



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

**Programa de Pós-graduação em Nanociência
e Nanobiotecnologia**

Camila Gomes Cabral

Análise do efeito do tratamento fotodinâmico mediado por nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina sobre a produção de hidrolases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Penicillium echinulatum*

Brasília 2020

Camila Gomes Cabral

Análise do efeito do tratamento fotodinâmico mediada por nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina sobre a produção de hidrolases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Penicillium echinulatum*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Brasília, 2020

Camila Gomes Cabral

Análise do efeito do tratamento fotodinâmico mediado por nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina sobre a produção de hidrolases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Penicillium echinulatum*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Data de aprovação: 19/03/2020

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann

Doutor em

Professor da (faculdade/instituto/departamento)

Prof. Dr. Patrícia Bento da Silva

Doutora em

Professor da (faculdade/instituto/departamento)

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

Doutor em

Professor da (faculdade/instituto/departamento)

Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância
que podemos solucioná-los.

- Isaac Asimov

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, meu irmão e minha família. Por todo o suporte que me foi dado desde sempre. Em todas as minhas escolhas e decisões, mesmo estando em frente ao erro, vocês estavam ao meu lado para me ajudar e me manter tranquila. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao Professor Dr. Márcio Poças, por ter me acolhido no laboratório desde 2014 e me dado a oportunidade de me desenvolver profissionalmente com aquilo que eu tive afinidade. Sou muito grata pela confiança e transferência de conhecimento. Ao Professor Dr. Luis Muehlmann por também ter me acolhido como aluna de mestrado e também ter aberto as portas do seu laboratório.

Agradeço aos meus amigos do CEMAB, da UnB, do Kpop, da dança... vocês que com frequência acreditam em mim mais do que eu mesma. Sou grata pelo apoio, pelas conversas e por ter compartilhado uma parte tão rica da minha vida com vocês. É um privilégio ter crescido com pessoas tão diversas e profundas.

Aos meus companheiros de laboratório durante toda essa jornada: João Heitor, Fernanda, Bruce, Kunal, Bontempo e Suguiura. Jade, Daniel, Gabriel, Túlio, Dileep, Mosar, Athayde e Beatriz. Sou grata por toda a ajuda durante os experimentos, discussões, pelo companheirismo e amizade.

Sou grata aos Professores do Departamento de Genética e Morfologia: Prof^a Nilda, Prof^a Cintia, Prof^o Renato, Prof^a Rosana, e demais professores. Obrigada por todos os cafés na copa, e por serem tão receptivos. Agradeço também ao pessoal do CDT, que me receberam com igual ternura e me apoiaram justamente nos momentos mais críticos do mestrado.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia. À capes e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Em especial, deixo meu agradecimento para Welton Reis. Sua passagem na minha vida foi breve, porém significativa, e eu dedico esse trabalho a você.

Resumo

O tratamento fotodinâmica (TFD) consiste na foto-oxidação de um composto biológico mediada por um fotossensibilizante que será exposto a luz de comprimento de onda adequado, resultando na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e radicais livres, gerando estresse oxidativo intracelular, o que pode causar danos e alterar a homeostase. Em fungos filamentosos, a administração do TFD resultou em inibição do crescimento de forma dose-dependente, aumento na sensibilização do fungo para tratamento concomitante com outras drogas, com pouco sucesso na completa inativação dos mesmos. Tendo isso em vista, a combinação de fungos com fotossensibilizantes apresenta potencial para ser usado como um sistema fotocatalítico em diversas áreas, buscando entender a citotoxicidade por vias oxidativas e possíveis efeitos além da inativação. Assim sendo, esse trabalho visou a investigar o potencial efeito do TFD mediado por cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsão (AIPc-NE) em dois fungos filamentosos produtores de hidrolases, *Humicola grisea* e *Penicillium echinulatum*, principalmente no tocante à produção de enzimas hidrolíticas. Os fungos, em seu estado vegetativo, foram expostos à diferentes concentrações de AIPc-NE para avaliação da capacidade de internalização do fotossensibilizante, via espectrofotômetro e microscopia de fluorescência. Uma vez estabelecido padrões de retenção do fotossensibilizante prosseguiu-se com o TFD mediada por 300 e 600 nM de AIPc-NE e análise de viabilidade. Após TFD, *H. grisea* foi crescido em Bagaço de Cana-de-açúcar (BCA), Farelo de Trigo (FT) e Glicose e análises realizadas após 12 e 96 h. Para *P. echinulatum* utilizou-se os mesmos substratos com adição de Celufloc[®] e análises foram realizadas após 96 e 120 h. Foram avaliadas a quantidade de proteínas solúveis secretadas, atividade antioxidante total no sobrenadante, e atividade das enzimas CMCase, xilanase e FPase. Após irradiação não houve alteração no crescimento e viabilidade dos fungos. Alterações na quantidade total de proteína secretada, atividade antioxidante total, atividade de CMCase e de xilanase, foram observadas após TFD, e tais alterações variam de acordo com a concentração de fotossensibilizante utilizado, substrato avaliado e espécie de fungo. Entre as atividades enzimáticas avaliadas, a de xilanase foi a mais expressiva e a de FPase foi a menos expressiva para ambos os fungos estudados. Dessa forma, foi observado impacto na produção de hidrolases causado pela administração do TFD.

Palavras-chave: Tratamento fotodinâmico. Cloreto de alumínio-ftalocianina. Hidrolases. *Humicola grisea*. *Penicillium echinulatum*

Abstract

Photodynamic treatment (PDT) consists on the photooxidation of a biological compound mediated by a photosensitizer exposed to light in an appropriate wavelength, culminating in the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and free radicals, leading to intracellular oxidative stress, damage and alteration in homeostasis. In filamentous fungi, the administration of PDT resulted in inhibition of growth in a dose-dependent manner, increased sensitization of the fungus for concomitant treatment with other drugs, but their complete inactivation was poorly achieved. Thereby, the combination of fungi with photosensitizers has the potential as a photocatalytic system in several areas, stablishing new models to understand cytotoxicity by oxidative pathways, going beyond inactivation. Therefore, this work aimed to investigate the potential effect of PDT mediated by aluminum chloride-phthalocyanine nanoemulsion (AlPc-NE) in two hydrolases-producing filamentous fungi, *Humicola grisea* and *Penicillium echinulatum*, as well as the implication of PDT in the hydrolysis of agroindustrial substrates as steam exploded sugarcane-bagasse (SCB) and Wheat Bran (WT). Such fungi have well-characterized hydrolytic capacities, and their enzymes have good biomass conversion capacity and thermostability. The fungi hyphae in their vegetative state were exposed to different concentrations of AlPc-NE and photosensitizer internalization was measured by spectrophotometer and fluorescence microscopy. Once the photosensitizer retention patterns were established, PDT mediated by 300 and 600 nM AlPc-NE was performed and viability analyzed. After PDT, *H. grisea* grow in SCB, WB and Glucose and analyzed after 12 and 96 h. For *P. echinulatum*, the same substrates were used with addition of Celufloc[®] and analyzes were performed after 96 and 120 h. The amount of soluble secreted proteins, total antioxidant activity in the supernatant, and CMC_{ase}, xylanase and FPase enzymes activity were evaluated. After irradiation, there was no change in the growth and viability of the fungi. Changes in the total amount of secreted protein, total antioxidant activity, CMC_{ase} and xylanase activity were observed after PDT, and these changes varied according to the concentration of photosensitizer used, evaluated substrate and fungus species. Among the enzymatic activities evaluated, Xylanase had the most altered pattern; meanwhile, FPase remained virtually unchanged in both fungi species. Thus, an impact was observed in the production of hydrologists caused by the administration of PDT.

Key words: *Humicola grisea*. *Penicillium echinulatum*. Photodynamic therapy. Aluminum phthalocyanine chloride. Hydrolases.

Lista de figuras

- Figura 1.** Mecanismo e componentes básicos da Terapia Fotodinâmica.22
- Figura 2.** Representação esquemática do mecanismo de ação do tratamento fotodinâmico (TFD). O fotossensibilizante sai de seu estado basal para um estado excitado após exposição a luz em comprimento adequado podendo gerar espécies reativas de oxigênio pelos mecanismos do tipo I t tipo II. EROs: espécies reativas de oxigênio.23
- Figura 3.** Representação da estrutura do Cloreto de Alumínio-talocianina.24
- Figura 4.** Organização da hierarquia da parede celular vegetal. Imagem adaptada de <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181&topic=&citation=&general=Cellulose&restsection=all>.28
- Figura 5.** Hidrólise enzimática da celulose cristalina. Na imagem são destacadas a ação sinérgica dos três tipos de enzimas envolvidos. Primeiramente agem as Endoglucanases, seguidas das celobiohidrolases e por fim β -glicosidases. Efetores não enzimáticos como as Monooxigenases Lipopolissacarídicas líticas também são exibidos. Adaptado de Champreda et al 2019.30
- Figura 6.** Ação de proteínas sinérgicas na degradação de celulose. Destaca-se proteínas auxiliaadoras, expansinas e swoleninas, seguida da ação de endo e exoglucanases. Adaptado de Kim et al (2014).31
- Figura 7.** Representação esquemática da hidrólise de resíduos agroindustriais, nesse caso Bagaço de cana-de-açúcar e Farelo de Trigo, via associação de tratamentos físicos com hidrólise enzimática utilizando os fungos filamentosos *Humicola grisea* var *thermoidea* e *Penicillium echinulatum*, para geração de produtos com valor agregado.32
- Figura 8.** Desenho experimental das condições definidas para TFD (tratamento fotodinâmico) em *Humicola grisea*. Esporos foram previamente inoculados em meio completo para obtenção de micélio, este então foi pesado e partes iguais incubadas nos respectivos meios contendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT) ou glicose nas condições experimentais (TFD, exposição à luz, exposição à nanoemulsão ou sem nenhum tratamento). Coletas foram realizadas em 12 e 96 h seguidas de ensaios bioquímicos.44
- Figura 9.** Desenho experimental das condições definidas para TFD (tratamento fotodinâmico) em *Penicillium echinulatum*. Esporos foram previamente inoculados em meio completo para obtenção de micélio, este então foi pesado e partes iguais incubadas nos respectivos meios contendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT) ou glicose,

ou celulose intumescida nas condições experimentais (TFD, exposição à luz, exposição à nanoemulsão ou sem nenhum tratamento). Coletas foram realizadas em 96 e 120 h seguidas de ensaios bioquímicos.....44

Figura 10. Esquema representativo da linha do tempo experimental para *Humicola grisea*. Em -24h esporos foram inoculados em meio completo; em 0h o micélio crescido foi inoculado em meio mínimo em seus respectivos substratos, bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT), ou glicose. Nos pontos de 0h e 48h o fungo foi exposto ao led no comprimento de 660 nm. Sobrenadantes foram retirados em 12 e 96 h de crescimento. As condições experimentais envolvem controle sem tratamento, fungo exposto somente ao led, fungo exposto somente à Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc-NE).....45

Figura 11. Esquema representativo da linha do tempo experimental para *Penicillium echinulatum*. Em -64h esporos foram inoculados em meio completo; em 0h o micélio crescido foi inoculado em meio mínimo em seus respectivos substratos, bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT), ou celufloc, ou glicose. Nos pontos de 0h e 36h o fungo foi exposto ao led no comprimento de 660 nm. Sobrenadantes foram retirados em 96 e 120 h de crescimento. As condições experimentais envolvem controle sem tratamento, fungo exposto somente ao led, fungo exposto somente à Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc-NE).....46

Figura 12. Micrografia de fluorescência de filamentos de *H. grisea* após incorporação AlPc em nanoemulsão. Imagens da esquerda correspondem a sobreposição do campo claro com o canal vermelho (633 nm). Imagens a direita correspondem somente ao canal vermelho. **A** – Controle não exposto. **B** – Exposição à 600 nM por 2h. **C** – Exposição à 20 µM por 30 min. **D** - Exposição à 20 µM por 2 h. AlPc: cloreto de alumínio-ftalocianina.....53

Figura 13. Micrografia de fluorescência de filamentos de *Penicillium echinulatum* após incorporação AlPc em nanoemulsão. Imagens da esquerda correspondem a sobreposição do campo claro com o canal vermelho (633 nm). Imagens a direita correspondem somente ao canal vermelho. **A** – Controle não exposto. **B** – Exposição à 600 nM por 2 h. **C** – Exposição à 20 µM por 2 h. AlPc: cloreto de alumínio-ftalocianina.54

Figura 14. Gráfico da correlação entre fluorescência relativa e concentração de AlPc-NE (nM) livre em DMSO $R = 0,9617$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. Curva obtida $Y = 1,114 * X - 5,666$55

Figura 15. Quantidade cloreto de alumínio ftalocianina incorporada pelos filamentos fúngicos após 1h de exposição a diferentes concentrações de AlPc-NE (nM). A - *Humicola grisea*; “a” e

“b” representam diferença estatística ($p < 0,005$). B - *Penicillium echinulatum*. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. 55

Figura 16. Análise da quantidade de cloreto de alumínio-ftalocianina internalizado com o passar do tempo, expresso em porcentagem do total exposto. **A** - *Humicola grisea* exposto a 300 nM. **B** - *Humicola grisea* exposto a 600 nM. **C** - *Humicola grisea* exposto a 20 μ M. **D** - *Penicillium echinulatum* exposto a 300 nM. **E** - *Penicillium echinulatum* exposto a 600 nM. **F** - *Penicillium echinulatum* exposto a 20 μ M. Asteriscos indicam diferença estatística entre os tempos de incubação. (*) $p < 0,05$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. 56

Figura 17. Curvas de crescimento de *Humicola grisea* em meio completo (A), e meio mínimo (B), e de *P. echinulatum* em meio completo (C), e meio mínimo (D). Em verde controle submetido apenas às condições normais de cultivo. Em azul, fungo exposto somente a 20 μ M de AlPc-NE; em vermelho exposição a luz no comprimento de onda de a TFD, e seus respectivos controles. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 57

Figura 18. Quantificação de proteínas solúveis totais para *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** - Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** - Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** - Glicose(1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** - Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **E** - Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** - Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 58

Figura 19. Quantificação de proteínas solúveis totais para *P. echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição a TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** - Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** - Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE **C** - Celofloc (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** - Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE **E** - Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** - Farelo de Trigo (1%) + 600 **G** - Celofloc (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **H** - Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 60

Figura 20. Capacidade antioxidante total do sobrenadante de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição a TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 61

Figura 21. Capacidade antioxidante total do sobrenadante para *Penicillium echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 62

Figura 22. Determinação da atividade de CMC_{Case} de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição a TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 63

Figura 23. Determinação da atividade de CMC_{Case} de *P. echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 64

< 0,01; (**): $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 64

Figura 24. Determinação da atividade de Xilanase de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 65

Figura 25. Determinação da atividade de Xilanase de *Penicillium echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 66

Figura 26. Determinação da atividade de FPase de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle. 67

Figura 27. Determinação da atividade de FPase de *Penicillium echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle.

(*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle..... 68

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição do farelo de trigo não tratado. Adaptado de Reisinger et al 2013.	26
Tabela 2. Principais pré-tratamentos utilizados na indústria de etanol celulósico. Adaptado de Kumar and Sharma (2017).	29
Tabela 3. Descrição das soluções utilizadas nos experimentos.	38
Tabela 4. Descrição das soluções utilizadas para manutenção e cultivo de <i>Humicola grisea</i> . 39	
Tabela 5. Descrição dos meios utilizadas para manutenção e cultivo de <i>Humicola grisea</i>	40
Tabela 6. Descrição das soluções utilizadas para manutenção e cultivo de <i>Penicillium echinulatum</i>	41
Tabela 7. Descrição dos meios utilizadas para manutenção e cultivo de <i>Penicillium echinulatum</i>	42
Tabela 8. Substratos utilizados para o crescimento e indução de hidrolases, concentração de AlPc-NE utilizada na TFD e condições experimentais em <i>Humicola grisea</i> e <i>Penicillium echinulatum</i>	47
Tabela 9. Descrição das soluções utilizadas para realização dos ensaios enzimáticos	49
Tabela 10. Propriedades coloidais da AlPc-NE dispersa em salina 0,9% em temperatura ambiente e em 42 °C, sendo esta a temperatura de crescimento do fungo <i>Humicola grisea</i>	52
Tabela 11. Efeito do tratamento fotodinâmico (TFD) mediado por AlPc-NE nas concentrações de 300 nM e 600 nM. Efeitos observados na quantidade de proteínas solúveis totais, atividade antioxidante, atividade de CMCCase, Xilanase e FPase de <i>Humicola grisea</i> após 12 e 96 h. Os dados apresentados correspondem à diferença percentual em relação ao controle não tratado ((X - controle) x 100/controlado). Em colorido encontra-se as alterações que foram estatisticamente significativas.	69
Tabela 12. Efeito do tratamento fotodinâmico (TFD) mediado por AlPc-Ne nas concentrações de 300 nM e 600 nM. Efeitos observados na quantidade de proteínas solúveis totais, atividade antioxidante, atividade de CMCCase, Xilanase e FPase de <i>Penicillium echinulatum</i> após 96 e 120 h. Os dados apresentados correspondem a alterações percentuais com relação ao controle não tratado ((X - controle) x 100/controlado). Em colorido encontra-se as alterações que foram estatisticamente significativas.	69

Lista de abreviaturas e siglas

[]	Concentração
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AIPc	Cloreto de ftalocianina de alumínio
AIPc-NE	Nanoemulsão com cloreto de alumínio-ftalocianina
ANOVA	Análise de variância
BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	Meio ágar-dextrose-batata
BEN	Balanco Energético Nacional
BGL	β -glicosidases
CBH	Celobiohidrolases
CMC	Carboximetilcelulose
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMSO	Sulfóxido de dimetileno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EG	Endoglucanase
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FP	Papel Filtro
FT	Farelo de trigo
g	Gramas
g	Força gravitacional
IBA	Instituto Brasileiro de Árvores
ISC	Intersystem crossing
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
L	Litro
LPMOs	Monooxigenases lipopolissacarídicas líticas
mg	Miligramas
mL	Mililitro

mV	Milivolts
mW	Miliwatt
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
PdI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial de Hidrogênio
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TFD	Terapia Fotodinâmica
UCS	Universidade de Caxias do Sul
Zp	Potencial Zeta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Nanociência e Nanobiotecnologia	21
1.1.1 Tratamento Fotodinâmico	21
1.2 Biomassa	25
1.2.1 Biomassa como fonte de energia	25
1.2.2 Parede celular vegetal	27
1.2.3 A hidrólise enzimática da parede vegetal	29
1.3 Fungos Filamentosos e sua importância industrial	31
1.3.1 <i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i>	32
1.3.2 <i>Penicillium echinulatum</i>	34
2. Justificativa.....	35
3. Objetivo Geral	36
3.1 Objetivos Específicos	36
4 Materiais e métodos	37
4.1 Obtenção e manutenção dos microrganismos	37
4.2 Meios de crescimento e soluções.....	37
4.2.1 Soluções gerais	38
4.2.2 Meios e soluções para <i>Humicola grisea</i>	39
4.2.3 Meios e soluções para <i>Penicillium echinulatum</i>	41
4.3 Preparo e caracterização da AIPc-NE.....	42
4.4 Microscopia de Fluorescência	43
4.5 Análise de internalização por fluorescência	43
4.8 Terapia fotodinâmica	44
4.8.1 TFD em <i>Humicola grisea</i>	44
4.8.2 TFD em <i>Penicillium echinulatum</i>	46
4.9 Crescimento e viabilidade após TFD	48
4.10 Ensaio Enzimáticos.....	48

4.10.1 Soluções para ensaios enzimáticos.....	48
4.10.2 Medidas de atividade enzimática	49
4.11 Quantificação de proteínas solúveis.....	50
4.12 Atividade Antioxidante total	50
4.13 Análise Estatística	51
5 Resultados.....	51
5.1 Caracterização físico-química da nanoemulsão.....	52
5.2 Internalização de AlPc-NE.....	52
5.3 Viabilidade após TFD	57
5.4 Efeitos da TFD.....	57
5.4.1 Quantificação de proteínas solúveis totais para <i>H. grisea</i> e <i>P. echinulatum</i>	58
5.4.2 Atividade antioxidante total para <i>H. grisea</i> e <i>P. echinulatum</i>	60
5.4.3 Determinação da atividade de CMC _{Case} nos sobrenadantes para <i>H. grisea</i> e <i>P. echinulatum</i>	62
5.4.4 Determinação da atividade de Xilanase nos sobrenadantes para <i>H. grisea</i> e <i>P. echinulatum</i>	64
5.4.5 Determinação da atividade de FPase nos sobrenadantes para <i>H. grisea</i> e <i>P. echinulatum</i>	66
6. Discussão.....	70
7. Conclusões e perspectivas	76
8. Referências bibliográficas.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanociência e Nanobiotecnologia

A nanotecnologia é caracterizada pelo desenvolvimento, uso e aplicação de materiais em escala nanométrica, onde as propriedades da matéria divergem significativamente das apresentadas em escala macro. Uma vez nesse tamanho, a matéria como um todo começa a se comportar de forma diferente, apresentando novas características magnéticas, ópticas, eletrônicas, mecânicas, térmicas, efeitos quânticos e interações de superfície (AVOURIS et al., 2012; HORNYAK et al., 2009). Tais características são amplamente investigadas e exploradas nos campos da saúde, biorremediação, informática, farmacêutica e química (MIYAZAKI; ISLAM, 2007).

É na interface entre estudo e aplicação que surge a nanobiotecnologia, conceituada como a aplicação das técnicas e conhecimentos usados em nanoescala visando a compreensão e transformação de biosistemas, assim como o uso de princípios e materiais biológicos para a criação de novos dispositivos e sistemas em nanoescala. Assim sendo, a nanotecnologia fornece os meios e plataformas para a modificação de componentes biológicos para a obtenção de conhecimento, desenvolvimento e criação de produtos nanobiotecnológicos (TAKEDA et al., 2009).

O desenvolvimento de nanoestruturas é cerne na nanobiotecnologia, principalmente no que tange à funcionalização e aplicação de compostos inorgânicos nanoestruturados, como nanopartículas, nanoemulsões, nanocarreadores, misturas, nanocápsulas e inúmeros outros que podem ser facilmente preparados em larga quantidade usando métodos relativamente simples (NIEMEYER, 2006). Tais características são importantes dentro da nanobiotecnologia industrial, definida como a aplicação de diferentes procedimentos de base biológica na produção em larga escala de nanomateriais (DORCHEH; VAHABI, 2016).

Uma característica intrínseca da nanobiotecnologia é sua capacidade de transitar entre áreas. Frequentemente uma tecnologia é desenvolvida para uma atividade fim, mas acaba sendo aplicada e utilizada em campos não necessariamente propostos durante seu desenvolvimento inicial.

1.1.1 Tratamento Fotodinâmico

O tratamento fotodinâmico (TFD) consiste na fotooxidação de um composto biológico mediada por um fotossensibilizante que será exposto a luz de comprimento de onda adequado, passando para um estado eletronicamente excitado. O resultado dessa reação é a interação do fotossensibilizante com oxigênio e outras moléculas, culminando produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e radicais livres, gerando estresse oxidativo em locais específicos dentro da célula, levando a apoptose ou necrose (YANO et al., 2011).

