

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

THAIS VANESSA THEIS

**CARBOXIMETILAÇÃO DE (1→6)-β-D-GLUCANA: INFLUÊNCIA DA
CONCENTRAÇÃO DO AGENTE DERIVATIZANTE SOBRE O GRAU
DE SUBSTITUIÇÃO DA MOLÉCULA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2015**

THAÍS VANESSA THEIS

**Carboximetilação de (1→6)-β-D-glucana: influência da
concentração do agente derivatizante sobre o grau de substituição
da molécula**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

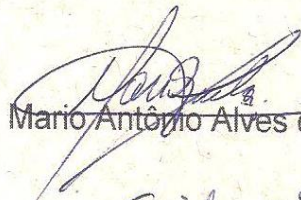
Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha.

Pato Branco, 2015

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Carboximetilação de (1→6)- β -D-glucana: Influência da concentração do agente derivatizante sobre o grau de substituição da molécula** foi considerado **APROVADO** de acordo com a ata da banca examinadora N° **6.1.2015-B** de 2015.

Fizeram parte da banca os professores.


Mario Antônio Alves da Cunha


Sirlei Dias Teixeira


Vidiany Aparecida Queiroz Santos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida.

Agradeço também a minha família, em especial a meu pai Paulo Fernando Theis, minha mãe Felícia Maieski Theis, e meus irmãos Mayco Aloisio Theis e Jean Theis, que me apoiaram e incentivaram desde o começo desta caminhada. Agradeço por apoiarem minhas decisões e acima de tudo estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, assim como os de alegrias.

Por todo amor, compreensão, companheirismo e, sobretudo incentivo, agradeço ao meu namorado Aglaer Girardi. Por estar sempre ao meu lado me apoiando e amenizando essa jornada, tornando-a mais leve.

A minha amiga Francini Yumi Kagimura, por todo aprendizado que me transmitiu, assim como ideias e sugestões, mas acima de tudo pela amizade.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, por tornarem o dia-a-dia mais alegre. E também a todos os amigos e colegas que ajudaram e participaram desta caminhada.

Agradeço ao meu orientador Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, pela orientação, apoio e tantos ensinamentos, contribuindo em muito para minha formação, meu sincero obrigado.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer
o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga,
mas onde estará o palácio
se não o fizerem ali?”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

THEIS, Thais Vanessa. Carboximetilação de (1→6)- β -D-glucana: influência da concentração do agente derivatizante sobre o grau de substituição da molécula. 2015. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

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. Entre os polissacarídeos com aplicações industriais destacam-se as β -glucanas, que são polissacarídeos que apresentam diversas propriedades biológicas, como atividade antitumoral, antioxidante, anticoagulante, antiviral e antitrombótica. A bioatividade dos polissacarídeos está relacionada com a massa molecular e com a estrutura química e conformacional da molécula. Alterações na estrutura da molécula, como a introdução de grupamentos químicos, podem afetar suas atividades biológicas e a intensidade com que se manifestam. Neste contexto, no presente trabalho foi produzido por fermentação submersa o biopolímero lasiodiplodana, uma (1→6)- β -D-glucana) e obtidos derivados carboximetilados. Foram obtidos três derivados carboximetilados através de reação controlada com três relações mássicas entre lasiodiplodana e ácido monocloroacético (1:5, 1:6,5 e 1:8). Análises por Infra-vermelho com transformada de Fourier indicaram sinais típicos de polissacarídeos na região entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . A ligação β -glicosídica foi confirmada por bandas fracas de absorção na região de 890 cm^{-1} . Bandas de absorção forte na região 1604 cm^{-1} (COO^-) e 1421 cm^{-1} (COO^-) resultante do estiramento das vibrações assimétricas e simétricas de COO^- , respectivamente, indicaram a carboximetilação do biopolímero. Os derivados obtidos apresentaram grau de substituição de 0,47, 0,51 e 0,58, respectivamente. A carboximetilação contribui para o aumento da solubilidade do biopolímero, sendo obtidos derivados com solubilidade entre 9 e 10 mg/mL.

