

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ISABELLE MARIA FEITOSA DE ARAÚJO

PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE POLISSACARÍDEOS  
EXTRAÍDOS DAS PAREDES CELULARES DAS LEVEDURAS *Kluyveromyces*  
*marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*

RECIFE  
2021

ISABELLE MARIA FEITOSA DE ARAÚJO

PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE POLISSACARÍDEOS  
EXTRAÍDOS DAS PAREDES CELULARES DAS LEVEDURAS *Kluyveromyces*  
*marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco – Campus Sede, como requisito parcial da graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.  
Orientador: Éder Galinari Ferreira

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D278p

De Araújo, Isabelle Maria Feitosa

Prospecção da atividade antimicrobiana de polissacarídeos extraídos das paredes celulares das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* / Isabelle Maria Feitosa De Araújo. - 2021.

32 f. : il.

Orientador: Eder Galinari Ferreira.

Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

1. Polissacarídeos. 2. Antimicrobiano. 3. Leveduras. 4. Bactérias patogênicas. I. Ferreira, Eder Galinari, orient. II. Título

CDD 574

---

ISABELLE MARIA FEITOSA DE ARAÚJO

PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE POLISSACARÍDEOS  
EXTRAÍDOS DAS PAREDES CELULARES DAS LEVEDURAS *Kluyveromyces*  
*marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco – Campus Sede, como requisito parcial da graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Recife, 26 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Éder Galinari Ferreira  
(UFRPE)

---

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco  
(UFRPE)

---

Prof. Dr. Robson de Assis Souza  
(UNIFENAS)

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima  
(UFRPE)

Dedico este trabalho ao meu filho, Antônio,  
que me apresentou o amor mais puro.

## RESUMO

Polissacarídeos das mais diversas fontes, podem possuir atividades farmacológicas como, por exemplo, antioxidante, imunomoduladora, anticoagulante e antimicrobiana. Tendo em vista que esta última atividade ainda não foi avaliada, segundo nosso levantamento bibliográfico, para os polissacarídeos de parede celular das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*, o objetivo deste estudo foi o de verificar a atividade antimicrobiana de polissacarídeos extraídos das paredes celulares das leveduras *Kluyveromyces marxianus* CCT7735 e *Kluyveromyces lactis* CBS2359 e compará-las a uma levedura não-*Kluyveromyces* como a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. Os testes de suscetibilidade foram realizados em placas de Petri (90 x 15 mm) pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer conforme preconizados pelo suplemento M 100 da 29ª edição do *Clinical & Laboratory Standards Institute*. Dez microlitros da solução de polissacarídeos (10 mg/mL) solubilizados em água destilada e esterilizados por filtração foram depositados sobre os discos de papel estéreis (6 mm). Os polissacarídeos foram testados frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle positivo: 100/10 µg de piperacilina-tazobactam); *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (controles positivos: 30 µg de cefoxitina e 10 unidades de penicilina); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (controles positivos: 100/10 µg de piperacilina-tazobactam e 10 µg de gentamicina); *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (controle positivo: 10 µg de gentamicina) e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (controles positivos: 30 µg de tetraciclina e 10 unidades de penicilina). Nenhuma das amostras de polissacarídeos de parede celular avaliadas inibiram o crescimento das linhagens de bactérias patogênicas testadas. Desta forma, pelo menos nas moléculas nativas, os polissacarídeos não apresentaram atividade antimicrobiana. Sugere-se que novos estudos sejam realizados com as amostras avaliadas, seja para outras aplicações/atividades farmacológicas ou com a modificação química ou alteração da concentração destes polissacarídeos, seguido de uma nova testagem quanto a atividade antimicrobiana, dentre outras.

**Palavras-chave:** Polissacarídeos, antimicrobiano, leveduras, bactérias patogênicas.

## ABSTRACT

Polysaccharides from the most diverse sources, may have pharmacological activities such as, for example, antioxidant, immunomodulatory, anticoagulant and antimicrobial. Bearing in mind that this last activity has not yet been evaluated, according to our bibliographic survey, for the cell wall polysaccharides of the yeasts *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis*, the objective of this study was to verify the antimicrobial activity of polysaccharides extracted from the cell walls of the yeasts *Kluyveromyces marxianus* CCT7735 and *Kluyveromyces lactis* CBS2359 and compare them to a non-*Kluyveromyces* yeast like *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. The susceptibility tests were performed in Petri dishes (90 x 15 mm) using the Kirby-Bauer disc-diffusion method as recommended by the M 100 supplement of the 29<sup>th</sup> edition of the Clinical & Laboratory Standards Institute. Ten microliters of the polysaccharide solution (10 mg/mL) solubilized in distilled water and sterilized by filtration were deposited on sterile paper discs (6 mm). Polysaccharides were tested against *Escherichia coli* ATCC 25922 (positive control: 100/10 µg of piperacillin-tazobactam); *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (positive controls: 30 µg of cefoxitin and 10 units of penicillin); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (positive controls: 100/10 µg of piperacillin-tazobactam and 10 µg of gentamicin); *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (positive control: 10 µg gentamicin) and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positive controls: 30 µg tetracycline and 10 units of penicillin). None of the cell wall polysaccharide samples evaluated inhibited the growth of the pathogenic bacteria strains tested. Thus, at least in native molecules, polysaccharides did not show antimicrobial activity. We suggest that further studies be carried out with the samples evaluated, either for other pharmacological applications/activities or with the chemical modification or modification of the concentration of these polysaccharides, followed by a new test for antimicrobial activity, among others.

**Keywords:** Polysaccharides, antimicrobial, yeasts, pathogenic bacteria.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	8
1.1 Atividades biológicas/farmacológicas de polissacarídeos .....	8
1.2 Polissacarídeos de parede celular de leveduras .....	8
1.2.1 Quitina .....	9
1.2.2 Glucana .....	10
1.2.3 Manana .....	11
1.3 Polissacarídeos como agentes antimicrobianos .....	13
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Cultivo das leveduras .....	16
3.2 Obtenção dos polissacarídeos de parede celular .....	17
3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos polissacarídeos .....	17
3.3.1 Amostras bacterianas .....	17
3.3.2 Preparo dos inóculos .....	17
3.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos polissacarídeos .....	18
4. RESULTADOS .....	18
5. DISCUSSÃO .....	21
6. CONCLUSÕES .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Atividades biológicas/farmacológicas de polissacarídeos

Os polissacarídeos constituem-se de macromoléculas de longas cadeias de monossacarídeos presentes em abundância nos organismos vivos, apresentando importantes funcionalidades, tais como função estrutural (por exemplo, paredes celulares), receptores de membrana e como armazenamento energético (NELSON; COX, 2018; CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009). Polissacarídeos são carboidratos formados por poliidroxialdeídos ou poliidroxiacetonas cíclicos com, pelo menos, 20 unidades monossacarídicas e que, na maioria das vezes, apresentam fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ . Os monossacarídeos podem estar ligados por uma diversidade de ligações glicosídicas formando polissacarídeos lineares ou ramificados (NELSON; COX, 2018). Os polissacarídeos podem ser extraídos de diversas fontes como algas marinhas (RODRIGUES; COURA; BENEVIDES, 2016; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015), bactérias (GUPTA; DIWAN, 2017), fungos filamentosos (ANDRADE *et al.*, 2015; TAKAHASHI *et al.*, 2017) e leveduras (TANG *et al.*, 2017; LIU; HUANG; LV, 2018).

No campo da biotecnologia, as propriedades desses polímeros vêm sendo testadas para obtenção de compostos naturais que apresentem atividades farmacológicas de interesse, como, por exemplo, atividades antioxidantes (CHENG; HUANG, 2019; MUTAILLIFU *et al.*, 2019), antitumoral (RAN *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2019), antimicrobiana (KRICHEN *et al.*, 2015; BERRI *et al.*, 2016), anti-inflamatória (PRADO *et al.*, 2016; LI; SHAH, 2016), anticoagulante (FAGGIO *et al.*, 2015), imunomoduladora (WANG *et al.*, 2017), hipocolesterolêmica (BHAT; BAJAJ, 2018) e hipolipidêmica (KOLSI *et al.*, 2017).

### 1.2 Polissacarídeos de parede celular de leveduras

Além dos fungos serem ótimos decompositores, desempenhando um papel importante nos ecossistemas, também apresentam características que permitem sua aplicação em diferentes áreas industriais e de interesse comercial (SUTHERLAND, 1998).

Polissacarídeos da parede celular de leveduras têm apresentado diversas respostas biológicas. A aplicação terapêutica depende da forma espacial e da composição de cada polímero. Assim, as diferenças nas estruturas de cada polissacarídeo representam características específicas para novas aplicabilidades farmacológicas (SILVA *et al.*, 2006).

