

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PEDRO RIBEIRO FONTES

**QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL POR HPLC-DAD COMO MEDIDA DA
BIOMASSA DE *Aspergillus tamaritii* CULTIVADO NA PRESENÇA DA CASCA DE
MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener):
DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO.**

BRASÍLIA

2016

PEDRO RIBEIRO FONTES

**QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL POR HPLC-DAD COMO MEDIDA DA
BIOMASSA DE *Aspergillus tamaritii* CULTIVADO NA PRESENÇA DA CASCA DE
MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener):
DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello.

BRASÍLIA

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com dados fornecidos pelo autor.

F683q Fontes, Pedro Ribeiro
Quantificação do ergosterol por HPLC-DAD como medida da biomassa de *Aspergillus tamarisii* cultivado na presença da casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): desenvolvimento, otimização e validação. / Pedro Ribeiro Fontes; orientador Mauricio Homem-de-Mello. -- Brasília, 2016. 90 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Ergosterol. 2. Maracujá-amarelo. 3. Resíduo agroindustrial. 4. *Aspergillus tamarisii*. 5. Planejamento fatorial. I. Homem-de-Mello, Mauricio, orient. II. Título.

PEDRO RIBEIRO FONTES

**QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL POR HPLC-DAD COMO MEDIDA DA
BIOMASSA DE *Aspergillus tamarii* CULTIVADO NA PRESENÇA CASCA DE
MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener):
DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 1º de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE:

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

MEMBROS:

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Membro Externo do Programa
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

SUPLENTE:

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello, pela liderança, incentivo e pelo exemplo de perspicácia e altivez como cientista e professor. Agradeço a confiança passada nos momentos delicados e a paciência nos difíceis.

À Profa. Dra. Pérola Magalhães, por ter aberto as portas que me trouxeram até aqui.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Ximenes, por gentilmente ceder o espaço de trabalho e os recursos para que eu conduzisse as atividades. Espero que as sementes deste trabalho retribuam a enorme gentileza.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni, pela confiança e por acreditar em meu potencial para fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À minha companheira Carla Guimarães, parceira de alegrias, tristezas, raivas, amores e todos os afins, meu muito obrigado jamais será suficiente por tudo o que fez pelo nosso sucesso nessa jornada.

À Dra. Paula Jaramillo, que deu o pontapé inicial e preparou o terreno para esse trabalho de pesquisa.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos. À FAP-DF e ao CNPq pelo financiamento concedido para execução deste projeto de pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia: Antonielle, Caio, Raissa, Andreza, Diandra, Guilherme Recalde, Guilherme Sperandio, Carol, Babi, Débora, Leonora, Elenilde, Alonso, Fran e Samuel, pelos momentos de descontração no meio de tantos trabalhos contraídos. Ao Helder, meu agradecimento especial, por ter me prestado incrível auxílio e instrução em diversos experimentos. Obrigado!

Às estimadas técnicas Marísia e Margarete, sempre prestativas e incrivelmente habilidosas.

Um obrigado especial à melhor estudante, estagiária e aspirante a cientista que conheci nos últimos tempos, Jaya. Sua mão de obra altamente especializada foi fundamental em todo o decorrer do nosso trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, especialmente Marcela, Luana e Larizza por dividirem conhecimentos e experiências.

À minha família, pela parceria incondicional, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso (e para o fracasso também) das etapas dessa experiência incrível que é fazer Ciência.

RESUMO

FONTES, Pedro Ribeiro. **Quantificação do ergosterol por HPLC-DAD como medida da biomassa de *Aspergillus tamarii* cultivado na presença da casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): desenvolvimento, otimização e validação.** Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

O ergosterol tem papel fundamental na estrutura e função da membrana plasmática de fungos. Ele tem sido utilizado como marcador da biomassa fúngica, pois sua variação no tempo está associada à variação de biomassa. Diversos métodos de extração de ergosterol são reportados na literatura. Vários autores têm reportado o uso de delineamentos experimentais para otimizar procedimentos relacionados ao ergosterol, como a extração, cultivo de fungos ou a seleção de substratos para cultivo. Este trabalho teve por objetivo desenvolver e otimizar um método de extração assistida por micro-ondas de ergosterol de *Aspergillus tamarii* cultivado na presença de casca da maracujá-amarelo (CMA) como fonte de carbono (FC) e determinar o perfil de crescimento de *A. tamarii* pela quantificação do ergosterol. A massa de ergosterol extraído dividida pela massa inicial de amostra ($\mu\text{g}/\text{mg}$) foi usada como resposta nos experimentos de otimização. A triagem de variáveis da extração indicou que tempo de irradiação, volume de pentano e massa de amostra afetaram a resposta significativamente. Um planejamento fatorial 2^3 foi modelado pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para maximizar a quantidade de ergosterol obtida. Os valores ótimos encontrados foram de 45 s de irradiação, 50 mg de amostra e 10 mL + 5 mL de pentano. A análise de ergosterol por HPLC-DAD apresentou tempo de retenção de 2,8 minutos e não foi observada co-eluição. O método apresentou boa linearidade ($r^2 > 0,999$; 0,01 – 200,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e precisão ($\text{CV} < 8,77\%$) em todas as análises. O ergosterol apresentou uma forte correlação com a biomassa de *A. tamarii*, além de aparentar ter alguma associação com a biomassa fúngica e a atividade de pectinase em função do tempo de crescimento.

Palavras-chave: ergosterol, maracujá-amarelo, resíduo agroindustrial, *Aspergillus tamarii*, planejamento fatorial.

ABSTRACT

FONTES, Pedro Ribeiro. **Ergosterol quantification by HPLC-DAD as a measure of *Aspergillus tamarii* biomass cultivated in presence of passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener):** development, optimization and validation. Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Ergosterol plays an important role to the structure and function of the membrane. It has been used in many studies as a marker of fungal biomass. Several methods of ergosterol extraction are found in literature. Authors have also reported the use of experimental designs to optimize procedures related to ergosterol, such as extraction, fungi cultivation or selection of different substrates. In this work, we aimed to develop and optimize a microwave-assisted extraction method of ergosterol from *Aspergillus tamarii* grown in the presence of passion fruit peel as carbon source and use the ergosterol production profile to determine the growth curve of *A. tamarii*. Ergosterol mass divided by initial sample mass ($\mu\text{g}/\text{mg}$) was used as response in optimization experiments. Preliminary selection of variables indicated that irradiation time, pentane volume and sample mass significantly affected the response. The data from a 2^3 factorial design were used to maximize the amount of ergosterol obtained in the extraction by Response Surface modeling. Ergosterol separation was achieved at 2.8 minutes and no co-elution was observed. The method has showed a good linearity ($r^2 > 0.999$, $0.01 - 200.00 \mu\text{g}/\text{mL}$) and precision ($\text{CV} < 8.77\%$) to all analyses. Ergosterol showed to be strongly correlated to both pure fungal biomass and sample mass with residual lignocellulosic carbon source, and it appears to have some degree of correlation to the fungal biomass and pectinase activity along the growth time.

Keywords: ergosterol, passion fruit, agroindustrial residues, factorial design, *Aspergillus tamarii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Estrutura molecular do ergosterol (M = 396,65 g/mol).....	21
Figura 2 — Estruturas dos esteróis. A) Estrutura dos principais esteróis encontrados animais (colesterol), fungos (ergosterol) e plantas (β -sitosterol); B) Estrutura base do esterol com carbonos enumerados.	21
Figura 3 — Via de biossíntese resumida do ergosterol. As setas triplas indicam múltiplos passos até o produto final: ergosterol. Adaptado de Veen e Lang (2005)..	23
Figura 4 — Exemplo de ajuste de um modelo linear a pares de dados (x,y).	34
Figura 5 — Representação esquemática de um CCD com dois fatores (esquerda) e com três fatores (direita). Os círculos escuros representam os pontos fatoriais, os círculos vazios representam os pontos axiais e o quadrado vazio representa o ponto central. Reproduzido de Korany e colaboradores (2015).	40
Figura 6 — Representação esquemática do protocolo de extração de ergosterol assistida por micro-ondas. Quadros com contorno vermelho indicam as etapas consideradas nos experimentos de otimização. * A etapa de centrifugação foi incluída na tentativa de facilitar a coleta de frações pentânicas.	48
Figura 7 — Curva analítica do ergosterol. Áreas de cada ponto foram determinadas em triplicata. Análises realizadas na coluna Kinetex Core-Shell.	55
Figura 8 — A) Cromatogramas referentes ao padrão analítico de ergosterol a 100 $\mu\text{g/mL}$, com eluição na coluna C18 Core-Shell Kinetex (*) ou na coluna C18 LiChroCART (**); B) Cromatogramas referentes à curva analítica (Figura 7). Cada ponto da curva é demonstrado em uma linha distinta.	56
Figura 9 — Cromatogramas obtidos a partir da análise dos extratos de amostra G (A) e amostra M (B). Em cada cromatogramas estão representados os espectros obtidos para cada tipo de amostra. ** Espectro obtido da análise do padrão analítico de ergosterol.	57
Figura 11 — Massa absoluta de ergosterol em cada extração. Rótulos dos pontos representam a massa de ergosterol (μg) para cada extração.	60
Figura 12 — Massa acumulada de ergosterol em cada extração. Rótulos dos pontos representam a massa de ergosterol (μg) para cada extração.	60
Figura 13 — Porcentagem acumulada de ergosterol extraído em função do número de extrações com ACN. Rótulos dos pontos representam a porcentagem acumulada de cada extração.	61
Figura 14 — Comparação das médias, efeitos principais e efeitos de interação dos fatoriais 1-IR e 2-IR.	64
Figura 15 — Superfícies de resposta do modelo fatorial de 1-IR. A) Superfície que descreve as respostas para a massa fixa em 50 mg. O ápice, na região vermelha da superfície, representa o ponto ótimo previsto pelo modelo. B) Superfície que descreve as respostas para volume de pentano fixo em 10/5 mL.	65
Figura 16 — Comparação dos efeitos do fator x1 entre uma e duas irradiações. As barras representam o IC 95%.	66

Figura 17 — Superfícies de respostas construídas por RSM a partir dos dados de 1-IR sem ensaios adicionais. A) Superfície para massa fixa em 50 mg. B) Superfície para tempo de irradiação fixo em 45 segundos.....	69
Figura 18 — Superfícies de resposta construídas por RSM a partir dos dados de 1-IR com os ensaios adicionais. A) Superfície para massa fixa em 50 mg. B) Superfície para tempo de irradiação fixo em 45 segundos.....	70
Figura 19 — Curvas de regressão entre massa de amostra G (Em A: curva G) e massa de amostra M (Em B: curva M) e a área de pico cromatográfico do ergosterol. Barras de erro representam o desvio-padrão.....	72
Figura 20 — Regressão de correspondência entre ergosterol proveniente das amostras G (eixo X) e das amostras M (eixo Y).....	72
Figura 21 — Comparação entre os coeficientes angulares das curvas por massa de amostra M (ponto 1), curva analítica (ponto 2) e curva por massa de amostra G (ponto 3).....	74
Figura 22 — Quantificação de ergosterol, proteínas totais e avaliação da atividade enzimática de pectinase em função do tempo, de <i>Aspergillus tamarii</i> crescido em meio com casca de maracujá. As barras de erros indicam o desvio padrão obtido das triplicatas.	75
Figura 23 — Quantificação de ergosterol, proteínas totais e avaliação da atividade enzimática de pectinase em função do tempo, de <i>Aspergillus tamarii</i> crescido em meio com glicose como FC. As barras de erros indicam o desvio padrão obtido das triplicatas.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Tabela de análise de variância para regressão multivariada.	35
Tabela 2 — Interpretação da significância estatística das fontes de variação da ANOVA para uma regressão.	36
Tabela 3 — Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos estoques em diclorometano e concentrações obtidas para curva analítica.	47
Tabela 4 — Matriz de planejamento do fatorial fracionário 2^{5-2} para triagem de fatores da extração de ergosterol.	50
Tabela 5 — Matriz de coeficientes de contraste para os efeitos principais e os respectivos níveis reais, por ensaio, no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	50
Tabela 6 — Matriz de planejamento dos fatoriais completos 2^3 para mensuração dos efeitos da extração de ergosterol.	51
Tabela 7 — Matriz de coeficientes de contraste para os efeitos principais e interações, bem como os níveis reais, por ensaio.	51
Tabela 8 — Ensaios adicionais e respectivas respostas para modelagem dos dados de otimização por RSM.	52
Tabela 9 — Contrastes calculados para cada fator considerado na triagem.	62
Tabela 10 — Análise de efeitos principais e das interações entre os fatores x_1 (tempo de irradiação), x_3 (volume de pentano) e x_5 (massa de amostra) em relação à resposta (μg de ergosterol/mg de amostra). Comparação entre uma e duas irradiações.	64
Tabela 11 — Discriminação de níveis dos ensaios do fatorial 1-IR e as respostas obtidas por ensaio.	65
Tabela 12 — Comparação entre os níveis no protocolo original e no otimizado pelo modelo fatorial.	68
Tabela 13 — Análise de variância para o modelo fatorial de 1-IR (Equação 9).	69
Tabela 14 — ANOVA para o modelo modificado dos dados de 1-IR e dos ensaios adicionais.	71
Tabela 15 — Estimativas de biomassa fúngica nas curvas de crescimento com glicose e CMA como fonte de carbono.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-IR: planejamento fatorial com uma irradiação

2-IR: planejamento fatorial com duas irradiações

Abs: absorvância

ACN: acetonitrila

ANOVA: análise de variância

BDA: batata-dextrose-ágar

BSA: albumina sérica bovina

CCD: *central composite design*

CMA: casca de maracujá-amarelo

CV: coeficiente de variação

DBC: delineamento em blocos casualizados

DBI: delineamento em blocos incompletos

Delin.: delineamento

DIC: delineamento inteiramente casualizado

DNS: ácido dinitrosalicílico

DQL: delineamento em quadrado-latino

EB: extrato bruto

EFC: experimento fatorial completo

EFF: experimento fatorial fracionário

FC: fonte de carbono

Fcalc: valor de F calculado

Ftab: valor de F tabelado

FV: fonte de variação

G: glicose

HPLC: *high performance liquid chromatography*

IC 95%: intervalo de confiança a 95% de confiança

LDL: *low density lipoprotein*

LLE: *liquid-liquid extraction*

LOD: limite de detecção

LOQ: limite de quantificação

MAE: *microwave-assisted extraction*

MQep: média quadrática

MQFaj: média quadrática de falta de ajuste

MQr média quadrática de resíduos

MQR: média quadrática de regressão

PaL: pectato liase

PC: ponto central

PE: pectina esterase

PeL: pectina liase

PG: poligalacturonase

R²: coeficiente de determinação

RP: *reverse phase*

rpm: rotações por minuto

RSM: *response surface methodology*

S/N: relação sinal-ruído

SPE: *solid phase extraction*

SQep: soma quadrática de erro puro

SQFaj: soma quadrática de falta de ajuste

SQR: soma quadrática de regressão

SQr: soma quadrática de resíduos

UFC: unidades formadoras de colônia

UHPLC: *ultra-high performance liquid chromatography*

UV-VIS: ultravioleta-visível

V-AL: *vacuum-alcoholic*;

g.l.: graus de liberdade

α : nível de significância

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO.....	15
II	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1	Biomassa lignocelulósica	17
1.1	Maracujá-amarelo	18
2	Fungo filamentosso <i>Aspergillus tamarii</i>	19
3	Ergosterol	20
3.1	Métodos de preparo de amostra e matrizes.....	24
3.2	Determinação e quantificação.....	26
3.3	Uso do ergosterol na determinação da biomassa e relação com o crescimento fúngico.....	27
4	Delineamento de experimentos e análise de dados	28
4.1	Criação de modelos empíricos e análise de regressão	31
4.2	Análise de variância (ANOVA).....	34
4.3	Experimentos fatoriais.....	36
4.3.1	Planejamentos fatoriais completos (PFC)	37
4.3.2	Planejamentos fatoriais fracionários (PFF).....	38
4.4	Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)	39
4.4.1	Planejamento Composto Central.....	40
III	OBJETIVOS.....	41
1	Geral.....	41
2	Específicos	41
IV	MATERIAL E MÉTODOS	42
1	Reagentes e padrões	42
2	Origem do resíduo lignocelulósico e pré-tratamento	42
3	Isolamento, manutenção e conservação do fungo <i>Aspergillus tamarii</i>	42
4	Cultivo em meio líquido	43
4.1	Produção de amostras para extração de ergosterol	43
4.2	Produção de amostras para determinação de atividade enzimática.....	44
5	Preparo de amostras	44
5.1	Amostras para extração de ergosterol	44

5.2	Amostras para determinação de atividade enzimática.....	44
6	Determinação da atividade enzimática de pectinase.....	44
7	Determinação do teor de proteínas totais.....	45
8	Análise dos extratos e quantificação do ergosterol	46
8.1	Quantificação e identificação do ergosterol	47
9	Otimização da extração de ergosterol	47
9.1	Protocolo inicial.....	47
9.2	Adaptação do protocolo inicial	49
9.3	Delineamento experimental e otimização da extração.....	49
9.3.1	Triagem de variáveis	50
9.3.2	Mensuração dos efeitos e comparação do número de irradiações	51
9.3.3	Modelagem matemática da extração e otimização	52
10	Correlação entre quantidade de ergosterol e biomassa fúngica	52
11	Curvas de crescimento de <i>A. tamarii</i>	53
11.1	Estimação da biomassa fúngica pelo ergosterol.....	53
V	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
1	Quantificação do ergosterol e validação do método.....	55
2	Otimização da extração.....	58
2.1	Adaptação do protocolo inicial	58
2.2	Triagem dos fatores	61
2.3	Estimação dos efeitos e comparação do número de irradiações.....	64
2.4	Modelagem matemática da extração por RSM	69
3	Correlação entre quantidade de ergosterol e biomassa fúngica	72
4	Curvas de crescimento.....	74
4.1	Estimação da biomassa fúngica pelo ergosterol.....	77
VI	CONCLUSÕES	79
VII	REFERÊNCIAS	81

I INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos são micro-organismos fundamentais na execução do ciclo do carbono na natureza, quando atuam na degradação de matéria orgânica, essencialmente polissacarídeos vegetais (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Por esse papel, são capazes de produzir enzimas necessárias para a desconstrução bioquímica do material lignocelulósico que compõe esse tipo de substrato vegetal (ZNAMEROSKI *et al.*, 2012). Essas enzimas podem ser aplicadas em demandas industriais, como é o caso do processamento do algodão na indústria têxtil (CHOI *et al.*, 2015), terapêuticas e alimentares, como ocorre com a L-asparaginase, utilizada no tratamento de câncer e, a indústria alimentícia, para reduzir a quantidade de acrilamida formada no processamento de alimentos (DIAS; SATO, 2016).

O ergosterol é um esterol presente na membrana plasmática de fungos. Este composto, que possui um núcleo molecular com quatro anéis carbônicos, é produzido por fungos superiores e tem funções importantes na regulação da fluidez e integridade da membrana plasmática (DUPONT *et al.*, 2012). A biossíntese do ergosterol em fungos é objeto de estudo na área de medicina como campo para desenvolvimento de novas drogas. Os fármacos antifúngicos disponíveis para uso em terapia medicamentosa atuam bloqueando alguma das etapas de biossíntese do ergosterol, ou por interação química direta, impedindo sua estruturação na membrana plasmática (GHANNOUM; RICE, 1999).

Trabalhos na literatura descrevem o uso de ergosterol como alternativa a métodos menos precisos para detectar a presença ou medir o crescimento fúngico (SEITZ *et al.*, 1979), em aplicações como medição da contaminação de grãos (TOTHILL *et al.*, 1992), presença de fungos em solos (MONTGOMERY *et al.*, 2000) e em plantas (MUNIROH *et al.*, 2014). A medição da massa seca de um fungo é utilizada como procedimento clássico para medir o crescimento de um fungo (GRANADE *et al.*, 1985). Contudo, o uso de fontes de carbono insolúveis em cultivos submersos faz com que a determinação da biomassa fúngica torne-se um problema, já que as massas dessas amostras contêm não apenas fungo, mas uma fração de fonte de carbono insolúvel. O mesmo problema pode ser observado em cultivos em estado sólido: sabendo que o micro-organismo é cultivado em um substrato sólido, na ausência de meio líquido, torna-se virtualmente impossível medir separadamente a biomassa fúngica da massa restante de substrato utilizado no

cultivo (DESGRANGES *et al.*, 1991). Por isso, existe a necessidade de se desenvolver métodos para quantificar a biomassa fúngica em cultivos com esta característica.

Seitz (1979) foi o primeiro autor a propor o uso do ergosterol como indicador do crescimento fúngico, mostrando que a quantidade de ergosterol varia com o decorrer do tempo de crescimento de três espécies de fungo (*Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus amstelodami*).

Dessa forma, visando estabelecer a relação entre a quantidade de ergosterol presente na membrana de *A. tamarii* e sua biomassa, foi proposto um método de extração de ergosterol assistido por micro-ondas para quantificá-lo a partir de cultivos deste fungo, além de estabelecer correlações entre a biomassa fúngica e a quantidade de ergosterol obtida de cultivos submersos de *A. tamarii*. Foi possível estabelecer uma forte correlação entre essas duas variáveis, sendo que esta foi utilizada para mensurar a diferença de ergosterol produzido pelo fungo quando cultivado na presença de glicose ou casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono.

Foi proposto ainda um método de quantificação de ergosterol por HPLC-DAD rápido, simples e eficiente na determinação deste analito, o qual apresenta potencial para ser utilizado na quantificação de ergosterol obtido não apenas de culturas de *A. tamarii*, mas também de culturas de outros fungos filamentosos cultivados na presença de outros resíduos lignocelulósicos como fontes de carbono.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica representa uma fonte alternativa e praticamente inextinguível para o crescimento microbiano e obtenção de produtos do metabolismo destes micro-organismos, como metabólitos, ácidos e álcoois orgânicos e enzimas industriais (GUERRIERO *et al.*, 2016). Estima-se que 5% a 8% da produção anual de lignocelulose seriam suficientes para suprir a demanda anual de combustíveis fósseis (ELGHARBAWY *et al.*, 2016), representando uma alternativa ambientalmente mais adequada quanto à demanda de matrizes energéticas.

A biomassa lignocelulósica é composta dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina, e pela lignina (45–60%, 20–40%, 5–10% e 10–40%, respectivamente) (HAMANN *et al.*, 2015) sendo encontrados como componentes da parede celular vegetal em quantidades variáveis dependendo da espécie (SIQUEIRA; FILHO, 2010; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Segundo Siqueira e colaboradores (2010), utiliza-se o termo “holocelulose” para designar o conteúdo total de polissacarídeos da lignocelulose, nome este que se dá ao material após a remoção da lignina.

A pectina é um dos componentes da holocelulose e representa um ingrediente com alto valor agregado utilizado no processamento industrial de alimentos, utilizada, por exemplo, como agente espessante e gelificante na fabricação de geleias e sucos (SEIXAS *et al.*, 2014; SRIVASTAVA; MALVIYA, 2011). Trata-se de um polímero linear de unidades de ácido-D-galacturônico unidas por ligações α -1,4 e possui características hidrofílicas. A pectina pode ser obtida a partir da casca de maçã e de frutas cítricas (p. ex. limão e laranja) pela extração com ácidos inorgânicos (SEIXAS *et al.*, 2014). Recentemente, Seixas e colaboradores (2014) propuseram o uso da casca de maracujá-amarelo como fonte para obtenção de pectina.

Resíduos agroindustriais como casca de arroz, casca do grão de soja, bagaço de cana-de-açúcar, caule de bananeira, casca do grão de café, entre outros, são uma importante fonte de biomassa lignocelulósica, cujos componentes servem de matéria-prima para a obtenção e produção de diversos compostos químicos e bioquímicos com variadas aplicações industriais e elevado valor agregado, como biopolímeros, frutose, xilitol e polifenóis oriundos da degradação da lignina, além de

enzimas terapêuticas e industriais (DE SIQUEIRA *et al.*, 2010; GUERRIERO *et al.*, 2016; RAMBO *et al.*, 2015; SIQUEIRA; FILHO, 2010). Os polissacarídeos da parede celular vegetal são os compostos orgânicos mais abundantes encontrados na natureza (DE VRIES; VISSER, 2001). Esses resíduos podem ainda ser utilizados como fonte de energia renovável, como na produção de etanol a partir da fermentação de açúcares obtidos da degradação enzimática da holocelulose, além de outros biocombustíveis e compostos químicos com valor econômico agregado (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Em aplicações biotecnológicas, especificamente as que utilizam micro-organismos para fermentar resíduos lignocelulósicos com vistas à obtenção de produtos biotecnológicos (p. ex. enzimas, biocombustíveis, compostos químicos), disponibilizar os carboidratos que constituem a estrutura da holocelulose é um requisito, de forma que os micro-organismos os utilizem como fonte de carbono para crescer e produzir seus metabólitos, assim como fungos o fazem na natureza (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). A desconstrução da biomassa lignocelulósica requer um conjunto de diferentes enzimas, como celulases, hemicelulases e pectinases (DE SIQUEIRA *et al.*, 2010). No que concerne às pectinases, há importantes aplicações industriais, como na fabricação de sucos e vinhos e na indústria de papel e celulose. Elas são constituídas por um grupo amplo de enzimas, dividido em esterases, representadas pela pectina esterase (PE), e despolimerases, representadas pela poligalacturonase (PG), pectina liase (PeL) e pectato liase (PaL) (DAMÁSIO *et al.*, 2011).