Palavras-chave: Polissacarídeos Microbianos. Atividade Biológica. Exopolissacarídeos. Derivatização Química. Macromoléculas

ABSTRACTS

THEIS, Thais Vanessa. Carboxymethylation of (1→6) - β -D-glucan: influence of the concentration of derivatizing agent on the substitution degree of the molecule. 2015. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

The world market for polysaccharides has attracted large industrial companies interested in gaining new and profitable fields of activity. Polysaccharides with technological and biological properties can be obtained from plants, algae and microorganisms. Among the polysaccharides for industrial applications there are the β -glucans, which are polysaccharides that exhibit biological properties as antitumor, antioxidant, anticoagulant, antiviral and antithrombotic activities. The bioactivity of polysaccharides is related to the molecular weight and the chemical and conformational structure of the molecule. Changes in the molecule structure, such as the introduction of chemical groups, can affect the biological activity and their intensity. In this context, in the present work lasiodiplodan, a (1→6)- β -D-glucan, was produced by submerged fermentation and obtained carboxymethylated derivatives. Three carboxymethylated derivatives were obtained through controlled reaction using three massic relationship between lasiodiplodan and monochloroacetic acid (1: 5, 1: 6.5 and 1: 8). FTIR analysis showed typical signs of polysaccharides in the region between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} . The β -glycosidic linkage was confirmed by weak absorption bands in the region of 890 cm^{-1} . Strong absorption band in the region 1604 cm^{-1} (COO) and 1421 cm^{-1} (-COO-) resulting from the asymmetric and symmetric stretching vibrations of COO-, respectively, indicated carboxymethylation of the biopolymer. The obtained products showed substitution degree of 0.47, 0.51 and 0.58, respectively. The carboxymethylation contributes to the increased solubility of the biopolymer, being obtained derived with solubility between 9 to 10 mg / mL.

Keywords: Microbial Polysaccharides. Biological Activity. Exopolysaccharides. Chemical Derivatization. Macromolecules

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol	17
Figura 2. Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana.	18
Figura 3. Lasiodiplana bruta liofilizada.	18
Figura 4. Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana modificada através de carboximetilação.	20
Figura 5. Lasiodiplodana modificada por carboximetilação.	20
Figura 6. Fluxograma do processo de cultivo submerso do <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	22
Figura 7. Fluxograma do processo de recuperação e purificação da lasiodiplodana.	23
Figura 8. Fluxograma simplificado da obtenção dos derivados carboximetilados LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3 da lasiodiplodana.	24
Figura 9. Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana não modificada (a) e derivados carboximetilados LAS-C1 (b), LAS-C2 (c) e LAS-C3 (d).....	28
Figura 10. Tubos após centrifugação e descarte do sobrenadante da LAS-C1 (a), LAS-C2 (b) e LAS-C3 (c).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solubilidade da lasiodiplodana bruta e de seus derivados carboximetilados.	31
---	----

LISTA DE ACRÔNIMOS

BRM	Modificador da Resposta Biológica
DS	Grau de Substituição
EPS	Exopolissacarídeo
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
LAS	Lasiodiplodana
LAS-C	Lasiodiplodana Carboximetilada
LAS-C-H	Lasiodiplodana Carboximetilada em Forma Ácida
LAS-C-Na	Lasiodiplodana Carboximetilada em Forma de Sal
VMSM	Meio de Sais Minerais de Vogel