A maioria dos fungos contém cinco componentes principais em sua parede celular, sendo eles quitina, glicoproteínas, (1→3)- $\beta$ -glucanas, (1→6)- $\beta$ -glucanas e (1→3)- $\alpha$ -glucanas (GRÜN, 2003). A parede celular fúngica é constituída principalmente por polissacarídeos, que podem estar ligados a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos. Na parede celular de leveduras existem três principais grupos de polissacarídeos (Figura 1), determinando rigidez e características morfológicas. Esses polissacarídeos podem ser denominados de acordo com o açúcar predominante, assim, existem por exemplo, as mananas, polímeros de manose (encontradas também ligadas a proteínas, as manoproteínas), as glucanas, polímeros de glicose (polissacarídeo de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glicose) e polímeros de *N*-acetilglicosamina, responsável pela formação de quitina (ADAMS, 2004). As glucanas e mananas estão em maior abundância na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, correspondendo a praticamente, 60 a 90% do peso seco da parede celular (CHAUD; SGARBIERI, 2006), o que torna atrativo seu estudo, devido a um bom rendimento desses polissacarídeos após sua extração.

### 1.2.1 Quitina

A quitina é um homopolímero linear e longo de *N*-acetilglicosamina ligada de forma  $\beta$ (1→4), insolúvel em água e relativamente pequeno quando comparado aos outros polissacarídeos da parede celular fúngica. Fungos filamentosos contém 10 a 20% de quitina, enquanto nas leveduras constitui de 1 a 2% da parede celular. Ligações de hidrogênio formam as microfibrilas de quitina nas leveduras e fungos filamentosos. Por serem estruturas fortes, são responsáveis por manterem a integridade da parede celular, fazendo-a suportar às pressões osmóticas. Logo, uma falha na produção de quitina causa deformação da célula fúngica (BOWMANN; FREE, 2006).

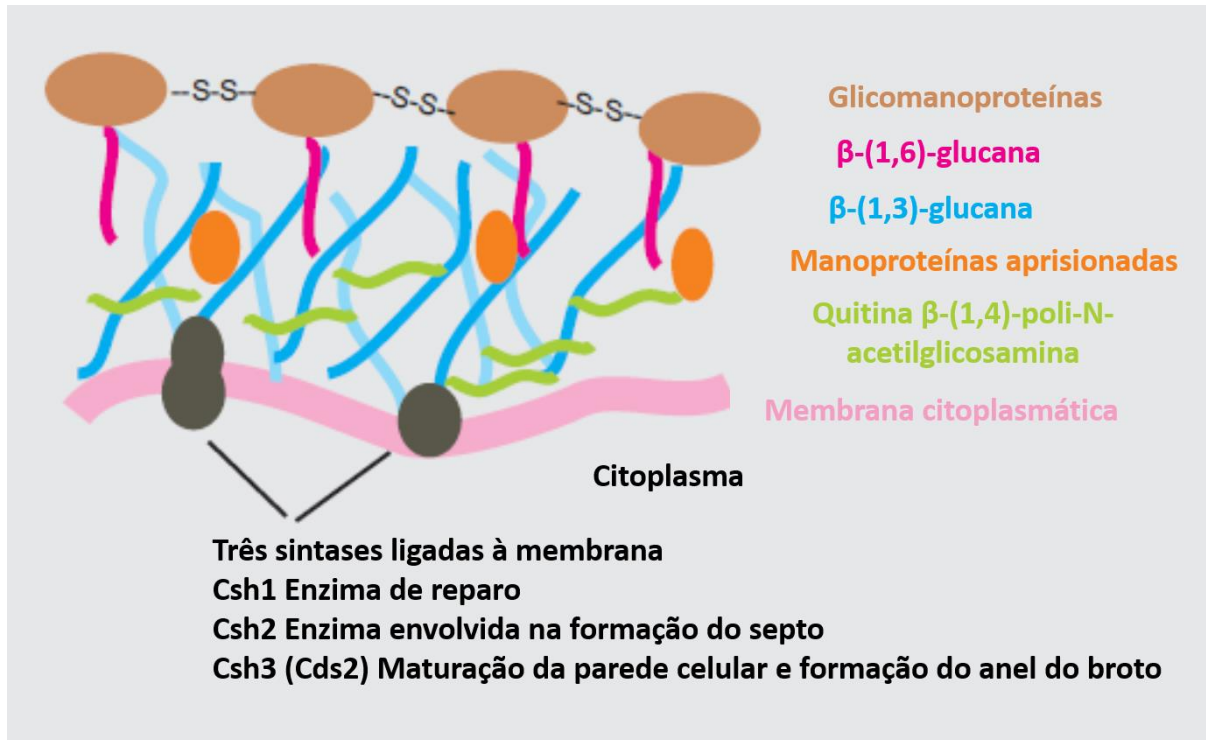


Figura 1. Constituição da parede celular da levedura *S. cerevisiae* de acordo com Feldmann, 2012.

### 1.2.2 Glucana

As glucanas, polissacarídeos mais estudados em relação à atividade biológica, são importantes biopolímeros de D-glicose, e podem apresentar no seu carbono anomérico configuração  $\alpha$  ou  $\beta$  (RAMESH, 2003). As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia. Ao serem reconhecidas pelo organismo, desencadeiam uma série de eventos na resposta imune, sendo assim, caracterizadas como um modificador da resposta biológica. As glucanas induzem a ativação de macrófagos, linfócitos polimorfonucleares e expressão de citocinas (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Moon *et al.* (2005), investigaram a ação antitumoral das  $\beta$ -glucanas isoladas de *Aureobasidium* sp. em camundongos com tumores. Os autores observaram que  $\beta$ -glucanas atuam ativando e potencializando funções imunológicas do hospedeiro, desempenhando um papel importante na destruição de células tumorais e impossibilitando as metástases.

Robbins e Seeley (1997), em seus experimentos com leveduras e frações de glucanas, introduziram-nas numa dieta com baixo teor de colesterol em ratos e observaram que houve uma diminuição de forma rápida e eficaz nos níveis de colesterol sérico, podendo concluir então que as glucanas possuíam atividade hipocolesterolêmica.

Em algumas ocasiões as glucanas são pouco solúveis, o que acaba inviabilizando a sua utilização, a exemplo das glucanas  $\beta$ 1-3 (KWIATKOWSKI e KWIATKOWSKI, 2012), ou tendo que solubilizá-las em outros solventes que não a água, como o dimetilsulfóxido (DMSO), mas que dependendo da concentração deste, torna-se tóxico para as células de mamíferos (JINDAL *et al.*, 2013; GALVAO *et al.*, 2014; OCK; RHO, 2011; RUIZ-DELGADO *et al.*, 2009). Uma outra possibilidade é a modificação química dessas glucanas insolúveis, por exemplo, por processos de sulfatação e carboximetilação (SANTOS; SATO, 2009). A sulfatação de  $\beta$ -glucanas afeta significativamente sua solubilidade em água, a viscosidade e o peso molecular, alterando as propriedades funcionais do polissacarídeo.  $\beta$ -glucanas sulfatadas demonstraram atividades antioxidante e hipolipidêmica superiores quando comparadas às  $\beta$ -glucanas não sulfatadas (GUO *et al.*, 2019). Polissacarídeos sulfatados do fungo *Catathelasma ventricosum* também exibiram melhores habilidades antioxidante e anticoagulante do que  $\beta$ -glucanas nativas (LIU *et al.*, 2018).

### 1.2.3 Manana

Mananas são polissacarídeos compostos de unidades de manose. Apesar de existir uma variedade de linhagens de leveduras com estruturas de mananas diferentes, todas elas apresentam em comum moléculas bem ramificadas, contendo ligações  $\alpha(1\rightarrow2)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  e  $\alpha(1\rightarrow6)$  (STEWART; BALLOU, 1968), a exemplo do que foi observado no estudo de Galinari *et al.* (2017) cuja manana da levedura *Kluyveromyces marxianus* continha esses tipos de ligação química e sendo uma molécula ramificada (Figura 2). Além disso, as mananas têm como característica uma boa solubilidade em água (SANTOS; SATO, 2009). São compostas principalmente de D-manose, mas, às vezes, contêm outros monossacarídeos em menor proporção como glicose, galactose e xilose, que também influenciam nas atividades do polissacarídeo (KRIŽKOVÁ *et al.*, 2001).

Os mananoligossacarídeos (MOS) presentes na parede celular de leveduras podem se ligar de maneira efetiva a bactérias patogênicas do trato intestinal e bloquear sua capacidade de colonização. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio cholerae*, por exemplo, possuem lectinas que se ligam especificamente a manose do MOS (SEDMAK, 2006), ou seja, a manana serve como um sítio de ligação alternativo para bactérias Gram-negativas, evitando que patógenos se fixem aos enterócitos (célula epitelial da camada superficial do intestino delgado e intestino grosso), impedindo assim uma infecção bacteriana (FERKET *et al.*, 2002).

