilada e secas em papel de filtro.

**Fracionamento das proteínas:** Na tentativa de separar as proteínas dos extratos com potencial alergênico, foram feitos testes de cromatografia de permeação em gel com diferentes tipos de géis. Devido a presença de diversas proteínas a serem fracionadas nos extratos com potencial alergênico, foi usada uma coluna com altura útil de 40 cm e diâmetro interno de 1,2 cm. Foram testados os seguintes géis, da Pharmacia (EUA):

- Sephadex G-100 (fraciona proteínas na faixa de 4 a 150 kDa),
- Sephadex G-150 (fraciona proteínas na faixa de 5 a 300 kDa)
- Mistura de Sephadex G-100 com Sephadex G-200, na proporção 2:1.

O gel Sephadex G-200 fraciona proteínas na faixa de 5 a 600 kDa. A utilização da mistura de Sephadex G-100 com Sephadex G-200, na proporção 2:1, foi baseada no trabalho de Granath & Kvist (1967), os quais concluíram que a mistura proporcionou um fracionamento de dextranas na faixa de massa molecular de 10 a 150 kDa.

Inicialmente, para conhecer-se os perfis de eluição da coluna, a mesma foi calibrada pela passagem de 2,0 mL de uma solução contendo os seguintes padrões:

- IgG de soro bovino (0,5 mg/mL) – 150 kDa
- Albumina de soro bovino – BSA (0,5 mg/mL) – 67 kDa
- $\beta$ -lactoglobulina (0,5 mg/mL) – 35 kDa

Após a calibração, foi aplicado no gel, para cada teste, uma amostra de 2,0 mL de extrato com potencial alergênico (obtido por precipitação com EtOH, para o tempo de 144 h de fermentação), sendo a seguir coletadas 52 frações de 1,5 mL, totalizando 78 mL de material eluído coletado.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÕES I

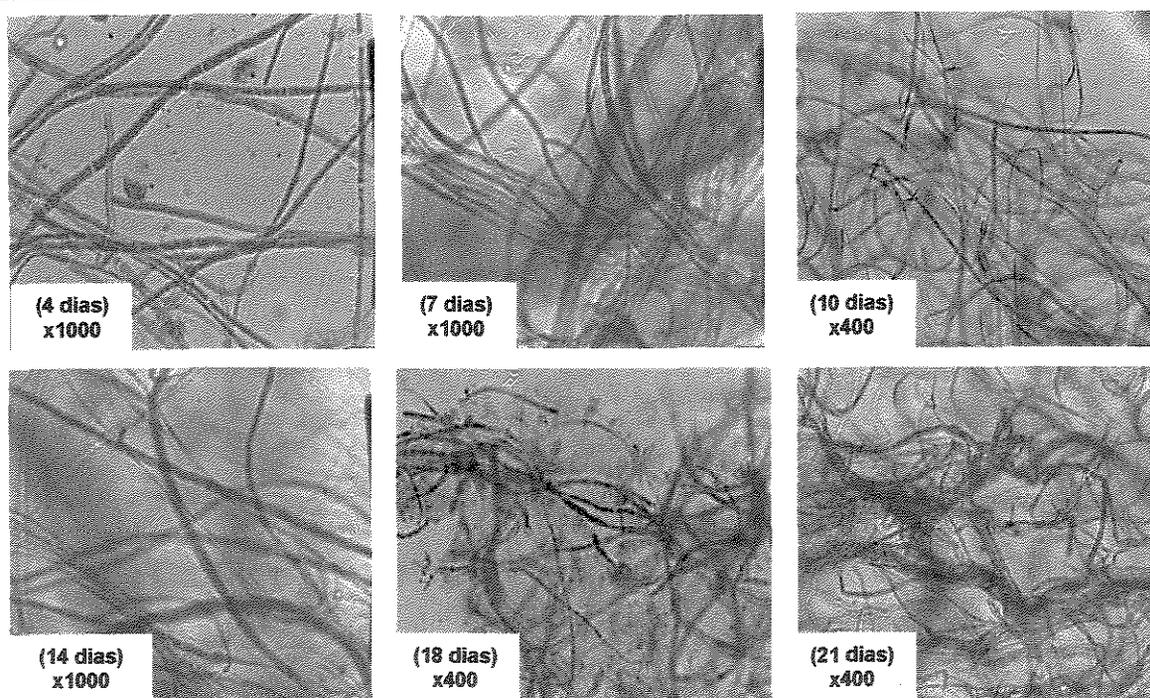
#### FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: OTIMIZAÇÃO E CINÉTICA

No presente capítulo é apresentado inicialmente um estudo para avaliar-se as características micromorfológicas do fungo durante o seu crescimento. A seguir, são apresentados resultados onde são definidas as condições prévias de fermentação, para que se possa iniciar a otimização da FES. Por último, são apresentados os resultados da caracterização cinética, determinada para as condições otimizadas da FES.

##### 4.1. Acompanhamento Micromorfológico do Fungo

A Figura 4.1 mostra as micrografias do fungo após 4, 7, 10, 14, 18 e 21 dias de microcultivo em lâmina contendo meio de ágar-Czapeck modificado por Yunginger et al (1980). Como se pode observar, existiu a predominância de micélio vegetativo em todas as fases do crescimento, não sendo possível identificar o início da fase conidial até o 21º dia de incubação.

Menezes (1995) constatou para esse fungo, em fermentação submersa, o início da fase conidial a partir do 14º dia de crescimento, prolongando-se até o 28º dia quando se observa a autólise do mesmo. Para o caso da FES, considerou-se um tempo máximo de 12 dias de crescimento para o *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, de modo a evitar-se contaminação do meio fermentativo através de tempo demasiadamente longo de fermentação.



**Figura 4.1.** Micrografias do fungo *D. monoceras* obtidas após 4, 7, 10, 14, 18 e 21 dias de microcultivo em lâmina com ágar-Czapeck.

Para inocular-se o meio a ser fermentado necessita-se de um inóculo de concentração inicial conhecida. Para alguns tipos de fungos, a concentração pode ser estimada através de contagem dos propágulos (em solução) em microscópio usando a Câmara de Neubauer. Devido as características da cepa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* usada neste trabalho, a contagem dos propágulos não foi possível uma vez que o fungo não apresentou, na etapa de preparo do inóculo, esporulação na sua fase reprodutiva, resultando em crescimento celular constituído basicamente de massa micelial. Assim sendo, para estimar-se a concentração inicial da solução de microrganismo foi feita uma padronização do inóculo por meio da construção de uma curva-padrão, usando a massa celular seca do fungo obtida após crescimento do mesmo em meio inclinado de ágar-Czapeck modificado por Yunginger et al (1980), em estufa incubadora a 25°C, por 14 dias. Para tal, foram feitas diversas diluições da massa celular seca, sendo as absorbâncias medidas a 550 nm.

#### 4.2. Determinação Prévia das Condições de Fermentação

Antes de iniciar o planejamento estatístico de experimentos propriamente dito, foi necessário determinar a faixa de variação de alguns parâmetros importantes a serem utilizados na fermentação tais como a escolha do substrato mais adequado, a idade e a concentração do inóculo e o pH do meio de fermentação. Para isso, foram feitas fermentações usando três níveis para a estimativa dos efeitos de cada fator:

- Substrato (S): bagaço de cana, farelo de milho e farelo de trigo.
- Idade do inóculo (I): 7, 14 e 21 dias.
- Concentração inicial do inóculo (Co): 0,27; 0,41 e 0,82 mg/mL.
- pH inicial do meio de fermentação: 8, 9 e 10.

A vazão de ar utilizada em cada coluna foi de 2,0 L/h. Foram avaliadas as produtividades (mg proteína/gms/dia) das fermentações realizadas nas colunas de Raimbault, por meio de 3 planejamentos fatoriais completos do tipo  $3^2$  (três níveis de duas variáveis), totalizando 27 experimentos. Dessa forma, foram determinadas, para cada planejamento, os efeitos principais das variáveis e de interação entre as mesmas. A Tabela 4.1 apresenta os valores dos efeitos principais e de interação obtidos e as Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 apresentam os gráficos das produtividades para as interações entre cada duas variáveis.

**Tabela 4.1.** Efeitos calculados para os planejamentos  $3^2$  das variáveis concentração inicial do inóculo (Co), substrato (S), pH do meio e idade do inóculo (I).

1° Planejamento		2° Planejamento		3° Planejamento	
Média	1,31	Média	1,09	Média	1,00
Efeito Co	-0,03	Efeito pH	0,1	Efeito Co	Zero
Efeito S	1,13	Efeito S	1,33	Efeito I	Zero
Interação CoxS	-0,25	Interação pHxS	0,05	Interação CoxI	0,2

Verificou-se, através das Figuras 4.2 e 4.3, que os melhores resultados de produtividade foram obtidos para o farelo de trigo, seguido do bagaço de cana e do farelo de milho, para todas as condições de concentração inicial de inóculo (Co) e pH inicial do meio. A Tabela 4.1 mostra os maiores valores obtidos para o

efeito do substrato (S), indicando a grande influência da escolha do substrato sobre os valores de produtividade.

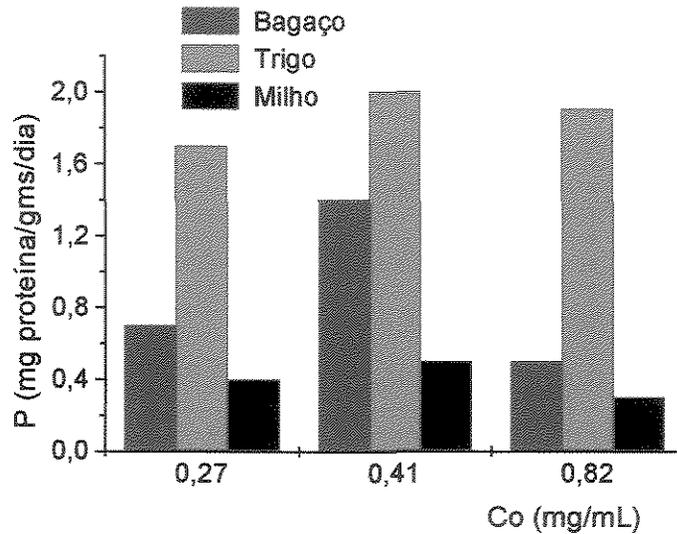


Figura 4.2. Valores de produtividade P (mg proteína/gms/dia, onde gms = gramas de massa seca do meio fermentado) em função da concentração inicial do inóculo Co, para os diferentes substratos (S).

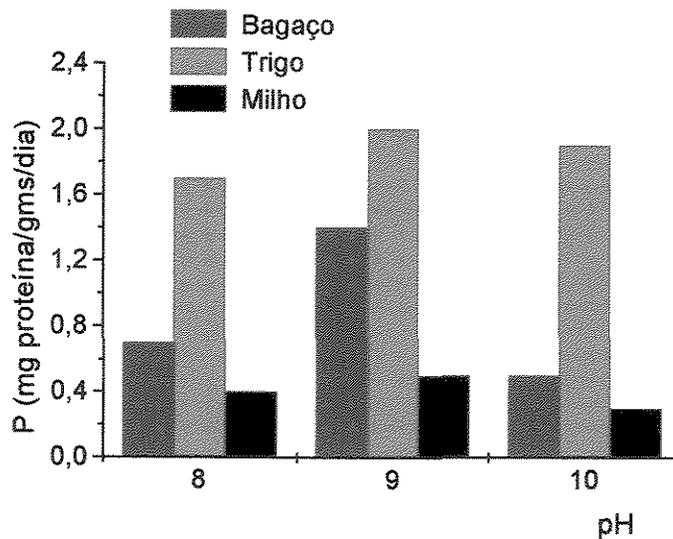
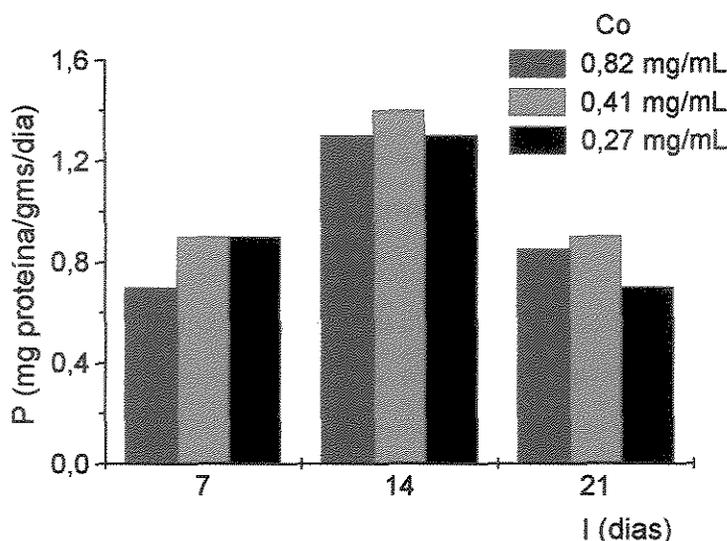


Figura 4.3. Valores de produtividade P (mg proteína/gms/dia, onde gms = gramas de massa seca do meio fermentado) em função do pH inicial do meio de fermentação, para os diferentes substratos (S).



**Figura 4.4.** Valores de produtividade P (mg proteína/gms/dia, onde gms = gramas de massa seca do meio fermentado) em função da idade do inóculo (I), para diferentes concentrações de inóculo Co.

As Figuras 4.2 e 4.4 apresentam os maiores valores de produtividade para o nível de concentração inicial do inóculo (Co) igual a 0,41 mg/mL, para qualquer condição de substrato e idade do inóculo.

Observa-se no gráfico da Figura 4.4 que o preparo do inóculo com idade de 14 dias de pré-cultivo foi o que apresentou melhores resultados de produtividade. Como é característico deste fungo, sabe-se que há neste estágio de crescimento, uma predominância de micélio vegetativo. Portanto, o fato do inóculo com idade de 14 dias apresentar-se basicamente na forma micelial, e também por estar adaptado ao meio de fermentação, resultou em uma maior produtividade. Por outro lado, para 7 dias de pré-cultivo a quantidade de massa celular do inóculo é menor e, para 21 dias de pré-cultivo, a produtividade global do processo seria prejudicada, além do fato do fungo não apresentar esporulação neste período do crescimento do inoculo.

Os resultados obtidos nesta fase mostraram que os melhores valores de produtividade do processo foram verificados para o meio com farelo de trigo e pH inicial igual a 9,0. Foi determinado, para todos os meios, como melhor condição de

preparo de inóculo aquele com pré-cultivo de 14 dias e concentração inicial igual a 0,41 mg/mL.

### **4.3. Otimização das Condições da FES**

#### **4.3.1. Determinação das Variáveis Significativas**

Para esta primeira série de experimentos foram estudados os efeitos de cinco variáveis sobre a resposta produtividade (P), sendo 8 experimentos usados para o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$  (de resolução 3) e 3 experimentos para o ponto central. A Tabela 4.2 mostra as variáveis e os valores usados para cada nível (-1 e +1) e para o ponto central (0). Os valores especificados para a umidade, vazão de ar e diâmetro de partícula do substrato foram com base em dados médios verificados na literatura, para a FES com fungos filamentosos. Os valores de pH e Co foram com base nas condições prévias determinadas no item 4.2. A Tabela 4.3 apresenta as mesmas variáveis, porém nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de produtividade após o processo fermentativo para cada experimento. Os valores de produtividade referem-se aos conteúdos de proteína obtidos após 7 dias de fermentação. Em todos os experimentos foi usado farelo de trigo como substrato e a temperatura da fermentação foi mantida constante em 25°C.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o primeiro planejamento é dada na Tabela 4.4, onde pode-se observar também os valores obtidos para o erro puro, a estatística " $t^2$ ", a probabilidade, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação  $R^2$  e o nível de significância, valores obtidos do módulo "Experimental Design" do programa computacional "Statistica", versão 5.0. Os valores evidenciados em estilo negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). A estatística " $t^2$ " representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado, indicado pelo gráfico de Pareto.

**Tabela 4.2.** Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$ .

Variável	Nível		
	-1	0	+1
pH = pH inicial do meio	7,0	9,0	11,0
U = umidade inicial do meio (%)	40,0	50,0	60,0
Q = vazão de ar (L/h/coluna)	1,0	2,0	3,0
dp = diâmetro de partícula do substrato (mm)	0,35	0,59	0,84
Co = concentração inicial do inóculo (mg/mL)	0,2	0,4	0,6

**Tabela 4.3.** Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$  com as variáveis codificadas e resultados obtidos de produtividade (P).

Ensaio	pH	U	Q	dp	Co	P (mg proteína/gms/dia)
1	- 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	1,52
2	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	1,14
3	- 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1	1,27
4	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1	1,05
5	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	1,51
6	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	1,03
7	- 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	1,46
8	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	0,14
9	0	0	0	0	0	1,77
10	0	0	0	0	0	1,52
11	0	0	0	0	0	1,75

Como se pode observar na Tabela 4.4 e na Figura 4.5, apenas a variável pH mostrou-se significativa (ao nível de significância de 95%, "default" do programa). Observa-se, no entanto, um valor elevado para a umidade, o qual apresenta valor de  $p = 0,0814$ , próximo a 0,05. Assim sendo, diminuindo-se o intervalo de confiança para 90%, o efeito da umidade passa a ser significativo ( $p < 0,10$ ), como se pode verificar na Tabela 4.5 e no gráfico de Pareto na Figura 4.6.

Tabela 4.4. Estimativa dos efeitos, para intervalo de confiança de 95%, obtida para o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$ .

Variável	Efeito	Erro puro	$t^2$	p	Coefficiente
<b>pH</b>	<b>-0,60</b>	<b>0,098</b>	<b>-6,107</b>	<b>0,026</b>	<b>-0,300</b>
U	-0,32	0,098	-3,257	0,082	-0,160
Q	-0,21	0,098	-2,138	0,166	-0,105
dp	-0,25	0,098	-2,544	0,126	-0,125
Co	-0,17	0,098	-1,731	0,226	-0,085
pH x Q	-0,30	0,098	-3,054	0,093	-0,150
pH x dp	-0,15	0,098	-1,527	0,266	-0,075
<b>Intercepto</b>	<b>1,29</b>	<b>0,041</b>	<b>30,732</b>	<b>0,001</b>	<b>1,287</b>

$R^2 = 0,678$ ;  $R = 0,823$

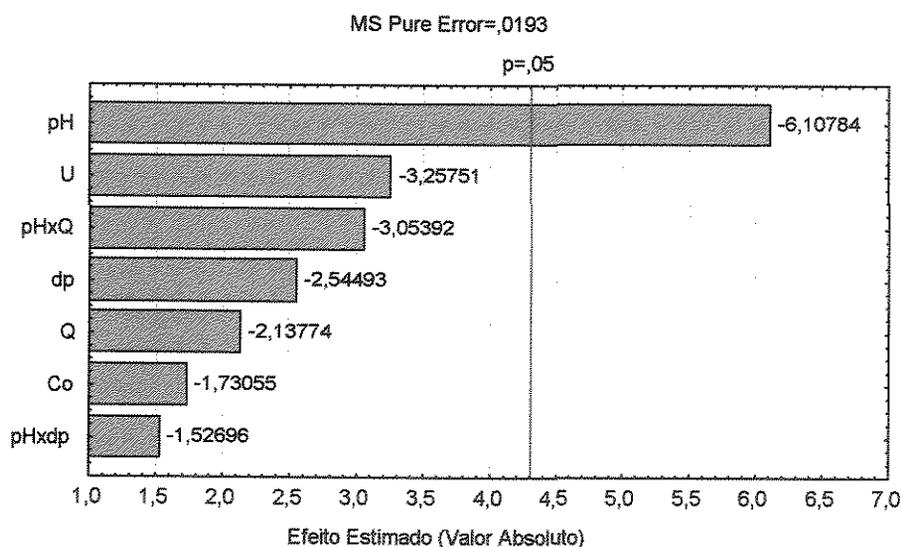
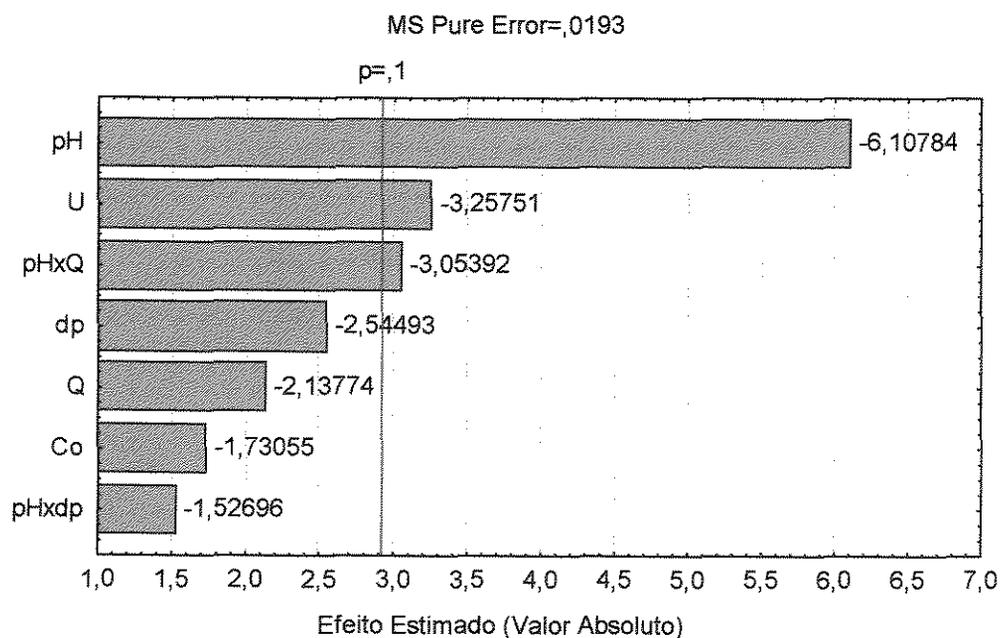


Figura 4.5. Gráfico de Pareto, para intervalo de confiança de 95%, obtido para o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$ .

**Tabela 4.5.** Estimativa dos efeitos, para intervalo de confiança de 90%, obtida para o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$ .

Variável	Efeito	Erro puro	$t^2$	p	Coefficiente
<b>pH</b>	<b>-0,60</b>	<b>0,098</b>	<b>-6,107</b>	<b>0,026</b>	<b>-0,300</b>
<b>U</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,098</b>	<b>-3,257</b>	<b>0,082</b>	<b>-0,160</b>
Q	-0,21	0,098	-2,138	0,166	-0,105
dp	-0,25	0,098	-2,544	0,126	-0,125
Co	-0,17	0,098	-1,731	0,226	-0,085
<b>pH x Q</b>	<b>-0,30</b>	<b>0,098</b>	<b>-3,054</b>	<b>0,093</b>	<b>-0,150</b>
pH x dp	-0,15	0,098	-1,527	0,266	-0,075
<b>Intercepto</b>	<b>1,29</b>	<b>0,041</b>	<b>30,732</b>	<b>0,001</b>	<b>1,287</b>

$R^2 = 0,678$ ;  $R = 0,823$



**Figura 4.6.** Gráfico de Pareto, para intervalo de confiança de 90%, obtido para o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}_{III}$ .

