

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

FRANCINI YUMI KAGIMURA SOMENSI

**BIOPRODUÇÃO DE β -(1→6)-D-GLUCANA E OBTENÇÃO DE
DERIVADO POR CARBOXIMETILAÇÃO VISANDO ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2014

FRANCINI YUMI KAGIMURA SOMENSI

**BIOPRODUÇÃO DE β -(1 \rightarrow 6)-D-GLUCANA E OBTENÇÃO DE
DERIVADO POR CARBOXIMETILAÇÃO VISANDO ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Coorientador: Prof. Dr. Davi Costa Silva

PATO BRANCO

2014

S693b Somensi, Francini Yumi Kagimura .
Bioprodução de β -(1→6)-D-glucana e obtenção de derivado por
carboximetilação visando atividade biológica / Francini Yumi Kagimura
Somensi. -- 2014.
97 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
Coorientador: Prof. Dr. Davi Costa Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2014.
Bibliografia: f. 79 – 95.

1. Polissacarídeo. 2. Derivatização. 3. Antioxidante. 4. Citotoxicidade. I.
Cunha, Mário Antônio Alves da, orient. II. Silva, Davi Costa, coorient. III.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 15

Título da Dissertação

**“BIOPRODUÇÃO DE β - (1 \rightarrow 6) - D - GLUCANA E OBTENÇÃO DE DERIVADO
POR CARBOXIMETILAÇÃO VISANDO ATIVIDADE BIOLÓGICA”**

Autora

FRANCINI YUMI KAGIMURA

Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 30 minutos do dia 15 de agosto de 2014, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha – UTFPR
Presidente

Prof^a Dra. Luciane Sene – UNIOESTE
Examinadora

Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti – UNICENTRO
Examinador

Visto da Coordenação

Prof^a Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coordenadora do PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Este trabalho é dedicado à minha família e amigos...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois dele vem à vida, a sabedoria e todo o alicerce necessário para a realização de nossas conquistas.

Aos meus pais Henrique e Edinéia, os quais sempre incentivaram meus estudos e, acima de tudo, sempre respeitaram minhas escolhas, com apoio, amor e dedicação.

À minha irmã Luryan por todos os bons momentos de companhia e risadas, tornando esta época mais leve...

Por todo amor, compreensão, companheirismo e dedicação, agradeço ao meu marido Daniel, que esteve presente em todos os momentos desta etapa, fazendo-me companhia em domingos e feriados no laboratório, ouvindo minhas ideias “mirabolantes”, reclamações, animações, mas acima de tudo, sempre me ouvindo e apoiando...

Aos meus amigos Mayara Gobetti e Otto Heinz, por todos os momentos de companhia no laboratório, pelos auxílios nas análises e, principalmente, pela amizade.

À minha companheira de todas as horas Thaís Theis, pela ajuda nos domingos, feriados, e todos os dias que precisei... Pelos almoços, pelas conversas e pela amizade. Serei eternamente grata por tudo...

Ao meu orientador professor Mário A. A. Cunha, pela confiança em entregar-me um trabalho inédito em muitos aspectos e desbravador para o grupo. Agradeço muito pela oportunidade, pelos ensinamentos, conselhos e apoio neste trabalho.

À professora Sirlei, por toda paciência e disponibilidade. O pouquinho que sei hoje de química orgânica é graças a você e com certeza isso fez muita diferença em nosso trabalho.

Ao Laboratório de Qualidade Agroindustrial - LAQUA, em especial à Roberta Roncatti, que, por muitas vezes, nos auxiliou na realização de análises, além de ceder materiais e equipamentos.

À Central de Análises pela realização de várias etapas deste trabalho. Em especial à Daniele Reinieri e Mariéli Karling, pela atenção, prestação e disponibilidade sempre que necessário.

Aos meus colegas de laboratório, e a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram na execução deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante o curso e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

SOMENSI, Francini Yumi Kagimura. **Bioprodução de β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica.** 2014. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014.

O mercado mundial de polissacarídeos tem atraído grandes companhias industriais interessadas em conquistar novos e rentáveis campos de atuação. Polissacarídeos com propriedades tecnológicas e biológicas podem ser obtidos a partir de plantas, algas e de microrganismos. Dentre os polissacarídeos com propriedades biológicas, as glucanas tem se destacado por apresentarem atividade imunoestimulante e potencialidades no tratamento de doenças como câncer, hipercolesterolemia, diabetes, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares. Recentes estudos demonstram a produção extracelular de β -glucanas por fungos filamentosos em cultivos submersos. A modificação na estrutura química das glucanas por carboximetilação é considerada uma importante rota para melhorar suas propriedades, podendo contribuir para o aumento da solubilidade da molécula, bem como atividades biológicas, especialmente aquelas associadas a mecanismos de ação antioxidante e antiproliferativa. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a produção de β -1,6-D-glucana (lasiodiplodana) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em cultivo submerso, bem como a carboximetilação da molécula, caracterização e avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante. A carboximetilação da molécula foi confirmada através da verificação de sinais químicos específicos identificados por espectroscopia de FT-IR e RMN ^{13}C e a molécula carboximetilada apresentou grau de substituição (DS) de 1,27. A análise térmica (TG/DTA) indicou que a amostra bruta e carboximetilada apresentaram quatro estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorreu em 125°C (perda de água) e houve dois eventos consecutivos de perda de massa (200°C-400°C) atribuídos à degradação da molécula. O quarto estágio ocorreu entre 425°C e 620°C (decomposição final) com pico exotérmico em 510°C. Análise por MEV indicou que a lasiodiplodana bruta apresenta estruturas granulares que se rompem após carboximetilação. Análise de DRX demonstrou que o polímero bruto e carboximetilado apresentam estrutura não cristalina. A carboximetilação contribuiu para melhorar a hidrossolubilidade da molécula (aumento de 60%) e para melhorar a atividade antioxidante avaliada pela capacidade de captura dos radicais ABTS, DPPH e poder redutor do íon férrico (FRAP). Não foi verificado efeito citotóxico da lasiodiplodana bruta e modificada sobre hemácias. Os resultados obtidos sugerem que a carboximetilação da lasiodiplodana pode contribuir para melhoria das propriedades biológicas e para o potencial de uso biotecnológico da molécula.

Palavras-chave: Polissacarídeo. Derivatização. Antioxidante. Citotoxicidade.

ABSTRACT

SOMENSI, Francini Yumi Kagimura. **Bioproduction of β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan and obtain derived by carboxymethylation aiming biological activity.** 2014. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014.

The world market of polysaccharides has attracted large industrial companies interested in gaining new and profitable fields. Polysaccharides with technological and biological properties can be obtained from plants, algae and microorganisms. Among the polysaccharides with biological properties, glucans have been highlighted by demonstrate immunostimulatory activity and potential for treating diseases such as cancer, hypercholesterolemia, diabetes, multiple sclerosis and cardiovascular diseases. Recent studies demonstrate the production of exocellular β -glucans by filamentous fungi in submerged cultivations. Modifications in the chemical structure of glucans by carboxymethylation is considered an important route to improve its properties, may contribute to the increased solubility of the molecule as well as biological activities, especially those associated with antioxidant and antiproliferative mechanisms of action. Therefore, the present work aimed the production of β -1,6-D-glucan (lasiodiplodana) by the *Lasiodiplodia theobromae* MMPI fungus in submerged cultivation and carboxymethylation of the molecule, characterization and evaluation of cytotoxicity and antioxidant activity. The carboxymethylation of the molecule was confirmed by checking specific chemical signals identified by FT-IR and NMR and ^{13}C spectroscopy. Carboxymethylated molecule presented degree of substitution (DS) of 1.27. Thermal analysis (TG / DTA) indicated that native and carboxymethylated samples had four stages of mass loss. The first stage was at 125 °C (loss of water) and there were two consecutive events of weight loss (200 °C - 400 °C) attributed to the degradation of the molecule. The fourth stage occurred between 425 °C and 620 °C (final decomposition) with exothermic peak at 510 °C. SEM analysis indicated that the raw lasiodiplodan presents granular structures which are broken after carboxymetylation. XRD analysis showed that native and carboxymethylated biopolymers have no crystalline structure. Carboxymethylation aided to improve water solubility the molecule (60% increase) and to improve antioxidant activity assessed by ability to capture the ABTS, DPPH radical scavenging and the ferric ion reducing power (FRAP). There was no cytotoxic effect of raw lasiodiplodana and modified on the erythrocytes. The results suggest that the carboxymethylation of lasiodiplodan can contribute to improved biological properties and the potential biotechnological use of the molecule.

Keywords: Polysaccharide. Derivatization. Antioxidant. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura de β -glucanas fúngicas: (a) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana; (b) (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana; (c) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucana; (d) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana; (e) (1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana.....	18
Figura 2 – Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol	22
Figura 3 – Representação estrutural de glucanas modificadas através de: (a) Sulfatação, onde o grupo A representa S ⁺ O ₂ HO. (b) Carboximetilação, onde o grupo R representa ⁺ CH ₂ COOH. (c) Fosforilação, onde o grupo B representa (HO) ₂ OPO ⁻ . (d) Acetilação, onde R´ representa CH ₃ COO ⁻	23
Figura 4 – (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana carboximetilada.....	24
Figura 5 – Ação de antioxidante (AH) sobre o radical livre DPPH.....	29
Figura 6 – Ação de antioxidante (AH) sobre o radical livre ABTS	30
Figura 7 – Ação de antioxidante (e ⁻) sobre o complexo Fe(III)-TPTZ.....	31
Figura 8 – Preparo do inóculo de <i>L. theobromae</i> para o cultivo submerso: (a) fungo armazenado em tubo, (b) fungo cultivado em placa, (c-d) inóculo fúngico cultivado em shaker, (e) homogeneização em mixer para padronização do inóculo	35
Figura 9 – Fluxograma do processo de produção, recuperação e purificação da lasiodiplodana	36
Figura 10 – Etapas da reação de carboximetilação: (a) EPS, (b) adição de Isoprpanol e NaOH, (c) completa solubilização do EPS e adição de ácido monocloroacético, (d) diálise, (e) Derivado carboximetilado liofilizado	39
Figura 11 – Crescimento fúngico em biorreator de bancada ao final de 72 h de cultivo.	46
Figura 12 – Espectros de RMN ¹³ C do polímero carboximetilado (EPS-C).....	52
Figura 13 – Espectros de RMN ¹³ C do polímero não carboximetilado (EPS).....	53
Figura 14 - Micrografia de lasiodiplodana brutra e carboximetilada obtida por microscopia eletrônica de varredura. (A) lasiodiplodana brutra em aumento de 200 X, (B) lasiodiplodana brutra em aumento de 1500 X, (C) lasiodiplodana carboximetilada em aumento de 400 X, (D) lasiodiplodana carboximetilada em aumento de 1500 X	57
Figura 15 – Micrografia de lasiodiplodana brutra obtida por microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 2000 X, evidenciando os diâmetros granulares.....	58

Figura 16– Curva padrão de GPC de dextrana	63
Figura 17– Perfil do cromatograma de permeação em gel (GPG) da amostra de lasiodiplodana bruta	64
Figura 18 – Perfil do cromatograma de permeação em gel (GPG) da amostra lasiodiplodana carboximetilada	64
Figura 19 – Tubo após centrifugação do EPS-C em água	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil do conteúdo de glicose e produção de lasiodiplodana ao longo do cultivo	48
Gráfico 2 – Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana não modificada (A) e carboximetilada (B)	52
Gráfico 3 – Padrões de difração de raio-x (DRX) da amostra bruta (EPS) e carboximetilada (EPS-C)	56
Gráfico 4 – Curvas TG, DTG e DTA da amostra de lasiodiplodana bruta	59
Gráfico 5 – Análise de TG, DTG e DTA do EPS-C	60
Gráfico 6 – Comparação da análise TG entre EPS-C e EPS	61
Gráfico 7 – Avaliação do potencial hemolítico das amostras EPS-C e EPS	67
Gráfico 8 – Porcentagem de remoção do radical ABTS nos ensaios com as amostras de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C), glicose e lasiodiplodana não carboximetilada (EPS)	70
Gráfico 9 – Porcentagem de remoção do radical DPPH nos ensaios com as amostras de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C), glicose e lasiodiplodana não carboximetilada (EPS)	72
Gráfico 10 – Curva padrão de sulfato ferroso	75
Gráfico 11 – Potencial de redução do ferro (III) verificados na amostra de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C), glicose e lasiodiplodana não carboximetilada (EPS)	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo de substrato, variação do pH do meio e produção de lasiodiplodana ao longo do cultivo em biorreator de bancada.....	47
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da produção da lasiodiplodana por <i>L. theobromae</i> MMPI cultivado em fermentação submersa após 72 horas.....	50
Tabela 3 – Deslocamentos químicos de ¹³ C obtidos da lasiodiplodana bruta (EPS) e modificada (EPS-C).....	53
Tabela 4 – Conteúdo de perda de massa das amostras de lasiodiplodana bruta e modificada em intervalos de temperatura determinados.....	62

LISTA DE SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BDA	Ágar Batata Dextrose
BRM	Modificador da Resposta Biológica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DRX	Difração de Raios-x
DS	Grau de Substituição
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Análise Termogravimétrica Derivada
EPS	Exopolissacarídeo
EPS-C	Exopolissacarídeo Carboximetilado
FRAP	Potencial Redutor do íon férrico
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
RMN	Ressonância Nuclear Magnética
TGA	Análise Termogravimétrica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – α
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
VMSM	Meio de Sais Minerais de Vogel

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 POLISSACARÍDEOS	15
2.2 EXOPOLISSACARÍDEOS	16
2.2.1 β -D-glucanas	17
2.3 FUNGO <i>LASIODIPLODIA THEOBROMAE</i>	20
2.3.1 Lasiodiplodana	21
2.4 MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA QUÍMICA DE GLUCANAS	22
2.4.1 Carboximetilação	24
2.5 COMERCIALIZAÇÃO DE B-GLUCANAS	25
2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	26
2.6.1 Sequestro do Radical DPPH	28
2.6.2 Sequestro do Radical ABTS	30
2.6.3 Poder Redutor Férrico (FRAP)	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 CEPA FÚNGICA	34
4.2 PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO	34
4.2.1 Preparo do Inóculo	34
4.2.2 Cultivo Submerso de <i>L. theobromae</i> e Recuperação do Exopolissacarídeo	35
4.2.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos do Cultivo Submerso	36
4.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA LASIODIPLODANA POR CARBOXIMETILAÇÃO	38
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA BRUTA E CARBOXIMETILADA	39
4.4.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)	39
4.4.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C RMN)	39
4.4.3 Determinação do Grau de Substituição (DS)	40
4.4.4 Determinação de Açúcares Redutores, Totais e Proteínas	40

4.4.5 Análise por Difração de Raios-x.....	41
4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.4.7 Análise Térmica.....	41
4.4.8 Análise da Massa Molecular.....	42
4.4.9 Análise da Solubilidade em Água.....	42
4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> SOBRE HEMÁCIAS.....	43
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	43
4.6.1 Atividade de Sequestro do Radical DPPH.....	43
4.6.2 Atividade de Sequestro do Radical Cátion ABTS.....	44
4.6.3 Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM BIORREATOR DE MISTURA.....	46
5.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA	49
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA MODIFICADA E NÃO MODIFICADA.....	51
5.3.1 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR).....	51
5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³ C).....	52
5.3.3 Determinação do Grau de Substituição da Glucana Carboximetilada (DS)	54
5.3.4 Conteúdo de Carboidrato e Proteína Total do Exopolissacarídeo Bruto	55
5.3.5 Difração de Raios-x	55
5.3.7 Caracterização Térmica	59
5.3.8 Teste de Homogeneidade por Cromatografia de Exclusão Molecular	63
5.3.9 Solubilidade em Água da Lasiodiplodana Bruta e Modificada.....	66
5.4 CITOTOXICIDADE SOBRE HEMÁCIAS.....	67
5.5 CARACTERÍSTICAS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA LASIODIPLODANA BRUTA E MODIFICADA	68
5.5.1 Sequestro do Radical Cátion ABTS	69
5.5.2 Sequestro do Radical DPPH	71
5.5.3 Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos oriundos de plantas, algas, bactérias e fungos têm despertado interesse de indústrias químicas e farmacêuticas, e de diversos grupos de pesquisas em vários países do mundo. Pesquisas revelam que alguns polissacarídeos podem atuar sobre o sistema imunológico, sendo estes denominados Modificadores da Resposta Biológica (BRM). Tais biomoléculas podem apresentar atividade anticoagulante, antitrombótica, antioxidante, anti-inflamatória e têm sido descritas como efetivas no tratamento de várias enfermidades, como câncer, diabetes, alterações dos níveis de colesterol, infecções microbianas e auxiliares na redução de riscos cardiovasculares.

Dentre os polissacarídeos com função biológica, destacam-se as β -glucanas, que podem ser isoladas da parede celular de leveduras, micélio fúngico, corpo de frutificação de fungos e da parede celular de cereais. Alguns estudos recentes demonstram a produção extracelular de β -glucanas por fungos filamentosos em cultivos submersos.

Modificações na estrutura química das glucanas por carboximetilação podem contribuir para aumentar a solubilidade da molécula, bem como atividades biológicas, especialmente aquelas associadas a mecanismos de ação antioxidante e antitumoral. São verificados na literatura trabalhos que descrevem a atividade antitumoral (WIATER et al. 2012), antioxidante (YANG et al. 2011) e imunomodulatória (CHEN et al. 2014) de β -glucanas derivatizadas por carboximetilação.

Nesse contexto, é proposto no presente trabalho a produção de β -1 \rightarrow 6-D-glucana (lasiodiplodana), pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em cultivo submerso, a carboximetilação da glucana obtida, bem como a caracterização da molécula por FT-IR, RMN ^{13}C , difração de raios-x, avaliação de propriedades térmicas e avaliação da atividade antioxidante e citotoxicidade sobre hemácias da glucana original e do biopolímero modificado.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um dos grupos de compostos mais abundantes e importantes da biosfera. Estes polímeros são constituídos de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo entre si na unidade monomérica, no grau de ramificação, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias. Podem ser obtidos a partir de biomassa vegetal, algas marinhas ou de microrganismos. Atualmente, os polissacarídeos extraídos de plantas (goma arábica e pectinas), de algas marinhas (alginato, goma carragena e ágar) e de crustáceos (quitina) ainda dominam o mercado, sendo que os polissacarídeos microbianos (goma xantana, gelana, pululana e alginato bacteriano) ainda representam uma pequena fração do mercado de biopolímeros (FREITAS et al. 2009).

Vários polissacarídeos, de diferentes fontes, têm a capacidade de estimular o sistema imune, classificando-se, farmacologicamente, como Modificadores da Resposta Biológica (BRM). Diferentes parâmetros físico-químicos, como solubilidade, estrutura, massa molecular e ramificações da cadeia estrutural podem influenciar a atividade biológica (SOLTANIAN, 2009). Devido a essa diversidade, os polissacarídeos possuem um amplo campo de aplicações nas indústrias de alimentos, biomédicas, farmacêuticas e cosméticas (CUNHA et al. 2012).

Na área biológica eles são aplicados em engenharia de tecidos, em processos de imobilização de enzimas e como veículo de liberação de fármacos. Atividades biológicas como ação antiviral, antitumoral, antioxidante, anticoagulante e antitrombótica também vêm sendo investigadas em polissacarídeos oriundos de diferentes fontes. Polissacarídeos sulfatados têm sido descritos como agentes anticoagulantes e antitrombóticos, devido à similaridade estrutural com a heparina (FEITOSA e CUNHA, 2009).

Yermak et al. (2012) avaliaram as propriedades de carragenas, verificando efeitos imunomodulatórios e atividade anticoagulante dependentes da estrutura do

polissacarídeo. No mesmo contexto, Souza et al. (2012) verificaram as propriedades de galactanas isoladas de algas vermelhas, demonstrando ação pró-inflamatória, atividade anticoagulante e antiangiogênica em doses elevadas. Shi, Zhang e Yang (2013) demonstraram atividade antioxidante e imunomodulatória de polissacarídeos obtidos do cultivo de *Ganoderma lucidum* em resíduos de soja.

A aplicação clínica de alguns polissacarídeos pode apresentar limitações, devido ao elevado peso molecular e viscosidade dos mesmos e, ainda, a baixa solubilidade de alguns. Nesse sentido a modificação química pode ser uma oportuna estratégia para aplicação como agentes terapêuticos (SARANGI et al. 2006; ZONG, CAO e WANG, 2012; ZHANG et al. 2013).

2.2 EXOPOLISSACARÍDEOS

Os exopolissacarídeos são definidos comumente como polissacarídeos extracelulares, produzidos por fungos e bactérias e excretados para o meio extracelular, e têm sido reconhecidos como biomacromoléculas de elevado valor agregado. Dependendo do sistema microbiano, alguns polissacarídeos permanecem associados à superfície celular, enquanto outros são encontrados no meio extracelular (SILVA e HASHIMOTO, 2006; MAHAPATRA e BANERJEE, 2013).

Biopolímeros, também conhecidos como gomas, tem a capacidade de formar géis e soluções viscosas, sendo geralmente solúveis em água. São produzidos por uma variedade de organismos, o que lhes garantem características físico-químicas próprias (PRAJAPATI, 2013). Devido a essas propriedades, tornaram-se moléculas de alto valor agregado e com ampla variedade de aplicações industriais (CHOA et al. 2006), incluindo aplicações nas indústrias de petróleo e no campo médico, sendo produtos da biotecnologia amplamente aceitos (ONBASLIA & ASLIMB, 2009).

A biossíntese de alguns exopolissacarídeos (EPSs) está diretamente associada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente. Desempenham diversas funções na célula, tais como, proteção contra dessecação, constituem uma barreira impedindo a união de vírus a sítios específicos da parede celular, neutralizam toxinas, atuam como fonte de carbono e energia, são importantes na conversão do excesso de substrato em um material

pouco metabolizável por outros microrganismos, além de interagirem com células de animais ou plantas com relações específicas, simbióticas ou patogênicas (BULLOCK & KRISTIANSEN, 1987).

Segundo Mahapatra e Banerjee (2013) a produção de EPS por fungos depende principalmente do tipo de cepa utilizada, da composição do meio de cultivo, bem como das condições físicas e modo de condução do processo.

2.2.1 β -D-glucanas

As glucanas são polímeros de unidades D-glicopiranosídicas, unidas por ligações glicosídicas, com configurações α ou β . Apesar da simplicidade da composição monossacarídica, grande diversidade pode ser encontrada no número e configuração anomérica das unidades de D-glicopiranosose, posição e sequência das ligações glicosídicas ao longo da cadeia, grau de ramificação e conformação de sua cadeia (CARVALHO et al. 2013; GRABAUM et al. 2012).

As β -D-glucanas ocorrem como polissacarídeos constituintes da parede celular em uma variedade de cereais, especialmente em cevada e aveia (RIEDER et al. 2012). Além dos cereais, podem ser isoladas de fontes como fungos, bactérias e algas, podendo diferir em suas estruturas ou solubilidade em água e álcalis (NOVAK & VETVICKA, 2009). A principal função estrutural das β -glucanas é auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular de fungos e leveduras. No ambiente natural em que os microrganismos são encontrados, tais polímeros podem estar relacionados à patogenicidade, ou também estarem associados à interação planta-microrganismo, proporcionando proteção à célula microbiana contra a dessecação ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários (BAUERMEISTER, 2010).