Estudos realizados com uma fração rica em manana demonstraram sua eficiência no bloqueio da interação de *E. coli* no intestino (realizado através de infecção *in vitro*). A adesão de *E. coli* às células HT-29 (células intestinais) diminuiu consideravelmente, sendo possível observar uma redução nas respostas pró-inflamatórias (BROWNE *et al.*, 2019). Křižková *et al.* (2001), observaram que em *Euglena gracilis*, glucomananases, mananas isoladas das leveduras *S. cerevisiae* e *Candida albicans* apresentaram atividade antimutagênica, reduzindo efeitos negativos causados pela oxidação ao DNA de seus cloroplastos. Estudo de Kokoulin *et al.* (2020), também investigaram a atividade biológica da manana no desenvolvimento de colônias de diferentes linhagens celulares de câncer. Foi isolada amostra de  $\alpha$ -D-manana sulfatada da bactéria marinha *Halomonas halocynthiae*. Os autores observaram que a  $\alpha$ -D-manana reduziu a viabilidade celular e a formação de colônias das células MDA-MB-231 (células de câncer de mama).

O polissacarídeo também pode apresentar atividades farmacológicas quando associado a outros compostos. A manana sulfata (MS) ligada a nanopartículas de prata (MS-AgNPs) demonstrou ser um potencial agente tópico na cicatrização de feridas. Um hidrogel produzido com MS obtido através da manana extraída de parede celular de *S. cerevisiae*, apresentou propriedade cicatrizante acelerada em feridas devido a uma melhor captação do receptor de manose (MUGADE *et al.*, 2017).

Outros estudos de avaliação de atividades biológicas de  $\alpha$ -mananas têm sido realizados através do isolamento, purificação e caracterização química destes polissacarídeos, obtidos a partir de fontes naturais (PENG *et al.*, 2016; GALINARI *et al.*, 2017; CHATTERJEE *et al.*, 2018; LAKRA *et al.*, 2020).

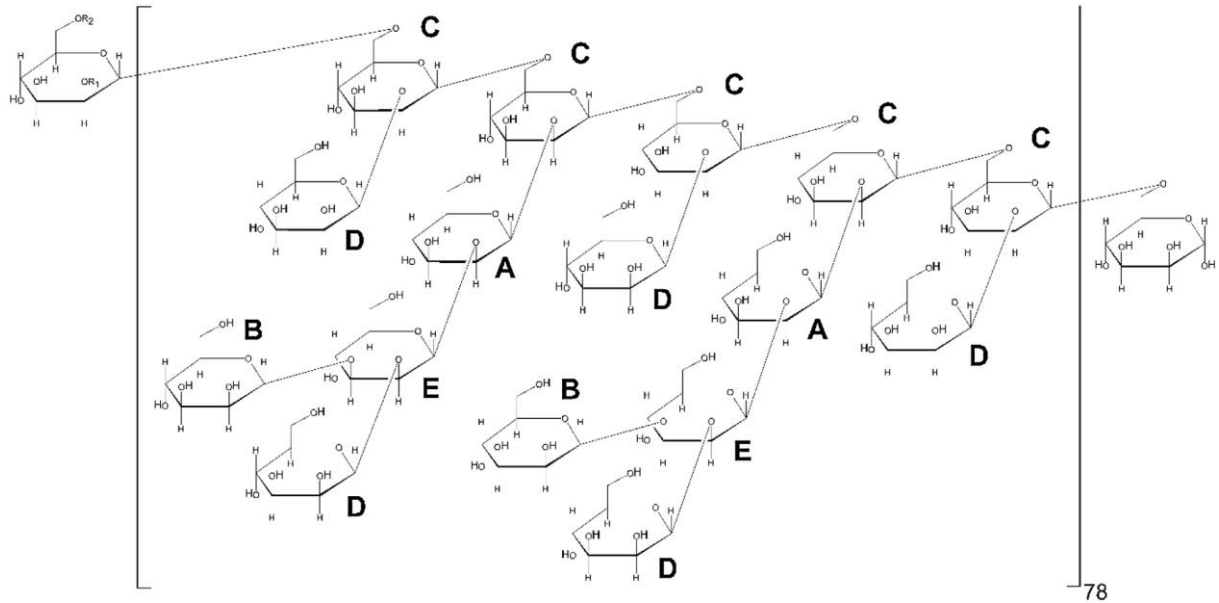


Figura 2. Proposição da estrutura da manana da parede celular de *K. marxianus* no trabalho de Galinari *et al.* (2017). A: 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2); B:  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3) terminal não redutor; C: 2,6)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6); D:  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2) terminal não redutor; E: 2,3)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2).

### 1.3 Polissacarídeos como agentes antimicrobianos

Os microrganismos, em especial as bactérias, têm a capacidade de rapidamente tornarem-se resistentes a um determinado antimicrobiano. Isso pode ocorrer por diversos fatores como o uso indiscriminado de antimicrobianos ou em concentrações subletais, ou ainda pela administração por um período inferior ao recomendado que, portanto, ocasiona uma pressão seletiva, selecionando cepas com mecanismos de resistência (DIAS; MONTEIRO; MENEZES, 2010; DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Verifica-se que os mecanismos de resistência aos antibióticos acontecem devido a mudanças na permeabilidade da membrana celular, alterações da molécula alvo de um antibiótico e aquisição da capacidade de degradar ou inativar o antibiótico (LOUREIRO *et al.*, 2016). Dessa forma, diversos medicamentos já são ineficazes contra bactérias patogênicas. Como consequência, torna-se necessária a busca por novos compostos contra infecções de origem bacteriana, visto que, a indústria farmacêutica não tem conseguido produzir novos antibióticos na mesma velocidade (SINGH *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2017).

A Organização Mundial da Saúde elaborou um plano global sobre resistência antimicrobiana, listando cinco objetivos estratégicos específicos que visam combater a resistência microbiana; sendo eles: i) melhorar a conscientização e a compreensão

da resistência microbiana; ii) reduzir a incidência de infecções; iii) otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos; iv) reforçar os conhecimentos por meio de vigilância e pesquisas; v) garantir investimentos sustentáveis em novos medicamentos, diagnósticos e vacinas (MENDELSON; MATSOSO, 2015). Nesse contexto, a comunidade científica tem se mostrado cada vez mais interessada em explorar características químicas e estruturais de diversas fontes naturais para a obtenção de novas moléculas com possível aplicação antimicrobiana. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os polissacarídeos extraídos de fontes naturais apresentam propriedades de interesse biotecnológico e são viáveis opções no desenvolvimento de novos antibióticos. (TAHMOUZI, 2014; FAKHFAKH *et al.*, 2017).

MAZAREI *et al.* (2017) testaram a capacidade de polissacarídeos extraídos das folhas de *Capparis spinosa* L. frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus panis* e *Shigella dysenteriae*. O extrato apresentou relevante atividade antimicrobiana contra todas essas bactérias citadas.

O kefirano, um exopolissacarídeo produzido por algumas espécies de lactobacilos isoladas de grãos de kefir, também demonstrou propriedades terapêuticas (PAIVA, 2013; MORADI; KALANPOUR, 2019). Segundo estudos de Rodrigues *et al.* (2005), o exopolissacarídeo foi capaz de inibir sete espécies de bactérias, entre elas a *Streptococcus pyogenes*, a qual obteve maior eficácia antimicrobiana. Em seus experimentos, também avaliaram que ratos com feridas cutâneas infectadas com *S. aureus* tiveram melhor atividade cicatrizante quando expostos ao kefirano, em comparação com os tratados com a emulsão de neomicina-clostebol.

Um polissacarídeo purificado da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) exibiu efeito antimicrobiano contra as cepas bacterianas *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli*, porém não apresentou atividade antimicrobiana relevante contra essa última. Ademais, foi constatado, de acordo com os valores da concentração mínima inibitória (CMI), maior potencial de inibição contra *S. enteritidis*, *E. cloacae*, *M. flavus*, *S. typhimurium* e *B. cereus*. (KUNGEL *et al.*, 2018). O estudo de Zhang *et al.* (2017), demonstrou que o polissacarídeo do fungo *Cordyceps cicadae* exerceu atividade bactericida ao danificar a parede celular bacteriana, aumentando a permeabilidade da membrana e causando lesões estruturais. Esse polissacarídeo

apresentou forte efeito antimicrobiano contra *Salmonella paratyphi*, *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*.