### 4.3.2. Otimização das Variáveis da FES por Metodologia de Superfície de Resposta

#### 4.3.2.1. Primeiro Planejamento Composto Central

A partir dos resultados obtidos no primeiro planejamento fatorial fracionário, foram consideradas apenas as variáveis pH e umidade inicial do meio de fermentação para compor o primeiro planejamento composto central. As demais variáveis tiveram seus valores fixados no ponto central do planejamento fatorial fracionário, uma vez que foram obtidos neste ponto os melhores valores de produtividade. Assim sendo, os valores usados foram  $Q = 2$  L/h/coluna,  $dp = 0,59$  mm e  $Co = 0,4$  mg/mL.

Para as variáveis pH e umidade foi montado o planejamento composto central constituído de um planejamento completo  $2^2$  e triplicata no ponto central, para definição de um modelo linear, e de uma configuração estrela, para definição de um modelo quadrático. Portanto, esse planejamento contém 5 níveis para as duas variáveis, ou sejam,  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  e  $+\alpha$ , sendo o nível "0" para o ponto central, os níveis " $-1$ " e " $+1$ " para o planejamento completo  $2^2$ , e os níveis " $-\alpha$ " e " $+\alpha$ " para a configuração estrela, onde,

$$\alpha = 2^{(n/4)} ; \quad n = \text{n}^\circ \text{ de variáveis} = 2 \quad ; \quad \alpha = 2^{1/2}$$

Como os melhores valores de produtividade do primeiro planejamento foram obtidos no ponto central, admitiu-se para o nível  $+2^{1/2}$  os valores de pH 9,0 e  $U = 50\%$  e valores menores para os demais níveis, uma vez que os efeitos principais do planejamento fatorial fracionário resultaram negativos, indicando que a produtividade aumenta com a diminuição dos valores de pH e U.

Por outro lado, foram fixados para o nível inferior  $-2^{1/2}$  os valores de pH 5,0 e  $U = 30\%$ , as quais foram escolhidas em função das limitações impostas pelo processo. Assim sendo, os valores de pH e U para os níveis " $-1$ " e " $+1$ " foram calculados por interpolação, partindo-se do ponto central, e dos níveis  $-2^{1/2}$  e  $+2^{1/2}$ . A Tabela 4.6 apresenta os valores reais do pH e umidade (U) usados para cada nível e a Tabela 4.7 os experimentos com suas variáveis codificadas e os resultados obtidos de produtividade para cada experimento.

**Tabela 4.6.** Especificação dos níveis das variáveis usadas no primeiro planejamento composto central.

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	5,0	5,6	7,0	8,4	9,0
U (%)	30,0	33,0	40,0	47,0	50,0

#### 4.3.2.1.1. Modelo Quadrático

Os valores obtidos para os efeitos principais e de interação das variáveis pH e U de ordem linear (L) e quadrática (Q) são apresentados na Tabela 4.8, para o intervalo de confiança de 95% e, a análise de variância (ANOVA) correspondente é apresentada na Tabela 4.9. Verificou-se, ao nível de significância de 95%, que apenas o efeito da variável pH (termos linear e quadrático) era significativo. Por outro lado, a análise de variância indicou a evidência de falta de ajuste do modelo, sendo a relação  $F_{\text{calc.}}/F_{\text{tabel}}$  muito baixa.

#### 4.3.2.1.2. Modelo Linear

De modo a se obter o modelo linear deve-se desconsiderar a configuração estrela do planejamento da Tabela 4.7 e calcular os efeitos principais e de interação a partir do planejamento completo e do ponto central. Assim sendo, obtêve-se os efeitos e a análise de variância indicados nas Tabelas 4.10 e 4.11, respectivamente.

A Tabela 4.10 indica que os efeitos principais do pH, da umidade (U) e do intercepto são significativos ao nível de significância de 95% e o modelo apresenta um elevado coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,977$ ). Assim sendo, pode-se escrever a seguinte equação para o modelo da produtividade,

$$P = 1,187 + 0,21.pH + 0,08.U + 0,04.pH.U$$

onde P é expressa em mg proteína/gms/dia e pH e U encontram-se em sua forma codificada.

**Tabela 4.7.** Matriz do primeiro planejamento composto central com as variáveis codificadas e resultados obtidos de produtividade (P).

Ensaio	pH	U	P (mg proteína/ gms/dia)
1	- 1	- 1	0,98
2	+ 1	- 1	1,31
3	- 1	+ 1	1,06
4	+ 1	+ 1	1,55
5	0	0	1,21
6	0	0	1,20
7	0	0	1,15
8	- 2 <sup>1/2</sup>	0	0,70
9	0	+ 2 <sup>1/2</sup>	1,06
10	+ 2 <sup>1/2</sup>	0	1,12
11	0	- 2 <sup>1/2</sup>	1,22

**Tabela 4.8.** Estimativa dos efeitos para o modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o primeiro planejamento composto central.

Variável	Efeito	Erro puro	t <sup>2</sup>	p	Coefficiente
<b>pH (L)</b>	<b>0,354</b>	<b>0,022</b>	<b>15,551</b>	<b>0,004</b>	<b>0,177</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>-0,177</b>	<b>0,027</b>	<b>-6,528</b>	<b>0,022</b>	<b>0,088</b>
U (L)	0,023	0,022	1,031	0,411	0,011
U (Q)	0,053	0,027	1,974	0,187	0,027
pH x U	0,080	0,032	2,489	0,131	0,040
<b>Intercepto</b>	<b>1,187</b>	<b>0,019</b>	<b>63,937</b>	<b>0,0002</b>	<b>1,187</b>

R<sup>2</sup> = 0,717; R = 0,847 onde L = linear e Q = quadrático

**Tabela 4.9.** Análise de variância do modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtido para o primeiro planejamento composto central.

	SS	GL	MQ	F
Modelo	0,3055	5	0,0611	2,424
Erro Total	0,1258	5	0,0252	
Falta de Ajuste	0,1237	3		
Erro puro	0,0021	2		
Total	0,4313	10		

F tabelado: (0,95; 5; 5) = 5,05 ;  $F_{\text{calc.}} / F_{\text{tabel.}} = 2,424/5,05 = 0,48$

**Tabela 4.10.** Estimativa dos efeitos para o modelo linear, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo).

Variável	Efeito	Erro puro	t <sup>2</sup>	p	Coefficiente
<b>pH</b>	<b>0,410</b>	<b>0,0321</b>	<b>12,755</b>	<b>0,0060</b>	<b>0,210</b>
<b>U</b>	<b>0,160</b>	<b>0,0321</b>	<b>4,977</b>	<b>0,0381</b>	<b>0,080</b>
pH x U	0,080	0,0321	2,489	0,1306	0,040
<b>Intercepto</b>	<b>1,187</b>	<b>0,0190</b>	<b>63,939</b>	<b>0,0002</b>	<b>1,187</b>

$R^2 = 0,977$ ;  $R = 0,988$

**Tabela 4.11.** Análise de variância do modelo linear, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo).

	SS	GL	MQ	F
Modelo	0,20010	3	0,0667	43,63
Erro Total	0,00459	3	0,00153	
Falta de Ajuste	0,00252	1		
Erro puro	0,00207	2		
Total	0,22330	6		

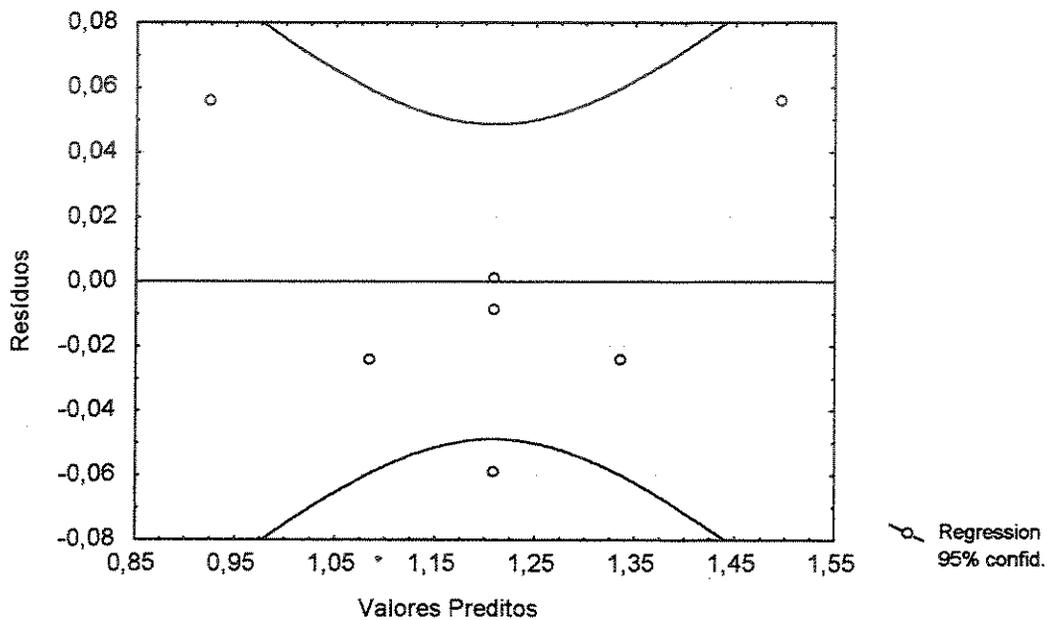
F tabelado: (0,95; 3; 3) = 9,28 ;  $F_{\text{calc.}} / F_{\text{tabel.}} = 43,63/9,28 = 4,7$

A análise de variância do modelo, apresentada na Tabela 4.11 mostra uma relação  $F_{\text{calc.}} / F_{\text{tabel.}}$  maior que 4,00 , ao nível de significância de 95%. A falta de ajuste neste caso não é significativa.

$$F_{\text{calc, falta ajuste}} = MQ_{f,aj.} / MQ_{EP} = 0,00252 / 0,001335 = 2,44$$

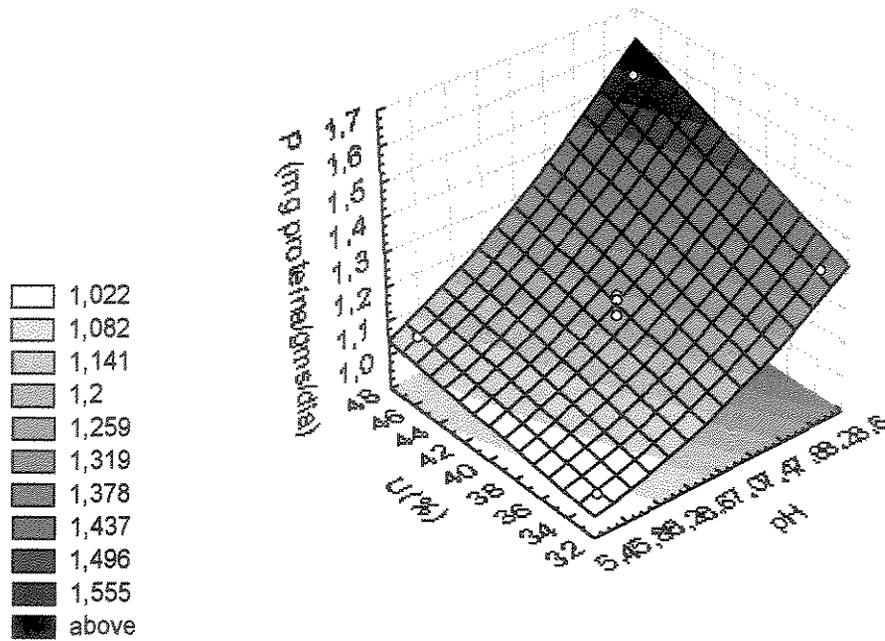
$$F_{\text{tabel}} (0,95; 1;2) = 18,51$$

Como  $F_{\text{calc, falta ajuste}} < F_{\text{tabel}}$ , não há evidência de falta de ajuste do modelo, o que é reforçado pelo gráfico da Figura 4.7, onde se observa que os resíduos do modelo distribuem-se aleatoriamente em torno do zero.



**Figura 4.7.** Gráfico dos resíduos em função dos valores estimados de P, para o modelo linear obtido para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo).

As Figuras 4.8 e 4.9 apresentam, respectivamente, a superfície de resposta e o gráfico de contorno, obtidas para o modelo, onde pode-se observar que a produtividade tende a aumentar com o acréscimo do pH e da umidade.



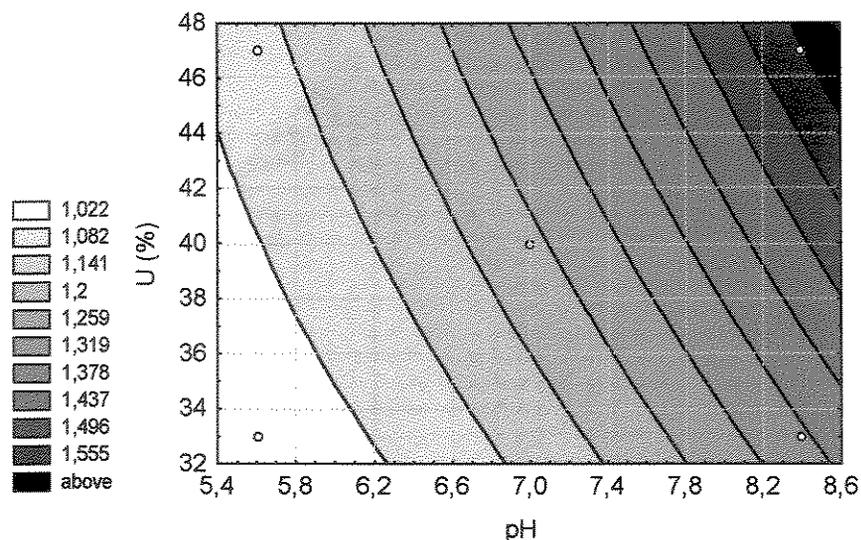
**Figura 4.8.** Superfície de resposta para a produtividade (P) em função do pH e umidade (U) obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo).

#### 4.3.2.2. Deslocamento de Máxima Inclinação

Segundo Barros Neto et al (1996), outra forma de obter uma representação bidimensional da superfície modelada é desenhar suas curvas de nível, que são a projeção das superfícies em linhas onde a resposta é constante. A curva de nível de um plano é um segmento de reta. Por exemplo, se fizermos  $P = 1,43$  mg proteína/gms/dia na equação do modelo linear chegamos à expressão

$$pH = (0,243 - 0,08.U) / (0,21 + 0,04.U)$$

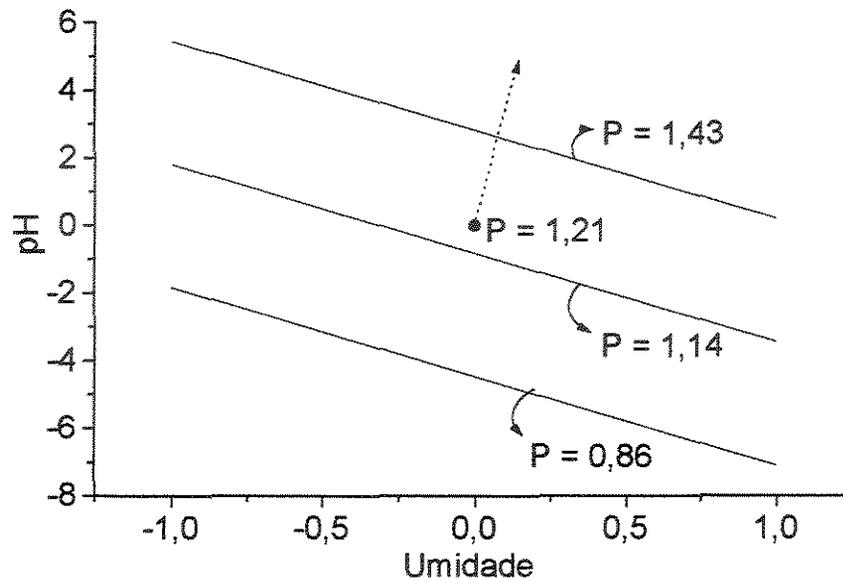
que representa uma reta. Em qualquer ponto dessa reta o valor da produtividade deve ser igual a 1,43, de acordo com o modelo ajustado. Fazendo o mesmo para outros valores de produtividade obteremos outras curvas de nível, que em conjunto darão uma imagem da superfície de resposta na região investigada (Figura 4.10).



**Figura 4.9.** Gráfico de contorno da produtividade em função do pH e umidade (U) obtida para o primeiro planejamento composto central (porém após excluir a configuração estrela do mesmo).

Podemos ver nas Figuras 4.8 e 4.10 que se tratam de planos inclinados obliquamente em relação aos eixos, e com direção ascendente indo da esquerda para a direita. Assim, se desejamos obter maiores valores de produtividade, devemos deslocar a região experimental para maiores valores de pH e umidade, ao longo de uma trajetória perpendicular às curvas de nível, chamada de deslocamento de máxima inclinação da superfície ajustada.

A trajetória de máxima inclinação pode ser algébricamente determinada a partir dos coeficientes do modelo linear obtido. Para se ter a máxima inclinação, os deslocamentos ao longo dos eixos pH e U devem ser feitos na proporção  $0,08/0,21 = 0,38$ , o que significa que para cada unidade a ser avançada no pH devemos avançar 0,38 unidades na umidade. As coordenadas de vários pontos ao longo dessa trajetória são apresentadas na Tabela 4.12, tanto nas variáveis codificadas ( $X_1$  e  $X_2$ ) quanto nas unidades reais de pH e umidade correspondentes.



**Figura 4.10.** Curvas de nível do plano descrito pelo modelo linear. A linha tracejada preta é a trajetória de máxima inclinação partindo do ponto central do planejamento.

Os valores reais de pH e U (Tabela 4.12), a partir dos valores codificados, foram obtidos pelas equações abaixo com base nos níveis especificados na Tabela 4.6.

$$X_1 = (pH - 7,0) / 1,4 \quad \text{e} \quad X_2 = (U - 40) / 7$$

**Tabela 4.12.** Matriz do planejamento para a trajetória de máxima inclinação, com os valores das variáveis codificadas e reais.

$X_1$	$X_2$	pH	U (%)
1	0,38	8,4	42,7
2	0,76	9,8	45,3
3	1,14	11,2	48,0
4	1,52	12,6	50,6
5	1,90	14,0	53,3

Devido aos elevados valores de pH indicados na Tabela 4.12 serem inviáveis operacionalmente, optou-se por multiplicar a proporção de coeficientes

obtida por 0,6, ou seja,  $0,38 \cdot 0,6 = 0,228$ , o que não altera a inclinação da equação do modelo. Assim, os novos valores para as variáveis codificadas e reais encontram-se na Tabela 4.13, bem como os respectivos resultados obtidos dos experimentos.

**Tabela 4.13.** Matriz do planejamento para a trajetória de máxima inclinação, com os valores das variáveis codificadas e reais, e resultados de produtividade (P).

$X_1$	$X_2$	pH	U (%)	P (mg proteína/gms/dia)
0,6	0,228	7,8	41,6	1,10
1,2	0,456	8,7	43,2	1,31
1,8	0,684	9,5	44,8	1,47
2,4	0,912	10,4	46,4	1,25
3,0	1,140	11,2	48,0	0,45

Pode-se observar que o melhor resultado corresponde ao terceiro experimento. Assim sendo, o próximo planejamento foi feito considerando seu ponto central em torno do ponto correspondente ao terceiro ensaio, ou seja, pH 9,5 e U = 45%.

#### 4.3.2.3. Segundo Planejamento Composto Central

A Tabela 4.14 apresenta a nova matriz de planejamento, contendo um planejamento completo  $2^2$ , triplicata no novo ponto central e uma configuração estrela. Os valores obtidos para os efeitos principais e de interação das variáveis pH e U de ordem linear (L) e quadrática (Q) são apresentados na Tabela 4.15, para o intervalo de confiança de 95% e, a análise de variância (ANOVA) correspondente é apresentada na Tabela 4.16. A Tabela 4.15 e a Figura 4.11 indicam que os efeitos principais do pH (termo quadrático), da umidade (termos quadrático e linear) e do intercepto são significativos ao nível de significância de 95% e o modelo apresenta um elevado coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,953$ ). Assim sendo, podemos escrever a seguinte equação para o modelo,

$$P = 1,43 - 0,274.pH^2 + 0,057.U - 0,241.U^2$$

onde P é expressa em (mg proteína/gms/dia) e pH e U encontram-se em sua forma codificada.

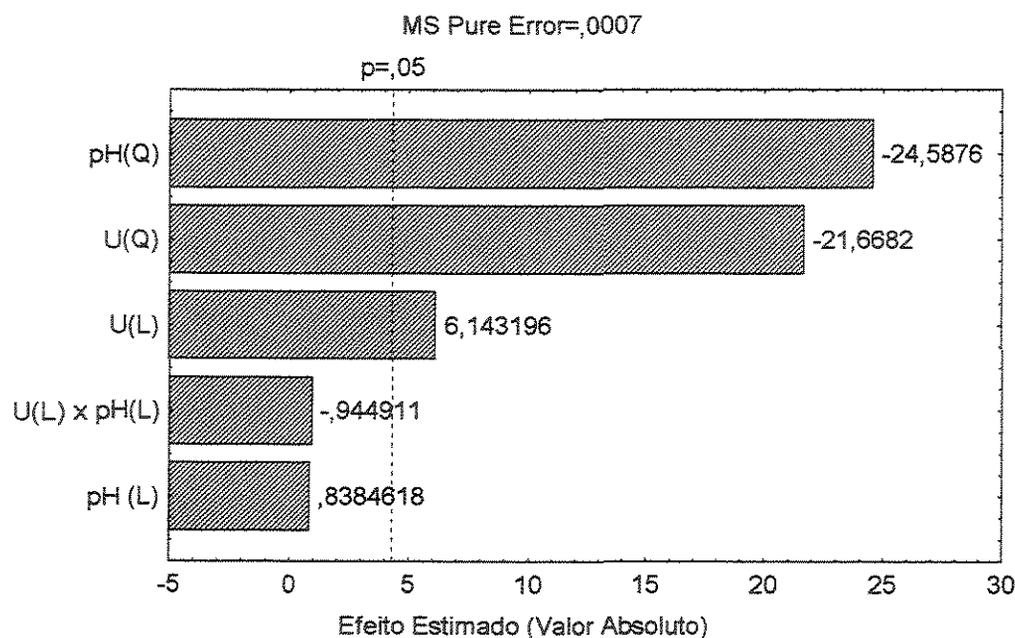
**Tabela 4.14.** Matriz do segundo planejamento composto central com as variáveis codificadas e resultados obtidos de produtividade (P).