O TFD é formado por três componentes básicos: fotossensibilizante, luz e oxigênio (figura 1), sendo este último um fator chave no mecanismo de ação do TFD. Existem dois tipos de reação envolvidas diretamente com o efeito do TFD, conforme figura 2: reação do tipo II, onde o fotossensibilizante reage diretamente com o oxigênio, gerando EROs; e a reação do tipo I, onde o fotossensibilizante reage com outras moléculas gerando radicais livres (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

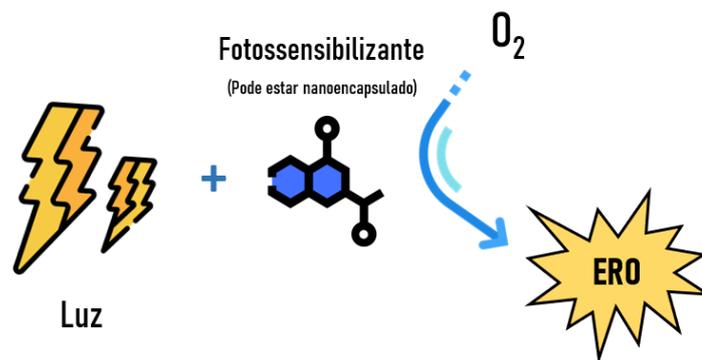


Figura 1. Mecanismo e componentes básicos da Terapia Fotodinâmica.

O processo fotofísico por trás do TFD envolve a absorção de energia da luz pelo fotossensibilizante, que sai de um estado basal (S_0) para um estado excitado (S_1). Nessa primeira parte, o fotossensibilizante se encontra em um estado singlete que dura poucos nanossegundos e causa pouco dano celular. Em seguida o fotossensibilizante tende a retornar para um estado menos energético liberando um fóton e gerando fluorescência, porém, vários outros processos para liberação dessa energia podem ocorrer, sendo um deles um processo não irradiativo conhecido como *intersystem crossing* (ISC) que leva à formação do estado tripleto (T_1) (DĄBROWSKI, 2017; YANO et al., 2011). É esse estado o responsável por eventuais danos e demais efeitos gerado pelo TFD, já que diferentemente do estado S_1 , o T_1 dura de micro a milissegundos, tempo suficiente para a geração de reações fotodinâmicas nas células (YANO et al., 2011).

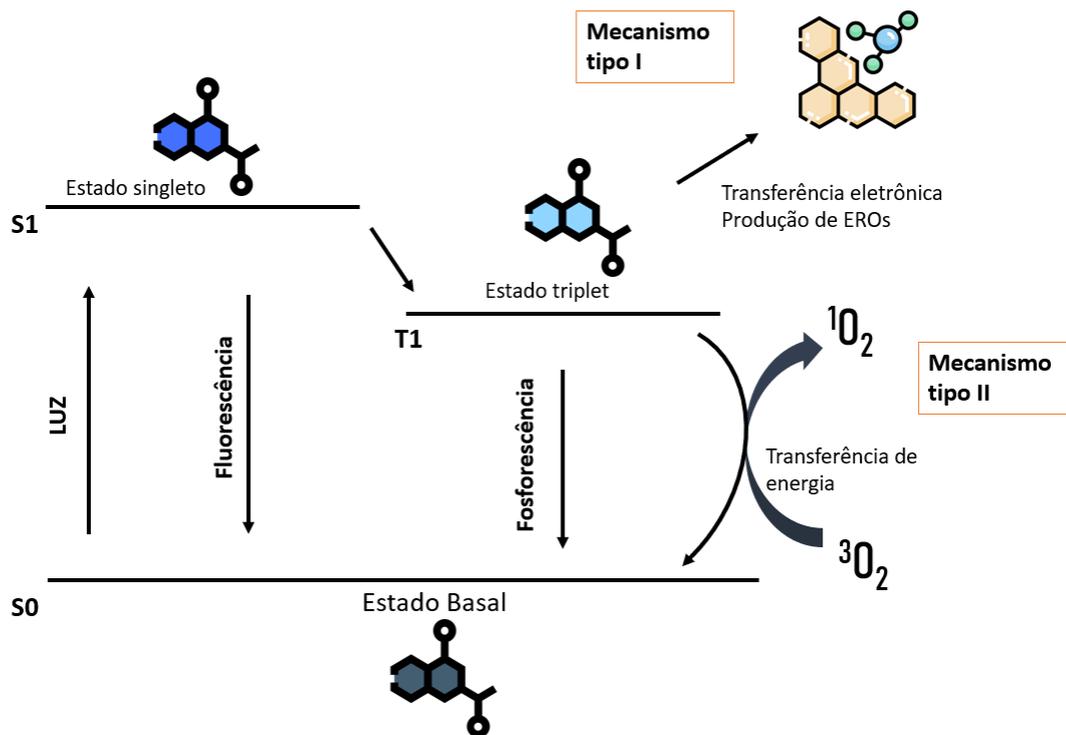


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do tratamento fotodinâmico (TFD). O fotossensibilizante sai de seu estado basal para um estado excitado após exposição a luz em comprimento adequado podendo gerar espécies reativas de oxigênio pelos mecanismos do tipo I t tipo II. EROs: espécies reativas de oxigênio.

Existem diversas classes de fotossensibilizantes disponíveis para TFD, atualmente os mais utilizados são as porfirinas, ftalocianinas e compostos relacionados. Essas moléculas se destacam pela geração de um estado excitado de longa duração, além da fácil transferência de energia para o oxigênio molecular, levando-o para o estado singleto necessário para um TFD efetivo (ION; ŞUICĂ-BUNGHEZ, 2015). Ftalocianinas são derivados de porfirinas que geralmente absorvem no UV entre 300 e 350nm e na faixa de luz visível entre 600 e 700nm, sendo essa última faixa a mais utilizada no TFD devido sua alta inserção em tecidos biológicos (SPIKES, 1986). O arranjo molecular das ftalocianinas permite absorção em maior comprimento de luz, quando comparado com as porfirinas, colocando-a em vantagem para potenciais tratamentos e aplicações biotecnológicas. A presença de metais como o alumínio permite maior eficiência na geração de oxigênio em estado singleto, além de estender a absorção para maiores comprimentos de onda na faixa do visível, como é o caso do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc) (figura 3) (PUSHPAN et al., 2002).

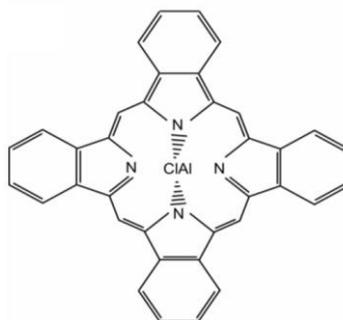


Figura 3. Representação da estrutura do Cloreto de Alumínio-talocianina.

Embora AlPc possua as qualidades desejáveis para um fotossensibilizante, como baixo custo de produção, pouca citotoxicidade e absorção em longo comprimento de onda com alta produção de EROs, tal fotossensibilizante em seu estado livre apresenta hidrofobicidade e baixa solubilidade em água, sofrendo agregação e consequente modificação de suas características fotofísicas, tornando-a pouco atrativa para uso em sistemas biológicos (DARWENT et al., 1982; SPIKES, 1986; VILSINSKI et al., 2015). Visando solucionar esse problema, abordagens envolvendo a encapsulação e complexação dessas moléculas em nanossistemas provam-se uma alternativa eficaz, uma vez que nanopartículas, micelas, lipossomas e nanoemulsões frequentemente conferem características de biocompatibilidade, necessária para administração em organismos vivos (FAKAYODE et al., 2018).

Como revisto por Mason e colaboradores (2006), nanoemulsões podem ser definidas como dispersões homogêneas de dois líquidos imiscíveis, com fase dispersa na escala nanométrica. A interface entre a fase dispersa e a contínua é estabilizada com surfactantes, os quais são agentes anfipáticos que visam reduzir a tensão superficial, permitindo a interação entre os líquidos, formando estruturas com 5 a 200 nm de diâmetro. As características das nanoemulsões são derivadas de suas propriedades físico-químicas, onde o seu tamanho, dispersão e estabilidade conferem as particularidades que permitem seu uso em diversas áreas, como na formulação de cosméticos, entrega de fármacos, criação de nanoambientes para reações enzimáticas, aumento de solubilidade, liberação lenta de fármacos e outros (CHAVDA; SHAH, 2017). A síntese de nanoemulsões contendo fotossensibilizante inicialmente hidrofóbicos vem obtendo sucesso, com uso principalmente voltado para tratamento de tumores.

Estudos como o de Muehlmann (2011) demonstram que a nanoencapsulação do cloreto de alumínio-ftalocianina foi capaz de mostrou-se eficiente ao gerar um sistema hidrossolúvel, de fácil internalização capaz de produzir espécies reativas de oxigênio quando exposto a luz no comprimento de onda adequado. Posteriormente em 2014, o mesmo grupo desenvolveu uma

nanoemulsão contendo AIPc, obtendo um sistema monodisperso, estável e novamente com alta solubilidade.

1.2 Biomassa

1.2.1 Biomassa como fonte de energia

O uso de petróleo como principal fonte energética se mostra ineficiente, limitada e prejudicial ao ecossistema. Poucos países são responsáveis por suprir a demanda global, a custos de altas taxas de exportação, gerando instabilidade econômica e social (DAY; DAY, 2017). Além disso, os estoques fósseis são restritos e modelos preditivos estimam um declínio acentuado na produção anual de petróleo e gás para os próximos 20 anos (MICHAELIDES, 2017). Conseqüentemente, a substituição dos combustíveis fósseis por alternativas baratas, mais eficientes, mais abundantes e sobretudo de baixo impacto ambiental é a única alternativa para a manutenção do nosso atual padrão social.

De acordo com a publicação da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA), o termo biomassa pode ser definido como “grupo de produtos energéticos e matérias-primas renováveis, originados a partir da matéria orgânica formada por via biológica [...] (de origem animal ou vegetal) que pode ser utilizado para a produção de energia”. (MARAFON et al., 2016). Diferentemente dos recursos fósseis, a biomassa é um recurso renovável que pode ser produzida perpetuamente, desde que a fertilidade do solo seja mantida e os recursos hídricos preservados (SPEIRS; MCGLADE; SLADE, 2015).

Porém, existem complexas implicações acerca da produção de biomassa para fins energéticos, envolvendo principalmente o uso do solo. O estabelecimento de “crops energéticas” frequentemente geram conflitos com indústria alimentícia e madeireira, causando debates sobre conservação da biodiversidade, urbanização e geração de resíduos. No Brasil, o uso de biocombustíveis é notável desde a década de 70 e desde então o país deixou de utilizar 2,15 bilhões de barris de petróleo e evitou a emissão de 1,34 bilhões de toneladas de CO₂, pelo uso do etanol (MORANDI, 2019).

Embora a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar esteja em notável expansão, existe um déficit no aproveitamento de todo o potencial energético da cana de forma integral. Um dos subprodutos, o bagaço da cana-de-açúcar (BCA) ainda é pouco aproveitado e subutilizado tendo em vista a quantidade gerada. De acordo com os dados do Balanço Energético Nacional (BEN), a oferta de BCA foi de 157 milhões de toneladas apenas em 2018

(BRASIL, 2019). Ainda de acordo com o BEN, 45,3% da matriz energética brasileira é composta por fontes renováveis de energia, sendo que 17,4% desse total é provido pela biomassa da cana de açúcar, percentual que supera o quantitativo da energia hidráulica. No entanto, segundo Hollanda e colaboradores (2007) “A referida estatística, subestima a importância da cana na matriz energética ao omitir a energia das palhas, que pode ser transformada em energia junto com o bagaço e que tem um conteúdo energético aproximadamente equivalente ao do caldo e ao do bagaço da cana.”

Os resíduos agroindustriais não se limitam apenas aqueles provenientes da produção de biocombustíveis. Dentro da cadeia agropecuária existem inúmeros subprodutos de origem vegetal (frutas, oleaginosas, grãos, fibras, madeiras, etc) e origem animal (laticínios, avicultura de corte, aquicultura, etc) que apresentam diferentes constituintes com grande potencial de agregação de valor (ROSA; SANTAELLA, 2011). O farelo de trigo (FT) é um resíduo advindo do processamento do trigo e estima-se que 1 milhão de toneladas de trigo gere 0,25 milhão de toneladas FT (IKRAM-UL-HAQ, 2012). Levando em consideração dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO), a produção mundial de trigo em 2019 chegou a 2,7 bilhões de toneladas, o que significa que aproximadamente um quarto dessa quantidade foi gerada em resíduos de FT.

O farelo de trigo cobre até 14% do grão e é composto por três camadas (pericarpo, camada aleurona e testa) formadas por inúmeros tecidos (IKRAM-UL-HAQ, 2012). Em sua constituição encontra-se fibras de interesse dietético, polifenóis, fenóis, flavonoides e também polissacarídeos não-amido, que são de grande interesse para a indústria (IKRAM-UL-HAQ, 2012; STEVENSON et al., 2012). Em 100 g de FT não tratado encontra-se até 25,5 g de glicose e 20,3 g de xilose (tabela 1), o que naturalmente faz do FT um resíduo adequado para a concepção de biorrefinarias (REISINGER et al., 2013).

Tabela 1. Composição do farelo de trigo não tratado. Adaptado de Reisinger et al 2013.

Analito	g/100 g peso seco
Carboidratos totais	56,9
Amido	9,1
Glicose (total)	25,4
Xilose (total)	20,3
Arabinose (total)	9,3
Galactose (total)	1,9
Proteína Bruta	13,2
Cinzas	7,0
Gordura Bruta	4,3

Atualmente, a conversão e o uso de biomassa como fonte de energia visam a redução de subprodutos com conseqüente atenuação no impacto ambiental. O aproveitamento de resíduos resulta em agregação de valor, gerando novamente matéria prima a partir de processos essenciais, e garante a redução de custos de atividades chave, como a produção de etanol a partir da cana de açúcar, processamento de milho, soja e trigo. Porém, tais materiais são ricos em celulose, hemicelulose, lignina, xilana e outros polímeros de difícil processamento químico e físico.

1.2.2 Parede celular vegetal

A biomassa vegetal é o recurso mais abundante no planeta e seu principal constituinte é a celulose. Estima-se que anualmente as plantas produzam 180 bilhões de toneladas de celulose por ano. Sua versatilidade e estrutura permitem sua aplicação e desenvolvimento em inúmeros produtos como papel, tecidos, químicos, bioplásticos, fibrilas e nanomaterias. Segundo o Instituto Brasileiro de Árvores (IBA), no Brasil em 2018 foram produzidas mais de 20 milhões de toneladas de celulose proveniente do plantio de árvores. Tais dados colocam a celulose como um recurso importante do ponto de vista econômico e biotecnológico, sendo considerada uma commodity.

A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal, junto com a lignina, hemicelulose, pectina e proteínas. É um polímero formado por unidades de D-glicose, unidas covalentemente em cadeias lineares conectadas por ligações O-glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ (KUMAR GUPTA et al., 2019). As cadeias lineares, quando agrupadas de forma paralela, formam microfibrilas que se mantêm coesas por ligações de hidrogênio, as microfibrilas apresentam domínios ordenados, denominados cristalinos, e domínios amorfos. As fibrilas se sobrepõem formando camadas que interagem com os outros componentes que constituem a matriz da parede celular (DHYANI; BHASKAR, 2019; KHANDELWAL; WINDLE, 2013; KOVALENKO, 2010). Tal arquitetura resulta em um material resistente, recalcitrante e de alto poder estrutural cuja hierarquia organizacional pode ser observada na figura 4.

Mais um componente da parede celular, a hemicelulose, é um polímero heterogêneo de cadeias curtas e ramificadas, formado pela mistura de diversos açúcares (hexoses, pentoses e ácido urânico). Este possui menor grau de polimerização do que a celulose e se liga a esta via ligações de hidrogênio, geralmente cobrindo as microfibrilas. Devido a estrutura amorfa, sua hidrólise é relativamente fácil resultando em pentoses xilose e arabinose (HAGHIGHI MOOD et al.,

2013; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Outro polímero heterogêneo presente é a lignina. Sua composição é variável, mas de forma geral encontram-se hidroxifenil, guaicil e álcool-sinapílico como unidades formadoras. Sua estrutura tridimensional é complexa, de alta recalcitrância e está firmemente ligada na celulose e hemicelulose. A lignina confere à parede vegetal uma estrutura rígida, impermeável e resistente à ataque microbiano e estresse oxidativo (PONNUSAMY et al., 2019).

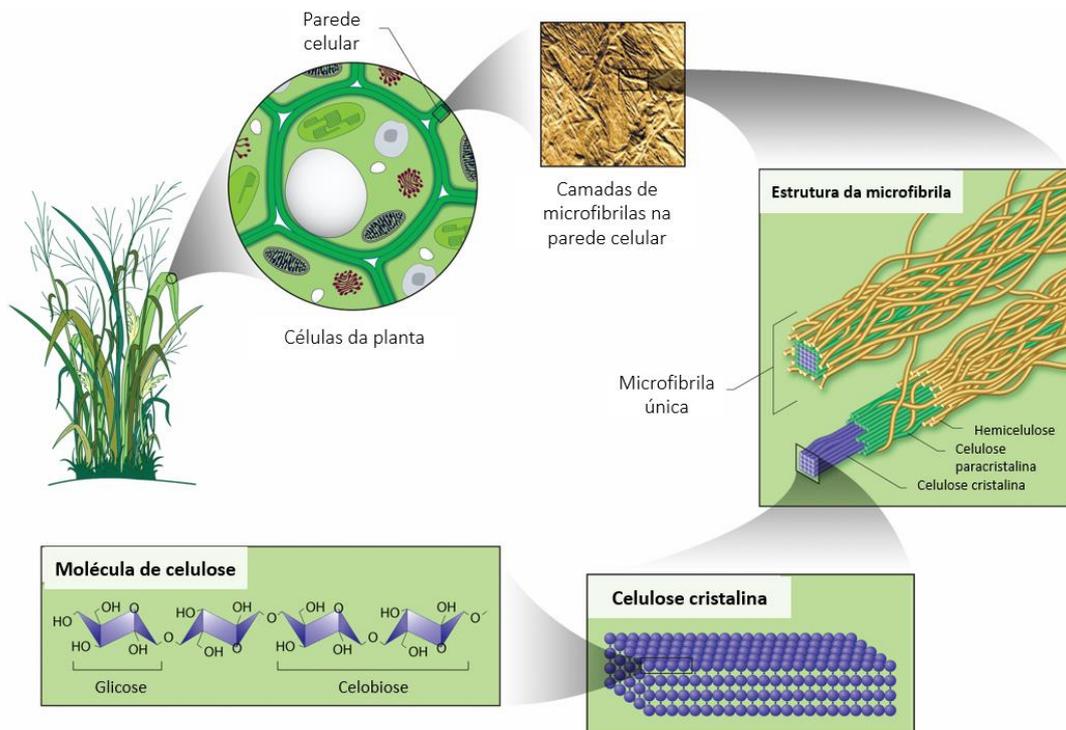


Figura 4. Organização da hierarquia da parede celular vegetal. Imagem adaptada de <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181&topic=&citation=&general=Cellulose&restsection=all>.

Parte da força e recalcitrância da estrutura celulósica vem de suas ligações de hidrogênio inter e intracadeias (HARMSSEN et al., 2010). Longas microfibrilas de celulose com alto grau de polimerização costumam apresentar densas regiões cristalinas que são pouco acessíveis quimicamente, insolúveis em água e de difícil hidrólise (DHYANI; BHASKAR, 2019). Pré-tratamentos físicos e químicos visam a quebra da recalcitrância da celulose. Frequentemente se utiliza de temperatura elevada como forma de fornecer energia o suficiente para a quebra das ligações entre as fibrilas, tornando o polímero mais acessível para hidrólise (HARMSSEN et al., 2010). Diversos tipos de pré-tratamentos são atualmente utilizados na indústria (tabela 2), a depender da origem e do destino da matéria lignocelulósica. Entretanto, tais tratamentos envolvem um passo a mais no processamento da biomassa, podendo causar impacto no preço de um produto derivado.

Materiais nanoestruturados podem ser obtidos a partir da celulose através de abordagens *top-down* resultando em nanocrstais e, nanofibrilas, assim como curtas fibras cristalinas nanométricas denominadas *whiskers*. Tais materiais apresentam mudanças significativas nas suas propriedades elétricas, ópticas, magnéticas, ferromagnéticas e de condutividade. Portanto são extensivamente utilizados como emulsificantes, espessantes, estabilizantes na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (AZIZI SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005; FATHI; KARIM; AHMADI, 2019).

Tabela 2. Principais pré-tratamentos utilizados na indústria de etanol celulósico. Adaptado de Kumar and Sharma (2017).

Químico	Físico	Físicoquímico	Biológico
Extrusão mecânica	Tratamento ácido		
Moagem	Tratamento alcalino	Explosão a vapor	Degradação fúngica
Microondas	Ozonolise	Explosão com CO ₂	Degradação bacteriana e por
Ultrassom	Organosolv	Oxidação	arquea
Pirólise	Líquidos iônicos	Oxidação úmida	
Pulso elétrico	Solventes eutéticos		

1.2.3 A hidrólise enzimática da parede vegetal

Na natureza a degradação de plantas é realizada primariamente por enzimas secretadas por fungos e outros microorganismos, uma vez que estes usam a biomassa como principal fonte de carbono. Conseqüentemente, diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo buscam nos fungos filamentosos novas e potentes linhagens capazes de suprir a demanda existente no mercado. A hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica em açúcares mais simples requer a cooperação e a sinergia de enzimas que degradem celulose (endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), β -glicosidases (EC 3.2.1.21)), hemicelulose (endoxilanasas (EC 3.2.1.8), mananasas, β -xilosidases (EC 3.2.1.3), β -manosidades e outras) e lignina (manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e lacases) (VALENCIA; CHAMBERGO, 2013).

Entende-se por celulasas o complexo enzimático formado por pelo menos três tipos de enzimas que são capazes de romper as ligações glicosídicas, resultando na liberação de monômeros de glicose (CHAMPREDA et al., 2019). Como pode ser visto na figura 5, primeiramente as endoglucanases agem internamente nas fibras de celulose, rompendo ligações de forma aleatória, produzindo extremidades reductoras e não-reductoras que serão alvo das

celobiohidrolases que clivam as ligações entre os açúcares produzindo celbiose (dímero de glicose com ligação B-1,4) e monômeros livres. Em seguida, as β -glicosidasases (BGL) agem nos dímeros de glicose, realizando então a sacarificação total da celulose (SINGHANIA et al., 2016). Sabe-se que muitas BGL provenientes de fungos filamentosos são inibidas tanto pelo substrato (celbiose), quanto pelo seu produto (glicose), o que compromete o uso de tais enzimas na indústria e incentiva a busca por enzimas mais tolerantes.