Os fungos representam uma promissora fonte natural de bioativos (STROBEL *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2019), investigaram a eficácia de um polissacarídeo produzido a partir do fungo *Chaetomium globosum* contra *E. coli* e *S. aureus*. Concluíram que o polissacarídeo é um promissor agente antibacteriano para indústrias alimentícia e farmacêutica. O polissacarídeo agiu rompendo a membrana citoplasmática, porém, não teve influência sobre a parede celular dos patógenos.

Em alguns casos, polissacarídeos são incorporados com outras substâncias ativas, a fim de se obter ou potencializar um efeito antimicrobiano (PERINELLI *et al.*, 2018). Diversas substâncias como a quitosana, pó de celulose, carboximetilcelulose e celulose microcristalina carregados com nanopartículas de prata (AgNPs) se tornam potenciais antimicrobianos contra *E. coli* e *S. aureus* (HASSABO *et al.*, 2015). Ainda, nanopartículas de prata estabilizadas com exopolissacarídeos extraídos de bactérias do ácido láctico foram capazes de inibir o crescimento microbiano de algumas bactérias patogênicas, como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *K. pneumonia* e *P. aeruginosa* (KANMANI; LIM, 2013). A incorporação de extrato de folha de betel (BE) em filmes de quitosana também demonstraram melhorar sua capacidade antimicrobiana (KASAI *et al.*, 2020)

Atividades antimicrobianas também foram descritas para polissacarídeos isolados de folhas de *Olea europaea* (KHEMAKHEM *et al.*, 2018), de caldo de *Streptomyces virginia* H03 (HE *et al.*, 2010), de alga marrom *Sargassum swartzii* e *Spatoglossum asperum* (VIJAYABASKAR; VASEELA; THIRUMARAN, 2012; PALANISAMY *et al.*, 2017), de cascas da raiz de *Periploca laevigata* (HAJJI *et al.*, 2019), de frutos da *Cordia myxa* (HOJJATI; BEIRAMI-SERIZKANI, 2020), de *Pleurotus eryngii*, de *Streptococcus thermophilus* (LI; SHAH, 2014), entre outros, indicando que os polissacarídeos com atividade antimicrobiana podem ser extraído de diferentes fontes, desde plantas e frutos à microrganismos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Obter polissacarídeos das paredes celulares das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* com propriedade antimicrobiana.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade antimicrobiana dos polissacarídeos das paredes celulares das leveduras *K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Cultivo das leveduras

As leveduras foram cultivadas em reator com capacidade de 8 L e contendo um meio de cultura complexo EM:G (Extrato de malte 2% e glicose 1%) ou um meio definido *yeast carbon base* (YCB, cuja constituição é: ácido bórico, 0,0005 g/L; sulfato de cobre • 5 H<sub>2</sub>O, 0,00004 g/L; iodeto de potássio, 0,0001 g/L; cloreto férrico • 6 H<sub>2</sub>O, 0,0002 g/L; sulfato de manganês • H<sub>2</sub>O, 0,0004 g/L; molibdato de sódio • 2 H<sub>2</sub>O, 0,0002 g/L; sulfato de zinco • 7 H<sub>2</sub>O, 0,0004 g/L; biotina, 0,000002 g/L; pantotenato de cálcio, 0,0004 g/L; ácido fólico, 0,000002 g/L; inositol, 0,002 g/L; ácido nicotínico, 0,0004 g/L; ácido *p*-aminobenzóico, 0,0002 g/L; riboflavina, 0,0002 g/L; hidrocloreto de piridoxina, 0,0004 g/L; hidrocloreto de tiamina, 0,0004 g/L; hidrocloreto de L-histidina, 0,001 g/L; DL-metionina, 0,002 g/L; DL-triptofano, 0,002 g/L; sulfato de magnésio • 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L; cloreto de sódio, 0,1 g/L; cloreto de cálcio, 0,1 g/L; sulfato de amônio, 5 g/L; fosfato monobásico de potássio, 1 g/L; glicose 10 g/L). As condições de cultivo foram: 37 °C para *K. marxianus* CCT7735 e 30 °C para *K. lactis* CBS2359 e *S. Cerevisiae* CAT-1, agitação a 200 rpm e injeção de 3 L/min de ar filtrado durante 48 horas. Foi realizada uma batelada de cada levedura.

### 3.2 Obtenção dos polissacarídeos de parede celular

Após o cultivo das leveduras, as biomassas foram recuperadas por centrifugação a  $9.800 \times g/15 \text{ min}/ 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Estas então, foram lavadas três vezes com água destilada para remoção do meio de cultura residual. As células foram liofilizadas, pesadas e submetidas à extração dos polissacarídeos com 3% de NaOH a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 horas. Essa etapa de extração foi repetida mais duas vezes, guardando-se o sobrenadante (porção onde estão os polissacarídeos solúveis) e descartando-se o *pellet*. O pH do sobrenadante contendo os polissacarídeos foi neutralizado com ácido clorídrico 4 M. Os polissacarídeos foram precipitados com metanol frio (2 volumes) durante 12 horas e recuperados por centrifugação a  $15.300 \times g/30 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O pellet foi dialisado e liofilizado para obtenção do peso seco do polissacarídeo bruto e confirmação do rendimento. Esses procedimentos foram realizados por Éder Galinari Ferreira durante seu estágio pós-doutoral.

### 3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos polissacarídeos

A atividade antimicrobiana foi determinada de acordo com as informações indicadas pelo *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* suplemento M 100 da 29ª edição do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019).

#### 3.3.1 Bactérias utilizadas no ensaio

A atividade antimicrobiana dos polissacarídeos de parede celular foi avaliada nas cepas de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. faecalis* ATCC 29212, gentilmente cedidas pela professora Anna Carolina Soares Almeida do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA (Genoma/UFRPE).

#### 3.3.2 Preparo dos inóculos

As cepas bacterianas foram previamente cultivadas em caldo Mueller Hinton (MHB), e incubados por 24 h à  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cada cultura ativada foi transferida para placas

de Petri contendo ágar Mueller Hinton, aplicando-se a técnica de esgotamento por estrias compostas e incubadas à 35 °C por 18 a 24 h.

Após o período de incubação, colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina estéril (NaCl 0,85%), até obter uma turvação correspondente a concentração 0,5 da escala de McFarland ( $\pm 1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

### 3.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos polissacarídeos

Os testes de suscetibilidade aos polissacarídeos foram realizados pelo método qualitativo de disco-difusão de acordo com a técnica de Kirby-Bauer (1966), em placa de Petri (90 x 15 mm), contendo meio sólido Ágar Mueller Hinton (MHA, cuja constituição é: extrato de carne, 2,0 g/L; ácidos casaminos, 17,5 g/L; amido, 1,5 g/L; Ágar, 17,0 g/L).

Após o preparo dos inóculos padronizados em 0,5 da escala de McFarland, a suspensão bacteriana de cada inóculo foi coleta com um *swab* estéril e espalhada uniformemente sobre a superfície do ágar. Aguardou-se 15 minutos antes da aplicação dos discos de papel (6 mm) estéreis. Posteriormente, foram adicionados 10 µL da solução de polissacarídeos (10 mg/mL) no centro de cada disco de papel. Aguardou-se cerca de 10 minutos para a completa absorção da solução de polissacarídeos antes da incubação das placas de Petri em posição invertida na B.O.D. a 35 °C por 24 h. Toda a manipulação bacteriana foi realizada em condições assépticas da câmara de fluxo laminar. Foram utilizados como controles positivos os antibióticos cefoxitina (30 µg) e penicilina (10 unidades) para *S. aureus*, tetraciclina (30 µg) e penicilina (10 unidades) para *E. faecalis*, piperacilina-tazobactam (100/10 µg) e gentamicina (10 µg) para *P. aeruginosa*, piperacilina-tazobactam (100/10 µg) para *E. coli* e gentamicina (10 µg) para *K. pneumoniae*. Ao final do período de incubação, fez-se as medições dos halos de inibição utilizando-se um paquímetro.

## 4. RESULTADOS

Pelo teste de disco-difusão, verificou-se que as amostras de polissacarídeos de parede celular obtidos das três espécies de leveduras, na concentração de 10 mg/mL, não apresentaram inibição de crescimento contra os cinco microrganismos patogênicos avaliados. Os resultados obtidos para *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*,

*P. aeruginosa* e *E. faecalis* estão representados nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente.