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1. POLISSACARÍDEOS	14
3.2. EXOPOLISSACARÍDEOS.....	14
3.2.1. β -glucanas.....	15
3.3. FUNGO <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	16
3.4. LASIODIPLODANA	17
3.5. MODIFICAÇÃO NA ESTRUTURA QUÍMICA DE GLUCANAS.....	19
3.6. CARBOXIMETILAÇÃO.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. PREPARO DO INÓCULO	21
4.2. PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO	21
4.3. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIOPOLÍMERO.....	22
4.4. DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA	23
4.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV-TF)	24
4.6. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)	25
4.7. ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA MODIFICADA E NÃO MODIFICADA.....	27
5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV-TF).....	27
5.1.2. Determinação do Grau de Substituição das Glucanas Carboximetiladas (DS)	
29	
5.1.3. Solubilidade em Água das Lasiodiplodanas Bruta e Modificadas	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

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

Dentre os polissacarídeos com função biológica, destacam-se as β -glucanas, as quais, em escala comercial, são extraídas da parede celular de cereais como aveia e cevada ou da parede celular de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*. Podem, também, ser obtidas a partir de micélio de alguns fungos e do corpo de frutificação de basideomicetos.

Alguns estudos recentes demonstram a produção extracelular de β -glucanas por fungos filamentosos em cultivos submersos. Açúcares simples como glicose ou sacarose podem ser empregados como substratos eficientes para a produção de glucanas por fermentação submersa.

Tais glucanas podem ser facilmente separadas do meio de cultivo por processos de centrifugação e serem recuperadas do caldo fermentado por processos simples de precipitação com etanol.

Modificações na estrutura química das glucanas por carboximetilação, acetilação, fosforilação e sulfonação podem contribuir para aumentar a solubilidade da molécula, bem como potencializar algumas propriedades biológicas, especialmente associadas a mecanismos de ação antioxidante e anticoagulante.

Nesse contexto, é proposto no presente trabalho a obtenção de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana (lasiodiplodana) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em cultivos submersos e estudo da carboximetilação do biopolímero avaliando diferentes concentrações do agente derivatizante sobre a solubilidade e grau de substituição da macromolécula.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produção de (1→6)- β -D-glucana (lasiodiplodana) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI e modificação da estrutura química da molécula por carboximetilação, visando a obtenção de derivados com diferentes graus de substituição.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lasiodiplodana em cultivo submerso com *L. theobromae* MMPI.
- Recuperar, purificar e liofilizar o biopolímero.
- Carboximetilar a lasiodiplodana usando diferentes concentrações de ácido monocloroacético como agente derivatizante.
- Determinar o grau de substituição dos derivados obtidos
- Avaliar a solubilidade em água dos derivados obtidos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. POLISSACARÍDEOS

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza está na forma de polissacarídeos, com massa molecular variando de média a alta. Estes polímeros são formados a partir da condensação de mais de dez unidades monossacarídicas, através de ligações covalentes chamadas ligações glicosídicas (VOET et al. 2000). O que difere uns dos outros é a natureza das unidades monossacarídicas (constituídos de um único ou de diversos tipos de unidades monoméricas); o comprimento das cadeias, o tipo de ligação entre os monossacarídeos e o grau de ramificação (NELSON et al. 2011).

Estas macromoléculas possuem diversas funções fisiológicas em plantas ou microrganismos, seja como forma de armazenamento de energia em plantas (amido), como agente estruturante da parede celular e da matriz extracelular (celulose, quitina e peptidoglicanos) (NELSON et al. 2011).

Um grande número de polissacarídeos tem sido estudado por apresentarem diversas atividades biológicas, sendo muitos considerados modificadores da resposta biológica. A ação biológica provocada pelo polissacarídeo está diretamente relacionada com sua estrutura molecular, incluindo a composição monomérica, a ligação glicosídica da cadeia principal e os monossacarídeos que o compõe, o grau de ramificação, o grau de substituição e a conformação das principais cadeias. Por isso, a modificação química de polissacarídeos com a finalidade de sintetizar derivados com atributos funcionais desejáveis tem atraído cada vez mais atenção (MA et al. 2012; TAO, ZHANG, & ZHANG, 2009; WANG et al. 2010).