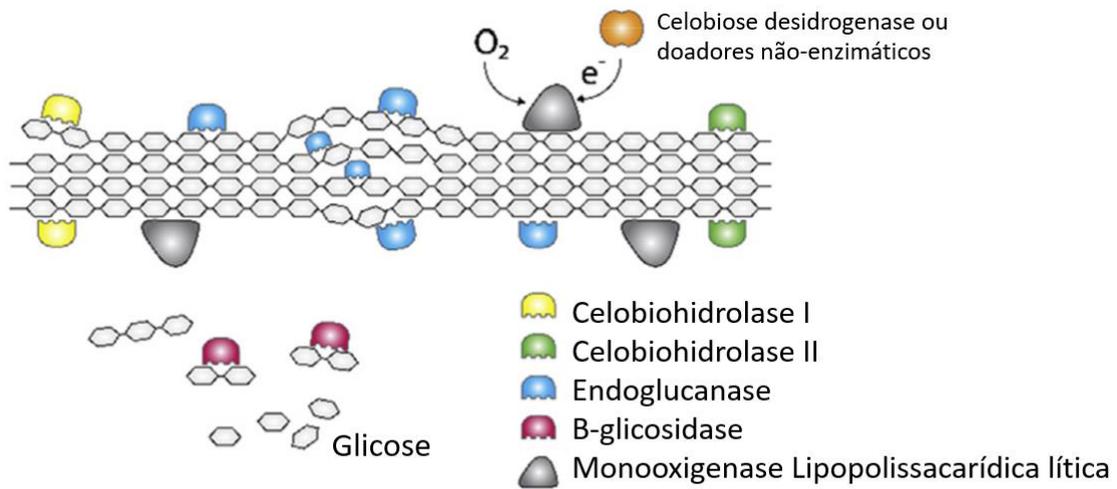


Figura 5. Hidrólise enzimática da celulose cristalina. Na imagem são destacadas a ação sinérgica dos três tipos de enzimas envolvidos. Primeiramente agem as Endoglucanases, seguidas das celobiohidrolases e por fim β -glicosidasases. Efeitores não enzimáticos como as Monooxigenases Lipopolissacarídicas líticas também são exibidos. Adaptado de Champreda et al 2019.

Além da ação de hidrolases, o sistema de degradação de biomassa necessita do auxílio de proteínas sinérgicas não hidrolíticas. Tais proteínas não possuem função de despolimerização direta dos componentes da parede celular, mas realizam modificações estruturais relevantes que permitem maior acessibilidade das hidrolases (figura 6) (KIM et al., 2014). Pectinases e xilanases também fazem parte do conjunto de enzimas facilitadoras do processo e são frequentemente chamadas de “enzimas acessório”, e atuam na remoção de polissacarídeos não-celulósicos, mas que cobrem as fibras de celulose. Quando tais enzimas são adicionadas à preparados enzimáticos compostos somente por celulasas observa-se o aumento da capacidade hidrolítica com menos proteínas, gerando otimização do processo de despolimerização da celulose (BERLIN et al., 2007).

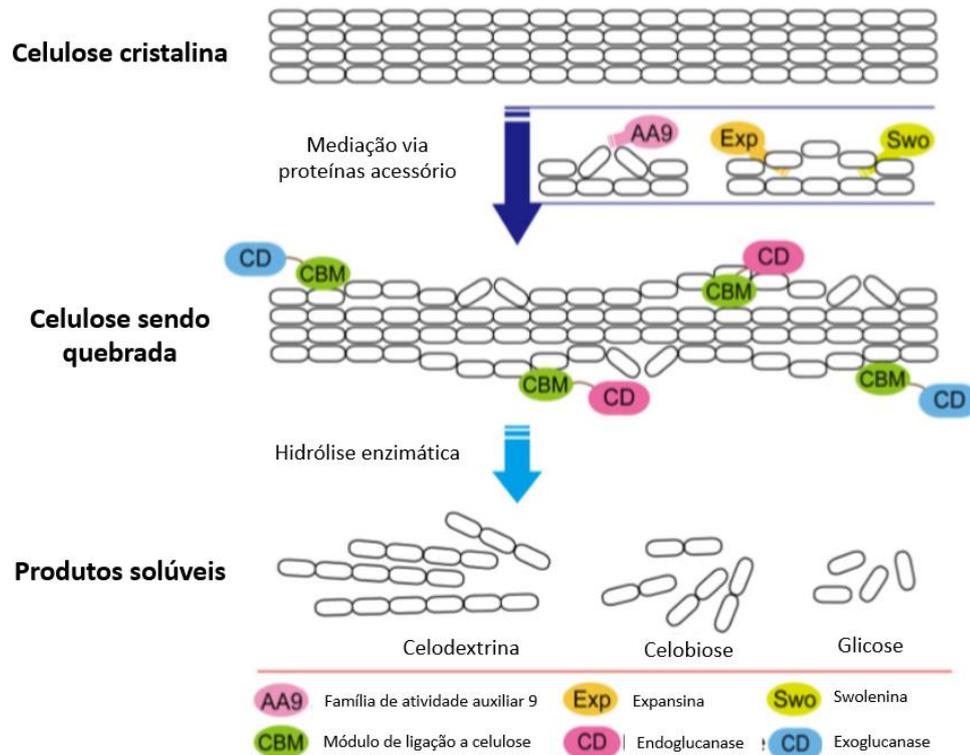


Figura 6. Ação de proteínas sinérgicas na degradação de celulose. Destaca-se proteínas auxiliaadoras, expansinas e swoleninas, seguida da ação de endo e exoglucanases. Adaptado de Kim et al (2014).

Os mecanismos exatos de todas as proteínas sinérgicas não hidrolíticas ainda não são completamente elucidados, mas módulos de ligação ao carboidrato, expansinas, swoleninas e monooxigenases lipopolissacarídicas líticas (LPMOs) são alguns exemplos extensivamente estudados e descritos (KIM et al., 2014).

1.3 Fungos Filamentosos e sua importância industrial

Fungos filamentosos são organismos eucarióticos, com distribuição global presente nos mais diversos ambientes e ecossistemas. Na natureza possuem papel central na decomposição da matéria, imobilização e ciclagem de nutrientes. Sua estrutura celular única permite a captação de recursos e sua distribuição de forma descentralizada, de modo que estruturas celulares distantes, com pouco acesso a nutrientes consigam manter sua integridade (IN et al 2004). Dentro da Biotecnologia industrial, fungos filamentosos têm sido explorados para a produção em larga escala de ácidos orgânicos, proteínas, pigmentos, enzimas e antibióticos, com aplicações no mercado de alimentos, bebidas, farmácia, papel e polpa, detergentes, indústria têxtil e de biocombustíveis. (FOUILLAUD et al., 2014; MEYER et al., 2016; SHOW et al., 2015).

Destaca-se o uso de diversas espécies do gênero *Aspergillus* para a produção de ácido ascórbico, tal fungo é capaz de crescer em substratos baratos, possui fácil manutenção e produz grande quantidade de ácido ascórbico por vias fermentativas (SHOW et al., 2015). Estudado por mais de 50 anos, o sistema celulolítico do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é referência e suas enzimas são comercializadas mundialmente e aplicadas em processos industriais que envolvem a despolimerização da celulose (KESHAVARZ; KHALESI, 2016). Além dos organismos modelos, estudos ressaltam inúmeros fungos capazes de secretar enzimas com produtividade, estabilidade e rendimento para o processamento de resíduos industriais. Entre eles, destacamos os fungos *Humicola grisea var thermoidea* e *Penicillium echinulatum* como potenciais fontes enzimáticas que junto com o uso de pré-tratamentos podem ser aplicados em sistemas de despolimerização para acesso da energia inerente da biomassa, conforme esquematizado na figura 7.

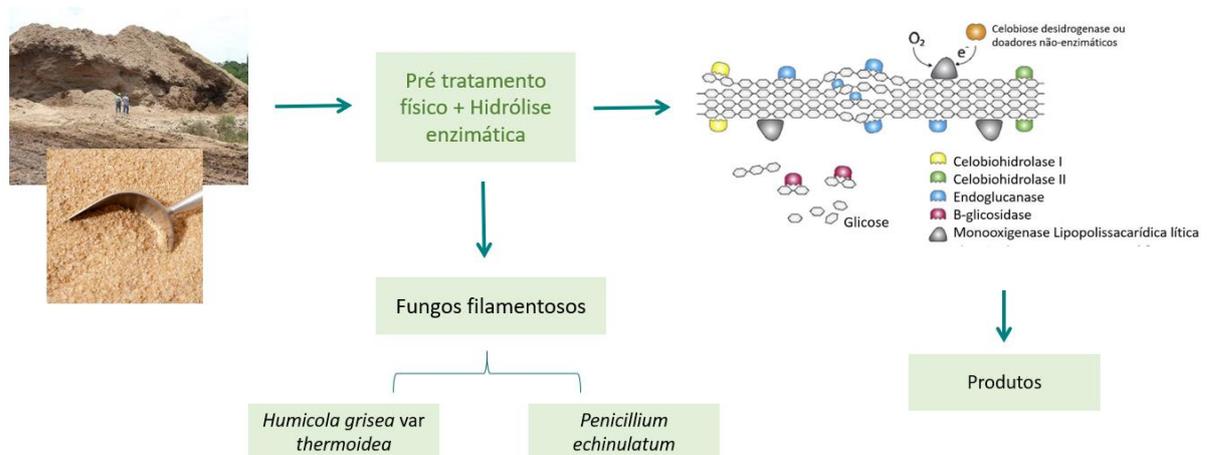


Figura 7. Representação esquemática da hidrólise de resíduos agroindustriais, nesse caso Bagaço de cana-de-açúcar e Farelo de Trigo, via associação de tratamentos físicos com hidrólise enzimática utilizando os fungos filamentosos *Humicola grisea var thermoidea* e *Penicillium echinulatum*, para geração de produtos com valor agregado.

1.3.1 *Humicola grisea var thermoidea*

Primeiramente descrito por Traaen em 1924, o gênero *Humicola* possui como principais características morfológicas esporos unicelulares pigmentados e com espessa parede celular (WANG et al., 2019). Atualmente existem registro de mais de 50 espécies dentro do gênero, frequentemente isoladas do solo, rizosfera, compostagem e pelo de animais (Referência). Em especial, *Humicola grisea var. thermoidea* (MB349549), é um termofílico moderado que foi isolado a partir de compostagem e descrito pela primeira vez por Chaves em 1982. Com

crescimento ótimo entre 40 e 42°C, tal microrganismo é capaz de produzir hidrolases termoestáveis. Pelo menos 6 β -glicosidases (TAKASHIMA et al., 1996), celulasas (AZEVEDO et al., 1990; POÇAS-FONSECA et al., 1997; POÇAS-FONSECA et al., 2000), xilanases (DA-SILVA et al., 1994; MONTI et al., 1991), amilases (OLIVEIRA et al., 1991) e trealases (CARDELLO et al., 1994 ; ZIMMERMANN et al., 1990).

Os genes de *H. grisea* var. *thermoidea thermoidea* responsáveis pela degradação de biomassa complexa têm sua expressão promovida na presença do bagaço de cana de açúcar como substrato (DE-PAULA et al., 1999; MELLO-DE-SOUSA et al., 2011). O isolamento, caracterização, análise de regulação e expressão heteróloga de genes de celulase e xilanase de *H. grisea* reforçam o potencial desse micro-organismo para aplicações industriais e em estratégias de conservação ambiental ao converter resíduos agrícolas em produtos úteis como adubo, ração animal e biocombustíveis. Pode-se destacar a endoglucanase (egl2) termoestável que foi clonada, sequenciada e expressa em *Aspergillus oryzae*, demonstrando uma alta atividade em carboximetilcelulose, temperatura ótima de 75°C, e atividade significativa em avicel e xilana (TAKASHIMA et al., 1997); a xilanase 2, foi expressa sob o promotor de celobiohidrolase de *Trichoderma reesei*, e secretada na presença de Avicel-lactose como fonte de carbono, onde a atividade enzimática se mostrou superior com relação a do hospedeiro (DE FARIA et al., 2002); o gene da β -Glicosidase-4 expresso em *Saccharomyces cerevisiae*, cujo proteína obtida, além de resistente a inibição por glicose, mostrou-se termoestável com atividade ótima a 40°C em pH 6,0 podendo ser aplicada em processos de sacarificação de resíduos lignocelulíticos (BENOLIEL et al., 2010).

Em *H. grisea* a regulação de celobiohidrolases, endoglucanases e exoglucanases, estão atreladas aos fatores de transcrição dependentes de fonte de carbono, pacC e creA. Ambos são modulados pelo pH, sendo o pacC induzido em condições alcalinas e fortemente reprimido na presença de glicose, e o creA induzido por glicose e reprimido em condições alcalinas (MELLO-DE-SOUSA et al., 2011) Recentemente, buscando compreender melhor a regulação em níveis moleculares, utilizou-se da droga epigenética 5-aza-2'-deoxicitidina, um inibidor da atividade de DNA-metiltransferase, durante o crescimento do fungo em resíduos agroindústrias, onde obteve-se aumento da atividade de xilanase após crescimento em farelo de trigo, e aumento no acúmulo de transcritos de celobiohidrolases, endoglucanases, xilanases, na presença da droga, mesmo em condições em que tais enzimas estão normalmente reprimidas. Além disso também houve maior acúmulo de transcritos dos genes moduladores creA e pacC quando o fungo foi tratado com 5-aza (MANFRÃO-NETTO et al., 2017).

1.2.3 *Penicillium echinulatum*

Distribuído globalmente, o gênero *Penicillium* possui mais de 354 espécies descritas, com alta relevância para a biotecnologia (VISAGIE et al., 2014). Desde a descoberta da penicilina em 1929 fungos desse gênero têm sido amplamente explorados nos mais diversos produtos e processos: na indústria alimentícia, farmacêutica, biorremediação, produção de gases, pigmentos, químicos e enzimas lignocelulolíticas (SHARAF et al., 2016). Diversos metabólitos secundários com atividades antimicrobianas, antitumorais, imunomoduladoras, antiviral, e inseticidas também já foram descritas (FRISVAD et al., 2004).

O complexo celulolítico de *Penicillium echinulatum* mostra potencial similar ao de *Trichoderma reesei*, com semelhante atividade enzimática em Papel Filtro (FP) e carboximetilcelulose (CMC), além de atividade 4,3 vezes maior em celobiose (Martins et al 2008). Ademais, suas enzimas hidrolíticas possuem boa estabilidade térmica, pH ótimo entre 4,5 e 5,0 e boa proporção de BGLs, com relação a atividade em PF, resultando em boa hidrólise enzimática sem necessidade de suplementação com outras enzimas (CAMASSOLA et al., 2004).

A exposição de conídios de *P. echinulatum* linhagem 2HH a agentes mutagênicos (luz ultravioleta e peróxido de hidrogênio) revelou-se uma boa estratégia para obtenção de linhagens mais eficientes em degradação de celulose. De tal abordagem obteve-se *P. echinulatum* linhagem 9A0S1 com maior atividade de BGLs em cultura submersa quando comparada com outras linhagens também provenientes de mutagênese (DILLON et al., 2006). Além de alta de produção das mesmas enzimas durante fermentação em estado sólido usando como substrato BCA pré-tratado junto com FT (CAMASSOLA; DILLON, 2007). Outra linhagem de *P. echinulatum* obtida via mutagênese teve seu secretoma analisado. Os resultados demonstraram que glicosil-hidrolases eram as proteínas mais abundantes e que proteínas relacionadas com degradação de lignina também estavam presentes quando o fungo foi cultivado em BCA (SCHNEIDER et al., 2016).

2. Justificativa

É evidente que o uso do TFD deve ser explorado em outros campos, buscando elucidação de possíveis efeitos além da inativação e citotoxicidade. Assim sendo, esse trabalho visou a investigar o potencial efeito do TFD sobre aspectos metabólicos de fungos filamentosos, dada sua relevância na biotecnologia, já que estes são um dos principais bioconversores e bioprodutores da atualidade. Para tanto, foi avaliada a susceptibilidade de dois fungos filamentosos, *H. grisea* e *P. echinulatum*, ao TFD mediado por AlPc-NE, assim como a implicação do TFD na hidrólise dos substratos agroindustriais BCA e FT.

3. Objetivo Geral

Analisar o efeito do TFD mediada pela nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina(AIPc-NE) sobre a produção de hidrolases em *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Penicillium echinulatum*.

3.1 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade de incorporação do AIPc-NE por filamentos de *H. grisea* var *thermoidea* e *P. echinulatum*.
- Verificar viabilidade dos fungos filamentosos após o TFD mediada por AIPc-NE.
- Avaliar os possíveis efeitos do TFD mediado por AIPc-NE sobre a secreção de proteínas totais solúveis;
- Verificar a capacidade antioxidante total do sobrenadante de cultura de *H. grisea* e *P. echinulatum* submetidos ao TFD mediado por AIPc-NE.
- Avaliar os possíveis efeitos do TFD mediado por AIPc-NE sobre a secreção de enzimas hidrolíticas, mais especificamente na atividade de endoglucanases, xilaanses e FPases.

4 Materiais e métodos

4.1 Obtenção e manutenção dos microrganismos

Foi utilizada a linhagem de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, linhagem selvagem isolada do solo brasileiro (ARAUJO et al., 1983). E a linhagem de *Penicillium echinulatum* 9A02S1, pertencente a coleção de microrganismos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rio Grande do Sul. Linhagem cedida pelo Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon (UCS).

Esporos de *H. grisea* foram obtidos após 5 dias de crescimento em meio sólido ágar-aveia (descrito na seção seguinte), 42 °C. Os esporos foram removidos da placa, filtrados, contados em câmara de Neubauer e armazenados em 35% de glicerol a 4 °C. Conídeos de *P. echinulatum* foram obtidos após 5 dias de crescimento em meio ágar-dextrose-batata (BDA) a 28 °C, o procedimento de estoque foi o mesmo adotado para *H. grisea*.

4.2 Meios de crescimento e soluções

Os meios e soluções descritos a seguir foram sempre preparados utilizando água destilada. O pH foi ajustado com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 1 M ou 2 M e em seguida as soluções e meios foram esterilizados em autoclave por 120 °C por 20 min. Em todos os meios de cultura foram adicionados ampicilina para a concentração final de 100 µg/mL previamente ao inóculo dos microrganismos.

4.2.1 Soluções gerais

As soluções utilizadas foram realizadas de acordo com o descrito na tabela 3. Para diluição dos reagentes foi utilizada água destilada, a não ser quando especificado. Azida sódica em concentração final de 0,02% foi utilizada para evitar proliferação de microrganismos nos sobrenadantes coletados.

Tabela 3. Descrição das soluções utilizadas nos experimentos.

Solução	Composição	Observação
Solução estoque de ampicilina 100mg/ml	Ampicilina (Sigma-Aldrich [®]) - 2 g Etanol 70% - 20 mL	Diluir e esterilizar por filtração em membrana Milipore de 0,22 µm. Manter refrigerado e protegido da luz.
Salina 0,9%	NaCl - 9,0 g Água destilada (q.s.p.) - 1,0 L	
Azida sódica 10%	Azida sódica - 10 g Água destilada (q.s.p.) - 100,0 mL	Diluir e esterilizar por filtração em membrana Milipore de 0,22 µm. Usar em concentração final de 0,02%.

4.2.2 Meios e soluções para *Humicola grisea*

Os meios de cultura e soluções para *H. grisea* foram realizados conforme descrito nas tabelas 4 e 5. Quando necessário o pH foi ajustado utilizando soluções de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 1 M ou 2 M. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 120 °C durante 20 min. Em todos os meios de cultura foram adicionados ampicilina para a concentração final de 100 µg/mL previamente ao inóculo dos microrganismos.

Tabela 4. Descrição das soluções utilizadas para manutenção e cultivo de *Humicola grisea*.

Solução	Composição	Observações
Sais de Pontecorvo 1X (Pontecorvo et al., 1953)	NaNO ₃ - 6,00 g	Ajustar o pH para 6,8
	KCl - 0,50 g	
	KH ₂ PO ₄ - 1,50 g	
	MgSO ₄ 7H ₂ O - 0,50 g	
	ZnSO ₄ - 0,01 g	
	FeSO ₄ - 0,01 g	
	Água destilada (q.s.p.) - 1,0 L	
Solução de Elementos Traço (2000X)	C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O (ác. cítrico monohidratado) - 5,00 g	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O - 1,00 g	
	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O - 1,00 g	
	CuSO ₄ H ₂ O - 0,25 g	
	MnSO ₄ H ₂ O - 0,05 g	
	H ₃ BO ₃ - 0,05 g	
	Na ₂ MoO ₄ -H ₂ O - 0,05 g	
	Água destilada (q.s.p) estéril - 1,00 L	
Solução de Vitaminas (1000X)	Ácido nicotínico - 0,10 g	
	Ácido para-aminobenzóico - 0,01 g	
	Biotina - 0,20 mg	
	Piridoxina - 0,05 g	
	Riboflavina - 0,10 g	
	Tiamina - 0,05 g	
	Água destilada (q.s.p) - 100,00 mL	

Tabela 5. Descrição dos meios utilizadas para manutenção e cultivo de *Humicola grisea*

Meio	Composição	Observação
Meio ágar-aveia para a produção de esporos	Aveia (Quacker®) - 40 g Ágar bacteriológico - 15 g Água destilada (q.s.p.) - 1,0 L	Ajustar o pH para 7,2
	Sol. de Sais de Pontecorvo 10X - 100,0 mL	Ajustar o pH para 6,8
Meio Mínimo – usado para indução	Água destilada (q.s.p) - 1,0 L Fonte de carbono: Farelo de Trigo 1% (p/v) Bagaço de cana explodido a vapor 0,1% (p/v) Glicose 1% (p/v)	Autoclavar e após esfriar acrescentar: Soluções de elementos traço para 1X Soluções de Vitaminas para 1X
Meio Completo para obtenção de micélio	Glicose 1% - 10,0 g Solução de Sais de Pontecorvo 10X - 100,0 mL Peptona 0,1% (g/v) - 1,0 g Extrato de levedura 0,25% (g/v) - 2,5 g Água destilada (q.s.p) - 1,0 L	Ajustar o pH para 6,8 Acrescentar: Solução de Elementos Traço 1X Solução de Vitaminas 1X

4.2.3 Meios e soluções para *Penicillium echinulatum*

Os meios de cultura e soluções para *P. echinulatum* foram realizados conforme descrito nas tabelas 6 e 7. Quando necessário o pH foi ajustado utilizando soluções de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 1 M ou 2 M. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 120 °C durante 20 min. Nos meios contendo glicose, esta foi autoclavada separadamente e posteriormente adicionada. Em todos os meios de cultura foram adicionados ampicilina para a concentração final de 100 µg/mL previamente ao inóculo dos microrganismos.

Tabela 6. Descrição das soluções utilizadas para manutenção e cultivo de *Penicillium echinulatum*.

Solução	Composição	Observação
Solução de elementos traço	Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O - 40 mg	Ajustar pH para 2
	CuSO ₄ 5H ₂ O - 400 mg	
	FeSO ₄ 7H ₂ O - 800 mg	
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O - 8 mg	
	Água destilada (q.s.p) 1,0 L	
Solução se sais	KCl - 26 g	Autoclavar por 30min e incubar em shaker com agitação a 180 rpm/48 h. Em seguida adicionar 140 mL de água destilada estéril e homogeneizar.
	MgSO ₄ 7H ₂ O - 10 g	
	KH ₂ PO ₄ - 76 g	
	Solução de elementos traço 50 mL	
	Água destilada (q.s.p) - 1,0 L	
Celulose intumescida (2,5%)	Celufloc 200 [®] - 5 g	
	Água destilada (q.s.p) - 60 mL	
	Pérolas de vidro - 20 mL	

Tabela 7. Descrição dos meios utilizadas para manutenção e cultivo de *Penicillium echinulatum*

Meio	Composição	Observação
Meio ágar-dextrose-batata (BDA) para a produção de conídeos	BDA (Sigma-Aldrich®) - 37 g Água destilada (q.s.p) - 1,0 L Solução de sais 20 mL Água destilada (q.s.p) -1,0 L Fontes de carbono:	
Meio mínimo – usado para indução	Farelo de Trigo 1% (p/v) Bagaço de cana explodido a vapor 0,1% (p/v) Glicose 1% (p/v) Celulose intumescida 1% (v/v)	Ajustar o pH para 6,8
Meio completo – para obtenção de micélio	Extrato de Levedura - 5 g Peptona - 2 g Solução de Sais - 20 mL Glicose 3% (m/v) Água destilada (q.s.p) - 1,0 L	

4.3 Preparo e caracterização da AIPc-NE

A AIPc-NE foi produzida de acordo com o método de emulsificação espontânea previamente descrito pelo grupo (MUEHLMANN et al., 2015). Brevemente, em um preparo típico, adicionou-se em um béquer o surfactante, o óleo e o fotossensibilizante (AIPc) e, na sequência, adicionou-se água destilada. Em seguida, a mistura foi deixada sob agitação magnética branda a 60 °C por uma hora. Kolliphor EPL® foi utilizado como tensoativo e o óleo de rícino como solubilizante, na proporção de 3:1, respectivamente. A concentração de AIPc na nanoformulação final (AIPc-NE) foi de 40 µM.