Ensaio	pH	U	pH	U (%)	P (mg proteína/gms/dia)
1	- 1	- 1	8,1	38,0	0,74
2	+ 1	- 1	10,9	38,0	0,86
3	- 1	+ 1	8,1	52,0	0,91
4	+ 1	+ 1	10,9	52,0	0,98
5	0	0	9,5	45,0	1,41
6	0	0	9,5	45,0	1,42
7	0	0	9,5	45,0	1,46
8	- 2 <sup>1/2</sup>	0	7,5	45,0	0,97
9	0	+ 2 <sup>1/2</sup>	9,5	54,9	1,05
10	+ 2 <sup>1/2</sup>	0	11,5	45,0	0,88
11	0	- 2 <sup>1/2</sup>	9,5	35,1	0,93

**Tabela 4.15** Estimativa dos efeitos para o modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtida para o segundo planejamento composto central.

Variável	Efeito	Erro puro	t <sup>2</sup>	p	Coefficiente
pH (L)	0,0157	0,0187	0,838	0,4900	0,008
<b>pH (Q)</b>	<b>-0,5476</b>	<b>0,0223</b>	<b>-24,588</b>	<b>0,0017</b>	<b>-0,274</b>
<b>U (L)</b>	<b>0,1149</b>	<b>0,0187</b>	<b>6,143</b>	<b>0,0255</b>	<b>0,057</b>
<b>U (Q)</b>	<b>-0,4826</b>	<b>0,0222</b>	<b>-21,668</b>	<b>0,0021</b>	<b>-0,241</b>
pH x U	-0,0250	0,0265	-0,945	0,4444	-0,012
<b>Intercepto</b>	<b>1,4300</b>	<b>0,0153</b>	<b>93,617</b>	<b>0,0001</b>	<b>1,430</b>

R<sup>2</sup> = 0,953 onde L = linear e Q = quadrático



**Figura 4.11.** Gráfico de Pareto, para intervalo de confiança de 95%, para o modelo quadrático obtido do segundo planejamento composto central.

A análise de variância do modelo (Tabela 4.16) mostra uma relação  $F_{calc}/F_{tabel.}$  maior que 4,00, ao nível de significância de 95%. A falta de ajuste neste caso não é significativa.

$$F_{calc, falta\ ajuste} = MQ_{f.aj.} / MQ_{EP} = 0,0096 / 0,0007 = 13,71$$

$$F_{tabel} (0,95; 3; 2) = 19,16$$

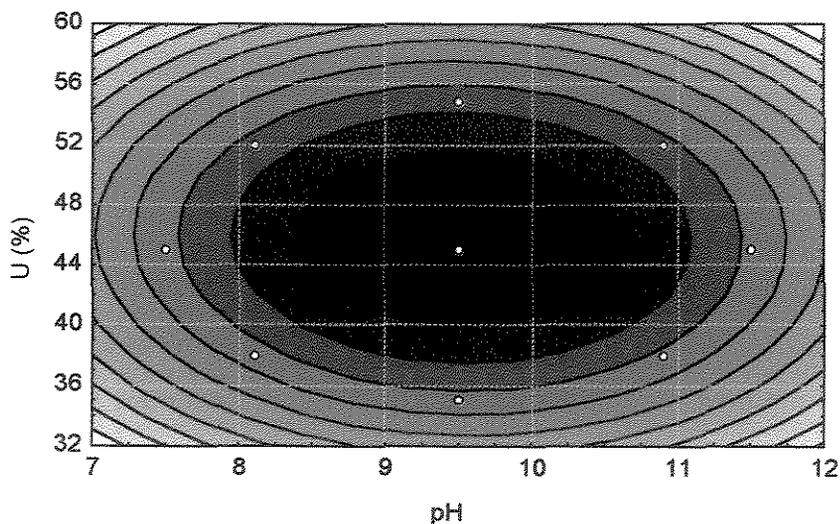
Como  $F_{calc, falta\ ajuste} < F_{tabel.}$  não há evidência de falta de ajuste do modelo.

**Tabela 4.16.** Análise de variância para o modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95%, obtido do segundo planejamento composto central.

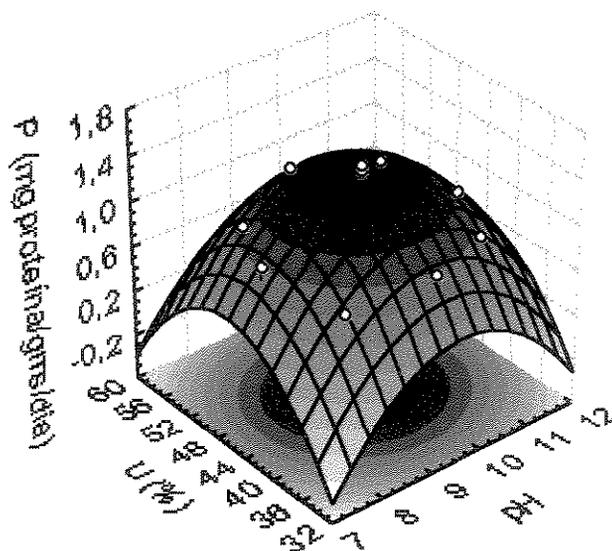
	SS	GL	MQ	F
Modelo	0,7794	5	0,1559	25,81
Erro Total	0,0302	5	0,0060	
Falta de Ajuste	0,0288	3		
Erro puro	0,0014	2		
Total	0,8096	10		

$$F_{tabelado}: (0,95; 5; 5) = 5,05 ; F_{calc.}/F_{tabel.} = 25,81/5,05 = 5,11$$

As Figuras 4.12 e 4.13 apresentam o gráfico de contorno e a superfície de resposta obtidas para o modelo, onde pode-se observar que a produtividade atinge um valor máximo com pH e umidade em torno de 9,5 e 45%, respectivamente.



**Figura 4.12.** Gráfico de contorno do modelo quadrático (P em função de U e pH) obtido para o segundo planejamento composto central.



**Figura 4.13.** Superfície de resposta do modelo quadrático (P em função de U e pH) obtido para o segundo planejamento composto central.

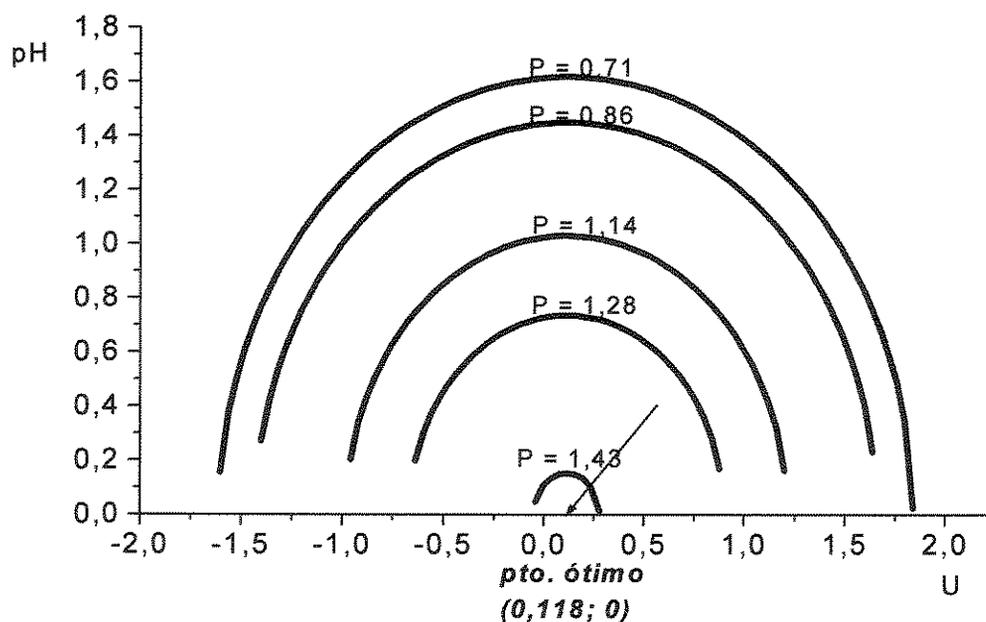
Derivando a equação do modelo quadrático da produtividade em função do pH e em função de U e fazendo ambas as derivadas iguais a zero, obtêve-se o ponto (valores codificados de pH e U) no qual a produtividade é máxima, ou seja,

$$\begin{aligned} d(P)/d(\text{pH}) = -0,548 \cdot \text{pH} = 0; & \quad \text{pH} = 0 = X_1 \\ d(P)/d(U) = 0,057 - 0,482 \cdot U = 0; & \quad U = 0,118 = X_2 \end{aligned}$$

Os valores reais de pH e U, a partir dos valores codificados, foram obtidos pelas equações abaixo com base nos níveis especificados na Tabela 4.14.

$$\begin{aligned} X_1 = (\text{pH} - 9,5)/1,4 = 0; & \quad \text{pH} = 9,5 \\ X_2 = (U - 45)/7 = 0,118; & \quad U = 45,8\% \end{aligned}$$

Assim, o ponto ótimo no qual se obtém o máximo valor de produtividade, corresponde ao pH de 9,5 e umidade de 45,8%. Usando valores de produtividade de 0,71 a 1,43 mg/gms e substituindo na equação do modelo quadrático, obtêve-se as curvas de nível correspondentes. Plotando as respectivas curvas, obtêve-se o gráfico da Figura 4.14, onde pôde-se observar que a produtividade tende a aumentar em direção ao ponto ótimo correspondente aos valores codificados de  $\text{pH} = 0$  e  $U = 0,118$  (o que equivale a  $P = 1,44$  mg/gms/dia).



**Figura 4.14.** Curvas de nível da superfície descrita pelo modelo quadrático. A seta corresponde ao ponto de máxima produtividade (valores codificados de U e pH).

#### 4.4. Cinética de Crescimento da Biomassa Fúngica

Para a determinação do perfil de crescimento do *D. monoceras* foi feita a fermentação usando-se todo o conjunto das doze colunas de Raimbault, sendo uma coluna retirada a intervalos de 24h para a caracterização cinética da fermentação. As condições usadas na fermentação foram as otimizadas, ou seja, com pH 9,5 e  $U = 45,8\%$ . As demais variáveis foram especificadas como na Tabela 4.2 (ponto central), e apresentam os seguintes valores:

- Concentração inicial do inóculo: 0,4 mg/mL
- Tamanho de partícula do substrato = 0,59 mm
- Vazão de ar = 2,0 L/h/coluna

Além disso, foi usado o farelo de trigo como substrato, idade de 14 dias para o preparo do inóculo e temperatura de 25°C. Após a fermentação, os meios fermentados, juntamente com a amostra inicial ( $t_f = 0h$ ), foram secos em estufa a 37°C e, em seguida, feita a extração das proteínas conforme descrito no item 3.2.2 (Capítulo 3). Foram analisados os conteúdos de proteína, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) dos 13 extratos brutos obtidos. A análise de polifenóis nas amostras de extrato bruto mostrou-se inviável devido a problemas de formação de precipitados para concentrações acima de 0,3 mM. Assim, o conteúdo de polifenóis foi determinado nas amostras de extratos com potencial alergênico, obtidas após recuperação das proteínas do extrato bruto por precipitação com etanol e acetona. A análise de umidade e atividade de água ( $a_w$ ) foram feitas nas amostras do meio sólido fermentado úmido.

A cinética de crescimento da biomassa fúngica foi caracterizada através dos perfis de proteína, AR, ART, umidade, atividade de água e polifenóis. As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam os resultados obtidos para a caracterização cinética. Pode-se observar, pelo perfil de proteínas obtido que o início da fase logarítmica pode ser considerado aproximadamente a partir de 24 horas e a fase estacionária estabelecida após 168 horas (7 dias).

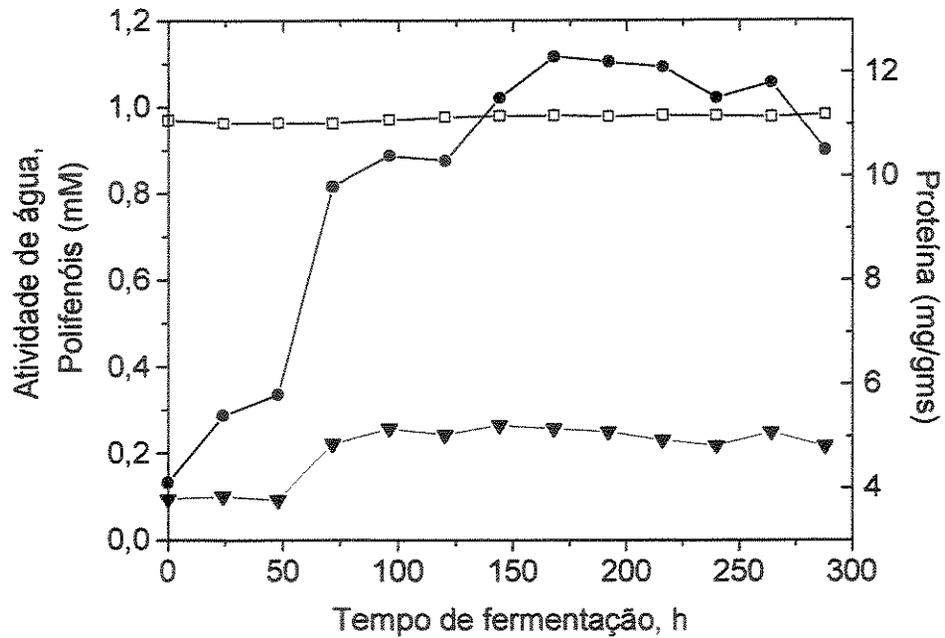


Figura 4.15. Perfis de proteína (mg/gms, —●—), atividade de água (—□—) e polifenóis (mM, —▼—) obtidos para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES.

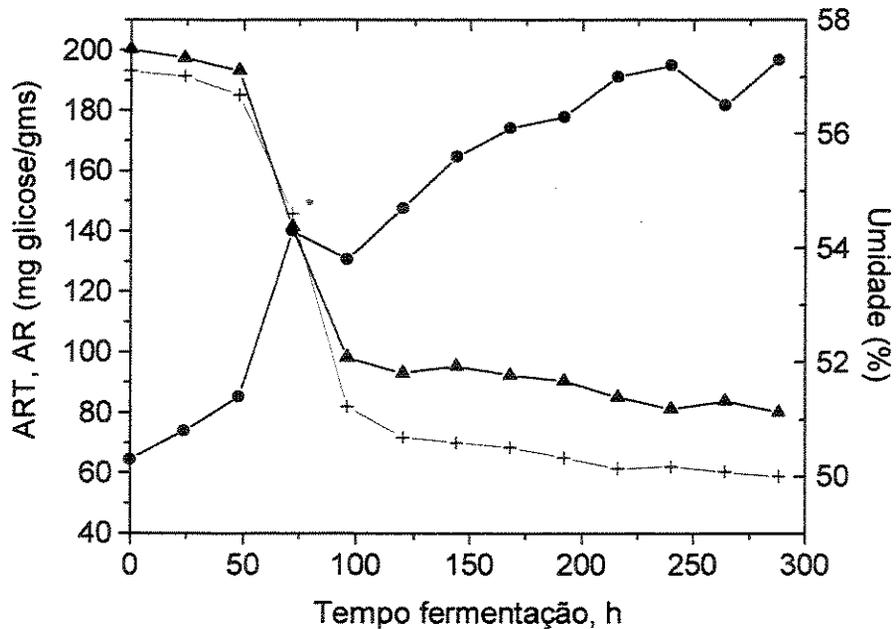


Figura 4.16. Perfis de ART (mg glicose/gms, —▲—), umidade (% , —●—) e AR (mg glicose/gms, —+—) obtidos para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES.

O elevado período da fase lag deve-se, provavelmente a adaptação do fungo à sua nova condição ou meio de crescimento. Uma vez adaptado ao meio, o fungo cresce de forma exponencial, tendo como substrato a glicose presente no meio, a qual tem seu conteúdo diminuído como se pode observar nos perfis de AR e de ART (Figura 4.16). A redução no conteúdo de AR foi mais acentuada ao longo da fase log de crescimento do fungo e mais amena na fase estacionária, permanecendo praticamente constante na fase de autólise.

Para os polifenóis, observa-se um perfil semelhante ao das proteínas, o que faz inicialmente pressupor que a variação no conteúdo de polifenóis está associado ao crescimento do fungo. Por outro lado, pode-se afirmar que as condições (pH e relação sólido:solvente) estabelecidas para a extração das proteínas (item 3.2.2, Capítulo 3) favorecem também a extração dos polifenóis. Azzoni (2002), trabalhando com recuperação e purificação de proteínas (especificamente a aprotinina recombinante) a partir de sementes de milho transgênico, estudou a influência que a força iônica e o pH da extração de proteínas exercem sobre o conteúdo de polifenóis. Concluiu que a força iônica, em termos de concentração de NaCl (na faixa de valores estudados de 0 a 300 mM), apresentou pouca influência sobre o conteúdo de polifenóis. Porém, em termos de pH, os resultados indicaram aumento significativo na concentração de polifenóis quando o pH passa de 4,0 para 10,0. Foi obtida a concentração de polifenóis de 0,229 mM para o pH 4,0 contra 0,654 mM para o pH 10,0.

Como a extração das proteínas da massa fermentada de *D. monoceras* foi a pH 9,0 pressupõe-se, portanto, que tenha ocorrido maior extração de compostos fenólicos presentes no substrato, para este valor de pH. Porém, devido à recuperação das proteínas por precipitação obteve-se níveis finais inferiores de polifenóis, alcançando valor máximo de 0,265 mM em 144 h (Figura 4.15). Este valor encontra-se próximo ao encontrado por Azzoni (2002) para faixa de pH de extração igual a 4,0. O autor concluiu, baseado em dados disponíveis na literatura, que a quantidade de polifenóis extraída em pH 3,0 e 4,0 não é suficientemente alta para ocasionar perdas expressivas de proteína ativa durante o processo de recuperação e purificação de aprotinina recombinante.

O teor de umidade do meio (Figura 4.16) teve aumento de 13% ao final da fermentação, como era esperado. O metabolismo primário, utilizado na produção

de energia, ocasiona a produção de CO<sub>2</sub> pela respiração do fungo, entre outros gases, o que resulta em perdas de matéria seca. Essas perdas de material, associadas ao acúmulo de água no meio fermentativo, justificam o aumento de umidade no meio. Segundo Doelle et al (1992), a umidade apresenta, para cada tipo de substrato, uma relação característica com a atividade de água. A relação entre  $a_w$  e a umidade não é linear e alterações no conteúdo da umidade resultam em variações relativamente pequenas na atividade de água. O valor ótimo de  $a_w$  para o crescimento de alguns fungos usados em processos de FES foi determinado como sendo 0,96 no mínimo. Neste estudo, a atividade de água passou de um valor inicial de 0,96 para 0,98 ao término da fermentação (aumento de 2%, apenas). Somente a partir de 96 h apresentou um aumento mais pronunciado, resultando no crescimento mais acelerado do fungo, mantendo-se praticamente constante até o final da fermentação. De acordo com Doelle et al. (1992), a manutenção do valor da atividade de água no mesmo patamar da fase do crescimento resulta na produção da biomassa sem esporulação do fungo.

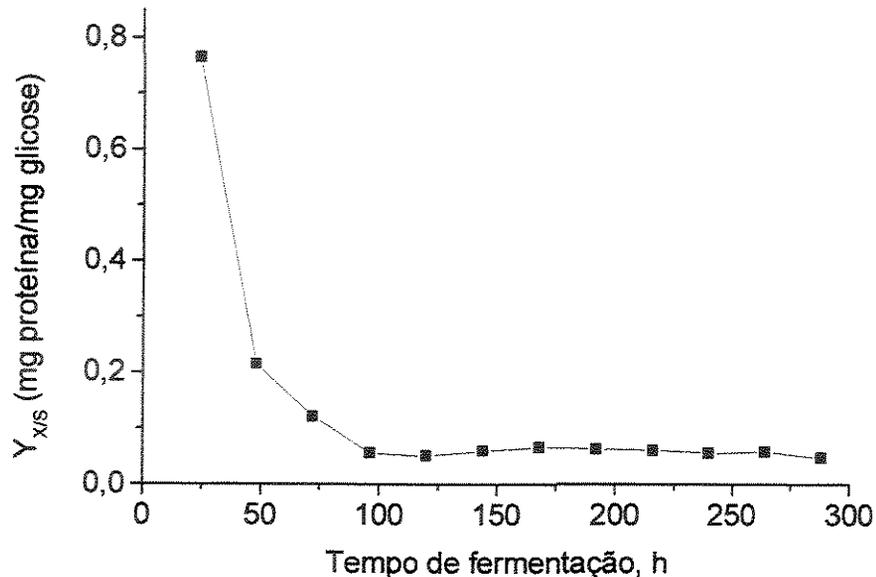
A ação microbiana sobre o substrato pode conduzir a mudanças na  $a_w$  do substrato. A oxidação de carboidratos libera água, aumentando a  $a_w$  do substrato, caso a água não seja removida durante o processo (Raimbault & Alazard, 1980; Durand & Chereau, 1988). No caso da fermentação com *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* a temperatura ideal de crescimento foi estabelecida em 25°C (Menezes, 1995) e, neste caso, a injeção de ar saturado na temperatura ambiente, associado à natureza pouco exotérmica da reação, aumentou a pressão de vapor d'água no substrato resultando em acréscimo na atividade de água e umidade do mesmo.

#### 4.4.1. Coeficiente de Rendimento $Y_{X/S}$

O gráfico da Figura 4.17 mostra o perfil do coeficiente de rendimento,  $Y_{X/S}$ , calculado para a fermentação, o qual relaciona a quantidade de biomassa ( $X$ ) produzida em qualquer tempo "t" com o respectivo consumo de substrato ( $S$ ), de acordo com a equação abaixo:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_t - X_0)}{(S_0 - S_t)} \quad (\text{mg proteína / mg glicose})$$

Verifica-se redução acentuada nos valores de  $Y_{XS}$  até 96h de fermentação, período no qual ocorre aumento exponencial da massa celular com grande consumo de substrato. Entretanto, ao longo da fase estacionária,  $Y_{XS}$  se mantém constante uma vez que se verifica um menor consumo de glicose, necessário apenas para a manutenção do fungo.



**Figura 4.17.** Perfil de  $Y_{XS}$  obtido para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES.

O perfil de  $Y_{XS}$ , associado ao fato dos açúcares do meio não terem sido completamente consumidos ao final da fermentação, pode ser um indicativo de limitação de oxigênio no sistema.