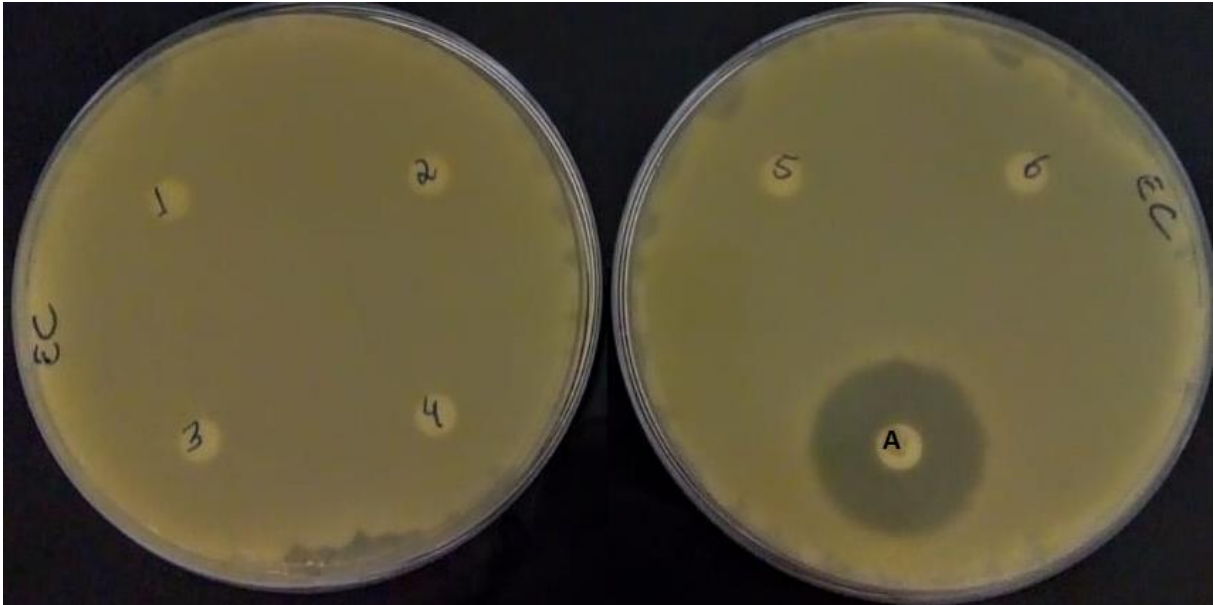


Figura 3. Antibiograma com polissacarídeos (10 mg/mL) de *K. marxianus* cultivada em EM:G (1) e YCB (2), *K. lactis* cultivada em EM:G (3) e YCB (4) e *S. cerevisiae* cultivada em EM:G (5) e YCB (6). A bactéria testada foi a *E. coli*. (A) indica o antibiótico piperacilina-tazobactam (100/10 µg).

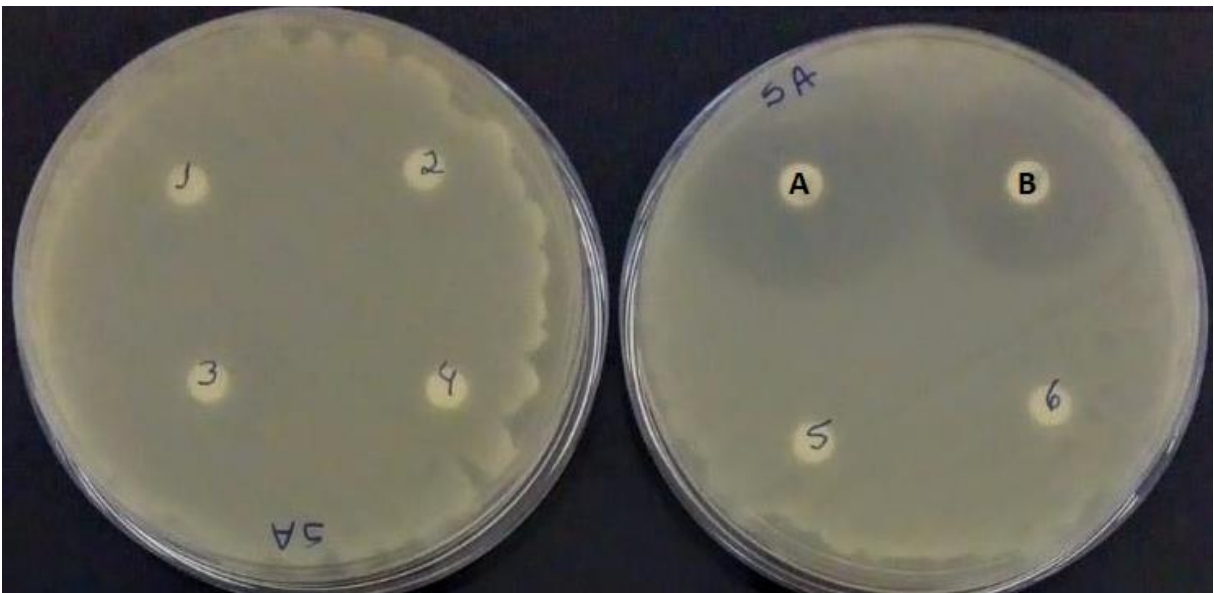


Figura 4. Antibiograma com polissacarídeos (10 mg/mL) de *K. marxianus* cultivada em EM:G (1) e YCB (2), *K. lactis* cultivada em EM:G (3) e YCB (4) e *S. cerevisiae* cultivada em EM:G (5) e YCB (6). A bactéria testada foi a *Staphylococcus aureus*. (A e B) indicam, respectivamente, os antibióticos penicilina (10 unidades) e cefoxitina (30 µg).

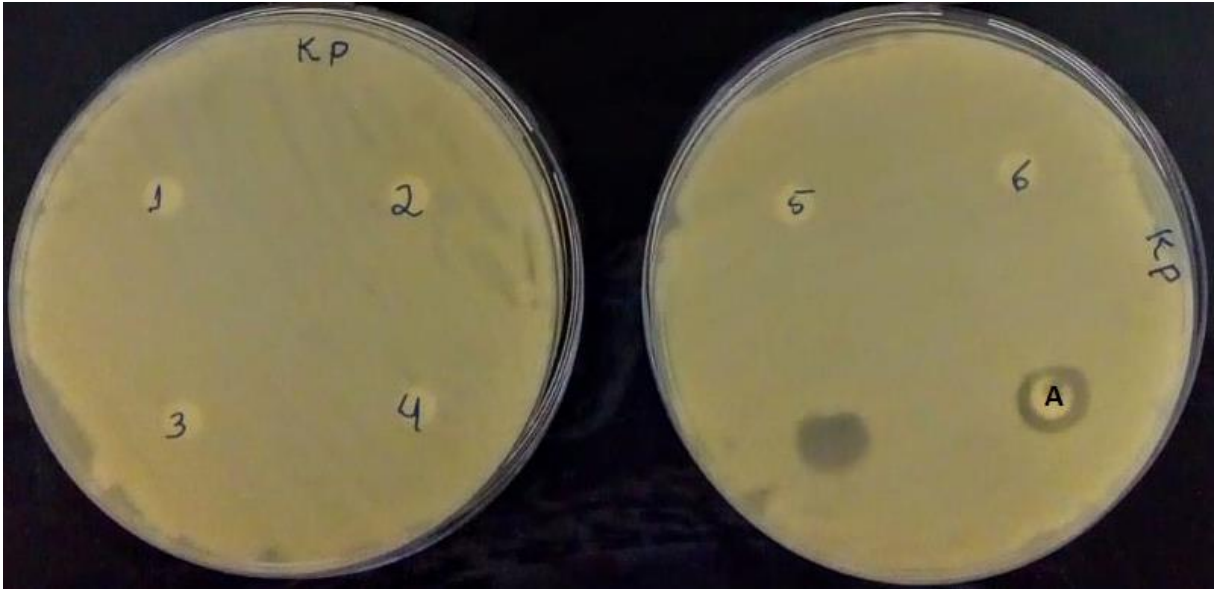


Figura 5. Antibiograma com polissacarídeos (10 mg/mL) de *K. marxianus* cultivada em EM:G (1) e YCB (2), *K. lactis* cultivada em EM:G (3) e YCB (4) e *S. cerevisiae* cultivada em EM:G (5) e YCB (6). A bactéria testada foi a *K. pneumoniae*. (A) indica o antibiótico gentamicina (10 µg).