As β -D-glucanas de origem fúngica são polissacarídeos constituídos de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas (comumente $(1\rightarrow3)$), mas também por ligações do tipo $(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$, $(1\rightarrow6)$, $(1\rightarrow3;1\rightarrow4)$ (Figura 1). Elas têm sido isoladas da parede celular de leveduras, micélio fúngico, corpo de frutificação de fungos e também podem ser produzidas extracelularmente por fungos em cultivos submersos. $(1\rightarrow6)$ - β -D-glucanas fúngicas, produzidas e excretadas para o

meio, são menos comuns e há poucas informações sobre a fisiologia microbiana de sua produção e atividades biológicas (TSIAPALI et al. 2001; JUNG et al. 2008; NOVAK E VETVICKA, 2008).

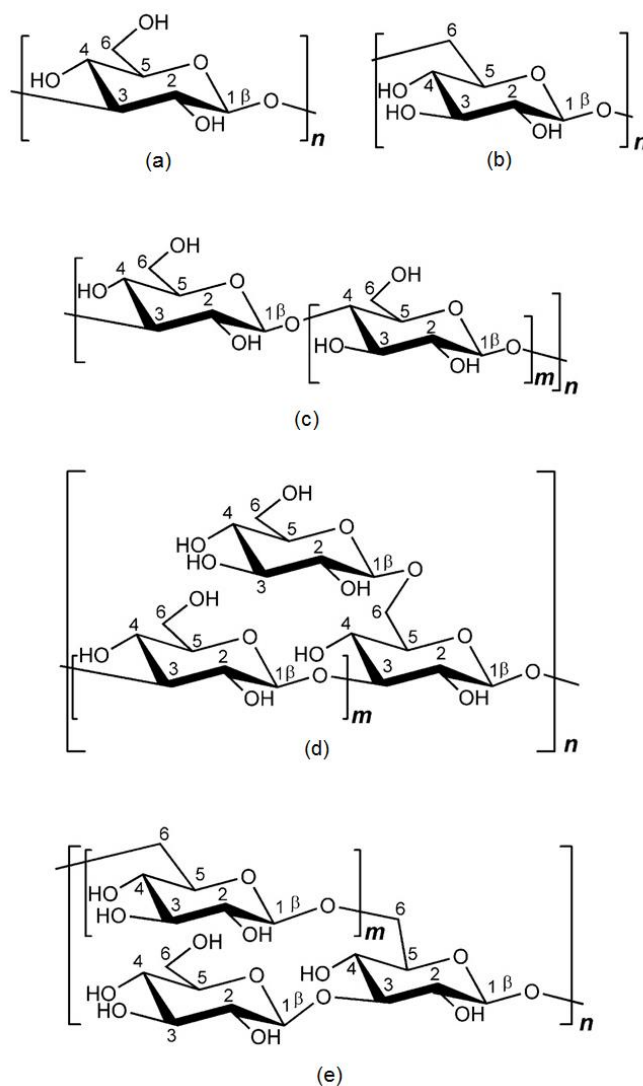


Figura 1 – Estrutura de β -glucanas fúngicas: (a) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana; (b) (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana; (c) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucana; (d) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana; (e) (1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana

Fonte: Adaptado de Synytsya & Novák (2013)

A razão pela qual as β -glucanas têm despertado atenção são seus notáveis efeitos fisiológicos. Pertencem ao grupo dos compostos fisiologicamente ativos, coletivamente denominados Modificadores da Resposta Biológica (BRM) (ZONG, CAO e WANG, 2012). Estes biopolímeros não são sintetizados pelos seres humanos, portanto não são reconhecidos pelo sistema imunológico como auto-

moléculas, conseqüentemente induzem tanto a resposta imune inata como a adaptativa (CHEN e SEVIOUR, 2007; GRAUBAUM et al. 2012).

β -glucanas fúngicas têm demonstrado atividade antiproliferativa (FANG et al. 2012; ZABULYTE et al. 2012; JABBER 2011), imunomodulatória (ZYCOVA et al. 2013; KIM et al. 2011), como probióticos (LAM & CHEUNG 2013) e antioxidante (DENG et al. 2012). Além de proteção contra infecções microbianas de alguns patógenos como *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, Aspergiloses, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei*, *Mesocestoides corti*, *Trypanosoma cruzi* e *Eimeria vermiformis* (NOVAK & VETVICKA, 2009).

Auinger et al. (2013) verificaram a ingestão de (1,3)-(1,6)- β -glucana fúngica de *S. cerevisiae*, por indivíduos saudáveis, a fim de verificar sua ação em relação à gripe. Seus resultados evidenciaram que a glucana ajudou a reduzir em 25% as gripes comuns sintomáticas, quando comparado ao placebo, além de não apresentar sinais de toxicidade aos seres humanos estudados.

Outra importância que têm ganhado destaque em relação às glucanas é sua atuação como fibras solúveis. Estes polímeros podem agir como fibras dietéticas, protegendo a parede intestinal, servindo como probióticos e exercendo efeitos sobre a degradação de carboidratos disponíveis e, conseqüentemente, sobre o índice glicêmico dos alimentos ingeridos (KOZARSKI et al. 2013; MIRA, GRAF e CÂNDIDO, 2009).

À medida que a incidência de obesidade, a diabetes e as doenças cardíacas continuam aumentando, dietas ricas em fibras estão em evidência, na busca da redução de níveis de glicose e colesterol sanguíneos. A aveia e a cevada tem sido reconhecidas como fontes superiores de fibras dietéticas solúveis, elas contêm (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucanas em sua parede celular, que têm sido descritas como importantes na redução do colesterol sanguíneo e na regulação dos níveis de glicose pós-prandial. Estes efeitos estão relacionados à capacidade de β -glucanas em desenvolver alta viscosidade no trato gastrointestinal, podendo retardar a absorção de glicose (DONG et al. 2011), interferir na digestão do amido (REGAND et al. 2011) e absorção de colesterol (LAZARIDOU et al. 2014; SHARAFBAFI et al. 2014; SIKORA et al. 2013).

Inúmeros estudos relacionam efeitos benéficos de glucanas em diferentes sistemas fisiológicos, no entanto, apenas uma parte destes traduzem estes

benefícios biológicos com mecanismos consistentes (VASCONCELOS et al. 2013; MIRANDA et al. 2008). Há evidências de que as glucanas exibem suas propriedades biológicas através de uma cascata de eventos, incluindo ligações específicas a macrófagos, interação com seus receptores, e sinalização para o núcleo celular, que leva a expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose de células em proliferação e invasão (NOVAK & VETVICKA, 2009). Em vertebrados, a imunomodulação de β -glucanas pode estar relacionada à sua capacidade de ativar leucócitos, ao entrarem em contato com receptores celulares como Dectina-1, CR3 (Receptor Complemento-3), LacCer (Lactosilceramida) e TLR-2. Após esse contato, as células tornam-se mais ativas na fagocitose, morte e digestão de bactérias, além de gerarem moléculas de sinalização (citocinas), que estimulam a formação e ativação de novas células sanguíneas (CHEN et al. 2007; SOLTANIAN et al. 2009).

Um fator importante, que provavelmente contribui para a atividade biológica das β -glucanas sobre a imunidade de vertebrados, é o longo período de tempo que permanece em tais organismos, em função da ausência de β -glucanases. Os macrófagos representam o que é provavelmente a única ferramenta para a degradação das β -glucanas no organismo e como consequência as β -glucanas estão disponíveis em células por semanas ou até meses, até serem degradadas via lentos processos oxidativos (NOVAK & VETVICKA, 2008; SOLTANIAN et al. 2009).

2.3 FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* pertence à família *Botryosphaeriaceae*, gênero *Lasiodiplodia*, anteriormente designado como *Botryodiplodia theobromae* (MUNIZ et al. 2011). Representa o estado assexuado de *Botryosphaeria rhodina*, sendo que, isolados diferentes, quando em meio de cultura, podem apresentar características variáveis em coloração e velocidade de crescimento. Da mesma forma, podem ser encontradas variações na capacidade de utilização de substratos, tolerância a faixas de temperatura, produção de toxinas ou outros metabólitos (PEREIRA et al. 2006). As colônias de *L. theobromae* variam de coloração acinzentada a negras, dependendo do substrato, com abundante micélio aéreo (RODRIGUES, 2003).

Espécies da família *Botryosphaeriaceae* são frequentemente descritas como patógenos oportunistas, geralmente isolados de plantas aparentemente saudáveis, em métodos de isolamento de fungos endofíticos, porém, em situações de estresse da planta, podem se tornar patogênicos (SAKALIDIS et al. 2011).

Lasiodiplodia theobromae é um fungo patogênico a plantas de regiões tropicais e subtropicais, conhecido por sua variedade em compostos bioativos (LIMA et al. 2012; TSUKADA et al. 2010). Está relacionado à infecção em mais de 500 espécies de plantas, sendo que no Brasil, é considerado um grave problema do setor agrícola (BARROS-FILHO et al. 2010).

Este fungo tem sido associado a manchas foliares, necrose, gomose e até mesmo a morte de muitas plantas hospedeiras, incluindo herbáceas como mandioca e beringela, e plantas lenhosas, como mangueira, coqueiro, eucalipto e pessegueiros. Menos frequentemente também tem sido associado com micoses e pneumonia em humanos (MUNIZ et al. 2011).

2.3.1 Lasiodiplodana

Recentemente foi descrita na literatura a lasiodiplodana, uma (1→6)-β-D-glucana produzida extracelularmente pelo fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (Figura 2) (VASCONCELOS et al. 2008, CUNHA et al. 2012). As (1→6)-β-D-glucanas são comumente encontradas como compostos insolúveis da parede celular de ascomicetos e basidiomicetos (LESAGE E BUSSEY, 2006). O isolamento destas é complicado e envolve múltiplas etapas de extração com hexano (remoção de lipídios), seguida por extração com água quente e fria e com álcali (CORRADI DA SILVA et al. 2008). No entanto a lasiodiplodana é secretada no meio de cultivo submerso e é facilmente precipitada com etanol, sendo seu isolamento mais simples e econômico do que a extração da parede celular de fungos.



Figura 2 – Fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol

Túrmina et al. (2012) avaliaram os efeitos da Lasiodiplodana (MMPI) em ratos albinos suíços (*Mus musculus*) alimentados por gavagem durante 28 dias. Os autores relataram não haver sinais de toxicidade, alterações hematológicas ou histopatológicas (rins, baço, fígado e coração), além de haver atividade hipoglicemiante em machos e redução de transaminases em machos e fêmeas. Cunha et al. (2012) demonstraram atividade antiproliferativa dose dependente da lasiodiplodana frente a células de câncer de mama (MCF-7) em ensaios *in vitro*. Vasconcelos et al. (2013) avaliaram a atividade anticoagulante de lasiodiplodana oriunda de *Lasiodiplodia theobromae* (MMLR) após sulfatação, demonstrando que, a derivatização da molécula resultou em atividade anticoagulante.

2.4 MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA QUÍMICA DE GLUCANAS

As variadas atividades biológicas de β -glucanas podem estar ligadas à sua estrutura molecular, incluindo tipo de ligação glicosídica, ramificações ao longo da cadeia, peso molecular e solubilidade em água (VOLMAN et al. 2008; GRAUBAUM

et al. 2012). Desta forma, modificações químicas na estrutura dos polissacarídeos como sulfatação, carboximetilação, fosforilação e acetilação são consideradas importantes ferramentas para aumentar suas propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Figura 3) (TRANQUILAN-ARANILLA et al. 2012; YE et al. 2012; JINDAL et al. 2013). A eficiência do processo de derivatização química da molécula de polissacarídeo é comumente avaliada e monitorada por espectroscopia de RMN e por determinação do grau de substituição (DS) de grupamentos químicos da molécula (MA et al. 2012; WANG et al. 2012; SYNYTSYA & NOVAK, 2013).

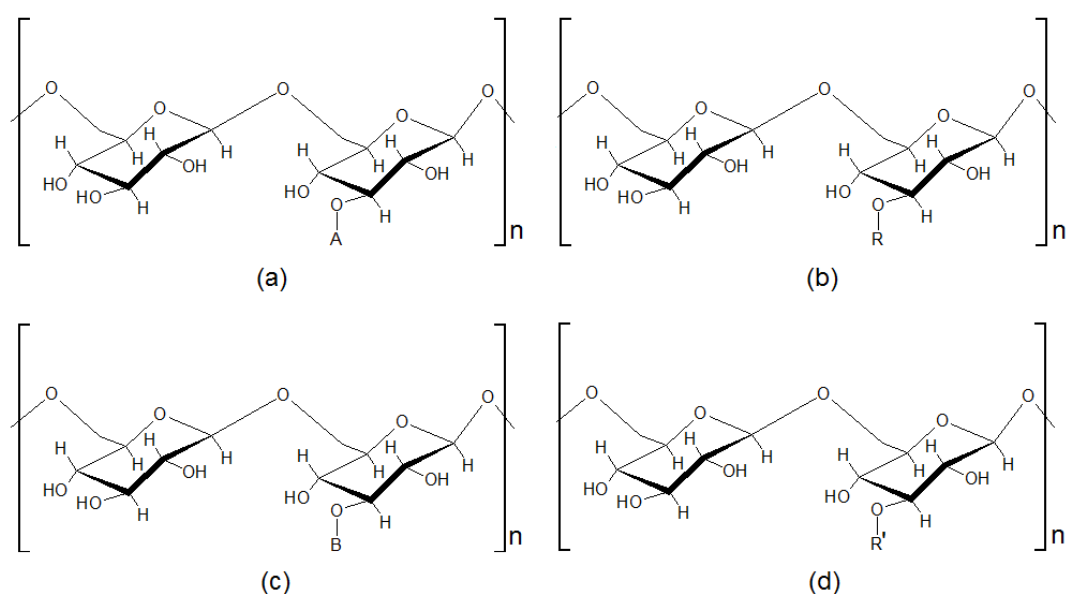


Figura 3 – Representação estrutural de glucanas modificadas através de: (a) Sulfatação, onde o grupo A representa S^+O_2HO . (b) Carboximetilação, onde o grupo R representa $^+CH_2COOH$. (c) Fosforilação, onde o grupo B representa $(HO)_2OPO^-$. (d) Acetilação, onde R´ representa CH_3COO^-

Na literatura são verificados vários trabalhos que descrevem estudos voltados à derivatização química de glucanas. Liu et al. (2014) estudaram uma (1→4),(1→6)-β-D-glucana de *Phellinus ribis* após sulfatação, verificando inibição da proliferação de células de câncer de ovário in vitro e de carcinoma hepatocelular em ratos.

Wang et al. (2013) avaliaram a remoção de radicais livres e atividade imunomodulatória do de β-(1→3)-D-glucana extraída do corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum* após sulfatação e carboximetilação. Os dois polissacarídeos derivatizados apresentaram atividade antioxidante e imunomodulatória em ratos. No mesmo contexto, Chen et al. (2010) verificaram que uma β-(1→3)-D-glucana de

Poria cocos, após carboximetilação e sulfatação na mesma molécula, apresentou um aumento significativo das funções imunitárias em ratos, além ação anti-tumoral.

Ye, Xu e Li (2012) demonstraram atividade anticoagulante de um exopolissacarídeo produzido por *Acaudina molpadioidea*, após metilação, carboximetilação e sulfatação da molécula, sendo o derivado sulfatado o que apresentou maior atividade anticoagulante.

Chen et al. (2009) avaliaram a fosforilação de (1→3)-β-D- glucana produzida por *Poria cocos*. Os resultados demonstraram aumento da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra células do sarcoma S-180.

2.4.1 Carboximetilação

A carboximetilação de vários polímeros naturais como celulose, amido, quitina, quitosana, dextrana, galactomanana e xilanas têm sido estudada nos últimos anos. Os derivados obtidos apresentam propriedades que os tornam potenciais moléculas para aplicações na área química, farmacêutica, de alimentos e indústria de cosméticos (TRANQUILAN-ARANILLA et al. 2012).

A carboximetilação é geralmente feita por meio de suspensão do biopolímero com ácido cloroacético em condições alcalinas (SYNYTSYA & NOVÁK, 2013). A amostra é tratada com uma base forte, como hidróxido de sódio, que desprotona os grupos hidroxil livres para formar alcóxidos, aumentando seu poder nucleofílico. Grupos carboximéticos são, então, formados em uma reação entre o alcóxido e ácido cloroacético (Figura 4) (DODI et al. 2011).

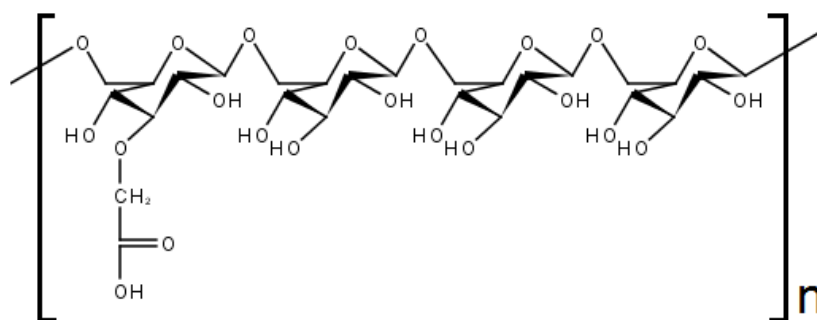


Figura 4 – (1→6)-β-D-glucana carboximetilada

Chen et al. (2013) verificaram que a carboximetilação de uma β -glucana de milho resultou em uma molécula com maior solubilidade, diminuição na viscosidade e aumento de atividade antioxidante. De maneira semelhante Wang, Yu, e Mao (2009) demonstraram os efeitos do grau de carboximetilação do polissacarídeo (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana de *Poria cocos*, e observaram um significativo aumento na solubilidade após a modificação e uma remoção de radicais livres dose dependente.

Wiater et al. (2012) avaliaram (1 \rightarrow 3)- α -D-glucana from *Ganoderma lucidum* após carboximetilação, e observaram um decréscimo no metabolismo de células de carcinoma cervical. Esse tipo de atividade foi baseado na ativação do sistema imune com conseqüente ação na morfologia, metabolismo e viabilidade das células tumorais.

Zhang et al. (2004) carboximetilaram uma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana de *Pleurotus tuber-regium*. O resultado foi uma molécula mais solúvel e com alta atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*. De forma similar, Kogan et al. (2002) verificaram que uma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana carboximetilada, em administração conjunta ao quimioterápico ciclofosfamida, aumentou a inibição de células do carcinoma de Lewis, além de inibir metástases pulmonares, desta forma, aumentando a eficiência do antitumoral preconizado.

2.5 COMERCIALIZAÇÃO DE β -GLUCANAS

O comércio de glucanas, como forma de suplemento alimentar, tem se tornado muito popular, principalmente em endereços eletrônicos chineses, onde as fontes de β -glucanas, principalmente cogumelos, são conhecidas e consumidas há muitos anos.

Descrita como “Um potente imuno-estimulante com propriedades clinicamente demonstradas”, uma β -(1,3/1,6)-D-glucana extraída de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, fabricada pela Biothera® pode ser adquirida, via internet, ao valor de 36.00 €. É comercializada como cápsulas de 250 mg, contendo, no mínimo, 75% de glucanas e tendo a recomendação da ingestão de uma cápsula/dia (SUPER-SMART, 2013).

Beta-glucana Source Naturals® é descrita como eficaz na melhora do sistema imunológico, sendo derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, possuindo melhor sabor que a molécula extraída da aveia e por não ser solúvel em água, não se torna viscosa. O fabricante recomenda a ingestão de uma cápsula/dia de 100 mg de beta-1,3/1,6-glucana antes das refeições (BIOVEA-BRASIL, 2013).

O site supplementspot, comercializa β -glucana em cápsulas de 400 mg, sendo indicada pelo fabricante a ingestão de duas cápsulas/dia, com valor comercial de \$19.95 (SUPPLEMENTSPOT, 2013).

No endereço eletrônico da empresa Amazon®, pode-se encontrar β -1,3/1,6-glucana de 250 mg. Indicado para vegetarianos, sendo livre de glúten, soja, amido, lactose, corantes, adoçantes e conservantes, livre de substâncias geneticamente modificadas. O site enfatiza que beta-(1-3, 1-6)-glucana é uma forma natural de fibra dietética solúvel, fornece um papel na ativação do sistema imunológico e não deve ser confundida com as beta-glucanas encontrada na aveia (AMAZON, 2013).

Também podem ser encontradas glucanas carboximetiladas com comercialização on-line. Um exemplo é o oferecido pela empresa chinesa Angel Yeast®, uma glucana carboximetilada com DS 0.5-0.75 para aplicação tópica. “O milagre da glucana carboximetilada é a sua forma molecular única”. Quando aplicado na pele, ela trabalha poderosamente a nível celular, aumentando a capacidade da sua pele em reparar, proteger e melhorar sua aparência (Angelyeast, 2013). CMG é uma beta-glucana de levedura, com parte carboximetilada, que é solúvel em água, tendo função em cosmética para revitalizar as defesas da pele, melhorar a reparação natural e reduzir a sensibilidade (21FOOD, 2013).

2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são moléculas altamente reativas liberadas durante o estresse oxidativo, produzidos pela luz solar, luz ultravioleta, radiações ionizantes, reações químicas e processos metabólicos. São capazes de danificar numerosas substâncias biológicas, incluindo DNA, lipídeos, proteínas e membranas, e iniciam eventos que levam ao aumento do risco de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas e

diabetes (PIKE e CHANDRA, 1995; AJITH e JANARDHANAN, 2007; CHEN e SEVIOUR, 2007; THETSRIMUANG et al. 2011). A oxidação pode também afetar os alimentos, resultando em alterações nutricionais, de cor, sabor e textura (ANTOLOVICH et al. 2002).

Denominam-se antioxidantes as substâncias que, em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação do substrato (HUANG et al. 2005). Substâncias antioxidantes têm a capacidade de remover radicais livres do meio e podem fornecer proteção contra doenças. Alguns antioxidantes sintéticos têm sido utilizados na preservação de alimentos, como butil-hidroxianisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), no entanto, tais substâncias podem contribuir para efeitos secundários indesejáveis, como danos ao fígado e desenvolvimento de tumores em longo prazo (THETSRIMUANG et al. 2011; ZHANG et al. 2012). Neste sentido, os antioxidantes naturais, oriundos de frutos, legumes, cogumelos, são preferencialmente utilizados em aplicações alimentares. Tais substâncias têm amplo campo de aplicações na indústria, especialmente como conservantes em alimentos e cosméticos (KOZARSKI, 2012).

Em relação ao potencial antioxidante de polissacarídeos, não há um mecanismo exato definido, porém, está relacionado ao fornecimento de hidrogênios ou elétrons pela molécula. Tem sido relatado, que os polissacarídeos podem possuir capacidade de doar hidrogênios por sua fraca energia de dissociação da ligação OH. Além disso, a inserção de grupos, como sulfatos e carboxila, no polissacarídeo, diminuem ainda mais a energia de dissociação OH, facilitando a doação de hidrogênios (JIN et al. 2011; SHI et al. 2013).

A adição de substituintes doadores de elétrons na molécula polissacarídica provavelmente aumenta a atividade antioxidante, como resultado do aumento da densidade eletrônica no anel heterocíclico de carbonos. Baixas atividades podem ser associadas com a formação de fortes ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, inibindo a reatividade das hidroxilas do polímero (XU et al. 2009).