#### 4.4.2. Alternativas para a Prevenção da Compactação do Meio Sólido

Verificou-se, ao longo da fermentação, encolhimento do leito de fermentação, que se deve à perda de matéria seca, devida à liberação de gases, e ao umedecimento da massa, em função da entrada de ar saturado, compactando dessa forma o meio fermentado e formando caminhos preferenciais para o escoamento do oxigênio, o qual tende a passar pela parte externa do leito, circundando o mesmo. Esse fato vem a comprometer a eficiência de transferência de oxigênio para as regiões mais internas do meio de fermentação, dando origem

à formação de gradientes de concentração de oxigênio ao longo do leito, limitando, desta forma, o crescimento aeróbio do fungo de forma homogênea e, por consequência, afetando o rendimento do processo.

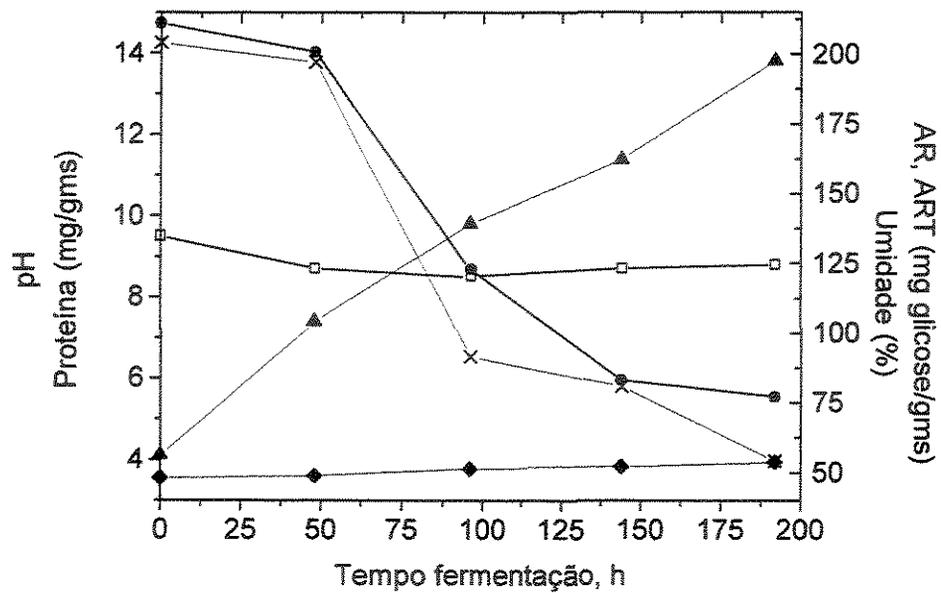
Visando amenizar a compactação do meio e melhorar o acesso do oxigênio ao longo do leito de fermentação, foram feitos ensaios considerando as seguintes alternativas: 1) utilização de material inerte (esferas de vidro, de 2 mm de diâmetro) homogeneamente misturado ao meio de fermentação, para prevenir a compactação e 2) uso do material inerte associado à redução da umidade do ar de entrada do biorreator, para prevenir a compactação e melhorar a transferência de oxigênio. Assim, foram feitos experimentos usando-se as doze colunas de fermentação, distribuídas em três ensaios:

- Ensaio 1 (E1): Quatro colunas usadas para a fermentação normal (semelhante as anteriores) que servirá de controle, conforme as condições especificadas no item 4.4.

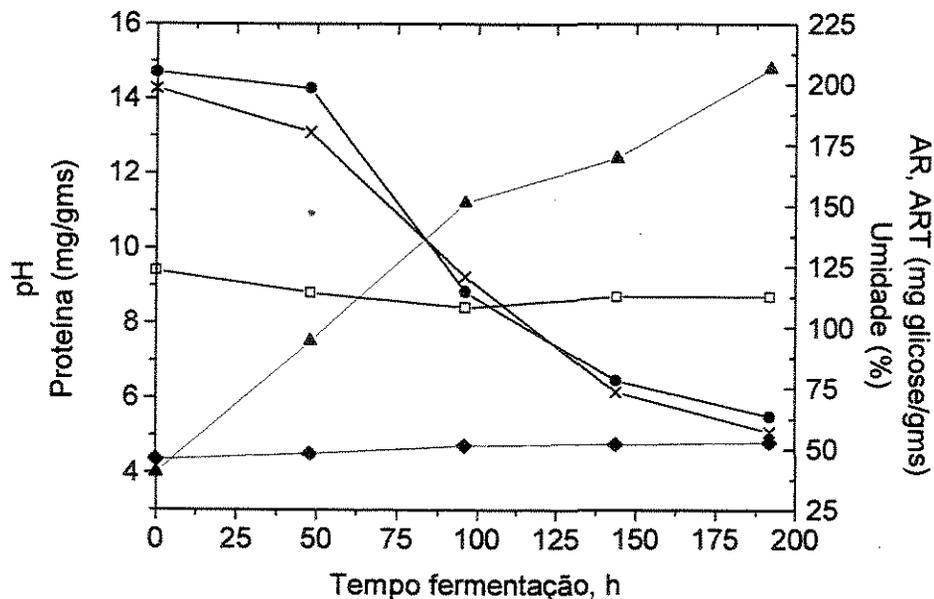
- Ensaio 2 (E2): Idem à E1, porém usando 30% (p/p) de esferas de vidro de 2 mm de diâmetro (previamente esterilizadas), homogeneamente misturadas ao meio de fermentação.

- Ensaio 3 (E3): Idem à E2, porém sem adicionar água aos distribuidores secundários, para reduzir a umidade do ar de entrada dos reatores.

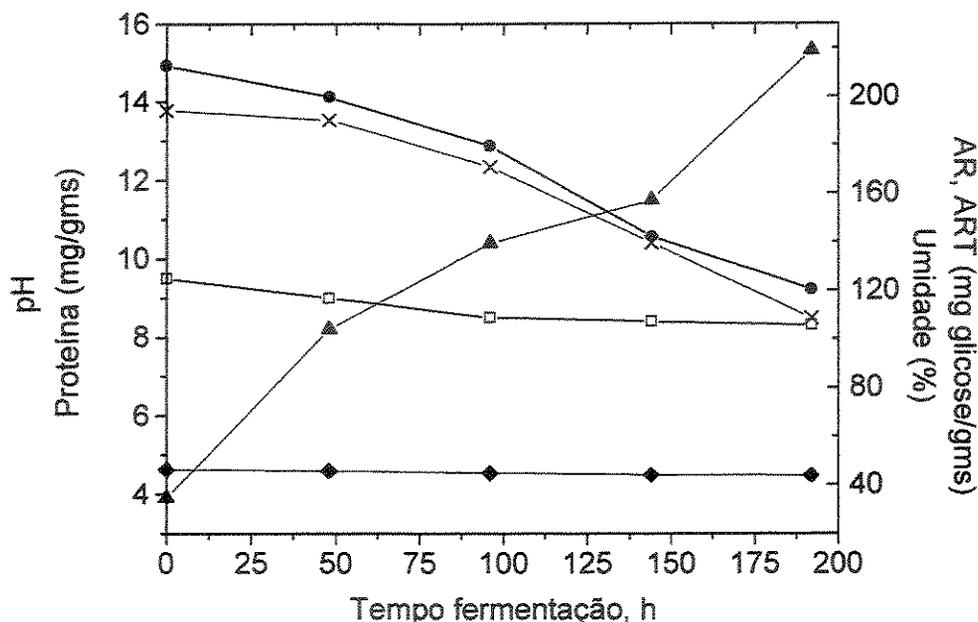
Cada ensaio foi feito em 4 colunas, que foram consecutivamente retiradas após 48, 96, 144 e 192 h de fermentação para análise de umidade e pH nas amostras sólidas e AR, ART e proteínas nos extratos brutos obtidos das mesmas. As Figuras 4.18, 4.19 e 4.20 apresentam os perfis cinéticos obtidos para cada ensaio. Verificou-se, após 192 h, menor quantidade de massa fermentada seca obtida para os ensaios E2 e E3, indicando que ocorreu maior liberação de gases durante a fermentação, proporcionada provavelmente por reação metabólica mais intensa. A variação no conteúdo de umidade ao final da fermentação foi de +12,1% para o ensaio E1, +15,2% para o ensaio E2 e -5,2% para o ensaio E3. O aspecto visual do ensaio E3 indicou menor compactação do meio, ocasionada pela introdução de ar menos úmido no biorreator, apesar da maior liberação de gases (massa seca).



**Figura 4.18.** Perfis de pH (— □ —), proteína (mg/gms, —▲—), ART (mg glicose/gms, —●—), AR (mg glicose/gms, —x—) e umidade (% , —◆—) obtidos para o ensaio E1, para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES.



**Figura 4.19.** Perfis de pH (— □ —), proteína (mg/gms, —▲—), ART (mg glicose/gms, —●—), AR (mg glicose/gms, —x—) e umidade (% , —◆—) obtidos para o ensaio E2, para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES.



**Figura 4.20.** Perfis de pH (— □ —), proteína (mg/gms, —▲—), ART (mg glicose/gms, —•—), AR (mg glicose/gms, —x—) e umidade (% , —♦—) obtidos para o ensaio E3, para o crescimento de *D. monoceras* nas condições otimizadas da FES.

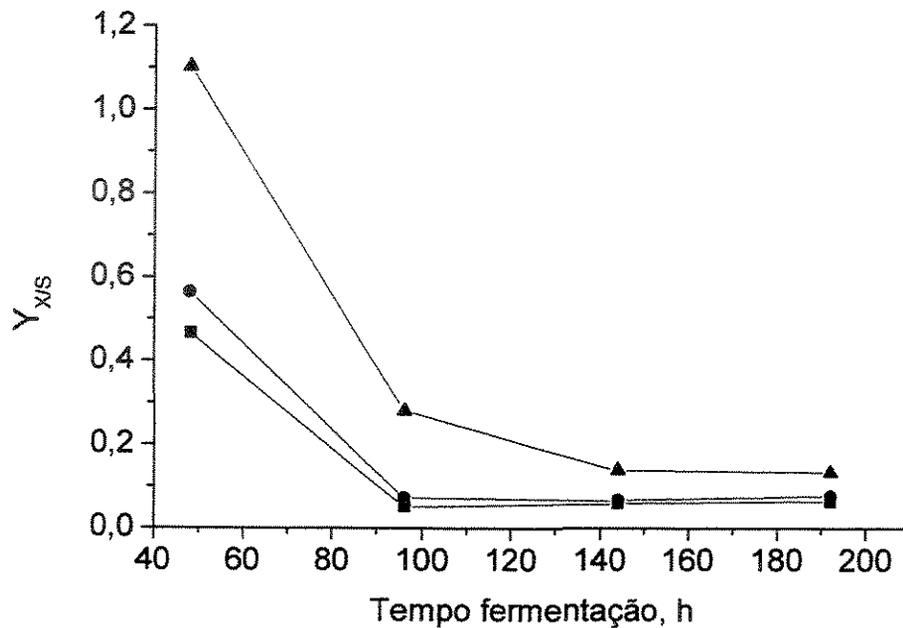
A produtividade (para 192h de fermentação) obtida para o ensaio E3 foi de 11,4 mg proteína/gms ao passo que se obteve 9,7 mg proteína/gms para o ensaio E1 e 10,8 mg proteína/gms para o ensaio E2. Portanto, o menor umedecimento e compactação verificada no ensaio E3, devido a introdução de ar não saturado na coluna, resultou em acréscimo de 17,5% no valor da produtividade, proporcionado certamente pela transferência mais eficiente de oxigênio.

Nas Figuras 4.18 a 4.20 pode-se observar a diminuição dos açúcares redutores evidenciando o consumo de glicose pelo fungo durante o crescimento. O gráfico da Figura 4.21 apresenta os perfis do coeficiente de produção  $Y_{XS}$  calculado para os três ensaios.

Pode-se observar valores mais elevados do coeficiente de produção para o ensaio E3, indicando maior eficiência de crescimento do fungo com consumos menores de substrato. O fato dos ensaios E1 e E2 apresentarem crescimento fúngico com consumos maiores de glicose pode ser um indício de condições de

anaerobiose, a qual pode ocorrer nas regiões mais internas do leito de fermentação com a presença evidente de menores quantidades de oxigênio.

Oostra et al. (2001) e Jennings (1995) conduziram o crescimento de *Rhizopus oligosporus* em FES em meio contendo glicose e observaram que, sob concentrações reduzidas de oxigênio, obtinha-se a conversão anaeróbica de glicose em etanol. Estes autores verificaram também valores menores para o coeficiente de produção  $Y_{X/S}$ , fato que atribuíram às condições de anaerobiose.



**Figura 4.21.** Perfis do coeficiente de produção  $Y_{X/S}$  obtidos para os ensaios E1 (— ■ —), E2 (— ● —) e E3 (— ▲ —), para o crescimento de *D. monoceras*, nas condições otimizadas da FES. Os valores de  $Y_{X/S}$  são expressos em mg proteína/mg glicose.

Observa-se nos ensaios E1 e E2 (Figuras 4.18 e 4.19) uma redução no valor do pH até 96 h de fermentação e, após, um ligeiro acréscimo. No ensaio E3 (Figura 4.20) verifica-se uma diminuição constante do pH até o valor de 8,3. Segundo Doelle et al. (1992), o pH de uma cultura de microrganismos pode mudar durante a fermentação em resposta à atividade metabólica. A razão mais óbvia para o decréscimo no pH é a secreção de ácidos orgânicos como ácido lático ou

acético. Por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos, que porventura possam estar presentes em certos meios de cultura, conduzirá ao aumento do pH. Para o caso do ensaio E3, como a menor umidificação do meio, aliada a melhor respiração do fungo, conduziu ao crescimento mais expressivo do mesmo é possível conjecturar que tenha ocorrido alguma mudança nas vias metabólicas do fungo pela maior acessibilidade das hifas aos nutrientes, resultando na excreção de produtos de caráter menos básico. Por outro lado, pode-se também afirmar que a diminuição da quantidade de água ao longo do ensaio E3 (bem como à alterações nas condições de temperatura e pressão) induziu a diferentes condições de equilíbrio dos solutos dos nutrientes no meio de fermentação, fazendo baixar o pH.

O valor de pH inicial 9,5 otimizado neste trabalho para o crescimento do *D. monoceras* em meio sólido pode ser considerado elevado se comparado ao valor de pH inicial 7,0 usado por Menezes (1995) para o crescimento desse fungo em fermentação submersa por meio do uso do caldo Czapeck. Segundo Doelle et al. (1992), os fungos filamentosos crescem em condições do meio na faixa de pH de 2 a 9, com valor ótimo geralmente entre 3,8 e 6,0, dependendo do meio de fermentação utilizado. Como exemplos de valores de pH inicial elevado para crescimento de fungos filamentosos em FES, podem ser citados Yadav (1988), o qual cultivou *Coprinus* sp. em palha de trigo com pH inicial igual a 9,0 e Mitchell et al. (1988), que trabalhando com amido de mandioca, obteve o crescimento de *Aspergillus oryzae* com pH inicial igual a 8,0.

#### **4.4.3. Considerações sobre a Variabilidade da Produtividade**

Neste trabalho, os ensaios de fermentação foram feitos em três blocos distintos: determinação prévia das condições de fermentação, otimização das condições da FES e cinética de crescimento da biomassa fúngica. Para cada bloco, foi utilizado um conjunto de repiques de 12 tubos, obtidos a partir de diferentes tubos originados da cepa mãe, conforme descrito no item 3.2.2. Nos resultados obtidos, pode-se verificar diferenças significativas nos valores de produtividade obtidos nas mesmas condições operacionais, como é o caso do ponto máximo resultante do planejamento estatístico, que fornece o valor de 1,44 mg/gms/dia (Figs. 4.13 e 4.14) e os ensaios cinéticos, cujo valor máximo obtido

em 7 dias (168h) foi de 1,17 mg/gms/dia (calculado a partir da Figura 4.15). Produtividades maiores podem ser observadas também nos ensaios iniciais para determinação prévia das condições de fermentação (Figs. 4.2 e 4.3). Esta variabilidade observada deve-se tanto aos repiques sucessivos (obtidos do repique original) quanto à própria variabilidade do repique original, obtido da cepa mãe. Essas variações foram observadas durante o trabalho e, para reduzi-las e principalmente garantir a coerência dos resultados nos ensaios de otimização da FES, cada bloco de experimentos foi realizado a partir de um repique original e com no máximo 2 repiques sucessivos.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÕES II

#### RECUPERAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO EXTRATO BRUTO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos para a obtenção dos extratos com potencial alergênico após a recuperação das proteínas dos extratos brutos, mediante a precipitação das mesmas por diferentes agentes precipitantes. Será apresentada também uma avaliação dos níveis de concentração de proteínas e carboidratos obtidos nos extratos e, por último, um estudo visando uma remoção mais efetiva dos sais e polifenóis.

##### 5.1. Recuperação das Proteínas do Extrato Bruto

O extrato bruto de *D. monoceras*, obtido conforme item 3.2.2 (Capítulo 3), apresentou cor marrom escura e intensa, pois se constitui de mistura de diversos compostos que se encontram no meio fermentado e que são solúveis em água. De modo a melhor caracterizar as proteínas com potencial alergênico, as mesmas foram recuperadas a partir dos extratos brutos, usando processos de precipitação com solventes orgânicos e com sulfato de amônio, conforme descrito no item 3.2.3 (Capítulo 3).

Os métodos utilizados permitiram clarificar os extratos brutos de tal modo que se tornou possível identificar posteriormente as proteínas por meio de eletroforese SDS-PAGE, pois a cor dos extratos brutos e a presença de certas substâncias dificultavam a revelação e a definição das bandas protéicas, devido a formação de manchas escuras e contínuas ao longo de cada raia. Após a precipitação das proteínas dos extratos brutos, procedeu-se a filtração em gel com

Sephadex G-25 e diálise, para remoção de sais e polifenóis, de modo a se obter o extrato com potencial alergênico.

Foram realizados três ensaios de precipitação para se determinar a eficiência de recuperação das proteínas.

- Primeiro ensaio: precipitação com EtOH (70% v/v), seguido de precipitação com acetona (50% v/v);
- Segundo ensaio: precipitação apenas com EtOH (70% v/v);
- Terceiro ensaio: precipitação apenas com solução saturada de SAm (70% v/v).

No primeiro ensaio foram utilizadas as amostras de extratos brutos obtidas da curva de crescimento (cinética) do fungo (item 4.4, Capítulo 4). A Figura 5.1 mostra os 2 perfis obtidos para os conteúdos de proteína antes (extrato bruto) e após a precipitação, filtração em gel e diálise (extrato com potencial alergênico). O processo de recuperação de proteínas do extrato bruto acarretou perdas no conteúdo protéico, que podem ser visualizadas pela diferença entre os dois perfis. A recuperação média de proteínas foi determinada em  $31,8 \pm 9,5\%$  para o primeiro ensaio.

No segundo e no terceiro ensaio foram utilizadas as amostras de extratos brutos obtidas a partir de nova fermentação. As Figuras 5.2 e 5.3 apresentam os perfis (extratos bruto e com potencial alergênico) de proteína obtidos para ambos os ensaios. A recuperação média de proteínas foi determinada como sendo  $42,8 \pm 7,4\%$  para a precipitação apenas com EtOH e  $38,6 \pm 4,2\%$  para a precipitação apenas com sulfato de amônio (SAm).

Pode-se observar que as precipitações com EtOH (segundo ensaio) e com SAm (terceiro ensaio) apresentaram maior rendimento em termos de recuperação das proteínas do extrato bruto, ficando portanto descartada a utilização da acetona como segundo agente precipitante, no primeiro ensaio.

A utilização da acetona como segundo agente precipitante (no primeiro ensaio) permitiu a obtenção de um extrato com potencial alergênico mais clarificado, o que facilitou a identificação posterior das proteínas no gel de eletroforese. Por outro lado, mesmo sem a utilização da acetona, a identificação das proteínas no gel de eletroforese foi possível.

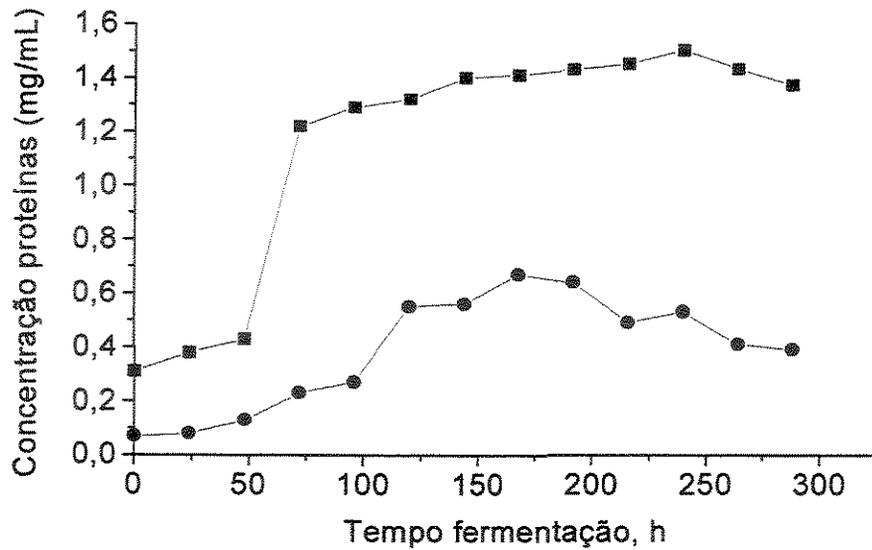


Figura 5.1. Perfis de proteína (mg/mL) no extrato bruto (— ■ —) e no extrato com potencial alergênico (— ● —), sendo este último obtido por precipitação com EtOH e acetona (primeiro ensaio).