3.2. EXOPOLISSACARÍDEOS

Produzidos por fungos e bactérias, os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares. Podendo ser produzidos e permanecerem

aderidos à superfície celular formando cápsulas e tornando-se parte da parede celular, ou ser secretados para o meio, isso tudo dependendo do sistema microbiano. Quando secretados, os polissacarídeos formam limos sendo difundidos na fase líquida provocando mudanças no meio de cultivo, alterando a viscosidade e a reologia. Microrganismos capazes de gerar meios de cultivo com elevada viscosidade possuem maior potencial de produção tornando-os propícios a comercialização considerando que a recuperação do exopolissacarídeo (EPS) do meio de cultivo é um processo relativamente simples (SILVA et al. 2006).

Microrganismos diferentes produzem exopolissacarídeos distintos. E também, é possível produzir polissacarídeos com propriedades físico-químicas diferentes a partir de uma mesma cepa microbiana, para tal, a composição do EPS pode ser manipulada modificando o meio de cultivo de forma que as propriedades do biopolímero possam ser alteradas. Os poucos relatos encontrados nesse contexto, indicam ser possível modificar o grau de substituição da unidade repetitiva por vários grupos, bem como o grau de polimerização; porém não é possível alterar a estrutura ou a composição da unidade básica repetitiva do polissacarídeo (SILVA et al. 2006).

Estudos *in vitro* sugerem que a atividade biológica está ligada ao peso molecular do biopolímero, sendo que β -glucanas de baixo peso molecular de cadeia muito curta são geralmente consideradas biologicamente inativas (AKRAMIENÉ et al. 2007).

3.2.1. β -glucanas

β -glucanas são polímeros de glicose produzidos por algumas plantas como aveia e cevada, além de outros organismos como algas, bactérias e fungos filamentosos. São constituintes da parede celular de certas bactérias patogênicas, como *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, e também de fungos unicelulares como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (AKRAMIENÉ et al. 2007).

As β -glucanas pertencem a um grupo heterogêneo de polímeros de glicose e apresentam algumas variações na sua estrutura em função da origem. Todas são formadas por uma cadeia linear composta de unidades D-glucose unidas entre si

através de ligações beta glicosídicas, contendo ou não ramificações. Comumente, as ligações glicosídicas são do tipo (1→3), mas também podem ser do tipo (1→3;1→6), (1→6) e (1→3;1→4). Tais diferenças estruturais podem ter grandes implicações na bioatividade de β-glucanas, principalmente com relação ao peso molecular, pois β-glucanas de cadeia muito curta são consideradas inativas (AKRAMIENĖ et al. 2007).

β-glucanas são conhecidas por sua capacidade imunomoduladora (ZHOU et al. 2013). Tais polissacarídeos são considerados modificadores da resposta biológica, pois são inofensivos ao organismo, mas o auxiliam na adaptação ao ambiente frente aos estresses biológicos (CHEN et al. 2009). A literatura demonstra que as respostas imunológicas específicas e não específicas de mamíferos são estimuladas pelas β-glucanas através de mecanismos de ação que incluem a ativação de macrófagos, neutrófilos e aumento da fagocitose (ZHOU et al. 2013).

A atividade biológica do grupo das biomoléculas β-glucanas é influenciada por diferentes parâmetros físico-químicos, tais como solubilidade, massa molecular, estrutura molecular e ramificações. Esta diversidade resulta em inúmeras propriedades, possibilitando uma ampla gama de aplicações para estas biomoléculas em alimentos, nos setores comerciais biomédicos, farmacêuticos e cosméticos (KAGIMURA et al. 2015a).

3.3. FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 1) pertence à família *Botryosphaeriaceae*, gênero *Lasiodiplodia* sp, anteriormente designado como *Botryodiplodia theobromae* (MUNIZ et al. 2011). Representa o estado assexuado do *Botryosphaeria rhodina*, sendo que, isolados diferentes, podem apresentar características variáveis em coloração e velocidade de crescimento quando em meio de cultura. 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). A coloração das colônias de *L. theobromae* variam de acinzentada a negras, dependendo do substrato, e sempre com abundante micélio aéreo (RODRIGUES, 2003).