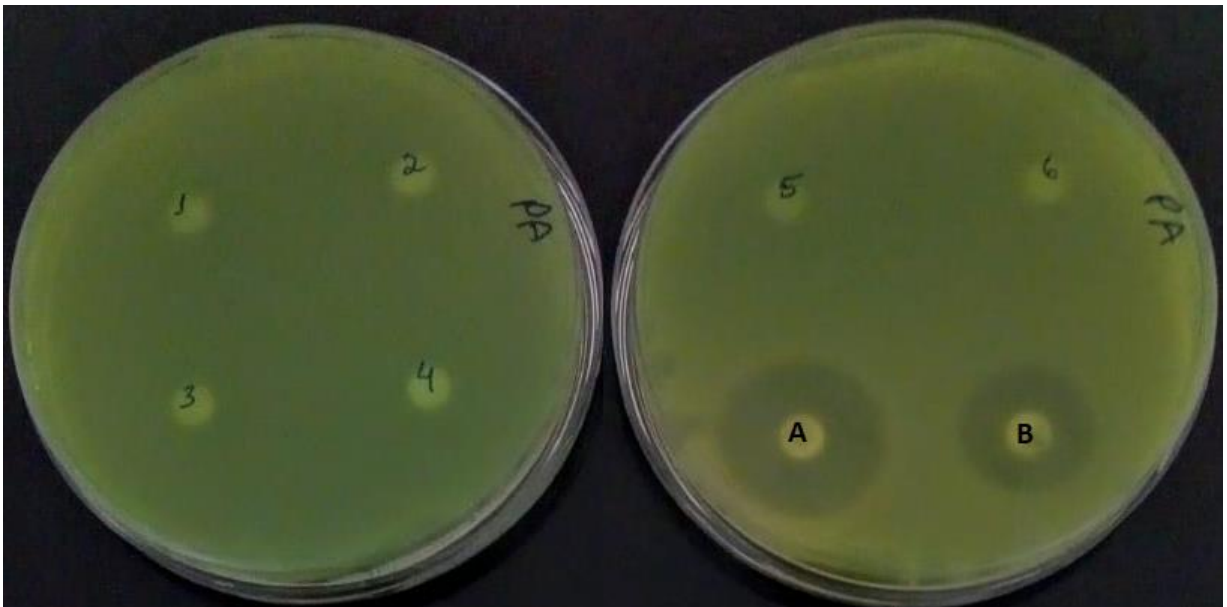


Figura 6. Antibiograma com polissacarídeos (10 mg/mL) de *K. marxianus* cultivada em EM:G (1) e YCB (2), *K. lactis* cultivada em EM:G (3) e YCB (4) e *S. cerevisiae* cultivada em EM:G (5) e YCB (6). A bactéria testada foi a *Pseudomonas aeruginosa*. (A e B) indicam, respectivamente, os antibióticos piperacilina-tazobactam (100/10 µg) e gentamicina (10 µg).

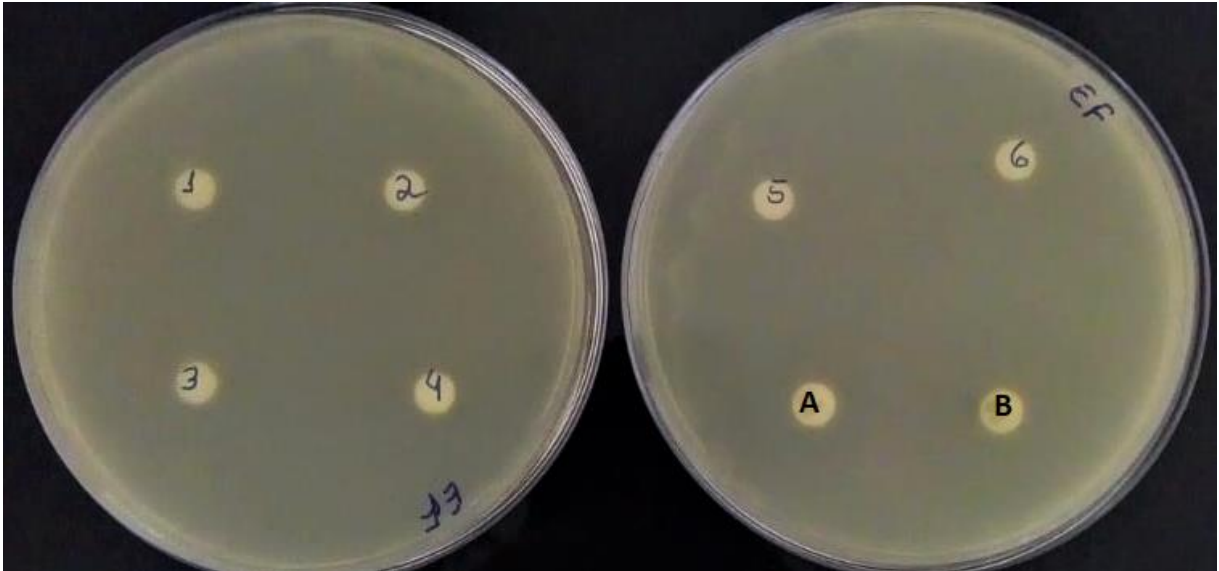


Figura 7. Antibiograma com polissacarídeos (10 mg/mL) de *K. marxianus* cultivada em EM:G (1) e YCB (2), *K. lactis* cultivada em EM:G (3) e YCB (4) e *S. cerevisiae* cultivada em EM:G (5) e YCB (6). A bactéria testada foi a *E. faecalis*. (A e B) indicam, respectivamente, os antibióticos tetraciclina (30 µg) e penicilina (10 unidades). Os halos de inibição ficaram sutis, não sendo visualizados na imagem.

## 5. DISCUSSÃO

Diante da quantidade de infecções bacterianas e o aumento da resistência a antibióticos, é de grande importância estudos que façam prospecção de novos agentes antimicrobianos. Nesse contexto, este experimento testou atividades antibacterianas de polissacarídeos extraídos das paredes celulares de leveduras, com o intuito de contribuir na descoberta de compostos provenientes de fontes naturais para fins farmacêuticos. Como mencionado, as seis amostras de polissacarídeos das três espécies de leveduras não demonstraram atividade antimicrobiana contra as espécies de bactérias avaliadas. A ausência de atividade antimicrobiana destas amostras pode estar relacionada a diversos fatores como citados a seguir.

A capacidade bioativa de um polissacarídeo está diretamente associada às suas características químicas, físicas e estruturais, como composição química, massa molecular (Mw), conformação estrutural da cadeia e solubilidade em água. Considerando, portanto, seus monômeros e configurações  $\alpha$  ou  $\beta$ , o tipo de ramificação, a presença de grupamentos e grau de substituição (GS) como características importantes para entender suas propriedades funcionais (XU *et al.*, 2019; MULLOY; MOURAO; GRAY, 2000).

Estudos de Tzianabos e Cisneros (1996), avaliaram atividade de polímeros solúveis de poli-(1-6)- $\beta$ -glucotriosil-(1-3)- $\beta$ -glucopirranose (PGG glucana), derivados de parede celular de *S. cerevisiae*, combinados com antibióticos. Os resultados de tal estudo demonstraram que a combinação de PGG glucana com antibióticos cefalotina, gentamicina e ciprofloxacina promoveu proteção melhorada contra *E. coli* ou *S. aureus* em comparação com o uso apenas dos antibióticos. O tratamento de camundongos com PGG glucana aumentou as propriedades anti-infecciosas de vários antibióticos contra bactérias resistentes, contribuindo na eliminação microbiana e aumentando o número de monócitos e neutrófilos.

Polissacarídeo extraído de *S. cerevisiae* apresentou maior atividade antimicrobiana quando submetido a irradiação em comparação com a amostra nativa. A radiação  $\gamma$  foi capaz de influenciar as propriedades funcionais do extrato, pois resultou em uma maior exposição de grupos funcionais como -OH, C=O e C-H. Ocorreu uma diminuição significativa na sua massa molecular e maior efeito antibacteriano de acordo com o aumento da dose de irradiação de 5 para 50 kGy.  $\beta$ -D-glucana foi extraído da parede celular de levedura com 2 % de NaOH a 90 °C durante 5 h. O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético 2 M e precipitação dos polissacarídeos com etanol (3 volumes). O polissacarídeo alcoólico foi então dissolvido em ácido acético a 3 % e centrifugado para remover as proteínas contaminantes. Por fim, o sobrenadante foi neutralizado com NaOH 2 M. O polissacarídeo demonstrou atividade antimicrobiana frente a *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. vulgaris*. Para o teste foi utilizado o mesmo método de disco-difusão. (KHAN *et al.*, 2016). Diante disso, talvez os polissacarídeos de *K. marxianus* CCT7735, *K. lactis* CBS2359 e *S. cerevisiae* CAT-1, obtivessem resultados antimicrobianos após tratamento por irradiação.

No presente estudo, as leveduras foram submetidas à extração dos polissacarídeos com NaOH. Apesar do método de extração com compostos alcalinos ser bastante utilizado, este só extrai alguns polissacarídeos, e o método de extração pode afetar a conformação de polissacarídeos de leveduras, sendo fator determinante de suas bioatividades (NOVAK; VETVICKA, 2008; OHNO *et al.*, 1999).