Lin et al. (2012) isolaram uma α -1,6-(6-metil)-glucana com ramificações (α -1,4) com N-acetil-D-glucosamina, a partir de *Bordetella sp.* B4 e verificaram atividade de sequestro de radicais livres superior ao ácido ascórbico, empregado como padrão de referência.

Xiang, Xu e Li (2012) avaliaram a atividade antioxidante de exopolissacarídeo produzido por *Inonotus obliquus*. Os polissacarídeos avaliados tiveram habilidade na remoção de radicais hidroxila e DPPH de maneira dose-dependente.

Deng et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de uma β -D-glucana isolada do corpo de frutificação de *Dictyophora indusiata*. A redução do radical DPPH pela glucana (1 mg/mL) foi de 50,27%, sendo mais baixa que a do ácido ascórbico (81,92%). A remoção de radicais hidroxila foi dependente da concentração do polissacarídeo, aumentando de 9,52% para 39,59% no intervalo de concentração de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL, já o ácido ascórbico atingiu 73,81% a 1,0 mg/mL.

Kozarski et al. (2012) estudaram a atividade antioxidante de polissacarídeos isolados do corpo de frutificação dos fungos *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* e *Trametes versicolor*. A capacidade antioxidante dos extratos de *G. applanatum* e *T. versicolor* atingiram valores de 77,5% - 81,9% e 74,7% - 77,5%, respectivamente em condições de concentração de EPS variando entre 1,0-10,0 mg/mL. Extratos de *L. edodes* expressaram a sua capacidade antioxidante máxima de 71,7% a 0,1 mg/mL. Extratos de *G. lucidum* mostraram máxima capacidade neutralizante de radicais livres (94,8%) a 2,5 mg/mL.

2.6.1 Sequestro do Radical DPPH

Uma grande variedade de metodologias é encontrada na literatura relacionada ao sequestro do radical livre DPPH, baseados no método original de Marsden Blois (1958) em que foi demonstrada, pela primeira vez, a doação de um átomo de H ao radical DPPH a partir da molécula de cisteína. Neste artigo, é demonstrado que compostos como a glutathiona, aminas aromáticas, α -tocoferol e compostos aromáticos podem ser detectados pelo método DPPH. Por outro lado, fenóis monohídricos, açúcares simples, purinas e pirimidinas, não reagem, e as proteínas são precipitadas. O método mais recente, descrito por Brand-Williams e colaboradores (BRAND-WILLIAMS et al. 1995) tem sido utilizado como referência para vários trabalhos (MOLYNEUX, 2004).

O método de sequestro do radical livre DPPH é amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de compostos variados, sendo considerado rápido,

fácil e reprodutível. O radical DPPH é estável e mostra máxima absorvância a 517 nm em etanol. Seu mecanismo é baseado na doação de hidrogênio do antioxidante para o radical DPPH, que é convertido na forma não radical DPPH-H, com redução da absorvância (MARXEN et al., 2007; YANG et al. 2011; DENG et al. 2012).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515nm - 520 nm e por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas, facilitando seu uso. Na presença de um doador de hidrogênio a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (Figura 5) (TIRZITIS e BARTOSZ, 2010; SUCUPIRA et al. 2012).

A molécula de DPPH caracteriza-se como um radical livre estável por virtude da deslocalização do elétron livre da molécula, de modo que a molécula não dimeriza, como seria o caso com a maioria dos outros radicais livres. A deslocalização de elétrons também dá origem à cor violeta forte, caracterizado por uma banda de absorção centrada em solução de etanol a cerca de 517 nm (ALAM et al. 2013).

Quanto ao solvente a ser utilizado, o método parece funcionar igualmente bem com metanol ou etanol, que não interferem na reação (MOLYNEUX, 2004). O método de DPPH pode ser utilizado em solventes orgânicos aquosos e não polares, e pode ser usado para examinar ambos os antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos. (KEDARE e SINGH, 2011).

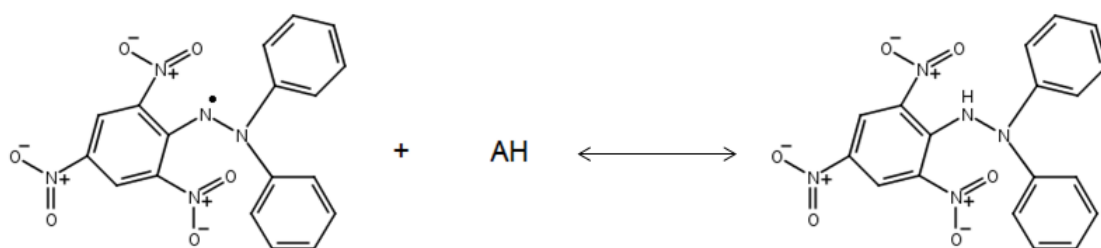


Figura 5 – Ação de antioxidante (AH) sobre o radical livre DPPH

2.6.2 Sequestro do Radical ABTS

O ensaio de ABTS é frequentemente utilizado para avaliar o poder antioxidante total de um único composto ou de uma mistura complexa de vários polissacarídeos (TIRZITIS e BARTOSZ, 2010; YANG et al. 2011).

Originalmente, este ensaio foi descrito por Miller et al. (1993) utilizado metahemoglobina e H_2O_2 para gerar ferromioglobina, que em seguida reagia com ABTS, formando o radical. Nestes testes a amostra era adicionada ao meio de reação antes de o radical ser formado. Esta ordem de adição dos reagentes foi criticada, pois os antioxidantes podiam reagir com os agentes oxidantes, levando a uma avaliação errada de resultados. Assim, foram propostos protocolos com adição posterior da amostra, nestas versões a amostra a ser testada é adicionada após a geração do radical ABTS (PRIOR et al. 2005; BADARINATH et al. 2010).

O radical ABTS é produzido a partir do ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico por reações enzimáticas ou químicas, como a partir da oxidação do sal persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, por um período 12 a 16 horas (SUCUPIRA et al. 2012). Esse método baseia-se na geração do radical ABTS, que apresenta cor azul esverdeada, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do radical ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (Figura 6). Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do radical ABTS é determinada. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (ALAM et al. 2013).

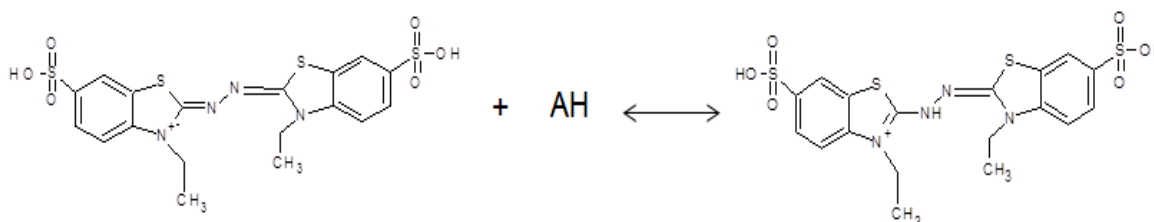


Figura 6 – Ação de antioxidante (AH) sobre o radical livre ABTS

2.6.3 Poder Redutor Férrico (FRAP)

O método FRAP foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996) e originalmente foi aplicado ao plasma, porém, atualmente, tem sido utilizado em outros fluidos biológicos, alimentos, extratos, sucos e polímeros. O método baseia-se na redução do complexo Ferro(III)-(2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (TPTZ) à forma ferrosa Fe(II)-TPTZ em pH ácido (mantem a solubilidade do ferro) (Figura 7). O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, sendo os resultados obtidos com aumento da absorvância a 593 nm após uma incubação de 30 minutos a 37°C. Os valores de FRAP podem ser expressos como micromolar de Fe^{2+} equivalentes por kg ou por g de amostra (ANTOLOVICH et al. 2001; SUCUPIRA et al. 2012; ALAM et al. 2013)

O mecanismo FRAP é totalmente por transferência de elétrons, não permitindo detectar compostos que fazem transferência de hidrogênio como tióis e proteínas. Assim, seus valores tem pouca relação com outros métodos, podendo ser útil em distinguir os mecanismos dominantes de diferentes antioxidantes (PRIOR et al. 2005; BADARINATH et al. 2010).

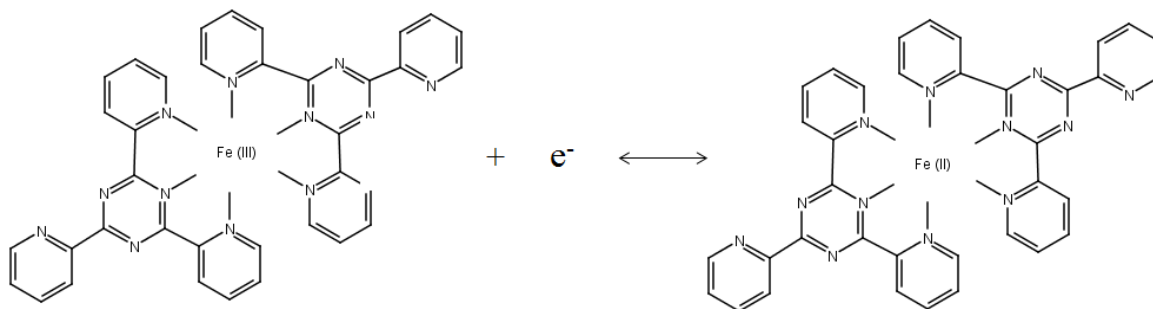


Figura 7 – Ação de antioxidante (e^-) sobre o complexo Fe(III)-TPTZ

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir β -1,6-D-glucana (lasiodiplodana) em biorreator a partir do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI e modificar quimicamente a molécula obtida, vislumbrando atividades biológicas de interesse industrial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lasiodiplodana em biorreator através de cultivo submerso;
- Obter derivado da lasiodiplodana, por modificação química, através de carboximetilação;
- Avaliar a estrutura química da lasiodiplodana bruta e carboximetilada por espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C ;
- Determinar o grau de substituição da biomolécula pelos grupamentos carboximetílicos após derivatização;
- Caracterizar a lasiodiplodana bruta e carboximetilada por espectroscopia de difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a lasiodiplodana bruta e carboximetilada quanto às propriedades térmicas;
- Avaliar a hidrossolubilidade da lasiodiplodana original e modificada;

- Avaliar a citotoxicidade da lasiodiplodana original e modificada sobre hemácias, em testes *in vitro*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da lasiodiplodana original e modificada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPA FÚNGICA

No presente trabalho foi utilizado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*). O fungo foi mantido em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol a 4°C, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol.

4.2 PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO

4.2.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, inicialmente foi transferida uma alçada de micélio do fungo para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 horas. O micélio crescido na superfície das placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Meio de Sais Minerais de Vogel - VMSM (VOGEL, 1956) e glicose (5 g/L) e cultivado por 48 horas a 28 °C sob agitação (150 rpm). A pré-cultura foi homogeneizada assepticamente em mixer por 30 segundos. O homogeneizado de células foi centrifugado e no micélio recuperado foi adicionada água destilada esterilizada para originar uma solução padrão com absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (STELUTI, GIESE e PIGGATO, 2004). O processo de produção do inóculo está descrito na Figura 8.

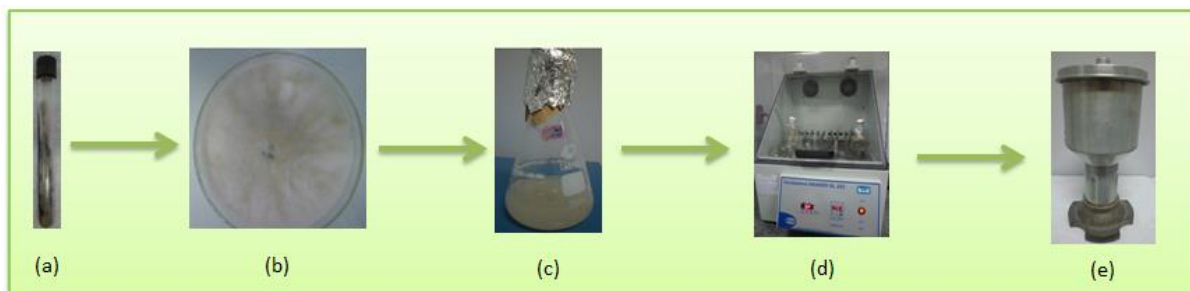


Figura 8 – Preparo do inóculo de *L. theobromae* para o cultivo submerso: (a) fungo armazenado em tubo, (b) fungo cultivado em placa, (c-d) inóculo fúngico cultivado em shaker, (e) homogeneização em mixer para padronização do inóculo

4.2.2 Cultivo Submerso de *L. theobromae* e Recuperação do Exopolissacarídeo

O cultivo submerso foi conduzido em biorreator de bancada (Biostat B, B. Braun International, Alemanha) com cuba de 2 L, equipado com termopar para controle de temperatura. O volume de trabalho foi de 1,0 L, fluxo de ar de 0,8 vvm, tempo de cultivo de 72 horas, 28 °C de temperatura e 400 rpm de velocidade de agitação da turbina. O pH inicial do meio fermentativo foi ajustado para 5,5 através de adição de solução de ácido clorídrico 1 M. Como meio de cultivo foi empregado meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956) e glicose (20 g/L) como fonte de carbono e um volume de inóculo de 100 mL (CUNHA et al. 2012).

No final do processo, o caldo de cultivo foi separado da biomassa por centrifugação (1500 x g, 30 min.) e intensamente dialisado contra água sob refrigeração (4°C) usando tubos de diálise com diâmetro de poros de \cong 12 kD (1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich). Posteriormente, o exopolissacarídeo (EPS) foi precipitado com etanol absoluto a 4°C (*overnight* em geladeira). O precipitado foi recuperado por filtração em papel filtro e ressolubilizado em água destilada a 60°C sob agitação. O material obtido foi novamente submetido à intensa diálise contra água destilada (6 dias, com 3 trocas diárias de água) e liofilizado.

O processo de produção, recuperação e purificação da lasiodiplodana está representado na Figura 9.

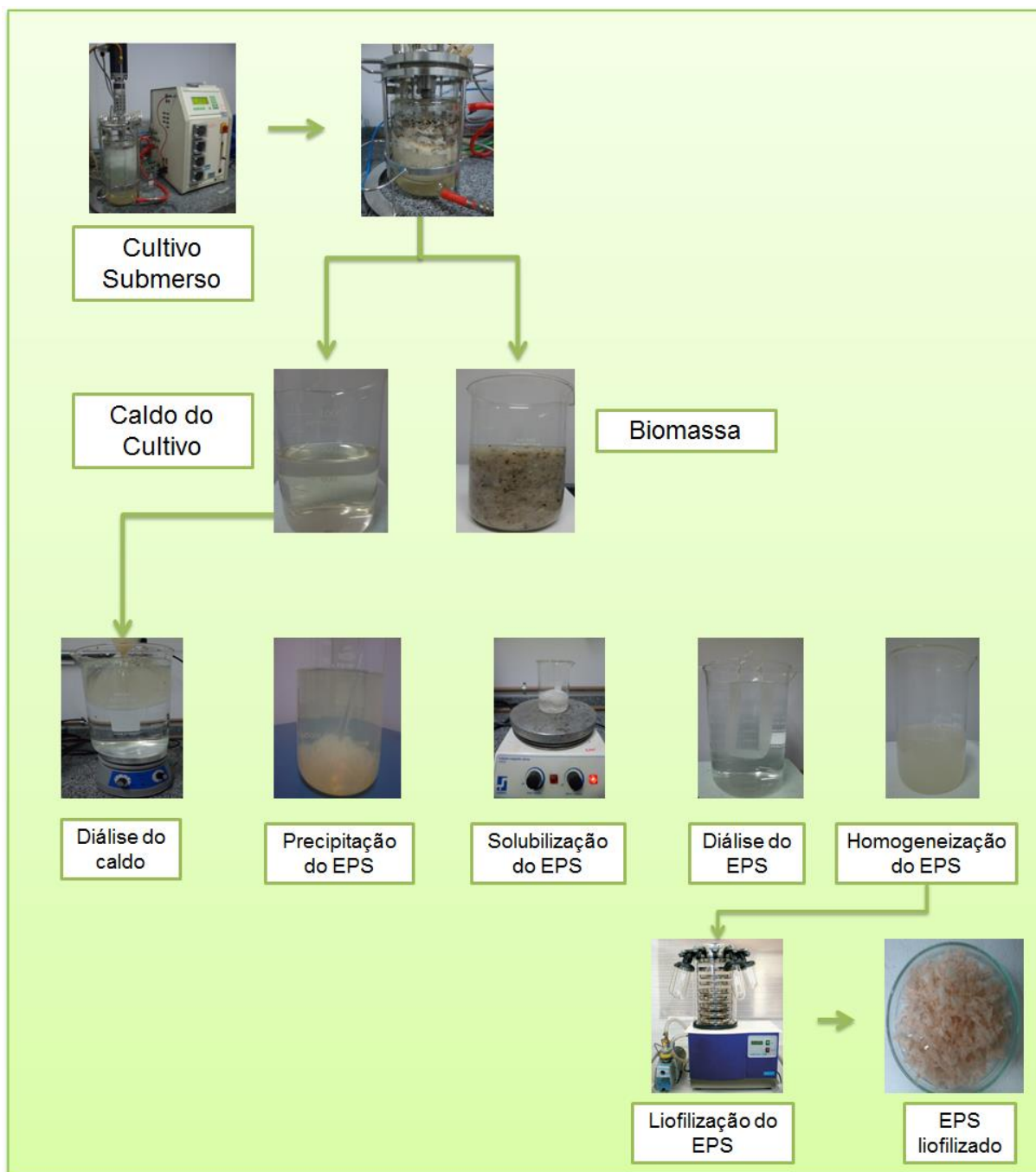


Figura 9 – Fluxograma do processo de produção, recuperação e purificação da lasiodiplodana

A biomassa obtida no cultivo foi lavada sucessivamente com água quente para remoção de todo exopolissacarídeo. Em seguida, foi seca em estufa a 50 °C, para quantificação da biomassa seca.

4.2.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos do Cultivo Submerso

O perfil fermentativo de *L. theobromae* MMPI no cultivo submerso foi avaliado através da determinação dos parâmetros cinéticos: rendimento de lasiodiplodana ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica em lasiodiplodana (Q_P), produtividade volumétrica de biomassa celular (Q_X), taxa de consumo de substrato (Q_S), percentual de consumo de substrato (Y_C), produção de biomassa por unidade de glicose consumida ($Y_{X/S}$) e rendimento específico (Y_e). Tais parâmetros foram calculados de acordo com as equações 1-7.

O rendimento de conversão de glicose em lasiodiplodana ($Y_{P/S}$) foi calculado como a quantidade de lasiodiplodana produzida a partir do substrato consumido:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{lasiodiplodana (g/L)}}{\text{Consumo de glicose (g/L)}} \quad (1)$$

A produtividade volumétrica de lasiodiplodana (Q_P) foi calculada como a relação entre a concentração máxima de lasiodiplodana e o tempo de fermentação:

$$Q_P = \frac{\text{Concentração Máxima de lasiodiplodana (g/L)}}{\text{Tempo de Fermentação (h)}} \quad (2)$$

A produtividade volumétrica de biomassa (Q_X) foi calculada como a razão entre a máxima concentração de biomassa e o tempo de fermentação:

$$Q_X = \frac{\text{Concentração Máxima de Biomassa (g/L)}}{\text{Tempo de Fermentação (h)}} \quad (3)$$

A taxa total de consumo de substrato (Q_S) foi calculada como a razão entre a glicose consumida e o tempo da fermentação:

$$Q_S = \frac{\text{Glicose consumida (g/L)}}{\text{Tempo de Fermentação (h)}} \quad (4)$$

O percentual de consumo de substrato (Y_C) foi calculado pela razão entre o substrato consumido e seu conteúdo inicial:

$$Y_C = \frac{\text{Glicose consumida (g/L)}}{\text{Glicose inicial (g/L)}} * 100 \quad (5)$$

A produção de biomassa por unidade de glicose consumida ($Y_{X/S}$) foi calculada como a razão entre biomassa produzida por glicose consumida:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Biomassa (g/L)}}{\text{Glicose consumida (g/L)}} \quad (6)$$

O rendimento específico (Y_e) foi calculado como a quantidade de lasiodiplodana produzida sobre a biomassa formada:

$$Y_e = \frac{\text{Concentração máxima de lasiodiplodana (g/L)}}{\text{Biomassa produzida (g/L)}} \quad (7)$$

4.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA LASIODIPLODANA POR CARBOXIMETILAÇÃO

A carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizada seguindo protocolo descrito por Wang e Zhang (2009) com adaptações. O EPS (250 mg) foi suspenso em 15 mL de isopropanol à temperatura ambiente e mantido sob agitação por 15 minutos. A seguir foram adicionados lentamente 10 mL de solução de NaOH 30% (m/v) e a mistura foi agitada a 50 °C até completa solubilização da lasiodiplodana. Posteriormente foram acrescentados 3 g de ácido cloroacético (suspenso em pequena quantidade de água destilada) sob agitação. A reação foi conduzida por 8 horas a 50 °C. Após o resfriamento da mistura, à temperatura ambiente, a mesma foi neutralizada com solução de HCl (0,5M). A solução resultante foi dialisada contra água destilada por 8 dias com trocas frequentes de água, usando tubos de diálise 1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich. O produto dialisado (lasiodiplodana carboximetilada) foi liofilizado (Figura 10).

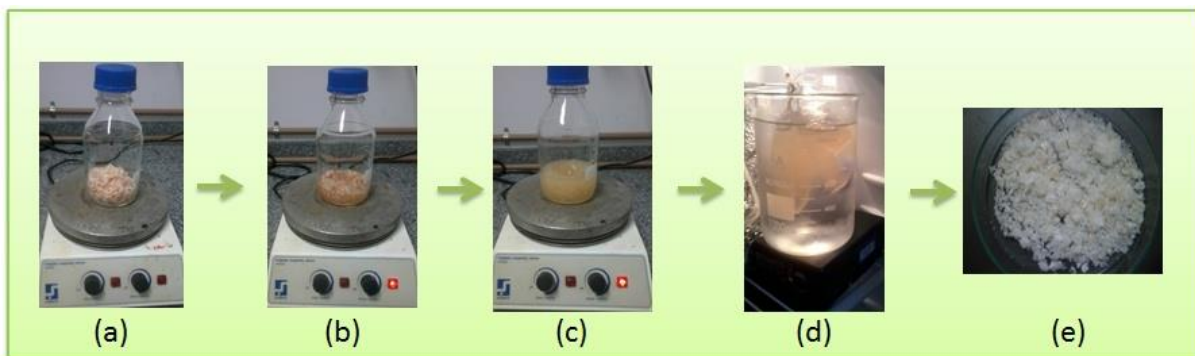


Figura 10 – Etapas da reação de carboximetilação: (a) EPS, (b) adição de Isopropanol e NaOH, (c) completa solubilização do EPS e adição de ácido monocloroacético, (d) diálise, (e) Derivado carboximetilado liofilizado

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA BRUTA E CARBOXIMETILADA

4.4.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho do EPS original e modificado (EPS-C) foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR Spectrometer Frontier, Perkin Elmer (USA), na região de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, usando o método de discos de KBr.