1.1 Maracujá-amarelo

O maracujá-amarelo, fruto do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener, família Passifloraceae) é industrialmente empregado na fabricação de sucos concentrados, polpas, doces, xaropes, sorvetes e geleias, e a casca reaproveitada para alimentação animal. Por ser rica em pectina, a própria casca do maracujá-amarelo (CMA) pode também ser utilizada na fabricação de alimentos processados (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Janebro e colaboradores (2008) reportaram que a casca de maracujá pode ser utilizada como alimento funcional, pois a pectina tem a capacidade de reter água, retardando o esvaziamento gástrico e prolongando a sensação de saciedade.

Além disso, relataram propriedades hipoglicemiantes da casca de maracujá em ratos e em indivíduos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2.

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá, detentor de 90% da produção mundial (FERRARI *et al.*, 2004). A produção de maracujá em 2010 foi de 920.158 toneladas, e em 2012 de 776.097 toneladas (IBGE, 2012). Uma vez que o insumo de maior interesse econômico é a polpa, para produção do suco, esta enorme produção inevitavelmente gera grandes quantidades de casca de maracujá como resíduo, que corresponde a aproximadamente metade da massa do fruto. Dessa forma, é necessário encontrar alternativas factíveis para o reaproveitamento deste resíduo ou formas de descarte ambientalmente adequado (PINHEIRO *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2014). Neste trabalho, é apresentada a proposta de reaproveitar a casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono em cultivos submersos do fungo filamentosso *Aspergillus tamaritii*.

Conforme reportado por Seixas e colaboradores (2014), mesmo após processada e armazenada, a casca de maracujá pode ser utilizada para extração de pectina com vistas ao uso industrial deste polissacarídeo como aditivo em alimentos. Yapo e Koffi (2006) concluem, pela caracterização físico-química de substâncias pécticas de CMA, que se trata de uma potencial fonte natural nova de pectina, de onde se infere que a casca de maracujá-amarelo poderia ser utilizada como alternativa às usuais fontes de pectina para uso industrial (bagaço de maçã e casca de frutas cítricas).

Trabalhos reportaram o uso de CMA como fonte de carbono (FC) em cultivos submersos para produção e purificação de pectinases, demonstrando que a CMA pode ser utilizada para indução de pectinases, celulasas e xilanases por fungos filamentosos (DUQUE JARAMILLO *et al.*, 2013; MALLER *et al.*, 2011).

2 Fungo filamentosso *Aspergillus tamaritii*

Na natureza, os fungos têm um importante papel na degradação de biomassa vegetal, pois produzem um grande conjunto de enzimas específicas para degradar polissacarídeos presentes nos vegetais (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Os Ascomicetos e Basidiomicetos saprófiticos são capazes de se adaptar a diferentes fontes de carbono e nitrogênio e são os mais eficientes na decomposição da biomassa lignocelulósica (BOUWS *et al.*, 2008).

Os fungos do gênero *Aspergillus*, pertencentes ao filo *Ascomycota*, são saprófitos eficientes, sendo comumente encontrados no solo. Podem ainda ser encontrados em ambientes fechados, onde liberam esporos, facilmente transportados pelo ar. Os representantes deste gênero podem ter impacto positivo ou negativo na vida humana. Como positivo, destaca-se seu uso como microrganismos fermentadores na produção de alimentos (p. ex. molho de soja e saquê), uso como produtores de metabólitos secundários utilizados como fármacos (p. ex. lovastatina) e como produtores de ácidos orgânicos (ácidos cítrico, glucônico) e enzimas. Os *Aspergilli* são ideais para aplicações industriais, pois possuem excelente capacidade de fermentação e alto grau de secreção de proteínas. Quanto aos impactos negativos, a produção de micotoxinas e micotoxicoses, aspergiloses e reações de hipersensibilidade são as consequências de maior importância (DE VRIES; VISSER, 2001; HOUBRAKEN *et al.*, 2014).

Aspergillus tamaris (seção Flavi), um fungo filamentoso não aflatoxigênico (ITO *et al.*, 1999), é descrito na literatura como bom produtor de xilanases em cultivo submerso contendo resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono (KADOWAKI *et al.*, 1997), possuindo, portanto, potencial como produtor de holocelulases para possíveis aplicações industriais. Akbar e colaboradores (2012) e Amande e Adebayo-Tayo (2012) descreveram excelente produção de pectinases e poligalacturonases, respectivamente, por *A. tamaris* em cultivo submerso utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. O fungo *A. tamaris* foi também descrito como um fungo endofítico de figueira (*Ficus carica* L.) produtor de substâncias inibidoras do crescimento de fitopatógenos (ZHANG *et al.*, 2012). Entretanto, até o momento não foi relatada a produção de pectinases por *A. tamaris* para uso industrial, tampouco o uso de casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono para este fungo.

3 Ergosterol

O ergosterol ($C_{28}H_{44}O$, 3 β -hidroxiergosta-5,7,22-trieno) (Figura 1), foi descoberto e isolado a partir do esporão do centeio (*Claviceps purpurea*) no ano de 1889, pelo farmacêutico e químico francês Charles Tanret (TANRET, 1889; WEETE *et al.*, 2010). Por ter encontrado grande similaridade de propriedades químicas entre essa nova substância e o colesterol, e por tê-la isolado do *ergot*, Tanret deliberou assim nomeá-la: ergosterol (do francês, *ergostérine*).

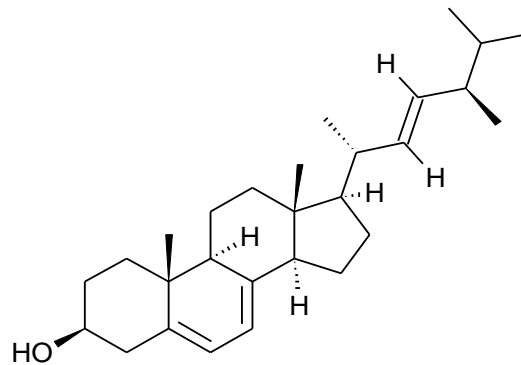


Figura 1 — Estrutura molecular do ergosterol (M = 396,65 g/mol).

Dos três principais esteróis encontrados em eucariotos (Figura 2-A), o ergosterol é o principal na constituição da membrana plasmática de fungos (DUPONT *et al.*, 2012; TARDIEU *et al.*, 2007). Em células vegetais encontram-se os fitosteróis (p. ex.: β -sitosterol) e o colesterol é o esterol característico de células animais (DUPONT *et al.*, 2012). Deve-se considerar, entretanto, que nem todas as espécies de fungos possuem o ergosterol C-28 como esterol constituinte. Há relatos de espécies filogeneticamente menos avançadas que sintetizam colesterol como constituinte de membrana; em outros casos, diferenças em etapas na biossíntese podem gerar variações estruturais, como uma metilação adicional, o que leva à formação de um derivado C-29 do ergosterol (WEETE *et al.*, 2010). Galea e Brown (2009) publicaram uma revisão em que levantam a hipótese de que o surgimento dos esteróis de membrana nos micro-organismos ocorreu, ao menos em parte, como um meio de adaptação à oxigenação atmosférica da Terra.

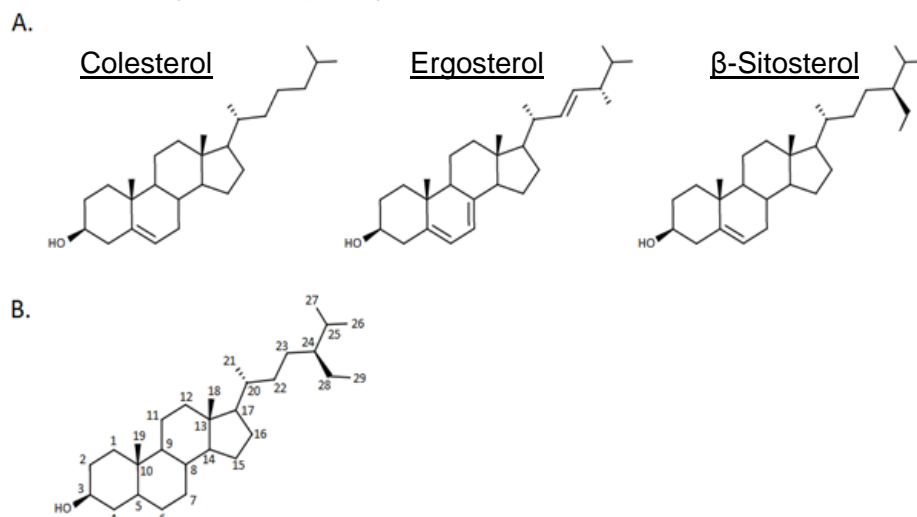


Figura 2 — Estruturas dos esteróis. A) Estrutura dos principais esteróis encontrados animais (colesterol), fungos (ergosterol) e plantas (β -sitosterol); B) Estrutura base do esterol com carbonos enumerados.

Embora o tipo de esterol presente em fungos possa variar de acordo com a espécie, pode-se afirmar que a estrutura básica de esteróis fúngicos consiste em um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno tetracíclico, substituído com um grupo hidroxila equatorial na posição 3β , grupos α -metila em C-10 e C-13 e uma cadeia lateral em C-17, com oito a dez carbonos (PARKS; CASEY, 1996) (Figura 2-B). O ergosterol, que possui a estrutura base acima citada, possui ainda duas insaturações conjugadas em C-5 e C-7, além de uma instauração na cadeia lateral (Figura 2-A). Isso possibilita sua detecção com seletividade e sensibilidade quando detectado por métodos espectrofotométricos, pois este dieno conjugado é o responsável pela absorção de radiação ultravioleta a 282 nm (NEWELL *et al.*, 1988).

O ergosterol está presente na membrana plasmática de fungos, assim como o colesterol está na membrana de células animais, e possui um papel fundamental na regulação de sua fluidez, permeabilidade, estabilidade térmica e sobre a atividade e estrutura de proteínas integrais de membrana (DUPONT *et al.*, 2012; KRISTAN; RIZNER, 2012; TARDIEU *et al.*, 2007),. Além disso, tanto a sua presença na membrana quanto a integridade de sua rota biossintética são essenciais para o crescimento celular (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2008).

Além disso, a presença do ergosterol na membrana e as propriedades que confere a ela são de tamanha importância que são alvos farmacológicos estabelecidos de compostos antifúngicos, como a anfotericina B, que se liga ao ergosterol na membrana celular e cujo mecanismo de ação parece ser o de formação de poros hidrofílicos na membrana, com o consequente extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais. Sob o mesmo prisma, destaca-se a importância da biossíntese desse esterol para a sobrevivência e crescimento celular, haja vista que os antifúngicos da classe dos azóis (p. ex. itraconazol e cetoconazol) e das alilaminas (p. ex. terbinafina e naftifina) são inibidores enzimáticos na via biossintética do ergosterol (Figura 3 — inibem 14α -desmetilase e esqualeno-2,3-epoxidase, respectivamente) (BENNETT, 2011; GHANNOUM; RICE, 1999).

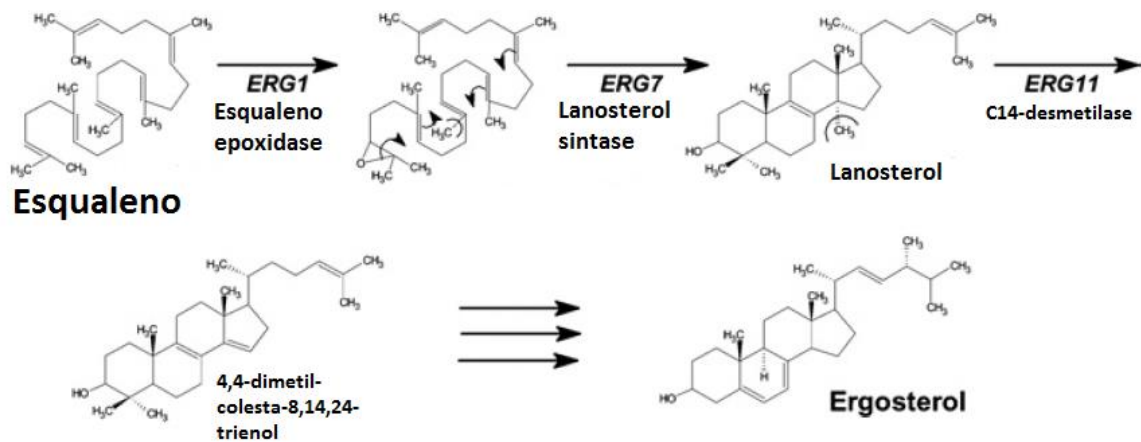


Figura 3 — Via de biossíntese resumida do ergosterol. As setas triplas indicam múltiplos passos até o produto final: ergosterol. Adaptado de Veen e Lang (2005).

Em leveduras, o ergosterol existe em duas formas: livre e esterificado a ácidos graxos de cadeia longa (PARKS; CASEY, 1996). O ergosterol livre encontra-se principalmente na membrana celular, enquanto a forma esterificada permanece estocada em vesículas lipídicas (VEEN *et al.*, 2003). Em leveduras, a proporção entre esteróis livres e esterificados se altera conforme o tempo de crescimento: durante a fase *log*, *Saccharomyces cerevisiae* mantém níveis baixos de ésteres de esterol, mas os níveis aumentam consideravelmente quando atinge a fase estacionária, se mantendo então estáveis. Quando o fungo é colocado em meio de cultura novo, a quantidade de ergosterol livre torna a aumentar, o que sugere que a esterificação do ergosterol e de outros esteróis existentes em leveduras é um mecanismo de estocagem deste componente membranar, já que há um considerável custo energético em sua biossíntese (BAILEY; PARKS, 1975). Evans e Gealt (1985) reportaram que os fungos filamentosos *Aspergillus nidulans* e *Penicillium urticae* não apresentaram a mesma tendência observada na levedura *S. cerevisiae*, de forma que naqueles a quantidade de ergosterol livre e esterificado foi semelhante tanto na fase exponencial quanto na estacionária.

Presente também em fungos do filo *Basidiomycota*, ao qual pertencem alguns fungos comestíveis, o ergosterol possui propriedades nutricionais importantes, como a redução na absorção do colesterol, reduzindo o colesterol e o LDL plasmáticos sem efeitos adversos observáveis (TEICHMANN *et al.*, 2007). Ainda sob esse ponto de vista, esse esterol é ponto de partida para o enriquecimento nutricional de

cogumelos, quando expostos à radiação ultravioleta (KALARAS *et al.*, 2012). Esse processo, similar à conversão do 7-desidrocolesterol a vitamina D₃ (colecalfiferol) na pele exposta à radiação solar, faz com que o ergosterol seja convertido a vitamina D₂ (ergocalciferol), substância análoga à vitamina D₃ e com propriedades fisiológicas importantes, como regulação da homeostase do cálcio e ação antiproliferativa e estimuladora de diferenciação celular sobre células neoplásicas (CORCORAN *et al.*, 2015).

3.1 Métodos de preparo de amostra e matrizes

Diversos métodos de extração de ergosterol são reportados na literatura com aplicação em diversas matrizes, como grãos (SEITZ *et al.*, 1977), solos (DAVIS; LAMAR, 1992; MONTGOMERY *et al.*, 2000; STAHL; PARKIN, 1996) sedimento de rios (RAVELET *et al.*, 2001), matrizes vegetais (LARSEN *et al.*, 2004; MUNIROH *et al.*, 2014; TARDIEU *et al.*, 2007), cogumelos comestíveis (BARREIRA *et al.*, 2014; VILLARES *et al.*, 2014), inclusive culturas puras de fungos produzidas em laboratório. Kieber e colaboradores (1955) relataram trabalhos feitos entre os anos de 1931 e 1944 em que já eram desenvolvidos métodos de ruptura celular e extração do ergosterol, com o objetivo de utilizá-lo como precursor de síntese de hormônios esteroides sintéticos. Até então, os protocolos reportados utilizavam métodos de abertura da amostra por ruptura mecânica, e Kieber foi o primeiro a relatar um método de extração que utilizava álcalis ou ácidos para promover a hidrólise química das estruturas celulares.

Seitz e colaboradores (1977) descrevem que até o fim da década de 1970, o método corrente para determinar a presença de fungos em alimentos, especialmente grãos nos quais esses micro-organismos cresciam durante o armazenamento, era a quantificação de glucosamina, produto da hidrólise da quitina presente na parede celular. Este método apresentava como limitações a interferência de outras fontes de quitina na amostra (p. ex. insetos ou partes deles) e longo tempo de preparo de amostra. Estes autores foram pioneiros em propor um método alternativo de avaliação da invasão de grãos de sorgo, trigo e milho por fungos, utilizando o ergosterol como marcador indireto da presença de fungos, uma vez que já era sabido que esta substância estava presente quase exclusivamente em fungos e não havia evidências da sua presença em vegetais.

Davis e Lamar (1992) buscaram avaliar se o método originalmente proposto por Seitz, com pequenas adaptações, era adequado para ser aplicado a amostras de solo. Eles concluíram que a etapa de saponificação alcalina é fundamental para elevar a recuperação de ergosterol da amostra, fato que concorda com as conclusões de Seitz. No ano seguinte, Padgett e Posey (1993) avaliaram cinco protocolos de extração, visando principalmente comparar o uso de metanol e etanol sobre a eficiência da extração, além de verificar se a quantidade de ergosterol remanescente na amostra sólida (biomassa fúngica pura, no caso) era significativamente relevante para que se justificasse novas extrações da mesma amostra. Os resultados indicaram que o metanol foi mais eficiente em extrair o analito e que a quantidade de ergosterol remanescente na amostra era substancialmente elevada, algumas vezes maior que a quantidade já extraída.

Mais recentemente, Tardieu e colaboradores (2007) compararam dois métodos de extração de ergosterol de milho, trigo e cevada, em termos de rendimento. As amostras foram fortificadas com ergosterol puro (5 mg/kg) e preparadas ou por extração em fase sólida (SPE) ou por extração líquido-líquido (LLE), sendo que nesta última, em todos os casos, o rendimento obtido foi significativamente maior que pelo preparo por SPE, embora para LLE a variação, expressa pelo coeficiente de variação, tenha sido maior.

Partindo da observação de trabalhos realizados entre 1977 e 1994 (ver (ANDERSON *et al.*, 1994; DAVIS; LAMAR, 1992; NEWELL, 1994; NEWELL *et al.*, 1988; PADGETT; POSEY, 1993; SEITZ *et al.*, 1977; SEITZ *et al.*, 1979; TOTHILL *et al.*, 1992), foi verificado que a extração de ergosterol a partir da biomassa fúngica, bem como de outras matrizes, segue um procedimento cujas etapas fundamentais envolvem: extração sólido-líquido, saponificação da amostra sólida por solução alcalina, extração líquido-líquido, secagem e ressuspensão para análise, geralmente feita por métodos cromatográficos. Observou-se também que o procedimento poderia ainda envolver uma etapa de estresse físico para abertura da amostra, como ultrassom ou agitação mecânica (ANDERSON *et al.*, 1994), aquecimento por autoclavagem (KIEBER *et al.*, 1955), por refluxo (DAVIS; LAMAR, 1992; NEWELL *et al.*, 1988; PADGETT; POSEY, 1993) ou em banho-maria (TOTHILL *et al.*, 1992). Apesar de evidências indicando que a etapa de saponificação aumenta a quantidade de ergosterol extraída (DAVIS; LAMAR, 1992), fato corroborado por Padgett e Posey (1993), parecia não haver consenso quanto a esta etapa, pois ela não havia sido

executada por todos os autores [ver Seitz *et al.* (1977) e Matcham *et al.* (1985)]; entretanto, observa-se que sua execução sempre foi acompanhada de aquecimento.

Muitos dos trabalhos que utilizavam tratamento por refluxo demandavam tempos prolongados para esta etapa, que variavam de minutos a algumas horas, além de grandes massas de amostra (até 20 g) e grandes volumes de solventes (até 300 mL) (YOUNG, 1995). Diante disso, Young (1995) desenvolveu um método de extração de ergosterol a partir de massa micelial pura ou amostras contaminadas por fungos utilizando micro-ondas, denominando-a extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave-assisted extraction*). Segundo este método, é necessária uma massa menor de amostra (10 a 100 mg), volumes menores de solvente (p. ex. 2 mL de metanol, 500 μ L de NaOH 2 mol L⁻¹) além de tempos consideravelmente menores que os necessários para tratamento por refluxo (p. ex. 35 s). Young foi o primeiro a desenvolver um método para tal aplicação e inovou ainda adicionando uma etapa de neutralização do álcali de saponificação. As modificações apresentadas por ele representaram uma grande melhoria em eficiência em termos de ganho em tempo, economia de reagentes, geração de menos resíduos; entretanto, o uso de amostras menores demanda cuidados adicionais no que diz respeito à homogeneidade e consequente representatividade da mesma (YOUNG, 1995).

3.2 Determinação e quantificação

Os métodos analíticos reportados para determinação de ergosterol se utilizam de métodos cromatográficos com detecção óptica, usualmente espectrofotometria na região do UV-VIS (YOUNG, 1995). Seitz e colaboradores (1977) foram os primeiros a propor a associação da detecção óptica com a cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC), o que se apresentou como um diferencial para separação de interferentes muito apolares. Mais recentemente, alguns autores propuseram métodos de análise por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (HEADLEY *et al.*, 2002; NIELSEN; MADSEN, 2000). Por sua versatilidade, robustez e seletividade de detecção do ergosterol a 282 nm, trabalhos mais atuais utilizam HPLC-UV ou HPLC-DAD para determinação do ergosterol (BARREIRA *et al.*, 2014; MUNIROH *et al.*, 2014; VILLARES *et al.*, 2014).

3.3 Uso do ergosterol na determinação da biomassa e relação com o crescimento fúngico

Em experimentos de laboratório, o crescimento de um fungo é monitorado, usualmente, pela medição da variação da massa micelial seca em função do tempo (GRANADE *et al.*, 1985), procedimento simples de ser realizado quando um fungo é cultivado em meio de cultura líquido com fontes de carbono solúveis em água: o cultivo é filtrado e a fração sólida obtida é composta por biomassa fúngica pura. Entretanto, a utilização de fontes de carbono insolúveis torna praticamente impossível a medição da biomassa fúngica, pois não há como separá-la da fonte de carbono não consumida (KOUTINAS *et al.*, 2003). No caso de cultivos em estado sólido, o fungo está em contato íntimo com o substrato, o que não permite a separação quantitativa deste e da biomassa fúngica, impedindo sua mensuração (DESGRANGES *et al.*, 1991). Dessa forma, deve-se utilizar um meio indireto de mensurar a biomassa fúngica tanto em cultivos em meio líquido quanto nos cultivos em estado sólido.

Diante disso, Seitz (1977; 1979) propôs que o crescimento fúngico poderia ser medido indiretamente pela quantificação de algum composto químico por ele produzido. À época, a medição de biomassa fúngica era comumente feita pela quantificação de glucosamina, um método limitado e trabalhoso (ver item 3.1). O autor sugeriu, então, que a substância utilizada fosse o ergosterol, o qual se sabia ser produzido pela maioria dos fungos. Seitz foi o primeiro autor a relatar o crescimento fúngico pela quantificação do ergosterol, trabalhando com cultivos em estado sólido de *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus amstelodami* (SEITZ *et al.*, 1979).

A partir da proposta de Seitz, diversos autores desenvolveram trabalhos utilizando o ergosterol como marcador do crescimento ou da presença de fungos em amostras ambientais ou produzidas como cultivo em laboratório. Matcham e colaboradores (1985) encontraram boa correlação entre massa micelial seca e quantidade de ergosterol de *Agaricus bisporus*. Anderson e colaboradores (1994) mensuraram ergosterol em solo com alto teor de material orgânico vegetal decomposto sem, entretanto, relacioná-lo a micro-organismo algum. Bermingham e colaboradores (1995) figuram entre os primeiros a estudar a correlação estatística entre biomassa fúngica e ergosterol, realizando uma avaliação crítica desta relação para nove espécies de fungos aquáticos, sem detectar, todavia, correlação

significativa para seis deles. Ng e colaboradores (2008) determinaram uma forte correlação positiva entre quantidade de ergosterol e unidades formadoras de colônia (UFC) de *Aspergillus niger* em placas de Petri ($R^2 = 0,9645$), mas não encontraram correlação significativa entre ergosterol e UFCs do mesmo fungo crescido em milho moído.