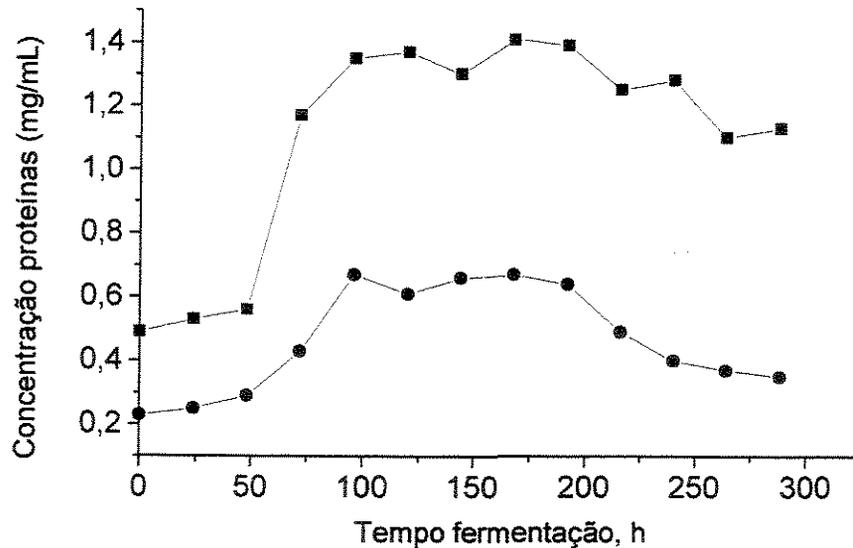
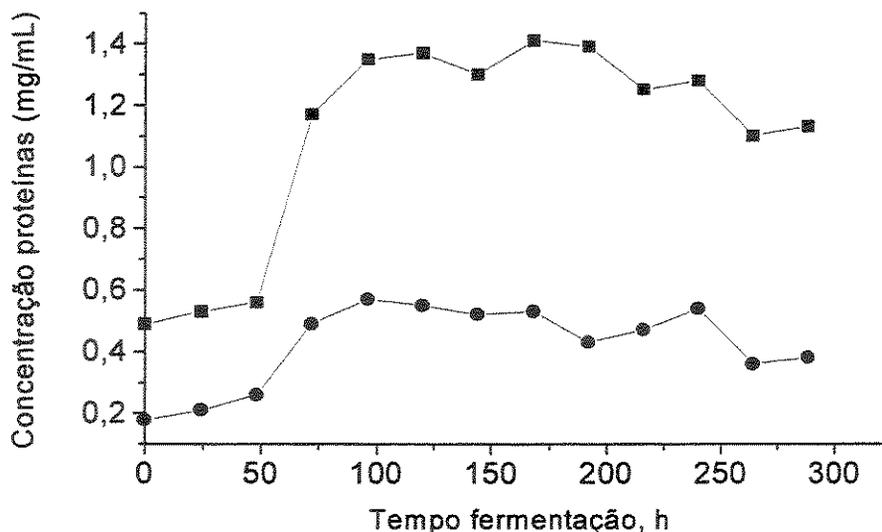


Figura 5.2. Perfis de proteína (mg/mL) no extrato bruto (— ■ —) e no extrato com potencial alergênico (— ● —), sendo este último obtido por precipitação com EtOH (segundo ensaio).



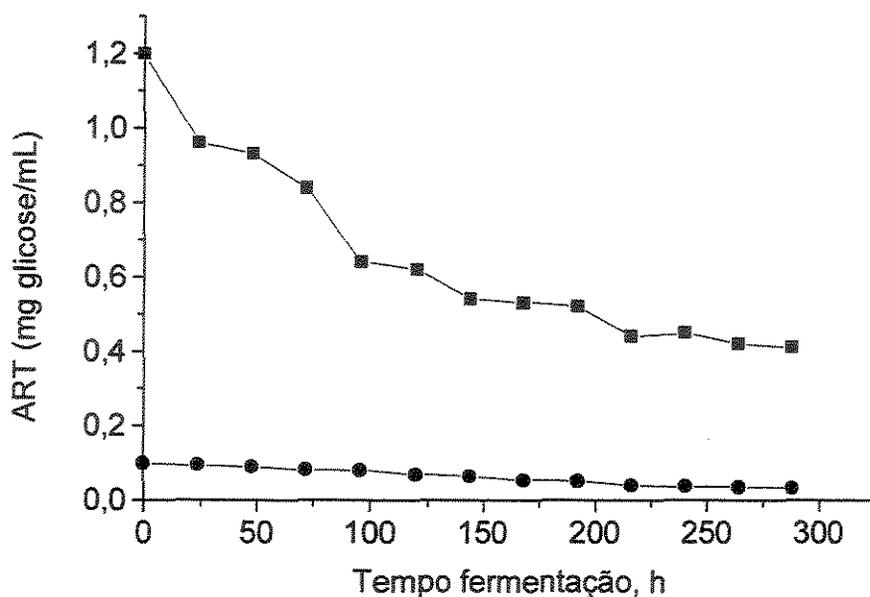
**Figura 5.3.** Perfis de proteína (mg/mL) no extrato bruto (— ■ —) e no extrato com potencial alergênico (— • —), sendo este último obtido por precipitação com SAM (terceiro ensaio).

O tipo de precipitado formado no ensaio com SAM resultou em uma centrifugação ineficiente do mesmo. O sobrenadante, contendo o precipitado residual não centrifugado, foi submetido a uma filtração manual, com tecido de poliamida. Em função dos resultados obtidos foi descartada a precipitação sucessiva com EtOH e acetona.

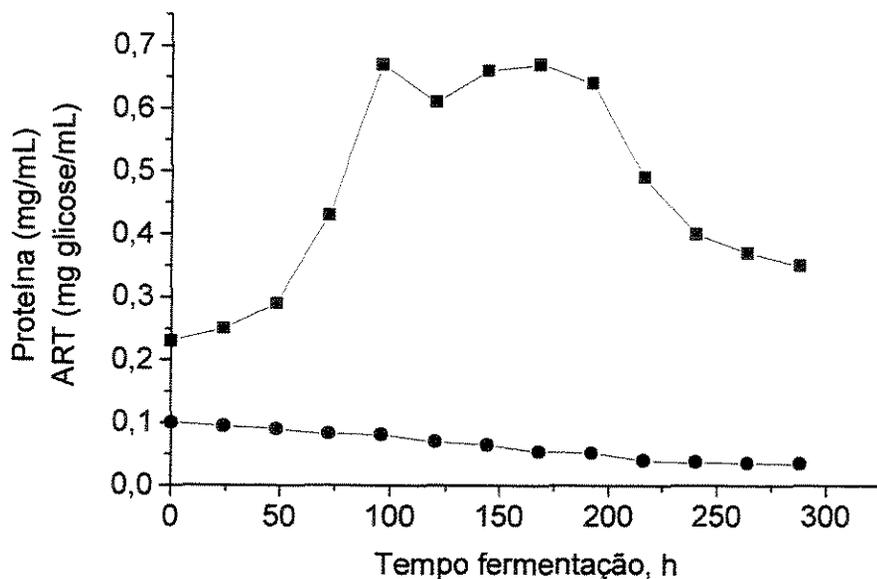
## 5.2. Relação entre os Conteúdos de Proteína e Carboidrato nos Extratos

A Figura 5.4 mostra os 2 perfis obtidos para os conteúdos de ART antes (extrato bruto) e após a precipitação com EtOH, filtração em gel e diálise (extrato com potencial alergênico). Foram obtidos valores baixos de ART ( $< 0,1$  mg/mL) para o extrato com potencial alergênico, indicando que os açúcares presentes nos extratos brutos foram removidas através do processo de precipitação, filtração em gel e diálise. A remoção média de açúcares foi determinada em  $90,0 \pm 1,3\%$ .

A Figura 5.5 apresenta os perfis de ART e proteína obtidos para os extratos com potencial alergênico. Considerando-se apenas os conteúdos de proteínas e carboidratos nos extratos com potencial alergênico, obteve-se os valores médios de 86,2% de proteínas e 13,8% de carboidratos.



**Figura 5.4.** Perfis de ART (mg glicose/mL) no extrato bruto (— ■ —) e no extrato com potencial alergênico (— ● —), sendo este último obtido por precipitação com EtOH.



**Figura 5.5.** Perfis de proteína (mg/mL, — ■ —) e ART (mg glicose/mL, — ● —) no extrato com potencial alergênico obtido por precipitação com EtOH.

As maiores porcentagens de proteína foram observadas para as amostras de extratos com potencial alergênico de 96 a 288 h de fermentação. Para os extratos brutos, obteve-se a composição média de 72,1% de proteínas e 27,9% de carboidratos, para os tempos de fermentação entre 96 e 288h. Menezes (1995) determinou, para o extrato bruto de *D. monoceras*, obtido após o 28º dia de fermentação em meio líquido, a composição de 74,4% de proteínas e 25,6% de carboidratos.

### 5.3. Considerações sobre a Quantificação de Proteínas nos Extratos

Um aspecto importante a ser ressaltado refere-se à quantificação de proteínas nos extratos pelo método de Bradford, usado neste trabalho. De acordo com Singh et al (1992), a utilização do método de Bradford resulta em valores menores de concentração de proteínas para extratos alergênicos. Sabidamente, o método é rápido e sensível, porém a precisão dos resultados é dependente da ligação das proteínas presentes no extrato com o corante Coomassie brilliant blue G-250, uma vez que a formação do complexo colorido ocorre preferencialmente com as proteínas de maior tamanho. Assim sendo, é muito provável que ocorra a inibição, em certo grau, do processo de formação do complexo proteína-corante durante a análise devido a presença, além de proteínas, de carboidratos, polifenóis e alguns pigmentos nos extratos alergênicos.

Segundo Singh et al (1992), a maioria dos métodos geralmente utilizados para a quantificação de proteínas de extratos apresentam resultados variáveis devido à presença de interferentes. De modo a determinar o método mais apropriado para a estimativa do teor protéico de extratos alergênicos de fungos, o autor e seus colaboradores testaram os métodos de Lowry modificado (LM), Bradford (B), micro-Kjeldahl (MK), ácido bicinconínico (BCA) e ácido bicinconínico modificado (MBCA). O método de Bradford resultou em menores valores de proteína e o método MK apresentou os valores mais elevados, ficando os métodos LM, BCA e MBCA com concentrações intermediárias de proteínas para a maioria dos extratos alergênicos fúngicos testados.

Neste trabalho foram realizados testes comparativos entre os métodos de Bradford, LM (Hartree, 1972) e BCA para a determinação do conteúdo de proteínas nos extratos com potencial alergênico de *D. monoceras*. O método LM

apresentou problemas de estabilidade, devido à formação de precipitados durante a análise. Com o método BCA obteve-se valores quatro vezes maiores de concentração em relação ao Bradford. Foram observados, pelo método BCA, valores médios de 5,6 mg/mL de proteínas para os extratos brutos (obtidos para os tempos de fermentação de 96 a 240 h) contra 1,4 mg/mL de proteínas pelo método de Bradford. Portanto, devido a essas variações, deve-se ter cuidado ao se comparar valores de produtividade entre o método FES conduzido neste trabalho e o método de cultivo em meio líquido conduzido por Menezes (1995), para o mesmo fungo, uma vez que este autor utilizou o método de Lowry et al (1951) para a determinação do conteúdo de proteína dos extratos.

#### **5.4. Remoção de Sais e Polifenóis**

A formulação dos nutrientes usada para a fermentação foi baseada na composição do meio Czapeck, a qual inclui diversos sais, além da adição de carboidratos e peptona. A maior quantidade de compostos fenólicos (taninos, flavonóides e quinonas) no meio fermentado deve-se provavelmente à natureza química do farelo de trigo. As proteínas do extrato podem interagir com moléculas de tamanho pequeno que estejam presentes, como sais e polifenóis, as quais devem ser removidas. A presença de polifenóis pode resultar em interferências nos testes cutâneos a serem realizados nos pacientes com sintomas de alergia respiratória, além de problemas nas técnicas de separação por cromatografia líquida.

No processo de recuperação de proteínas por precipitação, descrito no item 5.1, ocorreu a remoção parcial destes sais e polifenóis dos extratos brutos. Para uma melhor remoção dos sais e polifenóis, procedeu-se, após a precipitação das proteínas, a filtração em gel em coluna contendo Sephadex G-25. Em seguida fez-se uma diálise no líquido eluído da coluna, conforme descrito no item 3.2.3.

Para avaliar o rendimento de remoção dos sais na filtração em gel e na diálise, foi medida a condutividade eletrolítica nos extratos com potencial alergênico antes e após a filtração em gel e após a diálise. Através da curva padrão de condutividade eletrolítica, preparada com soluções de concentrações conhecidas de sulfato de amônio, determinou-se as concentrações de sal nos extratos.

A remoção de polifenóis foi avaliada pelo conteúdo de polifenóis antes e após a filtração em gel e após a diálise. As Figuras 5.6 e 5.7 mostram os perfis das concentrações de sais e polifenóis, respectivamente. Foram testados os extratos com potencial alergênico obtidos por precipitação com EtOH, seguida de precipitação com acetona. Foram obtidos os seguintes valores médios para a remoção de sais:

- remoção de sais por filtração em gel:  $42,7 \pm 10,5\%$ ;
- remoção de sais por diálise:  $72,8 \pm 7,5\%$
- remoção de sais total (incluindo filtração em gel e diálise):  $84,2 \pm 6,8\%$ .

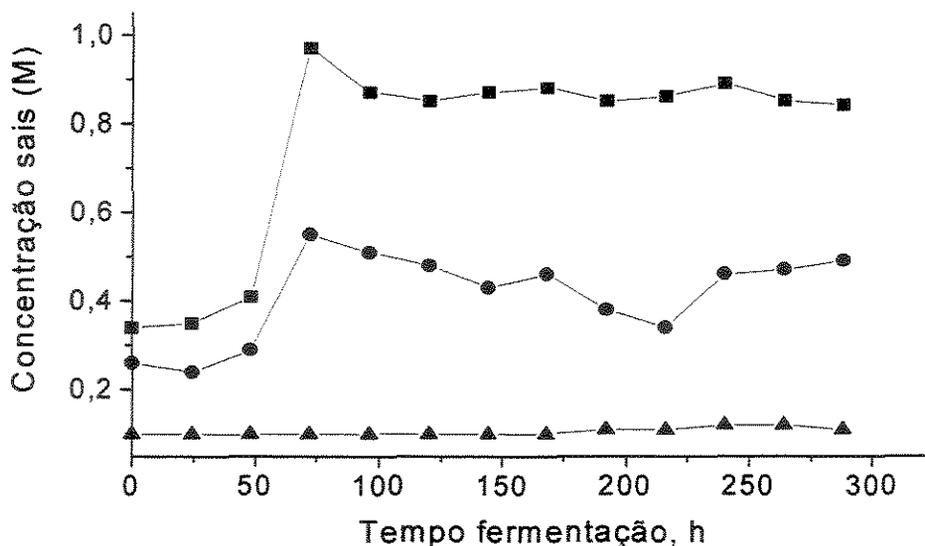
Pode-se observar que a diálise foi decisiva na remoção dos sais, alcançando-se um valor mínimo e constante de concentração de sais, na ordem de aproximadamente 0,10 M. Esse valor de concentração deve-se, provavelmente, à presença de sais remanescentes, ou outros compostos com cargas elétricas, que estariam associadas as proteínas e que, por este fato, não puderam ser removidas pela diálise em função do diâmetro de corte da membrana utilizada.

Foram obtidos os seguintes valores médios para a remoção de polifenóis:

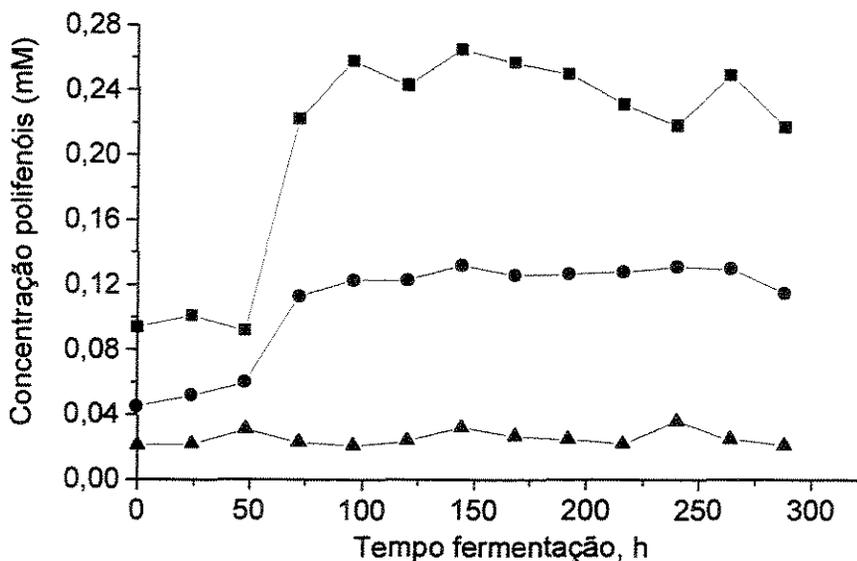
- remoção de polifenóis por filtração em gel:  $47,4 \pm 5,0\%$
- remoção de polifenóis por diálise:  $73,4 \pm 12,1\%$
- remoção de polifenóis total (filtração em gel e diálise):  $85,8 \pm 7,5\%$ .

Estes valores são próximos aos encontrados para a remoção de sais, o que indica que a remoção de polifenóis, por filtração em gel e por diálise, ocorreu concomitantemente com a remoção de sais.

Além da diálise, outros métodos foram testados para a remoção de polifenóis tais como a adsorção com as resinas Dowex 1x8 e XAD-4, a complexação com PVPP e a ultrafiltração, conforme descrito no item 3.2.3 (Capítulo 3). A Tabela 5.1 apresenta as concentrações de polifenóis obtidas antes e após cada teste, bem como as porcentagens de remoção.



**Figura 5.6.** Perfis de concentração de sais dos extratos com potencial alergênico obtidos no processo de separação por filtração em gel e diálise, realizada após precipitação das proteínas do extrato bruto por adição sucessiva de EtOH e acetona. Antes da filtração em gel (—■—), após a filtração em gel (—●—) e após a diálise (—▲—).



**Figura 5.7.** Perfis de concentração de polifenóis dos extratos com potencial alergênico obtidos no processo de separação por filtração em gel e diálise, realizada após precipitação das proteínas do extrato bruto por adição sucessiva de EtOH e acetona. Antes da filtração em gel (—■—), após a filtração em gel (—●—) e após a diálise (—▲—).

Para estes testes partiu-se de uma mesma amostra de extrato com potencial alergênico (amostra no tempo de fermentação de 192 h), porém sem a etapa da diálise. Pelos resultados obtidos, observa-se que a maior eficiência de separação ocorreu com a ultrafiltração (61,4%), porém com menor porcentagem de remoção que a diálise, anteriormente determinada (73,4%).

Foi determinado também o conteúdo de proteína total antes e após a separação dos polifenóis e verificou-se uma perda em torno de 15% de proteínas na ultrafiltração e 4% na diálise. Nas resinas PVPP, XAD-4 e Dowex 1x8 não foram observadas perdas de proteínas.

**Tabela 5.1.** Concentrações de polifenóis obtidas a partir dos diferentes métodos de separação, e suas respectivas % de remoção.

Método de separação	Concentração de polifenóis (mM), antes separação	Concentração de polifenóis (mM), após separação	% remoção de polifenóis
Complexação por PVPP	0,127	0,110	13,4
Adsorção em XAD-4	0,127	0,076	40,2
Adsorção em Dowex 1x8	0,127	0,087	31,5
Ultrafiltração	0,127	0,049	61,4

## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS E DISCUSSÕES III

#### CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS COM POTENCIAL ALERGÊNICO

Neste capítulo, inicialmente são apresentadas as eletroforeses (SDS-PAGE), para a identificação das massas moleculares das proteínas presentes nos extratos com potencial alergênico, e também os resultados obtidos da focalização isoelétrica para a determinação dos pontos isoelétricos das proteínas. A seguir, são apresentados os resultados dos testes cutâneos (“prick-test”), aplicados nos pacientes com sintomas de alergia respiratória, e também os resultados das análises de “Dot-Blotting” e “Immunoblotting” para a avaliação do grau de alergenicidade *in vitro* dos extratos com potencial alergênico. Finalmente, são apresentados os estudos feitos com cromatografia de permeação em gel para a tentativa de fracionamento das proteínas dos extratos com potencial alergênico.

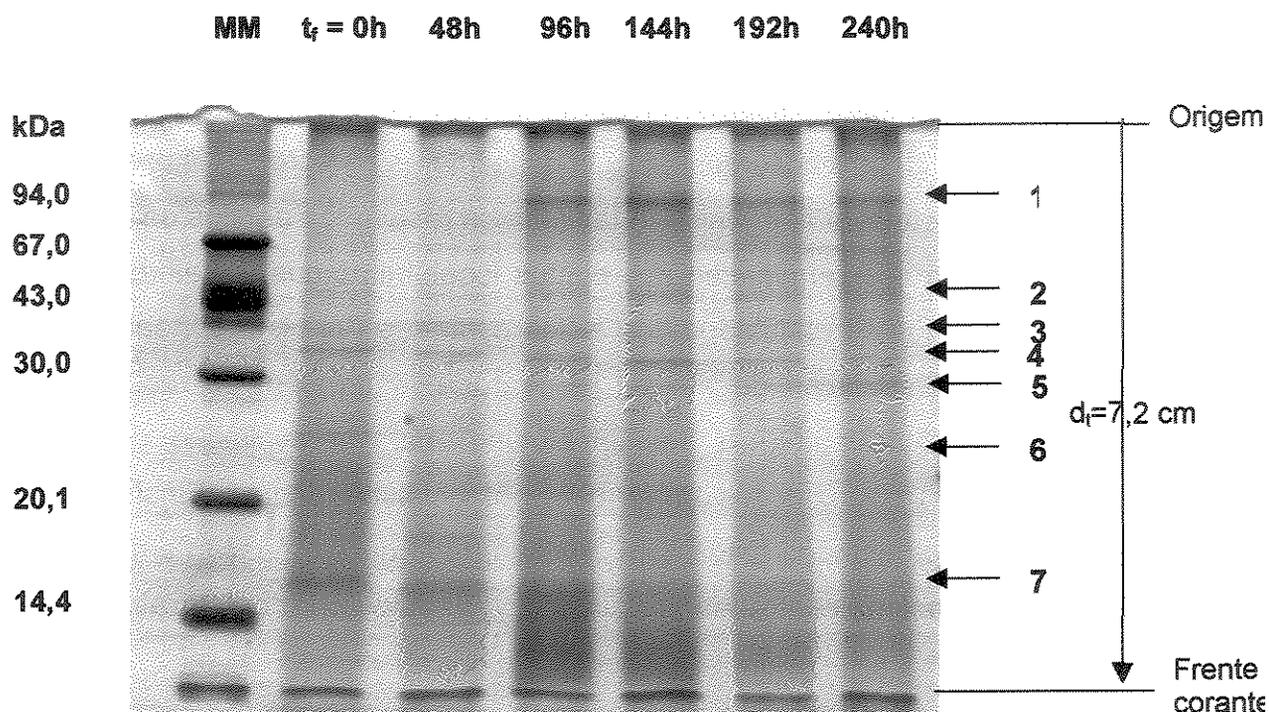
##### 6.1. Identificação das Proteínas

A identificação das proteínas nos extratos com potencial alergênico foi realizada por meio da análise de eletroforese SDS-PAGE. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de 15% de concentração de poliacrilamida para identificar as proteínas de baixa massa molecular (na faixa de 14,4 a 94,0 kDa), e gel de 10% de concentração de poliacrilamida para identificar as proteínas de alta massa molecular (na faixa de 53 a 212 kDa).