4.4.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C RMN)

Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos em espectrômetro de ressonância nuclear magnética BRUKER Modelo DRX 200 MHz, 4,7 Tesla. Óxido de deutério (D_2O , 99,9%) foi utilizado como solvente para as amostras EPS e EPS-C (10 mg/mL) as quais foram avaliadas em 303 K (29,85 °C). Os espectros foram registrados utilizando tetrametilsilano como padrão de referência interno e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos aos sinais de ^{13}C .

4.4.3 Determinação do Grau de Substituição (DS)

O grau de substituição (DS) do derivado carboximetilado foi determinado pelo método de titulação por neutralização, segundo Tatongjai e Lumdubwong (2010). A molécula carboximetilada (150 mg) foi dissolvida em 100 mL de água ultra pura (Milli-Q), homogeneizada vigorosamente por 3 minutos e centrifugada. O sobrenadante na forma de um sal (EPS-C-Na) foi convertido para a forma ácida (EPS-C-H) em coluna de troca iônica (Amberlite IR-120) usando um fluxo de 3 mL/min. Após a coluna foi lavada com 400 mL de água ultra pura (Milli-Q) e a solução coletada (500 mL) foi seca em estufa a 50°C. O produto resultante foi dissolvido em 100 mL de água destilada e misturado com 3 gotas de fenolftaleína, 2 mL de metanol e 15 mL de NaOH 0,1M. A mistura foi titulada com HCl 0,1 M e água foi utilizada como branco. O DS foi calculado pela seguinte equação:

$$Wc = \frac{c * Mc * (Vb - Vs) * 100\%}{m}$$

$$DS = \frac{Wc * Ma}{(100\% - Wc)X * Mc}$$

Sendo que:

Wc: conteúdo de grupos carboximetil na solução da amostra (m/m %).

c: concentração da solução de HCl (0,1 M) utilizado na titulação.

Mc: massa molar do grupo funcional carboximetil que reagiu com o EPS (58 g/mol).

Ma: massa molar de uma unidade de glicose anidra (162 g/mol).

Vb: volume de HCl usado para titulação do branco (mL).

Vs: volume do HCl utilizado para titulação da amostra (mL)

m: massa correta da amostra EPS-C (mg).

DS: grau de substituição de grupos carboximetil na amostra.

4.4.4 Determinação de Açúcares Redutores, Totais e Proteínas

Açúcares totais foram determinados pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al. 1956). Açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (MILLER, 1959). E a determinação de proteínas foi realizada seguindo método de Bradford empregando soroalbumina bovina 22% como padrão (BRADFORD, 1976).

4.4.5 Análise por Difração de Raios-x

Para obtenção dos padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras foi utilizado difratômetro Shimadzu, modelo XDR-6000, com fonte de radiação de lâmpada de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$), corrente de 30 mA e tensão de 40 kV, velocidade de 0,5 °/min e passo de 0,02 graus.

4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia superficial do polímero e seu derivado. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de bancada (Hitachi, modelo TM3000, USA) a partir das amostras liofilizadas. As amostras foram dispostas no suporte do equipamento aderidas em fitas de carbono e imagens foram obtidas com amplitude de 200 vezes, 400 vezes e 1500 vezes.

4.4.7 Análise Térmica

Amostras liofilizadas de EPS bruto e modificado foram submetidas à Análise Térmica Diferencial (DTA), Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimétrica Derivada (DTG), realizadas em equipamento SDT Q600 TA. A perda de massa foi acompanhada entre 26 °C e 800 °C com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e ar sintético com fluxo de 50 mL/minuto.

4.4.8 Análise da Massa Molecular

A massa molecular da lasiodiplodana não modificada e da molécula carboximetilada foram estimadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) usando dextrana como padrão molecular.

O exopolissacarídeo bruto e seu produto carboximetilado (EPS-C) foram, separadamente, solubilizados em água deionizada (1mg de açúcar total/mL) e filtrados em membranas Millipore (acetato de celulose) com 0,22 μm de porosidade. Alíquotas de 200 μL foram injetadas em cromatógrafo líquido de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC – High Pressure Size Exclusion Chromatography), marca SHIMADZU, equipado com detector de índice de refração diferencial, SHIMADZU modelo RID 10A. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação marca WATERS, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da, dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (0,1 M), contendo azida sódica (0,003 %) foi utilizada como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 1422 psi e temperatura de 37 °C. A aquisição de dados foi realizada pela utilização do programa LC Solution (SHIMADZU CORPORATION). Padrões de dextrana de MM entre 14×10^8 g/mol até $9,4 \times 10^3$ g/mol foram utilizados para construir a curva de calibração para determinação da MM dos polissacarídeos.

4.4.9 Análise da Solubilidade em Água

Para investigar a hidrossolubilidade da lasiodiplodana bruta e modificada foi empregado protocolo descrito por Wang et al. (2012) com adaptações. As amostras (100 mg) foram suspensas em água destilada (8 mL) e a suspensão foi agitada a 25°C por 24 horas. Após centrifugação a 3000 X g por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e nesta amostra quantificou-se o conteúdo de açúcares totais, sendo este, diretamente relacionado com a quantidade de amostra solúvel, considerando o grau de pureza do biopolímero (conteúdo de carboidrato). A solubilidade em água foi expressa em porcentagem de massa solúvel (porcentagem de EPS solúvel) e quantidade de massa solúvel (g) em 1 mL de água.

4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* SOBRE HEMÁCIAS

Foram coletados 5 mL de sangue de três indivíduos voluntários saudáveis, de forma aleatória quanto ao sexo masculino ou feminino, acima de 18 anos. A coleta foi por punção venosa tendo os devidos cuidados de assepsia, utilizando-se álcool 70% e não havendo qualquer risco ao paciente mediante o procedimento. O sangue coletado foi colocado em tubo de ensaio contendo 10 µL de heparina. O sangue foi centrifugado por 5 minutos a 4°C e 1200 x g e então foi retirado o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias foi lavada com solução gelada de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 por três vezes. Finalmente os eritrócitos foram suspensos para obtenção de um hematócrito com volume globular de 5 % através de determinação pelo método de microhematócrito.

A citotoxicidade sobre hemácias foi avaliada pela ação hemolítica das amostras de EPS e EPS-C. O potencial hemolítico foi avaliado em uma suspensão celular 3 % contendo solução tampão de sódio (10 mM), pH 7.4 (37 °C), NaCl (150 mM) e 5 µL das amostras (EPS 5000 µg/mL e EPS-C 15000 µg/mL). O efeito das glucanas sobre os eritrócitos foi observado após 24 horas de incubação e a hemólise foi avaliada por leitura do conteúdo de hemoglobina a 550 nm (VELLOSA et al. 2011).

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Atividade de Sequestro do Radical DPPH

A atividade antioxidante do EPS original e modificado foi avaliada pela capacidade sequestrante do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de acordo com metodologia descrita por Jing et al. (2014). A capacidade antioxidante total foi determinada em relação à porcentagem de remoção do radical DPPH.

Em tubo de ensaio foram misturados 1,90 mL de solução etanólica de DPPH 0,2 mM, 100 µL de solução de EPS (nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL,

250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 5000 µg/mL, 10000 µg/mL e 15000 µg/mL em água) e 3 mL de etanol absoluto. A absorvância foi mensurada a 517 nm após 30 minutos em espectrofotômetro UV/Visível U-2800 (Digilab). Vitamina C e Trolox foram empregados como controle positivo. A diminuição da absorvância da mistura reacional indica aumento na atividade antioxidante. A capacidade de remoção o radical DPPH foi calculada utilizando a equação a seguir:

$$\text{Remoção do radical DPPH (\%)} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] * 100$$

Sendo que:

A₀: absorvância do controle (mistura reacional sem amostra).

A₁: absorvância na presença da amostra.

4.6.2 Atividade de Sequestro do Radical Cátion ABTS

A capacidade de sequestro do radical ABTS (2,2'-Azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Cheng et al. (2013). O radical ABTS foi produzido por meio da reação da solução de ABTS (7 mM) com solução de persulfato de potássio (2,45 mM) mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 16 horas. Na sequencia 3 mL desta mistura foi diluída em etanol absoluto até a obtenção de uma absorvância de 0,700 ± 0,02 a 734 nm de comprimento de onda. Em tubos de ensaio foram misturados 30 µL de amostra (nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000, 5000 µg/mL, 10000 µg/mL e 15000 µg/mL em água) e 3,0 mL de solução ABTS. Após agitação em vórtex os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 6 minutos e a leitura foi realizada a 734 nm. O percentual de remoção do radical ABTS foi calculado pela equação:

$$\text{Remoção do radical ABTS (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100$$

Sendo que:

A_{amostra} : absorvância da amostra com radical.

A_{controle} : absorvância apenas do radical.

4.6.3 Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)

O poder redutor da amostra de EPS bruto e modificado foi avaliado pela capacidade de redução do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina férrico ($[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$), seguindo metodologia descrita por Wang et al. (2013). Este ensaio baseia-se na redução do complexo ($[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) para o complexo ferroso de cor azul intensa ($[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) em meio ácido, por ação de compostos antioxidantes. O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3M); 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). O reagente foi preparado e utilizado imediatamente. Para a análise, 90 μL da amostra (nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 2000 $\mu\text{g/mL}$, 5000 $\mu\text{g/mL}$, 10000 $\mu\text{g/mL}$ e 15000 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados em tubo de ensaio, juntamente com 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram agitados e incubados a 37°C por 30 minutos. As análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram realizadas a 595 nm, utilizando-se o reagente FRAP como branco. Como curva de calibração foi utilizado sulfato ferroso nas concentrações 100 μM , 500 μM , 1000 μM , 1500 μM e 2000 μM , e os resultados foram expressos em μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Os resultados obtidos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e os valores das médias comparados ao nível de 5% de significância através de Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM BIORREATOR DE MISTURA

As condições operacionais e nutricionais empregados no cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI contribuíram tanto para o crescimento celular como para a produção do exopolissacarídeo (lasiodiplodana). Como pode ser visto na Figura 11, houve bom crescimento micelial e o fungo desenvolveu-se na forma de “pellets” no caldo de cultivo, similares a pequenas esferas com diâmetro médio de 2 mm; e na forma de filamentos nas paredes do reator.



Figura 11 – Crescimento fúngico em biorreator de bancada ao final de 72 h de cultivo.

Ao longo do processo fermentativo houve grande crescimento micelial, especialmente após 24 horas (verificado visualmente) de cultivo. Em 48 horas de cultivo foi verificado grande acúmulo de biomassa celular aderida nas chicanas e paredes do biorreator. Ao final do cultivo (72 horas) foi verificado um acúmulo de biomassa de 3,87 g/L (massa seca) (Tabela 1).

Tabela 1 – Consumo de substrato, variação do pH do meio e produção de lasiodiplodana ao longo do cultivo em biorreator de bancada.

Tempo de Cultivo (horas)	Glicose (g/L)	pH	lasiodiplodana (g/L)	Biomassa (g/L)
T0	20,12 ±0,09 ^a	5,50	0	0,059
T24	7,22 ±0,22 ^b	5,23	3,48±0,11 ^e	Nd
T48	4,48 ±0,12 ^c	3,33	9,20±0,19 ^f	Nd
T72	3,73±0,03 ^d	5,59	9,53±0,17 ^f	3,87

nd: valores não determinados.

médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);

Embora tenha sido verificado bom crescimento celular do fungo nas condições de cultivo empregadas, maior acúmulo de biomassa foi descrito anteriormente por Cunha et al. (2012) (11,9 g/L) em cultivo com o fungo em biorreator de bancada. No entanto, os autores empregaram quantidades superiores (2 vezes) de substrato no meio de cultivo (40 g/L) e o tempo de cultivo descrito pelos autores também foi superior (120 horas). De fato, quantidades superiores de substrato (glicose) podem contribuir para maior crescimento de biomassa bem como maior produção de exopolissacarídeo. Por outro lado, maiores concentrações de substrato, associadas a maior tempo de cultivo, podem contribuir para possível estresse do microrganismo, o que leva ao escurecimento da biomassa celular bem como do próprio exopolissacarídeo, possivelmente por produção de pigmentos escuros como melanina (DONG e YAO, 2012).

Nesse sentido, no presente trabalho, optou-se por empregar menor concentração de substrato (20 g/L) no meio e menor tempo de cultivo, objetivando-se obter um biopolímero isento de pigmentação escura.

O pH original do meio de cultivo empregado no bioprocesso foi 5,5, considerado ideal para o cultivo do *L. thebromae* (CUNHA et al. 2012). Como pode ser verificado na Tabela 1 houve redução de pH após 48 horas de cultivo, onde foi verificado o menor valor (3,3). Já nas últimas 24 horas de cultivo foi verificado elevação nos valores de pH, sendo observado um pH de 5,59 (72 h), valor similar ao inicial do meio de cultivo (5,5). A redução do pH possivelmente está associada a produção de ácidos orgânicos oriundos da própria atividade microbiana, em especial da atividade respiratória, uma vez que nas primeiras 48 horas de cultivo foi

verificado maior acúmulo do polissacarídeo no meio e maior consumo do substrato. Embora não tenha sido quantificada biomassa celular em 48 horas, possivelmente, neste período, tenha sido produzida quantidade similar a quantificada no final do processo (72 h). De acordo com Cunha et al. (2012) aparentemente há uma correlação entre produção do exopolissacarídeo e crescimento celular. Cabe salientar que não foi quantificada biomassa em 24 horas e 48 horas de cultivo, pois como se trata de um cultivo com fungo filamentososo, em que há certo crescimento de biomassa nas chicanas e nas paredes do biorreator, próximo ao meio, a coleta de amostra em tais períodos de cultivo poderia subestimar o conteúdo real e total de biomassa celular.

O perfil de consumo de substrato e a produção de lasiodiplodana ao longo do cultivo está demonstrado no Gráfico 1.

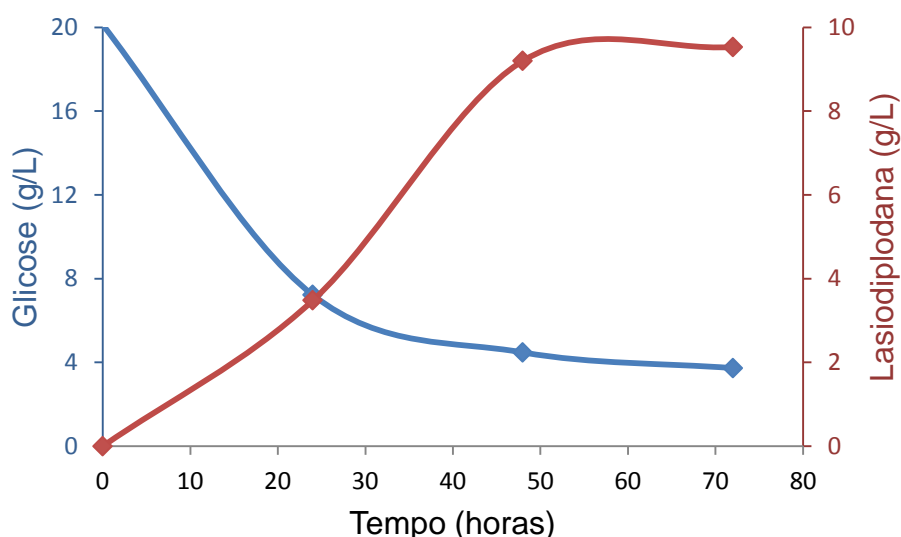


Gráfico 1 – Perfil do conteúdo de glicose e produção de lasiodiplodana ao longo do cultivo

De acordo com as curvas de ajuste de glicose residual e produção de lasiodiplodana demonstradas no Gráfico 1 e os dados da Tabela 1, verifica-se que houve consumo linear de glicose nas primeiras 24 horas de cultivo (64%) com uma taxa global de consumo do substrato de 0,54 g/L.h (Q_S). Já nas últimas 24 h de cultivo foi observada uma redução na taxa de consumo do substrato (Q_S 0,07 g/L.h, entre 24 horas e 72 horas).

Parece haver uma correlação entre o consumo da glicose e o acúmulo do exopolissacarídeo, visto que a partir de 48 horas de cultivo há redução da taxa de

assimilação da glicose e também as quantidades de exopolissacarídeo no meio permaneceram praticamente constantes entre 48 horas (9,20 g/L) e 72 horas (9,53 g/L). Cunha et al. (2012) em cultivo com *L. theobromae*, empregando condições de cultivo similares diferindo apenas na quantidade de glicose (40 g/L), descrevem que após 48 horas não foi verificado aumento na produção do exopolissacarídeo. Os autores atribuem tal característica a possível redução do conteúdo de oxigênio disponível para as células em função do grande aumento de viscosidade do meio devido ao acúmulo de exopolissacarídeo no meio. Tal condição também foi verificada neste trabalho, sendo visualmente constatado o aumento de viscosidade do caldo de cultivo ao longo do bioprocessamento.

5.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA

Os valores dos parâmetros cinéticos determinados e empregados para avaliar o perfil fermentativo de *L. theobromae* MMPI (rendimento de lasiodiplodana, produtividade volumétrica de lasiodiplodana, produtividade volumétrica de biomassa fúngica, taxa de consumo de substrato e rendimento específico) estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da produção da lasiodiplodana por *L. theobromae* MMPI cultivado em fermentação submersa após 72 horas.

Parâmetros Fermentativos	Valores
P_F (g/L)	9,53±0,17
P_X (g/L)	3,82
$Y_{(P/S)}$ (g/g)	0,58±0,01
$Y_{(X/S)}$ (g/g)	0,23±0,01
Y_e (g/g)	2,50±0,02
Y_c (%)	81,31±0,91
Q_P (g/ L'h)	0,132±0,002
Q_X (g/ L'h)	0,05
Q_S (g/ L'h)	0,226±0,001

P_F : produção de lasiodiplodana, P_X : produção de biomassa, $Y_{P/S}$: conversão de glicose em lasiodiplodana, $Y_{X/S}$: conversão de glicose em biomassa, Y_e : rendimento específico, Y_c percentual de consumo de substrato, Q_P : produtividade volumétrica em lasiodiplodana, Q_X : produtividade volumétrica em biomassa celular, Q_S : taxa global de glicose consumida.

Como pode ser verificado na tabela 2, o fungo foi hábil em consumir o substrato e produzir o exopolissacarídeo, sendo observado uma taxa global de consumo de substrato de 0,23 g/L.h, consumo de 81,4 % do conteúdo inicial de glicose e produção final de 9,53 g/L de EPS. O substrato não foi completamente esgotado do meio, restando em torno de 18,6 % do conteúdo inicial o que também foi observado por Cunha et al., (2012) (Y_c : 69,5 % após 120 h de cultivo). O consumo incompleto do substrato pode estar associado ao acúmulo de exopolissacarídeo no meio e conseqüente redução da disponibilidade de oxigênio para as células, o que pode ter dificultado a atividade metabólica do fungo.

Os valores de rendimento em EPS e biomassa celular observados foram 0,58g/g e 0,23 g/g, respectivamente. Valores interessantes quando comparados com os dados descritos por Cunha et al. (2012), os quais verificaram valores de 0,21 g/g de rendimento em EPS e 0,43 g/g de conversão em biomassa. Aparentemente, maiores concentrações iniciais de substrato no meio contribuem para maior conversão do substrato em biomassa, mas menor conversão em EPS. Possivelmente, em tais condições o fungo pode ter priorizado o crescimento celular

em contraste a polimerização da glicose como reserva energética, considerando que já havia grande quantidade de exopolissacarídeo no meio.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA MODIFICADA E NÃO MODIFICADA

5.3.1 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros FT-IR da lasiodiplodana original (EPS) e carboximetilada (EPS-C) estão demonstrados no Gráfico 2. Como pode ser verificado, os espectros FT-IR obtidos foram semelhantes, exibindo sinais típicos de polissacarídeos na região entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Duas novas bandas de absorção forte na região 1604 cm^{-1} (COO^-) e 1421 cm^{-1} (COO^-) resultante do estiramento das vibrações assimétricas e simétricas COO^- , respectivamente, foram observadas no espectro de EPS-C. Tais bandas indicam a carboximetilação do polímero. A banda de absorção forte entre 3311 cm^{-1} e 3424 cm^{-1} em ambos os espectros é atribuída a vibrações de alongamento de OH. O pico em 2923 cm^{-1} é atribuído ao estiramento CH dos grupos CH_2 . O pico em 1648 cm^{-1} verificado no espectro do EPS foi atribuído ao anel de glicose (XU et al. 2009). Na mesma região (1604 cm^{-1}) é verificado um maior pico na amostra de EPS-C que pode ser atribuído ao anel de glicose associado à banda de absorção correspondente a COO^- . As bandas observadas na amostra de EPS na região 1350 cm^{-1} - 1450 cm^{-1} corresponderam à deformação simétrica de grupos CH_2 e COH. Vibrações de alongamento simétricas C-O-C (grupo característico de açúcares) aparecem por volta de 1075 cm^{-1} e as vibrações de alongamento assimétricas em torno de 1269 cm^{-1} - 1247 cm^{-1} . A absorção na região 890 cm^{-1} caracteriza configuração do tipo β -, sendo enfraquecida no EPS-C (WANG e ZHANG 2009).

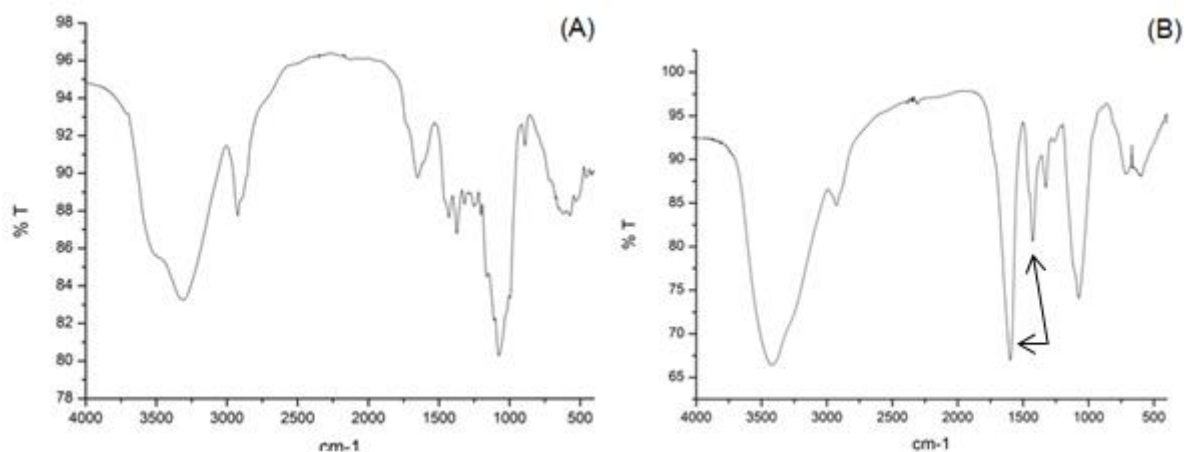


Gráfico 2 – Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana não modificada (A) e carboximetilada (B)

5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN ^{13}C da lasiodiplodana bruta e carboximetilada estão demonstrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Os sinais de tais espectros foram comparados e estão descritos na Tabela 3.