Em trabalho mais recente, Muniroh e colaboradores (2014) buscaram correlacionar a presença de *Ganoderma boninense* em amostras de palma de óleo (dendezeiro, *Elaeis guineensis* Jacq). Estes autores otimizaram um método de extração de ergosterol assistida por micro-ondas realizando saponificação com NaOH. Além disso, foram determinadas a correlação entre biomassa fúngica pura de *G. boninense* e quantidade de ergosterol, e a correlação entre massa de palma de óleo e quantidade de ergosterol, obtendo coeficientes de determinação (R^2) de 0,7845 e 0,7676, respectivamente. Os resultados destes autores demonstram que a presença de ergosterol é boa indicativa da presença do fungo e que a quantidade do analito está diretamente relacionada tanto à biomassa fúngica pura quanto à massa de amostra infectada por *G. boninense*. Este achado descortina a possibilidade da quantificação da biomassa fúngica a partir do ergosterol em outros contextos de pesquisa, como na monitorização de produção enzimática por fungos crescidos na presença de fontes de carbono complexas, como é o caso dos resíduos lignocelulósicos.

4 Delineamento de experimentos e análise de dados

O delineamento de experimentos surgiu a partir de trabalhos de Sir Ronald A. Fisher, matemático, biólogo e estatístico inglês, realizados na Estação Experimental em Agricultura de Rothamsted, na Inglaterra. Considerado o pai da Estatística Moderna, Sir Fisher foi chamado em 1918 pelo diretor da Estação para analisar dados de rendimento de colheitas realizadas em lotes tratados anualmente com o mesmo tipo de fertilizante. Sua função era analisar os dados e buscar extrair conclusões utilizando métodos estatísticos, para a qual lançou mão do ajuste de modelos pelo método de mínimos quadrados. Entretanto, ele se deparou com questões críticas que não poderiam ser respondidas a partir dos dados que analisara devido a deficiências inerentes ao planejamento daqueles experimentos. Em face disso, Fisher desenvolveu as bases do delineamento experimental para que esses problemas fossem superados. Curiosamente, Fisher certa vez afirmou,

quando analisava um experimento, que a única análise que poderia ser feita era a *post-mortem*, para descobrir do que foi que o experimento morreu (BARROS NETO *et al.*, 2010; BOX *et al.*, 2005; STEINBERG; HUNTER, 1984).

O uso de planejamentos experimentais pode ser aplicado a diversas áreas do conhecimento, como a Física, Química, Engenharias, Agronomia e Psicologia (STEINBERG; HUNTER, 1984; VIVALDI, 1999). Com aplicações extremamente vantajosas no contexto industrial, o planejamento experimental se utiliza de ferramentas estatísticas para tirar conclusões a partir de dados experimentais, de forma racional e econômica, culminando na obtenção do máximo de informação útil sobre um sistema experimental, realizando o menor número possível de experimentos (BARROS NETO *et al.*, 2010).

Um experimento pode ser definido como um conjunto de circunstâncias (tratamentos ou fatores) parcialmente controladas, elaborado sob um protocolo específico, com o objetivo de observar seu efeito quando aplicados a uma unidade experimental (parcela). Um experimento pode ser, ainda, do tipo comparativo, no qual mais de um tratamento é aplicado a parcelas, visando comparar seus efeitos (KUEHL, 1994).

Os delineamentos experimentais, conforme Fisher introduziu, seguem três princípios fundamentais (FISHER, 1935): repetição, controle local e casualização. O princípio da repetição, ou da replicação, estabelece que a aplicação de um tratamento deve ser repetida, de maneira independente, a mais de uma parcela idêntica, pois isso possibilita demonstrar a repetibilidade e estimar o erro experimental.

No caso do controle local, ou blocagem, as parcelas são agrupadas em conjuntos (blocos) com características homogêneas, minimizando o erro experimental ou aumentando a exatidão dos resultados. Fisher utilizou esse recurso no estudo da influência de diferentes fertilizantes sobre o rendimento de plantações. Em seu estudo, as parcelas representavam porções de solo onde seria aplicado o fertilizante. Contudo, por ser o solo uma porção que varia bastante de um local para o outro, era necessário selecionar blocos (demarcações de solo) com a maior homogeneidade possível, os quais seriam subdivididos em parcelas, as unidades experimentais. Por exemplo, uma seção de solo mais próxima de um rio certamente apresentará o viés de umidade em relação a uma seção de solo mais distante do

mesmo rio. A blocagem possibilita que esse viés seja controlado e que seu impacto sobre a resposta de interesse seja calculado, de forma a controlar o experimento.

Por fim, casualizar, aleatorizar ou randomizar, significa estabelecer uma ordem aleatória para a execução do(s) tratamento(s) sobre as parcelas. A casualização evita que, durante a execução do experimento, sejam introduzidos vieses, conhecidos ou não, além de tornar válida a estimação do erro experimental. Por exemplo: se as duas amostras do mesmo fungo, produzidas em cultivos diferentes (A e B) serão submetidas a uma extração em cinco replicatas cada, convém que a extração seja realizada aleatoriamente entre os 10 experimentos, ao invés de extrair primeiro as culturas A e depois as B, ou vice-versa (COCHRAN; COX, 1992; KUEHL, 1994). Experimentos planejados buscam, portanto, arranjar as parcelas aos tratamentos para que o erro experimental seja minimizado, os dados observados sejam não viesados e independentes entre si.

O termo “delineamento de experimentos” é utilizado para descrever os seguintes estágios experimentais (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 99; MILLER, J. N.; MILLER, 2010, p.187):

- i) Identificação dos fatores que podem influenciar uma ou mais respostas de interesse;
- ii) Delinear o experimento de forma que os efeitos de fatores não controlados sejam minimizados; e
- iii) Usar análise estatística para separar e avaliar os efeitos dos fatores envolvidos.

Diversos delineamentos experimentais existem previamente elaborados, como, por exemplo, o delineamento inteiramente casualizado (DIC), delineamento em blocos casualizados (DBC), delineamento em quadrado-latino (DQL), delineamento em blocos incompletos (DBI), experimentos fatoriais completos (EFC) e fracionários (EFF) (BARROS NETO *et al.*, 2010; BOX *et al.*, 2005; MILLER, J. N.; MILLER, 2010). Pode-se citar ainda a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), frequentemente utilizada em experimentos de otimização (BARROS NETO *et al.*, 2010). A escolha de um planejamento experimental em particular vai depender do objetivo que o pesquisador quiser alcançar (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 100).

4.1 Criação de modelos empíricos e análise de regressão

Segundo Cochran e Cox (1992), um dos métodos mais utilizados para descrever e analisar de dados de experimentos delineados é o uso de regressões lineares. Esses autores sumarizam este tipo de análise nos seguintes passos:

- i) Elaboração do modelo matemático para o sistema experimental em estudo
- ii) Estimação do efeito dos tratamentos usados no experimento; e
- iii) Análise estatística dos efeitos e do modelo.

A elaboração do modelo matemático, ou da regressão, pode também ser chamada de modelagem. A modelagem dos dados é um procedimento que busca descrever a relação matemática que melhor ajusta a(s) variável(eis) explicativa(s) (ou independentes, representadas por x) à variável resposta de interesse (ou dependente, representada por y). Modelos que associam apenas uma variável independente a uma variável resposta são modelos univariados; já os que associam duas ou mais variáveis independentes a uma variável resposta, são modelos multivariados.

A relação entre x e y é definida pelos coeficientes do modelo (β), que são desconhecidos. A modelagem almeja, dessa forma, estimar esses coeficientes, calculando os estimadores de β (b_i) (Equação 1).

$$y(x_1, x_2, \dots, x_i) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_i x_i + e = \beta_0 + \sum_{k=1}^i (\beta_k x_k) + e$$

Equação 1 — Modelo linear multivariado genérico, também chamado de equação de regressão, para ajuste de dados. A equação descreve y em função de x_1 a x_i , os parâmetros β representam coeficientes para cada variável i inserida no delineamento. β_0 é o termo constante; e representa o erro aleatório associado ao experimento.

Como se pode observar, a Equação 1 representa um modelo aditivo, isto é, soma os efeitos principais de cada tratamento ou fator k . Entretanto, há ainda os modelos que descrevem as interações entre fatores, adicionando seus termos à equação (Equação 2).

$$y(x_1, x_2) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e$$

Equação 2 — Exemplo de modelo linear para dois fatores com interação. O quarto termo da equação ($\beta_{12} x_1 x_2$) descreve a interação entre os fatores 1 e 2.

Deve-se considerar que um modelo empírico, aquele obtido com base apenas nas evidências experimentais, somente descreve o comportamento do sistema em estudo, isto é, não explica os fenômenos que permeiam a influência de x sobre y , mas fornece apenas uma descrição matemática desta influência. Além disso, conforme esclarecem Barros Neto e colaboradores (2010, p. 19, grifos dos autores),

Mesmo conseguir descrever, dito assim, sem nenhuma adjetivação, pode ser em muitos casos uma tarefa ambiciosa demais. Na modelagem empírica já nos damos por satisfeitos se somos capazes de descrever o processo estudado *na região experimental investigada*. Isso significa que modelos empíricos são também **modelos locais**. Sua utilização para fazer previsões para situações desconhecidas corre por conta e risco do usuário.

Entretanto, segundo os mesmos autores, não aplicar os modelos elaborados para finalidades práticas, em muitas situações, tornaria sem sentido a realização dos experimentos que forneceram os resultados.

O efeito de um tratamento, conforme mencionado no item ii), é um número cujo módulo representa a extensão em que este tratamento influencia o valor da variável resposta. Do ponto de vista do modelo matemático, o efeito associado a um fator é representado pelo seu estimador (b_i) e representa numericamente a mudança em y quando x varia uma unidade (SNEDECOR; COCHRAN, 1967, p. 147). Como os efeitos estão intimamente relacionados aos estimadores do modelo, as etapas i) e ii) anteriormente descritas serão consideradas neste trabalho como componentes de uma mesma etapa na análise de dados (aplicações do cálculo de efeitos serão apresentadas no item 4.3– Experimentos fatoriais).

Um dos métodos mais utilizados para a construção de modelos é o método de mínimos quadrados (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 218; JOHNSON, 1992). Em resumo, o método de mínimos quadrados, também chamado de análise de regressão, mensura os resíduos (ou erro) associados à regressão, isto é, a diferença entre os valores experimentais observados e os valores previstos pelo modelo, para então minimizá-los. Isto é feito calculando a soma dos quadrados dos resíduos, ou soma quadrática de resíduos (SQr, Equação 3).

$$SQr = \sum_{i=1}^i (y_i - \hat{y}_i)$$

Equação 3 — Fórmula para o cálculo de SQr. y_i representa a resposta observada no experimento i ; \hat{y}_i representa o valor de y estimado pelo modelo para o experimento i .

Em resumo, a análise de regressão por mínimos quadrados busca estimar os valores dos coeficientes do modelo que minimizam o valor de SQr (SNEDECOR; COCHRAN, 1967, p. 147), ou seja, o valor dos b_i para que a discrepância entre os valores experimentais (y_i) e os valores estimados (\hat{y}_i) seja a menor possível. Conforme o caso, o modelo que melhor ajusta um conjunto de dados pode ser linear ou não linear (polinomial, exponencial, logarítmico etc). Se há uma lei matemática (ou de qualquer outra área de conhecimento) que rege a relação entre um conjunto x de dados e um conjunto y , como ocorre, por exemplo, na relação entre a concentração de uma solução e a absorvância de radiação ultravioleta, definida pela Lei de Lambert-Beer, espera-se observar um modelo linear para ajustar os dados. Por outro lado, para se correlacionar, por exemplo, a área superficial de uma esfera em função de seu raio, espera-se observar um modelo não linear do tipo polinomial de segunda ordem (ou quadrática), uma vez que essas duas variáveis estão relacionadas pela equação *Área superficial* = $4\pi(\text{raio})^2$.

Há diversos programas computacionais, pagos e gratuitos, que apresentam recursos para fazer modelagem de dados. Devido à complexidade que alguns deles apresentam, alguns autores publicaram tutoriais bastante didáticos para análise de dados por mínimos quadrados, utilizando planilhas eletrônicas (BROWN, 2001; KEMMER; KELLER, 2010; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Uma aplicação clássica de ajuste por mínimos quadrados é a calibração analítica, que tem usos em diversas áreas de pesquisa (química, bioquímica, geociências, toxicologia) (BARROS NETO *et al.*, 2010; PETERS *et al.*, 2007). Um exemplo com dados retirados de Barros Neto (2010, p. 255) está representado no gráfico da Figura 4. A equação foi modelada pelo método de mínimos quadrados, fornecendo $b_0 = -0,1906$ e $b_1 = 15,3488$, para ajustar a uma equação para quantificação do herbicida bentazona. Os dados experimentais estão representados pelos pontos azuis, e a reta em preto representa o modelo ajustado para os dados.

Neste exemplo observa-se que o modelo não se ajusta perfeitamente aos dados experimentais. A distância vertical dos pontos até a reta é o que se define como resíduo.

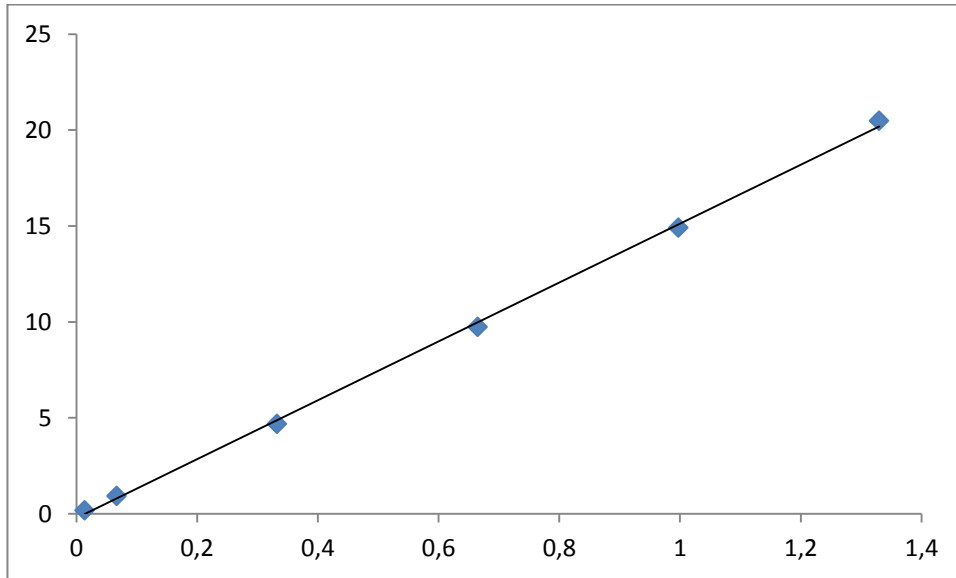


Figura 4 — Exemplo de ajuste de um modelo linear a pares de dados (x,y) .

4.2 Análise de variância (ANOVA)

A análise de regressão compreende também uma segunda etapa: a avaliação estatística do modelo. Essa etapa também se utiliza do método de mínimos quadrados, sistematizando seu uso na Análise de Variância (ANOVA) (COCHRAN; COX, 1992). Em linhas gerais, a ANOVA se baseia numa decomposição algébrica (Equação 4) do desvio de cada observação experimental (y_i) em relação à resposta média global (\bar{y}), seguida da comparação desses desvios (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 277).

$$\sum(y_i - \bar{y}_i)^2 = \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (a)$$

$$SQT = SQR + SQr \quad (b)$$

Equação 4 — Decomposições algébricas em relação a (\bar{y}) na execução da ANOVA.

A comparação dos desvios é o que permite avaliar a significância estatística do modelo. Resumidamente, pode-se representar a decomposição algébrica como na Equação 4b, em que a variação total das respostas experimentais é descrita em parte pela equação de regressão (soma quadrática de regressão, SQR) e em parte aos resíduos (SQr, Equação 3) (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 228).

Quando o experimento é realizado com replicatas, estas podem ser utilizadas para calcular o erro experimental. Nesse caso, a SQ_r , poderia ainda ser decomposta em mais dois termos: as somas quadráticas de falta de ajuste (SQ_{Faj}) e de erro puro (SQ_{ep}), que são utilizadas para averiguar estatisticamente se o modelo ajustado aos dados apresenta falta de ajuste, mesmo que graficamente não pareça haver evidência disso. A SQ_{Faj} representa, dentro dos resíduos totais (SQ_r), a porção que atrapalha o ajuste devido a deficiências do próprio modelo matemático, enquanto a SQ_{ep} representa a porção que atrapalha o ajuste devido a fatores aleatórios e não controláveis. Com base nisso, é simples concluir que a situação ideal é minimizar a SQ_{Faj} , por meio de alterações no modelo matemático (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 242).

Os componentes da ANOVA, para os quais são calculadas as SQ, são chamados fontes de variação (FV) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Para cada FV, há um número de graus de liberdade (*g.l.*), os quais estão sumarizados e explicados na Tabela 1. A razão entre as SQ e os *g.l.* fornece as médias quadráticas (MQ).

A última etapa da ANOVA é a realização de um teste F. O teste F é caracterizado pela comparação de duas variâncias, sendo que o valor de F, também chamado de razão de variâncias, é calculado pela razão de duas variâncias: uma devido à regressão e outra devido ao erro associado a ela (SNEDECOR; COCHRAN, 1967, p. 265). No caso, essas variâncias são representadas pelas médias quadráticas e suas respectivas razões (Tabela 1).

Tabela 1 — Tabela de análise de variância para regressão multivariada.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade.	Média Quadrática	Teste F
Regressão	SQR	$p - 1$	MQR	MQR/MQr
Resíduos	SQ_r	$n - p$	MQ_r	
Falta de ajuste	SQ_{Faj}	$m - p$	MQ_{Faj}	MQ_{Faj}/MQ_{ep}
Erro puro	SQ_{ep}	$n - m$	MQ_{ep}	
Total	SQT	$n - 1$		

Legenda: p : número de parâmetros do modelo; n : número total de experimentos; m : número de experimentos distintos (replicatas são consideradas um único experimento em m) (Adaptada de Teófilo e Ferreira, 2006).

A significância de uma FV é confirmada caso o valor de F calculado (F_{calc}) seja maior o valor de F tabelado (F_{tab}). Em outros termos, uma FV será significativa se $F_{calc} > F_{tab}$. Outra forma de se confirmar a significância de uma FV é pela comparação do p -valor com o nível de significância (α) adotado no estudo. Se p for

menor que α , a FV é considerada significativa. Do contrário, a FV avaliada não é considerada significativa. Na prática, a ANOVA de uma regressão avalia a significância de duas FV: a regressão em si e a falta de ajuste.

Interpretando a significância de cada FV na regressão, tem-se o representado na Tabela 2.

Tabela 2 — Interpretação da significância estatística das fontes de variação da ANOVA para uma regressão.

FV	Significativo?	Interpretação
Regressão	SIM; Fcalc > Ftab ou $p < \alpha$	Os coeficientes do modelo são estatisticamente diferentes de zero ($\beta_i \neq 0$), logo a regressão existe.
	NÃO; Fcalc < Ftab ou $p > \alpha$	Os coeficientes do modelo são estatisticamente iguais a zero ($\beta_i = 0$), logo a regressão não existe ou o modelo está incorreto.
Falta de ajuste	SIM; Fcalc > Ftab ou $p < \alpha$	O modelo apresenta falta de ajuste e deve ser modificado.
	NÃO; Fcalc < Ftab ou $p > \alpha$	O modelo está bem ajustado.

Legenda: Fcalc: F calculado; Ftab: F tabelado; p : p-valor; α : nível de significância

Além da ANOVA, uma análise obrigatória para avaliar a adequação de um modelo é a análise do gráfico de resíduos (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 242). Os resíduos de um modelo devem estar distribuídos aleatoriamente em torno de zero, ao longo da variação de x . Se em algum caso estiverem distribuídos seguindo um padrão, isto indica que o modelo apresenta falta de ajuste.

4.3 Experimentos fatoriais

Um problema corrente em experimentação é a necessidade de avaliar o efeito da variação de diversos fatores, qualitativos ou quantitativos, sobre uma ou mais respostas de interesse. Uma forma fácil e vantajosa de verificar tal efeito permitiria a avaliação de todos simultaneamente, ao invés de ter que medir o efeito para cada fator individual e sequencialmente. Por isso, Fisher, na década de 1920, apontou a realização dos experimentos fatoriais, ou planejamentos fatoriais, como a ferramenta

que facilita e fornece informações sobre todos os fatores envolvidos no experimento, bem como suas interações (SNEDECOR; COCHRAN, 1967, p. 339).

Em um planejamento fatorial, são escolhidos os fatores de interesse, aos quais são atribuídos níveis, que são os valores que esses fatores assumirão durante o experimento. Logo, para cada fator há um número de níveis atribuído, cujos valores reais são geralmente codificados para valores menores ou para sinais (p. ex. -2, -1 0, +1, +2; cinco níveis), a fim de facilitar os cálculos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Então, o experimento é conduzido de forma que o sistema experimental é submetido a uma combinação definida de níveis de todos os fatores selecionados para o experimento. A cada uma dessas combinações dá-se o nome de ensaio (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 101).

Muitas, vezes, a realização de replicatas nos experimentos representa um problema, no que diz respeito ao elevado número de procedimentos a serem executados. Por isso, em planejamentos fatoriais, pode-se optar por incluir um ponto no centro do planejamento (ponto central, PC), equivalente à média da faixa de níveis determinada por cada um dos fatores. No ponto central serão realizadas as repetições para medir o erro experimental (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

4.3.1 Planejamentos fatoriais completos (PFC)

Um planejamento fatorial completo é caracterizado pela realização de todas as possíveis combinações de níveis dos fatores, isto é, de todos os ensaios possíveis. Uma tabela que organiza as combinações de níveis chama-se matriz de planejamento (p. ex. Tabela 4). A tabela que organiza os sinais atribuídos aos níveis, bem como os sinais das possíveis interações, chama-se matriz de coeficientes de contraste (p. ex. Tabela 5) (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 102; TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

Para um planejamento fatorial com p níveis e k fatores, o número mínimo de ensaios a serem executados em um planejamento fatorial completo (PFC) é dado por p^k , se a todos os fatores forem atribuídos o mesmo número de níveis. Por exemplo, em um PFC com 3 fatores e 3 níveis cada, o número mínimo de ensaios é igual a $3^3 = 27$ ensaios. Se em um PFC tem-se 2 fatores com 3 níveis cada, ele é denominado um fatorial 3^2 (lê-se três a segunda), e o número mínimo de ensaios é igual a $3^2 = 9$ ensaios. Os fatoriais completos são mais indicados quando se

necessita avaliar o efeito de poucos fatores sobre a resposta (BARROS NETO *et al.*, 2010).

Teófilo e Ferreira (2006) apresentam um tutorial simples para análise de dados de planejamentos fatoriais em planilhas eletrônicas, utilizando um algoritmo matricial para o cálculo dos efeitos. A significância destes efeitos é, em seguida, calculada por meio da construção de intervalos de confiança para cada efeito. Se o IC contiver o zero, assume-se que existe uma probabilidade de $1 - \alpha$ (sendo α o nível de significância adotado) de que o valor daquele efeito seja igual a zero. Nessa situação, diz-se que o fator cujo efeito não é significativo não influencia significativamente a resposta estudada.

4.3.2 Planejamentos fatoriais fracionários (PFF)

Em alguns problemas experimentais, pode existir uma quantidade muito grande de fatores cuja influência sobre a resposta de interesse acredita-se ser importante. Neste caso, a execução de um planejamento fatorial completo torna-se excessivamente dispendioso e pode ser até mesmo um desperdício, já que alguns fatores podem não ser significativos. Para isso, os experimentos de triagem são bastante úteis, pois identificam os fatores cuja influência sobre a resposta é estatisticamente significativa (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Os planejamentos fatoriais fracionários (PFF) são um exemplo deste tipo de experimento.

Nesse tipo de fatorial, os mesmos princípios do PFC se aplicam. Entretanto, no PFF é realizado apenas uma fração do número mínimo de ensaios. Se, por exemplo, tem-se 5 fatores para serem avaliados em dois níveis, seriam necessários $2^5 = 32$ ensaios. Dependendo do aparato experimental disponível, ou dos recursos necessários, torna-se impossível executar este experimento. A execução, todavia, de uma fração deste número de ensaios, permite, muitas vezes, tirar conclusões equivalentes às de um planejamento completo com os mesmos níveis e fatores (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 165).

Por definição, uma fração meia de um planejamento completo é o planejamento que possui a metade do número de ensaios de um PFC. A fração meia de um PFC 2^4 é representada por um PFF 2^{4-1} (lê-se dois a quarta menos um), que totalizam 8 ensaios, e assim sucessivamente para as frações quarta e oitava. Evidentemente, não convém reduzir drasticamente o número de ensaios em um PFF, pois isso não permitiria inferir conclusão alguma.

4.4 Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A Metodologia de Superfície de Resposta é uma técnica de otimização que se utiliza de planejamentos fatoriais. Ela se subdivide claramente em duas etapas: modelagem e deslocamento, que podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias, até se alcançar um objetivo pré-estabelecido. A modelagem trata da criação de modelos matemáticos que descrevem o comportamento de uma ou mais variáveis sobre uma resposta de interesse, geralmente usando dados de experimentos planejados. O deslocamento se trata de alterar progressivamente os valores das variáveis na direção que promove a variação mais pronunciada na resposta (BARROS NETO *et al.*, 2010).