A mensuração de parâmetros coloidais das nanoemulsões, especificamente o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PdI) e o potencial zeta, foi realizada com o equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-shire, UK) sob

temperatura ambiente e em 1 h após incubação sob condições de cultivo (25 °C e 42 °C) . As amostras sempre foram diluídas em salina 0,9% (1:100, v:v) e a leitura realizada em triplicata.

4.4 Microscopia de Fluorescência

Micélio, esporos e conídios foram expostos à nanoemulsão em concentrações de equivalentes a 600 nM e 20 µM de AlPc durante 30 min ou 2h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (15 000 g, 5 min), o pellet celular lavado 3 vezes com Salina 0,9% para remoção de fotossensibilizante não incorporado. O pellet foi resuspendido para volume original e 10 µL foram aplicados em lâminas que foram observadas em microscópio de fluorescência (LEICA, SP5, BRA).

4.5 Análise de internalização por fluorescência

Os fungos foram pré-cultivados em meio sólido até a formação de esporos: meio ágar-aveia 42° para *H. grisea* e BDA 28°C para *P. echinulatum*. Os esporos então foram cultivados por 24 h em meio líquido completo, em suas respectivas temperaturas e com agitação de 150 rpm para a obtenção de micélio. Para cada espécie, 10⁶ esporos e 1 mL micélio foram utilizados para a internalização. Os microrganismos foram incubados com diferentes concentrações de AlPc-NE (300 nM, 600 nM e 20 µM) e a internalização foi acompanhada durante 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, o pellet celular foi lavado com salina 0,9% e centrifugado novamente. A lise foi realizada com sulfóxido de dimetilo (DMSO) e pérolas de vidro por 30 min sob agitação em vórtex. A fluorescência do lisado foi lida em espectrofotômetro (EspectraMax, Ex: 370nm e Em: 680nm). Como controle negativo foram utilizadas células lisadas não tratadas, e como controle positivo foi empregada a AlPc-NE diluída em DMSO.

Para quantificação de fotossensibilizante internalizado, uma curva padrão foi realizada utilizando AlPc-NE diluída em DMSO nas seguintes concentrações: 50, 100, 150, 200, 300, 600, 900, 1200, 1500 e 20.000 nM. Foi realizada regressão linear e uma equação foi obtida, tal equação foi utilizada para mensurar a concentração de AlPc-NE internalizada pelos fungos.

4.8 Terapia fotodinâmica

O TFD foi padronizado e aplicada de forma similar em ambas as espécies. Um esquema representativo se encontra nas figuras 8 e 9.

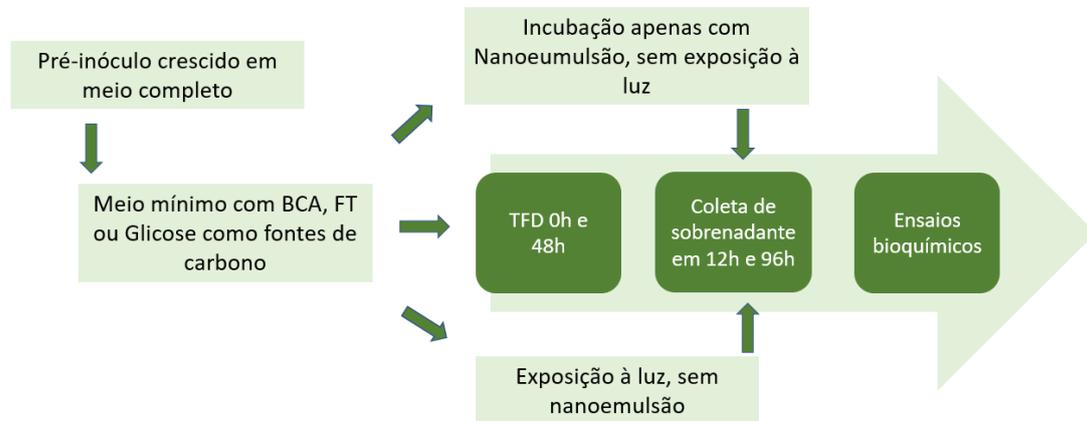


Figura 8. Desenho experimental das condições definidas para TFD (tratamento fotodinâmico) em *Hemicola grisea*. Esporos foram previamente inoculados em meio completo para obtenção de micélio, este então foi pesado e partes iguais incubadas nos respectivos meios contendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT) ou glicose nas condições experimentais (TFD, exposição à luz, exposição à nanoemulsão ou sem nenhum tratamento). Coletas foram realizadas em 12 e 96 h seguidas de ensaios bioquímicos.

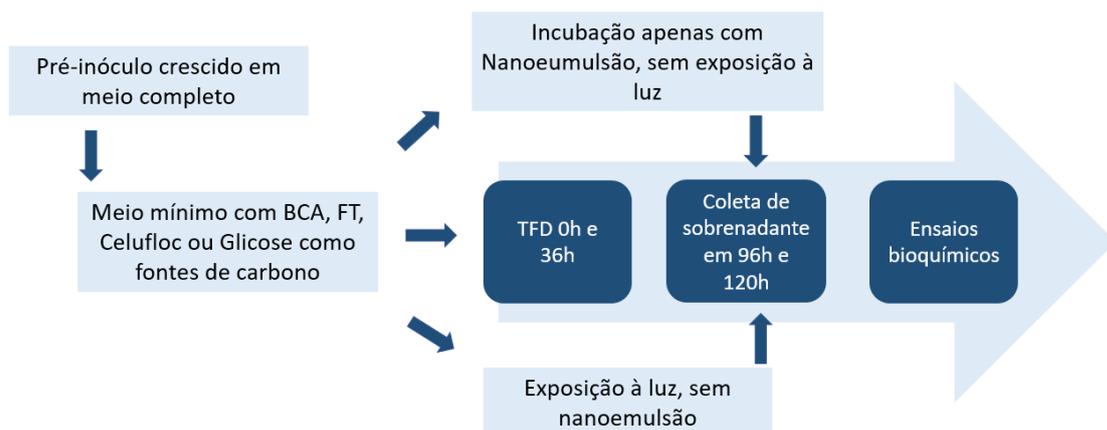


Figura 9. Desenho experimental das condições definidas para TFD (tratamento fotodinâmico) em *Penicillium echinulatum*. Esporos foram previamente inoculados em meio completo para obtenção de micélio, este então foi pesado e partes iguais incubadas nos respectivos meios contendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT) ou glicose, ou celulose intumescida nas condições experimentais (TFD, exposição à luz, exposição à nanoemulsão ou sem nenhum tratamento). Coletas foram realizadas em 96 e 120 h seguidas de ensaios bioquímicos.

4.8.1 TFD em *Hemicola grisea*

Esporos de *H. grisea* foram pré-cultivados em meio líquido completo a 42 °C 150 rpm por 24 h visando a produção de micélio. Utilizaram-se 2,0 g de micélio para cada condição.

Após seco e pesado, o micélio foi reidratado e centrifugado $3000 \times g$ por 5 min e sobrenadante descartado. Foi adicionada AIPc-NE para as concentrações testadas conforme tabela 8. Após homogeneização, o micélio junto com a nanoemulsão foi incubado protegido da luz a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1h e lavado com salina 0,9% logo em seguida. O micélio foi incubado em Erlenmeyers de 250 mL com os devidos substratos e condições controle descritas na tabela 8.

O TFD foi administrado no início do crescimento ($t=0$) e após o primeiro tempo de dobra estimado do fungo ($t=48 \text{ h}$), conforme desenho experimental esquematizado na figura 10. O tempo de dobra foi calculado levando em consideração a fase exponencial das curvas de crescimento em meio mínimo previamente realizadas. Para tanto, o coeficiente angular da fase exponencial foi considerado como a taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}), e aplicado na equação $\ln 2/\mu_{\text{max}}$.

O equipamento de LED utilizado foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza e colaboradores (Laboratório de Softwares e Instrumentação do Instituto de Física da Universidade de Brasília, DF), propicia iluminação em comprimento de onda específico de 660 nm e permite a configuração da fluência, tempo e distância da exposição. O TFD foi realizado seguindo os seguintes parâmetros: 50 mW/cm^2 , por 11 min com fluência total de aproximadamente 35 J/cm^2 a uma distância de 7cm. A potência e distância foram alteradas levando em consideração a transmissão de 90% (de acordo com o fabricante) do vidro de borossilicato utilizado para o crescimento do fungo. Foram removidas 10 mL da cultura após 12 h e 96 h de crescimento, a biomassa foi separada por centrifugação a 3000 g por 10 min e o sobrenadante mantido congelado com azida sódica em concentração final de 0,02%.

Humicola grisea var thermoidea

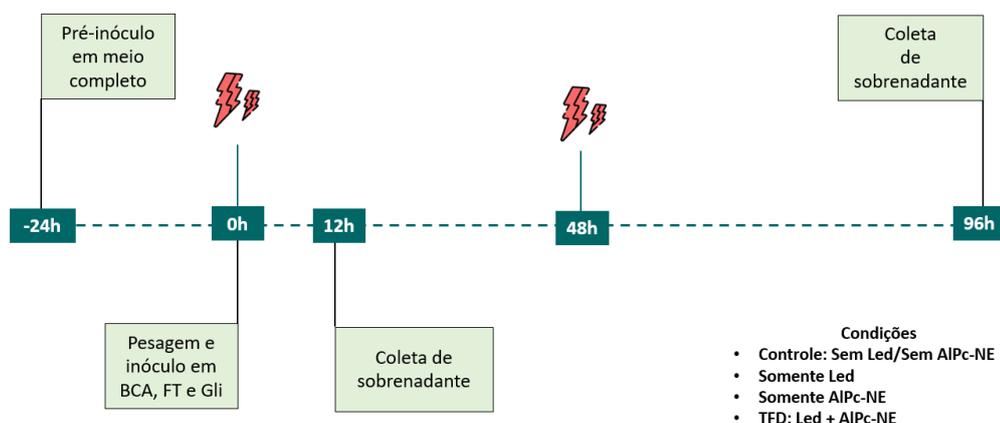


Figura 10. Esquema representativo da linha do tempo experimental para *Humicola grisea*. Em -24h esporos foram inoculados em meio completo; em 0h o micélio crescido foi inoculado em meio mínimo em seus respectivos substratos, bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT), ou glicose. Nos pontos de 0h e 48h o fungo foi exposto ao led no comprimento de 660 nm. Sobrenadantes foram retirados em 12 e 96 h de crescimento. As

condições experimentais envolvem controle sem tratamento, fungo exposto somente ao led, fungo exposto somente à Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc-NE).

4.8.2 TFD em *Penicillium echinulatum*

Uma dispersão de *P. echinulatum* foi inoculada em meio líquido para concentração final de 10^6 conídios/mL em completo a 28 °C 150 rpm por 96 h visando a produção de micélio. Utilizou-se 1,5 g de micélio para cada condição. Após seco e pesado, o micélio foi reidratado e centrifugado 3000 G por 10 min e sobrenadante descartado. Foi adicionada AlPc-NE para a concentração de trabalho conforme tabela 8. Após homogeneização, o micélio junto com a AlPc-NE foi incubado protegido da luz a 28 °C durante 1 h e lavado com salina 0,9% logo em seguida. O micélio foi incubado em Erlenmeyers de 250 mL com os devidos substratos e condições controle descritas na tabela 8.

O TFD foi realizado no início do crescimento ($t=0$) e após o primeiro tempo de dobra estimado do fungo ($t=36h$) conforme desenho experimental esquematizado na figura 11. O tempo de dobra da massa fúngica foi calculado levando em consideração a fase exponencial das curvas de crescimento em meio mínimo previamente realizadas. Para tanto, o coeficiente angular da fase exponencial foi considerado como a taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}), e aplicado na equação $\ln 2/\mu_{max}$.

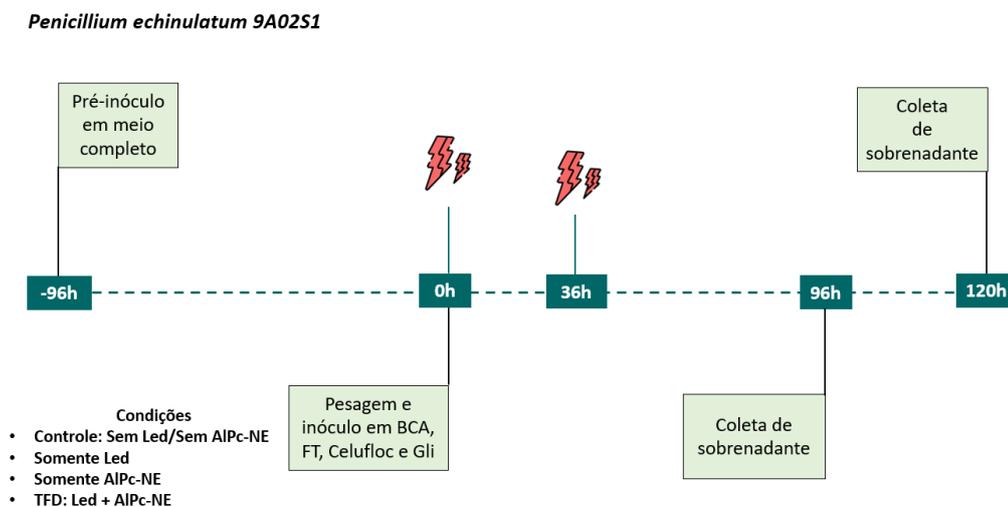


Figura 11. Esquema representativo da linha do tempo experimental para *Penicillium echinulatum*. Em -64h esporos foram inoculados em meio completo; em 0h o micélio crescido foi inoculado em meio mínimo em seus respectivos substratos, bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou farelo de trigo (FT), ou celufloc, ou glicose. Nos pontos de 0h e 36h o fungo foi exposto ao led no comprimento de 660 nm. Sobrenadantes foram retirados em 96 e 120 h de crescimento. As condições experimentais envolvem controle sem tratamento, fungo exposto somente ao led, fungo exposto somente à Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc-NE).

Tabela 8. Substratos utilizados para o crescimento e indução de hidrolases, concentração de AlPc-NE utilizada no TFD e condições experimentais em *Humicola grisea* e *Penicillium echinulatum*.

Fungo	Substrato	AlPc-NE (nM)	LED (~J/cm ²)
		0	
	FT 1%	300	
		600	
		20 000	
<i>H. grisea e</i> <i>P.echinulatum</i>	BCA explodido a vapor 1%	0	
		300	
		600	0 ou
		20 000	35
		0	
	Glicose 1%	300	
		600	
		0	
<i>P.echinulatum</i>	Celufloc 1%	300	
		600	

O equipamento de LED utilizado foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza e colaboradores (Laboratório de Softwares e Instrumentação do Instituto de Física da Universidade de Brasília, DF), propicia iluminação em comprimento de onda específico de 660 nm e permite a configuração da fluência, tempo e distância da exposição.

O TFD foi realizado seguindo os seguintes parâmetros: 50 mW/cm², por 11 min com fluência total de aproximadamente 35 J/cm² a uma distância de 7 cm. A potência e distância foram ajustadas levando em consideração a transmissão de 90% (de acordo com o fabricante) do vidro de borossilicato utilizado para o crescimento do fungo. Foram removidas 10 mL da cultura após 12 h e 96 h de crescimento, a biomassa foi separada por centrifugação a 3000 g por 10 min e o sobrenadante mantido congelado com azida sódica em concentração final de 0,02%.

4.9 Crescimento e viabilidade após TFD

A análise de crescimento de fungos filamentosos em microplaca foi adaptada de Meletiadis e colaboradores (2001). 10^3 Conídios e Esporos de *P. echinulatum* e *H. grisea*, respectivamente, foram crescidos em 200 μ L de meio mínimo ou completo, em microplaca de 96 poços, e a germinação acompanhada periodicamente via microscopia. Na formação das primeiras hifas, os fungos foram expostos a 20 μ M de AlPc-NE durante 1 h, seguida de lavagem com salina 0,9%. Posteriormente as culturas foram irradiadas com LED no comprimento de onda de 660 nm, 50 mW/cm², por 10min com fluência total de aproximadamente 35 J/cm² a uma distância de 7 cm. Após irradiação, as placas foram lidas em espectrômetro (Shimadzu UV-1800) no comprimento de onda de 405 nm a cada 30 min, durante 96 h para *H. grisea* e 192 h para *P. echinulatum*.

4.10 Ensaio Enzimáticos

4.10.1 Soluções para ensaios enzimáticos

Tabela 9. Descrição das soluções utilizadas para realização dos ensaios enzimáticos

Solução	Composição	Observação
Solução de DNS (MILLER, 1959)	Ácido dinitrosalicílico (DNS) - 10 g NaOH 2 M - 200 mL Tartarato de sódio e potássio - 300 g	O DNS deve ser diluído sob agitação e aquecimento, em seguida dissolver o tartarato de sódio e potássio em 500 mL de água destilada ou miliQ. Adicionar o DNS dissolvido na solução com tartarato de sódio e potássio e deixar em agitação sob aquecimento até a completa dissolução dos reagentes. Completar para 1000 mL com água destilada.
Tampão acetato de sódio 0,05M	Acetato de Sódio - 2,06 g Água destilada (q.s.p) - 500 mL	Ajustar o pH para 5,0
Solução Xilana 1%	Xilana Beechwood - 1 g NaOH 1 M – 20 mL HCl 1M – 20mL Tampão acetato de sódio 100 mM – q.s.p 100 mL	Ajustar pH para 5. A solução deve ser centrifugada de 15 a 20 minutos a 10 000 G para separação da parte solúvel. O sobrenadante deve ser utilizado e o pellet removido.
Solução de Carboximetil-celulose (CMC) 4 %.	CMC baixa viscosidade – 4 g Tampão acetato de sódio - 0,05M (q.s.p) 100 mL	Deixar em agitação até a completa dissolução do CMC

4.10.2 Medidas de atividade enzimática

A atividade hidrolítica dos sobrenadantes foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise do substrato, utilizando o reagente DNS

(MILLER, 1959), com adaptações para microplaca (CHUNDAWAT; BALAN; DALE, 2008; YU et al., 2016).

A determinação da atividade de xilanases (endoxilanases e β -D-Xilosidase) foi feita usando xilana como substrato. Os ensaios enzimáticos foram realizados com incubação de 50 μ L da amostra enzimática e 450 μ L do substrato xilana beechwood 1% por 30 minutos a 50 °C. Para os controles as amostras enzimáticas foram adicionadas após o banho. Depois do tempo da incubação as amostras foram submetidas a um choque térmico em água com gelo por 5 minutos para inativação das enzimas do substrato. Em sequência foram adicionados 750 μ L de DNS e os tubos foram imersos em banho fervente durante 5 minutos. As atividades descritas acima foram medidas espectrofotometricamente (Shimadzu UV-1800) a 540 nm e o resultado foi expresso em μ mol de xilose formado por minuto e por mL de solução enzimática (UI/mL) (Ghose, 1987). Para conversão das medições de espectrofotometria em quantidade equivalente de xilose foi realizada uma curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações (100 μ g a 500 μ g/mL) desse monossacarídeo com o reagente DNS.

A determinação da atividade de CMCase foi feita usando CMC como substrato. Os ensaios enzimáticos foram realizados com incubação de 250 μ L da amostra enzimática e 250 μ L do substrato CMC 4% (Sigma-Aldrich®) por 60 minutos a 50 °C. Para os controles as amostras enzimáticas foram adicionadas após o banho. Em seguida foram adicionados 750 μ L de DNS e os tubos imersos em banho fervente durante 5 minutos. As atividades descritas acima foram medidas espectrofotometricamente a 540 nm e o resultado foi expresso em μ mol de glicose formado por minuto e por mL de solução enzimática (UI/mL) (Ghose, 1987). A curva de calibração foi realizada com diferentes concentrações de glicose (100 μ g a 500 μ g/mL).

4.11 Quantificação de proteínas solúveis

Para a análise qualitativa de proteínas foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976) seguindo-se o princípio de ligação proteína-corante. Utilizou-se o reagente de Bradford (Merck® B6916), segundo orientações do fabricante. Uma curva padrão foi realizada com soroalbumina bovina (BSA), e a equação obtida foi usada para mensuração da quantidade de proteína solúveis nos sobrenadantes obtidos.

4.12 Atividade Antioxidante total

O ensaio de capacidade antioxidante total por fosfomolibdênio foi adaptado de Prieto e colaboradores (1999). A solução reagente foi composta por Ácido sulfúrico a 0,6 M, molibdato de amônio 4 mM e fosfato de sódio 28 mM.

100 μ L de amostra contendo as espécies redutoras, neste caso o sobrenadante obtido, foi misturada com 900 μ L da solução reagente. Incubada a 95 °C por 90 min, em seguida resfriada até temperatura ambiente. Absorbância foi medida a 696 nm. Para o branco foi utilizada 1 mL da solução junto com 0,1 mL do solvente utilizado na amostra. Uma curva padrão com ácido ascórbico (estoque de 10 mg/mL) foi realizada e a equação da reta usada para mensuração da atividade antioxidante total do sobrenadante. O resultado foi expresso em porcentagem de Potencial de Redução do Fosfomolibdênio.

4.13 Análise Estatística

Os resultados apresentados referem-se a média \pm desvio padrão. Todos os dados foram obtidos em triplicata e experimentos realizados de forma independente. Para análise estatística foi utilizado análise de variância (ANOVA two-way), seguida de pós-teste de Tukey e para dados não normais foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Para todas as análises, o nível de significância (α) utilizado foi de 0,05. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o software GraphPad Prism 8.0.2 para Windows, San Diego, California USA, www.graphpad.com

5 Resultados

5.1 Caracterização físico-química da nanoemulsão

As características coloidais da AIPc-NE diluída em solução salina estão apresentadas na tabela 10. A análise dos dados revela a estabilidade da nanoemulsão em 42 °C, utilizada para o cultivo de *H. grisea*.

Tabela 10. Propriedades coloidais da AIPc-NE dispersa em salina 0,9% em temperatura ambiente e em 42 °C, sendo esta a temperatura de crescimento do fungo *Humicola grisea*

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
Temperatura Ambiente (~25 °C/1h)	25,85±0,28	0,162±0,02	-0,04±0,08
42 °C/1h	26,95±0,50	0,164±0,01	-2,00±0,54

5.2 Internalização de AIPc-NE

Com o objetivo de observar a capacidade de internalização da ftalocianina pelos fungos filamentosos *H. grisea* e *P. echinulatum*, foi utilizada a microscopia de fluorescência (figuras 12 e 13). A capacidade de internalização de nanoemulsões é amplamente descrita para células de mamíferos e leveduras, no entanto, registros para fungos filamentosos são escassos. Deste modo, diferentes concentrações da AIPc-NE foram utilizadas, buscando a observação da internalização da mesma pelos fungos em estado vegetativo. Em *H. grisea* observou-se que quando exposta à AIPc-NE na concentração de AIPc de 20 µM durante 30 min, foi possível observar a internalização do fotossensibilizante, com pico de internalização em 2 h de exposição (figuras 12C, D).