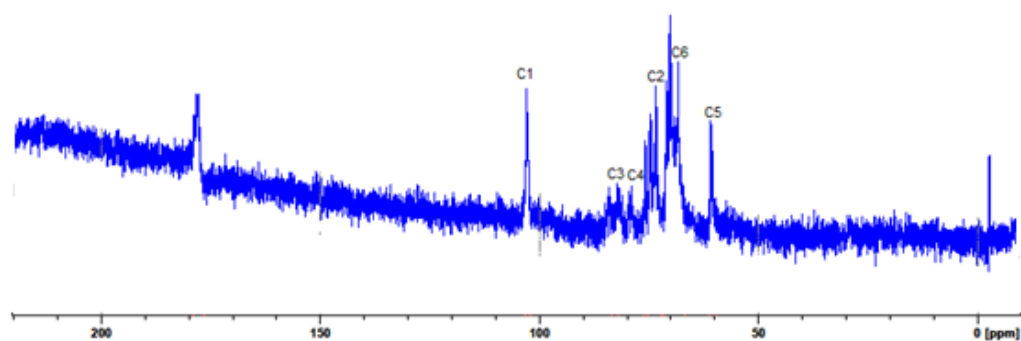


Figura 12 – Espectros de RMN ^{13}C do polímero carboximetilado (EPS-C)

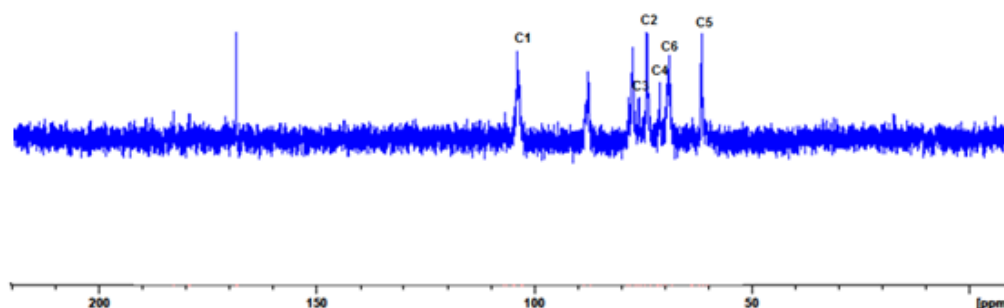


Figura 13 – Espectros de RMN ^{13}C do polímero não carboximetilado (EPS)

Tabela 3 – Deslocamentos químicos de ^{13}C obtidos da lasiodiplodana bruta (EPS) e modificada (EPS-C)

Átomo	^{13}C (ppm)	
	EPS	EPS-C
C1	104	103,2
C2	74,4	73,5
C3	76,1	82,4
C4	71,4	79,2
C5	61,9	60,8
C6	69,4	68,4

A análise de RMN ^{13}C demonstrou que a molécula modificada possui configuração β , o que é verificado através de sinal típico em torno de 103 ppm. Os sinais químicos demonstrados na amostra de EPS-C em 73,5 ppm; 68,4 ppm e 60,8 ppm foram atribuídos aos carbonos 2, 6 e 5, respectivamente. O sinal em 178,2 ppm foi atribuído ao grupo carbonila e o sinal em 70,3 ppm atribuído ao carbono metilênico do grupo carboximetila. Tais sinais (178,2 ppm e 70,3 ppm) evidenciam a carboximetilação, já indicada pela análise de FT-IR. Os deslocamentos dos sinais do C3 de 76,1 ppm para 82,4 ppm e do C4 de 71,4 ppm para 79,2 ppm sugerem que a carboximetilação ocorreu nos carbonos 3 e 4.

O sinal em 168 ppm observado na amostra de EPS bruto pode estar relacionado ao material proteico presente na molécula, visto que representa um sinal de padrão diferente dos demais. Tal sinal pode estar associado a ligação C=O do grupo carboxílico da proteína.

5.3.3 Determinação do Grau de Substituição da Glucana Carboximetilada (DS)

Após a reação química de carboximetilação, seguindo os parâmetros indicados no item 4.3, verificou-se que o grau de substituição das hidroxilas por grupos carboximetil foi de 1,27.

O grau de substituição total (DS) representa o número médio de grupos funcionais introduzidos em uma unidade de glicose, sendo importante sua avaliação para otimização das condições da reação de substituição, além de auxiliar na compreensão da nova estrutura (HEINZE, 2005; STOJANOVIC et al. 2005; LIU et al. 2014b).

Wang et al. (2012) verificou relação entre a remoção de radicais livres e o DS. Em seu estudo, o aumento do grau de substituição levou a um aumento na quelação de íon ferro, remoção de radicais hidroxilas e superóxido.

Jin et al. (2011) realizaram a sulfatação um exopolissacarídeo de *Enterobacter cloacae* e avaliaram a relação da atividade antioxidante com variação de DS (0,1 a 0,68). Todos os derivados mostraram atividade de remoção de radicais hidroxila e superóxido, porém, o polissacarídeo com DS de 0,60 apresentou o maior potencial de remoção.

Existem evidências de que elevados graus de substituição (DS) estão correlacionados com menores potenciais de remoção de radicais DPPH. Isto pode ser explicado pelo fato de que a eliminação de radicais DPPH está diretamente relacionada com a capacidade de doação de hidrogênios das hidroxilas. Assim, um alto grau de hidroxilas substituídas por grupos carboximetil resulta em menor número de hidroxilas livres para reagirem com o radical DPPH e, como consequência, em um menor percentual de remoção.

5.3.4 Conteúdo de Carboidrato e Proteína Total do Exopolissacarídeo Bruto

A determinação do conteúdo de carboidratos, através da quantificação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico, e proteínas, no EPS produzido após 72 horas de cultivo, indicou elevado grau de pureza da molécula bruta. Foi verificado conteúdo de carboidratos de 95% e 3% de proteínas. De fato, o conteúdo de proteínas ligadas ao EPS é bastante baixo. É relativamente comum haver proteínas ligadas à molécula do polissacarídeo excretada para o meio.

You et al. (2014) avaliaram quatro amostras de polissacarídeos de *Tricholoma mongolicum* Imai verificando que o conteúdo de carboidratos variou entre 73,92% e 88,13% e conteúdo proteico entre 0,11% e 1,75%.

Bai et al. (2014) avaliaram β -glucanas com conteúdo de 89,22% de carboidratos e 1,63% de proteínas.

Kozarski et al. (2012) avaliaram polissacarídeos de *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes* e *T. versicolor* verificando um conteúdo polissacarídico de 63,5%; 56,6%; 78,2%; 83,9%; e proteico 3,9%; 2,7%; 5,2%; 3,9%, respectivamente.

5.3.5 Difração de Raios-x

De forma geral, devido à estrutura polimérica, β -glucanas apresentam picos muito largos (VEVERKA et al. 2014). Conforme pode ser observado no Gráfico 3, o perfil dos difratogramas indica que ambas as amostras apresentam estrutura diferente de estruturas cristalinas convencionais. É verificada pequena diferença nos difratogramas, mais especificamente na região entre 3° (2θ) e 15° (2θ), havendo a presença de um pico mais pronunciado entre 5° (2θ) e 15° (2θ) na amostra de lasiodiplodana bruta comparada a amostra carboximetilada. Tal pico pode estar associado a uma estrutura pouco cristalina, indicada por um pico largo. O pico verificado na região entre 3° (2θ) e 15° (2θ) se perde após a carboximetilação possivelmente pela formação de novas ligações químicas (carboximetilação) nesse ponto da estrutura do polímero. Além disso, há um deslocamento do pico principal

após a carboximetilação, o que pode ser devido a possível estresse introduzido na rede estrutural em função de novas ligações químicas. Os difratogramas indicam que houve modificações pontuais na estrutura do biopolímero após carboximetilação, entretanto a estrutura principal permaneceu preservada.

Padrão semelhante de difratograma é descrito por Veverka et al. (2014) ao analisar uma β -glucana. Qian et al. (2009) também descreveram polissacarídeos fúngicos (*Agaricus blazei* Murill, *Ganoderma lucidum* e *Lentinus edodes*) com estrutura amorfas. Novak et al. (2012) prepararam filmes à partir de β -glucana que também não demonstraram cristalinidade.

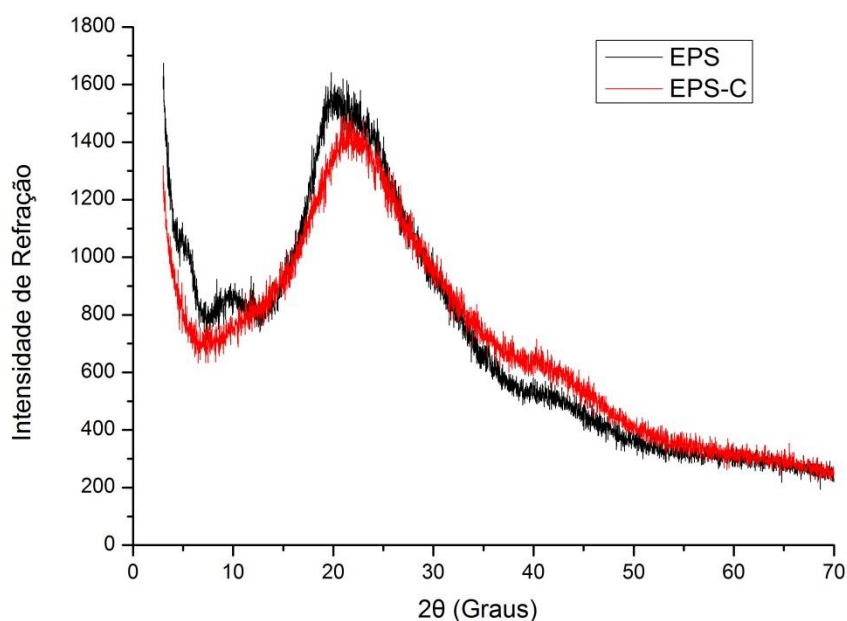


Gráfico 3 – Padrões de difração de raio-x (DRX) da amostra bruta (EPS) e carboximetilada (EPS-C)

5.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura a seguir (Figura 14) estão ilustradas as micrografias das amostras de lasiodiplodana bruta e carboximetilada obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

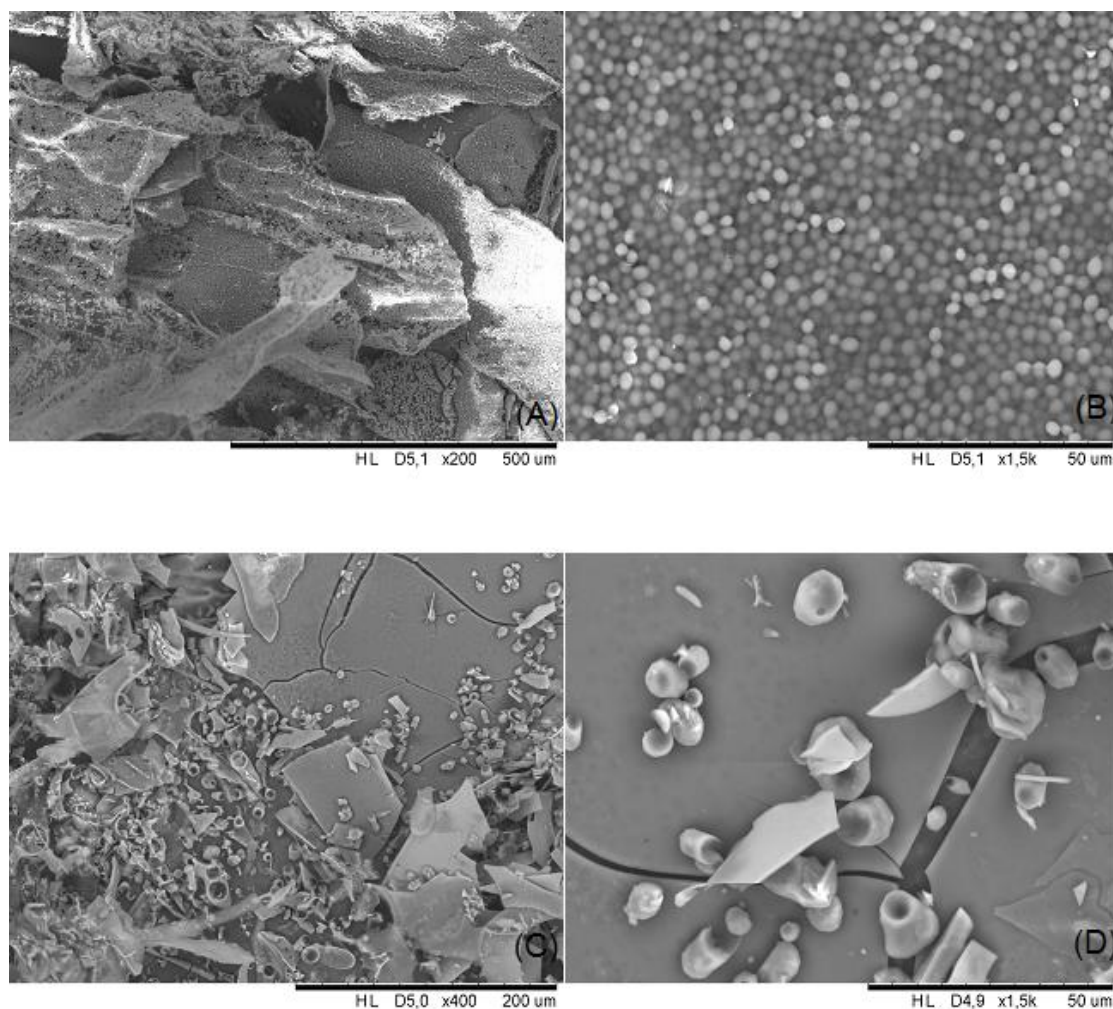


Figura 14 - Micrografia de lasiodiplodana bruta e carboximetilada obtida por microscopia eletrônica de varredura. (A) lasiodiplodana bruta em aumento de 200 X, (B) lasiodiplodana bruta em aumento de 1500 X, (C) lasiodiplodana carboximetilada em aumento de 400 X, (D) lasiodiplodana carboximetilada em aumento de 1500 X

Conforme pode ser verificado na Figura 14a e 14b amostra de lasiodiplodana não modificada apresenta estruturas esféricas (grânulos) com formato ovoide e diâmetro médio de $3,33 \mu\text{m}$ (diâmetro maior, Figura 15). Verifica-se uma distribuição homogênea dos grânulos ao longo de superfícies semelhantes a placas irregulares.

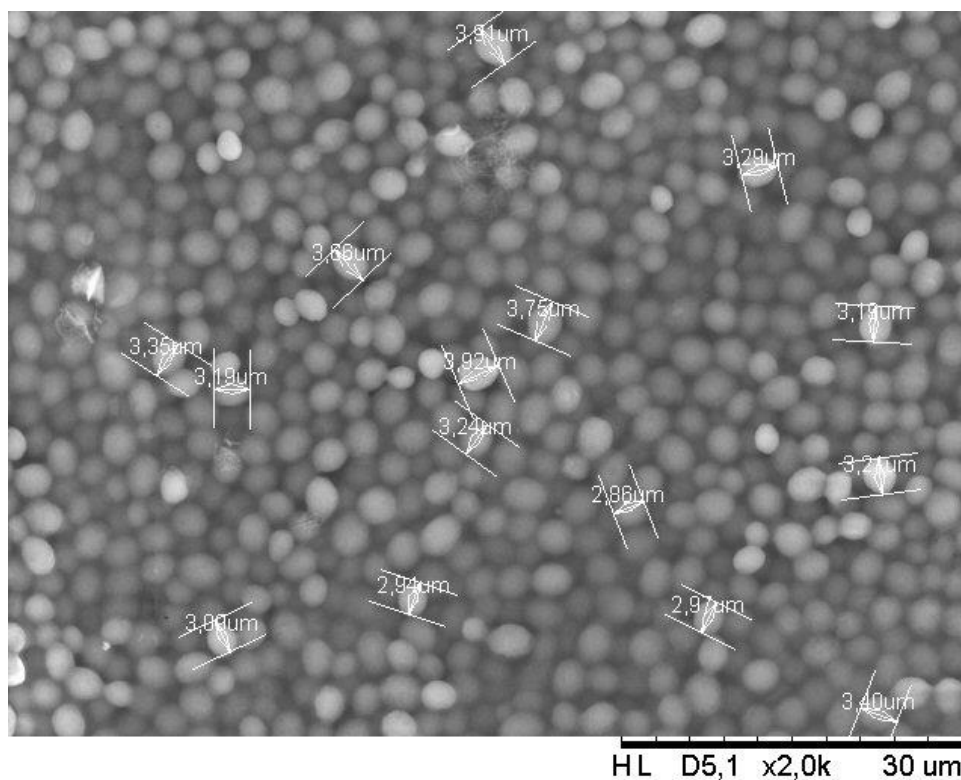


Figura 15 – Micrografia de lasiodiplodana bruta obtida por microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 2000 X, evidenciando os diâmetros granulares

Já na amostra de lasiodiplodana carboximetilada (Figura 14c e 14d) houve perda das estruturas granulares, sendo verificadas estruturas sem forma ou dimensões definidas. Similarmente ao observado com os grânulos de lasiodiplodana (Figuras 14a, 14b), as estruturas irregulares verificadas após carboximetilação também encontram-se dispostas sobre placas, no entanto, tais placas apresentam trincas ao longo da superfície.

De modo semelhante, Jing et al. (2014) verificaram por microscopia eletrônica de varredura que um polissacarídeo composto por glicose e ramnose apresentou uma estrutura composta por uma superfície na forma de “folhas” com aleatórias formas ovóides de cerca de 2 µm, distribuídas ao longo da área, morfologia atribuída à estrutura em rede do polissacarídeo.

Ma et al. (2012) avaliaram a morfologia de um polissacarídeos após carboximetilação, verificando que a amostra não modificada apresentava-se na forma de fragmentos não-uniformes, após carboximetilação apresentou morfologia semelhante a azulejos.

5.3.7 Caracterização Térmica

Nos Gráficos 4 e 5 estão descritas as curvas termogravimétrica (TG), termogravimétrica derivada (DTG) e termogravimétrica diferencial (DTA) das amostras de lasiodiplodana bruta e modificada.

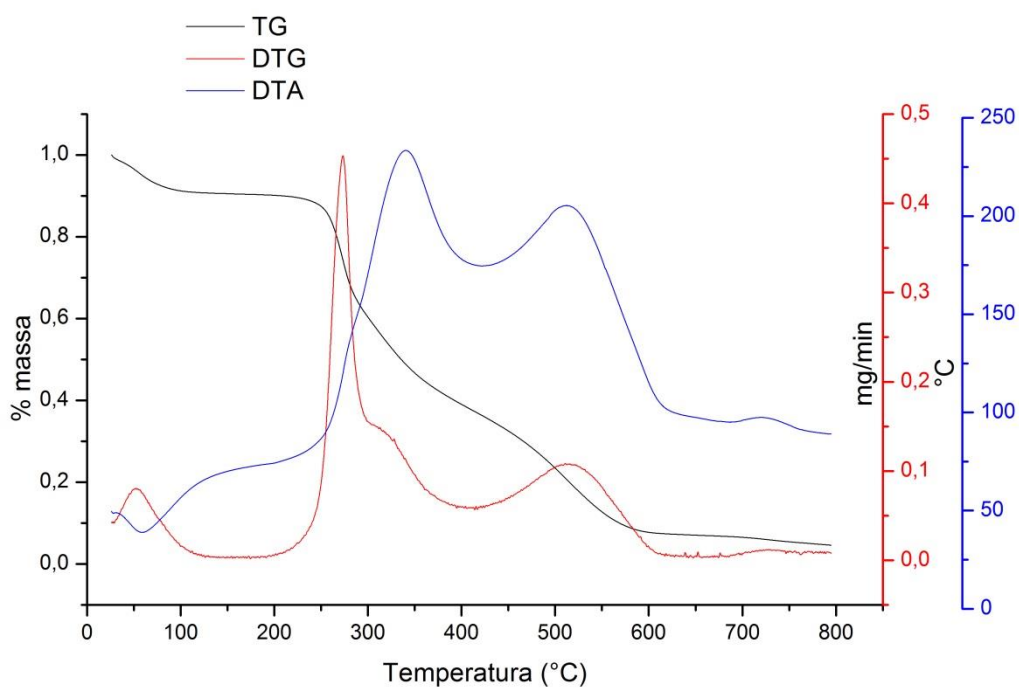


Gráfico 4 – Curvas TG, DTG e DTA da amostra de lasiodiplodana bruta

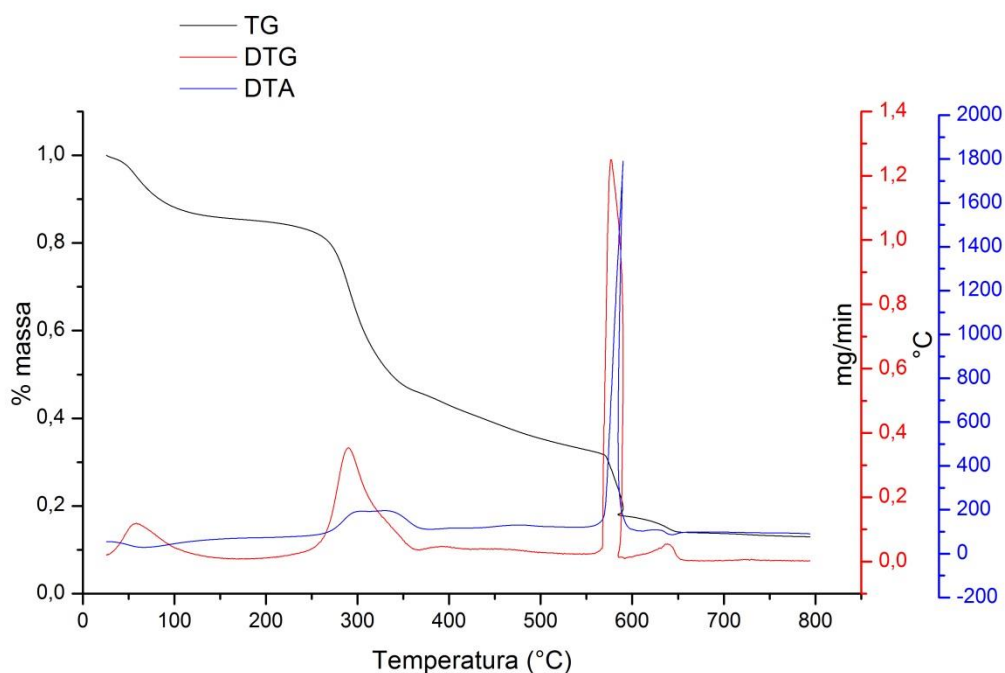


Gráfico 5 – Análise de TG, DTG e DTA do EPS-C

De acordo com os dados da análise térmica, verifica-se que ambas as amostras (lasiodiplodia bruta e modificada) apresentaram quatro estágios de perda de massa.

Na amostra de lasiodiplodana não modificada (EPS) o primeiro estágio de perda de massa ocorreu até 125 °C, sendo atribuída à eliminação de água da amostra. Tal perda de água é observada através de um pico endotérmico a 52°C pela curva termogravimétrica diferencial (DTA).

Houve dois eventos consecutivos com perda de massa entre 200°C e 400 °C correspondendo à degradação térmica da molécula, com um pico exotérmico verificado em 340 °C pela DTA. Um quarto estágio de perda de massa foi verificado entre 425°C e 620 °C correspondendo a decomposição final (carbonização) da amostra, com um pico exotérmico em 510 °C (Gráfico 4).