Enquanto, planejamentos fatoriais são frequentemente utilizados em experimentos de triagem de variáveis, a RSM é utilizada em uma etapa subsequente, na qual os fatores selecionados na triagem são utilizados em um novo experimento. Este experimento fornecerá dados para que sejam construídos modelos matemáticos empíricos, capazes de descrever o sistema experimental em estudo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Por terem esta característica, é possível utilizar esses modelos para descobrir que valores as variáveis em estudo deveriam assumir para que a resposta de interesse fosse máxima ou mínima, a depender do caso.

Recentemente, Heleno e colaboradores (2016) publicaram um trabalho de otimização no qual aplicam a Metodologia de Superfície de Resposta na busca de condições ótimas de extração de ergosterol de *Agaricus bisporus*, um cogumelo comestível. Os autores modelaram os dados experimentais em uma equação que permitiu prever que combinação de valores se deveria atribuir às variáveis selecionadas para a otimização, de forma a maximizar duas respostas que as interessavam: massa de ergosterol/massa de amostra e massa de ergosterol/massa de extrato.

Uma vez que a RSM necessita de dados de um planejamento experimental, vários tipos de planejamentos podem ser utilizados para gerar dados ajustáveis a modelos. O Planejamento Composto Central (CCD) é um dos mais utilizados, mas pode-se citar o planejamento Doehlert (BARROS NETO *et al.*, 2010; TEÓFILO; FERREIRA, 2006) e o planejamento Box-Behnken (HELENO *et al.*, 2016).

4.4.1 Planejamento Composto Central

O Planejamento Composto Central (do inglês *central composite design*, CCD) é um tipo especial de fatorial, em que os pontos tradicionais do experimento sofrem uma rotação de 45° nos níveis. A Figura 5 ilustra um CCD. É composto por três partes: a fatorial, idêntico a um planejamento fatorial; a axial, produto do deslocamento dos pontos fatoriais no espaço experimental; e o ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

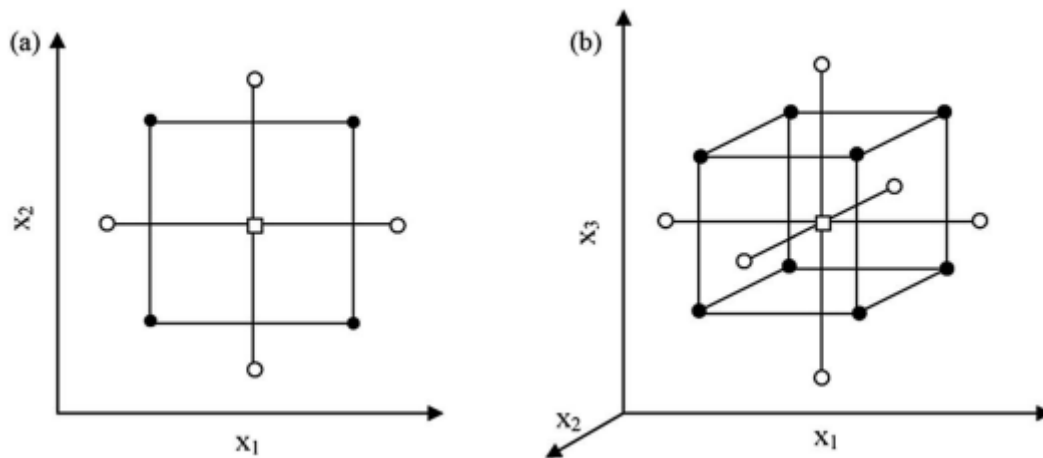


Figura 5 — Representação esquemática de um CCD com dois fatores (esquerda) e com três fatores (direita). Os círculos escuros representam os pontos fatoriais, os círculos vazios representam os pontos axiais e o quadrado vazio representa o ponto central. Reproduzido de Korany e colaboradores (2015).

Apesar de o CCD permitir a execução de experimentos nos pontos axiais, o uso destes pontos não é obrigatório, já que se não forem utilizados, tem-se um planejamento fatorial completo. O CCD apresenta a vantagem de se iniciar com um experimento fatorial completo (pontos fatoriais) e, caso seja necessário, realiza-se a rotação do fatorial inicial e são incluídos os ensaios novos para ajuste de um modelo. Essa situação é útil quando um modelo ajustado apresentar falta de ajuste ou o experimento não fornecer graus de liberdade o suficiente para avaliar a falta de ajuste do modelo, ocasião na qual será necessário incluir mais ensaios no experimento. Os pontos axiais são bastante úteis para isso.

III OBJETIVOS

1 Geral

- Avaliar a correlação entre o ergosterol produzido por *Aspergillus tamarii* e sua biomassa quando cultivado na presença de casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono.

2 Específicos

- Cultivar o fungo *A. tamarii* em meio líquido contendo casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono;
- Desenvolver e otimizar uma metodologia de extração de ergosterol em amostras de cultivo submerso contendo casca de maracujá-amarelo;
- Desenvolver e validar uma metodologia de quantificação de ergosterol por HPLC-DAD;
- Determinar o perfil de produção de pectinases em função do tempo de crescimento do fungo *Aspergillus tamarii* em meio líquido contendo casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono
- Comparar o perfil de produção de pectinases com a quantidade de ergosterol produzida durante o tempo de crescimento
- Estimar a quantidade em massa de *A. tamarii* quando cultivado na presença de casca de maracujá como fonte de carbono insolúvel.
- Determinar o perfil de crescimento de *A. tamarii* por meio da quantificação do ergosterol em função do tempo de crescimento;

IV MATERIAL E MÉTODOS

1 Reagentes e padrões

Os solventes para cromatografia (metanol e acetonitrila) foram adquiridos da J.T. Baker[®] (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA). Água ultrapura, para cromatografia, foi obtida do sistema de purificação de água Milli-Q[®], modelo Biocel (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os solventes utilizados em extrações (pentano e metanol) foram adquiridos das empresas Dinâmica[®] (Diadema, São Paulo, Brasil) e Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA), respectivamente. Hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA).

O padrão analítico de ergosterol (5,7,22-ergostatrien-3 β -ol, \geq 95% HPLC) foi adquirido da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Diclorometano foi adquirido de Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil).

Os reagentes utilizados para preparo de meios de cultura foram: di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄ — Vetec Química Fina/Sigma-Aldrich[®], RJ, Brasil), mono-hidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄ — Vetec Química Fina/Sigma-Aldrich[®], RJ, Brasil), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄·7H₂O — Merck[®], SP, Brasil), sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄ — Vetec Química Fina/Sigma-Aldrich[®], RJ, Brasil] e extrato de levedura (Kasvi[®], Paraná, Brasil).

2 Origem do resíduo lignocelulósico e pré-tratamento

Os frutos inteiros de maracujá-amarelo foram adquiridos no Hipermercado Extra, ao qual o produto foi fornecido pela empresa Brasnica[®] Frutas Tropicais (lote #4048, Brasfrutas Agronegócios Ltda, Brasília, Brasil). O pré-tratamento consistiu em lavar os frutos com água corrente, descartar a polpa e secar a casca em estufa a 65°C por 48 horas. Após pré-tratada, a casca do maracujá-amarelo foi submetida à trituração criogênica em almofariz até a obtenção de um particulado com aparência granulada e homogênea.

3 Isolamento, manutenção e conservação do fungo *Aspergillus tamarii*

O fungo filamentoso *Aspergillus tamarii* foi originalmente isolado da compostagem natural de resíduos da indústria de rebeneficiamento de fibras de algodão (Hantex Ltda., região do Vale do Itajaí, Gaspar, SC) conforme descrito por De Siqueira e colaboradores (2010). Este isolado encontra-se depositado na

Micoteca do Laboratório de Enzimologia, Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB), preservado a -80°C em criotubos contendo glicerol 50% (v/v). O micro-organismo está dentro do âmbito da rede Sisbiota de fungos filamentosos, com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010237/2015-1, sob supervisão do Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, coordenador do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB).

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contendo caldo de batata 2,0% (m/v), dextrose 1,0% (m/v) e ágar 2,0% (m/v) em câmara de germinação modelo TE-4013 (Tecnal® Equipamentos Científicos, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 28°C e ciclo claro/escuro de 12h/12h, até que se observasse esporulação (em torno de 5 dias). Esta condição, daqui em diante denominada cultura pura, foi utilizada para realizar o inóculo em meio de cultura líquido.

Regiões do DNA ribossomal espaçador interno transcrito (rDNA ITS) e dos genes de β -tubulina e calmodulina foram utilizados como marcadores para identificação molecular do fungo conforme descrito por Midorikawa e colaboradores (2008). A análise das regiões ITS indicou similaridades com sequências de fungos do gênero *Aspergillus*. Os genes de β -tubulina e calmodulina confirmaram a identidade como *A. tamaraii*.

4 Cultivo em meio líquido

4.1 Produção de amostras para extração de ergosterol

O fungo *A. tamaraii* foi cultivado em meio líquido mínimo contendo (m/v) 0,7% KH_2PO_4 ; 0,2% K_2HPO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,06% de extrato de levedura utilizando ou casca de maracujá-amarelo (de agora em diante designada como amostra M) ou glicose (de agora em diante designada como amostra G) a 1,0% (m/v) como fonte de carbono (JARAMILLO, 2014). Os cultivos foram feitos em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 400 mL de meio líquido, com pH ajustado em 6,8. O meio líquido foi inoculado com 1,0% (v/v) da suspensão de esporos contendo entre 10^6 e 10^7 esporos/mL, contados em câmara de Neubauer. Para preparar a suspensão de esporos, o micélio foi raspado da cultura pura e disperso em 50 mL de solução salina (NaCl — Vetec Química Fina/Sigma-Aldrich®),

RJ, Brasil) a 0,9% (m/v) acrescida de 1 mL de solução de Tween[®] 80 (Dinâmica[®], Diadema, São Paulo, Brasil) a 1,0% (v/v).

Os meios inoculados foram cultivados sob agitação constante em *shaker* a 120 rpm e 28°C, por 10 dias. De acordo com estudos anteriores realizados no Laboratório de Enzimologia (JARAMILLO, 2014), este tempo de cultivo foi determinado como o tempo necessário para a máxima produção de pectinases por *A. tamarii*.

4.2 Produção de amostras para determinação de atividade enzimática

A produção de amostras para determinação da atividade enzimática seguiu o mesmo protocolo descrito no item 4.1, sendo modificados apenas a escala do cultivo para frascos Erlenmeyer de 1 L e o volume de meio para 200 mL.

5 Preparo de amostras

5.1 Amostras para extração de ergosterol

Após 10 dias de cultivo o meio foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro (Whatman N°1). O papel de filtro contendo a fração sólida foi acondicionado em tubos Falcon de 50 mL, congelado a -80°C por 24 horas e liofilizado por 24 horas (Liofilizador modelo K202, Liotop[®], São Carlos, SP, Brasil). A massa seca foi então removida do papel de filtro e triturada em gral com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Este pó foi acondicionado em um tubo Falcon de 50 mL e armazenado a -80°C para ser utilizado como amostra de partida para extração.

5.2 Amostras para determinação de atividade enzimática

Uma alíquota de 40 mL da fração líquida obtida na filtração descrita no item 5.1 foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, ao qual foram adicionados 400 µL de solução de azida sódica a 10,0% (v/v). Essa amostra, doravante denominada extrato bruto (EB), foi armazenada a -20°C para análises subsequentes.

6 Determinação da atividade enzimática de pectinase

Os ensaios enzimáticos para determinação de atividade de pectinase foram realizados em microescala (placa de 96 poços) pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), um ensaio colorimétrico desenvolvido por Miller (1959), com adaptações. Em um poço foram adicionados 5 µL de extrato bruto homogeneizado e 10 µL de pectina a 1,0% (m/v) para serem incubados por 30 minutos a 50°C em termociclador

(Mycycler Thermal Cycler, Bio Rad Laboratories, EUA). Após a incubação, são adicionados 30 μL de DNS à mistura inicial, sendo novamente incubada por 10 minutos a 97°C. O conteúdo de cada poço foi então diluído com a adição de 150 μL de água destilada, homogeneizado e a absorbância foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro SpectraMax modelo M2e (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). Foram realizados brancos para a enzima, no qual não se adicionou substrato, e para o substrato, no qual não foi adicionado extrato bruto, com o objetivo de descontar as contribuições de absorbância relativas à enzima e ao substrato isoladamente, contidas na absorbância medida para o ensaio “teste”. Portanto, foi calculado um saldo de absorbâncias definido pela Equação 5. Todos os ensaios, teste e brancos, foram feitos em quintuplicata.

$$\text{Saldo}_{\text{ensaio teste}} = \text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{Branco enzima}} - \text{Abs}_{\text{Branco substrato}}$$

Equação 5 — Fórmula para cálculo do saldo de absorbância dos ensaios teste.

Foi construída uma curva analítica para quantificação de ácido galacturônico (mg de açúcar/15 μL de solução x Abs em AU) em função da absorbância obtida para 7 níveis de concentrações, cada nível preparado em triplicata. A atividade enzimática foi calculada em UI/mL (μmol de açúcar redutor formado por minuto por mL de solução enzimática), segundo a Equação 6.

$$\text{Atv. Enz. } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = \text{Atv. Enz. } (\text{UI}/\text{mL}) = \frac{[\text{Saldo (AU)} - b]/a}{0,194 \text{ mg}/\mu\text{mol}} \times \frac{10^3 \mu\text{L}}{30 \text{ minutos}} \times \frac{10^3 \mu\text{L}}{15 \mu\text{L}}$$

Equação 6 — Fórmula para cálculo da atividade enzimática em função do saldo de absorbância dos ensaios teste. *b*: coeficiente linear da curva analítica; *a*: coeficiente angular da curva analítica; 0,194 mg/ μmol é a massa molar do ácido galacturônico; 30 minutos é o tempo de reação da enzima com o substrato. O último termo da equação é o fator de conversão que transforma o volume de solução enzimática de microlitros para mililitros, considerando a unidade da abscissa utilizada na calibração.

7 Determinação do teor de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976). O extrato bruto foi diluído na proporção de 1:9 (v/v) para um volume final de 160 μL , aos quais foram adicionados 40 μL do reagente de Bradford, sendo homogeneizados no momento da mistura, em microplaca acrílica. Os ensaios foram analisados por espectrofotometria UV-VIS a 595 nm (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). Foi utilizado o *Kit Protein Assay* (Bio Rad Laboratories, EUA).

Foi construída uma curva analítica para quantificar as proteínas totais (μg de albumina bovina sérica (BSA) x Abs em AU) em função da absorbância obtida para 6 níveis de massa, sendo cada nível preparado em triplicata. O teor de proteínas totais foi calculado em mg/mL (mg de proteína por mL de extrato bruto), segundo a Equação 7.

$$\text{Teor Proteínas Totais (mg/mL)} = \frac{[(Abs - b)/a] \times d}{10^3} \times \frac{10^3}{160 \mu\text{L}}$$

Equação 7 — Fórmula para cálculo do teor de proteínas em mg de proteínas por mL de extrato bruto. ***b***: coeficiente linear da curva analítica; ***a***: coeficiente angular da curva analítica. ***d***: fator de diluição da amostra (igual a 10 no experimento); 10^3 é o fator de conversão que transforma μg para mg de proteínas. O último termo da equação é o fator de conversão que transforma a massa de proteína em $160 \mu\text{L}$ para a massa em 1 mililitro, considerando o volume inicial de amostra diluída utilizado no ensaio.

8 Análise dos extratos e quantificação do ergosterol

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) modelo UltiMate 3000 (Thermo Scientific™ Dionex™, Sunnyvale, CA, EUA), composto por um *rack* de solventes SRD-3600, sistema de bombas ternárias DGP-3600SD, injetor automático WPS-3000SL, compartimento de coluna TCC-3200 e detector de arranjo de diodos na região UV-VIS modelo DAD-3000 conectados ao software Chromeleon® versão 7.1.2 (Thermo Scientific™ Dionex™, Sunnyvale, CA, USA).

As separações foram realizadas em duas colunas analíticas: RP-C18 LiChroCART® Purospher® Star (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) com sua respectiva pré-coluna (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e Kinetex® Core-Shell C18 (100 mm x 4,6 mm, 5 μm) com sua respectiva pré-coluna (Phenomenex®, Torrance, CA, EUA). Sendo esta última utilizada nos experimentos de validação.

O método analítico foi adaptado de Montgomery e colaboradores (2000). A separação foi realizada em eluição isocrática com metanol 100% e fluxo de 1 mL min^{-1} . Todos os solventes foram filtrados em membrana de PVDF (Modelo Durapore, 0,22 μm , Merck® Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) e degaseificados em ultrassom por 30 minutos. O volume de injeção foi fixado em $20 \mu\text{L}$ e a temperatura da coluna foi mantida em 25°C . A detecção se deu a 282 nm com aquisição de dados espectrais (5 Hz).

8.1 Quantificação e identificação do ergosterol

Uma curva analítica com 7 níveis de concentração foi construída para quantificar o ergosterol. Uma solução-padrão estoque de ergosterol ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada em diclorometano e diluições foram feitas nas concentrações de 1000,0; 500,0; 100,0; 10,0; 1,0 e $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$; para o volume final de 10 mL de diclorometano. A partir de cada solução, foi realizada uma nova diluição de 10 vezes em metanol. A Tabela 3 exibe as concentrações dos estoques em diclorometano e as concentrações das diluições para o volume final de 10 mL metanol. As diluições em metanol foram filtradas em unidades de filtração para seringa (Millex[®]-GV, 13 mm, PVDF, $0,22 \mu\text{m}$, Merck[®], Darmstadt, Alemanha) diretamente em *vials* de 2 mL antes de serem injetadas. Todas as soluções-padrão foram estocadas em tubos Falcon a -20°C .

Tabela 3 — Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos estoques em diclorometano e concentrações obtidas para curva analítica.

Estoques	0,1	1,0	10,0	100,0	500,0	1000,0	2000,0
Curva	0,01	0,1	1,0	10,0	50,0	100,0	200,0

A identidade do ergosterol foi confirmada pela comparação do tempo de retenção e espectro UV (240 a 800 nm) do analito nos extratos e em soluções-padrão.

A linearidade foi avaliada pelo método de regressão por mínimos quadrados e o coeficiente de determinação (r^2) foi utilizado para mensurar a extensão da variância dos dados explicada pela equação. A significância dos coeficientes da curva foi determinada por IC 95%.

9 Otimização da extração de ergosterol

9.1 Protocolo inicial

O procedimento de extração inicial foi adaptado de Young (1995) e Montgomery e colaboradores (2000) e está esquematizado na Figura 6. Alíquotas das amostras M e G (150 mg) foram colocadas em tubos Falcon e tratadas com 2,5 mL de NaOH a 2 mol/L. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vórtex e mantido no escuro por 30 minutos para ser saponificado. Em seguida, foram adicionados 2 mL de metanol, os tubos foram selados com filme plástico e individualmente irradiados em um forno micro-ondas doméstico (Brastemp Ltda., Manaus, AM, Brasil) por 20 segundos a 40% da potência nominal (460 W de 1150

W). Os tubos foram colocados no escuro para esfriar por 15 minutos, após os quais foram novamente irradiados por 10 segundos na mesma potência. Após mais 15 minutos de resfriamento, o conteúdo dos tubos foi submetido à neutralização estequiométrica com 2,5 mL de HCl 2 mol/L, após a qual foram adicionados 2 mL de metanol. Em seguida, foram adicionados 5 mL de pentano e os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos. Esta etapa foi repetida mais 2 vezes e as 3 frações pentânicas foram recolhidas para um novo tubo. O *pool* de extrato pentânico foi transferido para tubos Eppendorf de 2 mL para secagem em centrífuga a vácuo (*Concentrator Plus* modelo 5305, Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) ajustado em 30°C e modo V-AL (concentração para soluções alcoólicas, 1.400 rpm). O sólido formado foi ressuscitado em 1,8 mL de metanol grau cromatográfico, sonificado por alguns minutos até a dissolução do precipitado e filtrado em unidades de filtração para seringa (Millex®-GV, 13 mm, PVDF, 0.22 µm, Merck®, Darmstadt, Alemanha) diretamente em *vials* de 2 mL, para análise por HPLC-DAD.

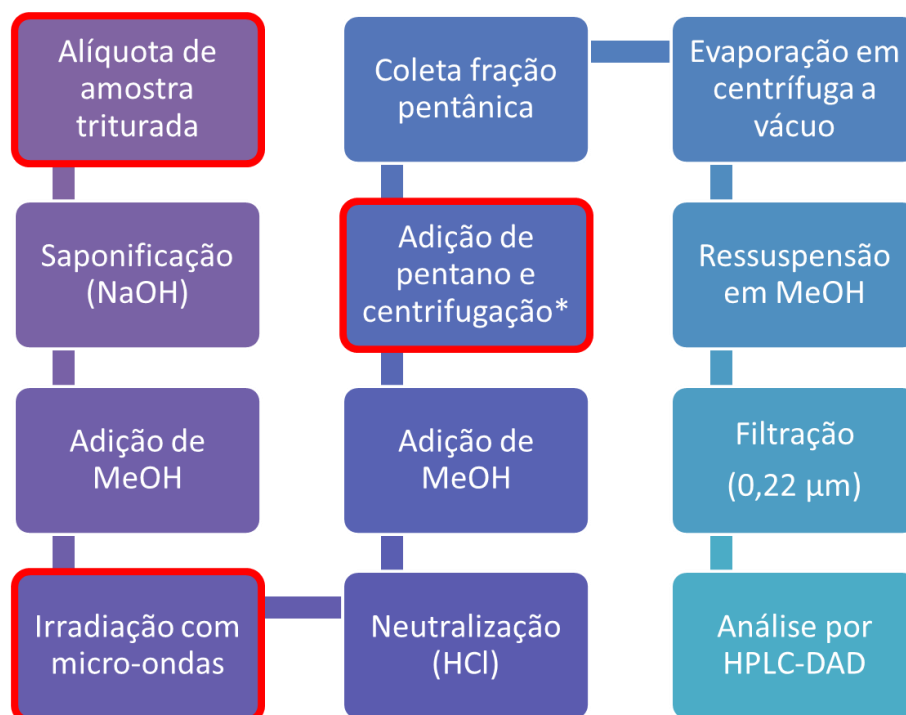


Figura 6 —Representação esquemática do protocolo de extração de ergosterol assistida por micro-ondas. Quadros com contorno vermelho indicam as etapas consideradas nos experimentos de otimização. * A etapa de centrifugação foi incluída na tentativa de facilitar a coleta de frações pentânicas.

9.2 Adaptação do protocolo inicial

Imediatamente antes da adição do pentano, foi incluída no procedimento uma etapa de extração com acetonitrila (ACN). A quantidade de ergosterol extraído de uma mesma amostra foi medida em 8 extrações de 5 mL de ACN, sendo que cada sobrenadante de ACN foi coletado separadamente e, a partir de cada um, foi executada a etapa subsequente: extração com 5 mL de pentano. Cada extrato, correspondente a uma lavagem de ACN, foi analisado por HPLC-DAD e a extensão da quantidade de ergosterol extraída foi mensurada relativamente ao montante total extraído nas 8 lavagens (Equação 8).

$$\% \text{ Ergosterol}_n = \frac{m(\text{erg})_n}{\sum_{n=1}^8 m(\text{erg})_n} \times 100$$

Equação 8 — Fórmula para cálculo da quantidade relativa (percentual) de ergosterol extraído na lavagem n . $m(\text{erg})$: massa de ergosterol na n ésima lavagem.

9.3 Delineamento experimental e otimização da extração

Em todos os experimentos de otimização foram utilizadas as amostras M, devido a sua maior complexidade em relação às amostras G. Com o intuito de maximizar a quantidade de ergosterol obtida na extração, experimentos fatoriais foram delineados em três etapas:

- i) triagem de variáveis do experimento;
- ii) mensuração dos efeitos e determinação dos níveis ótimos; e
- iii) modelagem matemática e previsão de níveis ótimos pelo modelo.

A variável resposta foi definida como microgramas de ergosterol por miligramas de amostra ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Os resultados dos experimentos i) e ii) foram analisados com o *software* Microsoft Excel® 2010 (Redmond, Washington, EUA), conforme descrito por Teófilo e Ferreira (2006) e por Barros Neto e colaboradores (2010). A significância estatística dos efeitos foi avaliada pela construção de intervalos de confiança com 95% de confiança (IC 95%), sendo considerados significativos os efeitos cujos IC não continham o valor zero.

Os resultados do experimento iii) foram analisados com o *software* Design-Expert versão 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA). O modelo foi submetido à análise de regressão por ANOVA a 5% de significância.

9.3.1 Triagem de variáveis

Visando determinar quais fatores são significativos sobre a resposta, foi delineado um experimento fatorial fracionário 2^{5-2} (5 fatores, 2 níveis cada, 8 ensaios), com ponto central em triplicata. Os fatores e respectivos níveis escolhidos para a triagem estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 — Matriz de planejamento do fatorial fracionário 2^{5-2} para triagem de fatores da extração de ergosterol.