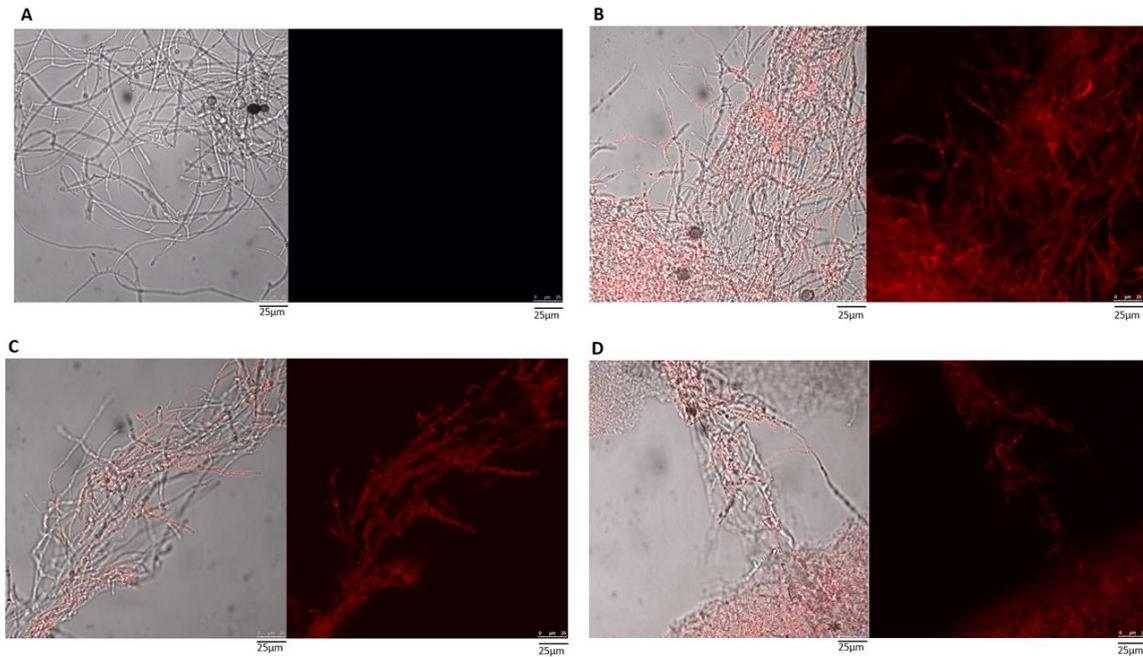


Figura 12. Micrografia de fluorescência de filamentos de *H. grisea* após incorporação AlPc em nanoemulsão. Imagens da esquerda correspondem a sobreposição do campo claro com o canal vermelho (633 nm). Imagens a direita correspondem somente ao canal vermelho. **A** – Controle não exposto. **B** – Exposição à 600 nM por 2h. **C** – Exposição à 20 μ M por 30 min. **D** - Exposição à 20 μ M por 2 h. AlPc: cloreto de alumínio-ftalocianina.

Em *P. echinulatum* foi possível observar o fotossensibilizante apenas após 2 h de exposição na concentração de 20 μ M (figura 13C). Em seguida, foi utilizada uma concentração menor: 600 nM por 2h, a qual permitiu observar a visualização do fotossensibilizante nos filamentos de ambos os fungos (figuras 12B e 13B).

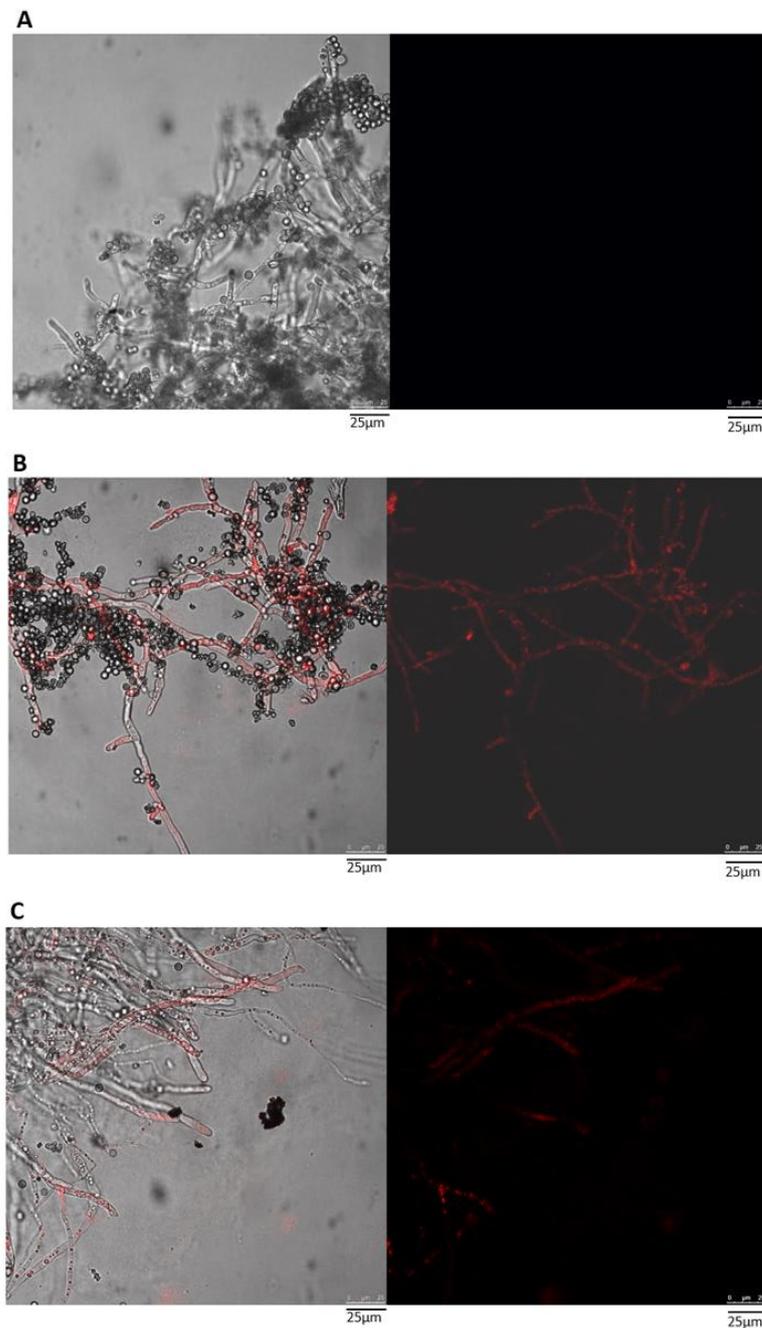


Figura 13. Micrografia de fluorescência de filamentos de *Penicillium echinulatum* após incorporação AIPc em nanoemulsão. Imagens da esquerda correspondem a sobreposição do campo claro com o canal vermelho (633 nm). Imagens a direita correspondem somente ao canal vermelho. **A** – Controle não exposto. **B** – Exposição à 600 nM por 2 h. **C** – Exposição à 20 μ M por 2 h. AIPc: cloreto de alumínio-ftalocianina.

Para verificar a quantidade de AIPc internalizada pelos fungos, foi traçada uma curva de intensidade de fluorescência em função da concentração de AIPc. Conforme observado na figura 14, há uma correlação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de AIPc-NE em solução salina. A partir da equação da reta obtida foi estimada, de forma

quantitativa, o total de AlPc internalizada pelos filamentos após exposição à AlPc-NE seguida de lise das células.

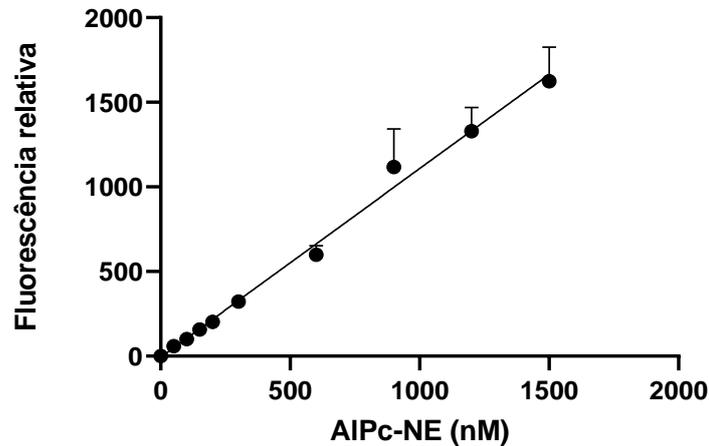


Figura 14. Gráfico da correlação entre fluorescência relativa e concentração de AlPc-NE (nM) livre em DMSO R = 0,9617. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. Curva obtida $Y = 1,114 * X - 5,666$.

As análises de fluorescência em fungos expostos à AlPc-NE mostraram que houve pouca variação na quantidade de fotossensibilizante internalizado em função da concentração inicial utilizada após o tempo de exposição de 1 h. Em *H. grisea*, excetuando a concentração de 20 μ M de NeAlFtc quando comparada com 300 e 1200 nM, todas as outras concentrações tiveram a mesma quantidade internalizada, sob análise estatística (figura 15A). O similar ocorreu em *P. echinulatum*, neste caso, todas as concentrações possibilitaram a mesma incorporação quando analisadas por vias estatísticas (figura 15B).

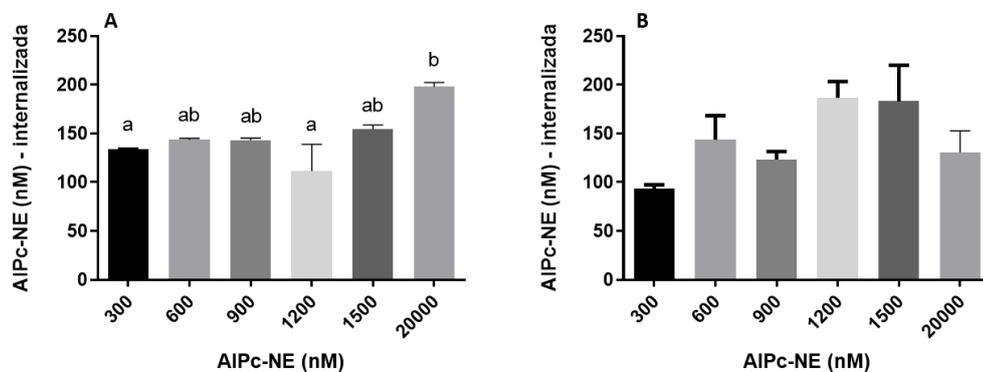


Figura 15. Quantidade cloreto de alumínio ftalocianina incorporada pelos filamentos fúngicos após 1h de exposição a diferentes concentrações de AlPc-NE (nM). A - *Humicola grisea*; “a” e “b” representam diferença estatística ($p < 0,005$). B - *Penicillium echinulatum*. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina.

Na sequência, foi verificado o perfil de internalização de AlPc-NE em diferentes tempos de exposição. Os filamentos foram expostos a concentrações de 300 nM, 600 nM e 20 μ M, conforme exposto na figura 13. Em *H. grisea*, notou-se que após 30 min houve uma estagnação

na incorporação de fotossensibilizante quando as células foram tratadas com 300 nM ou 600 nM (figuras 16A e B). Já ao se utilizar 20 μ M de AlPc-NE o tempo com maior retenção foi o de 180 min (figura 13C).

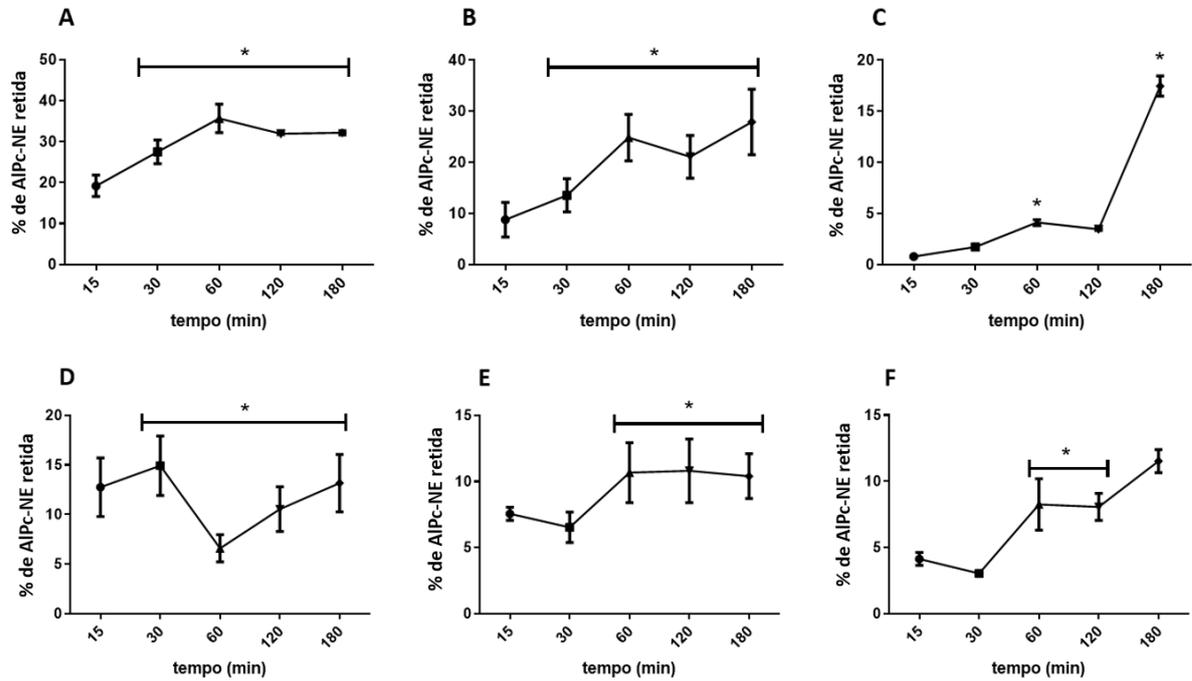


Figura 16. Análise da quantidade de cloreto de alumínio-ftalocianina internalizado com o passar do tempo, expresso em porcentagem do total exposto. **A** - *Humicola grisea* exposto a 300 nM. **B** - *Humicola grisea* exposto a 600 nM. **C** - *Humicola grisea* exposto a 20 μ M. **D** - *Penicillium echinulatum* exposto a 300 nM. **E** - *Penicillium echinulatum* exposto a 600 nM. **F** - *Penicillium echinulatum* exposto a 20 μ M. Asteriscos indicam diferença estatística entre os tempos de incubação. (*) $p < 0,05$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina.

Em *P. echinulatum* foram observados resultados similares aos obtidos para *H. grisea* nas concentrações de 300 e 600 nM, com retenção constante após 30 min de exposição (figura 16D e E). Já o perfil de retenção obtido em *P. echinulatum* com 20 μ M foi diferente do observado com *H. grisea*.

Levando em consideração os resultados obtidos e a viabilidade para o estabelecimento de um protocolo eficaz de TFD, o melhor tempo de exposição à AlPc-NE foi definido como o de 1 h, tanto para *H. grisea* quanto para *P. echinulatum*, já que não houve diferença significativa para exposição prolongada, nas concentrações de trabalho de AlPc-NE de 300 nM, 600 nM e 20 μ M para *H. grisea*, e 300 nM, 600 nM para *P. echinulatum*.

5.3 Viabilidade após TFD

Tendo em vista o potencial fungicida de eventos oxidativos, foi avaliada a viabilidade dos fungos submetidos ao TFD mediado por AIPc-NE. A figura 17 demonstra esse protocolo de TFD não alterou nem taxa nem o padrão de crescimento de ambas as espécies testadas. Ainda, não houve mudança significativa no padrão de crescimento de ambos os fungos após exposição somente a nanoemulsão ou à luz de maneira isolada. Diferenças foram encontradas apenas nos padrões de crescimento obtidos com diferentes meios – mínimo, ou completo – como esperado.

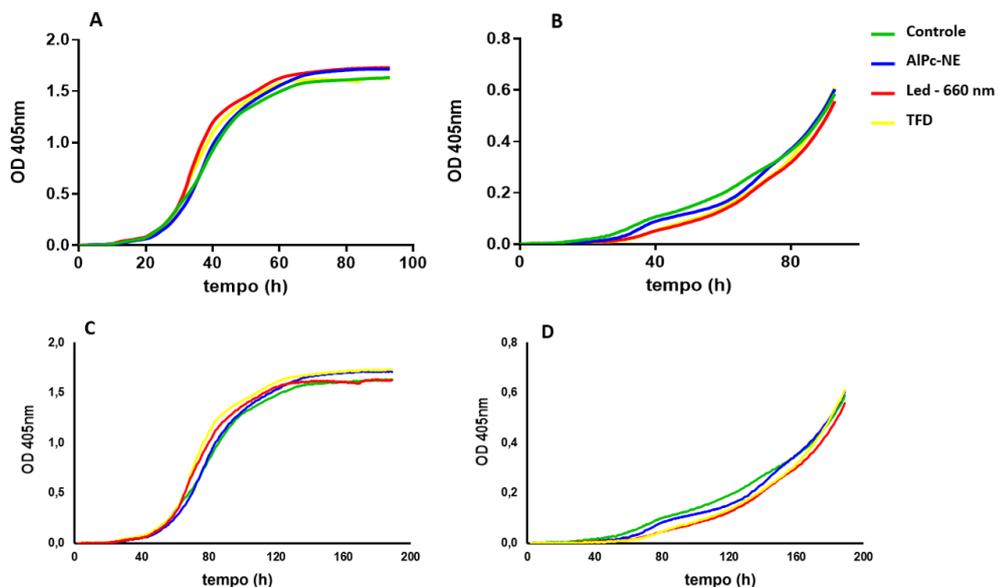


Figura 17. Curvas de crescimento de *Humicola grisea* em meio completo (A), e meio mínimo (B), e de *P. echinulatum* em meio completo (C), e meio mínimo (D). Em verde controle submetido apenas às condições normais de cultivo. Em azul, fungo exposto somente a 20 μ M de AIPc-NE; em vermelho exposição a luz no comprimento de onda de a TFD, e seus respectivos controles. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

5.4 Efeitos da TFD

Uma vez estabelecido os parâmetros do protocolo de TFD, foram definidos os substratos para crescimento fúngico. As seguintes análises têm como objetivo avaliar os possíveis efeitos do TFD na capacidade de secreção de proteínas, capacidade antioxidante total em sobrenadante e atividade de hidrolases nos fungos *H. grisea* e *P. echinulatum*.

5.4.1 Quantificação de proteínas solúveis totais para *H. grisea* e *P. echinulatum*

Quando o TFD foi realizado com 300 nM ou 600 nM de NeAlFtc, tendo BCA como substrato, foi observado um aumento significativo na quantidade de proteínas solúveis presentes, com relação ao controle, após 96 h de cultivo (Figuras 18A, D). O mesmo foi observado quando o fungo foi exposto somente a AlPc-NE. Com relação aos fungos expostos ao FT como substrato, obteve-se aumento da quantidade de proteínas, quando comparado com o controle, na presença somente do fotossensibilizante a 300 nM, na presença somente da luz e após TFD, em 12 h de crescimento (figura 18B). Após 96 h de crescimento não houve diferença entre as condições testadas com relação ao controle. Já quando os fungos foram expostos a 600 nM do fotossensibilizante, não foi observada diferença quanto à quantidade de proteína secretada durante as primeiras 12 h de crescimento, em 96 h houve redução no total quando na presença de fotossensibilizante e do TFD (figura 18E). Quando comparado ao crescimento com outras fontes de carbono, o crescimento em glicose resulta em pouca proteína secretada para o meio extracelular. A presença de fotossensibilizante na concentração de 300 nM reduziu ainda mais o total secretado após 12 h de crescimento (Figura 18C), e quando em 600 nM, após 96 h de cultura, houve redução significativa em todas as condições testadas (figura 18F).

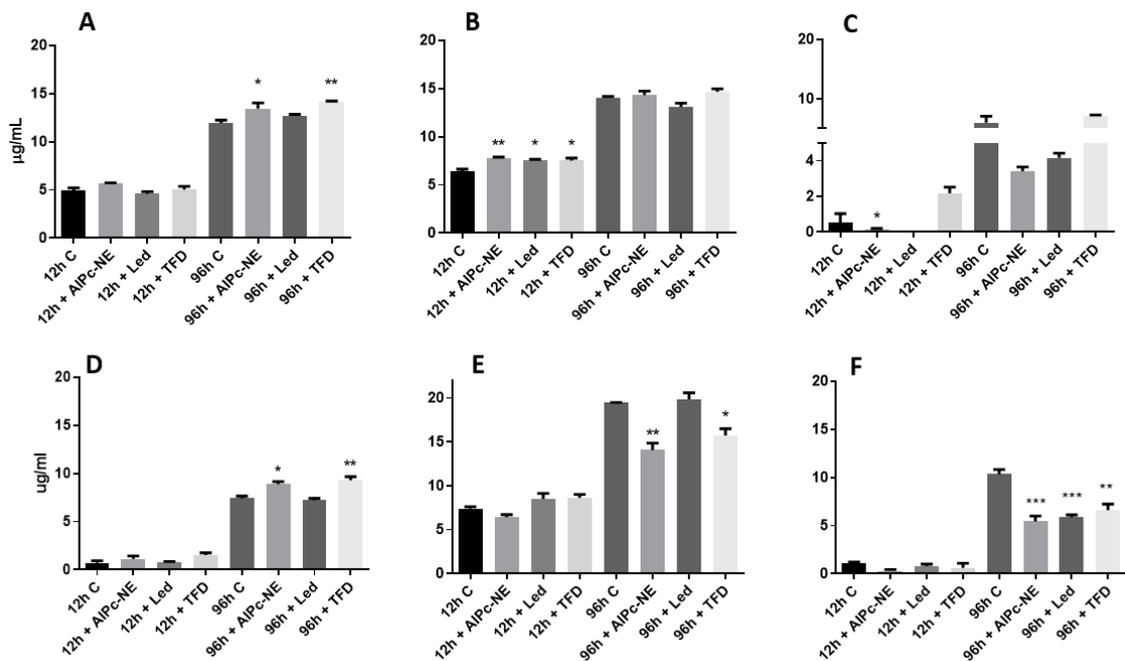


Figura 18. Quantificação de proteínas solúveis totais para *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo

controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

Em *P. echinulatum* após 96 h de crescimento em BCA observou-se um aumento na concentração de proteínas secretadas quando houve exposição ao fotossensibilizante na concentração de 300 nM, à luz e ao TFD. Após 120 h de crescimento o mesmo resultado foi observado, excetuando-se pela aplicação do TFD que não demonstrou diferença com relação ao controle (Figura 19A). No mesmo substrato, quando a concentração de AlPc-NE foi de 600 nM, houve aumento significativo após TFD, tanto em 96 h quanto em 120 h de crescimento (Figura 19E). No crescimento em FT, a exposição do fungo a 300 nM de AlPc-NE isoladamente, levou a redução na quantidade de proteínas nos dois tempos analisados. A exposição do fungo a luz também levou a redução, porém menos drástica com relação ao supracitado. O TFD aumentou a concentração total de proteínas secretadas após 120 h de crescimento (Figura 19B). Quando aos fungos expostos à AlPc-NE 600 nM, os resultados significativos foram redução da concentração de proteínas presentes no sobrenadante após exposição somente a luz, e após TFD (figura 19F).