Em relação a amostra de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C) o primeiro estágio de perda de massa ocorreu até 140 °C, sendo atribuída à eliminação de água da molécula e indicada por um pico endotérmico a 65°C pela DTA. O segundo estágio de perda de massa ocorreu entre 200 °C e 370 °C, correspondendo a decomposição da molécula e indicado por um pico exotérmico em 320 °C (DTA). O

terceiro estágio de perda de massa foi atribuído à decomposição (oxidação) da molécula verificada em temperaturas entre 596 °C e 660 °C e indicada por um pico exotérmico em torno de 590 °C (DTA). Um quarto estágio foi identificado em temperaturas entre 595 °C e 660 °C, sendo atribuído a decomposição final da molécula e demonstrado por um pico endotérmico a 643 °C (DTA) (Gráfico 5).

Para um melhor entendimento quanto a estabilidade térmica das amostras, foram plotadas no Gráfico 6 as curvas de perda de massa (TG) das amostras de lasiodiplodana bruta e lasiodiplodana carboximetilada. Com o mesmo propósito também foram descritos na Tabela 4 o conteúdo de perda de massa (%) das amostras (EPS e EPS-C) e os respectivos intervalos de temperatura determinados.

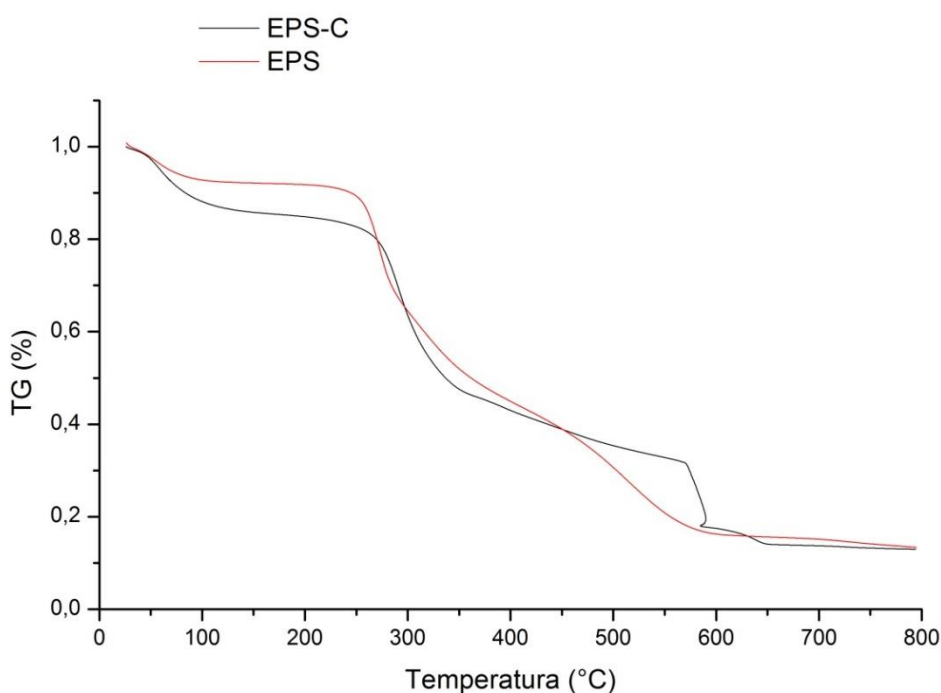


Gráfico 6– Comparação da análise TG entre EPS-C e EPS

Tabela 4 – Conteúdo de perda de massa das amostras de lasiodiplodana bruta e modificada em intervalos de temperatura determinados.

Intervalo de Temperatura (°C)	Perda de Massa (%) - (TG)	
	EPS	EPS-C
26-200	7,30	15,02
200-400	46,70	42,06
400-600	28,64	25,39
600-800	3,14	4,86
Total Perda de Massa (%)	85,78	87,33

Como pode ser observado na Tabela 4, no primeiro evento relacionado à perda de água, as amostras perderam 7,68% (EPS) e 14,17% (EPS-C) de massa. Até a temperatura de 200 °C as duas amostras permaneceram com massa estável (Gráfico 6), seguindo de um decaimento de massa até 620 °C (Gráfico 6). Foram verificados conteúdos de perda de massa (Tabela 4) de 85,78% na amostra de lasiodiplodana bruta e perda de 87,33% na amostra de lasiodiplodana modificada em 800 °C.

Através do Gráfico 6 e dos dados descritos na Tabela 4 verifica-se elevada estabilidade térmica das amostras considerando padrões industriais de produção e que ambas as amostras apresentaram comportamento térmico similar.

Kambourova et al. (2009) ao avaliaram a estabilidade térmica de uma glucana produzida por *Geobacillus tepidamans* V264, verificando que a perda de massa inicial ocorreu entre 50 °C e 60 °C devido à perda de água. Até a temperatura de 250 °C a amostra demonstrou-se estável, porém, começou a decompor-se em 280 °C.

De modo semelhante, Buriti et al. (2014) observaram três eventos de perda de massa para galactomanana *Caesalpinia pulcherrima*. O primeiro estágio, atribuído à evaporação da água, ocorreu em 58 °C. Os eventos seguintes foram relacionados com a decomposição térmica das amostras, ocorrendo após 260 °C. A máxima perda de massa (aproximadamente 80%) ocorreu entre 290 °C e 350 °C.

Cardozo et al. (2013) obtiveram termogramas de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação do fungo *Agaricus brasiliensis* com três etapas de decaimento.

Um evento inicial representou a perda de água, seguido de uma segunda etapa de decomposição em 266 °C (amostras não derivatizadas) ou 217 °C (amostras sulfatadas), sugerindo que a sulfatação contribuiu para certa redução da estabilidade térmica da biomolécula.

Mohite et al. (2014) estudaram a estabilidade térmica de celulose bacteriana, demonstrando que a molécula foi estável até a uma temperatura de 220 °C e a perda de massa referente a desidratação ocorreu até 120 °C e foi de 8%.

5.3.8 Teste de Homogeneidade por Cromatografia de Exclusão Molecular

Para a análise da massa molecular foi utilizada uma curva de calibração de dextranas, com massa molecular variando entre 9.4 kDa e 1400 kDa. A equação da curva padrão obtida foi $\log (MM) = -0,16373x+13,17564$, com coeficiente de correção de $R^2 = 0.98605$ (Figura 16).

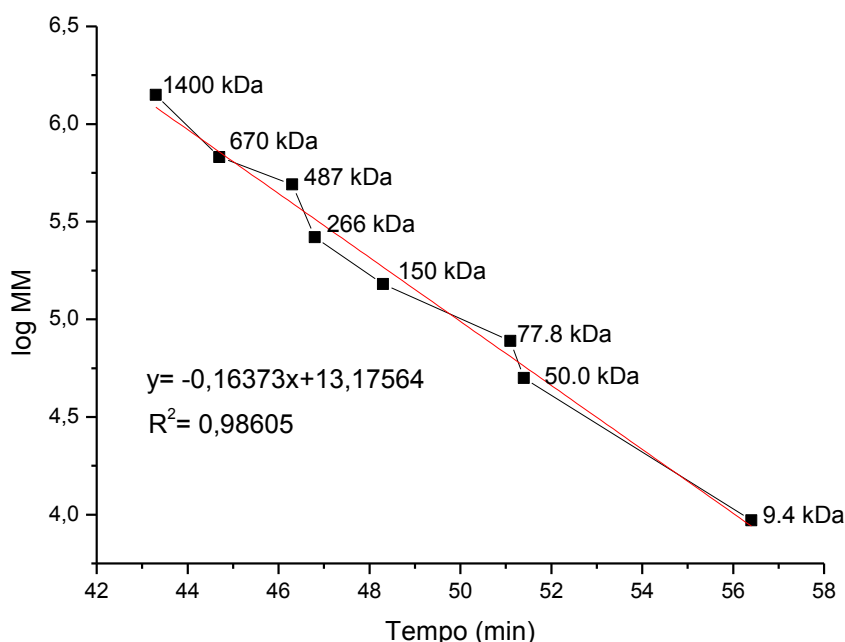


Figura 16– Curva padrão de GPC de dextrana

Os tempos de retenção das amostras lasiodiplodana bruta e lasiodiplodana carboximetilada estão demonstrados nas Figuras 17 e 18.

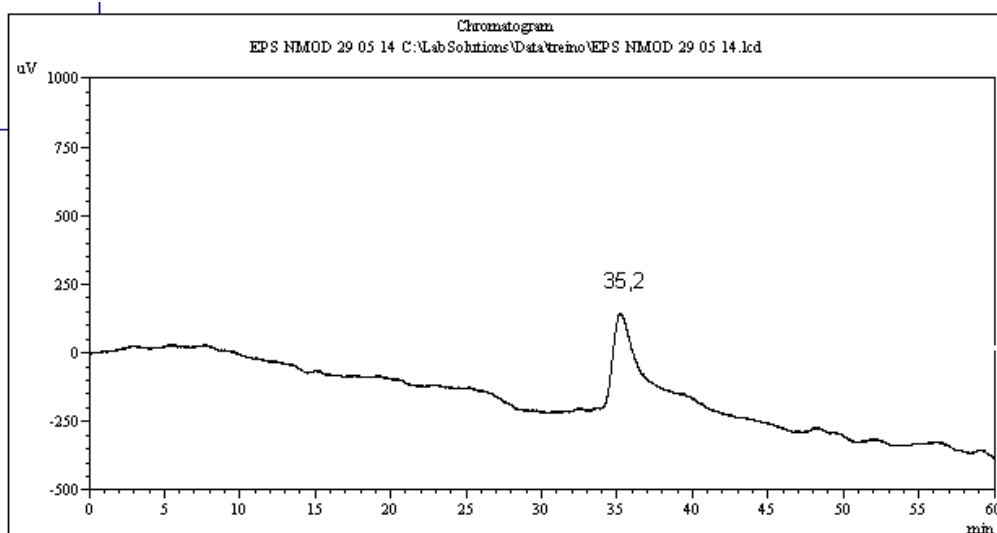


Figura 17– Perfil do cromatograma de permeação em gel (GPG) da amostra de lasiodiplodana bruta

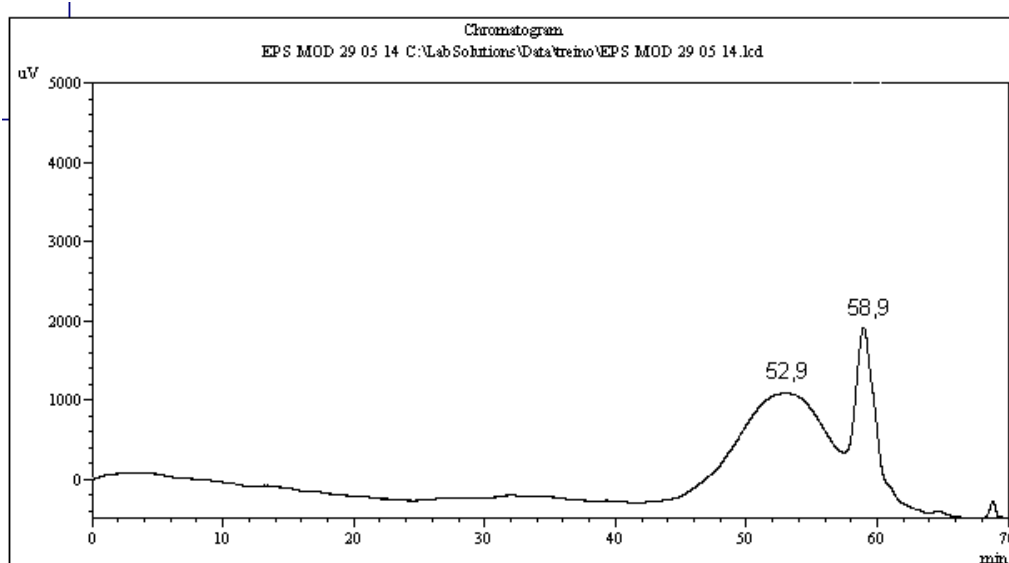


Figura 18 – Perfil do cromatograma de permeação em gel (GPG) da amostra lasiodiplodana carboximetilada

A partir dos cromatogramas descritos nas Figuras 17 e 18 e da curva padrão de dextrana (Figura 16) as massas moleculares médias das amostras de lasiodiplodana bruta e carboximetilada foram estimadas. Foi encontrado valor de massa molecular superior a $1,4 \times 10^6$ Da para a amostra de lasiodiplodana bruta e de $3,9 \times 10^4$ Da para a amostra de lasiodiplodana carboximetilada. Cabe salientar a dificuldade de estimar, com grande segurança, a massa molecular da lasiodiplodana não carboximetilada, uma vez que esta forma soluções bastante viscosas, o que pode influenciar no seu deslocamento ao longo da matriz de gel de permeação. O biopolímero possivelmente pode formar grandes agregados e, conseqüentemente, não sendo retido pelos poros do gel, levando a menor tempo de retenção e conseqüentemente sendo estimada maior massa molecular. Por outro lado, foi verificada menor massa molecular no biopolímero carboximetilado, o qual apresentou melhor solubilidade em água e permitiu uma análise com maior segurança.

A redução da massa molecular verificada na molécula carboximetilada possivelmente pode estar associada a provável hidrólise parcial ocorrida durante a reação de carboximetilação performada em meio ácido, com tempo reacional relativamente elevado (8 h).

Similarmente, Chen et al. (2014b) obtiveram moléculas polissacarídicas derivadas por carboximetilação, sulfatação e fosfatação com menor massa molecular que a molécula original (não derivatizada) e atribuíram tal característica a provável degradação (hidrólise) química durante a reação de derivatização.

Por outro lado, Wang et al. (2012), ao avaliarem a carboximetilação do polissacarídeo “pachyman” de *Poria cocos*, verificaram um aumento na massa molecular de 252,7 kDa para 360 kDa após a modificação química. Tais autores atribuíram o aumento da massa molecular da molécula derivada à inserção dos grupos carboximetil no polímero, levando a um aumento natural do peso molecular.

A massa molecular pode ter grande influência nas características físico-químicas e nas propriedades biológicas das biomoléculas. Nesse contexto, Zhang et al. (2013) destacam que polissacarídeos degradados, com baixo peso molecular, contém muitas hidroxilas livres o que resulta em melhor capacidade antioxidante, devido à maior solubilidade e maior área de contato, conferidas pela hidrólise da molécula.

5.3.9 Solubilidade em Água da Lasiodiplodana Bruta e Modificada

A modificação química de polissacarídeos é frequentemente relacionada com mudanças na solubilidade da molécula. A inserção de grupos químicos nas hidroxilas diminui as interações intramoleculares e intermoleculares, podendo tornar a molécula mais hidrofílica (WANG, YU e MAO, 2009; XU et al. 2009; YANG et al. 2011).

No presente estudo, a glucana não modificada apresentou apenas 3% (0,42 mg/ mL) de solubilidade em água a 25 °C de acordo com o ensaio realizado. Após a derivatização química por carboximetilação, a solubilidade em água passou para 63% (8,9 mg/mL). Na Figura 19 pode ser observado que, após a centrifugação, o tubo contendo EPS-C ainda continha material não solúvel, indicando uma hidrossolubilidade ainda parcial.

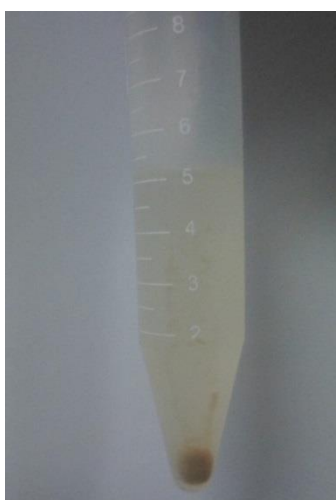


Figura 19 – Tubo após centrifugação do EPS-C em água

Bai et al. (2014) avaliaram a solubilidade de β -glucanas após carboximetilação e sulfoetilação, verificando que os derivatizados apresentaram maior solubilidade que a molécula original, além do derivado carboximetilado apresentar maior solubilidade (86,56%) que o derivado sulfoetilado (81,70%).

Wang et al. (2012) também demonstraram maior solubilidade em água do polissacarídeo “pachyman” após carboximetilação. A molécula original, que apresentava solubilidade 0 mg/mL, passou a 0,52 mg/mL após a modificação química.

5.4 CITOTOXICIDADE SOBRE HEMÁCIAS

A utilização de hemácias para a análise da citotoxicidade tem sido amplamente empregada devido à composição abundante em proteínas e lipídeos das membranas, fazendo dos eritrócitos um substrato modelo para avaliar a capacidade antioxidante (CAMARGO, 2011).

As maiores concentrações de exopolissacarídeos (EPS e EPS-C) utilizadas nos testes de atividade antioxidante foram avaliadas sobre a integridade celular de hemácias. Além disso, um branco (suspensão com 3% de hemácias e tampão) e um controle positivo (água) foram utilizados para comparação dos valores.

As amostras de lasiodiplodana carboximetilada na concentração de 15000 $\mu\text{g/mL}$ e lasiodiplodana não modificada na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$, não demonstraram citotoxicidade sobre hemácias nas condições avaliadas (Gráfico 7). Tal resultado é considerado de grande importância, visto que tais biomoléculas podem ter grande potencial em aplicação clínica, e, para tanto, não podem apresentar riscos à saúde. Sendo este teste um primeiro passo para comprovação da segurança clínica das biomoléculas.

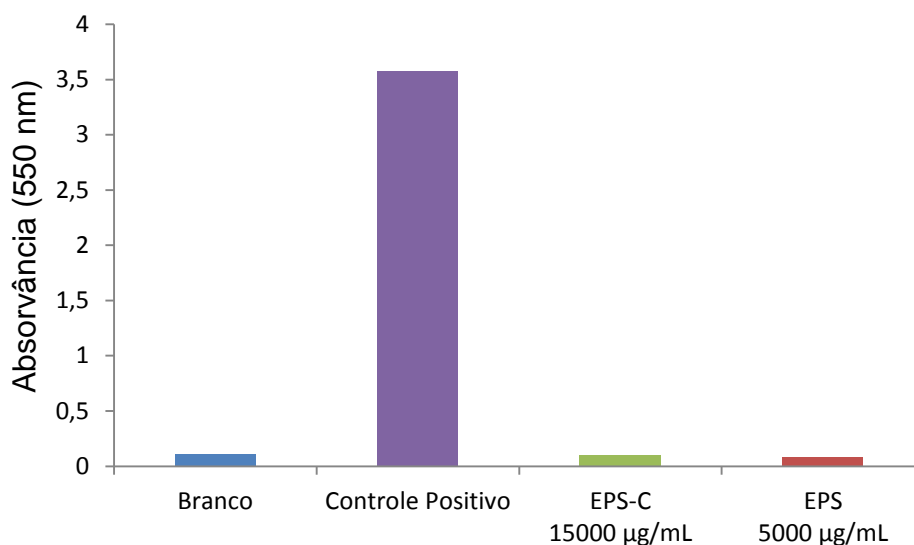


Gráfico 7– Avaliação do potencial hemolítico das amostras EPS-C e EPS

5.5 CARACTERÍSTICAS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA LASIODIPLODANA BRUTA E MODIFICADA

Segundo Kozarski et al. (2012) o potencial antioxidante de carboidratos é considerado fraco, quando comparado à moléculas padrões como Trolox (composto análogo a vitamina E). De acordo com os autores a pouca atividade existente deve-se, em grande parte, à presença de hidrogênios nos monossacarídeos constituintes. Quando os monossacarídeos estão na forma polimérica esta atividade aumenta, porém, ainda é relativamente baixa.

Além disso, como demonstrado por Ker et al. (2005), a atividade de remoção de radicais livres é dependente da solubilidade da molécula. Baixos valores de atividade antioxidante, encontrados em concentrações maiores de polissacarídeos, podem ser explicados pela baixa solubilidade, devido à agregação da molécula por ligações intermoleculares e intramoleculares das hidroxilas.

Uma alternativa à insolubilidade destas moléculas é a introdução de grupos carboximetila, que aumenta a nuvem eletrônica na molécula, tornando as hidroxilas mais “ativas”, ou seja, o potencial de doação de hidrogênios é aumentado (CHEN et al. 2013). Yang et al. (2011) demonstraram que a solubilidade em água do polissacarídeo (produzido por *Auricularia auricula*) aumentou significativamente após carboximetilação e, como consequência, a atividade antioxidante também. No entanto, o autor destaca que a atividade biológica de um polissacarídeo não está relacionada apenas com a solubilidade, mas também com o conteúdo monossacarídico e características estruturais.

A adição de grupos químicos na molécula é de extrema importância para aumentar a atividade biológica, porém, o grupo químico adicionado tem grande influência nestas atividades. Como descrito por Liu et al. (2012), que demonstraram que a introdução de grupos químicos, acetil, fosforil, e benzil, no polímero levava, resultaram em diferentes atividades antioxidantes, sendo o derivado fosforilado mais potente na remoção de radicais livres (hidroxil e superóxido). Ma et al. (2012) avaliaram o poder redutor de ferro de polissacarídeo nativo, sulfatado, acetilado e carboximetilado, sendo que o derivado acetilado demonstrou pronunciada vantagem comparada aos demais.

Chen et al. (2014) demonstraram um polissacarídeo nativo com elevado poder redutor, porém, com a introdução de grupos acetil e carboximetil houve diminuição das hidroxilas livres e mudança na conformação estérica do polissacarídeo, reduzindo a densidade eletrônica dos grupos hidroxila ativos e impedido alguns grupos carboximetil e acetil ativos de se ligarem ao íon metálico, resultando numa diminuição do poder redutor.

Outro fator importante em relação aos estudos de remoção de radicais livres é o método escolhido. A fim de determinar as propriedades antioxidantes das amostras é necessário aplicar métodos diferentes, baseados em diferentes mecanismos de reação, assim, será possível verificar qual o provável mecanismo de reação antioxidante de uma amostra (KOZARSKI et al. 2013). Tang et al. (2014) destacam que é de grande importância a avaliação do mecanismo de ação antioxidante do polímero em estudo, para que o método de avaliação ideal seja escolhido. Em seu estudo, houve melhor atividade antioxidante da molécula sobre remoção de radicais hidroxila, comparado à remoção de íons ferro ou ABTS.

Quando se tratam de amostras molecularmente similares, um fato importante na atividade antioxidante é o peso molecular. Zhang et al. (2013) demonstraram que produtos com baixo peso molecular contém muitos grupos hidroxila livres, conferindo um grande potencial antioxidante. Desta forma, amostras degradadas têm maiores chances de entrar em contato com radicais livres, já que possuem maior solubilidade e maior área de contato.

5.5.1 Sequestro do Radical Cátion ABTS

Os dados de remoção do radical ABTS verificados nos ensaios com as amostras de lasiodiplodana bruta, modificada e com o monômero glicose estão demonstrados no Gráfico 8.