	Fatores		Níveis		
	Real	Codificado	-1	0	1
Tempo de irradiação (s)		x1	25	20/10	45
Potência da irradiação (W)		x2	230	460	690
Volume de pentano (mL)		x3	3,0	5,0 ¹	5,0 ¹ /5,0 ¹
Núm. de centrifugações		x4	0	1	2
Massa de amostra (mg)		x5	50,0	100,0	150,0

Valores separados por barra indicam que a etapa foi executada duas vezes (valor da primeira execução/valor da segunda execução). ¹ O volume de pentano recuperado foi fixado em 3,0 mL.

Os coeficientes de contraste para os fatores x4 e x5 foram definidos pelas relações geradoras $4 = 123$ e $5 = 12$; a matriz de coeficientes de contraste está representada na Tabela 5. Os efeitos foram calculados pelo algoritmo matricial descrito por Barros Neto e colaboradores (2010, p. 112) no *software* Microsoft Excel[®] 2010 (Redmond, Washington, EUA). A significância dos efeitos foi determinada pela construção de intervalos de confiança a 95%.

Tabela 5 — Matriz de coeficientes de contraste para os efeitos principais e os respectivos níveis reais, por ensaio, no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} .

Ensaio	Coeficientes de contraste						Níveis reais				
	Média	x1	x2	x3	x4	x5	x1	x2	x3	x4	x5
1	1	-1	-1	-1	-1	1	25	230	3,0	0	150,0
2	1	1	-1	-1	1	-1	45	230	3,0	2	50,0
3	1	-1	1	-1	1	-1	25	690	3,0	2	50,0
4	1	1	1	-1	-1	1	45	690	3,0	0	150,0
5	1	-1	-1	1	1	1	25	230	5,0/5,0	2	150,0
6	1	1	-1	1	-1	-1	45	230	5,0/5,0	0	50,0
7	1	-1	1	1	-1	-1	25	690	5,0/5,0	0	50,0
8	1	1	1	1	1	1	45	690	5,0/5,0	2	150,0
9	1	0	0	0	0	0	20/10	460	5,0	1	100,0
10	1	0	0	0	0	0	20/10	460	5,0	1	100,0
11	1	0	0	0	0	0	20/10	460	5,0	1	100,0

Os ensaios 9, 10 e 11 representam a triplicata no ponto central.

9.3.2 Mensuração dos efeitos e comparação do número de irradiações

Para mensurar os efeitos para cada fator, foram realizados dois experimentos fatoriais completos 2^3 (3 fatores, 2 níveis cada, 8 ensaios cada experimento = 16 ensaios) e 5 replicatas no ponto central.

No primeiro fatorial (1-IR), o fator tempo de irradiação foi executado com uma irradiação, enquanto no segundo (2-IR) foi executado com duas irradiações. A comparação entre o efeito de x1 dos Fatoriais 1-IR e 2-IR, bem como de seus respectivos IC, forneceu conclusões acerca do efeito do número de irradiações sobre a resposta. A matriz de planejamento está representada na Tabela 6. A Tabela 7 apresenta a matriz de coeficientes de contraste.

Tabela 6 — Matriz de planejamento dos fatoriais completos 2^3 para mensuração dos efeitos da extração de ergosterol.

Fatores		1-IR			2-IR		
		Níveis			Níveis		
Real	Codificado	-1	0	1	-1	0	1
Tempo de irradiação (s)	x1	25	35	45	25/25	35/35	45/45
Volume de pentano (mL)	x3	5,0 ¹	10,0 ²	10,0 ² /5,0 ¹	5,0 ¹	10,0 ²	10,0 ² /5,0 ¹
Massa de amostra (mg)	x5	50,0	100,0	150,0	50,0	100,0	150,0

Valores separados por barra indicam que a etapa foi executada duas vezes (valor da primeira execução/valor da segunda execução). ¹ O volume de pentano recuperado foi fixado em 3,0 mL. ² O volume de pentano recuperado foi fixado em 7,0 mL.

Os efeitos foram calculados pelo algoritmo matricial descrito por Barros Neto e colaboradores (2010, p. 112) no *software* Microsoft Excel[®] 2010 (Redmond, Washington, EUA). A significância dos efeitos foi determinada pela construção de intervalos de confiança a 95%.

Tabela 7 — Matriz de coeficientes de contraste para os efeitos principais e interações, bem como os níveis reais, por ensaio.

Ensaio	Coeficientes de contraste				Níveis reais			Interações ³			
	Média	x1	x3	x5	x1 ²	x3	x5	x13	x15	x35	x135
1	1	-1	-1	-1	25	5	50	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	45	5	50	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	25	10,0/5,0	50	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	45	10,0/5,0	50	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	25	5	150	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	45	5	150	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	25	10,0/5,0	150	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	45	10,0/5,0	150	1	1	1	1
9-13 ¹	1	0	0	0	35	10	100	0	0	0	0

¹ Os ensaios de 9 a 13 representam as 5 replicatas no ponto central. ² Apesar de exibir apenas uma irradiação para x1, considerar que no Fatorial 2-IR (Tabela 6) foram executadas duas irradiações. ³ x13, x15 e x35 são efeitos de interação de 2ª ordem; x135 é o efeito de interação de 3ª ordem.

Um modelo matemático fatorial foi determinado pelo *software* Design-Expert versão 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA). O modelo foi submetido à análise de regressão por ANOVA a 5% de significância.

9.3.3 Modelagem matemática da extração e otimização

A otimização foi realizada por Metodologia de Superfície de Resposta utilizando o Planejamento Composto Central para o ajuste do modelo matemático. Os resultados do experimento 1-IR foram utilizados para ajustar o modelo, sozinhos ou com a realização de seis ensaios adicionais (Tabela 8). A previsão dos níveis ótimos para os fatores foi feita utilizando como critério a maximização da resposta (μg ergosterol/mg amostra).

Tabela 8 —Ensaio adicional e respectivas respostas para modelagem dos dados de otimização por RSM.

Ensaio	Tempo de irradiação (s)	Volume de pentano (mL)	Massa de amostra (mg)	Rend. em massa ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	45	10/5	50	1,43 \pm 0,10
2	40	10/3	60	0,79 \pm 0,06
3	30	10/2	70	1,13 \pm 0,08
4	30	7	135	0,87 \pm 0,06
5	40	8	90	0,98 \pm 0,07
6	30	10	120	0,98 \pm 0,07

¹ Valores separados por barra indicam que a etapa foi executada duas vezes (valor da primeira execução/valor da segunda execução). * Valores representados por resposta \pm desvio-padrão

10 Correlação entre quantidade de ergosterol e biomassa fúngica

Massas de 10, 20, 30, 40 e 50 mg das amostras M e amostras G foram aliqüotadas em quintuplicata e submetidas à extração descrita no item 9.2. Os extratos foram analisados por HPLC-DAD e a área do pico foi usada para ajustar uma regressão em relação às massas de amostra; a média das massas reais medidas foi considerada na construção destas regressões.

Os dados foram modelados utilizando o algoritmo matricial descrito por Teófilo e Ferreira (2006). A significância de todas as regressões foi avaliada por ANOVA ($\alpha = 0,05$) e a dos coeficientes pela construção de IC 95%, utilizando o *software* Microsoft Excel[®] 2010 (Redmond, Washington, EUA).

Com o objetivo de mensurar a biomassa fúngica crescida em casca de maracujá-amarelo, foram construídas duas regressões: *i*) biomassa fúngica pura (amostra G) x área de pico do ergosterol, designada como curva G; e *ii*) massa de amostra M x área de pico do ergosterol, designada como curva M. Para *i* e *ii*, alíquotas de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg foram extraídas em quintuplicata conforme a extração adaptada descrita no item 9.2 e a quantidade de ergosterol foi determinada.

Aplicando a técnica de comparação de métodos analíticos por regressão, descrito por Miller e Miller (2010, p. 130), uma terceira regressão foi determinada plotando os valores da variável resposta (área de pico do ergosterol) da curva M contra os da curva G, sendo gerada uma terceira regressão linear (*iii*), designada como curva de equivalência (ou curva Eq), do tipo $A_M = a \times A_G + b$, em que A_M representa a área de pico do analito nas amostras M e A_G representa a área de pico do analito nas amostras G.

Os coeficientes angulares e seus IC foram comparados, bem como os da curva analítica de ergosterol, para verificar a equivalência das regressões. Regressões cujas inclinações sejam estatisticamente iguais e cujos interceptos sejam estatisticamente iguais a zero podem ser consideradas equivalentes, o que pode ser facilmente determinado pela análise de sobreposição dos IC (MILLER, J. N.; MILLER, 2010, p. 131).

11 Curvas de crescimento de *A. tamaritii*

A produção de pectinases, de ergosterol e de proteínas totais pelo fungo *A. tamaritii* quando crescido em meio mínimo contendo casca de maracujá-amarelo ou glicose como fontes de carbono foram mensuradas a cada 5 dias durante um período de 30 dias. O cultivo foi realizado como descrito nos itens 4.2 e 5.2, sendo que foi preparado um frasco Erlenmeyer para ser processado em cada dia. Foram determinados a atividade de pectinases (conforme item 6), o teor de proteínas totais (conforme item 7) e a quantidade de ergosterol (conforme item 8.1, sendo que foi utilizado o protocolo otimizado de extração de acordo com os resultados do planejamento fatorial completo 2^3).

11.1 Estimação da biomassa fúngica pelo ergosterol

As regressões determinadas pelos dados do experimento descrito no item 10 foram utilizadas para estimar a biomassa fúngica pura em cada dia da curva de

crescimento. Para a curva de crescimento com CMA como fonte de carbono, a área de pico do analito encontrada, em cada dia, foi convertida para área de pico equivalente em uma amostra G, por meio da curva de equivalência (curva Eq). O valor obtido foi então convertido em massa de amostra G, considerada aqui como biomassa fúngica pura, utilizando a curva G.

Para estimar a biomassa fúngica na curva de crescimento feita com glicose como fonte de carbono, a área de pico do ergosterol, em cada dia, foi convertida em massa micelial a partir da curva G.

V RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Quantificação do ergosterol e validação do método

O método apresentou boa repetibilidade, com coeficiente de variação $CV \leq 8,7\%$ para todas as análises realizadas, e boa linearidade na faixa de trabalho (0,01 a 200 $\mu\text{g/mL}$), com $R^2 > 0,999$ ($p < 10^{-10}$) (Figura 7). A análise estatística dos parâmetros da equação indicou que o intercepto é estatisticamente igual a zero, de onde se infere que a ausência de analito fornece absorvância igual a zero. A partir dos dados da curva analítica, o método apresentou boa sensibilidade, com limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) estimados entre 0,01 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, pelo método da relação sinal-ruído (S/N) (ICH, 2005).

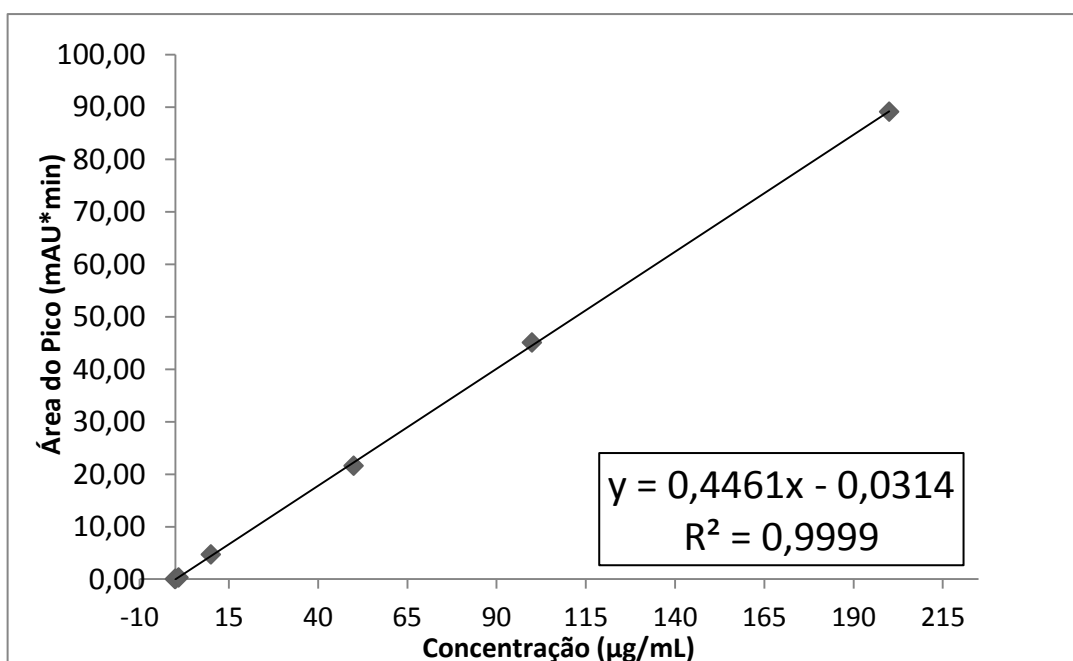


Figura 7 — Curva analítica do ergosterol. Áreas de cada ponto foram determinadas em triplicata. Análises realizadas na coluna Kinetex Core-Shell.

A coluna analítica LiChroCART foi substituída pela coluna Kinetex Core-Shell, o que reduziu o tempo de retenção médio do analito de 10,6 minutos para 2,8 minutos, com tempo total de corrida reduzido de 15 para 5 minutos (Figura 8, A). Isso representou um ganho substancial em tempo de análise e economia de solventes.

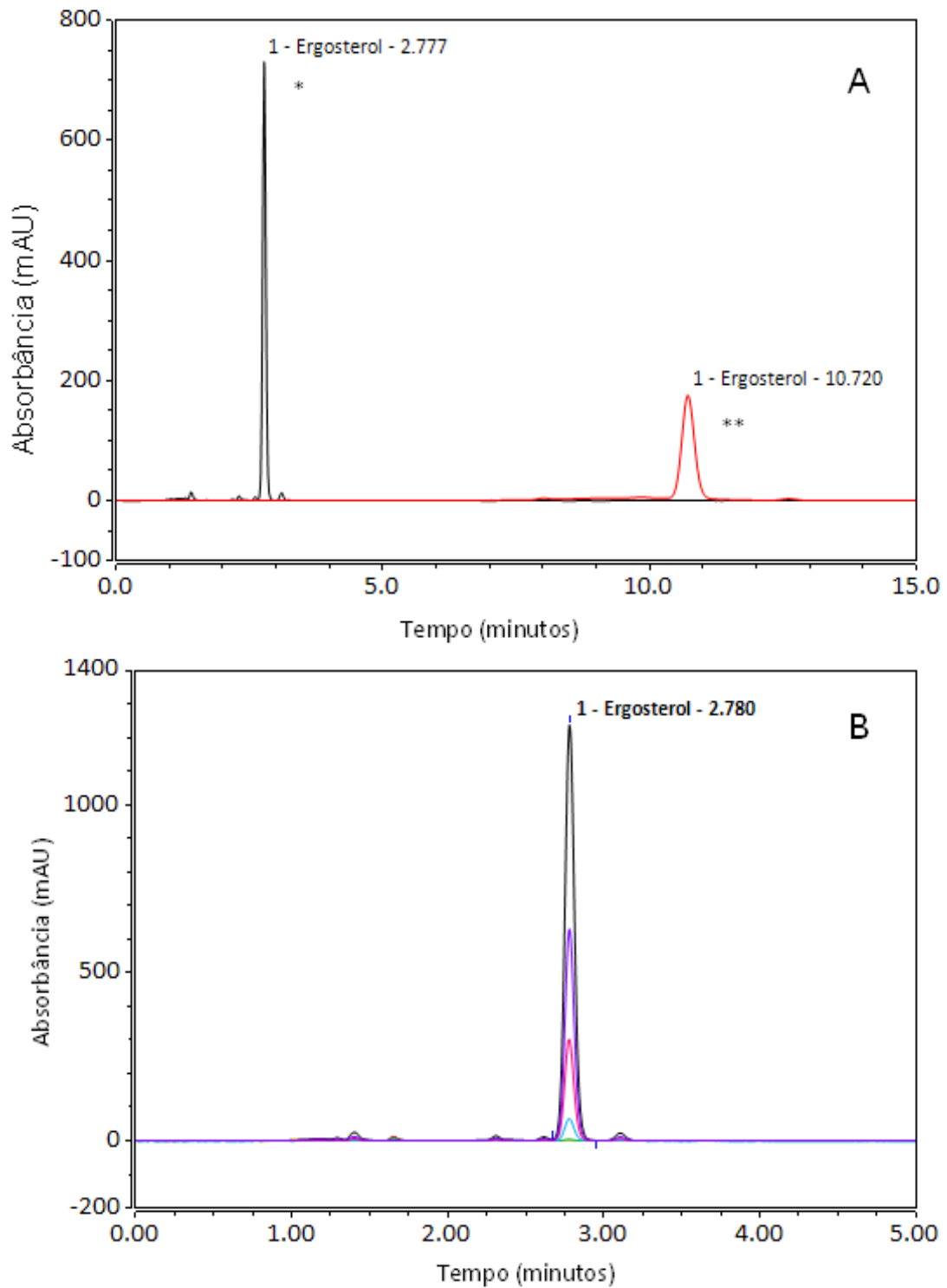


Figura 8 — A) Cromatogramas referentes ao padrão analítico de ergosterol a 100 µg/mL, com eluição na coluna C18 Core-Shell Kinetex (*) ou na coluna C18 LiChroCART (**); B) Cromatogramas referentes à curva analítica (Figura 7). Cada ponto da curva é demonstrado em uma linha distinta.

O método cromatográfico apresentou seletividade na separação do ergosterol obtido pela extração assistida por micro-ondas (Figura 9), não sendo observada co-

eluição em nenhuma das amostras analisadas. A pureza do pico foi atestada pelo *Match Factor* (concordância na sobreposição do espectro UV das amostras e do padrão analítico) $\geq 99,5\%$ nas amostras G, e $\geq 99,4\%$ nas amostras M (Figura 9). Em nenhum extrato analisado observou-se a presença de interferentes ou substâncias detectáveis a 282 nm que atrapalhassem a detecção do ergosterol. O tempo de retenção médio do analito nas condições iniciais de separação foi de 10,65 minutos.

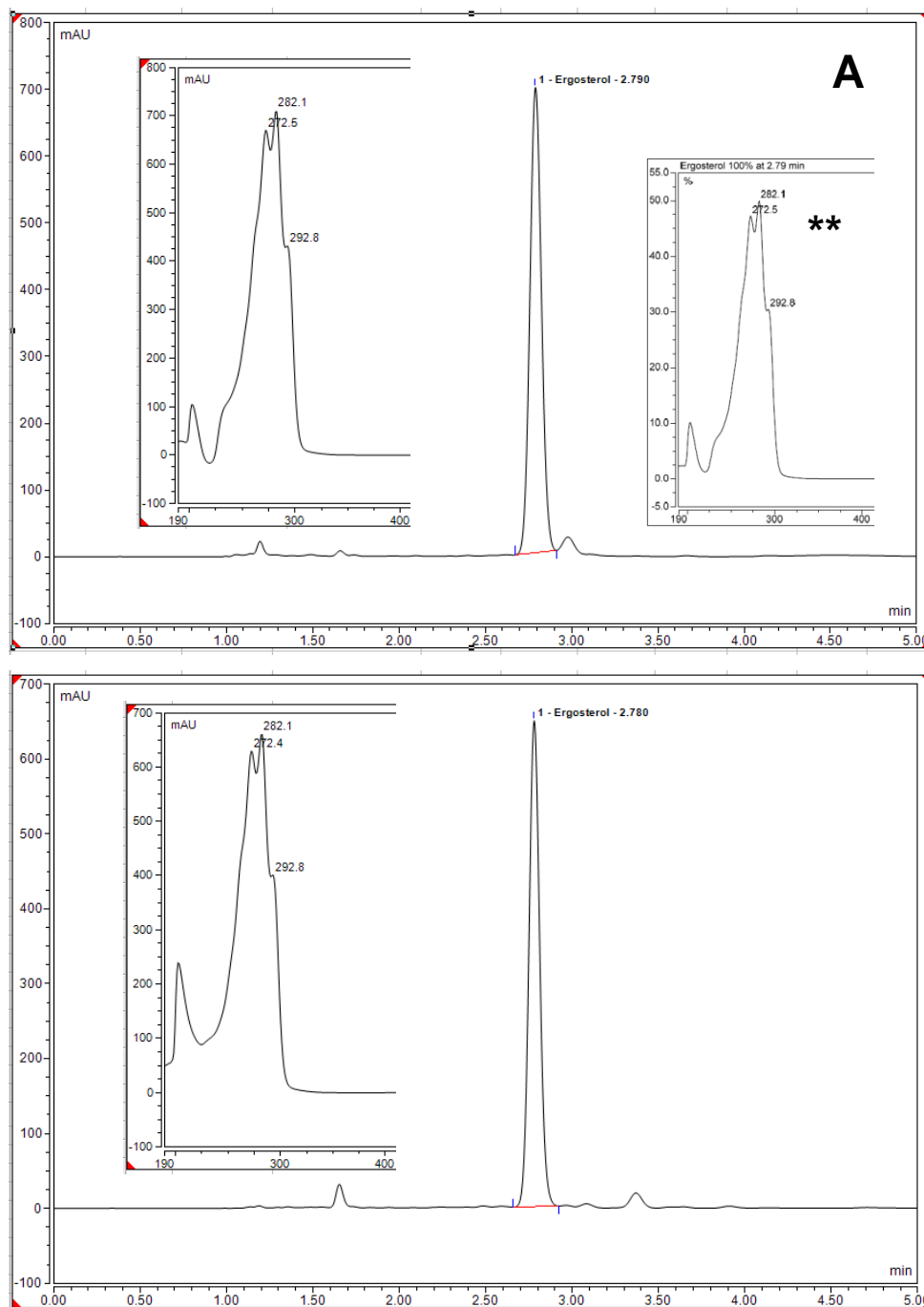


Figura 9 — Cromatogramas obtidos a partir da análise dos extratos de amostra G (A) e amostra M (B). Em cada cromatogramas estão representados os espectros obtidos para cada tipo de amostra. ** Espectro obtido da análise do padrão analítico de ergosterol.

De acordo com a normatização Q2(R1) da Conferência Internacional de Harmonização sobre validação de procedimentos analíticos (ICH, 2005), a substituição da coluna é um dos procedimentos de teste de robustez em cromatografia líquida, desde que a mudança deliberada não comprometa a confiabilidade dos resultados. Os resultados demonstram que o método é robusto, pois a mudança de coluna não provocou prejuízo na qualidade do sinal analítico, aumentando a eficiência cromatográfica medida em pratos teóricos e mantendo a repetibilidade instrumental.

Ensaio de adição de padrão foram executados para avaliar a exatidão do método. Esse tipo de ensaio é indicado quando é impossível preparar um branco da amostra, isto é, uma amostra sem a substância de interesse mas com o restante de sua composição idêntica à original (RIBANI *et al.*, 2004). Foi observado um intenso efeito de matriz, com recuperações do padrão adicionado na faixa de 19,5% a 63,2%. O forte efeito de matriz demandou uma nova estratégia para incluir em uma calibração o efeito das matrizes em amostras M e G. Dessa forma, optou-se por construir uma regressão correlacionando diretamente a massa de amostra à quantidade de ergosterol obtida dela.

Até o presente momento, os resultados e observações experimentais indicam a impossibilidade de se determinar a exatidão do método analítico por técnicas convencionais. Segundo Ribani e colaboradores (2004), a comparação de um método novo com métodos de referência pode ser utilizada para atestar a exatidão, desde que a incerteza do método de referência seja conhecida e que ambos tenham aplicação para a mesma amostra. Entretanto, não há na literatura relatos de métodos cromatográficos para determinação de ergosterol em amostras como as utilizadas neste trabalho. A inexistência de materiais certificados de referência também representa um obstáculo para esse requisito de validação. Mais estudos são necessários para superar este problema. Com isto, considera-se aqui que o presente método analítico está parcialmente validado.

2 Otimização da extração

2.1 Adaptação do protocolo inicial

Nas extrações de amostras M, foi observada a formação de uma espécie de goma quando da agitação do tubo após a adição do pentano. Uma explicação plausível para isto é que o tratamento alcalino somado ao aquecimento por micro-

ondas podem contribuir para a extração de pectina proveniente da casca de maracujá. Dados da literatura sustentam que em pH alcalino, enzimas da classe das pectato liases (PaL) podem promover a despolimerização da pectina pelo mecanismo de β -eliminação (ABBOTT; BORASTON, 2008). A degradação não enzimática da pectina pode ocorrer também pelo mesmo mecanismo, sendo aumentado em pH alcalino e temperaturas elevadas (DIAZ *et al.*, 2007). Supõe-se que o tratamento alcalino e o aquecimento da amostra durante a extração possa ter removido, em alguma extensão, a pectina presente na CMA.