Usando Celufloc[®] como substrato o TFD causou aumento no total de proteínas secretadas, após 96 h e 120 h, nas duas concentrações de AlPc-NE utilizadas (figuras 19C, G). Além disso, observou-se que a presença de 300 nM de AlPc-NE, unicamente, foi capaz de aumentar a concentração de proteína após 120 h de crescimento. Quanto ao crescimento em glicose, notou-se aumento na secreção de proteínas quando na presença de 300 nM de AlPc-NE, após 120h de crescimento (figura 19D). Ainda em glicose como substrato, quando utilizado 600 nM de AlPc-NE não foram observadas alterações estatisticamente significativas em todas as condições testadas (figura 19H).

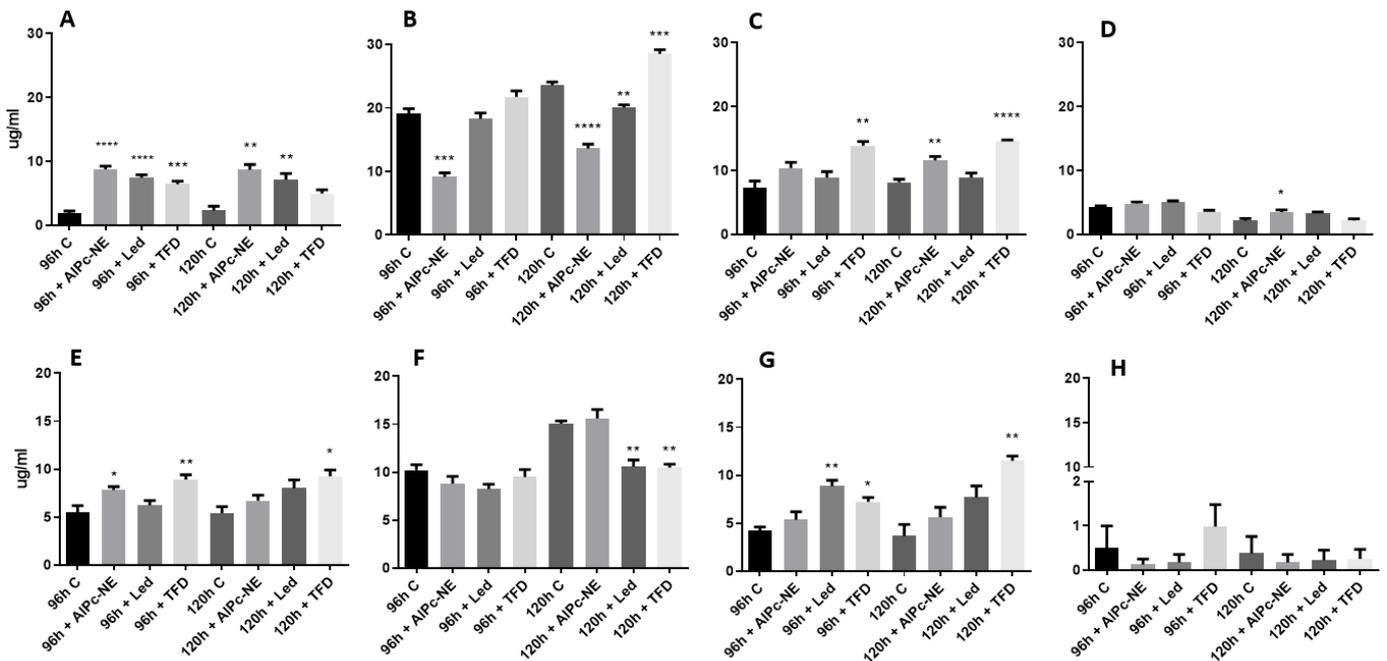


Figura 19. Quantificação de proteínas solúveis totais para *P. echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição a TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

5.4.2 Atividade antioxidante total para *H. grisea* e *P. echinulatum*

Após 12 h de crescimento foi observada redução da atividade antioxidante total em *H. grisea* submetido ao TFD com 300 nM de fotossensibilizante. Nas outras condições testadas (presença somente de AIPc-NE ou somente exposição à luz), foi observado um aumento com relação ao controle sem nenhuma condição experimental. Após 96 h não houve diferença estatística entre as condições testadas (figura 20A). Quando realizada com 600 nM de AIPc-NE, o TFD causou aumento na atividade antioxidante total apenas após 96 h de crescimento (figura 20). Em FT, o TFD causou redução da atividade com relação ao controle após 12 e 96 h de crescimento (figura 20B). No mesmo experimento, observou-se o aumento da atividade após exposição somente a luz (12 h de crescimento), e redução nas condições de exposição a AIPc-NE e luz, individualmente. Com 600 nM de fotossensibilizante, não houve diferença significativa nas condições experimentais após 12 h de crescimento em FT, porém em 96 h observou-se aumento com relação ao controle em todas as condições, inclusive TFD (figura 20E). A atividade antioxidante em glicose foi alterada na presença de 300 nM de AIPc-NE e

após TFD, resultando em redução com relação ao controle, após 12 h de crescimento. Após 96 h, observou-se redução nas condições de exposição a AIPc-NE e luz, individualmente, mas nenhuma diferença após TFD (figura 20C). Ainda em glicose, quando realizado TFD com 600 nM houve redução nos dois tempos testados. Além disso, também se observou redução na atividade antioxidante após exposição somente à AIPc-NE ou luz depois de 96 h de crescimento (figura 20F).

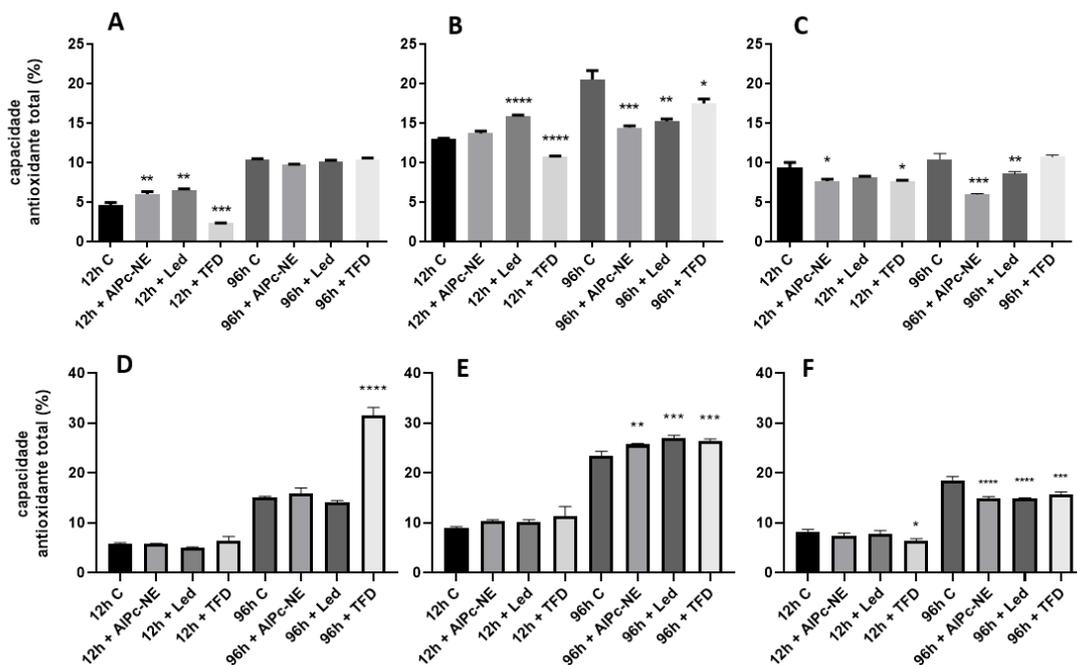


Figura 20. Capacidade antioxidante total do sobrenadante de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição a TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

Para *P. echinulatum*, usando BCA como substrato, a atividade antioxidante total não foi alterada quando se aplicou TFD usando 300 nM de AIPc-NE, nos dois tempos analisados (figura 21A). Já quando utilizada a concentração de 600 nM em BCA, a atividade apresentou aumento no tempo de 96 h de crescimento (figura 21E). Em FT, houve aumento na atividade tanto na presença apenas do fotossensibilizante quanto no TFD no tempo de 96 h. Em 120 h o TFD também resultou em aumento da atividade antioxidante do sobrenadante (figura 21B). Já ao utilizar 600 nM de fotossensibilizante não houve nenhuma alteração em 96 h, mas se obteve redução, com relação ao controle, em 120 h (figura 18F). Usando Celufloc[®] como substrato foi observado o aumento após aplicação do TFD, tanto em 96 h quanto em 120 h, quando usado

300 nM de fotossensibilizante (figura 21C). Já ao utilizar 600 nM de AlPc-NE, não foram observadas mudanças significativas (figura 21G). A atividade em glicose não foi alterada com TFD usando 300 nM de fotossensibilizante, já ao utilizar 600 nM houve aumento após 96 h de crescimento e redução após 120 h (figura 21D, H).

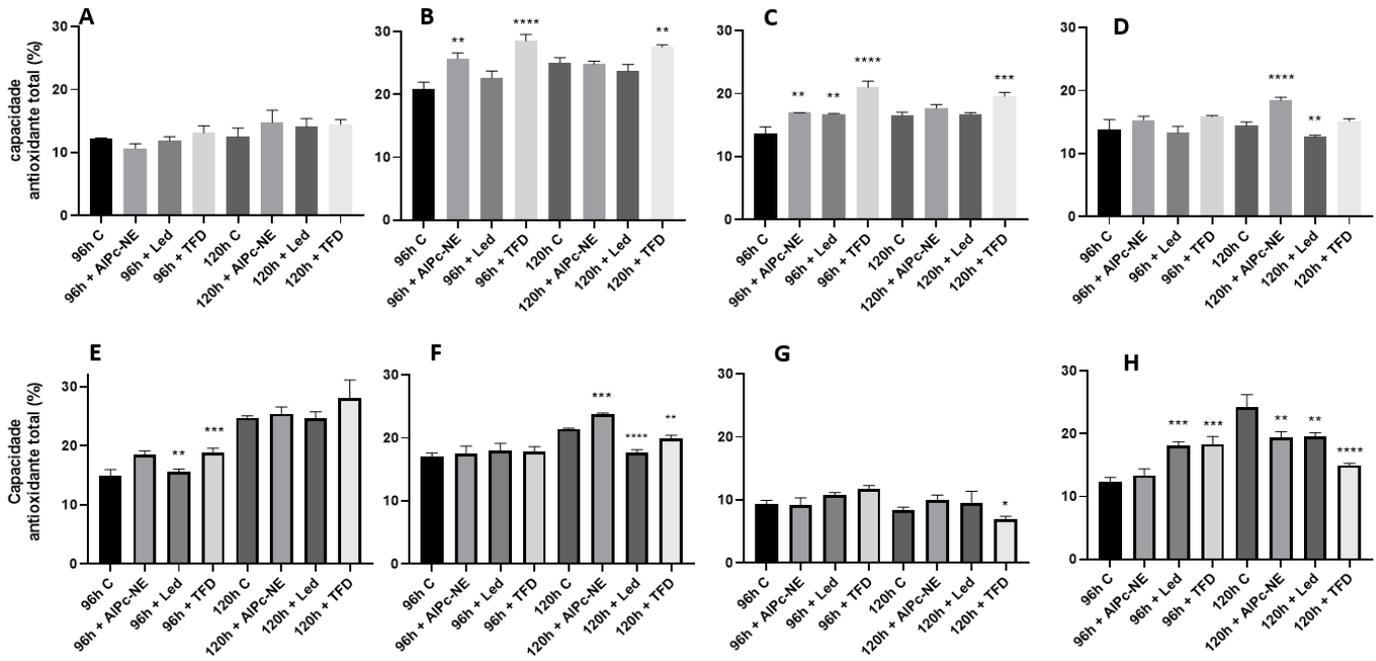


Figura 21. Capacidade antioxidante total do sobrenadante para *Penicillium echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AlPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AlPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AlPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AlPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AlPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AlPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

5.4.3 Determinação da atividade de CMCase nos sobrenadantes para *H. grisea* e *P. echinulatum*

O TFD mediada por 300 nM de AlPc-NE não alterou a atividade de CMCase nas primeiras 12 h, mas reduziu essa variável após 96 h de crescimento, conforme figura 22A. Já o TFD com 600 nM resultou em aumento após 96 h de crescimento no mesmo substrato (figura 22D). Em FT, após 12 h de crescimento foi observada uma redução na atividade após exposição o TFD (figura 22B), posteriormente, em 96 h, não foi observada mudança significativa. No mesmo substrato, aplicando-se TFD com 600 nM de fotossensibilizante, no entanto, foi observado aumento da atividade de CMCase após 96 h de crescimento (figura 22E). Usando glicose como substrato, o TFD com 300 nM de fotossensibilizante reduziu consideravelmente

a atividade de CMCase após 12 h, e após 96 h não houve alteração (figura 22C). Ao aplicar TFD com 600 nM de AIPc-NE não foram observadas alterações na atividade enzimática quando o fungo foi cultivado com glicose (figura 22F).

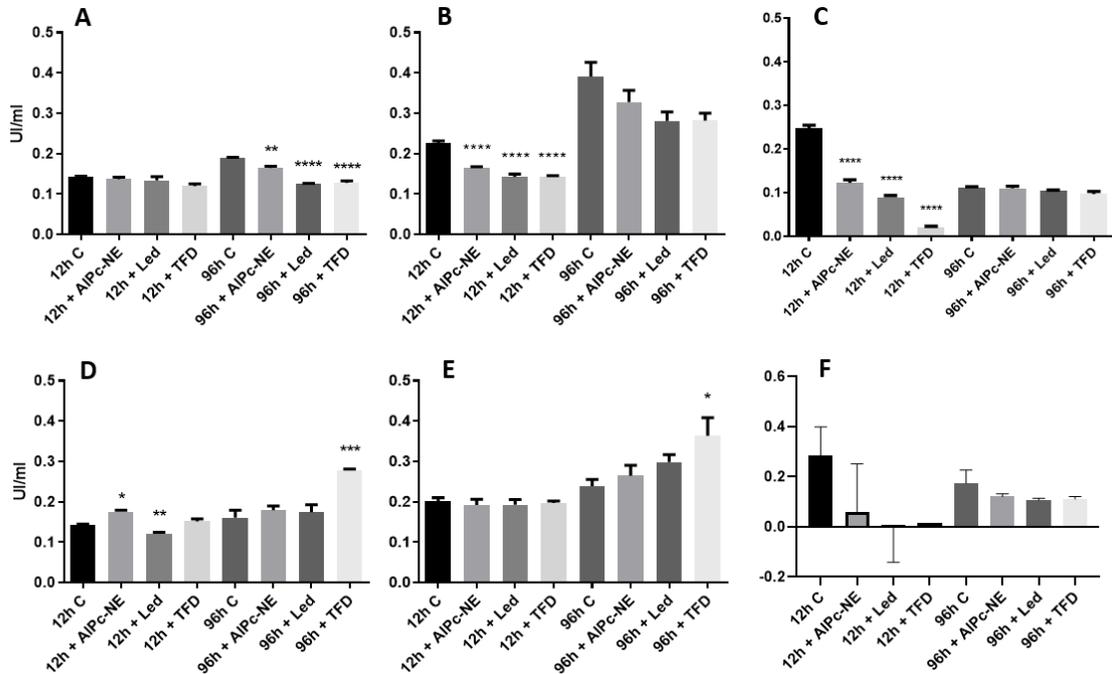


Figura 22. Determinação da atividade de CMCase de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição a TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

Em *P. echinulatum* não foram observadas mudanças significativas após TFD com 300 nM ao se utilizar BCA ou FT como fonte de carbono, conforme figuras 23A, B. Nessa mesma concentração de fotossensibilizante, o TFD alterou a atividade de CMCase quando o fungo foi crescido em Celufloc (Figura 23C), onde a atividade foi mais elevada com relação ao controle após 96h de crescimento e reduzida em 120h. O uso de 600 nM de fotossensibilizante causou aumento na atividade apresentada após crescimento em BCA, porém não foram observadas mudanças após TFD em nenhum dos tempos analisados (figura 23E). Já em FT, o TFD causou redução da atividade com relação ao controle após 120 h de crescimento (figura 23F). Ao se utilizar Celufloc[®] ou glicose como substrato, não foram observadas mudanças significativas após TFD com 600 nM de AIPc-NE (figura 23G, H), embora um aumento após exposição somente à nanoemulsão em 120 h de crescimento em Celufloc[®] tenha sido observado.

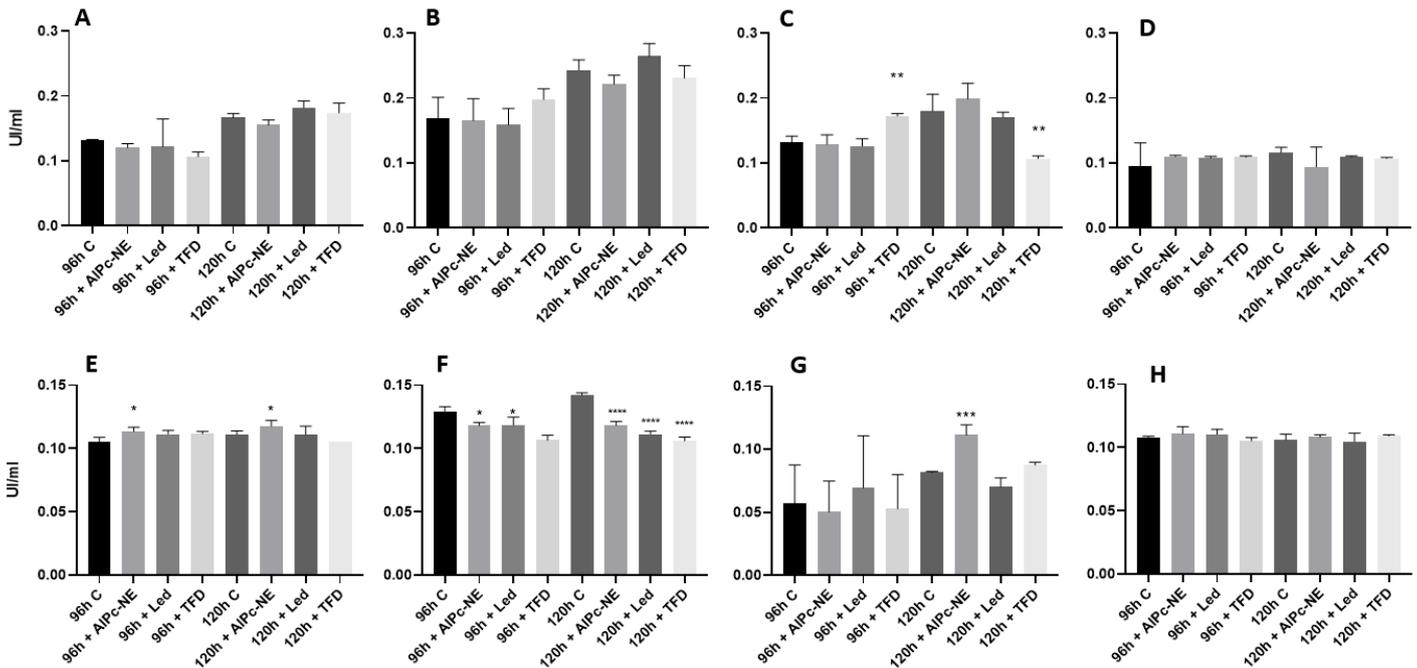


Figura 23. Determinação da atividade de CMCase de *P. echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

5.4.4 Determinação da atividade de Xilanase nos sobrenadantes para *H. grisea* e *P. echinulatum*

Em *H. grisea*, utilizando BCA como substrato, houve aumento na atividade de xilanase em relação ao controle nos dois tempos analisados (figura 24A, D). Além disso, a atividade de xilanase foi alterada não somente com TFD, mas com as demais condições experimentais analisadas em tal substrato. Resultados similares foram observados em FT após exposição do fungo ao fotossensibilizante na concentração de 600 nM, exposição somente a luz ou ao TFD, onde todas as condições resultaram em aumento na atividade (figura 24E). O mesmo não foi observado quando se utiliza 300 nM de fotossensibilizante, quando só a redução da atividade após 12 h de crescimento foi observada (figura 24B). Em glicose como substrato, o TFD causou aumento na atividade após 96 h de crescimento nas duas concentrações testadas (figura 24C, 24F). Redução significativa também foi observada em 12 h após TFD com 600 nM de fotossensibilizante.

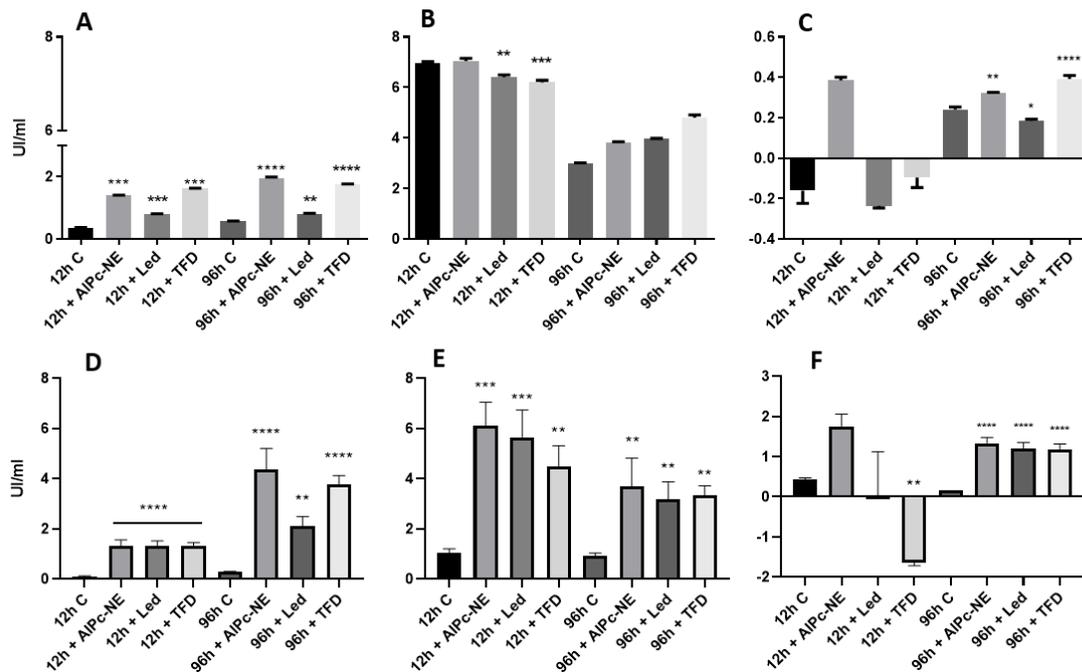


Figura 24. Determinação da atividade de Xilanase de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

A atividade de xilanase de *P. echinulatum* não foi alterada após TFD com 300 nM de fotossensibilizante ao se utilizar BCA como substrato, conforme figura 25A. Nesse mesmo substrato, o TFD com 600 nM de fotossensibilizante e o fotossensibilizante sozinho causaram aumento na atividade de xilanase após 120 h de crescimento (figura 25B). Em FT, o TFD resultou em aumento da atividade dessa enzima quando realizada com 300 nM e redução quando em 600 nM de AIPc-NE, tanto em 96 h quanto em 120 h (figura 25B, F). Em Celufloc[®] como substrato, não houve diferença com o uso de TFD com 300 nM de fotossensibilizante, mas com 600 nM observou-se redução no tempo de 120 h, conforme figuras 25C e 25G. Já ao se utilizar glicose como substrato, o TFD com 300 nM de AIPc-NE resultou em redução da atividade xilanolítica em 96 h e 120 h de crescimento, conforme figura 25D. O contrário se observou com 600 nM, resultando em aumento da atividade de xilanase com relação ao controle, após 96 h e 120 h de crescimento (figuras 25H).