Foram utilizadas as amostras dos extratos com potencial alergênico obtidos por precipitação com EtOH e por precipitação com SAm, considerando os tempos de crescimento de 0, 48, 96, 144, 192 e 240h.

### 6.1.1. Identificação das Proteínas dos Extratos com Potencial Alergênico Obtidos por Precipitação com EtOH

A Figura 6.1 apresenta o eletroforetograma obtido para as seis amostras de extrato com potencial alergênico (0 a 240h), sendo o gel de 15% de poliacrilamida e marcadores de baixa massa molecular. A distância  $d_i$ , indicada na figura, foi utilizada para o cálculo da migração relativa ( $R_f$ ), a qual permitiu a determinação mais precisa das massas moleculares das proteínas nos extratos. A Tabela 6.1 resume as proteínas identificadas em cada amostra.



**Figura 6.1.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH, em gel com 15% poliacrilamida e marcadores (MM) de baixa massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas de baixa massa molecular identificadas no gel.

As proteínas de alta massa molecular das amostras dos extratos com potencial alergênico obtidos por precipitação com EtOH foram identificadas do mesmo modo, porém usando os marcadores de alta massa molecular em gel de 10% de poliacrilamida. A Figura 6.2 apresenta o eletroforetograma. A Tabela 6.2

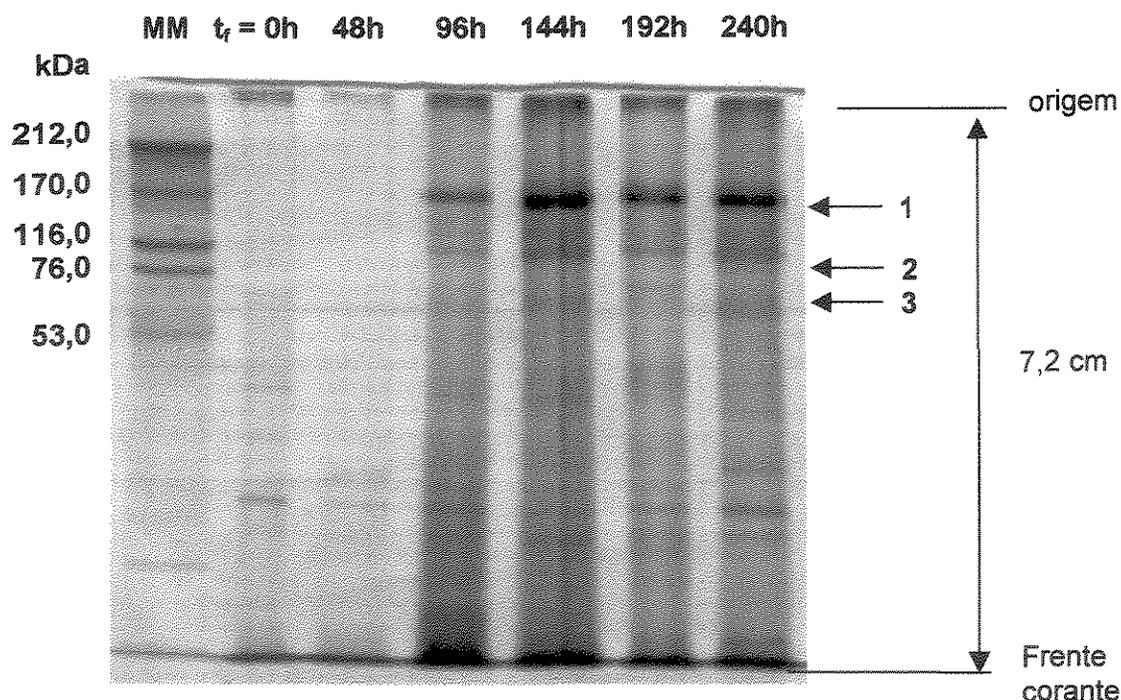
apresenta as proteínas identificadas no gel. A partir de 96h verificou-se no gel o aparecimento de proteínas de alta massa molecular.

**Tabela 6.1.** Proteínas de baixa massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH (gel de 15% de poliacrilamida).

Amostra	Proteínas (kDa)						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
	77,0	51,5	43,6	38,1	35,7	28,2	14,9
0		X	X	X		X	X
48 h		X	X	X			X
96 h	X	X	X	X	X		X
144 h	X	X		X	X		X
192 h	X	X		X	X		X
240 h	X	X		X	X		X

**Tabela 6.2.** Proteínas de alta massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH (gel de 10% de poliacrilamida).

Amostra	Proteínas (kDa)		
	(1)	(2)	(3)
	157,3	103,1	71,8
96 h	X	X	
144 h	X	X	
192 h	X	X	X
240 h	X	X	X



**Figura 6.2.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH, em gel com 10% de poliacrilamida e marcadores (MM) de alta massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas de alta massa molecular identificadas no gel.

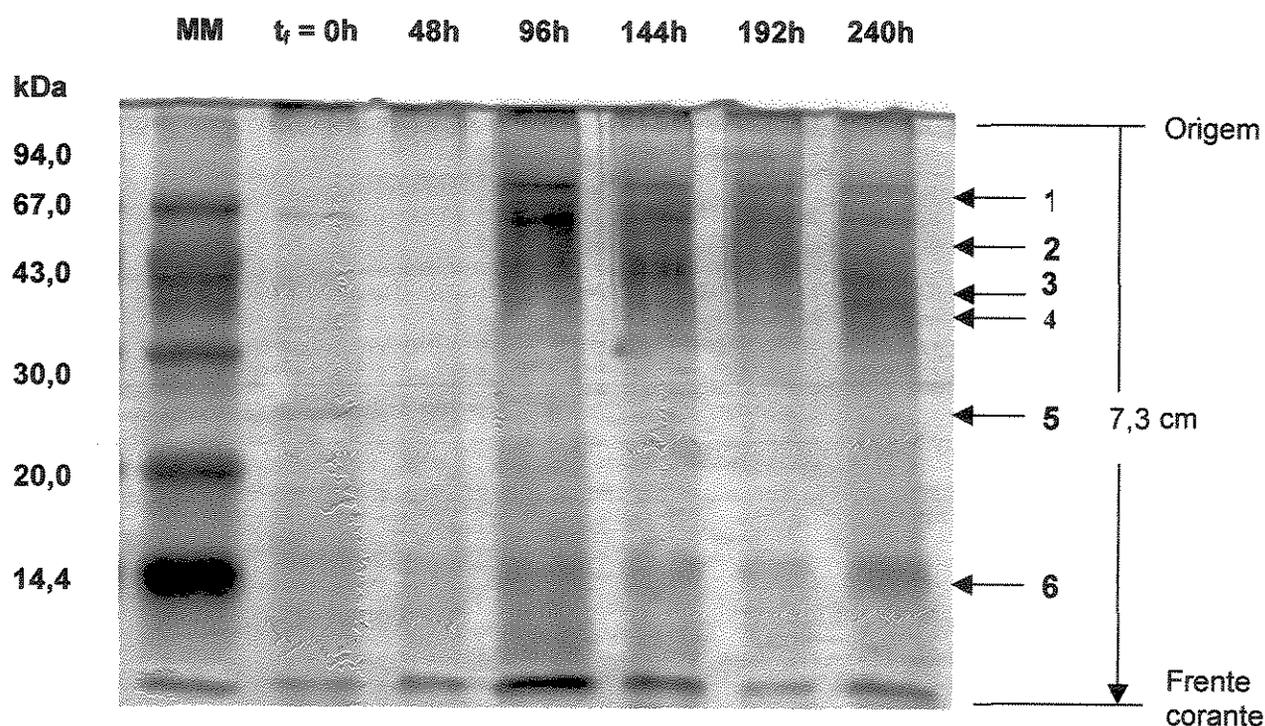
### 6.1.2. Identificação das Proteínas dos Extratos com Potencial Alergênico Obtidos por Precipitação com SAm

A Figura 6.3 apresenta o eletroforetograma obtido para as seis amostras de extrato com potencial alergênico (0 a 240h), sendo o gel de 15% de poliacrilamida e marcadores de baixa massa molecular. A Tabela 6.3 apresenta as proteínas identificadas no gel. Podemos observar o surgimento, a partir de 96h, das proteínas 1 a 6.

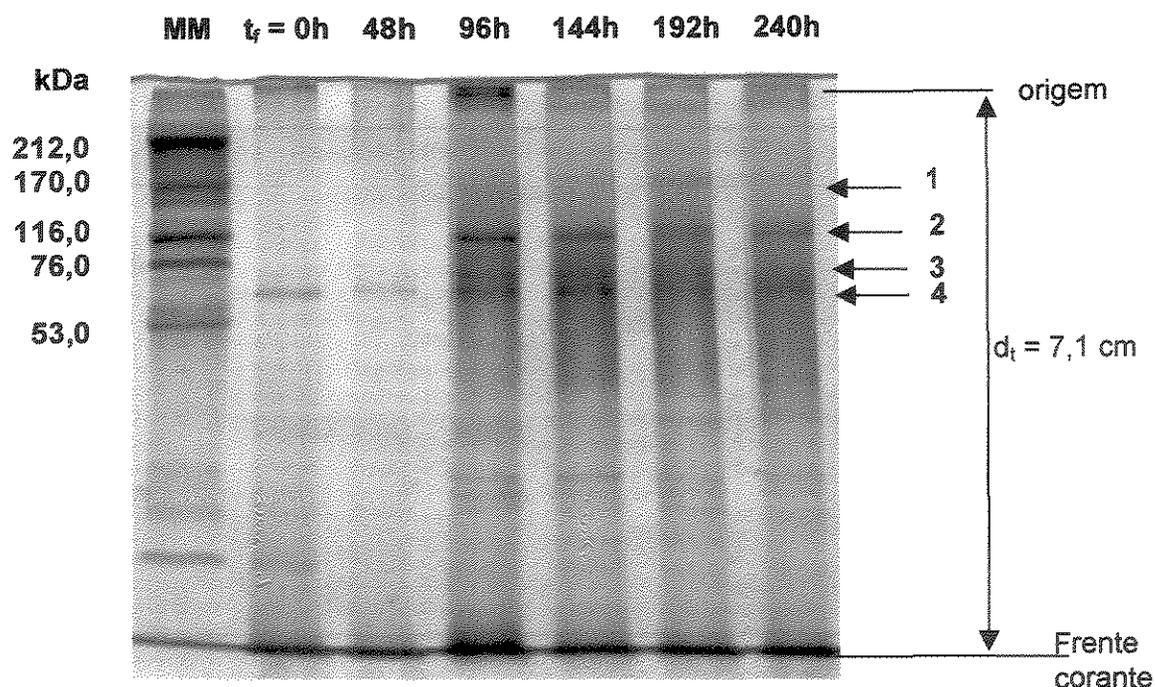
Da mesma forma, foram identificadas as proteínas de alta massa molecular das amostras dos extratos com potencial alergênico obtidos por precipitação com SAm. A Figura 6.4 apresenta o eletroforetograma obtido com gel de 10% de poliacrilamida. A Tabela 6.4 apresenta as proteínas identificadas no gel. São verificadas no gel, a partir de 96h, o aparecimento de proteínas de alta massa molecular.

**Tabela 6.3.** Proteínas de baixa massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm (gel de 15% de poliacrilamida).

Amostra	Proteína					
	(1) 75,3	(2) 65,5	(3) 49,6	(4) 44,7	(5) 27,4	(6) 13,6
0		X			X	
48 h		X			X	
96 h	X	X	X	X		X
144 h	X	X	X			X
192 h	X	X	X	X		X
240 h	X	X	X	X		X



**Figura 6.3.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm, em gel com 15% poliacrilamida e marcadores (MM) de baixa massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas identificadas no gel.



**Figura 6.4.** Eletroforetograma (SDS-PAGE) das amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm, em gel com 10% de poliacrilamida e marcadores (MM) de alta massa molecular. As setas, com os respectivos números, indicam a presença das proteínas identificadas no gel.

**Tabela 6.4.** Proteínas de alta massa molecular identificadas nas amostras de extratos com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm.

Amostra	Proteínas (kDa)			
	154,5	105,3	67,6	60,0
0 h				X
48 h				X
96 h		X	X	X
144 h		X	X	X
192 h	X	X	X	X
240 h		X	X	X

Encontram-se relacionadas a seguir as massas moleculares das proteínas identificadas por meio de eletroforese SDS-PAGE nos extratos com potencial alergênico obtidos por EtOH e por SAm:

- Proteínas identificadas nos extratos com potencial alergênico obtidos por EtOH:

**157,3 / 103,1 / 77,0 / 71,8 / 51,5 / 43,6 / 38,1 / 35,7 / 28,2 / 14,9**

- Proteínas identificadas nos extratos com potencial alergênico obtidos por SAm:

**154,5 / 105,3 / 75,3 / 67,6 / 65,5 / 60,0 / 49,6 / 44,7 / 27,4 / 13,6**

Os valores em negrito sugerem proteínas de mesma massa molecular, obtidas tanto por precipitação com EtOH como por precipitação com SAm. Pode-se observar que são obtidas aproximadamente as mesmas proteínas, independentemente do agente precipitante. Assim, tomando um valor médio dos valores em negrito, podemos definir os seguintes valores aproximados de massa molecular para as 12 proteínas identificadas nos extratos com potencial alergênico obtidos por EtOH e por SAm: 14,3; 27,8; 35,7; 38,1; 44,2; 50,6; 60,0; 65,5; 69,7; 76,2; 104,2 e 155,9 kDa.

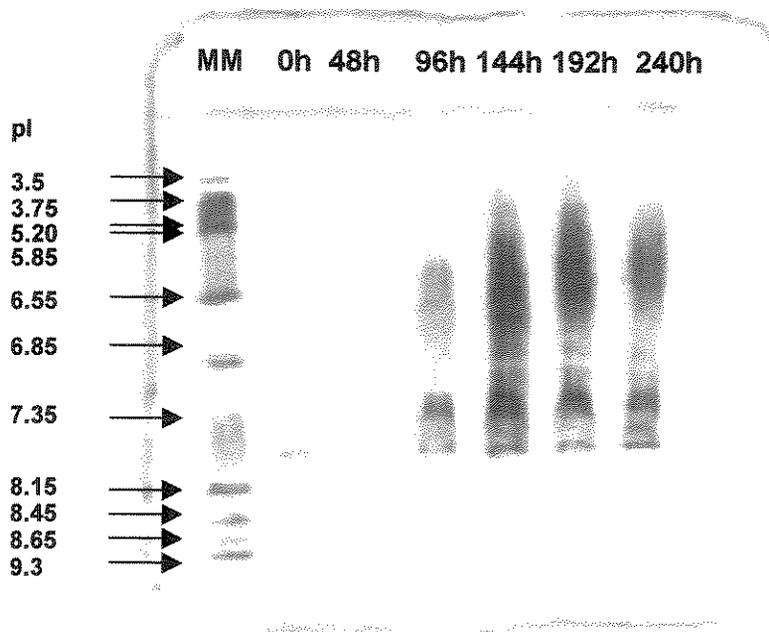
Menezes (1995) identificou 7 proteínas para o extrato bruto obtido para este mesmo fungo, após 28 dias de crescimento em fermentação submersa: 67,0 / 60,0 / 36,0 / 30,0 / 20,1 / 18,5 / 14,4 kDa. Segundo o autor, o número de frações protéicas obtidas foi menor do que o observado com outros fungos alergênicos.

Para o caso do extrato padronizado do fungo *Alternaria alternata* (estudado por diversos pesquisadores), foi assinalada a presença de 12 frações protéicas (Yunginger, 1992). Em cepas de *Cladosporium* sp., há referências sobre a presença de 10 a 15 frações (Aukrust, 1990), em *Aspergillus* sp., em torno de 10 frações (Harvey & Longbottom, 1987), e em *Penicillium* sp., aproximadamente 15 frações (Alonso et al., 1990). Das frações obtidas nesses fungos assinalados, nem todas apresentam características alergênicas. Além disso, as condições de cultivo e os líquidos extratores são diferentes, interferindo na quantidade de frações obtidas. Nesse sentido, Souza (1993), utilizando vários meios de cultivo e vários líquidos extratores, obteve diferentes números de frações protéicas para o extrato de *Trichophyton mentagrophytes*. Para o caso do cultivo do fungo em Czapeck modificado e extração das proteínas com Tris-HCl (mesmas condições utilizadas por Menezes, 1995), o autor obteve menor número de frações protéicas.

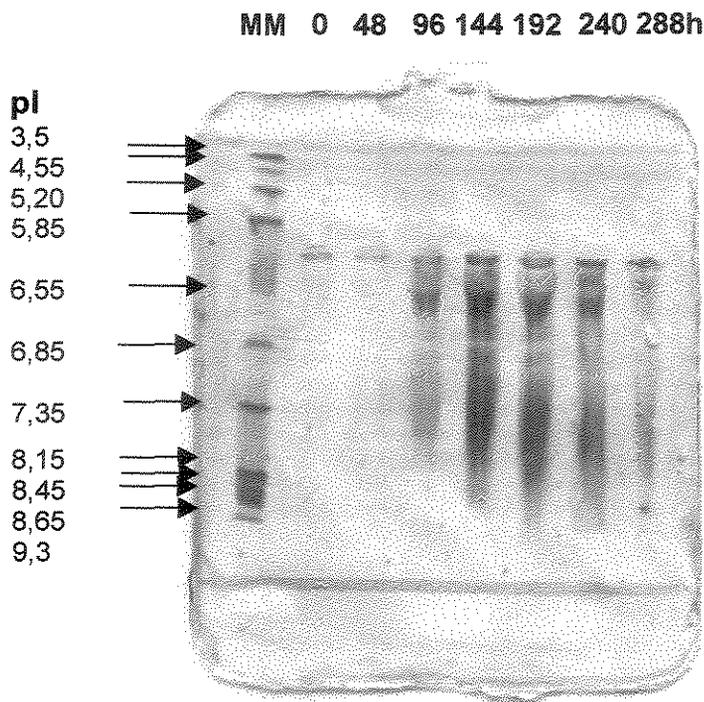
Assim podemos, a princípio, justificar neste trabalho a presença de maior quantidade de frações protéicas, comparativamente ao extrato alergênico obtido por Menezes (1995), devido à utilização da FES para o cultivo do *D. monoceras*, aliada ao uso da água como líquido extrator, além das diferentes condições operacionais usadas para a extração e para a recuperação das proteínas.

## 6.2. Ponto Isoelétrico das Proteínas

As Figuras 6.5 e 6.6 mostram as análises de focalização isoeletrica realizadas para as amostras de extrato com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH e SAm, para a curva de crescimento. Pode-se observar que não há uma boa definição do ponto isoeletrico (pI) para cada proteína presente nos extratos, mas sim por faixas de valores de pI's. Para as amostras de extrato com potencial alergênico obtidas por precipitação com EtOH (Figura 6.5, de 96 a 240h) pode-se observar pI's na faixa de 3,75 a 8,15 e, para as amostras de extrato com potencial alergênico obtidas por precipitação com SAm (Figura 6.6, de 96 a 240h) pode-se observar pI's na faixa de 6,55 a 8,15.



**Figura 6.5.** Análise de IEF das amostras dos extratos com potencial alergênico (0 a 240h) obtidas por precipitação com EtOH, em PhastGel gradiente 3-9 e marcador (MM) Pharmacia (pI 3-10).



**Figura 6.6.** Análise de IEF das amostras dos extratos com potencial alergênico (0 a 288 h) obtidas por precipitação com SAm, em PhastGel gradiente 3-9 e marcador (MM) Pharmacia (pI 3-10).

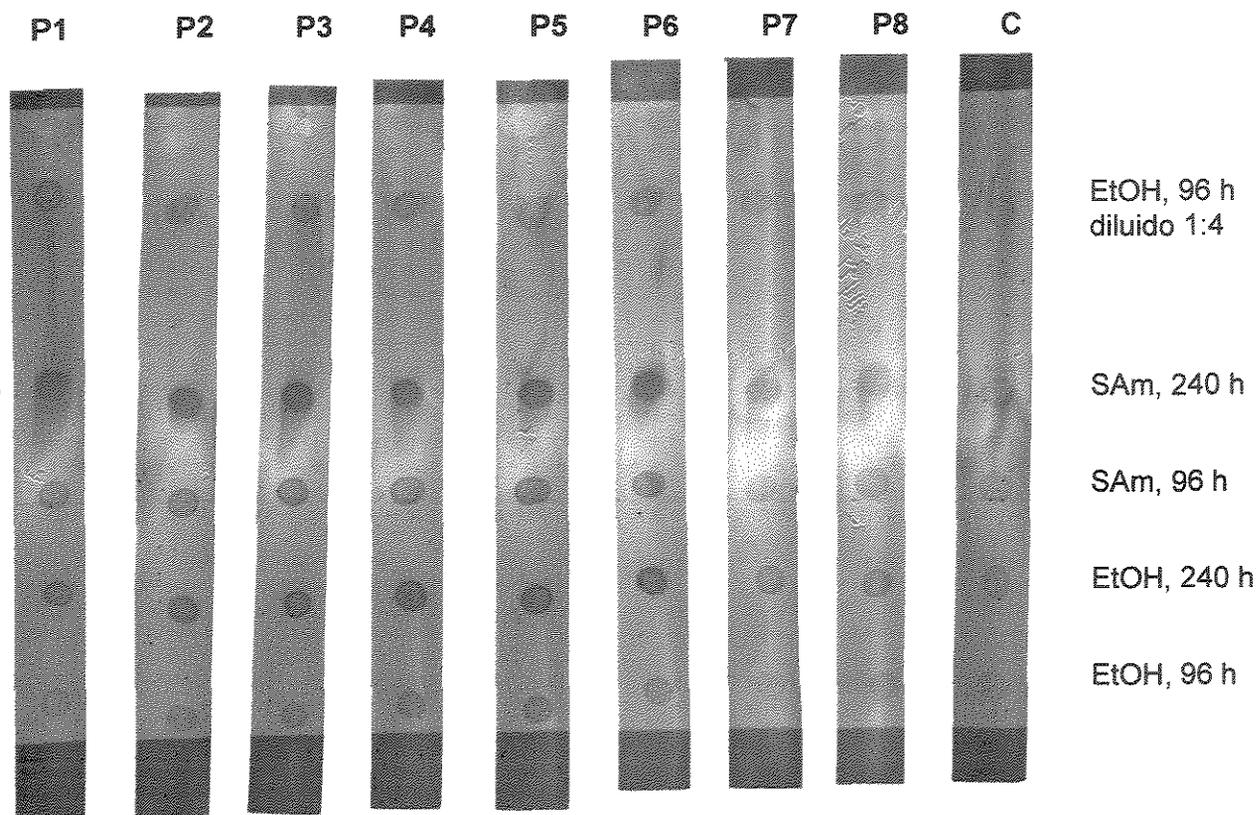
### 6.3. Reatividade dos Extratos com Potencial Alergênico

#### 6.3.1. Testes Cutâneos

Os resultados obtidos dos testes cutâneos (“prick-test”) realizados conforme descrito no item 3.2.4 (Capítulo 3) apresentaram positivities em 40% dos casos, considerando a formação de pápulas iguais ou maiores que 3 mm de diâmetro. Pápulas iguais ou maiores do que 4 mm foram observadas em 8 pacientes (24% dos casos), sendo então coletado sangue dos mesmos para posterior caracterização “in vitro” utilizando-se as técnicas de Dot-blotting e Immunoblotting.