De acordo com Srivastava e Malviya (2011), os métodos de extração de pectina utilizam basicamente duas etapas: aquecimento (por fervura em água ou por micro-ondas) e floculação pela adição de etanol ou isopropanol, exemplificado no trabalho de Seixas e colaboradores (2014). Sugere-se que no momento da adição do pentano, solvente fortemente apolar, seguida de agitação em vórtex, a fração solúvel de pectina tenha formado agregados insolúveis, o que justificaria a formação da goma.

Para superar este obstáculo, foi proposto acrescentar uma etapa de extração com ACN antes da extração com pentano. Esta alteração fez com que não mais se observasse a formação dos agregados e o extrato permaneceu fluido, possibilitando a remoção da fração com ACN para outro tubo, no qual seria feita a extração com pentano. Isso permitiu ainda evitar o contato com o resíduo sólido remanescente.

A partir do sucesso da adaptação do protocolo, seguiu-se com a otimização da extração com ACN, buscando maximizar a quantidade de ergosterol extraída em função do número de lavagens, conforme descrito no item 9.2. Os resultados desta otimização estão representados graficamente nas Figuras 11, 12 e 13.

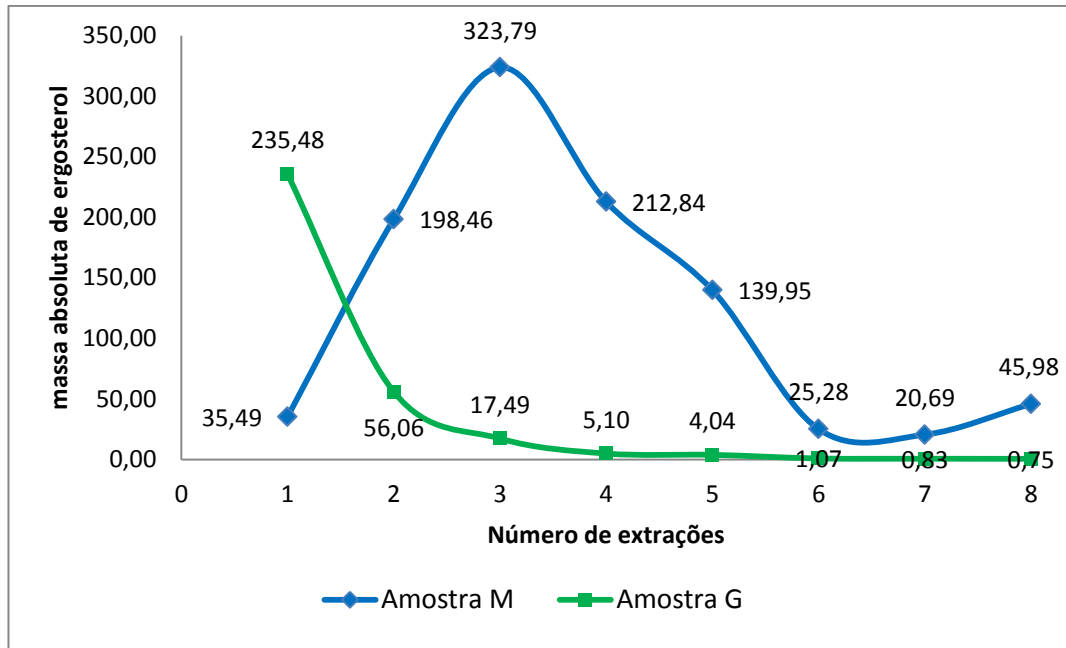


Figura 10 — Massa absoluta de ergosterol em cada extração. Rótulos dos pontos representam a massa de ergosterol (μg) para cada extração.

Esses resultados mostram que as amostras M parecem apresentar uma resistência à extração do ergosterol (“pico” observado na Figura 10) possivelmente relacionado à maior complexidade da amostra em comparação à amostra G (sem CMA), sendo necessário realizar mais etapas de extração quando comparado às amostras G, que com uma extração forneceu quantidade de analito similar a de duas extrações da amostra M (Figura 11).

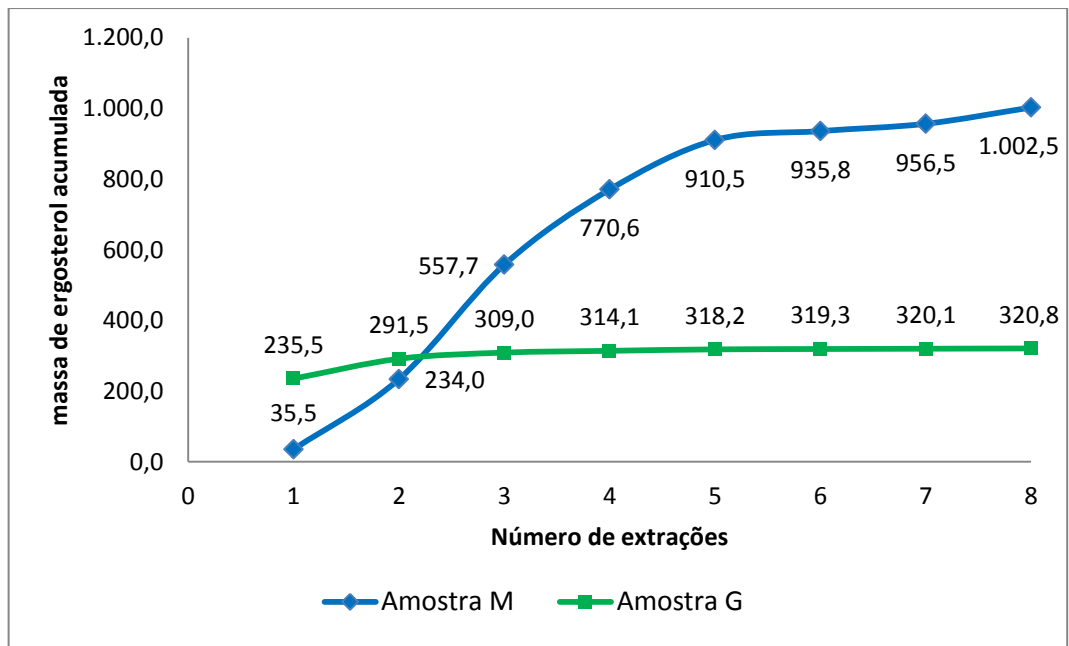


Figura 11 — Massa acumulada de ergosterol em cada extração. Rótulos dos pontos representam a massa de ergosterol (μg) para cada extração

Embora as amostras G tenham fornecido uma quantidade de ergosterol bastante inferior às amostras M, 97,91% do total de ergosterol das amostras G foi extraído até a 4^a extração, demonstrando que a amostra foi praticamente exaurida até esta etapa, conforme ilustra a Figura 12. Já as amostras M forneceram mais que o dobro da quantidade de ergosterol quando comparadas às amostras G até a 4^a extração, representando 76,87% do total extraído. Apesar de a 5^a extração ainda aumentar a quantidade de ergosterol (90,83%), o maior tempo necessário para a quinta extração (considerável quando se tem um número grande de amostras), aliado ao maior nível de interferentes analíticos, foram determinantes na escolha do protocolo com quatro lavagens.

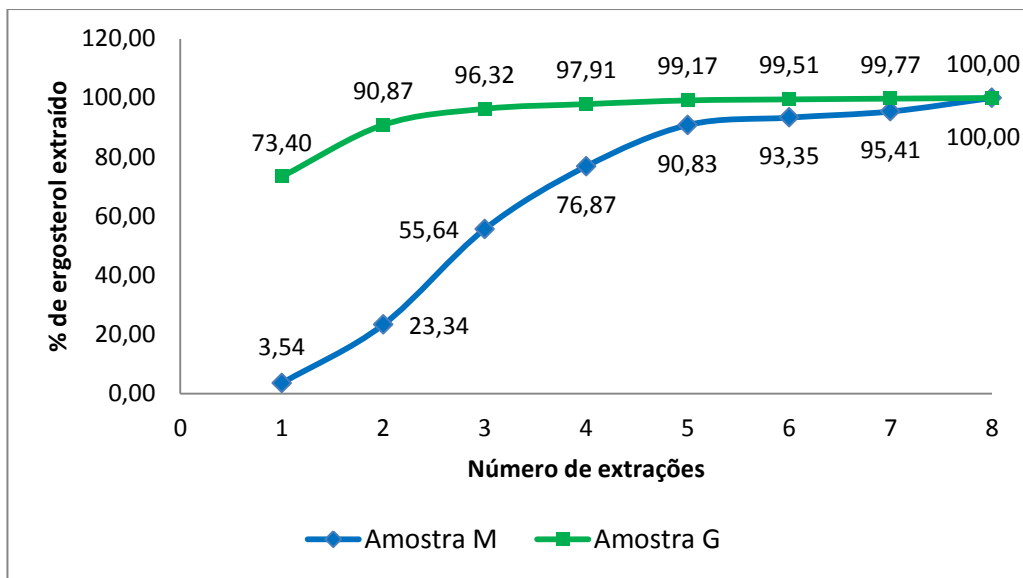


Figura 12 — Porcentagem acumulada de ergosterol extraído em função do número de extrações com ACN. Rótulos dos pontos representam a porcentagem acumulada de cada extração.

Dessa forma, ficou estabelecido que o protocolo adaptado compreende quatro extrações com ACN, previamente à extração com pentano.

2.2 Triagem dos fatores

Os resultados do experimento de triagem descrito na Tabela 4 estão mostrados na Tabela 9. O experimento de otimização do número de extrações com ACN foi desconsiderado nesta etapa, tendo em vista que quatro lavagens foram estabelecidas e fixadas como protocolo ótimo.

A média representa o valor médio de todos os ensaios realizados neste fatorial e, no caso, ela é significativa, o que implica que é estatisticamente diferente de zero. Em termos experimentais, isso significa que a extração fornece em média

uma quantidade de ergosterol diferente de zero, isto é, é possível obter o ergosterol por este protocolo.

Tabela 9 — Contrastes calculados para cada fator considerado na triagem.

Fatores	Contrastes	IC	
		Lim. Inf.	Lim. Sup.
Média	2,042*	1,400	2,684
Tempo de irradiação (1)	0,273	-1,012	1,557
Potência de irradiação (2)	-0,733	-2,017	0,552
Volume de pentano (3)	1,618*	0,333	2,903
Núm. de centrifugações (4)	-0,399	-1,684	0,885
Massa de amostra (5)	-0,928	-2,213	0,356

* Contrastes estatisticamente significativos ($p < 0,05$). A tabela resume apenas os contrastes principais, omitindo o número extensivo de interações possíveis. Lim. Inf.: limite inferior do IC; Lim. Sup.: limite superior do IC.

Pela análise dos intervalos de confiança, apenas o fator 3 (volume de pentano) foi significativo e, por isso, foi escolhido para integrar os próximos experimentos de otimização. Seu valor foi positivo, o que implica dizer que quanto maior o volume de pentano utilizado, maior a quantidade de ergosterol obtida na extração.

Aqui não se pode, ainda, determinar o nível +1 (5,0/5,0 mL) como ótimo em caráter definitivo, pois o planejamento fracionário implica a introdução de confundimento nos valores dos contrastes e das interações, o que dificulta a interpretação dos contrastes para fins de otimização, especialmente no caso de uma fração quarta, na qual o número reduzido de ensaios (8 dos 32 para um planejamento completo) limita a quantidade de contrastes que podem ser interpretados através de um modelo matemático fatorial (BARROS NETO *et al.*, 2010, p. 275).

Contudo, o contraste observado para o fator 1 (tempo de irradiação) foi positivo (maiores tempos fornecem mais ergosterol), o que não concordou com o que era esperado para este fator: submeter a amostra a maiores tempos provavelmente degradaria o analito, já que o extrato seria aquecido por mais tempo. Por esse motivo, este fator foi mantido para ser novamente avaliado no próximo planejamento fatorial.

O fator 2 (potência da irradiação) apresentou o contraste negativo, o que demonstra que potências maiores reduzem a quantidade de ergosterol obtida na

extração. Por não ser significativo, este fator não foi mais considerado nos experimentos seguintes, sendo fixado no valor utilizado no protocolo original: 460 W, 40% da potência nominal.

No procedimento inicial não havia uma etapa de centrifugação, que foi incluída neste estudo de triagem para avaliar se esta operação, realizada após a mistura do pentano, facilitaria a deposição de sólidos e posterior coleta da fração pentânica para secagem. O contraste do fator 4 (centrifugação) foi negativo e não significativo. Optamos por manter o protocolo inicial de extração sem esta centrifugação, pois o contraste negativo indica que o aumento do número de centrifugações reduz o ergosterol extraído, não havendo mais razão para incluí-la em experimentos posteriores.

Em relação ao fator 5 (massa de amostra), o contraste calculado foi negativo e não significativo, o que levaria a sua exclusão dos experimentos subsequentes. Entretanto, levando em consideração que o fator 3 foi significativo e seu contraste foi positivo, o contraste para a interação entre 3 e 5 (contraste 35, lê-se “contraste três cinco”) foi analisado. O contraste 35 foi igual a -0,399, do qual se pode inferir que o aumento simultâneo do volume de pentano e da massa de amostra, de -1 para +1, promoveria uma redução de 0,399 unidades na resposta considerada (μg ergosterol/mg amostra). Além disso, a diminuição da massa de amostra é metodologicamente interessante, já que aumenta o rendimento de cada cultivo. Com a redução da massa de amostra de 150 mg (protocolo inicial) para 50 mg (protocolo ótimo), a quantidade de amostra gerada por cultivo permitirá realizar três vezes mais extrações.

Apesar disso, a interação 35 está confundida com o contraste principal 4, que por sua vez foi estabelecido por meio do confundimento com a interação 123, a partir da relação geradora $4=123$ (conforme item 9.3.1). Devido ao confundimento, não é possível considerar o valor da interação 35 como o que de fato irá impactar numericamente a resposta. Essa conclusão nos levou a manter o fator massa de amostra no planejamento fatorial completo que foi realizado em seguida.

Dessa forma, os fatores selecionados neste estudo de triagem foram o tempo de irradiação (x1), o volume de pentano (x3) e a massa de amostra (x5).

2.3 Estimação dos efeitos e comparação do número de irradiações

O resultado dos planejamentos fatoriais descritos na Tabela 6 está explícito no gráfico mostrado na Figura 13. O cálculo dos efeitos associados a cada parâmetro está apresentado na Tabela 10. Observa-se que os fatores (x1, x3, x5 – tempo de irradiação, volume de pentano, quantidade de amostra), de forma independente, atuam de forma positiva em relação à resposta (massa de ergosterol/massa de amostra). Porém, quando analisados em conjunto, percebe-se que o aumento de uma variável pode ser prejudicial para outra.

Tabela 10 — Análise de efeitos principais e das interações entre os fatores x1 (tempo de irradiação), x3 (volume de pentano) e x5 (massa de amostra) em relação à resposta (μg de ergosterol/mg de amostra). Comparação entre uma e duas irradiações

Efeitos principais e de interação	1-IR			2-IR		
	Efeitos	IC		Efeitos	IC	
		Lim. Inf.	Lim. Sup.		Lim. Inf.	Lim. Sup.
Média	0,9329*	0,8871	0,9787	0,8614*	0,8156	0,9072
x1	0,1009*	0,0094	0,1925	0,0559	-0,0357	0,1475
x3	0,3698*	0,2782	0,4614	0,3718*	0,2802	0,4634
x5	0,0339	-0,0577	0,1255	0,0926*	0,0010	0,1842
x13	0,0231	-0,0685	0,1147	0,0974*	0,0058	0,1890
x15	-0,0931*	-0,1847	-0,0015	0,0550	-0,0366	0,1466
x35	0,0800	-0,0116	0,1715	0,0209	-0,0707	0,1125
x135	-0,1097*	-0,2013	-0,0181	0,0442	-0,0474	0,1358

* Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$). IR= Irradiação; Lim. Inf.: limite inferior do IC; Lim. Sup.: limite superior do IC.

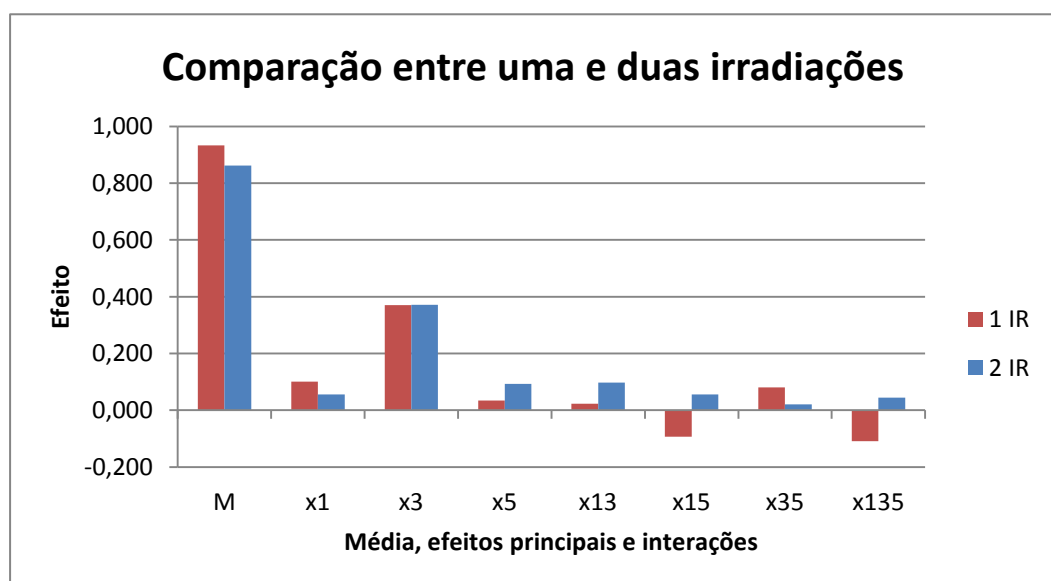


Figura 13 — Comparação das médias, efeitos principais e efeitos de interação dos fatoriais 1-IR e 2-IR

Pela análise da Tabela 11 e da Figura 14-B, nota-se que o ensaio que forneceu a maior resposta foi o de número 4, seguido pelo ensaio 7. Entre eles, a diferença no delineamento é a inversão dos níveis do tempo de irradiação e da massa de amostra, para um mesmo volume de pentano utilizado.

Tabela 11 — Discriminação de níveis dos ensaios do fatorial 1-IR e as respostas obtidas por ensaio.

Ensaio	Variáveis reais			Rendimento ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*
	Tempo de irradiação (s)	Vol. de pentano (mL)	Massa de amostra (mg)	
1	25	5	50	0,74 \pm 0,05
2	45	5	50	0,80 \pm 0,06
3	25	10/5	50	0,90 \pm 0,06
4	45	10/5	50	1,22 \pm 0,09
5	25	5	150	0,68 \pm 0,05
6	45	5	150	0,77 \pm 0,05
7	25	10/5	150	1,21 \pm 0,09
8	45	10/5	150	1,14 \pm 0,08

Valores separados por barra indicam que a etapa foi executada duas vezes (valor da primeira execução/valor da segunda execução). * Valores representados por resposta \pm desvio-padrão.

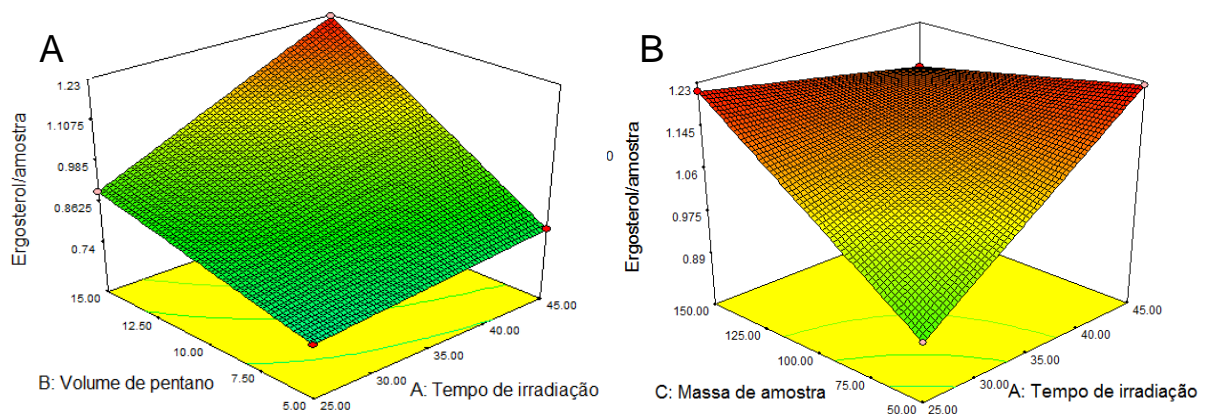


Figura 14 — Superfícies de resposta do modelo fatorial de 1-IR. A) Superfície que descreve as respostas para a massa fixa em 50 mg. O ápice, na região vermelha da superfície, representa o ponto ótimo previsto pelo modelo. B) Superfície que descreve as respostas para volume de pentano fixo em 10/5 mL.

No sistema experimental deste trabalho, observa-se que a realização de duas irradiações, como preconizado no protocolo original de Montgomery e colaboradores (2000) não é mais eficiente, em termos de extração de ergosterol, do que a realização de uma só irradiação; o protocolo proposto por Young (1995), que preconiza apenas uma irradiação, representa um protocolo mais adequado ao presente contexto experimental. Além disso, como se observa que o valor zero está

compreendido no IC para duas irradiações (2-IR), significa que fazer duas irradiações, independente da duração, não influencia o rendimento significativamente (TEÓFILO; FERREIRA, 2006), logo esse fator é inerte.

Comprova-se ainda a ausência de acréscimo de efeito da segunda irradiação quando comparamos os dados do fator x1 (tempo de irradiação) dentro dos dois fatoriais (Figura 15). Como existe sobreposição dos intervalos de confiança (IC - cálculos não demonstrados), conclui-se que não existe diferença estatística entre fazer uma e duas irradiações.

Por isso, a escolha do tempo de irradiação no protocolo com duas irradiações ficaria a critério do experimentador. Deve-se, porém, considerar que o efeito calculado para duas irradiações, mesmo não sendo significativamente diferente, é menor que para uma irradiação. Dessa forma, convém não realizar a segunda irradiação, pois isso representaria, na prática, uma tendência à perda de analito.

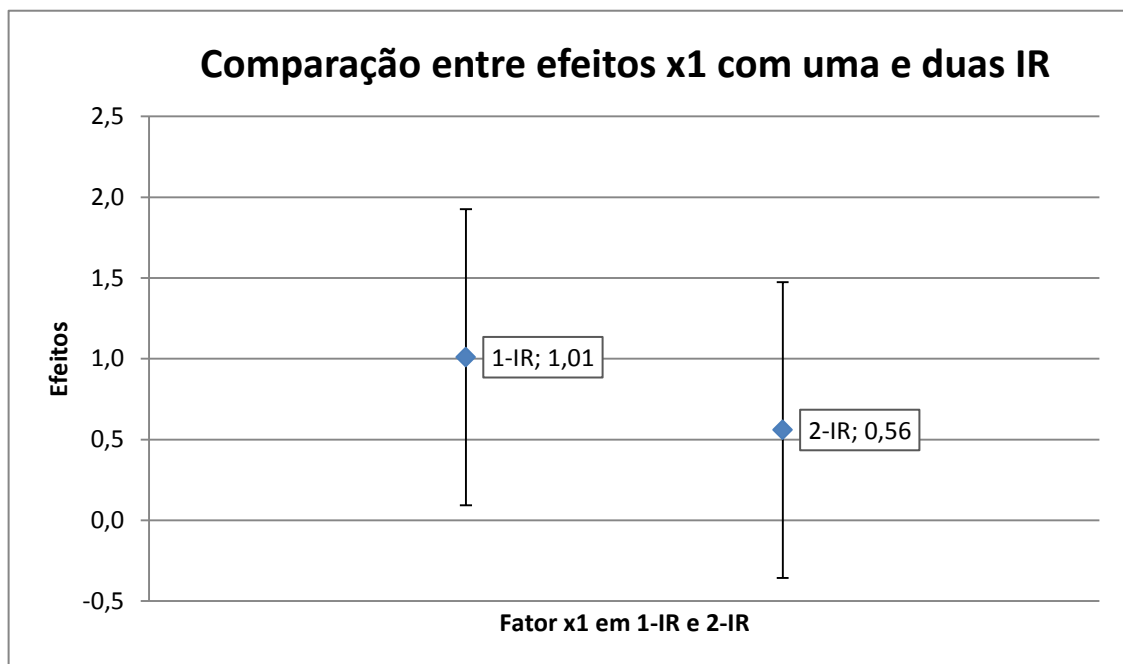


Figura 15 — Comparação dos efeitos do fator x1 entre uma e duas irradiações. As barras representam o IC 95%.

O estudo desta comparação demonstrou ser muito relevante, pois, na hipótese de esta etapa ter considerado apenas o fatorial com duas irradiações, os resultados levariam à conclusão de que qualquer tempo de irradiação (duas irradiações de 25, 35 ou 45 segundos) poderia ser escolhido como ótimo, uma vez que este fator não foi significativo, sem que, todavia, houvesse evidência de que uma irradiação é capaz de extrair mais ergosterol que duas irradiações. Com base

nestas interpretações, percebe-se que a segunda irradiação é dispensável, e, por consequência, optou-se por retirá-la do protocolo otimizado.