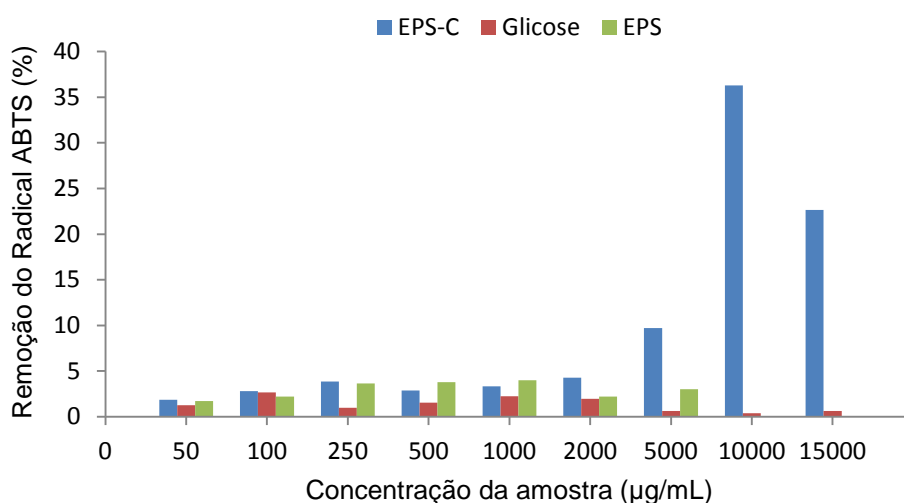


Gráfico 8– Porcentagem de remoção do radical ABTS nos ensaios com as amostras de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C), glicose e lasiodiplodana não carboximetilada (EPS)

A atividade antioxidante das amostras foram avaliadas até a concentração de 15000 µg/mL, exceto da amostra de lasiodiplodana não modificada que foi avaliada até a concentração de 5000 µg/mL. A capacidade antioxidante da amostra não carboximetilada não foi estudada nas concentrações de 10000 µg/mL e 15000 µg/mL devido a baixa solubilidade da amostra em tais concentrações.

As moléculas de lasiodiplodana bruta e modificada demonstraram capacidades similares quanto a remoção do radical ABTS nas concentrações entre 50 µg/mL e 1000 µg/mL. Por outro lado, em condições de maiores concentrações de biopolímero (2000 µg/mL e 5000 µg/mL) a lasiodiplodana carboximetilada demonstrou maior capacidade de remoção do radical ABTS comparada à biomolécula não carboximetilada. O maior percentual de remoção (36,28%) foi verificado na concentração de 10000 µg/mL.

Embora carboximetilação tenha melhorado a atividade antioxidante do biopolímero, a molécula derivatizada ainda apresenta um potencial relativamente baixo frente à captura de radicais ABTS. Esta característica possivelmente está associada à estrutura da molécula carboximetilada, especialmente em relação ao grau de carboximetilação, considerando que a molécula derivatizada apresentou elevado grau de substituição (1,27). Este fato é citado por Ker et al (2005), que relatam uma maior capacidade de remoção de radicais livres em moléculas com alta concentração de hidroxilas disponíveis. Desta forma, moléculas com elevado grau

de substituição podem ter sua capacidade antioxidante reduzida em função do menor número de grupos hidroxilas doadores de hidrogênio.

A glicose demonstrou atividade de remoção do cation ABTS inferior tanto em relação à molécula original como à molécula derivatizada, indicando que o tamanho da molécula tem grande influência quanto à atividade antioxidante. Giese et al. (2014) verificaram que monossacarídeos (glicose, frutose, arabinose, manose, xilose e galactose) na concentração de 1 g/L apresentaram menos de 13% de remoção de radicais ABTS.

De maneira geral, as três moléculas avaliadas demonstraram atividade antioxidante relativamente baixa em relação à capacidade de remoção do radical ABTS. Nas mesmas condições, os padrões Trolox e Vitamina C, na concentração de 5000 µg/mL, já haviam removido 100% dos radicais.

Yang et al. (2011) descrevem que a capacidade de eliminação do radical ABTS, por um polissacarídeo carboximetilado de *Auricularia auricula*, foi maior (60%) quando comparado à molécula não-modificada (40%). Wang et al. (2013) avaliaram o potencial de remoção do radical ABTS pelo polissacarídeo oriundo do fungo *Lactarius camphoratus*. A remoção foi dose-dependente e na concentração de 10 mg/mL a amostra já havia removido mais de 90% dos radicais. Liu et al. (2014) demonstraram que a atividade de remoção do radical ABTS por um polissacarídeo foi dose-dependente, atingindo 63,96% de remoção na concentração de 5 mg/mL.

Cabe salientar que em tais estudos foram avaliadas concentrações superiores do polissacarídeo e que os mesmos tratam-se de moléculas estruturalmente diferentes, o que interfere diretamente na atividade antioxidante.

5.5.2 Sequestro do Radical DPPH

Os dados de remoção do radical DPPH verificados nos ensaios com as amostras dos polissacarídeos (EPS e EPS-C) e de glicose estão demonstrados no Gráfico 9.

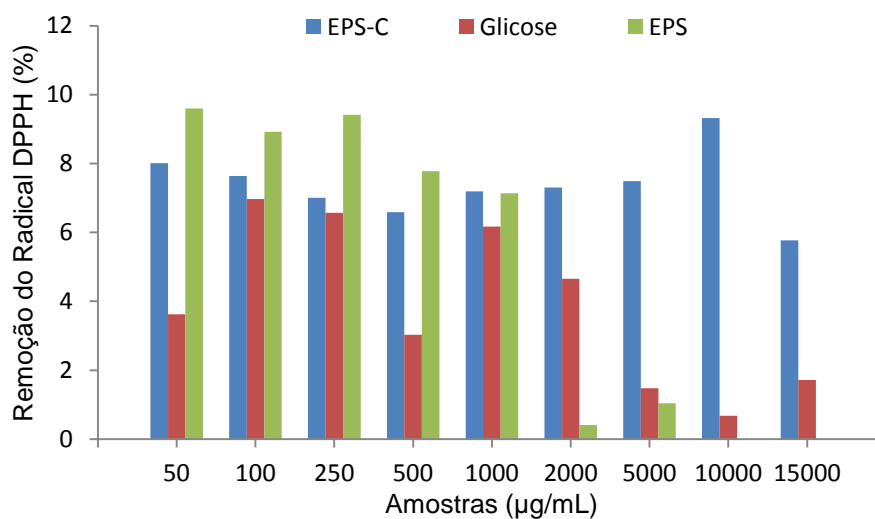


Gráfico 9 – Porcentagem de remoção do radical DPPH nos ensaios com as amostras de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C), glicose e lasiodiplodana não carboximetilada (EPS)

Da mesma forma como no ensaio com ABTS, não foi avaliada a capacidade de captura do radical DPPH da lasiodiplodana não modificada nas concentrações de 10000 µg/mL e 15000 µg/mL em função da insolubilidade da molécula em tais concentrações.

A remoção do radical DPPH pelas três moléculas ocorreu de maneira semelhante e constante, até a concentração de 1000 µg/mL, onde se observa uma queda na atividade da glicose e EPS. Já a molécula modificada (EPS-C) teve um decaimento em sua atividade apenas a partir da concentração 10000 µg/mL, acima desta a atividade foi prejudicada, provavelmente devido à diminuição na solubilidade.

As maiores remoções do radical DPPH ocorreram para EPS-C na concentração de 10000 µg/mL (9,32%) e para EPS na concentração de 50 µg/mL (9,60%). Este fato possivelmente pode ser explicado pela solubilidade das amostras. Ao passo que a amostra não modificada (EPS) é menos solúvel, houve uma tendência na diminuição de sua atividade de remoção com o aumento de suas concentrações. Já a amostra modificada, com maior solubilidade, teve uma remoção constante e com um sutil aumento na capacidade de remoção de radicais em concentrações até 10000 µg/mL, porém, em concentração maior, sua solubilidade foi prejudicada, refletindo em uma diminuição da atividade.

Comparado aos padrões Trolox e Vitamina C, a atividade foi considerada baixa. Nas mesmas condições, na concentração de 5000 µg/mL os padrões já haviam removido 100% dos radicais DPPH.

A capacidade de remoção do radical DPPH pela lasiodiplodana bruta foi similar nas concentrações 50 µg/mL, 100 µg/mL e 250 µg/mL. Houve redução na atividade de remoção do radical a partir da concentração de 500 µg/mL e acima desta concentração a atividade foi prejudicada, provavelmente devido à diminuição na solubilidade.

A molécula carboximetilada foi mais efetiva do que a molécula original e que a glicose quanto à remoção do radical, principalmente nas condições de maiores concentrações (5000 µg/mL, 10000 µg/mL e 15000 µg/mL). No entanto, a molécula não modificada apresentou maior capacidade de remoção do radical DPPH em menores concentrações (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL). O maior valor de remoção do radical DPPH (9,32%) observado no ensaio com a lasiodiplodana carboximetilada ocorreu na concentração de 10000 µg/mL e foi similar ao verificado com a molécula não modificada na concentração de 50 µg/mL (9,60%).

Este fato também pode ser explicado pela solubilidade das amostras. Ao passo que a lasiodiplodana bruta (EPS) é menos solúvel, houve uma tendência na diminuição de sua atividade de remoção com o aumento das concentrações. Já a amostra modificada, com maior solubilidade, teve uma remoção constante e com um sutil aumento na capacidade de remoção dos radicais em concentrações até 10000 µg/mL, porém, em concentração maior, sua solubilidade foi prejudicada, refletindo em uma diminuição da atividade.

Comparado os resultados obtidos com os padrões de referência Trolox e Vitamina C, a atividade foi considerada baixa. Nas mesmas condições de ensaio, na concentração de 5000 µg/mL os padrões já haviam removido 100% dos radicais DPPH.

Wiater et al. (2012) realizaram a carboximetilação de uma (1→3)-α-D-glucana, com DS de 1,04; verificando praticamente não haver atividade de remoção do radical DPPH, havendo uma ação de remoção em torno de 1% em comparação com o composto controle (Trolox).

Wang, Yu e Mao (2009) verificaram que polissacarídeos carboximetilados de *Poria cocos* demonstraram atividade de remoção do radical DPPH dose-

dependente, com remoção de mais de 50% dos radicais na concentração de 600 µg/mL, ao passo que o polissacarídeo não modificado não demonstrou atividade.

Yang et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante de polissacarídeos de *Auricularia auricula* após carboximetilação. O efeito de eliminação do radical DPPH aumentou com o aumento da concentração (0,1 mg/mL a 1,6 mg/mL), sendo obtido remoção do radical de 46,38% (polissacarídeo não-modificado) e 63,03% (carboximetilado).

Chen et al. (2014) carboximetilaram o polissacarídeo produzido por *Ganoderma atrum*, obtendo derivados com DS de 0,37 e 0,53. Tais autores descrevem maior capacidade de remoção do radical DPPH na molécula com DS de 0,53, com 20% de remoção, enquanto nos ensaios com a molécula com DS de 0,37 foi verificada capacidade de remoção do radical de 10%.

Machová et al. 2014 avaliaram a carboximetilação de uma glucana e o potencial antioxidante por diferentes métodos. A glucana com maior DS (0,56) apresentou uma remoção de radicais DPPH de 6,6% na concentração de 1 mg/mL.

Sun et al. (2008) avaliaram quitosanas carboximetiladas com diferentes DS (0,28; 0,41 e 0,54) e seu potencial antioxidante, sendo que pelo método DPPH foi verificada diminuição da atividade a medida que o grau de substituição da molécula aumentou.

5.5.3 Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)

No Gráfico 10 está demonstrada a curva de calibração de Sulfato Ferroso utilizada no ensaio pelo método FRAP. A equação, representada por uma reta ascendente apresentou coeficiente de correlação (R^2) de 0,9952, sendo o aumento da concentração de sulfato ferroso proporcional ao aumento da absorvância. Quanto maior atuação o antioxidante tem sobre a redução do Ferro (III) à Ferro (II), maior é a intensidade da cor roxa e maior a sua absorvância.

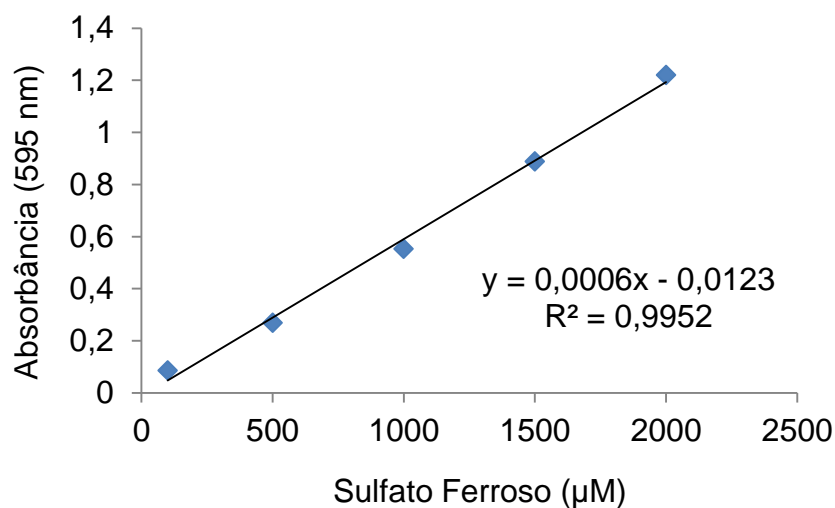


Gráfico 10 – Curva padrão de sulfato ferroso

Os dados de redução do Ferro (III) a Ferro (II) pelo método FRAP estão demonstrados no Gráfico 11.

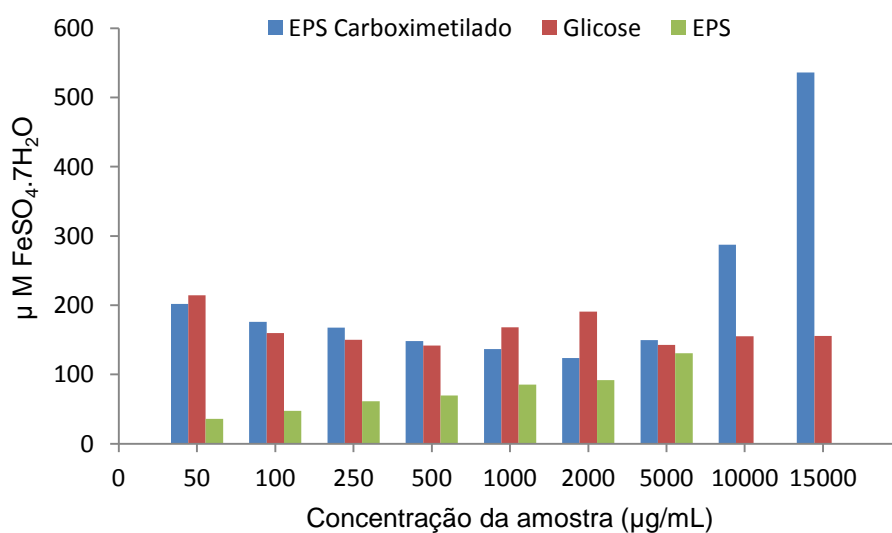


Gráfico 11 – Potencial de redução do ferro (III) verificados na amostra de lasiodiplodana carboximetilada (EPS-C), glicose e lasiodiplodana não carboximetilada (EPS)

Conforme pode ser constatado no Gráfico 11, as três moléculas demonstraram poder redutor sobre o íon férrico.

O poder redutor sobre o íon férrico da lasiodiplodana carboximetilada e a glicose foi relativamente similar entre as concentrações de 50 µg/mL e 5000 µg/mL e superiores ao verificado com a molécula não modificada.

Da mesma forma que observado nos métodos ABTS e DPPH, a concentração do polissacarídeo (modificado ou não) influenciou a atividade da molécula frente ao reagente testado. Maior poder redutor férrico foi verificado nos ensaios com a lasiodiplodana carboximetilada e nas maiores concentrações estudadas (10000 µg/mL: 287 µM FeSO₄.7H₂O equivalente e 15000 µg/mL: 536 µM FeSO₄.7H₂O equivalente).

Assim como verificado nos ensaios com DPPH e ABTS, comparado os resultados obtidos com os polissacarídeos com os verificados com os padrões Trolox e Vitamina C, a atividade pode ser considerada baixa. Visto que, nas mesmas condições, em concentrações de 20 µg/mL de Trolox ou Vitamina C foram verificadas atividades redutoras do íon férrico de 586 µM FeSO₄.7H₂O equivalente e 542 µM FeSO₄.7H₂O equivalente, respectivamente.

Du e Xu (2014) avaliaram o poder redutor de β-glucanas isoladas de diferentes fontes sobre o íon férrico. O maior valor encontrado foi de 110 µmol Fe²⁺ equivalente/100 g em uma amostra comercial de β-glucana carboximetilada. Enquanto que uma β-glucana comercial extraída de levedura apresentou um valor de 20 µmol Fe²⁺ equivalente/100 g.

Por outro lado, Chen et al. (2014) avaliaram o poder redutor de polissacarídeos acetilados e carboximetilados de *Ganoderma atrum*. O menor poder redutor foi o da amostra carboximetilada, com valores de aproximadamente 20 µmol Fe²⁺/g de amostra em amostra com DS de 0,37 e 40 µmol Fe²⁺/g em amostra com DS de 0,53.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo submerso do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em biorreator de bancada permitiu, de forma eficiente, a produção da molécula β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana (lasiodiplodana) nas condições estudadas. E, a partir da biomolécula produzida, foi possível a modificação de sua estrutura química, através da reação de carboximetilação.

A análise dos espectros de FT-IR e RMN ^{13}C confirmaram que houve a carboximetilação da lasiodiplodana e foi obtida uma molécula derivada com grau de substituição de 1,27 (DS).

A lasiodiplodana bruta e a modificada demonstraram estabilidade térmica até 200 °C e foram verificados quatro estágios de perda de massa e pico exotérmico em 510°C relacionada a decomposição final das moléculas.

A análise por difração de raios-x demonstraram que ambos biopolímeros apresentam estrutura típica de compostos não cristalinos.

A molécula bruta caracterizou-se por uma morfologia granular homogênea, ao passo que a modificação química levou ao rompimento da estrutura granular.

A reação de carboximetilação foi determinante para o parâmetro hidrossolubilidade. A molécula bruta possuía apenas 3% de solubilidade, e, após a derivatização química sua solubilidade em água passou a 63%. A inserção dos grupos químicos carboximetila diminuiu as interações intermoleculares e intramoleculares, tornando a molécula mais solúvel podendo desta forma potencializar sua aplicação em estudos clínicos.

Além disso, a modificação química da lasiodiplodana conferiu maior poder de remoção de radicais DPPH e ABTS, bem como aumento do poder redutor do íon férrico.

A lasiodiplodana bruta e carboximetilada não demonstraram atividade citotóxica em testes com hemácias humanas, fator importante, ao tratar-se de moléculas com potencial aplicação clínica e que, para tal, não devem apresentar riscos à saúde.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a carboximetilação da lasiodiplodana contribui para melhoria de suas propriedades podendo facilitar sua aplicação clínica. Além disso, não apresentam citotoxicidade em células vermelhas, sendo um primeiro passo para estudos clínicos. Cabe salientar, que a

lasiodiplodana, bem como seu derivado carboximetilado, ainda precisam ser amplamente estudados quanto a suas propriedades biológicas para futuro emprego farmacológico.

REFERÊNCIAS

AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 157-162, 2007.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

AMAZON. Disponível em: <<http://www.amazon.co.uk/Natures-Own-250mg-Glucan-Capsules/dp/B001CIV94U>> Acesso em: 04 dez. 2013.

ANGEL YEAST. Disponível em: <<http://en.angelyeast.com/contents/1190/17009.html>> Acesso em: 04 dez. 2013.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MACDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.

AUINGER, A.; RIEDE, L.; BOTHE, G. Yeast (1,3)-(1,6)-beta-glucan helps to maintain the body's defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects. **European Journal of Nutrition**, 2013. DOI: 10.1007/s00394-013-0492-z.

BADARINATH, A. V.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T. V. S.; GNANAPRAKASH, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, p. 1276-1285, 2010.

BAI, N.; GU, M.; ZHANG, W.; XU, W.; MAI, K. Effects of β -glucan derivatives on the immunity of White shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against White spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, v. 426, p. 66-73, 2014.

BARROS-FILHO, B. A.; NUNES, F. M.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOR, V. Bioreduction of prochiral ketones by growing cells of *Lasiodiplodia theobromae*: Discovery of a versatile biocatalyst for asymmetric synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 37-40, 2010.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Fungal B-1,3-Glucanases: production and biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, p. 75-86, 2010.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidante power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 14, p. 70-76, 1996.

BIOVEA-BRASIL. Disponível em: <http://biovea-brasil.com/product_detail.aspx?NAME=BETA-GLUCANO-100mg-60-C%C3%A1psulas&PID=2100&OS=204> Acesso em: 04 dez. 2013.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BO, S.; MUSCHIN, T.; KANAMOTO, T.; NAKASHIMA, H.; YOSHIDA, T. Sulfation and biological activities of konjac glucomanna. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 899-903, 2013.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-B-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymer**, v., 28, p. 3-14, 1995. DOI: 10.1016/0144-8617(95)00076-3.

BRADFORD, Marion. **Analytical Biochemistry.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BULOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia Básica**. Zaragoza: Acribia, p. 449-450. 1987.

BURITI, F. C. A.; SANTOS, K. M. O.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; TEIXEIRA-SÁ, D. M. A.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, G.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; EGITO, A. S. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521, 2014.

CAMARGO, Luciana E. A. **Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção.** 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2011.

CARDOZO, F. T. G. S.; CAMELINI, C. M.; CORDEIRO, M. N. S.; MASCARELLO, A.; MALAGOLI, B. G.; LARSEN, I. V.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BRAGA, F. C.; BRANDT, C. R.; SIMÕES, C. M. O. Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*. **International Journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 265-272, 2013.

CARVALHO, J. C. T.; PERAZZO, F. F.; MACHADO, L.; BEREAU, D. Biologic activity and biotechnological development of natural products. **BioMed Research International**, v. 2013, ID 971745, 4 páginas, 2013. doi:10.1155/2013/971745

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological Research**, v. 3, p. 635-652, 2007.

CHEN, X., XU, X., ZHANG, L., ZENG, F. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 581-587, 2009.

CHEN, L.; PAN, J.; LI, X.; ZHOU, Y.; MENG, Q.; WANG, Q. Endo-polysaccharide of *Phellinus igniarius* exhibited anti-tumor effect through enhancement of cell mediated immunity. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 255-259, 2011.

CHEN, X., ZHANG, L., CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 398-405, 2010.

CHEN, S., CHEN, H., TIAN, J., WANG, Y., XING, L., WANG, J. Chemical modification, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 428-437, 2013.

CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, v. 156, p. 279-288, 2014.

CHEN, C.; WU, W.; XU, X.; ZHANG, L.; LIU, Y.; WANG, K. Chain conformation and anti-tumor activity of derivatives of polysaccharide from *Rizhoma panacis japonica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 308-316, 2014b.

CHENG, H.; FENG, S.; JIA, X.; LI, Q.; ZHOU, Y.; DING, C. Structural characterization and antioxidante activities of polysaccharides extracted from *Epimedium acuminatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 63-68, 2013.

CHOA, E. J.; OHA, J. Y.; CHANGB, H. Y. E.; YUN, J. W. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 129–140, 2006.

CORRADI DA SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 793–798, 2008. DOI: 10.1016/J.CARRES.2007.12.021.

CUNHA, M. A. A.; TÚRMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, E. N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179-1188, 2012.

DENG, C.; HU, Z.; FU, H.; HU, M.; XU, X.; CHEN, J. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β-D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 70-75, 2012.

DODI, G.; HRITCU, D.; POPA, M. I. Carboxymethylation of guar gum: synthesis and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, p. 171-175, 2011.