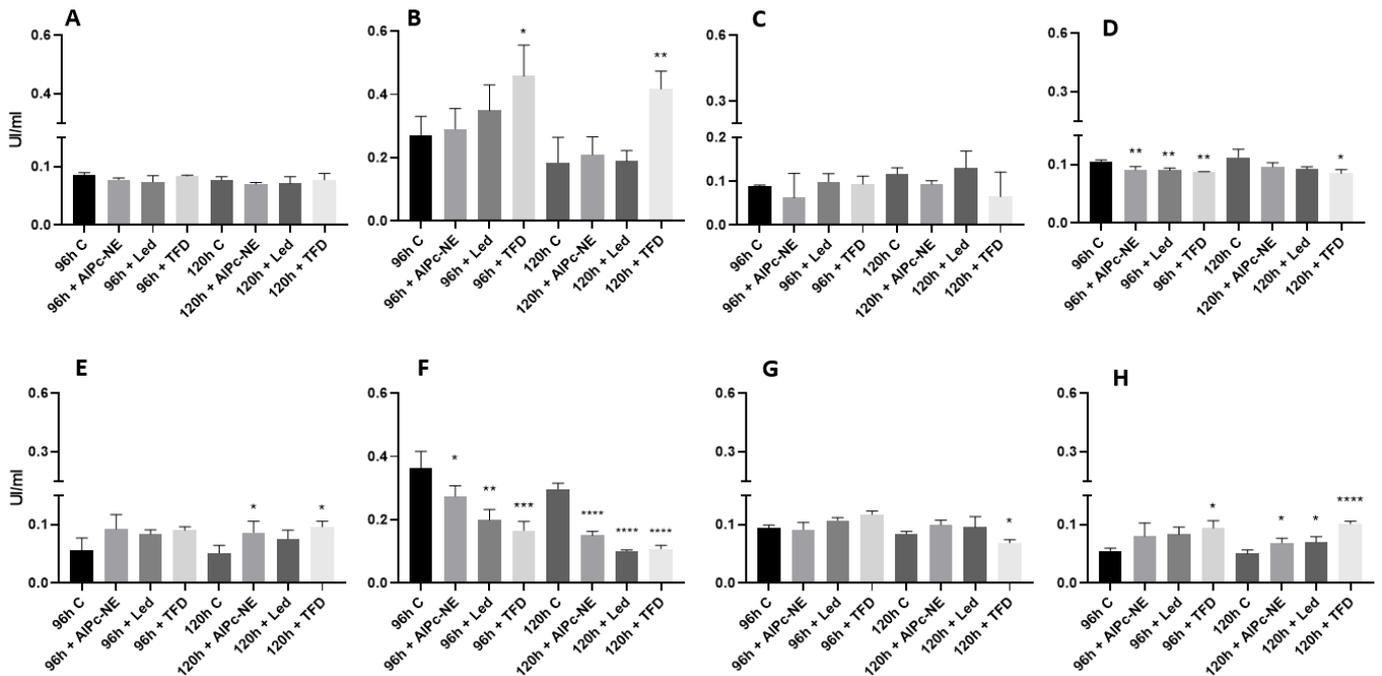


Figura 25. Determinação da atividade de Xilanase de *Penicillium echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

5.4.5 Determinação da atividade de FPase nos sobrenadantes para *H. grisea* e *P. echinulatum*

A atividade de FPase de *H. grisea* em BCA não foi alterada ao se aplicar TFD com 300 nM de fotossensibilizante (figura 26A). Ao se aplicar com 600 nM, observou-se o aumento na atividade após 96 h de crescimento (figura 26D). Em FT, uma elevação na atividade em 12 h foi observada após TFD com 300 nM, conforme figura 26B, elevação também foi notada ao expor o fungo somente a AIPc-NE ou somente a luz. Ao se utilizar 600 nM de fotossensibilizante nenhuma alteração devida ao TFD foi observada. Observou-se aumento na atividade com exposição somente a AIPc-NE (figura 26E). Já em glicose, o TFD reduziu drasticamente a atividade de FPase em ambas as concentrações reduziu drasticamente a atividade após 12 h de crescimento. A exposição somente à AIPc-NE ou somente à luz também reduziram a atividade dessa enzima (figuras 26C e 26F). Redução significativa também foi observada no tempo de 120 h quando se expõe o fungo ao TFD com 600 nM de fotossensibilizante.

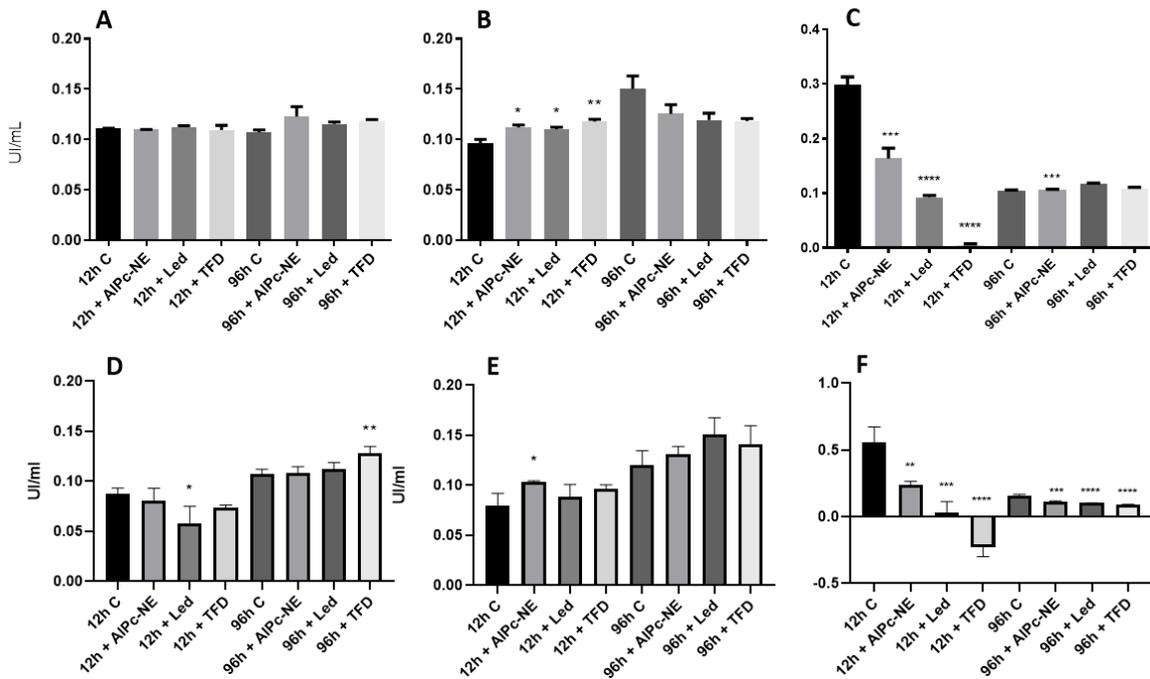


Figura 26. Determinação da atividade de FPase de *Humicola grisea* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Glicose(1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **E** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Glicose(1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

Quanto a atividade de FPase de *P. echinulatum*, o TFD com 300 nM de fotossensibilizante causou elevação da atividade quando o fungo foi crescido em FT durante 120h (figura 27B). Nas demais condições e substratos empregados não houve alteração significativa (figura 27).

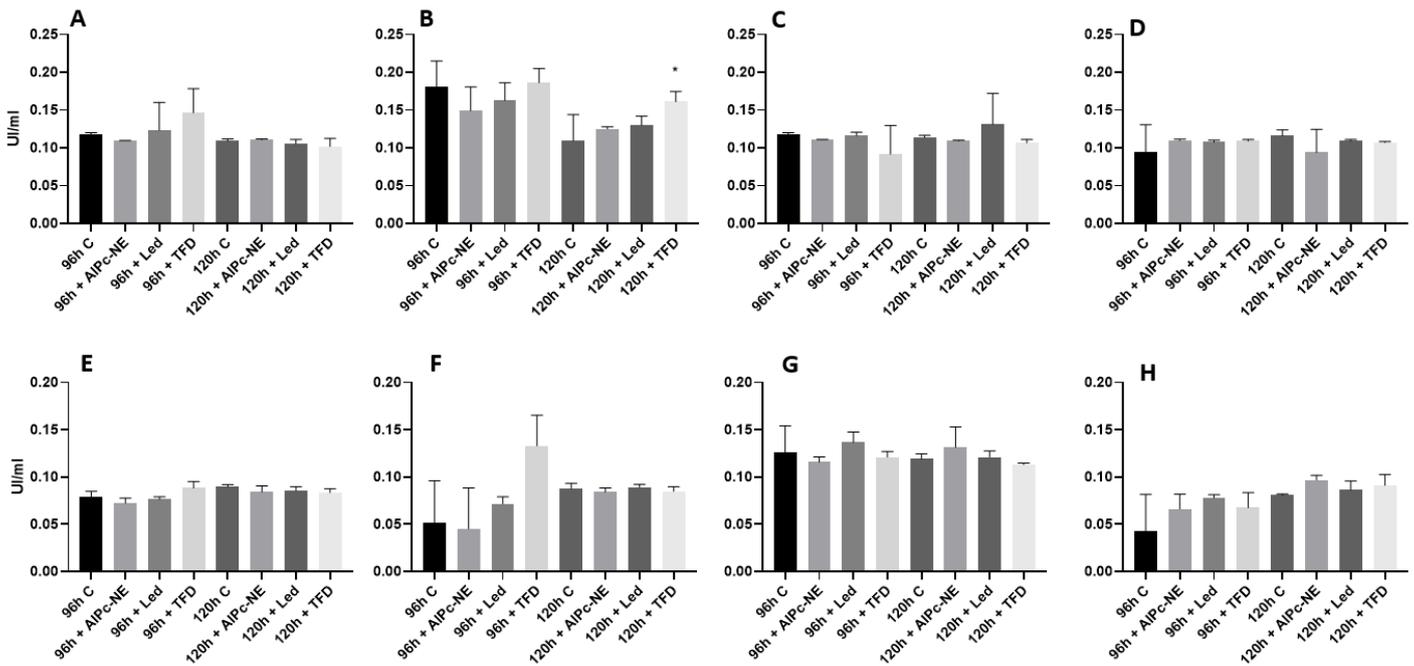


Figura 27. Determinação da atividade de FPase de *Penicillium echinulatum* crescido em diferentes substratos após exposição ao TFD com diferentes concentrações de fotossensibilizante. **A** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 300 nM de AIPc-NE. **B** – Farelo de Trigo (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **C** – Celofloc (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **D** – Glicose (1%) + 300 nM de AIPc-NE. **E** – Bagaço de Cana-de-açúcar (0,1%) + 600 nM de AIPc-NE. **F** – Farelo de Trigo (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **G** – Celofloc (1%) + 600 nM de AIPc-NE. **H** – Glicose (1%) + 600 nM de AIPc-NE. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao respectivo controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$. AIPc-NE: Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina. TFD: tratamento fotodinâmico. C: Controle.

A sumarização das alterações obtidas por consequência da submissão dos fungos ao TFD está representada na tabela 11 para *H. grisea* e 12 para *P. echinulatum*. Tal abordagem visual permite a verificação de que, de forma geral, os efeitos mais notáveis do TFD em *H. grisea* foram: aumento na quantidade de proteína solúvel secretada após TFD mediada por 300 nM de AIPc; redução na atividade antioxidante total, na maioria dos substratos, após TFD mediada por 300 nM de AIPc; alteração na atividade de CMCase a depender do substrato e concentração de fotossensibilizante; aumento em ao menos duas vezes na atividade de xilanase, após TFD mediada por 600 nM de AIPc em todos os substratos, excetuando-se por glicose nas primeiras 12 h; alteração na atividade de FPase a depender do substrato e concentração de fotossensibilizante.

Na mesma análise comparativa para *P. echinulatum* observou-se: aumento na quantidade de proteína solúvel secretada após TFD mediada por 600 nM de AIPc; alteração na atividade antioxidante total a depender do substrato e concentração de fotossensibilizante; poucas alterações na atividade de CMCase, com destaque apenas para Celufloc®; alteração na atividade de xilanase, a depender do substrato e concentração de fotossensibilizante; pouca

alteração na atividade de FPase com redução somente após exposição ao TFD mediada por 600 nM de AIPc e uso de FT como substrato durante 120 h.

Tabela 11. Efeito do tratamento fotodinâmico (TFD) mediado por AIPc-NE nas concentrações de 300 nM e 600 nM. Efeitos observados na quantidade de proteínas solúveis totais, atividade antioxidante, atividade de CMCCase, Xilanase e FPase de *Humicola grisea* após 12 e 96 h. Os dados apresentados correspondem à diferença percentual em relação ao controle não tratado ((X - controle) x 100/controlre). Em colorido encontra-se as alterações que foram estatisticamente

tempo de cultivo (h)	Substrato	Proteínas solúveis totais		Atividade antioxidante		CMCase		Xilanase		FPase	
		AIPc-NE (nM)									
		300	600	300	600	300	600	300	600	300	600
12	BCA	2,7%	108,2%	-49,3%	11,4%	-15,6%	-15,0%	342,6%	1095,5%	-0,54%	-15,7%
	FT	17,5%	16,5%	-17,8%	25,2%	-36,3%	-1,5%	-10,8%	330,3%	22,5%	22,1%
	Gli	304,8%	-44,5%	-18,1%	-22,0%	-91,9%	-94,8%	60,0%	-284,7%	-98,6%	-178,6%
96	BCA	18,5%	25,4%	0,5%	108,6%	-32,4%	76,1%	206,6%	1235,2%	10,4%	20,9%
	FT	4,3%	-19,1%	-14,8%	11,8%	-27,8%	52,2%	61,6%	259,9%	-21,3%	17,3%
	Gli	20,4%	-36,2%	2,3%	-14,9%	-13,0%	-36,6%	62,8%	654,5%	5,2%	-41,7%

Tabela 12. Efeito do tratamento fotodinâmico (TFD) mediado por AIPc-Ne nas concentrações de 300 nM e 600 nM. Efeitos observados na quantidade de proteínas solúveis totais, atividade antioxidante, atividade de CMCCase, Xilanase e FPase de *Penicillium echinulatum* após 96 e 120 h. Os dados apresentados correspondem a alterações percentuais com relação ao controle não tratado ((X - controle) x 100/controlre). Em colorido encontra-se as alterações que foram

tempo de cultivo (h)	Substrato	Proteínas solúveis totais		Atividade antioxidante		CMCase		Xilanase		FPase	
		AIPc-NE (nM)									
		300	600	300	600	300	600	300	600	300	600
96	BCA	247,0%	60,7%	7,9%	26,5%	-19,4%	6,1%	-0,1%	60,7%	25,2%	11,9%
	FT	14,0%	-6,7%	39,3%	4,3%	17,0%	-17,4%	70,0%	-54,2%	3,4%	160,8%
	Celufloc	90,7%	71,3%	52,8%	25,7%	30,4%	-8,8%	5,8%	26,0%	-21,7%	-4,0%
	Gli	-18,3%	97,8%	14,1%	49,2%	16,1%	-1,6%	-16,4%	73,7%	16,1%	56,3%
120	BCA	115,4%	71,5%	15,1%	13,2%	4,8%	-5,4%	0,1%	88,4%	-6,5%	-6,1%
	FT	20,9%	-30,3%	10,0%	-7,3%	5,0%	-25,5%	125,8%	-63,5%	47,8%	-2,4%
	Celufloc	78,6%	214,2%	18,1%	-18,6%	-40,6%	8,1%	-44,3%	-18,2%	-5,5%	-5,1%
	Gli	1,70%	-34,0%	4,8%	-38,4%	-6,9%	2,9%	-24,4%	103,0%	-6,9%	14,0%



6. Discussão

O TFD vem ganhando notoriedade principalmente pelo grande potencial como tratamento de diversos tipos de tumores devido sua baixa toxicidade, seletividade relativa e baixa invasão (YANO et al., 2011). Usos não-oncológicos também vêm ganhando destaque como sua aplicação para o tratamento de dermatoses, psoríase, verrugas e tratamentos cosméticos, como revisto por Nayak (2005). Além disso, o TFD pode ser usada para a inativação de microrganismos, estudos *in vitro* demonstraram que leveduras patogênicas como *Cryptococcus* sp. tiveram proliferação inibida e danos na viabilidade celular provocadas por TFD mediado por AlPc-NE (MORAIS et al., 2020). Fungos filamentosos dermatófitos também foram alvos de estudos buscando inativação via TFD, conforme revisto por Calzavara-Pinton e colaboradores (2012). Os efeitos em fungos filamentosos são variados, e são observados a inibição do crescimento de forma dose-dependente, aumento na sensibilização do fungo para tratamento concomitante com outras drogas e redução de lesões. No entanto, raramente se obteve completa inativação de fungos filamentosos (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; LIANG et al., 2016). Tendo isso em vista, a combinação de fungos com fotossensibilizantes apresenta potencial para ser usado como um sistema fotocatalítico em diversas áreas, como produção industrial de enzimas, biorremediação de resíduos urbanos e estabilização de nanocompostos para bioadsorção (PŘIKRYLOVÁ et al., 2017; YANG et al., 2018).

Primeiramente, foram avaliadas a estabilidade da AlPc-NE nas condições experimentais propostas. A estabilidade de sistemas nanoestruturados afeta sua interação com superfícies biológicas. Diversos fatores como a composição, condição de homogeneização, dispersantes, temperatura, pH e concentração de sais podem afetar a estrutura e a estabilidade das nanogotículas presentes (Oca-Ávalos et al 2017; Çinar et al 2017; Mei et al; 2011). Portanto, a avaliação da estabilidade na temperatura de 42 °C, exibidas na tabela 3, foi importante nesse trabalho para verificar se as características da AlPc-NE eram mantidas nas condições de cultivo dos fungos. Os resultados obtidos evidenciaram boa estabilidade da nanoemulsão em temperaturas mais elevadas. Conforme previamente descrito, a AlPc-NE possui DH por volta de 25,08 nm, PDI de 0,131 e carga superficial levemente negativa. Tais parâmetros se mantiveram sem variações significativas a 42°C, e demonstram que a nanoemulsão manteve sua monodispersividade, tamanho e carga durante os procedimentos experimentais em tal temperatura e tempo. Estudos anteriores com a mesma nanoemulsão analisaram sua

estabilidade por até 4 anos, não encontrando mudanças significativas nos parâmetros coloidais (MUEHLMANN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2020). Tais resultados demonstram que o nanossistema desenvolvido apresenta grande vantagem quanto a estabilidade a longo prazo e em diferentes condições ambientais.

Em seguida, foi observado por microscopia de fluorescência que ocorreu a internalização de fotossensibilizante pelas hifas fúngicas. No entanto, o mecanismo pelo qual nanoemulsões são internalizadas são pouco elucidativos. Para células de mamíferos são descritos mecanismos passivos, como a fusão das nanogotículas com a membrana celular via interação lipídica, e mecanismos ativos como a fagocitose, macropinocitose e endocitose, seguidos de acúmulo em lipossomas, vacúolos intracelulares ou citoplasma (GANTA et al., 2014). Os resultados da quantificação do total retido pelos filamentos demonstram que, embora diferentes concentrações tenham sido utilizadas para internalização, foi registrada pouca ou nenhuma diferença estatística na quantidade internalizada pelos fungos. Na análise de internalização com o passar do tempo, observou-se a saturação de internalização após 30 min ou 1 h em todos os cenários avaliados. As imagens provenientes de microscopia confocal permitiram a visualização de AlPc no interior das hifas de ambas as espécies fúngicas. A partir das imagens obtidas não foi constatada localização subcelular específica, portanto, admite-se a difusão citoplasmática do fotossensibilizante. Tais resultados parecem apontar para a saturação da internalização de AlPc pelas hifas. Estudos de cinética de retenção sugerem que a saturação na captação de fotossensibilizante é um fenômeno comum. Chwilkowska, Roberts e seus respectivos colaboradores (2003; 1989) relataram a estagnação na quantidade de fotossensibilizante internalizado com o passar do tempo em diferentes linhagens de células de mamíferos. Além disso, concluiu-se que a cinética de retenção está diretamente relacionada com o tipo de célula e de fotossensibilizante.

A suscetibilidade de alguns fungos filamentosos ao TFD já foi descrita na literatura. Smijs e colaboradores (2004) verificaram que o TFD mediada por porfirinas *in vitro* apresentou apenas um efeito fungistático contra o fungo filamentoso e dermatófito *Trichophyton rubrum*. Posteriormente, o mesmo grupo, em 2007, ao avaliar um tratamento *ex vivo* constatou que, após 48 h de pré-incubação dos esporos, o TFD mediada por porfirinas não apresentou nenhum efeito fungicida, quando realizada em meio DMEM (SMIJS et al., 2007). Corroborando a hipótese dos estudos citados, de que a susceptibilidade de fungos filamentosos é dependente do estágio de crescimento do fungo, o presente estudo demonstrou que *H. grisea* e *P. echinulatum* com crescimento vegetativo já estabelecido não têm seu crescimento ou viabilidade alteradas pela aplicação do TFD,

A ausência de efeito do TFD no padrão de crescimento dos fungos aqui estudados também pode estar relacionada à presença de pigmentos como a melanina nas células de *H. grisea*. Estudos que aplicaram o TFD em *Paracoccidioides brasiliensis* demonstraram que células melanizadas foram menos suscetíveis à inativação devido à ação da melanina como antioxidante (BALTAZAR et al., 2015). Em diversas espécies do gênero *Penicillium*, pigmentos solúveis vermelhos, azuis e amarelos já foram descritos como antioxidantes, tendo inclusive suas intensidades de biossíntese alteradas pelo substrato utilizado (DHALE; VIJAY-RAJ, 2009; GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008; ROBINSON et al., 1992). Fotossensibilizantes ideais possuem a característica de serem atóxicos quando não irradiados (GOMER 1988). Nesse cenário, vale ressaltar que os fungos expostos somente à AIPc-NE não tiveram alterações em sua viabilidade.

Na literatura, os efeitos biológicos do TFD são em geral descritos em um contexto de indução proposital de citotoxicidade decorrente da produção de $^1\text{O}_2$ e EROs, a qual resulta em oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, com eventuais danos a diferentes organelas celulares (NAYAK, 2005). O presente trabalho apresenta uma abordagem inovadora, visto que seu objetivo foi avaliar o efeito do TFD sobre alguns parâmetros de interesse biotecnológico, quais sejam quantidade de proteínas solúveis secretadas, atividade antioxidante total no sobrenadante, e atividade das enzimas CMCase, Xilanase e FPase.