Amostras de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia, na concentração de 2 mg/mL em DMSO:água destilada estéril (1:9), apresentaram atividade antimicrobiana (ZACARIAS FILHO *et al.*, 2020). A utilização de ácido acético, NaClO e DMSO também tem mostrado eficácia na extração de

polissacarídeos (MIURA *et al.*, 2003). Alguns polissacarídeos insolúveis, como  $\beta$ -glucanas, podem ser extraídos da parede celular de levedura em solução de NaOH e posteriormente serem derivadas em glucana sulfatada, glucana carboximetilada, glucana fosforilada, glucana carboximetilada-fosforilada, glucana carboximetilada-sulfatada e glucana sulfatada-fosforilada, a fim de comparar qual desempenha melhor atividade terapêutica (TANG *et al.*, 2017).

A carboximetilação de polissacarídeos melhora a atividade antimicrobiana (MADRUGA *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2020). Estudos de Liu *et al.* (2017) mostram que polissacarídeos carboximetilados de *Catathelasma ventricosum* apresentaram efeito inibitório contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *B. subtilis*. Ainda, Li *et al.* (2017) investigaram atividade antibacteriana de polissacarídeos carboximetilados e submetidos também a ácido hidroxâmico, comprovando a eficácia destes frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *B. subtilis* e *S. aureus*; com efeitos inibitórios aumentados sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*).

Williams *et al.* (1992) descreveram um método para a solubilização de micropartículas de (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucana de *S. cerevisiae*. A solubilização foi alcançada sulfatando parcialmente o polissacarídeo com DMSO e ureia, aumentando sua polaridade. Em média, um grupo sulfato foi substituído em cada terceira subunidade de glicose. Os estudos observaram que a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucana solubilizada possui conformação tripla hélice. Tal conformação apresenta maior atividade biológica em comparação com glucanas de hélice simples (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; VASCONCELOS, 2009). Anteriormente, em experimentos *in vivo*, Williams *et al.* (1991) mostraram que  $\beta$ -glucana sulfatada de *S. cerevisiae* apresentou forte atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *C. albicans*. Assim, a literatura sugere que a modificação química poderia ser uma alternativa eficiente para melhorar as bioatividades dos polissacarídeos, ou produzir propriedades novas.

Manana isolada de parede celular da levedura *C. albicans* foi quaternizada com (3-cloro-2-hidroxipropil) tri-cloreto de metilamônio (CHPTAC) sob condições alcalinas, gerando um conjunto de derivados catiônicos com quatro diferentes graus de substituição. O potencial antibacteriano das amostras foi avaliado frente a sete cepas de *S. aureus*. Observou-se que mananas com maior grau de substituição impediram totalmente o crescimento bacteriano. A manana nativa ou apenas CHPTAC não mostraram efeito inibitório no crescimento de *S. aureus*. No experimento, a utilização de solução salina para diluição de suspensão aumentou os valores da CMI quando



comparados a diluição em água estéril, demonstrando que mananas quaternizadas foram sensíveis na presença de sais. O estudo obteve um resultado positivo, contudo, um dos derivados mostrou atividade antimicrobiana apenas em concentração elevada (VALÁRIKOVÁ *et al.*, 2020). Percebe-se, então, que a concentração do polissacarídeo também pode influenciar sua capacidade de produzir atividades antimicrobianas. Min *et al.* (2005) verificaram que os efeitos antimicrobianos de polissacarídeos contra *E. coli* eram dependentes de sua concentração. Observou-se inibição de crescimento de 50 % na concentração de 1,29 mg/mL e 80 % a 2 mg/mL.

Há estudos satisfatórios acerca da atividade antimicrobiana de polissacarídeos extraídos de fontes naturais, como algas marinhas e fungos. Entretanto, ainda é pouco relatada para polissacarídeos de parede celular de leveduras, sendo, portanto, importante maior investigação quanto as suas propriedades químicas e físicas, bem como sua utilização.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo verificou que as amostras de polissacarídeos de parede celular das leveduras de *K. marxianus* CCT7735, *K. lactis* CBS2359 e *S. cerevisiae* CAT-1 não exibiram atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as linhagens bacterianas avaliadas. Assim, conclui-se que esses polissacarídeos não são considerados alternativas terapêuticas para infecções provocadas por *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Assim, tais amostras poderiam ser avaliadas, em estudos futuros, quanto a outras atividades biológicas/farmacológicas como antioxidante, anticoagulante, antitumoral, hipocolesterolêmica, hipolipidêmica, hipoglicemiante, anti-inflamatória e imunomoduladora; ou ainda, alterar a concentração dos polissacarídeos, ou promover sua modificação química por adição de grupos químicos, ou sua alteração pelo tratamento com radiações ionizantes e reavaliação da atividade antimicrobiana contra as linhagens patogênicas testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, David J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

ANDRADE, Jackeline Pereira et al. PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 2, p. 311, 2015.

BERRI, Mustapha et al. Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cells. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 5, p. 2999-3008, 2016.

BHAT, Bilqeesa; BAJAJ, Bijender Kumar. Hypocholesterolemic and bioactive potential of exopolysaccharide from a probiotic *Enterococcus faecium* K1 isolated from kalarei. **Bioresource technology**, v. 254, p. 264-267, 2018.

BOWMAN, Shaun M.; FREE, Stephen J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BROWNE, Niall; TRAYNOR, Aimee; HORGAN, Karina A. Mannan rich fraction from yeast modulates inflammatory responses in intestinal cells (HT-29) exposed to *Escherichia coli*. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 7, 2019.

CHATTERJEE, Soumya et al. Sphingobactan, a new  $\alpha$ -mannan exopolysaccharide from Arctic *Sphingobacterium* sp. IITKGP-BTPF3 capable of biological response modification. **International immunopharmacology**, v. 60, p. 84-95, 2018.

CHAUD, Saula Goulart; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 369-379, 2006.

CHENG, Hao; HUANG, Gangliang. The antioxidant activities of carboxymethylated garlic polysaccharide and its derivatives. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 1054-1063, 2019.

CUNHA, Pablyana Leila R. da; PAULA, Regina Célia M. de; FEITOSA, Judith. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DE PAIVA, Igor Moura. Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de Kefir. 2013.

DIAS, Margarida; MONTEIRO, Micaela S.; MENEZES, M. F. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos de Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação**. Lisboa, 2010.

FAGGIO, C. et al. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides. **Natural product research**, v. 30, n. 17, p. 1934-1937, 2016.

FAKHFAKH, Nahed et al. Isolation of polysaccharides from *Malva aegyptiaca* and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1519-1525, 2017.

FELDMANN, Horst. **Yeast: molecular and cell biology**. John Wiley & Sons, 2011.

FERKET, P. R.; PARKS, C. W.; GRIMES, J. L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. In: **Multi-State Poultry Meeting**. Indianapolis: University of Illinois, 2002.

FERRACINI-SANTOS, Luciana; SATO, Hélia Harumi. Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada. **Química nova**, v. 32, n. 2, p. 322-326, 2009.

GALINARI, Éder et al. Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall  $\alpha$ -d-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 1298-1305, 2017.

GALVAO, Joana et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GRÜN, Christian Hugo. **Structure and biosynthesis of fungal alpha-glucans**. 2003. Tese de Doutorado.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUO, Huan et al. Effects of sulfated modification on the physicochemical properties and biological activities of  $\beta$ -glucans from Qingke (Tibetan hulless barley). **International journal of biological macromolecules**, v. 141, p. 41-50, 2019.

GUPTA, Pratima; DIWAN, Batul. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 58-71, 2017.

HAJJI, Mohamed et al. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel polysaccharide from *Periploca laevigata* root barks. **Carbohydrate polymers**, v. 206, p. 380-388, 2019.

HASSABO, Ahmed G. et al. Impregnation of silver nanoparticles into polysaccharide substrates and their properties. **Carbohydrate polymers**, v. 122, p. 343-350, 2015.

HE, Feng et al. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1257-1262, 2010.

HOJJATI, Mohammad; BEIRAMI-SERIZKANI, Fatemeh. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel water soluble polysaccharide from *Cordia myxa* fruits. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 6, p. 3417-3425, 2020.

JINDAL, Manish et al. Sulfation of Aegle marmelos gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1660-1668, 2013.

KANMANI, Paulraj; LIM, Seung Taik. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1099-1106, 2013.

KASAI, Deepak et al. Preparation, characterization and antimicrobial activity of betel-leaf-extract-doped polysaccharide blend films. **Green Materials**, p. 1-20, 2020.

KHAN, Asma Ashraf et al. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of  $\beta$ -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of  $\gamma$ -irradiation. **Carbohydrate polymers**, v. 140, p. 442-450, 2016.

KHAN, Tabassum et al. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. **Carbohydrate polymers**, v. 210, p. 412-428, 2019.