Considerando que o fator x1 no fatorial com apenas uma irradiação foi significativo e positivo, ficou estabelecido que o tempo de irradiação será o designado pelo nível +1, isto é, 45 s.

Para o fator x3 (volume de pentano), o efeito foi significativo e positivo, o que nos levou a escolher o nível +1 para o protocolo, isto é, uma lavagem de 10 mL seguida de outra lavagem de 5 mL. Para minimizar o erro experimental, o volume de pentano coletado foi fixado em 7 mL na primeira extração e 3 mL na segunda.

Já para o fator x5 (massa de amostra) o efeito não foi significativo e positivo. Por não ser significativo, qualquer massa poderia ter sido escolhida para compor o protocolo ótimo de extração, embora o valor positivo indique que se deva escolher o nível +1 (150 mg). Entretanto, as interações 15 e 135 são negativas e significativas (Tabela 10), o que significa dizer que o aumento da massa tem um papel importante na redução da resposta quando associada ao aumento simultâneo do tempo de irradiação (interação 15) e também quando associada ao aumento simultâneo dos três fatores juntos (interação 135). É importante ressaltar também que mesmo que o efeito principal de x5 (massa de amostra) seja positivo, os efeitos de interação 15 e 135 (-0,0931 e -0,1097, respectivamente) são, em módulo, maiores que o efeito principal 5 (0,0339), significando que o incremento na resposta quando se usa a massa de amostra em +1 (150 mg) não supera o decréscimo quando se utiliza em paralelo o tempo de irradiação em +1 ou todos os fatores em +1. Uma vez que o tempo de irradiação ótimo já foi determinado como o do nível +1 e somando-se a isso a praticidade de uso de amostras menores, convém que o nível para o fator massa de amostra seja estabelecido como ótimo em -1 (50 mg).

Por esse experimento, definiu-se que o número de irradiações no micro-ondas necessário era de um, o melhor tempo de irradiação foi de 45 segundos, o volume de pentano ótimo para a extração foi de 15 mL (10 + 5 mL), e a massa de amostra a ser utilizada por ensaio foi de 50 mg. A Tabela 12 sumariza os níveis adotados no protocolo original e no otimizado.

Tabela 12 — Comparação entre os níveis no protocolo original e no otimizado pelo modelo fatorial.

Fatores	Protocolo			
	Real	Codificado	otimizado	
Tempo de irradiação (s)		x1	20/10 ¹	45
Volume de pentano (mL)		x3	5	10,0/5,0 ¹
Massa de amostra (mg)		x5	150	50
Quantidade de ergosterol extraído (µg/mg amostra)		y	1,17±0,08*	1,22±0,09*

¹ Valores separados por barra indicam que a etapa foi executada duas vezes (valor da primeira execução/valor da segunda execução). * Valores representados por resposta ± desvio-padrão.

Um modelo fatorial com todas as interações foi ajustado aos dados do fatorial 1-IR. O modelo (Equação 9) foi submetido a ANOVA (

Tabela 13) e foram geradas superfícies de resposta para este planejamento fatorial.

O modelo apresentado na Equação 9 é estatisticamente significativo, sendo que alguns de seus termos não são significativos. O coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9848 e o r^2 ajustado foi de 0,9581. Na modelagem contendo todos os fatores, com efeitos principais e interações até terceira ordem, não sobram graus de liberdade para avaliação do ajuste do modelo. Entretanto, a FV designada por “Curvatura” representa a adequação do modelo aos pontos centrais, isto é, o quão bem o modelo prevê a resposta quando os fatores estão no nível zero. Uma curvatura significativa implica que o modelo não descreve bem a região central, pois o modelo é linear e a análise identificou resíduos grandes nesta região. Mesmo que a ANOVA não tenha calculado a falta de ajuste, a curvatura significativa demonstra que o modelo não descreve bem todo o domínio experimental. Um modelo com termos quadráticos ou cúbicos deve ser testado.

$$Y_{est} = 1,035 - 9,887 \times 10^{-3}A - 0,064B - 5,680 \times 10^{-3}C + 2,425 \times 10^{-3}AB + 1,263 \times 10^{-4}AC + 9,278 \times 10^{-4}BC - 2,194 \times 10^{-5}ABC$$

Equação 9 — Modelo fatorial para os dados do planejamento 1-IR.

A partir do modelo, o *software* previu como ponto ótimo (Figura 14) a resposta obtida pela mesma combinação de níveis determinada a partir da interpretação dos efeitos (Tabela 12), mas novas previsões devem ser feitas por um modelo melhor ajustado aos dados.

Tabela 13 — Análise de variância para o modelo fatorial de 1-IR (Equação 9).

FV	SQ	<i>g.l.</i>	MQ	Valor de F	<i>p</i> -valor
Modelo	0,35147	7	0,05021	36,90581	0,0018*
A-Tempo de irradiação	0,02038	1	0,02038	14,98080	0,0180*
B-Volume de pentano	0,27353	1	0,27353	201,05227	0,0001*
C-Massa de amostra	0,00230	1	0,00230	1,69320	0,2631
AB	0,00106	1	0,00106	0,78232	0,4264
AC	0,01734	1	0,01734	12,74559	0,0234*
BC	0,01278	1	0,01278	9,39697	0,0375*
ABC	0,02407	1	0,02407	17,68953	0,0136*
Curvatura	0,51904	1	0,51904	381,50294	< 0,0001*
Erro puro	0,00544	4	0,00136		
Total	0,87595	12			

* Fontes de variação estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

2.4 Modelagem matemática da extração por RSM

Utilizando o mesmo *software*, os dados do fatorial 1-IR foram modelados de acordo com um planejamento composto central (CCD) pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), visando melhorar o ajuste do modelo no interior do planejamento. A modelagem foi feita utilizando os dados do fatorial 1-IR, acrescidos de seis ensaios adicionais, dos quais o primeiro é uma repetição do ensaio de 1-IR que forneceu a maior resposta (ver Tabela 11), para tentar melhorar o ajuste do modelo (Tabela 8).

O ajuste dos dados de 1-IR por CCD indicou que um modelo quadrático com interações de segunda ordem era significativo ($R^2 = 0,9663$; $p = 0,0021$), mas apresentava falta de ajuste ($p = 0,0136$) (Figura 16). Dessa forma, as respostas para os 6 ensaios adicionais da Tabela 8 foram incluídas na modelagem.

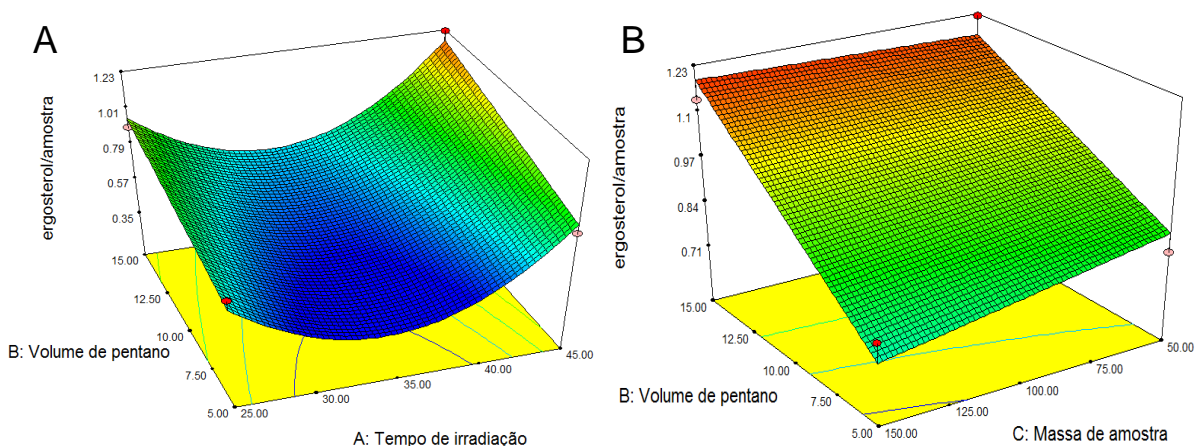


Figura 16 — Superfícies de respostas construídas por RSM a partir dos dados de 1-IR sem ensaios adicionais. A) Superfície para massa fixa em 50 mg. B) Superfície para tempo de irradiação fixo em 45 segundos.

Já para ajustar um modelo aos dados de 1-IR com as respostas dos ensaios adicionais, foi necessário um modelo com interações de segunda ordem e completamente quadrático em A (tempo de irradiação), excluindo-se alguns termos não significativos para que o modelo fosse significativo e não houvesse falta de ajuste (chamado modelo modificado). A Tabela 14 sumariza a ANOVA para este modelo, cuja equação está representada na Equação 10. As superfícies de resposta para este modelo estão representadas na Figura 17.

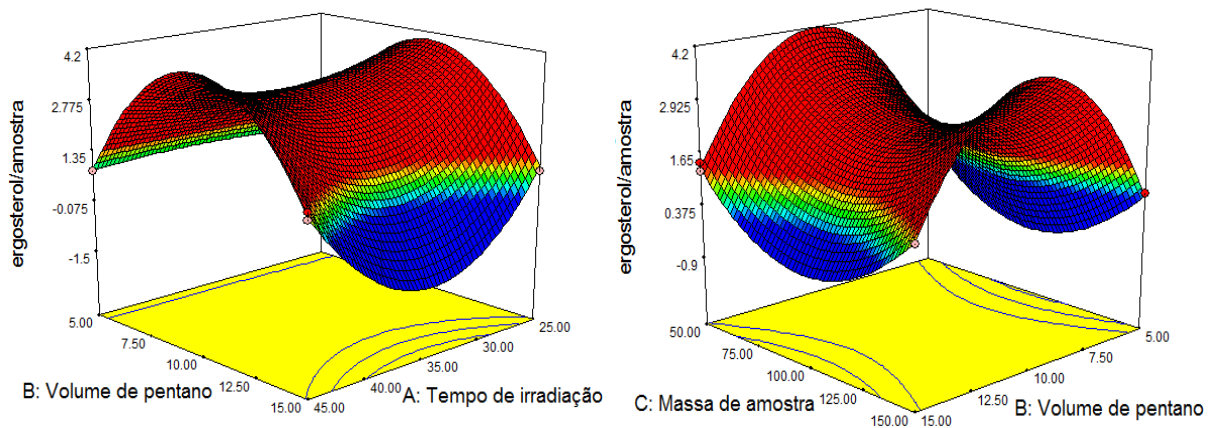


Figura 17 — Superfícies de resposta construídas por RSM a partir dos dados de 1-IR com os ensaios adicionais. A) Superfície para massa fixa em 50 mg. B) Superfície para tempo de irradiação fixo em 45 segundos.

O modelo obtido por RSM com os dados adicionais foi significativo e não apresentou falta de ajuste, conforme descreve a Tabela 14. Alguns termos da equação, nesta ANOVA, não foram considerados significativos, o que permite que sejam retirados do modelo para simplificá-lo. Entretanto, Barros Neto e colaboradores (2010, p. 234) afirmam que nesse caso, é costume manter os termos não significativos para manter a hierarquia matemática do modelo.

Tabela 14 — ANOVA para o modelo modificado dos dados de 1-IR e dos ensaios adicionais.

FV	SQ	<i>g. l.</i>	MQ	Valor de F	<i>p</i> -valor
Modelo	1,300	10	0,130	10,117	0,0016*
A-Tempo de irradiação	0,026	1	0,026	2,054	0,1897
B-Volume de pentano	0,187	1	0,187	14,541	0,0051*
C-Massa de amostra	0,120	1	0,120	9,360	0,0156*
AB	0,006	1	0,006	0,428	0,5313
AC	0,026	1	0,026	2,034	0,1917
A ²	0,301	1	0,301	23,447	0,0013*
B ²	0,364	1	0,364	28,304	0,0007*
C ²	0,228	1	0,228	17,739	0,0029*
A ² B	0,248	1	0,248	19,307	0,0023*
A ² C	0,114	1	0,114	8,910	0,0175*
Resíduos	0,103	8	0,013		
Falta de ajuste	0,076	3	0,025	4,6392	0,0659
Erro puro	0,027	5	0,005		
Total	1,403	18			

* Fontes de variação estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Utilizando este modelo para prever a combinação de níveis que gera a maior resposta, foram obtidos os seguintes valores: 44,3 segundos de irradiação, 10,55 mL de pentano, que seriam divididos em duas extrações, e 73,37 mg de amostra, com a predição de resposta no valor de 2,72 µg de ergosterol por mg de amostra. Embora esse modelo discorde dos valores ótimos determinados pelo fatorial 1-IR, por questões práticas optou-se por manter 45 segundos de irradiação; 10/5 mL de pentano, pela impraticidade de se medir frações pequenas deste solvente extremamente volátil e devido ao efeito positivo observado em 1-IR para este fator; e 50 mg de amostra devido a possibilidade de se trabalhar com amostras menores e conseqüentemente poder realizar mais extrações.

$$\begin{aligned}
 Y_{est} = & -29.65 + 1.59A + 5.69B + 0.02C - 0.20AB \\
 & - 9.45 \times 10^{-3}AC - 0.02A^2 - 0.13B^2 + 6.69 \times 10^{-4}C^2 \\
 & + 2.82 \times 10^{-3}A^2B + 1.33 \times 10^{-4}A^2C
 \end{aligned}$$

Equação 10 — Modelo para previsão de ponto ótimo de extração com modelagem modificada.

3 Correlação entre quantidade de ergosterol e biomassa fúngica

As regressões construídas conforme descrito no item 10 estão representadas na Figura 18.

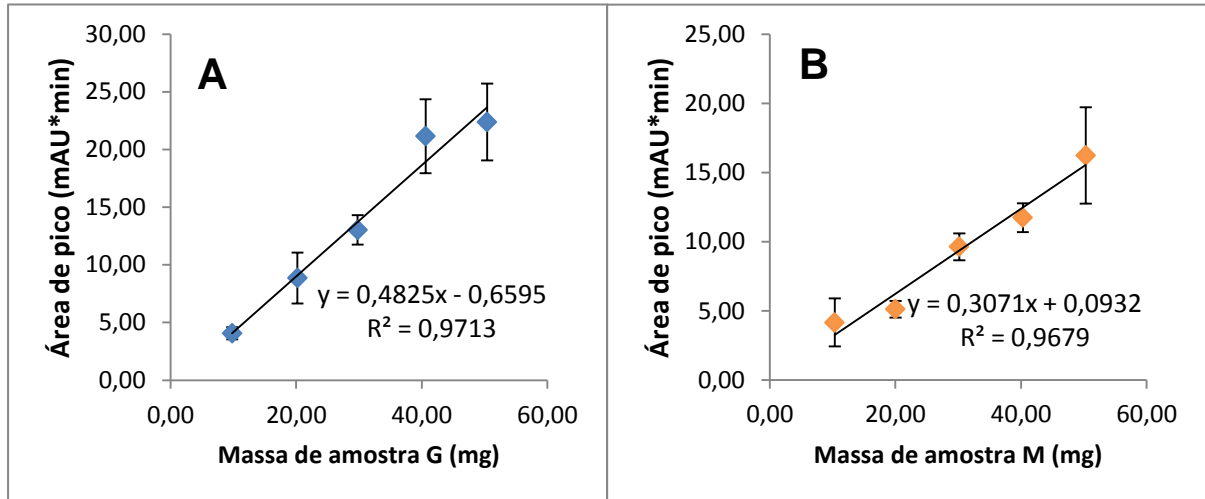


Figura 18 — Curvas de regressão entre massa de amostra G (Em A: curva G) e massa de amostra M (Em B: curva M) e a área de pico cromatográfico do ergosterol. Barras de erro representam o desvio-padrão.

Ambas as regressões lineares foram estatisticamente significativas ($p = 0,0021$ e $p < 0,003$, respectivamente) e a análise de significância dos parâmetros indicou o intercepto de ambas como estatisticamente igual a zero, por construção de IC 95%.

A terceira regressão, determinada pela comparação das duas exibidas na Figura 18, está mostrada na Figura 19.

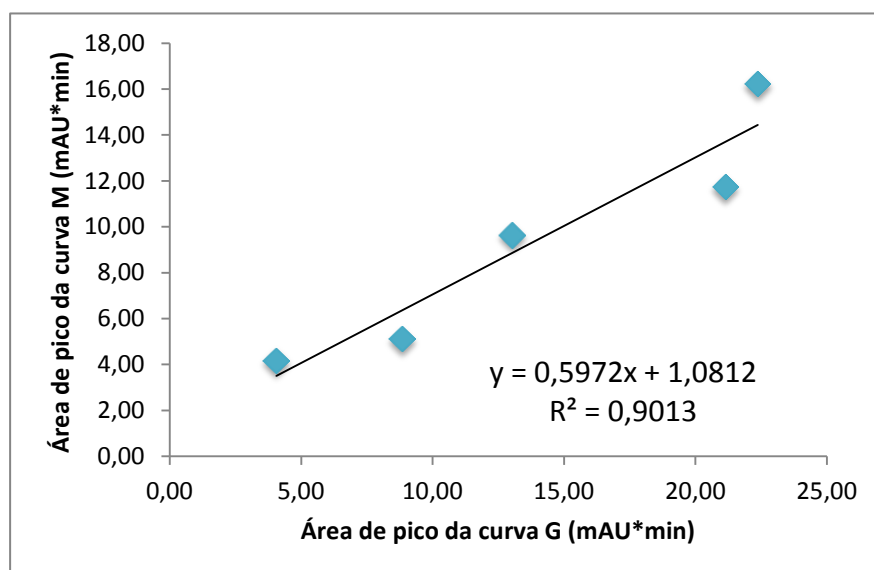


Figura 19 — Regressão de correspondência entre ergosterol proveniente das amostras G (eixo X) e das amostras M (eixo Y)

A regressão 'A' da Figura 18 mostram que há uma forte correlação entre a massa de amostra M e a quantidade de ergosterol obtida pela sua extração. O mesmo se observa em relação à regressão 'B' da mesma figura, que mostra a correlação entre massa de amostra G (biomassa fúngica pura) e o ergosterol, o que concorda com diversos relatos da literatura que afirmam existir correlação entre biomassa fúngica e quantidade de ergosterol (MUNIROH *et al.*, 2014; NG *et al.*, 2008; SEITZ *et al.*, 1977; SEITZ *et al.*, 1979; STAHL; PARKIN, 1996; TOTHILL *et al.*, 1992). Este resultado comprova que o ergosterol é um marcador eficiente da biomassa fúngica também no sistema experimental deste trabalho, fato que evidencia a possibilidade de se utilizar o ergosterol como medida do crescimento de fungos filamentosos cultivados com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, representando uma alternativa eficaz ao método de determinação do peso seco do fungo. Pode-se destacar essa nova ferramenta como uma potencial forma de controle em bioprocessos que visem à produção de enzimas, especialmente aqueles que utilizam resíduos agroindustriais lignocelulósicos sob a perspectiva de sustentabilidade e de reaproveitamento de resíduos. Estudos posteriores devem ser conduzidos para verificar a adequabilidade do medição do ergosterol como ferramenta de controle de processos biológicos.

A regressão representada na Figura 19 foi significativa ($p < 0,014$) e seu intercepto estatisticamente igual a zero. Este resultado significa que a regressão da Figura 19 de fato concretiza a equivalência das duas outras representadas na Figura 18, mostrando ainda que, em média, a quantidade de ergosterol encontrado nas amostras M é 40,3% menor que nas amostras G. Isso suporta os resultados do forte efeito de matriz observado nos ensaios de adição de padrão.

Com esta regressão de equivalência, será possível estimar a porção de biomassa fúngica presente nas amostras M, considerando que outra porção é composta por resíduo de casca de maracujá não consumido por *A. tamarii*.

Por meio da comparação dos coeficientes angulares (inclinação) das regressões entre massa de amostra G x Ergosterol (Figura 18-A), e massa de amostra M x Ergosterol (Figura 18-B), nota-se mais uma vez evidências de efeito de matriz. A Figura 20 mostra que a inclinação da curva por massa de amostra M é menor que a inclinação tanto da curva analítica quando da curva por massa de amostra G, o que indica que a presença de algum componente da amostra M,

provavelmente resíduos de CMA não consumidos, reduz as quantidades de ergosterol obtidas na extração.

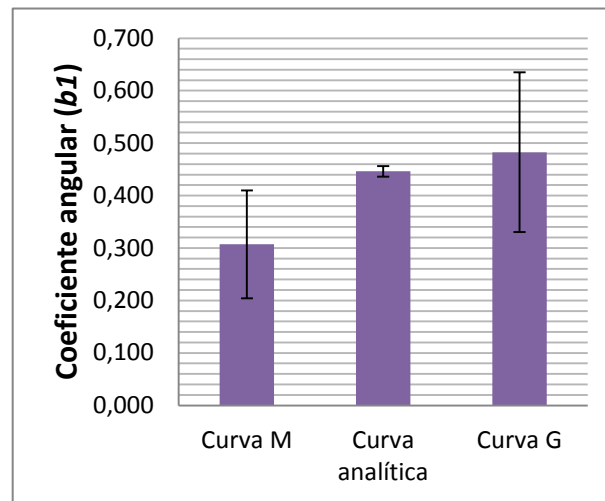


Figura 20 — Comparação entre os coeficientes angulares das curvas por massa de amostra M (ponto 1), curva analítica (ponto 2) e curva por massa de amostra G (ponto 3).

4 Curvas de crescimento

O frasco representativo do dia zero na curva com G como fonte de carbono não gerou amostra sólida para quantificação do ergosterol, sua representação foi omitida nos resultados. Não foi detectado ergosterol no dia zero de crescimento para a curva com CMA como fonte de carbono.

Os cultivos foram analisados em intervalos de 5 dias, entre zero e 30 dias, em função da concentração de ergosterol, do seu conteúdo em proteína e também em razão da atividade pectinolítica. O resultado da curva de crescimento com CMA como fonte de carbono é apresentado na Figura 21. As três curvas apresentaram perfil semelhante para o fungo crescido em CMA, tendência que não foi observada para os cultivos contendo glicose como FC (Figura 22). Este resultado corrobora o estudo de Jaramillo (2014) sobre a curva de crescimento enzimático, e indica que há algum fator limitante ao crescimento fúngico (e conseqüente produção de enzimas) no meio de cultivo. Tal afirmação é possível pela comparação das curvas de ergosterol (em azul) nas figuras 22 e 23. Quando cultivado com CMA como fonte de carbono, o fungo atingiu a fase estacionária no décimo dia. Já na presença de glicose como fonte de carbono, durante todo o período estudado não foi observado estagnação no crescimento, o que sugere não haver qualquer impeditivo para o crescimento do fungo durante 30 dias.

Pode-se apontar como causa para a estagnação do crescimento a partir do décimo dia (Figura 21) a estabilização da taxa de crescimento e morte celular. Os

resultados evidenciam que o crescimento celular estagnou, uma vez que a quantidade de ergosterol ficou constante, e já ficou demonstrada forte correlação entre biomassa e ergosterol (Figura 18). Além disso, parece pouco provável que a fonte de carbono tenha sido exaurida em nutrientes, uma vez que a produção de pectinases permanece relativamente constante no período, sugerindo que ainda há substrato a ser degradado. Ainda, é possível que outras enzimas lignocelulolíticas tenham sido produzidas, sendo que isso garantiria a nutrição do fungo pela degradação de outros polissacarídeos da casca de maracujá.

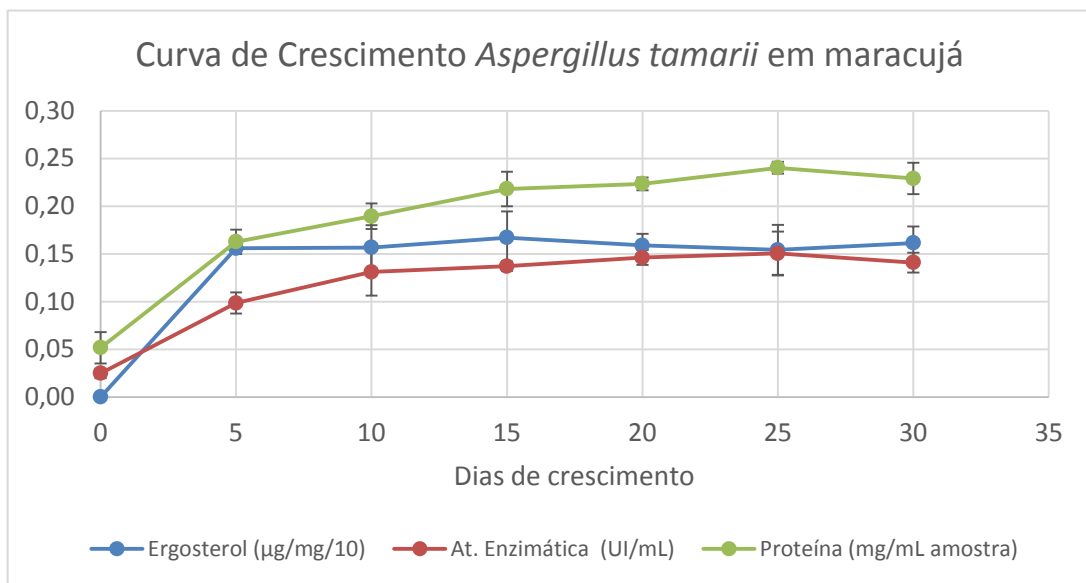


Figura 21 — Quantificação de ergosterol, proteínas totais e avaliação da atividade enzimática de pectinase em função do tempo, de *Aspergillus tamarii* crescido em meio com casca de maracujá. As barras de erros indicam o desvio padrão obtido das triplicatas.