DONG, J.; CAI, F.; SHEN,, R.; LIU, Y. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptoxotocin-induced diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1066-1071, 2011.

DONG, C.; YAO, Y. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 474-479, 2012.

DU, B.; XU, B. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidante power (FRAP) of β -glucans from diferente sources with various molecular weight. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v.3, p. 11-16, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FANG, J.; WANG, Y.; LV, X.; SHEN, X.; NI, X.; DING, K. Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- κ B signaling. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, p. 365-377, 2012.

FEITOSA, J. P. A.; CUNHA, P. L. R. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunitade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quimica Nova**, v. 32, p. 649-660, 2009.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R. E REIS, M. A. M. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859–865, 2009.

GRACHER, A. H. P.; CIPRIANI, T. R.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Antithrombin and heparina cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 180-187, 2010.

GRABAUM, J. H.; BUSCH, R.; STIER, H.; GRUENWALD, J. A double-blind, randomized, placebo-controlled nutritional study using na insoluble yeast beta-glucan. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 738-746, 2012.

HEINZE, T. Carboxymethyl ethers of cellulose and starch-A review. **Химия растительного сырья**, n.3, p. 13-29, 2005.

HUANG, D., OU, B.; PRIOR, R. L. The chemisty behind antioxidante capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ISHIBASHI, K. I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; TAMURA, S.; OHNO, N. The solubilization and biological activities of *Aspergillus* β -(1-3)-D-glucan. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, p. 155-166, 2004.

JABBER, A. J.; MAHDI, N. R.; YASEEN, N. Y. The effect of beta glucana extract of *Saccharomyces cerevisies* on câncer cell growth in vitro. **Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics**, v.4, p.53-58, 2011.

JIN, M.; LU, Z.; HUANG, MM.; WANG, Y.; WANG, Y. Sulfated modification and antioxidante activity of exopolysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 607-612, 2011.

JINDAL, M.; RANA, V.; KUMAR, V.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; TIWARY, A. K. Sulfation of *Aegle marmelos* gum: Synthesis, physic-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1660-1668, 2013.

JING, Y.; CUI, X.; CHEN, Z.; HUANG, L.; SONG, L.; LIU, T.; LV, W.; YU, R. Ellucidation and biological actibities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 288-296, 2014.

JUNG, H.; PARK, S.; PARK, B.; HONG, J. Physiological activities of a β -glucan produced by *Panebacillus polymyxa*. **Biotechnology Letters**, v. 30 p.1545-1551, 2008.

KAMBOUROVA, M.; MANDEVA, R.; DIMOVA, D.; POLI, A.; NICOLAUS, B.; ROMMONARO, G. Production and characterization of a microbial glucana, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from *Bulgarian* hot spring. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 338-343, 2009.

KEDARE, S. B e SINGH, R. P. Genesis and deveopment of DPPH method of antioxidante assay. **Journal of Food Science Technology**, v. 48, p. 412-422, 2011.

KER, Y., CHEN, K.; CHYAU, C.; CHEN, S.; GUO, J.; HASIEH, C.; WANG, H.; PENG, C.; CHANG, C.; PENG, R. Y. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7052-7058, 2005.

KIM, H. S.; HONG, J. T.; KIM, Y., HAN, S. Stimulatory effect of β -glucans on imune cells. **Immune Network**, v. 11, p. 191-195, 2011.

KOGAN, G., SANDULA, J., KOROLENKO, T. A., FALAMEEVA, O. V., POTERYAEVA, O. N., ZHANAEVA, S. Y., LEVINA, O. A., FILATOVA, T. G., KALEDIN, V. I. Increased efficiency of Lewis lung carcinoma chemotherapy with a

macrophage stimulator – yeast carboxymethyl glucana. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 775-781, 2002.

KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKSIC, M.; VRVIC, M. M.; TODOROVIC, N.; JAKOVLJEVIC, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from de widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. **Journal of food composition and analysis**, v. 26, p. 144-153, 2012.

KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKSIC, M. P. VAN-GRIENSVEN, L. J. L.D. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure, and antioxidative activity. **Hemijska industrija**, (2013). doi:10.2298/HEMIND121114056K

LAM, K. e CHEUNG, P. C. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, p. 45-64, 2013.

LAZARIDOU, A.; SERAFEIMIDOU, A.; BILIADERIS, C. G.; MOSCHAKIS, T.; TZANETAKIS, N. Structure development and acidification kinetics in fermented milk containing oat β -glucan, a yogurt culture and a probiotic strain. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p.204-214, 2014.

LEE, J. S.; HONG, E. K. Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from *Cordyceps militaris*. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1226-1233, 2011.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 70, p.317-343, 2006. DOI: 10.1128/MMBR.00038-05.

LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E., MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v.6, p. 10-16, 2012.

LIN, Y.; LIU, J.; HU, Y.; SONG, X.; ZHAO, Y. An antioxidant exopolysaccharide devoid of pro-oxidant activity produced by the soil bacterium *Bordetella* sp. B4. **Bioresource Technology**, v.124, p. 245-251, 2012.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidante and antitumor activities in vitro of diferente derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 767-772, 2012.

LIU, Y., DU, Y., WANG, J., ZHA, X., ZHANG, J. Structural analysis and antioxidante activities of polysaccharide isolated from *Jinqian* mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 63-68, 2014.

LIU, Y.; LIU, Y.; JIANG, H.; XU, L.; CHENG, Y.; WANG, P. G.; WANG, F. Preparation, antiangiogenic and antitumoral activities of the chemically sulfated glucana from *Phellinus ribis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 42-48, 2014b.

LU, R.; YOSHIDA, T.; NAKASHIMA, H.; PREMANATHAN, M.; ARAGAKI, R.; MIMURA, T.; KANEKO, Y.; YAMAMOTO, N.; MIYAKOSHI, T.; Uryu, T. Specific biological activities of Chinese lacquer polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 47–54, 2000.

LU, X.; MO, X.; GUO, H.; ZHANG, Y. Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from Persimmon (*Diospyros kaki L.*) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1189-1195, 2012.

MA, L.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; FU, L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 371-378, 2012.

MACHOVÁ, E.; CIZOVÁ, A.; BYSTRICKY, P. Effect of carboxymethylation on antioxidante properties and radical degradation of mannans and glucans. **Carbohydrate Polymers**, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.06.050

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1-16, 2013.

MENDES, S. F.; SANTOS J. R, O.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ARANHASELVERIO, G.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; PEREIRA, M. S.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 305-309, 2009.

MARXEN, K., VANSELOW, K. H., LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. Determination of DPPH Radical Oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. **Sensors**, v.7, p. 2080-2095, 2007.

MELO, F. R.; PEREIRA, Mariana S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. S. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides: Different mechanisms for heparina and sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 20824-20835, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MIRA, G. S.; GRAF, H.; CANDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 11-20, 2009.

MIRANDA, C. C. B. O.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.

MIRANDA-NANTES, C. C. B. O.; FONSECA, E. A. I.; ZAIA, C. T. B. V.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; CASTRO, I. A.; BARBOSA, A. M. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia conditions in rats. **Mycobiology**, v. 39, p. 187-193, 2011.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 132-141, 2014.

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

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211-219, 2004.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; COOKE, P., WOOD, D.; GUEDES, M. I. F. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. **Micron**, v. 42, p. 419-428, 2011.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1513-1519, 2003.

NGUYEN, T. L.; CHEN, J.; HU, Y.; WANG, D.; FAN, Y.; WANG, J., ABULA, S.; ZHANG, J.; QIN, T.; CHEN, X.; CHEN, X.; KHAKAME, S. K.; DANG, B. K. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1254-1258, 2012.

NOVAK, M; VETVICKA, V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory **Aspects and Mechanisms of Action**, v. 5, p. 47-57, 2008.

NOVAK, M; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets**, v. 9, p. 67-75, 2009.

NOVAK, M.; SYNITSYA, A., GEDEON, O.; SLEPICKA, P.; PROCHAZKA, V.; SYNITSYA, A.; BLAHOVEC, J.; HEJLOVA, A., COPIKOVA, J. Yeast $\beta(1,3),(1,6)$ -D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2496-2504, 2012.

ONBASLIA, D. E.; ASLIMB, B. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas spp.* Strains. **Journal of Hazardous Materials**, v. 30, n. 168, p. 64-67, 2009.

PEREIRA, A. V. S. **Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico ao mamão**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

PIKE J e CHANDRA, R. K. Effect of vitamin and trace element supplementation on immune indices in healthy elderly. International journal for vitamin and nutrition research. **Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 65, p.117-21, 1995.

PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; KHANDA, S. M. Pullulan: na exopolysaccharide and its various applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 540-549, 2013.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PIRES, N. R.; CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 92-99, 2013.

QIAN, J.; CHEN, W.; ZHANG, W.; ZHANG, H. Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 620-625, 2009.

RAVEENDRAN, S.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, S. D. Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. **Nanomedicine: NBM.**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.12.006>.

RAMÍREZ-MORENO, E.; CÓRDOBA-DÍAZ, D.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; GOÑI, I. Effect of boiling on nutritional, antioxidant and physicochemical characteristics in cladodes (*Opuntia ficus indica*). **Food Science and Technology**, v. 51, p. 296-302, 2013.

REGAND, A.; CHOWDHURY, Z.; TOSH, S. M.; WOLEVER, T. M. S.; WOOD, P. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glycemic response by modifying starch digestibility. **Food Chemistry**, v. 129, p. 297-304, 2011.

RIEDER, A.; KNUTSEN, S. H.; BALLANCE, S.; GRIMMER, S.; AIRADO-RODRÍGUEZ, D. Cereal β -glucan quantification with calcofluor-application to cell culture supernatants. **Carbohydrate Polymers**, n. 90, p. 1564-1572, 2012.

RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videria. 2003.** 53 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2003.

SAKALIDIS, M. L., HARDY, G. E. S.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the *Botryosphaeriaceae*. **Fungal Ecology**, v. 4, p. 1-14, 2011.

SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLIK, S. K. E MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1287-1297, 2006.

SHARAFBAFI, N.; TOSH, S. M.; ALEXANDER, M.; CORREDIG, M. Phase behaviour, rheological properties, and microstructure of oat β -glucan-milk mixtures. **Food Hydrocolloids**, v.41, p. 274-280, 2014.

SHI, M.; ZHANG, Z.; YANG, Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 200-206, 2013.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Coagulação: Visão Laboratorial da Hemostasia Primária e Secundária**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1. p. 85-92, 2006.

SIKORA, P.; TOSH, S. M.; BRUMMER, Y.; OLSSON, O. Identification of high β -glucan oat lines and localization and chemical characterization of their seed kernel β -glucans. **Food Chemistry**, v. 137, p. 83-91, 2013.

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z.; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; VAN GRIENSVEN, Leo J. L. D. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 \rightarrow 6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v.94, p. 91-99, 2013.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 2009. v.1.

SOLTANIAN, S; STUYVEN, E; COX, E; SORFELOOS, P; BOSSIER, P. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 109-138, 2009.

SOUZA, L. A. R.; DORE, C. M. P. G.; CASTRO, A. J. G.; AZEVEDO, T. C. G.; OLIVEIRA, M. T. B.; MOURA, M. F. V.; BENEVIDES, N. M.B.; LEITE, E. L. Galactans from the red seaweed *Amansia multifica* and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 154-162, 2012.

STELUTI R. M., GIESE E.C., PIGGATO M. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of basic Microbiology**, v.44, p. 480-486, 2004.

STOJANOVIC, Z.; JEREMIC, K.; JOVANOVIC, S.; LECHNER, M. D. A comparison of some methods for the determination of degree of substitution of carboxymethyl starch. **Starch**, v. 57, p.79-83, 2005.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Methods for measuring antioxidante activity of fruits. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde.**, v. 14, p. 263-269, 2012.

SUN, T.; YAO, Q.; ZHOU, D.; MAO, F. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5774-5776, 2008.

SUPER-SMART. Disponível em: <<http://www.super-smart.eu/article.pl?id=0508&lang=pt&fromid=GG132&gclid=CPHWpKXQlrsCFeHm7AodeQYAew>> Acesso em: 04 dez. 2013.

SUPPLEMENTSPOT. Disponível em: <<http://www.supplementspot.com/maximum-beta-glucan-60-capsules-400-mg.html?gclid=CKLgw9DPIrsCFWRk7Aodi28AHA>> Acesso em: 04 dez. 2013.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology, Limerick**, v. 16, p. 41-46, 1998.

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

TANG, J., NIE, J.; LI, D.; ZHU, W.; ZHANG, S.; MA, F.; SUN, Q.; SONG, J.; ZHENG, Y.; CHEN, P. Characterization and antioxidante activities of degraded polysaccharides from *Poria cocos sclerotium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 121-126, 2014.

TATONGJAI, J e LUMDUBWONG, N. Physicochemical properties and textile utilization of low and moderate substituted carboxymethyl rice starches with various amylose contents. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 377-384, 2010.

THETSIRIMUANG, C.; KHAMMUANG, S.; CHIABLAEM, K.; SRISOMSAP, C.; SARNTHIMA, R. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lév. **Food Chemistry**, v. 128, p. 634-639, 2011.

TIRZITIS, G e BARTOSZ, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, p. 139-142, 2010.

TRANQUILAN-ARANILLA, C.; NAGASAWA, N.; BAYQUEN, A.; ROSA, A. D. Synthesis and characterization of carboxymethyl derivatives of kappa-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1810-1816, 2012.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. **Free Radical Biology Medical**, v. 30, p. 393-402, 2001. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00485-8.

TSUKADA, K., TAKAHASHI, K., NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2019-2023, 2010.

TÚRMINA, J. A; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A, DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M., SANTO, F. S., SILVA, L. A. MALFATTI, C. R. M. Toxicological Assessment of β -(1 \rightarrow 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, p. 14298-14309, 2012.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; SILVA, M. L. C. Sulfonation and Anticoagulant Activity of Fungal Exocellular β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucan (Lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

VASCONCELOS A. F. D; MONTEIRO, N. K.; DEKKER R. F. H; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; SILVA, M. L. C. Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VELLOSA, J. C. R., REGASINI, L. O., KHALIL, N. M., BOLZANI, V. S., KHALIL, O. A. K., MANENTE, F. A., NETTO, H. P., OLIVEIRA, O. M. M. F. **Eclética Química**, v. 36, p. 7-20, 2011.

VEVERKA, M.; DUBAJ, T.; GALLOVIC, J.; JORÍK, V.; VEVERKOVÁ, E., MICUSIK, M., SIMON, P. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: synthesis, characterization, and stability. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 309-318, 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 276-284, 2008.

WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -Dglucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 105-112, 2009.

WANG, Y.; MO, Q.; LI, Z.; LAI, H.; LOU, J.; Liu, S.; MAO, J. Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1052-1056, 2012.

WANG, J.; WANG, Y.; LIU, X.; YUAN, Y.; YUE, T. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidium* polysaccharides derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 33-38, 2013.

WANG, Y., YU, Y., MAO, J. Carboxymethylated β -glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10913-10915, 2009.

WIATER, A., PADUCH, R., CHOMA, A., PLESZCZYNSKA, M.; SIWULSKI, M.; DOMINIK, J.; JANUSZ, G.; TOMCZYK, M. SZCZODRAK, J. Biological study on carboxymethylated (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1014-1023, 2012.

XIANG, Y.; XU, X.; LI, J. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1899-1905, 2012.

XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 227-234, 2009.

YANG, L.; ZHAO, T.; WEI, H.; ZHANG, M.; ZOU, Y.; MAO, G.; WU, X. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1124– 1130, 2011.

YE, L.; XU, L.; LI, J. Preparation and anticoagulant activity of a fucosylated polysaccharide sulfate from a sea cucumber *Acaudina molpadioidea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2052-2057, 2012.

YERMAK, I. M.; BARABANOVA, A. O.; AMININ, D. L.; DAVYDOVA, V. N.; SOKOLOVA, E. V.; SOLOV'eva, T. F.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Effects of structural peculiarities of carrageenan on their immunomodulatory and anticoagulant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 713-720, 2012.

YOU, Q., YIN, X., ZHANG, S., JIANG, Z. Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 1-10, 2014.

ZABULYTE, D., JONAUSKIENE, I., ULECKIENE, S., AKRAMIENE, D.; MATUSEVIVIVUS, P., DIDZIAPETRIENE, J. Experimental studies of possible modulative effect of β -glucan on mice lung carcinogenesis. **Veterinarija ir zootechnika**, v. 81, 2012.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; ZHANG, L.; CHIU, C.; OOI, V. E. C. Carboxymethylated β -glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 319-325, 2004.

ZHANG, Z.; WANG, X.; YU, S.; YIN, L.; ZHAO, M.; HAN, Z. Synthesized oversulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Enteromorpha linza* and their potential antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1012-1015, 2011.

ZHANG, Z.; WANG, X.; MO, X.; QI, H. Degradation and the antioxidant activity of polysaccharide from *Enteromorpha linza*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2084-2087, 2013.

ZHANG, X.; GENG, X.; JIANG, H.; LI, J.; HUANG, J. Synthesis and characteristics of chitin and chitosan with the (2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl functionality, and evaluation of their antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 486-491, 2012.

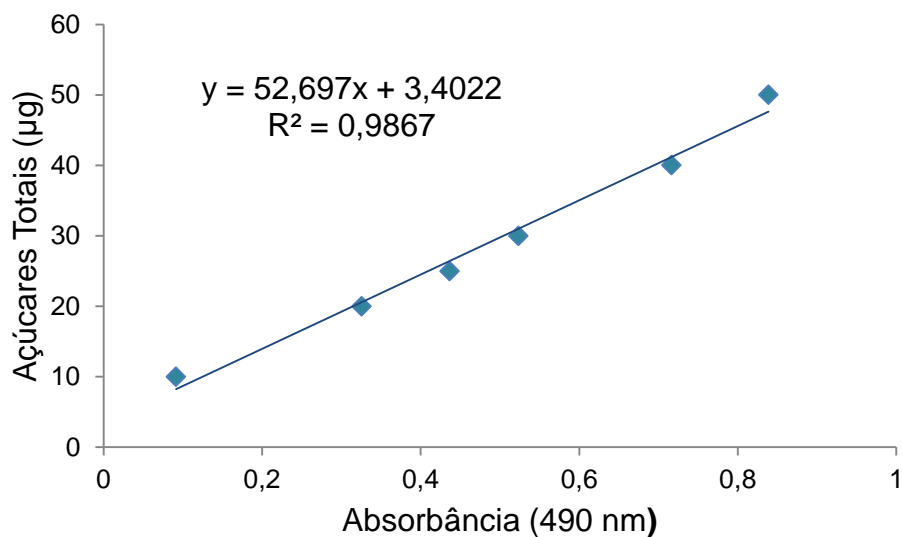
ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395-1410, 2012.

ZYKOVA, S. N.; BALANDINA, K. A.; VOROKHOBINA, N. V.; KUZNETSOVA A. V.; ENGSTAD, R.; ZYKOVA, T. A. Macrophage stimulating agente soluble yeast β -1,3/1,6-glucan as a topical treatment of diabetic foot and leg ulcers: a randomized, double blind, placebo-controlled phase II study. **Journal of Diabetes Investigation**, 2013. ISSN 2040-1116.s doi: 10.1111/jdi.12165, 2013.

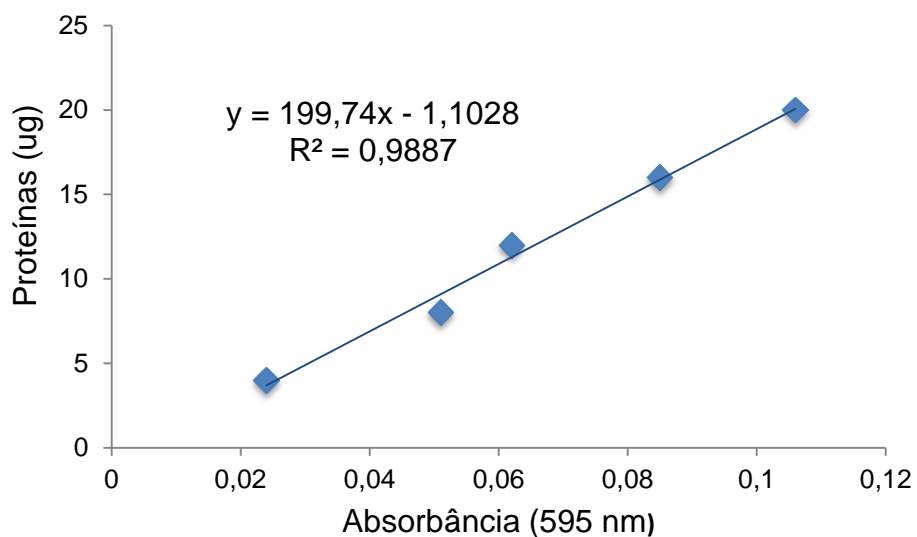
21FOOD. Disponível em: <[http://www.21food.com/products/carboxymethyl-yeast-beta-glucan\(cmg\)-c90-121967.html](http://www.21food.com/products/carboxymethyl-yeast-beta-glucan(cmg)-c90-121967.html)> Acesso em: 04 dez. 2013.

ANEXOS

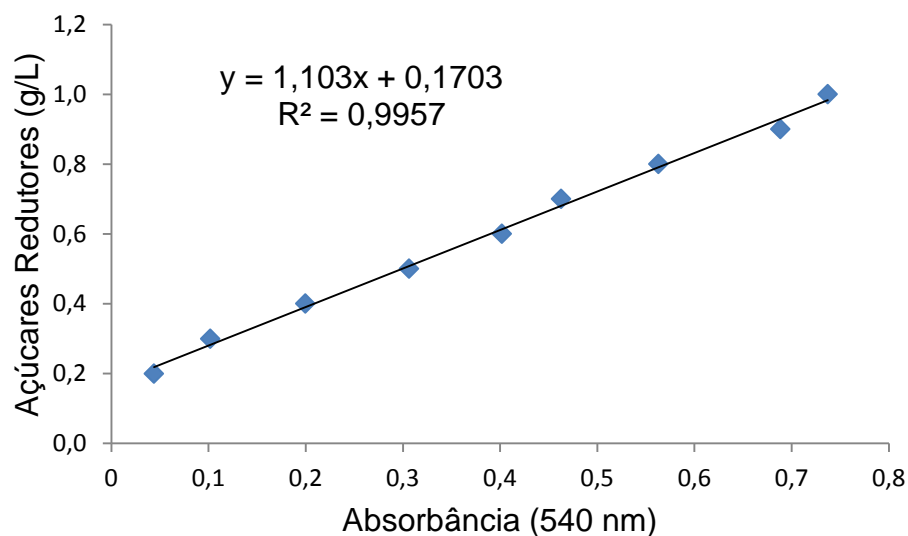
ANEXO A – Curva de Calibração de Açúcares Totais.



ANEXO B – Curva de Calibração de Proteínas.



ANEXO C – Curva de Calibração de Açúcares Redutores.



ANEXO D – Dados Curva Padrão de Dextranas para Massa Molecular.

M. M. (Da)	Log MM	R _T (min)
1.400.000	6,15	43,18
670.000	5,83	44,61
500.000	4,70	45,24
487.000	5,69	46,36
410.000	5,61	45,55
266.000	5,42	46,86
150.000	5,18	48,21
77.800	4,89	51,10
72.200	4,86	50,22
50.000	4,70	51,26
40.200	4,60	52,24
9.400	3,97	56,22