KHEMAKHEM, Ibtihel et al. Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 425-432, 2018.

KOKOULIN, Maxim S. et al. Structure and bioactivity of sulfated  $\alpha$ -D-mannan from marine bacterium *Halomonas halocynthiae* KMM 1376T. **Carbohydrate polymers**, v. 229, p. 115556, 2020.

KOLSI, Rihab Ben Abdallah et al. Sulphated polysaccharide isolated from *Sargassum vulgare*: Characterization and hypolipidemic effects. **Carbohydrate polymers**, v. 170, p. 148-159, 2017.

KRICHEN, Fatma et al. Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 283-289, 2015.

KRIŽKOVÁ, Livia et al. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 497, n. 1-2, p. 213-222, 2001.

KUNGEL, Pâmela TAN et al. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1161-1167, 2018.

KWIATKOWSKI, Stefan; KWIATKOWSKI, Stefan Edgar. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glucan polysaccharides-occurrence, separation and application in food, feed and health industries. **The complex world of polysaccharides**, v. 2, p. 47-70, 2012.

LAKRA, Avinash Kant et al. Physicochemical and functional characterization of mannan exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with bioactivities. **International journal of biological macromolecules**, v. 143, p. 797-805, 2020.

LI, Siqian; SHAH, Nagendra P. Anti-inflammatory and anti-proliferative activities of natural and sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii*. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 80-86, 2016.

LI, Siqian; SHAH, Nagendra P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food chemistry**, v. 165, p. 262-270, 2014.

LI, Yin-Ting et al. Antioxidant and antimicrobial evaluation of carboxymethylated and hydroxamated degraded polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1550-1557, 2018.

LIU, Yang; HUANG, Gangliang; LV, Meijiao. Extraction, characterization and antioxidant activities of mannan from yeast cell wall. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 952-956, 2018.

LIU, Yuntao et al. Antioxidant and anticoagulant activities of mycelia polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* after sulfated modification. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 53-60, 2018.

LIU, Yuntao et al. Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 355-362, 2017.

LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MADRUGA, Liszt YC et al. Carboxymethyl-kappa-carrageenan: A study of biocompatibility, antioxidant and antibacterial activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 483-491, 2020.

MAGNANI, Marciane; CASTRO-GÓMEZ, Raul Jorge Hernan. Beta-glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: Constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MAZAREI, Farzad et al. Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 224-231, 2017.

MENDELSON, Marc; MATSOSO, Malebona Precious. The World Health Organization global action plan for antimicrobial resistance. **SAMJ: South African Medical Journal**, v. 105, n. 5, p. 325-325, 2015.

MIURA, Noriko N. et al. Structure and Biological Activities of  $\beta$ -Glucans from Yeast and Mycelial Forms of *Candida albicans*. **Microbiology and immunology**, v. 47, n. 3, p. 173-182, 2003.

MOON, Seong-Hoon et al. BRD-glucan exhibits potent immunochemotherapeutic activity in vitro and in vivo. **International journal of oncology**, v. 26, n. 2, p. 395-404, 2005.

MORADI, Zahra; KALANPOUR, Nastaran. Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 223, p. 115100, 2019.

MUGADE, Megha; PATOLE, Milind; POKHARKAR, Varsha. Bioengineered mannan sulphate capped silver nanoparticles for accelerated and targeted wound healing: Physicochemical and biological investigations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 95-110, 2017.

MULLOY, B. P. A. S.; MOURAO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 123-135, 2000.

MUTAILLIFU, Paiheerding et al. Structural characterization and antioxidant activities of a water soluble polysaccharide isolated from *Glycyrrhiza glabra*. **International journal of biological macromolecules**, v. 144, p. 751-759, 2020.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NOVAK, M.; VETVICKA, V.  $\beta$ -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47-57, 2008.

OCK, Sun-A.; RHO, Gyu-Jin. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). **Cell transplantation**, v. 20, n. 8, p. 1231-1239, 2011.

OHNO, Naohito et al. Solubilization of yeast cell-wall  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. **Carbohydrate research**, v. 316, n. 1-4, p. 161-172, 1999.

PALANISAMY, Subramanian et al. In vitro antioxidant and antibacterial activity of sulfated polysaccharides isolated from *Spatoglossum asperum*. **Carbohydrate polymers**, v. 170, p. 296-304, 2017.

PENG, Yanfei et al. Deproteinization and structural characterization of bioactive exopolysaccharides from *Ganoderma sinense* mycelium. **Separation Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 359-369, 2016.

PERINELLI, Diego Romano et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 8-20, 2018.

PINHEIRO, Eloan et al. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 296-300, 2017.

PRADO, Maria Rosa Machado et al. Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan kefir. **Microvascular research**, v. 108, p. 29-33, 2016.

RAMESH, Honnavally P.; THARANATHAN, Rudrapatnam N. Carbohydrates—the renewable raw materials of high biotechnological value. **Critical reviews in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 149-173, 2003.

RAN, Linwu et al. Antitumor effects of pollen polysaccharides from Chinese wolfberry on DU145 cells via the PI3K/AKT pathway in vitro and in vivo. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 1164-1173, 2020.

RODRIGUES, José Ariévil Gurgel; COURA, Chistiane Oliveira; BENEVIDES, Norma Maria Barros. Extração e caracterização físico-química dos polissacarídeos sulfatados da rodófitca *Gracilaria cornea* J. Agardh e avaliação de seus efeitos sobre coagulação in vitro/Extraction and physical-chemical characterization of sulfated polysaccharides from the rhodophyceae *Gracilaria cornea* J. Agardh and evaluation of their effects on coagulation in vitro. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 91-100, 2016.

RODRIGUES, Kamila Leite et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005.

RUIZ-DELGADO, Guillermo J. et al. Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. **Acta haematologica**, v. 122, n. 1, p. 1-5, 2009.

SEDMAK, Joseph. **Production of beta-glucans and mannans**. U.S. Patent Application n. 11/418,922, 23 nov. 2006.

SHIN, Min Su et al. Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat  $\beta$ -glucan. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5554-5558, 2005.

SILVA, Maria de Lourdes Corradi da et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SINGH, Pawan et al. REVIEW ON A POTENTIAL OF ANTIBIOTICS. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 5-s, p. 35-40, 2018.

SONG, Juyi et al. Synthesis of carboxymethylated  $\beta$ -glucan from naked barley bran and its antibacterial activity and mechanism against *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate polymers**, v. 242, p. 116418, 2020.

STROBEL, Gary et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

SUTHERLAND, Ian W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

TAHMOUZI, Saeed. Optimization of polysaccharides from Zagros oak leaf using RSM: antioxidant and antimicrobial activities. **Carbohydrate polymers**, v. 106, p. 238-246, 2014.

TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida et al. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TANG, Qilin et al. The antioxidant activities of six (1→3)- $\beta$ -D-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 216-221, 2017.

TZIANABOS, Arthur O.; CISNEROS, Ronald L. Prophylaxis with the immunomodulator PGG glucan enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 797, p. 285-287, 1996.

VALÁRIKOVÁ, Jana et al. Anti-staphylococcal activity of quaternized mannan from the yeast *Candida albicans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 240, p. 116288, 2020.

VASCONCELOS, Ana Flora Dalberto.  $\beta$ -glucanas de isolados fúngicos do gênero *Botryosphaeria*: produção, caracterização química e atividade anticoagulante. 2009.

VASCONCELOS, Andreanne Gomes; DE ARAÚJO, Karla Vasconcelos; SANTANA, Lucas de Araújo Bastos. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde-ISSN: 2236-1103**, 2015.

VIJAYABASKAR, Pandian; VASEELA, Noormohamed; THIRUMARAN, Ganapathy. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. **Chinese journal of natural medicines**, v. 10, n. 6, p. 421-428, 2012.

WANG, Mingchun et al. Characterization, antioxidant activity and immunomodulatory activity of polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia*. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 809-817, 2017.

WANG, Zichao et al. Antibacterial activity of a polysaccharide produced from *Chaetomium globosum* CGMCC 6882. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 376-382, 2019.

WILLIAMS, David L. et al. Development of a water-soluble, sulfated (1→3)- $\beta$ -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, v. 235, p. 247-257, 1992.

WILLIAMS, David L. et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Immunopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 139-156, 1991.

XU, Yong et al. Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action. **International journal of biological macromolecules**, v. 132, p. 970-977, 2019.

ZACARIAS FILHO, Rachid Pinto et al. Seleção e produção de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da amazônia para o uso em odontologia/Selection and production of exo and/or polysaccharides of microbial



origin from the amazon for use in dentistry. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 73954-73977, 2020.

ZHANG, Yu et al. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*. **Journal of functional foods**, v. 38, p. 273-279, 2017.