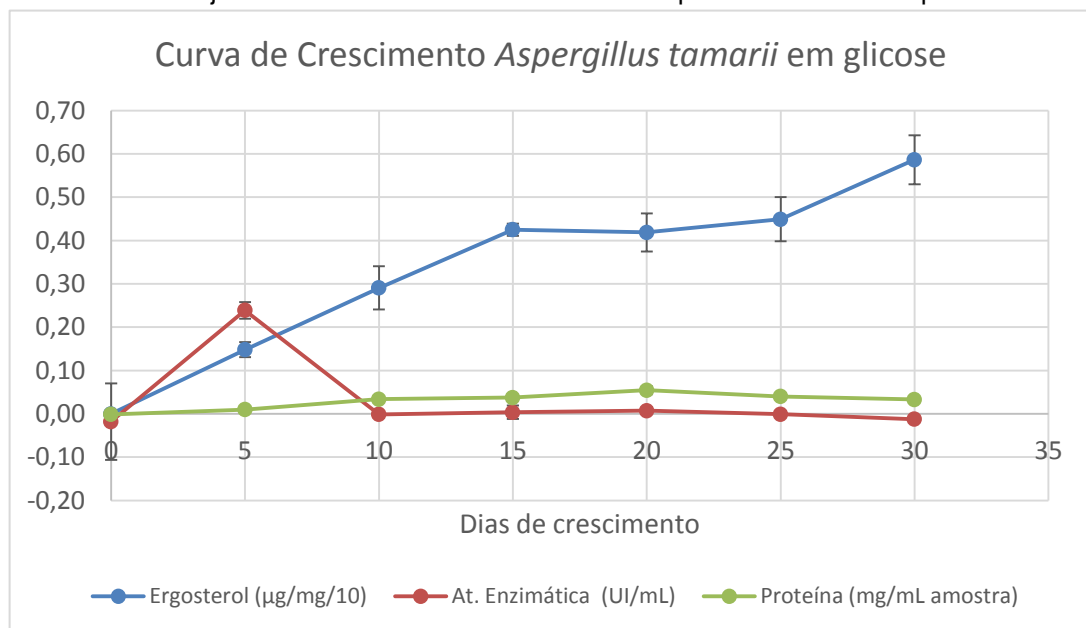


Figura 22 — Quantificação de ergosterol, proteínas totais e avaliação da atividade enzimática de pectinase em função do tempo, de *Aspergillus tamarii* crescido em meio com glicose como FC. As barras de erros indicam o desvio padrão obtido das triplicatas.

Como se observa na Figura 22, a quantidade de ergosterol aumenta durante todos os 30 dias de cultivo em glicose, enquanto que a quantidade de ergosterol é estabilizada no décimo dia para o fungo crescido com CMA. Da mesma forma, a produção de pectinases permanece estagnada também no décimo dia quando *A. tamaritii* foi cultivado com CMA (Figura 22). O fato de a quantidade de ergosterol estabilizar a partir do décimo dia sugere que o crescimento do fungo foi estabilizado, conclusão formulada a partir da comprovada correlação entre quantidade de ergosterol e biomassa fúngica, demonstrada na (Figura 18-A).

O fungo, quando cresce em glicose, não secreta pectinase, conforme sustentam Znameroski e colaboradores (2012) e Amore e colaboradores (2013) ao afirmar que enzimas lignocelulolíticas são produzidas apenas sob condições nas quais o fungo necessita do polissacarídeo como nutriente ou fonte de carbono, embora existam relatos na literatura de pectinases expressas constitutivamente por fungos do gênero *Aspergillus* (AGUILAR; HUITRON, 1990; MARTÍNEZ-TRUJILLO *et al.*, 2009). No quinto dia de crescimento, há produção de pectinase, que diminui novamente no décimo dia e permanece baixa até o fim dos 30 dias. É possível que tenha havido um período de produção constante de pectinases no período entre zero a dez dias, que só poderia ser detectado se a atividade fosse determinada em intervalos menores de tempo. Para fins de confirmação, este experimento deve ser repetido e reavaliado para confirmar a produção de pectinases no quinto dia.

Contudo, o aumento da quantidade de ergosterol no tempo quando o fungo cresceu em meio com glicose não concorda com a correlação estabelecida entre biomassa fúngica e o ergosterol. Uma vez que a curva de crescimento foi construída extraíndo massas iguais de amostra G em todos os dias, e a correlação estabelece que um valor de massa de amostra corresponde a um único valor de ergosterol (compreendido em um intervalo de valores possíveis definidos pelo desvio-padrão), o incremento na quantidade de ergosterol com o tempo sugere que: i) ou a regressão é falha em associar a biomassa fúngica e ergosterol; ii) ou a quantidade de fungo dentro de uma mesma alíquota de amostra G (50 mg) é variável, como se, com o passar do tempo de crescimento, os mesmos 50 mg concentrassem uma quantidade crescente de biomassa fúngica. Estudos posteriores devem ser realizados para elucidar esta questão. Por este motivo, assume-se deste ponto em diante que a biomassa fúngica calculada a partir das curvas de crescimento com

glicose e CMA como fonte de carbono são consideradas apenas estimativas a serem futuramente confirmadas.

4.1 Estimação da biomassa fúngica pelo ergosterol

Utilizando as curvas G e Eq, foi possível estimar a biomassa fúngica em cada ponto das curvas de crescimento, conforme descrito no item 11.1. A Tabela 15 apresenta as os valores convertidos pelas regressões.

Tabela 15 — Estimativas de biomassa fúngica nas curvas de crescimento com glicose e CMA como fonte de carbono.

Dias	Curva de crescimento em glicose		Curva de crescimento em CMA		
	Área ergosterol na curva (mAU*min) ¹	Biomassa equivalente em amostra G (mg) ²	Área ergosterol na curva (mAU*min) ¹	Área equivalente em amostra G (mAU*min) ²	Biomassa equivalente em G (mg) ²
0	—	—	0,000±0,00	—	—
5	19,51±2,20	41,47±4,39	20,59±0,87	30,81±3,19	64,21±3,76
10	38,31±6,55	79,30±3,57	20,70±3,11	30,98±3,13	64,55±3,75
15	55,83±1,82	114,58±3,42	21,91±3,63	32,80±3,81	68,22±3,68
20	54,98±5,51	112,86±3,41	20,89±1,48	31,27±3,08	65,13±3,74
25	58,95±6,89	120,85±3,47	20,30±3,53	30,38±3,41	63,36±3,78
30	77,23±7,13	157,65±4,13	21,26±2,28	31,82±3,17	66,25±3,72

¹ Valores observados na análise ± desvio-padrão da observação; ² Valores previstos ± erro padrão da previsão.

Ao comparar os valores estimados para a Biomassa equivalente em amostra G na curva de crescimento em glicose (terceira coluna da Tabela 15) com a massa inicial de amostra G utilizada nas extrações, igual a 50 mg, observa-se que as quantidades de biomassa fúngica estimada superam a massa inicial de amostra. Isso se deve ao fato de a estimativa considerar a massa absoluta de amostra tomada inicialmente na extração de ergosterol. Entretanto, será necessário um novo estudo para que essas estimativas considerem a biomassa fúngica total produzida em um cultivo após um tempo de cultivo definido, além de correlacionar a quantidade de ergosterol e a biomassa total produzida. Neste sentido, a determinação do peso seco dos cultivos fornecerá também dados confirmatórios sobre estas estimativas.

Apesar desta consideração, é possível afirmar que o método de estimação é eficaz para determinar a biomassa fúngica a partir da quantidade de ergosterol

medida, sendo que a exatidão das estimativas ainda necessita ser determinada pelo método do peso seco.

VI CONCLUSÕES

Com este trabalho, um método de extração de ergosterol assistido por micro-ondas foi adaptado com sucesso a amostras de cultivo de *Aspergillus tamaritii* na presença de casca de maracujá-amarelo e na presença de glicose como fontes de carbono. Ainda que o uso das micro-ondas como etapa de aquecimento represente um avanço metodológico em termos de tempo de análise, consumo de solventes e segurança quanto ao manuseio de aparatos em alta temperatura, propõe-se aqui a busca de métodos alternativos de preparo de amostra que possam ser adaptados ao tipo de amostra utilizada, uma vez que o método, mesmo otimizado, ainda se mostra relativamente complexo, trabalhoso e demorado, principalmente quando há necessidade de preparar um número grande de amostras.

A quantificação do ergosterol foi bem sucedida por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectroscópica na região do UV-visível. Trata-se de um analito cujas propriedades ópticas favorecem sua detecção com seletividade. Aliado a isso, soma-se a capacidade de o método de extração ser capaz de obter das amostras virtualmente apenas o ergosterol, uma vez que não foram observados outros picos expressivos nos cromatogramas obtidos. Entretanto, é importante buscar uma maneira de superar a complexidade da amostra, de forma a possibilitar a mensuração da exatidão do método analítico. Estudos devem ser conduzidos de forma a buscar solucionar este problema.

O método cromatográfico se mostrou robusto à mudança de coluna realizada, sendo um método preciso e linear em uma faixa ampla. Apresenta potencial para ser aplicado na quantificação de ergosterol obtido de outros fungos crescidos na presença de outras fontes de carbono, considerando que tais aplicações deverão ser avaliadas individualmente e em seguida validadas.

Foi constatado que a casca de maracujá-amarelo representa uma fonte de carbono importante para a produção de pectinases por *A. tamaritii*. Ficou nítida a produção destas enzimas em níveis praticamente constantes, a partir do décimo dia, até 30 dias após iniciar os cultivos.

Quando cultivado na presença de CMA, o fungo *A. tamaritii* apresentou um perfil de produção de ergosterol similar ao perfil de produção de pectinases durante 30 dias, padrão que não se observou quando *A. tamaritii* foi cultivado na presença de glicose como fonte de carbono.

Estudos futuros devem utilizar os modelos matemáticos de previsão da biomassa em experimentos confirmatórios, nos quais massas reais serão determinadas por peso seco para serem comparadas com as previsões feitas por estes modelos. Espera-se observar um alto grau de concordância entre os dois conjuntos de valores mencionados, o que possibilitaria que o ergosterol fosse utilizado para determinar, e não apenas prever, a variação de biomassa fúngica com o tempo em cultivos submersos utilizando resíduos agroindustriais lignocelulósicos como fontes de carbono.

VII REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. W.; BORASTON, A. B. Structural Biology of Pectin Degradation by Enterobacteriaceae. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 301-316, June 1, 2008 2008.
- AGUILAR, G.; HUITRON, C. CONSTITUTIVE EXO-PECTINASE PRODUCED BY ASPERGILLUS SP CH-Y-1043 ON DIFFERENT CARBON SOURCE. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 9, p. 655-660, Sep 1990.
- AKBAR, S.; PRASUNA, D. R. G.; THEJA, B.; CHAKRADHAR, Y. M. S. Exploitation of natural substrates and oil cakes for pectinase production by *A. tamarii* and *A. carbonarius*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 2, p. 614-624, 2012.
- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E.; GARCIA-EFFRON, G.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; CUENCA-ESTRELLA, J. M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, v. 73, n. 3, p. 339-347, 2008.
- ALMEIDA, J. R.; FAVARO, L. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 48, 2012.
- AMANDE, T.; ADEBAYO-TAYO, B. Screening of new isolates fungal strains for polygalacturonase production in submerged fermentation. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 11, n. September, 2012, p. 15-22, 2012.
- AMORE, A.; GIACOBBE, S.; FARACO, V. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. **Curr Genomics**, v. 14, n. 4, p. 230-49, Jun 2013.
- ANDERSON, P.; DAVIDSON, C. M.; LITTLEJOHN, D.; URE, A. M.; SHAND, C. A.; CHESHIRE, M. V. Extraction of ergosterol from peaty soils and determination by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 41, n. 5, p. 711-720, 1994.
- BAILEY, R. B.; PARKS, L. W. Yeast Sterol Esters and Their Relationship to Growth of Yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 2, p. 606-612, 1975.
- BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 217-223, 2014.

BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 pp. ISBN 978-85-7780-652-2.

BENNETT, J. E. Antifungal Agents. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B., *et al* (Ed.). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. United States: McGraw-Hill, 2011. cap. 57, ISBN 978-0-07-176939-6.

BERMINGHAM, S.; MALTBY, L.; COOKE, R. C. A Critical-Assessment of the Validity of Ergosterol as an Indicator of Fungal Biomass. **Mycological Research**, v. 99, p. 479-484, Apr 1995.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 381-388, Sep 2008.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery**. 2^a ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. 633 pp.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07 1976.

BROWN, A. M. A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 65, n. 3, p. 191-200, Jun 2001.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 11/15/ 2015.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Designs**. 2^a ed. EUA: Wiley-Interscience, 1992. 617 pp.

CORCORAN, A.; BERMUDEZ, M. A.; SEOANE, S.; PEREZ-FERNANDEZ, R.; KRUPA, M.; PIETRASZEK, A.; CHODYŃSKI, M.; KUTNER, A.; BROWN, G.; MARCINKOWSKA, E. Biological evaluation of new vitamin D2 analogues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Article in Press 2015.

DAMÁSIO, A. R. D. L.; MALLER, A.; SILVA, T. M. D.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. D. L. T. D. M. Biotechnological potential of alternative carbon sources

for production of pectinases by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 141-148, 2011.

DAVIS, M. W.; LAMAR, R. T. Evaluation of Methods to Extract Ergosterol for Quantitation of Soil Fungal Biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189-198, 1992.

DE SIQUEIRA, F. G.; DE SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20-26, 1// 2010.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-+, Dec 2001.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. BIOMASS ESTIMATION IN SOLID-STATE FERMENTATION .1. MANUAL BIOCHEMICAL METHODS. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 200-205, May 1991.

DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum l-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 33-39, 4// 2016.

DIAZ, J. V.; ANTHON, G. E.; BARRETT, D. M. Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5131-5136, Jun 2007.

DUPONT, S.; LEMETAIS, G.; FERREIRA, T.; CAYOT, P.; GERVAIS, P.; BENEY, L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2961-2968, 2012.

DUQUE JARAMILLO, P. M.; ROCHA GOMES, H. A.; DE SIQUEIRA, F. G.; HOMEM-DE-MELLO, M.; FILHO, E. X. F.; MAGALHÃES, P. O. Liquid-liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. **Separation and Purification Technology**, v. 120, p. 452-457, 12/13/ 2013.

ELGHARBAWY, A. A.; ALAM, M. Z.; MONIRUZZAMAN, M.; GOTO, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 252-267, 2016.

EVANS, J. L.; GEALT, M. A. The Sterols of Growth and Stationary Phases of *Aspergillus-Nidulans* Cultures. **Journal of General Microbiology**, v. 131, n. Feb, p. 279-284, 1985.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 101-102, 2004.

FISHER, R. A. **The Design of Experiments**. 9^a ed. Reino Unido: Macmillan Pub Co., 1935. 248

GALEA, A. M.; BROWN, A. J. Special relationship between sterols and oxygen: Were sterols an adaptation to aerobic life? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 6, p. 880-889, 2009.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GRANADE, T. C.; HEHMANN, M. F.; ARTIS, W. M. Monitoring of filamentous fungal growth by in situ microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance density, and ¹⁴C incorporation: alternatives to mycelial dry weight. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 101-108, 1985.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J. F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1-16, Jan 2016.

HAMANN, P. R. V.; SERPA, D. L.; BARRETO DA CUNHA, A. S.; DE CAMARGO, B. R.; OSIRO, K. O.; VALLE DE SOUSA, M.; FELIX, C. R.; MILLER, R. N. G.; NORONHA, E. F. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 97-105, 2015.

HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; VERMA, B.; ROBARTS, R. D. Mass spectrometric determination of ergosterol in a prairie natural wetland. **Journal of Chromatography A**, v. 958, n. 1-2, p. 149-156, 2002.

HELENO, S. A.; DIZ, P.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycoosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry**, v. 197, Part B, p. 1054-1063, 4/15/ 2016.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 86, p. 199-249, 2014.

IBGE. Tabela 15 - Área plantada ou área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias e permanentes em ordem decrescente de área colhida. 2012. Disponível em: <
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default_temp_perm_xls.shtm>. Acesso em: 05/02/2015.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text eand Methodology - Guideline Q2(R1)**. HARMONISATION, I. C. O. 2005.

ITO, Y.; PETERSON, S. W.; GOTO, T. Properties of *Aspergillus tamarii*, *A. caelatus* and related species from acidic tea field soils in Japan. **Mycopathologia**, v. 144, n. 3, p. 169-175, 1999.

JANEIRO, D. I.; QUEIROZ, M. D. S. R. D.; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; CUNHA, M. A. L. D.; DINIZ, M. D. F. F. M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 724-732, 2008.

JARAMILLO, P. M. D. **Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo**. 2014. 145 pp (Tese de Doutorado). Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

JOHNSON, M. L. Why, when, and how biochemists should use least squares. **Analytical Biochemistry**, v. 206, n. 2, p. 215-225, 11/1/ 1992.

KADOWAKI, M. K.; SOUZA, C. G. M.; SIMAO, R. C. G.; PERALTA, R. M. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 97-106, May 1997.

KALARAS, M. D.; BEELMAN, R. B.; HOLICK, M. F.; ELIAS, R. J. Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 396-401, 2012.

KEMMER, G.; KELLER, S. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. **Nat. Protocols**, v. 5, n. 2, p. 267-281, 02//print 2010.

KIEBER, R. J.; PAYNE, W. J.; APPLETON, G. S. The sterol content of fungi. I. Methods for disrupting cells, extracting and determining sterols. **Appl Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 247-8, 1955.

KORANY, M. A.; RAGAB, M. A. A.; YOUSSEF, R. M.; AFIFY, M. A. Experimental design and machine learning strategies for parameters screening and optimization of Hantzsch condensation reaction for the assay of sodium alendronate in oral solution. **RSC Advances**, v. 5, n. 9, p. 6385-6394, 2015.

KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 2, p. 93-100, 5// 2003.

KRISTAN, K.; RIZNER, T. L. Steroid-transforming enzymes in fungi. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 1-2, p. 79-91, 2012.

KUEHL, R. O. **Designs of experiments: statistical principles of research design and analysis**. 2^a ed. EUA: Duxbury, Thomson Learning, 1994.

LARSEN, T.; AXELSEN, J.; RAVN, H. W. Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1-2, p. 301-304, 2004.

MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. L.; DA SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; POLIZELI, M. D. L. T. D. M. Biotechnological Potential of Agro-Industrial Wastes as a Carbon Source to Thermostable Polygalacturonase Production in *Aspergillus niveus*. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 289206, 2011.

MARTÍNEZ-TRUJILLO, A.; ARANDA, J. S.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, C.; TREJO-AGUILAR, B.; AGUILAR-OSORIO, G. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 40-47, 2009.

MATCHAM, S. E.; JORDAN, B. R.; WOOD, D. A. Estimation of Fungal Biomass in a solid substrate by three independent methods **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 1-2, p. 108-112, 1985.

MIDORIKAWA, G. E. O.; PINHEIRO, M. R. R.; VIDIGAL, B. S.; ARRUDA, M. C.; COSTA, F. F.; PAPPAS, G. J.; RIBEIRO, S. G.; FREIRE, F.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 12-18, Jul 2008.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6^a ed. Reino Unido: Prentice Hall, Pearson, 2010.

MONTGOMERY, H. J.; MONREAL, C. M.; YOUNG, J. C.; SEIFERT, K. A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 8-9, p. 1207-1217, 2000.

MUNIROH, M. S.; SARIAH, M.; ABIDIN, M. A. Z.; LIMA, N.; PATERSON, R. R. M. Rapid detection of Ganoderma-infected oil palms by microwave ergosterol extraction with HPLC and TLC. **Journal of Microbiological Methods**, v. 100, p. 143-147, 2014.

NEWELL, S. Y. Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, n. 9, p. 3479-82, 1994.

NEWELL, S. Y.; ARSUFFI, T. L.; FALLON, R. D. Fundamental Procedures for Determining Ergosterol Content of Decaying Plant-Material by Liquid-Chromatography. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1876-1879, 1988.

NG, H. E.; RAJ, S. S.; WONG, S. H.; TEY, D.; TAN, H. M. Estimation of fungal growth using the ergosterol assay: a rapid tool in assessing the microbiological status of grains and feeds. **Lett Appl Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 113-8, Jan 2008.

NIELSEN, K. F.; MADSEN, J. O. Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 898, n. 2, p. 227-234, Nov 17 2000.

OLIVEIRA, L. F. D.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. D. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 22, p. 259-262, 2002.

PADGETT, D. E.; POSEY, M. H. An Evaluation of the Efficiencies of Several Ergosterol Extraction Techniques. **Mycological Research**, v. 97, p. 1476-1480, 1993.

PARKS, L. W.; CASEY, W., M. Fungal Sterols. In: PRASAD, R. e GHANNOUM, M. A. (Ed.). **Lipids of Pathogenic Fungi**. EUA: Library of Congress, 1996. cap. 3, ISBN 0-8493-4794-7.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p. 216-224, Jan 17 2007.

PINHEIRO, E. R.; SILVA, I. M. D. A.; GONZAGA, L. V.; AMANTE, E. R.; TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5561-5566, Sep 2008.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v. 144, p. 696-703, 11/1/ 2015.

RAVELET, C.; GROSSET, C.; ALARY, J. Quantitation of ergosterol in river sediment by liquid chromatography. **J Chromatogr Sci**, v. 39, n. 6, p. 239-242, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SEITZ, L. M.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D. B. Ergosterol as an Indicator of Fungal Invasion in Grains. **Cereal Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1207-1217, 1977.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E.; HUBBARD, J. D. Ergosterol as a Measure of Fungal Growth. **Phytopathology**, v. 69, n. 11, p. 1202-1203, 1979.

SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R. B.; GARCIA, P. S.; PETKOWICZ, C. L. D. O.; JAGADEVAN, S.; GIMENES, M. L. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 186-192, 7// 2014.

SIQUEIRA, F. G. D.; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54-60, Feb 2010.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 6ª ed. Iowa: The Iowa State University Press, 1967. 593 pp.

SRIVASTAVA, P.; MALVIYA, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry – An overview **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 1, p. 10-18, 2011.

STAHL, P. D.; PARKIN, T. B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 7, p. 847-855, 1996.

STEINBERG, D. M.; HUNTER, W. G. Experimental Design: Review and Comment. **Technometrics**, v. 26, n. 2, p. 71-97, 1984.

TANRET, C. **Sur un nouveau principe immédiat de l'ergot de seigle: l'ergostérine.** Annales de chimie et de physique. (PARIS), G. M. France. 6^{ème} série, Tome XX: 588 p. 1889.

TARDIEU, D.; BAILLY, J. D.; BENARD, G.; GUERRE, R. Comparison of two extraction methods for ergosterol determination in vegetal feeds. **Revue De Medecine Veterinaire**, v. 158, n. 8-9, p. 442-446, 2007.

TEICHMANN, A.; DUTTA, P. C.; STAFFAS, A.; JÄGERSTAD, M. Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 815-822, 2007.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TOTHILL, I. E.; HARRIS, D.; MAGAN, N. The Relationship between Fungal Growth and Ergosterol Content of Wheat-Grain. **Mycological Research**, v. 96, p. 965-970, 1992.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, Sep 2011.

VEEN, M.; LANG, C. Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, p. 1178-1181, 2005.

VEEN, M.; STAHL, U.; LANG, C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Yeast Research**, v. 4, n. 1, p. 87-95, 2003.

VILLARES, A.; MATEO-VIVARACHO, L.; GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E. Storage temperature and UV-irradiation influence on the ergosterol content in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 147, p. 252-256, 2014.

VIVALDI, L. J. **Análise de experimentos com dados repetidos no tempo ou no espaço**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. 52

WEETE, J. D.; ABRIL, M.; BLACKWELL, M. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10899, 2010.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind - A potential source of low-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2738-2744, Apr 2006.

YOUNG, J. C. Microwave-Assisted Extraction of the Fungal Metabolite Ergosterol and Total Fatty-Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2904-2910, Nov 1995.

ZHANG, H. C.; MA, Y. M.; LIU, R.; ZHOU, F. Endophytic fungus *Aspergillus tamaris* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 31-33, Dec 2012.

ZNAMEROSKI, E. A.; CORADETTI, S. T.; ROCHE, C. M.; TSAI, J. C.; IAVARONE, A. T.; CATE, J. H. D.; GLASS, N. L. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6012-6017, April 17, 2012 2012.