#### 6.3.2. Dot-blotting

A Figura 6.7 mostra as tiras de membrana de nitrocelulose obtidas através da análise de Dot-blotting realizada para os extratos com potencial alergênico, obtidos pela precipitação com SAm e EtOH (nos tempos de fermentação de 96 e 240 h), frente aos oito pacientes mais reativos aos testes cutâneos (P1 a P8). Foi usado soro de indivíduo não alérgico como controle (C).



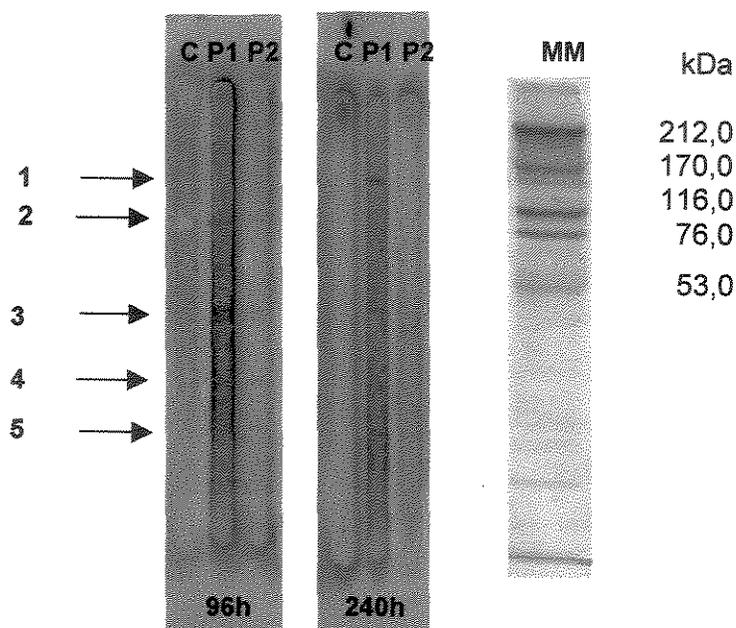
**Figura 6.7.** Análise de “Dot blotting” dos extratos com potencial alergênico de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, obtidos por precipitação com EtOH e com SAm, nos tempos de fermentação de 96 e 240 h, frente a oito soros de pacientes positivos aos testes cutâneos. P1-P8: pacientes; C: controle.

### 6.3.3. Immunoblotting

A Figura 6.8 mostra as membranas de nitrocelulose obtidas através da análise de Immunoblotting realizada para os extratos alergênicos, obtidos pela precipitação com EtOH (nos tempos de fermentação de 96 e 240 h), frente aos soros dos pacientes mais reativos aos testes cutâneos (P1 e P2). Foi usado soro de indivíduo não alérgico como controle (C). O gel utilizado na eletroforese foi o de 10%, sendo após feita a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. Assim, foi usado o marcador (MM) de 53 a 212 kDa como referência. As massas moleculares dos antígenos foram determinadas mediante cálculos do  $R_f$  (migração relativa) e da curva de calibração de massa molecular do marcador.

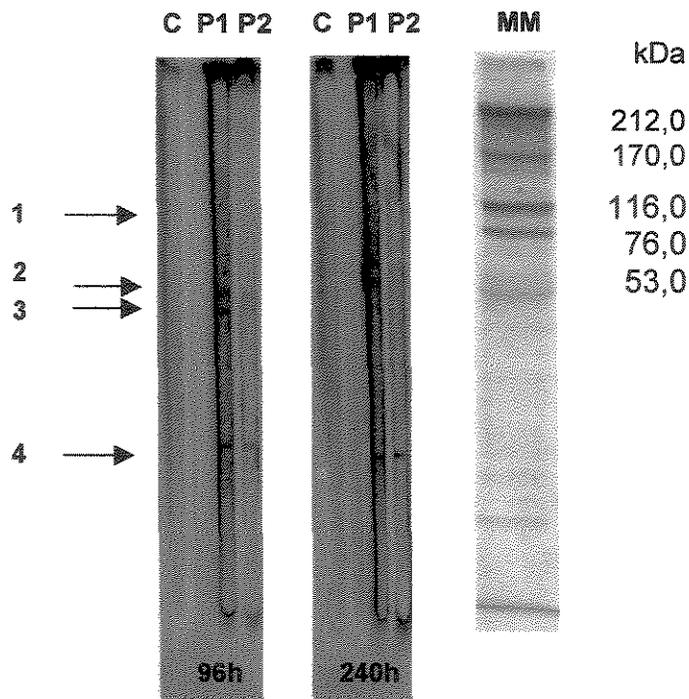
Pode-se observar na Figura 6.8, para o paciente P1, a presença de bandas mais reativas quando comparados ao controle (C). Para o extrato alergênico de

96 h, pode-se verificar que houve positividade para as proteínas de 104,2; 44,2; 27,8 e 14,3 kDa e para o extrato alergênico de 240 h, pode-se verificar que houve positividade para as proteínas de 155,9; 44,2; 27,8 e 14,3 kDa. Logo, as proteínas de 155,9; 104,2; 44,2; 27,8 e 14,3 kDa podem ser consideradas mais reativas.



**Figura 6.8.** Análise de Immunoblotting dos extratos alergênicos de *D. monoceras*, obtidos por precipitação com EtOH, nos tempos de fermentação de 96 e 240 h, frente aos soros positivos dos pacientes (P1 e P2) aos testes cutâneos. C: controle. MM: marcador de alta massa molecular.

Da mesma forma, a Figura 6.9 mostra as membranas de nitrocelulose obtidas para os extratos alergênicos, obtidos pela precipitação com SAm (nos tempos de fermentação de 96 e 240 h), frente aos pacientes mais reativos aos testes cutâneos (P1 e P2). O gel utilizado na eletroforese também foi o de 10%, sendo após feita a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. Observa-se, para o paciente P1, a presença de bandas mais reativas quando comparados ao controle (C). Para o extrato alergênico de 96 h, assim como para o extrato alergênico de 240 h, pode-se verificar que houve positividade para as proteínas de 44,2; 35,7 e 14,3 kDa.



**Figura 6.9.** Análise de Immunoblotting dos extratos alergênicos de *D. monoceras*, obtidos por precipitação com SAm, nos tempos de fermentação de 96 e 240 h, frente aos soros positivos dos pacientes (P1 e P2) aos testes cutâneos. C: controle. MM: marcador de alta massa molecular.

Para o paciente P2, observa-se a presença de bandas mais reativas de 44,2; 35,7 e 14,3 kDa para o extrato alergênico de 96 h e bandas mais reativas de 104,2; 44,2; 35,7 e 14,3 kDa para o extrato alergênico de 240 h. Assim, as proteínas que apresentaram atividade alergênica foram as de 104,2; 44,2; 35,7 e 14,3 kDa. Portanto, foram identificadas ao total 6 proteínas com atividade alergênica, apresentando massas moleculares de 155,9; 104,2; 44,2; 35,7; 27,8 e 14,3 kDa.

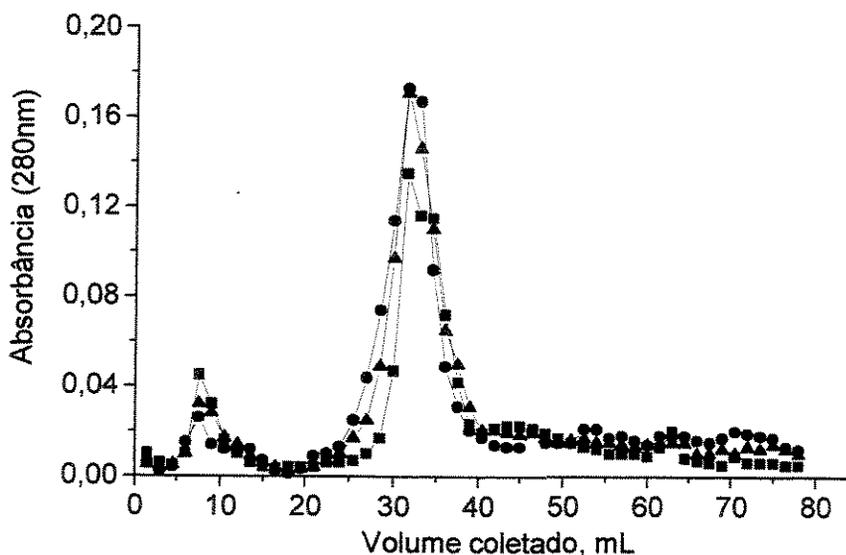
Menezes (1995) identificou 3 proteínas para o extrato bruto obtido para este mesmo fungo, após 28 dias de crescimento em cultivo em meio líquido: 60,0; 36,0 e 14,4 kDa. Comparando as proteínas com atividade alergênica identificadas neste trabalho com as obtidas por Menezes (1995), verificou-se a proximidade entre as proteínas de 35,7 e 14,3 kDa deste trabalho com as proteínas de 36,0 e 14,4 kDa de Menezes (1995).

#### 6.4. Fracionamento das Proteínas por Cromatografia de Permeação em Gel

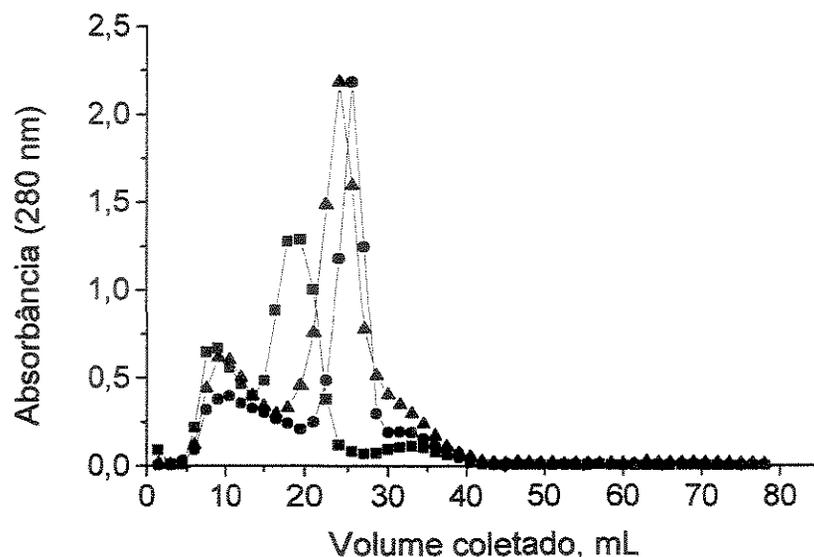
A Figura 6.10 apresenta os perfis de absorvância obtidos para a calibração com a solução padrão, para os três géis testados, onde pode-se observar a formação de apenas dois picos em cada gel, onde presume-se que o primeiro pico refere-se a fração de proteínas de massa molecular mais alta (IgG bovina, de 150 kDa) e, o segundo pico, a fração de proteínas de massa molecular mais baixa (BSA, de 67 kDa e  $\beta$ -lactoglobulina, de 35 kDa).

A Figura 6.11 apresenta os perfis de absorvância obtidos para cada teste (com extrato alergênico, de 144 h de fermentação), onde pode-se observar a formação de apenas dois picos em cada teste, de forma semelhante à curva de calibração.

O teste com Sephadex G-150 e a mistura de G-100 com G-200 apresentaram o mesmo comportamento em termos de separação, ao passo que o teste com Sephadex G-100 mostrou uma menor resolução para o segundo pico.



**Figura 6.10.** Perfis de absorvância das frações coletadas durante a cromatografia de permeação em gel, para calibração da coluna Amicon com solução padrão de proteínas (IgG de 150 kDa, BSA de 67 kDa e  $\beta$ -lactoglobulina de 35 kDa), para os três géis testados: Sephadex G-100 (— ■ —), mistura Sephadex G100-G200 (2:1) (—●—) e Sephadex G-150 (—▲—).

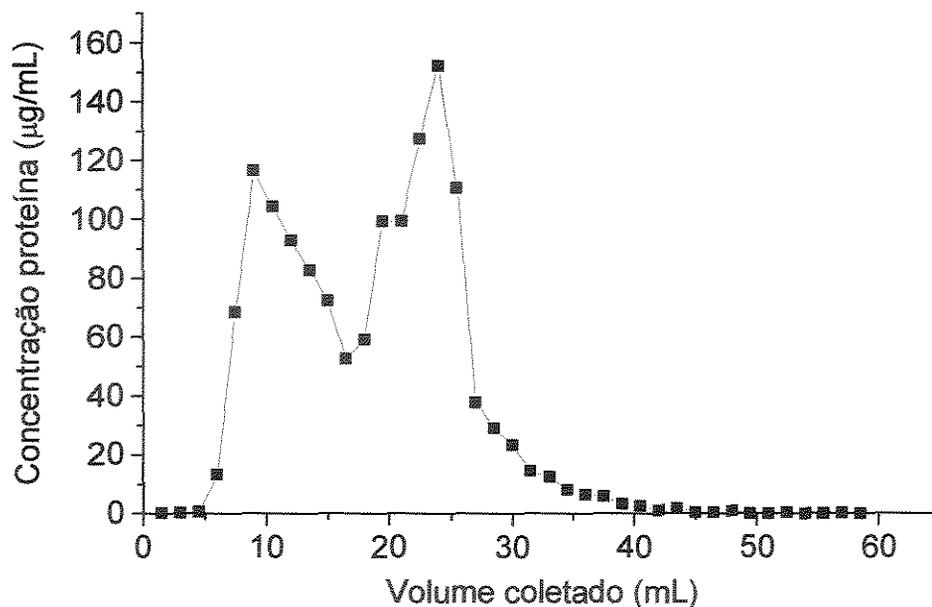


**Figura 6.11.** Perfis de absorvância das frações coletadas durante a cromatografia de permeação em gel, para o extrato alergênico obtido por precipitação com EtOH, após 144 h de fermentação, para os três géis testados: Sephadex G-100 (— ■ —), Sephadex G100-G200 (2:1) (—●—) e Sephadex G-150 (— ▲ —).

Da mesma forma que a curva de calibração, presumiu-se, para a amostra de extrato alergênico, que a primeira fração coletada nos testes refere-se as proteínas de massa molecular mais alta (de 100 a 157 kDa) e a segunda fração às proteínas de massa molecular mais baixa (de 15 a 77 kDa).

Como os extratos alergênicos apresentam maiores quantidades de proteínas de massa molecular mais baixa, justificam-se os maiores valores de absorvância verificados para o segundo pico.

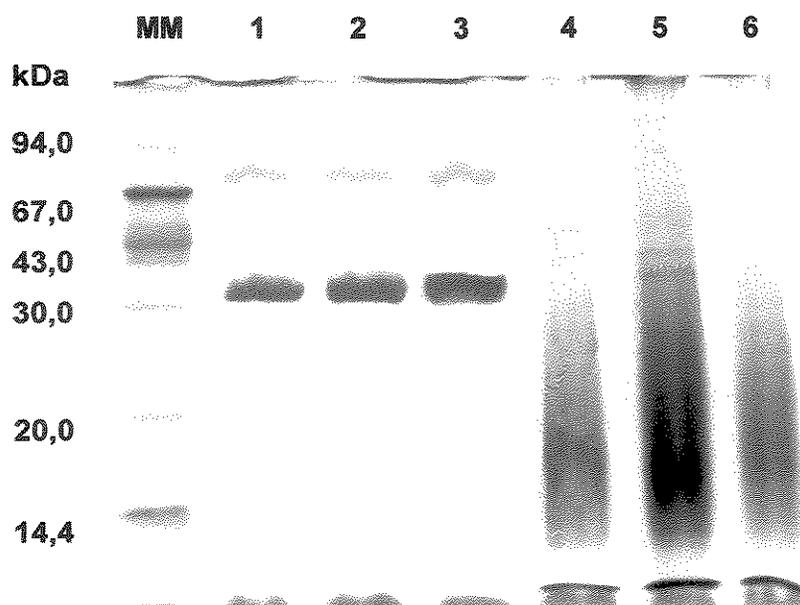
Foram analisados os conteúdos de proteína das frações coletadas para o teste com Sephadex G-150, para observar a concordância com o perfil de absorvância obtido. A Figura 6.12 apresenta o perfil de fracionamento, em termos de concentração de proteína, obtido para o teste.



**Figura 6.12.** Perfil de proteína das frações coletadas durante o teste de cromatografia de permeação em gel com Sephadex G-150, para o extrato alergênico obtido por precipitação com EtOH, após 144 h de fermentação.

Observa-se a presença de apenas dois picos para o perfil de concentração de proteínas, da mesma forma que o perfil de absorbâncias. O balanço de proteínas do teste de cromatografia de permeação em gel com Sephadex G-150 foi checado, mostrando-se coerente, ou seja, para 1,40 mg de proteína aplicada, foi coletado 1,28 mg, apresentando uma perda de 9% de proteína. Devido à diluição das proteínas nas frações coletadas, as mesmas foram analisadas através do microensaio de Bradford.

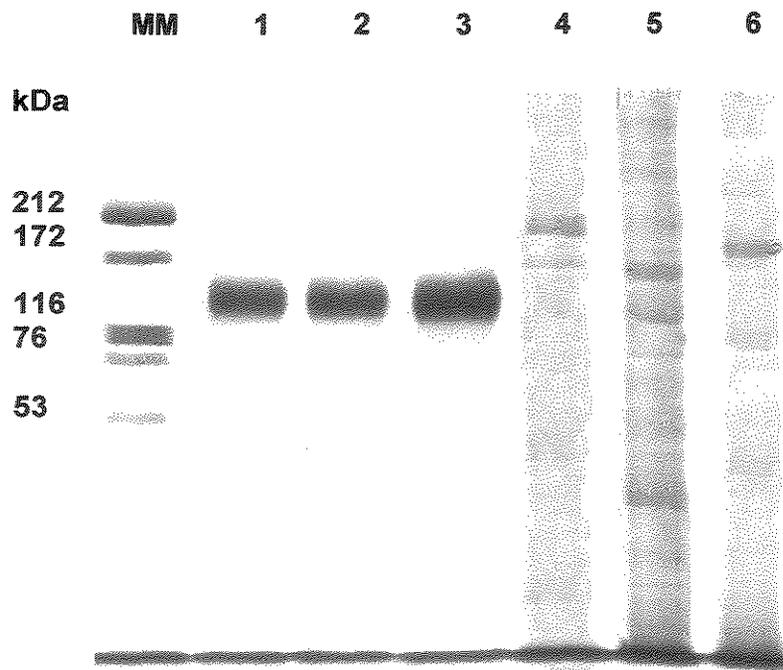
Para identificar as proteínas presentes nos dois picos, foram feitas duas eletroforeses (SDS-PAGE), sendo uma para cada pico obtido, tanto para as amostras dos extratos alergênicos coletados como para a solução padrão coletada (usada na calibração da coluna). A Figura 6.13 apresenta a eletroforese obtida para o segundo pico, correspondente à fração de proteínas de menor massa molecular (abaixo de 67 kDa).



**Figura 6.13.** Eletroforetograma (SDS-PAGE em gel com 15% de poliacrilamida e marcadores (MM) de baixa massa molecular) obtido para as frações coletadas no 2º pico dos testes de cromatografia de permeação em gel. As raias 1, 2 e 3 referem-se a aplicação da solução de calibração da coluna para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente. As raias 4, 5 e 6 referem-se a amostra de extrato alergênico (após 144 h de fermentação), para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente.

Foram observadas, nas raias 1, 2 e 3 no gel de eletroforese, as presenças das proteínas de 67 kDa (BSA) e 35 kDa ( $\beta$ -lactoglobulina), referentes as frações de solução de calibração da coluna coletadas no segundo pico, o que evidencia a separação destas proteínas nos três géis testados. Nas raias 4, 5 e 6 observou-se a presença de manchas para o extrato alergênico coletado no segundo pico dos testes de cromatografia de permeação em gel. Essas manchas, abaixo de 67 kDa, evidenciam a presença de proteínas de baixa massa molecular separadas na cromatografia de permeação em gel, para a amostra de extrato alergênico.

A Figura 6.14 apresenta a eletroforese obtida para o primeiro pico, correspondente à fração de proteínas de massa molecular mais alta (acima de 100 kDa).



**Figura 6.14.** Eletroforetograma (SDS-PAGE em gel com 10% de poliacrilamida e marcadores (MM) de alta massa molecular) obtido para as frações coletadas no 1º pico dos testes de cromatografia de permeação em gel. As raias 1, 2 e 3 referem-se a aplicação da solução de calibração da coluna para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente. As raias 4, 5 e 6 referem-se a amostra de extrato alergênico (após 144 h de fermentação), para o gel Sephadex G-100, G-150 e mistura G100:G200, respectivamente.

Foi observada, nas raias 1, 2 e 3 no gel de eletroforese, a presença da proteína de 150 kDa (IgG de soro bovino) referente as frações de solução de calibração da coluna coletadas no primeiro pico, o que evidencia a separação desta proteína nos três géis testados. Nas raias 4, 5 e 6 têm-se a presença de manchas para o extrato alergênico coletado no primeiro pico dos testes de cromatografia de permeação em gel. É possível, ainda assim, observar a presença de bandas de proteínas de massa molecular mais alta (de 103 a 157 kDa).

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSÕES

- As condições ótimas de fermentação, que resultaram em melhores valores de produtividade (para o tempo de fermentação de 168h), determinadas pelo planejamento estatístico de experimentos (dentro dos níveis operacionais estabelecidos neste trabalho) foram pH 9,5 e umidade inicial do meio de 45,8%. As demais variáveis de operação, definidas neste trabalho foram: uso do farelo de trigo como substrato, concentração inicial do inóculo de 0,4 mg/mL, idade de 14 dias para o inóculo, tamanho de 0,59 mm para a partícula do substrato, vazão de ar de 2,0 L/h e temperatura de 25 °C.

- O melhor resultado para a recuperação das proteínas dos extratos brutos foi obtido pela precipitação apenas com etanol, onde se obteve uma eficiência de recuperação de 42,8% ( $\pm 7,4\%$ ).