Primeiramente foram observados efeitos positivos e negativos do TFD sobre a quantidade de proteínas solúveis secretadas. Notou-se que tanto *H. grisea* quanto *P. echinulatum* cultivados na presença de BCA apresentaram aumento no total de proteínas secretadas em algum momento após TFD. Paralelamente, o TFD não foi capaz de alterar a secreção de proteínas em ambos os casos quando os fungos são cultivados em meio suplementado com glicose. Estudos correlacionam o montante de proteína produzida por fungos com a complexidade do substrato, principalmente no tocante aos níveis de expressão de enzimas relacionadas com a hidrólise da parede celular. (MELLO-DE-SOUSA; SILVA-PEREIRA; POÇAS-FONSECA, 2011). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que substratos mais complexos mobilizam maquinarias proteicas também mais complexas, aumentando a probabilidade de alterações na quantidade de proteínas promovidas pela TFD serem evidenciadas experimentalmente. Testes usando substratos mais simples além de glicose, como glicerol, e frutose, por exemplo, poderiam auxiliar na corroboração de tal hipótese. Por outro lado, sabe-se que é comum a presença de proteína na composição de substrato, principalmente no FT, que naturalmente é uma fração com considerável teor proteico, aproximadamente de 13,3%, seguindo Reisinger e colaboradores (2013). Tais proteínas devem

ser levadas em conta ao se mensurar o total presente no sobrenadante após crescimento fúngico. Portanto, estratégias de desproteinização de fonte de carbono complexas, ou comparação do total obtido após crescimento com relação ao total previamente disponível, são estratégias de otimização para se estabelecer o total de proteínas de fato obtidas pela secreção fúngica.

Outros fatores, além da fonte de carbono, afetam o desenvolvimento e o metabolismo fúngico. Dentre esses, pode ser citado o pH, a temperatura, eventos epigenéticos e, também, a presença de espécies oxidantes (GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA, 2007). Eventualmente, fungos expostos a um ambiente oxidativo podem sofrer alterações na expressão de enzimas e pequenas moléculas que, em conjunto, formam seu sistema de defesa antioxidante (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007). Assim, a atividade antioxidante total foi mensurada no sobrenadante após crescimento e aplicação do TFD. Conforme os resultados obtidos, diferentes concentrações de fotossensibilizantes na ausência ou na presença de luz – TFD – alteraram positivamente ou negativamente a capacidade antioxidante extracelular. Nos resultados evidencia-se que *H. grisea* submetido ao TFD com 300 nM de AIPc teve redução de sua capacidade oxidante nos sobrenadantes, enquanto que *P. echinulatum* exibiu aumento de tal capacidade nas mesmas condições. A redução na capacidade antioxidante pode ser justificada pela degradação e consumo dos compostos antioxidantes durante a neutralização de radicais livres e agentes pró-oxidantes gerados pelo TFD. Por outro lado, estudos com diferentes linhagens de *Mucor circinelloides* demonstraram que situações de estresse, como depleção de nutrientes, são capazes de induzir a produção de antioxidantes (HAMEED et al., 2017). Embora fungos filamentosos tenham mecanismos comuns para lidar com estresse oxidativo, aspectos intrínsecos da fisiologia de cada espécie afetam a resposta à estresse endógeno. Em adição, foi descrito que diferentes espécies, nas mesmas condições de cultivo submerso, exibiram diferentes concentrações de flavonoides, compostos fenólicos e taninos em seu sobrenadante, evidenciando a diversidade de resposta a EROs (SMITH; DOYLE; MURPHY, 2015).

Entre os principais envolvidos no estresse oxidativo podem ser citadas as ERO - como o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , o radical ânion superóxido O_2^- , o radical hidroxil $HO\cdot$, e oxigênio em seu estado singlete 1O_2 (GESSLER et al., 2007) Além das fontes exógenas de erro, como o próprio TFD ou outras fontes naturalmente presentes no ambiente, existem enzimas responsáveis por gerar e manter o estado oxidativo intracelular ideal, sendo elas a NADPH oxidase, glioxal oxidase e NO sintase, presentes não só em fungos, mas também nos demais eucariotos, sendo que em fungos filamentosos, NDPH oxidases já foram descritas como essenciais para reprodução e esporulação (MALAGNAC et al., 2004). Por outro lado, enzimas

antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalases e compostos de baixo peso molecular com radicais livres, como a glutatona, proteínas com resíduos de cisteína e CoA, são essenciais para a manutenção da homeostase (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007). Estudos acerca do transcriptoma de enzimas antioxidantes do fungo *P. brasiliensis*, após TFD, demonstraram que a expressão da catalase foi aumentada com menores quantidades de fotossensibilizante e reduzida com maiores quantidades. Genes como o da catalase, citocromo c peroxidase e peroxiredoxina também tiveram sua expressão alterada dependendo das condições experimentais. Tais resultados sugerem que diferentes concentrações de fotossensibilizante e diferentes condições de TFD afetam a maquinaria antioxidante de forma diferente a nível transcricional (ALMEIDA et al., 2012). É importante lembrar que existem diversos tipos de processos pós-transcricionais e pós-traducionais que regulam os níveis de enzimas antioxidantes e que podem estar sendo afetados pelo TFD. Portanto, uma análise de expressão acoplada com a de atividade e quantificação de fatores antioxidantes se mostra necessária para delimitação exata dos efeitos oxidativos intracelulares.

Os sistemas celulolíticos biológicos típicos são geralmente classificados como: complexo, presente em bactérias anaeróbicas, caracterizado pela presença do celulosoma na parede celular, ou não complexo, presente em fungos filamentosos aeróbios como os do gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phanerochaete*, *Fusarium* e *Humicola*, no qual as proteínas são secretadas para o meio extracelular (SINGHANIA et al., 2016). O organismo modelo *Trichoderma reesei* é mais estudado com relação a produção de celulose e de acordo com os registros do CAZy, são expressas duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e 5 endoglucanases (EG, EGI, EGII, EGIII e EGIV) que juntas constituem 90% do complexo enzimático, além de mais sete β -glicosidases que correspondem a 1% do complexo. LPMOs também são parte do complexo (PAYNE et al., 2015). O fungo filamentoso termofílico *Humicola insolens* apresenta sistema análogo ao de *T. reesei*, contendo duas CBHa e cinco EGs. Diferente de *T. reesei*, o complexo de ligação a celulose é ausente na EGI e EGIII, e esta última apresenta menor atividade enzimática em substratos celulósicos solúveis, quando comparada sua análoga em *T. reesei* (LYND et al., 2002).

Nesse contexto, a capacidade celulolítica dos fungos investigados nesse trabalho foi avaliada por meio da mensuração das atividades de CMCase, xilanase e FPase. A atividade de CMCase é principalmente um indicador da presença de endoglucanases, as quais atuam na parte amorfa da celulose. A CMC é um derivado sintético de celulose que, nos monômeros de glicose, apresenta grupamentos carboximetil no lugar dos hidroxil, o que aumenta a região amorfa ao longo da cadeia polimérica, tornando-o um substrato ideal para a ação de endoglucanases. Já

atividade de xilanase indica a capacidade de degradação da xilana (um dos componentes da hemicelulose) à xilose. Ainda, o ensaio de FPase é usado para estimar a atividade total de celulases, uma vez que para a degradação de papel filtro, utilizado como substrato, se faz necessário a ação cinérgica de endo e exoglucanases, assim como CBHs. Os resultados obtidos mostram, de forma geral, que para ambos os fungos ao TFD foi capaz de alterar a capacidade enzimática total com relação ao controle.

Os resultados obtidos quanto a atividade de CMCase de *H. grisea*, mostram que o TFD na concentração de 600nM foi capaz de aumentar a atividade enzimática em BCA e FT. Ainda em *H. grisea* a atividade de xilanase foi a mais alterada, apresentando elevação em BCA e FT e em glicose após TFD. Já em *P. echinulatum* foi observada pouca alteração da atividade de CMCase pelo TFD e, assim como para *H. grisea*, a alteração mais pronunciada aconteceu para a atividade de xilanase. Uma das estratégias estudadas para melhorar a secreção de enzimas hidrolíticas envolve limitar a percepção do fungo para o seu ambiente externo, ou seja, reduzir sua capacidade de detecção da disponibilidade de nutrientes, levando-o a secreção de complexos multiproteicos mesmo na presença de inibidores extracelulares (BAKER, 2018). Uma vez que o TFD tem como principal mecanismo o desbalanço oxidativo, é plausível se admitir que a quantidade de EROs gerada possa interferir em mecanismos de comunicação intracelular, levando a diferenças na percepção ambiental que acarretaria em maior ou menor secreção de enzimas para o meio extracelular mesmo na presença de substratos classicamente descritos como inibidores, como glicose.

Durante estados de hiperoxidação em fungos são descritas consequências fisiológicas como o acentuado catabolismo de macromoléculas e grande oxidação proteica capaz de afetar diretamente a atividade de enzimas e fluxos metabólicos (HANSBERG et al., 1990). Embora os resultados para CMCase e xilanase demonstre que as atividades de tais enzimas foram mais suscetíveis ao TFD, o mesmo não foi visto para FPase. Tal ensaio avalia a capacidade de degradação de celulose cristalina, o que requer a ação sinérgica de EGs, CBHs e BGLs (CHAMPREDA et al., 2019). Portanto, é plausível que outras enzimas necessárias para a conversão de celulose cristalina (principalmente as que dão início ao processo de despolimerização) tenham sua atividade pouco ou negativamente alterada pelo TFD. Ensaio específicos para mensurar a atividade de cada componente do complexo enzimático após TFD se faz necessário para esclarecer se CBHs e BGLs poderiam estar sendo ou não alteradas.

Também foram observados efeitos não relacionados ao TFD. Em *H. grisea* o aumento significativo na atividade de xilanase em BCA e em glicose foi observado também após exposição ao LED no comprimento de onda de 660 nm. Em geral, luz é um importante fator

ambiental que regula a fisiologia de fungos filamentosos, orquestrando conidiação, reprodução sexuada, produção de metabólitos secundários, crescimento e alteração na regulação de enzimas (SCHMOLL, 2018). Recentemente foi descrito que a maquinaria celulolítica de *T. reesei* sofre regulação por componentes relacionados à percepção da luz. A deleção de genes responsáveis pela transcrição de componentes de tal maquinaria levou a uma elevação na secreção de celulases mesmo no escuro (GYALAI-KORPOS et al., 2010). Embora a maior parte dos estudos mostre que luz no comprimento do azul é a mais relevante no metabolismo fúngico, receptores que respondem à luz na faixa do vermelho já foram descritos. Fitocromos em *A. nidulans* foram identificados no citoplasma e a percepção de luz no vermelho é um sinal favorável para reprodução assexuada (IDNURM; HEITMAN, 2005). Estima-se que tais receptores sejam amplamente presentes em ascomicetos e basidiomicetos, portanto, análise da presença de fitocromo em *H. grisea* seria de extrema relevância para aprofundar a resposta desse fungo em tal comprimento de onda e correlacionar os dados obtidos neste trabalho com os da literatura.

7. Conclusões e perspectivas

Considerando os dados apresentados, conclui-se que fungos filamentosos *H. grisea* e *P. echinulatum* são capazes de internalizar AIPc em seus filamentos. Após irradiação não houve alteração no crescimento e viabilidade dos fungos. Alterações na quantidade total de proteína secretada, atividade antioxidante total, atividade de CMCase e de Xilanase, foram observadas após TFD, e tais alterações variam de acordo com a concentração de fotossensibilizante

utilizado, substrato avaliado e espécie de fungo. Entre as atividades enzimáticas avaliadas, a de Xilanase foi a mais alterada e a de FPase foi a menos alterada em ambos os fungos estudados.

É importante levar em consideração que alterações positivas ou negativas observadas na quantidade de proteína total secretada pelos fungos não se correlacionaram com atividade enzimática analisada. Portanto, tais alterações podem estar relacionadas com os diversos mecanismos de respostas extracelulares o TFD, envolvendo proteínas de respostas a danos oxidativos e de degradação oxidativa de biomassa.

O TFD com 600 nM de AlPc se mostra uma boa alternativa para indução enzimática em *H. grisea*, em BCA e FT, tendo em vista o aumento na atividade enzimática de CMCase após 96 h. Já para a obtenção de xilanase, as melhores condições observadas foi a de aplicação de TFD mediado por 300 nM ou 600 nM de AlPc-NE em *H. grisea*. A fácil produção de AlPc-NE, associada com sua boa estabilidade térmica e temporal faz com que tal material possa ser explorado em escala industrial. Além disso, os substratos utilizados são baratos e de fácil obtenção. Levando em conta a demanda para bio-combustíveis, o uso associado de nanosistemas e fungos filamentosos pode ser uma boa alternativa para novas formas de modulação do potencial enzimático, principalmente na degradação de matéria rica em xilanase.

Propondo novas aplicações para o TFD, os resultados aqui obtidos suportam o uso de fungos filamentosos e fotossensibilizantes para fotooxidação visando tratamento de lodo de esgoto e outros resíduos orgânicos urbanos. As vantagens envolvem a resistência das espécies aqui estudadas o TFD, suscetibilidade de diversas leveduras e bactérias ao mesmo procedimento, e como demonstrado, aumento na atividade de enzimas hidrolíticas que podem auxiliar na biorremediação de rejeitos. Além disso, o aumento na quantidade de proteínas solúveis associados a elevação da atividade antioxidante no sobrenadante nos permite apoiar o uso do TFD como alternativa rápida e barata para obtenção de compostos antioxidantes em cultura submersa.

8. Referências bibliográficas

ALMEIDA, L. M. et al. Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of *paracoccidioides brasiliensis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 992–1000, 2012.

ARAÚJO, E. F. et al. Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola*

sp. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 11, p. 781–784, 1983.

AVOURIS, P. et al. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 612–626, 2005.

BAKER, S. E. Protein hyperproduction in fungi by design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8621–8628, 2018.

BALTAZAR, L. M. et al. Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4003–4011, 2015.

BELOZERSKAYA, T. A.; GESSLER, N. N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 506–515, 2007.

BENOLIEL, B. et al. Expression of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 2036–2044, 2010.

BERLIN, A. et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287–296, 2007.

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. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Relatório Síntese. BEN 2019 Ano Base 2018. p. 67, 2019.

CALZAVARA-PINTON, P. et al. Photodynamic Antifungal Chemotherapy†. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 512–522, maio 2012.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of**

Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 78, n. 1, p. 1–6, 2005.

CAMASSOLA, M. et al. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 5–6, p. 391–396, 2004.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2196–2204, 2007.

CHAMPREDA, V. et al. Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: From nature to application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 637–654, 2019.

CHAVDA, V. P.; SHAH, D. A Review on Novel Emulsification Technique : A Nanoemulsion. **Journal of Pharmacology and Toxicological Studies**, v. 5, n. 1, p. 29–37, 2017.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1281–1294, 2008.

CHWIŁKOWSKA, A. et al. Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 509–513, 30 jun. 2003.

DAŃBROWSKI, J. M. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 70, p. 343–394, 2017.

DARWENT, J. R. et al. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 44, n. 1, p. 83–126, jun. 1982.

DAY, C.; DAY, G. Climate change, fossil fuel prices and depletion: The rationale for a falling export tax. **Economic Modelling**, v. 63, n. January, p. 153–160, jun. 2017.

DHALE, M. A.; VIJAY-RAJ, A. S. Pigment and amylase production in *Penicillium* sp NIOM-02 and its radical scavenging activity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 12, p. 2424–2430, 2009.

DHYANI, V.; BHASKAR, T. Pyrolysis of Biomass. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and**

Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels. [s.l.] Elsevier, 2019. v. 1p. 217–244.

DILLON, A. J. P. et al. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 740–746, 2006.

DORCHEH, S. K.; VAHABI, K. Biosynthesis of Nanoparticles by Fungi: Large-Scale Production. p. 1–20, 2016.

FAKAYODE, O. J. et al. Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy. **Biophysical Reviews**, 2018.

FATHI, M.; KARIM, M.; AHMADI, N. **Nanostructures of cellulose for encapsulation of food ingredients.** [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

FOUILLAUD, M. et al. ScienceDirect Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. p. 56–61, 2014.

FRISVAD, J. C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 2004, n. 49, p. 201–241, 2004.

GANTA, S. et al. Nanoemulsions in translational research - Opportunities and challenges in targeted cancer therapy. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 694–708, 2014.

GESSLER, N. N.; AVER'YANOV, A. A.; BELOZERSKAYA, T. A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1091–1109, 2007.

GUNASEKARAN, S.; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1894–1898, 2008.

GYALAI-KORPOS, M. et al. Relevance of the light signaling machinery for cellulase expression in *trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 330, 2010.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review

with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAMEED, A. et al. Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1101, 7 out. 2017.

HARMSSEN, P. et al. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. **Food and Biobased Research**, n. May 2014, p. 1–49, 2010.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry and photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–157, 1992.

HOLLANDA, J. B. DE; ERBER, P. **Cana de açúcar : Usando todo seu potencial energético**. v. 5 ed. São Paulo - SP: Universidade de São Paulo, 2007.

HORNYAK, G. L. et al. **Introduction to Nanoscience and Nanotechnology**. Boca Raton, FL: [s.n.].

IDNURM, A.; HEITMAN, J. Photosensing Fungi: Phytochrome in the Spotlight. **Current Biology**, v. 15, n. 20, p. R829–R832, out. 2005.

IKRAM-UL-HAQ, M. M. J. S. Z. S. S. I. M. A. G. H. R. A. I. B. M. N. A. Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 4, p. 724–733, 9 set. 2012.

ION, R.-M.; ȘUICĂ-BUNGHEZ, I.-R. Oxidative Stress-Based Photodynamic Therapy with Synthetic Sensitizers and/or Natural Antioxidants. In: **Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress**. [s.l: s.n.]. p. 285–317.

KESHAVARZ, B.; KHALESI, M. *Trichoderma reesei*, a superior cellulase source for industrial applications. **Biofuels**, v. 7, n. 6, p. 713–721, 2016.

KHANDELWAL, M.; WINDLE, A. H. Hierarchical Organisation in the Most Abundant Biopolymer –Cellulose. **MRS Proceedings**, v. 1504, p. mrsf12-1504-v02- 03, 18 mar. 2013.

KIM, I. J. et al. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8469–8480, 2014.

KOVALENKO, V. I. Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. **Russian Chemical**

Reviews, v. 79, n. 3, p. 231–241, 2010.

KUMAR GUPTA, P. et al. An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. In: **Cellulose**. [s.l.] IntechOpen, 2019. v. ip. 13.

LIANG, Y. et al. Photodynamic therapy as an antifungal treatment (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 1, p. 23–27, 2016.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology
Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology Downloaded from
<http://mibr.asm.org/> on February 6 , 2013 by INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY
MADRAS. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MALAGNAC, F. et al. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 11, p. 982–997, 2004.

MANFRÃO-NETTO, J. H. C. et al. The DNA-methyltransferase inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine affects *Humicola grisea* enzyme activities and the glucose-mediated gene repression. **Journal of Basic Microbiology**, n. July, 2017.

MARAFON, A. C. et al. **Uso da Biomassa para a Geração de Energia**. 1. ed. Aracaju, SE: Embrapa, 2016. v. 211

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635–R666, 18 out. 2006.

MELETIADIS, J.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. v. 39, n. 2, p. 478–484, 2001.

MELLO-DE-SOUSA, T. M.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M. J. Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 19–26, 2011.

MEYER, V. et al. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 6, 2016.

MICHAELIDES, E. E. A New Model for the Lifetime of Fossil Fuel Resources. **Natural Resources Research**, v. 26, n. 2, p. 161–175, 2017.

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

MIYAZAKI, K.; ISLAM, N. Nanotechnology systems of innovation-An analysis of industry and academia research activities. **Technovation**, v. 27, n. 11, p. 661–675, 2007.

MORAIS, J. A. V. et al. Photodynamic therapy inhibits cell growth and enhances the histone deacetylase-mediated viability impairment in *Cryptococcus* spp. in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101583, 2020.

MORANDI, M. A. B. Biocombustíveis no Brasil, o RenovaBio e as mudanças climáticas. p. 1–4, 19 jan. 2019.

MUEHLMANN, A. L. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.

MUEHLMANN, L. A. **CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE POLI(VINIL,METIL-ÉTER-CO-ANIDRIDO MALEICO) COMO POTENCIAL FOTOSSENSIBILIZANTE DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTINEOPLÁSICA**. (tese de doutorado) Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

NAYAK, C. S. Photodynamic therapy in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 71, n. 3, p. 155–160, 2005.

NIEMEYER, C. M. Nanobiotechnology. In: MEYERS, R. A. (Ed.). . **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**. 2. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. v. 9.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PONNUSAMY, V. K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 462–472, 2019.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

PŘIKRYLOVÁ, K. et al. Nanostructured titania decorated with silver nanoparticles for photocatalytic water disinfection. **Monatshefte fur Chemie**, v. 148, n. 11, p. 1913–1919, 2017.

PUSHPAN, S. K. et al. Porphyrins in photodynamic therapy - A search for ideal photosensitizers. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 2, p. 187–207, 2002.

REISINGER, M. et al. Wheat bran biorefinery - A detailed investigation on hydrothermal and enzymatic treatment. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 179–185, 2013.

ROBERTS, W. G.; BERNS, M. W. In vitro photosensitization I. Cellular uptake and subcellular localization of mono-L-aspartyl chlorin e6, chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine, and photofrin II. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 90–101, 1989.

ROBINSON, N. et al. Blue pigments of penicillium herquei. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 6, p. 814–817, 1992.

RODRIGUES, M. C. et al. Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, p. 111808, 2020.

ROSA, M. D. F.; SANTAELLA, S. Valorização de resíduos da agroindústria. n. December 2014, 2011.

SCHMOLL, M. Regulation of plant cell wall degradation by light in Trichoderma. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–20, 2018.

SCHNEIDER, W. D. H. et al. Penicillium echinulatum secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–26, 2016.

SHARAF, A. F. et al. Biotechnology of Penicillium Genus. **Lasbela, U. J.Sci.Techl**, v. 5, n. January, p. 201–207, 2016.

SHOW, P. L. et al. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2015.

SINGHANIA, R. R. et al. Cellulases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**, p. 73–101, 2016.

SMIJS, T. G. M. et al. A novel ex vivo skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 433–440, 2007.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 185, p. 389–397, 2015.

SPEIRS, J.; MCGLADE, C.; SLADE, R. Uncertainty in the availability of natural resources: Fossil fuels, critical metals and biomass. **Energy Policy**, v. 87, p. 654–664, 2015.

SPIKES, J. D. PHTHALOCYANINES AS PHOTSENSITIZERS IN BIOLOGICAL SYSTEMS AND FOR THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, n. 6, p. 691–699, jun. 1986.

STEVENSON, L. et al. Wheat bran: Its composition and benefits to health, a European perspective. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 1001–1013, 2012.

TAKASHIMA, S. et al. Purification and Characterization of Cellulases from *Hemicella grisea*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 77–82, 1996.

TAKEDA, Y. et al. Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. **Scientometrics**, v. 80, n. 1, p. 23–38, 18 jul. 2009.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, n. 2013, p. 9–18, 2013.

VILSINSKI, B. H. et al. Spectroscopic study of aluminum phthalocyanine chloride (AlPcCl) in homogeneous and micro-heterogeneous media consisting of P-123 AND F-127 polymeric micelles. **Quimica Nova**, v. 38, n. 5, p. 631–639, 2015.

- VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343–371, 2014.
- WANG, X. W. et al. Redefining *Humicola* sensu stricto and related genera in the Chaetomiaceae. **Studies in Mycology**, v. 93, n. August 2018, p. 65–153, 2019.
- YANG, Z. et al. Simultaneous immobilization of cadmium and lead in contaminated soils by hybrid bio-nanocomposites of fungal hyphae and nano-hydroxyapatites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11970–11980, 2018.
- YANO, S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 46–67, 2011.
- YU, X. et al. Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. S93–S98, 2016.
- ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465–482, jul. 2012.