- A diálise foi o melhor método utilizado para remoção de sais e polifenóis, apresentando um rendimento médio de remoção de 73%.

- Foram identificadas, por SDS-PAGE, 12 proteínas nos extratos com potencial alergênico de *D. monoceras*, com os seguintes valores aproximados de massa molecular: 14,3; 27,8; 35,7; 38,1; 44,2; 50,6; 60,0; 65,5; 69,7; 76,2; 104,2 e 155,9 kDa.

- Foram observados pontos isoelétricos na faixa de 3,75 a 8,15, para as proteínas presentes no extrato com potencial alergênico obtido por precipitação

com EtOH e pl's na faixa de 6,55 a 8,15 para as proteínas do extrato com potencial alergênico obtido por precipitação com SAM.

- Foram verificadas, nos testes cutâneos, positivities em 40% dos casos dos pacientes com sintomas de alergia respiratória, considerando a formação de pápulas iguais ou maiores que 3 mm de diâmetro. Pápulas iguais ou maiores que 4 mm foram observadas em 8 pacientes (24% dos casos).

- Seis pacientes apresentaram reatividade mais intensa aos extratos com potencial alergênico em teste Dot-blotting, quando comparados ao controle, sendo os respectivos soros submetidos à análise de "Immunoblotting", para a determinação das proteínas com maior potencial alergênico. Os extratos obtidos com 96 e 240 h de fermentação podem ser considerados alergênicos, para efeitos de utilização em diagnóstico específico de alergia ao *D. monoceras*.

- No total foram identificadas, na análise de "Immunoblotting", 6 proteínas com atividade alergênica, apresentando massas moleculares de 155,9; 104,2; 44,2; 35,7; 27,8 e 14,3 kDa.

- Foram obtidas, por cromatografia de permeação em gel, duas frações protéicas para o extrato com potencial alergênico, sendo uma de massa molecular mais alta (acima de 100 kDa) e outra de massa molecular mais baixa (abaixo de 67 kDa).

## CAPÍTULO 8

### SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Os seguintes itens são sugeridos visando a complementação deste trabalho:

- Estudo da transferência de oxigênio na FES para a produção da biomassa de *D. monoceras*

- Estudo da FES em biorreatores alternativos como o leito expandido e a caracterização dos efeitos da expansão do leito sobre a transferência de oxigênio, fisiologia de crescimento do fungo e formação do produto.

- Estudo da influência do pH e da força iônica na extração de polifenóis, paralelamente a extração das proteínas da biomassa de *D. monoceras*.

- Determinação ou quantificação da atividade proteásica nos extratos brutos e alergênicos de *D. monoceras*.

- Estudo da estabilidade dos extratos alergênicos frente a diferentes condições de estocagem.

- Purificação das proteínas por meio de técnicas cromatográficas.

- Determinação do tipo de proteína identificada como alérgeno (se glicoproteína, lipoproteína etc.), bem como sua composição em aminoácidos.

- Identificação dos carboidratos presentes nos extratos alergênicos e avaliação da atividade alergênica dos mesmos.

## CAPÍTULO 9

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHATZ,G., OBERKOFER,H., LECHENAUER,E., SIMON,B., UNGER,A., KANDLER,D., EBNER,C., PRILLINGER,H., KRAFT,D. & BREITENBACH,M. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. **Molecular Immunology**, v.32, p.213-227, 1995.
- ALONSO,A.; SCAVINI,L.M.; MOUCHIAN,K.; RODRIGUEZ,S.M. & IRANETA,S.G. Antigenicity of *Penicillium notatum* in animals and in atopic patients. **Allergology and Immunopathology**, (Madri), v.816, p.301-307, 1990.
- AUKRUST,L. Advances in allergens of *Cladosporium herbarum*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.65, p.312-319, 1990.
- AUKRUST,L. Cross radioimmuno-electrophoretic studies of distinct allergens in two extracts of *Cladosporium herbarum*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.58, p.375-390, 1979.
- AZZONI,A.R. Plantas como biorreatores: Recuperação e purificação de aprotinina recombinante a partir de semente de milho transgênico. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2002.
- BALAKRISHNAN,K. & PANDEY,A. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. **Journal of Science and Industrial Research**, v.55, p.365-372, 1996.
- BARRIOS-GONZÁLEZ,J.; TOMASINI,A.; VINIEGRA-GONZÁLEZ,G. & LÓPEZ,J. Penicillin production by solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v.10, n.11, p.793-798, 1988.

- BARRON,G.L. **The genera of *Hyphomycetes* from soil.** Ed. Robert E. Kieger Publishing Company. Hunntigton, New York, 1972.
- BARROS NETO,B., SCARMINIO,I.S. & BRUNS,R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Editora da Unicamp. Campinas, SP. 299p, 1996.
- BASOMBA,A. Situacion actual del empleo de antigenos en alergia. In: **Purificacion y estandardizacion de alergenos,** Madri, 1982.
- BEROVIC,M. & LOGAR-DERENCIN,M. Solid state fermentation of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology,** v.56, n.2, p.209-211, 1993.
- BIO-RAD LABORATORIES, **Mini-Protean® Electrophoresis Cell: Instruction manual,** Bio-Rad Laboratories, California, 1988.
- BOX,G.E.P.; HUNTER,W.G. & HUNTER,J.S. **Statistics for experimenters - an introduction to design, data analysis and model building.** New York. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1978.
- BRADFORD,M.M. A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry,** v.72, p.248-254, 1976.
- BREITENBACH,M., SIMON,B., PROBST,G., OBERKOFER,H., FERREIRA,F., BRIZA,P., ACHATZ,G., UNGER,A., EBNER,C., KRAFT,D. & HIRSCHWEHR,R. Enolases are highly conserved fungal allergens. **International Archives of Allergy and Immunology,** v.113, p.114-117, 1997.
- BUSH,R.K. & SANCHEZ,H. *In vitro* synthesis of *Alternaria* allergens and their recognition by murine monoclonal and human IgE antibodies. **Annals of Allergy Asthma and Immunology,** v.78, p.287-292, 1997.
- BUSH,R.K. Fungi and Fungal allergens. Workshop N°. 867, In: **50th Annual Meeting Anaheim, The American Academy of Allergy & Immunology,** California, 1994.
- BUSH,R.K. Fungal extracts in clinical practice. **Allergy,** v.14, p.385-390, 1993.

- CANNEL,E. & MOO-YOUNG,M. Solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.15, p.24-28, 1980.
- CHRISTEN,P.; MEZA,J.C. & REVAH,S. Fruity aroma production of solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. **Micology Research**, v.101, p.911-919, 1997.
- COSTA,J.A.V. Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 1996.
- CROCE,J.; GAMBALE,W.; PAULA,C.R. & ZUPPI,L.J. Provocation of asthma by non-sporulating molds. In: **Advances in asthmologia**. Eds. S. Kobayashi e J. A. Bellanti. Excerpta Médica, Amsterdam, p.401-404, 1990.
- DAIGLE,D.J.; CONNICK,W.J.; BOYETTE,C.D.; JACKSON,M.A. & DORNER,J.W. Solid state fermentation plus extrusion to make biopesticide granules. **Biotechnology Techniques**, v.12, p.715-719, 1998.
- DESHPANDE,M.V. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. **Critical Review of Microbiology**, v.25, p.229-243, 1999.
- DOELLE,H.W.; MITCHELL,D.A. & ROLZ,C.E. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Science Publishers. England, 466p. 1992.
- DOLAN,C.T.; WEED,L.A. & DINES,D.E. Bronchopulmonary Helminthosporiosis. **Annals of Journal of Clinical and Pathology**, v.53, p. 235-242, 1970.
- DURAND,A.; RENAUD,R.; MARATRAY,J. & ALMANZA,S. The INRA-Dijon reactors: Design and applications. In: Roussos,S.; Lonsane,B.K.; Raimbault,M & Viniegra-Gonzales,G. **Advances in Solid State Fermentation. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Solid State Fermentation**. Montpellier, France. p.75-92, 1997.
- DURAND,A. & CHEREAU,D. A new pilot reactor for solid state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.476-486, 1988.

- ELLIS, M.B. *Dematiaceus Hyphomycetes*. Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute. London. 412p, 1971.
- FEINBERG, S., M. & LITTLE, H.T. Mould Allergens. It's importance in asthma and hay fever. *Wis. Medicine Journal*, v.34, p.254, 1935.
- FERNÁNDEZ-LAHOPE, H.M., FRAILE, E.R. & CASCONO, O. Acid protease recovery from solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*, v.62, p.83-93, 1998.
- FORD, A. Characterization of moulds. In: **Purificación y estandarización de alergenos**, Madri, p.43-53, 1982.
- FORD, A. Etiology of Asthma: a continuous review. *Annals of Allergy*, v.50, 1983.
- FRAZIER, W.C. **Microbiología de los alimentos**. 2ª edição. Zaragoza. Editora Acribia, 512p, 1976.
- GAMBALE, W.; PURCHIO, A. & CROCE, J. Flora Fúngica Anemófila da Grande São Paulo. *Revista de Microbiologia*, v.8, p.74-79, 1977.
- GAMBALE, W., MOHOVIC, J. & CROCE, J. Intradermal testings with allergenic extracts of 42 fungus genera isolated from the air in São Paulo, Brazil. *Revista Iberica de Micologia*, 5:53, 1988.
- GEGENHEIMER, P. Preparations of extracts from plants. In: DEUTSCHER, M.P., **Methods in Enzymology**, v.182, Academic Press, New York, p.174-193, 1990.
- GRANATH, K.A. & KVIST, B.E. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on Sephadex. *Journal of Chromatography*, v.28, p.69-81, 1967.
- GUTIERREZ-ROJAS, M. & TORRES, E.F. Curso de Fermentaciones en Medio Sólido, In: **Biotecnología para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales**. Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa. México, 1992.

- HARTREE,E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.
- HARRIS,E.L.V. Purification strategy. In: **Protein purification methods: a practical approach**. Eds. Harris,E.L.V. & Angal,S. IRL Press, Oxford University Press, Oxford, v.1, p.51-64, 1995.
- HARVEY,C. & LONGBOTTOM,J.L. Release of antigens and allergens during shake cultures of *Aspergillus fumigatus*. **Allergy**, v.42, p.359-365, 1987.
- HASAN,S.D.M.; COSTA,J.A.V. & SANZO,A.V.L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.10, p.787-791, 1998.
- HASAN,S.D.M. Modelagem e simulação da transferência de calor em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Dissertação (Mestrado)**, Departamento de Química, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, 1998.
- HOFFMAN,D.R. Mould allergens. In: **Mould Allergy**. Ed. Y. Aldoory & J. F. Dombson, Philadelphia, Lea & Febriger, p.104-116, 1984.
- HORNER,W.E.; HELBLING,A.; SAVAGGIO,J.E. & LEHRER,S.B. Fungal Allergens. **Clinical and Microbiology Review**, v.8, p.161-178, 1995.
- ISHIZAKA,K. The identification and significance of gamma-E. In: **Immunobiology**. Ed. Good,R.A. & Fisher,D.W., Stamford, Connecticut, Sinauer Associates, 1966.
- JENNINGS,D.H. **The physiology of fungal nutrition**. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- KARLSSON-BORGA,A. & ROLFSEN,W. Methodological considerations when using nitrocellulose immunoblotting from polyacrylamide gels to study the mould allergens *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria alternata*. **Journal of Immunology Methods**, v.136(1), p.91-102, 1991.
- KIM,S.J & CHAPARRAS,S.D. Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus* I. Preparation of antigens from organism grown in completely

- synthetic medium. **American Review Respiration Diseases**, v.118, p.547-551, 1978.
- KIRANSREE,N.; SRIDHAR,M.; RAO,L.V. & PANDEY,A. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. **Process Biochemistry**, v.34 (2), p.115-119, 1999.
- KURUP,V.P. & BANERJEE,B. Fungal allergens and peptide epitopes. **Peptides**, v.21, p.589-599, 2000.
- KURUP,V.P., SHEN,H.D. & BANERJEE,B. Respiratory fungal allergy. **Microbes and Infection**, v.2, p.1101-1110, 2000.
- KURUP,V.P. & FINK,J.N. In: **Fungal Infection and Immunity responses** Murphy,J.W.; Friedman,H. & Bendinelli,M. (Eds.), Plenum Press, New York, p.393-404, 1993.
- KURUP,V.P. Enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of specific antibodies against *Aspergillus* in patient sera. **Zentral Bakteriologie and Microbiology Hygiene**. v.261, p.509-516, 1986.
- LACAZ,C.S. **Micologia Médica**. Ed. Sarvier, São Paulo, 1991.
- LAEMMLI,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LARROCHE,C.; BESSON,I. & GROSS,J.B. High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. **Process Biochemistry**, v.34 (6-7), p.667-674, 1999.
- LONGBOTTOM,J.L. Antigens and allergens of *Aspergillus fumigatus*: recent advances. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.88, p. 68-76, 1992.
- LONSANE,B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA,G.; RAIMBAULT,M.; ROUSSOS,S.; VINIEGRA-GONZALES,G.; GHILDYAL,N.P.; RAMAKRISHNA,M. & KRISHNAIAH,M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, v.27, p.259-273, 1992.

- LOOMIS,W.D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. In: FLEISHER,S., PACKER,L. **Methods in Enzymology** , v.31, Academic Press, New York, p.528-545, 1974.
- LOWRY,O.H.; ROSEBROUGH,N.J.; FARR,A.L. & RANDALL,R.J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, v.193, p.265, 1951.
- MAKKAR,R.S. & CAMEOTRA,S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.2, p.237-241, 1999.
- MARQUES,S.P.O. Extratos alergênicos brutos obtidos por extração com líquidos de coca e Tris-HCl das fases vegetativa e reprodutiva de *Pleurotus ostreatus* análise bioquímica e alergênica. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1997.
- MENEZES,E.A. Fracionamento e caracterização alergênica do extrato de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. **Tese (Doutorado)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1995.
- MENEZES,E.A.; GAMBALE,W.; MACEDO, M.S.; ABDALLA,D.S.P.; PAULA,C.R. & CROCE,J. Biochemical, antigenic and allergenic characterization of crude extracts of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. **Mycopathologia**, v.101, p.75-81, 1995.
- MILLER,G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MITCHELL,D.A.; KRIEGER,N.; STUART,D.M. & PANDEY,A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v.35, p.1211-1225, 2000.
- MITCHELL,D.A., DOELLE,H.W. & GREENFIELD,P.F. Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.598-602, 1988.

- MOHOVIC,J., GAMBALE,W. & CROCE,J. Cutaneous positivity in patients with respiratory allergens to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in São Paulo, Brazil. **Allergol. Immunopathology**, v.16, p.397-402, 1988.
- MORRISSEY,J.H., Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.
- MORAES,R.O. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 1999.
- NAKAYAMA,S.; TAKAHASHI,S.; HIRAI,M. & SHODA,M. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.80-82, 1997.
- NAMPOOTHIRI,K.M. & PANDEY,A. Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp. **Biotechnology Letters**, v.16(2), p.199-204, 1996.
- NELSON,H. Diagnostic procedures in allergy I. Allergy skin testing. **Annals of Allergy**, v.51, p.411-417, 1983.
- OHNO,A.; ANO,T. & SHODA,M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.47, p.209-214, 1995.
- OOSTRA,J.; LE COMTE,E.P.; VAN DER HEUVEL,J.C. & TRAMPER,J. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.75, n.1, p.13-24, 2001
- PANDEY,A.; SOCCOL,C.R. & MITCHELL,D. New developments in solid state fermentation I – bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153-1169, 2000.
- PANDEY,A. & RADHAKRISHNAN,S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, v.14, p.486-488, 1992.

- PANDEY,A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p.109-117, 1992.
- PANDEY,A. Aspects of fermenter design for solid state fermentations. **Process Biochemistry**, v.26, p.335-361, 1991.
- PARIS,S., DEBEAUPUIS,J.P., PREVOST,M.C., CASOTTO,M. & LATGE,J.P. The 31 kDa major allergen Alt a 1 (1563) of *Alternaria alternata*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.88, p.902-908, 1991.
- PAUL,W.E. **Fundamental Immunology**, Lippincot-Raven Publishers. 4<sup>th</sup>. Ed., Philadelphia, EUA, 1999.
- PEPYS,J. Skin testing. **Brazilian Journal of Hospital Medicine**, v.14, p.413-417, 1975.
- PEREIRA,J.A.M. Adsorção de  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 1999.
- PRATT,H.N. & GROSSMAN,R. The comparative atopic activity of *Alternaria* spores and mycelium. **Journal of Allergy**, v.13, p.227, 1942.
- PRICE,M.L. & BUTLER,L.G. Rapid visual estimation and spectrofotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.25, n.6, p.1268-1273, 1977.
- PRINCE,H.E. Mold fungi in the etiology of respiratory allergy diseases. Immunological studies with mold extracts. Skin tests with broth and washings from mold pellicles. **Annals of Allergy**, v.2, 500-504, 1944.
- RAIMBAULT,M. & ALAZARD,D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal of Applied Microbiology**, v.9, p.199-209, 1980.
- RAIMBAULT,M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. In: **International Training Course On Solid State Fermentation**. UFPR, Curitiba, Paraná, 1997.

- RAMAKRISHNA,S.V., SUEELA,T., GHYLDYAL,N.P., JALEEL,S.A., PREMA,P., LONSANE,B.K. & AHMED,S.Y. Recovery of amyloglucosidase from mold bran, **Indian Journal Technology**. v.20, p.476-480, 1982.
- RAMESH,M.V. & LONSANE,B.K. A novel bacterial thermostable alpha-amylase system produced under solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v.9, p.501-504, 1987.
- SALVAGGIO,J. & AUKRUST,L. Mold induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v.68, p. 327-346, 1981.
- SALUNKHE,D.K., JADHAV,S.J., KADAN,S.S. & CHAVAN,J.K. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereal and legumes. **CRC – Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.17, n.3, 1981.
- SARAIVA,C.P. Extração de proteínas com potencial alergênico da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produzida por fermentação em estado sólido. **Dissertação (Mestrado)**, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2001.
- SAUCEDO-CASTANEDA,G.; GUTIÉRREZ-ROJAS,M.; RAIMBAULT,M. & VINIEGRA-GONZALES,G. Heat transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.802-808, 1990.
- SAUCEDO-CASTANEDA,G.; LONSANE,B.K; KRISHNALAH,M.M.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS,S. & RAIMBAULT,M. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, v.27, p.97-107, 1992.
- SCHEINER,O. & KRAFT,D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. **Allergy**, v.50, p.384-391, 1995.
- SHEN,H.D., LIN,W.L., TAM,M.F., WANG,S.R., TZEAN,S.S., HUANG,M.H. & HAN,S.H. Characterization of allergens from *Penicillium oxalicum* and *Penicillium notatum* by immunoblotting and N-terminal aminoacid sequence analysis. **Clinical Exp. Allergy**, v.29, p.642-651, 1999.

- SHEN,H.D., LIN,W.L., TAM,M.F., WANG,S.R., TSAI,J.J., CHOU,H. & HAN,S.H. Alkaline serine proteinase: a major allergen of *Aspergillus oryzae* and its cross-reactivity with *Penicillium citrinum*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.116, p.29-35, 1998.
- SHEN,H.D.; CHOO,K.B.; LIN,W.L.; CHANG,Z.N. & HAN,S.H. Immunoblot analysis of components of *Penicillium notatum* recognized by human IgE antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.88, p. 802-807, 1993.
- SINGH,B.P.; SRIDHARA,S.; ARORA,N. & GANGAL,S.V. Evaluation of protein assay methods for pollen and fungal spore extracts. **Biochemistry International**, v.27, n.3, p.477-484, 1992.
- SMITH,J.E. & BERRY,D.R. **Industrial Mycology**. New York, v.1, 1974.
- SOARES,M.; CHRISTEN,P.; PANDEY,A. & SOCCOL,C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, 35(8), 2000.
- SOCCOL,C.R., MARIN,B., RAIMBAULT,M. & LEBEAULT,J.M. Potential of solid state fermentation for production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.286-290, 1994.
- SOUZA,V.M. Obtenção de extratos brutos com líquido de coca, Tris-HCl e etileno-glicol de *Trichophyton mentagrophytes* var. antropofílica cultivado em vários substratos. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1993.
- STREDANSKY,M. & CONTI,E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.34, p.581-587, 1999.
- SWARD-NORDMO,N.; ALMELAND,T.L. & AUKRUST,L. Variability in different strains of *Cladosporium herbarium* with special attention to carbohydrates and contents of two important allergens (Ag-32 and Ag-54). **Allergy**. p.39:398-94, 1984.
- TAKUR,M.S., KARANTH,N.G. & NAND,K. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.32, p.409-413, 1990.

- TENGERDY, R.P. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: Pandey, A. editor. **Advances in Biotechnology**. New Delhi: Educational Publishers & Distributors, p.13-16, 1998.
- TOBWIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, v.76, p.4350-4354, 1989.
- VALENTA, R., VRTALA, S., LAFFER, S., SPITZAUER, S. & KRAFT, D. Recombinant allergens. **Allergy**, v.53, p.552-561, 1998.
- VIJAY, H.M.; THAKER, A.J.; BANERJEE, B. & KURUP, V.P. **Allergens and allergen immunotherapy**. Lockey, R.F.; Bukantz, S.C. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, p.133-154, 1999.
- VEREDAS, V. Purificação de  $\alpha$ -lactalbumina a partir do soro de leite em leite fixo e expandido de resinas. **Dissertação (Mestrado)**, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2000.
- VINIEGRA-GONZALEZ. Solid state fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In: **Advances in solid state fermentation**, Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. & Viniegra-Gonzales, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.5-22, 1988.
- VINIEGRA, G. & AUGUR, C. Production of enzymes by SSF, relation substrate/enzyme and induction/catabolic repression. In: **International Training Course: Solid State Fermentation**. ORSTOM, MAE, CNPq, UFPR - Curitiba, Brasil, 1997.
- YADAV, J.S. SSF of wheat straw with alcaliphilic *Coprinus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.414-417, 1988.
- YANG, S.S. & SWEY, W.J. Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation of corn-cob. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.43-46, 1996.
- YUNGINGER, J.W. Allergens: recent advances II. Allergens of *Alternaria*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.78, p.478-482, 1992.

- YUNGINGER, J.W. Allergens: recent advances. **Pediatric Clinical N. Annals**, v.35, p.981-993, 1988.
- YUNGINGER, J.W.; JONES, R.T.; NEIHEIM, M.E. & GELLER, M. Studies on *Alternaria* allergens III. Isolation of a major allergenic fraction (Alt-1). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.66, p.138-147, 1980.
- WEBER, R.W. Allergen immunotherapy and standardization and stability of allergen extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.84, p.1093-1095, 1989.