Espécies da família *Botryosphaeriaceae* geralmente são isolados de plantas aparentemente saudáveis, porém são frequentemente descritas como patógenos oportunistas quando em situações de estresse da planta hospedeira (SAKALIDIS et al. 2011).

Lasiodiplodia theobromae é conhecido por sua variedade em compostos bioativos, porém é um fungo patogênico a plantas de regiões tropicais e subtropicais, (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).



Figura 1. Fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol

3.4. LASIODIPLODANA

Descrita recentemente na literatura, a lasiodiplodana é uma (1→6)- β -D-glucana (Figura 2 e 3) produzida extracelularmente pelo fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (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.

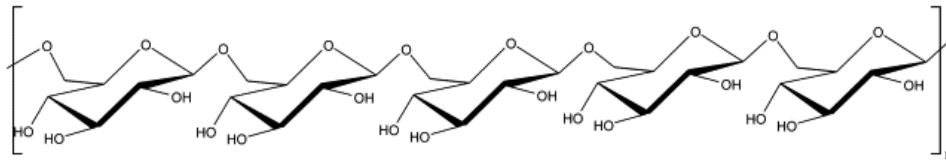


Figura 2. Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana.
Fonte: Vasconcelos et al. 2008.



Figura 3. Lasiodiplana bruta liofilizada.

Túrmina et al. (2012) avaliaram os efeitos da Lasiodiplodana 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. Kagimura et al.

(2015b) verificaram aumento na solubilidade e atividade antioxidante de derivados de lasiodiplodana carboximetilada.

3.5. MODIFICAÇÃO NA ESTRUTURA QUÍMICA DE GLUCANAS

Diversos relatos publicados nos últimos anos têm demonstrado que as atividades biológicas têm sido relativamente melhoradas com a modificação da estrutura química de polissacarídeos (MA et al. 2012). Derivados solúveis em água preparados a partir de sulfatação e carboximetilação de polissacarídeos insolúveis tem apresentado ação antiviral e antitumoral relativamente mais elevada (WANG et al. 2009).

A introdução de grupos químicos com apropriados graus de substituição pode influenciar a bioatividade das glucanas, para tal, comumente são preparados derivados por sulfatação, carboximetilação, acetilação e fosforilação (KAGIMURA et al. 2015a). Modificações na estrutura química de polissacarídeos insolúveis em água podem melhorar a sua solubilidade (CHEN et al. 2009), atributo interessante para a lasiodiplodana considerando sua baixa solubilidade em água.

3.6. CARBOXIMETILAÇÃO

É recente o interesse químico de modificação da estrutura dos polissacarídeos, uma vez que intensifica a bioatividade e/ou cria novas propriedades funcionais. Derivatização por carboximetilação tem sido frequentemente empregada, uma vez que favorece diversas funções biológicas, tais como atividade antitumoral, anticoagulante e antioxidante (WANG et al. 2012). Tal modificação química consiste em uma reação de esterificação que objetiva a substituição das hidroxilas presentes nas unidades monoméricas de glicose por grupos carboximetilo (CH_2COO^-). Na Figura 4 está descrita a representação estrutural de (1→6)- β -D-glucana modificada por carboximetilação e na Figura 5 é apresentado a Lasiodiplodana carboximetilada. Reações de substituição resultam em uma melhoria significativa nas propriedades

funcionais do derivado carboximetilado. (TATONGJAI; LUMDUBWONG, 2010). Estudos têm demonstrado que as propriedades funcionais de polissacarídeos modificados são influenciadas significativamente pelo grau de substituição (DS) resultante da reação. O DS consiste no número médio de grupos carboximetilo ligados por unidade de glucose (LIU et al. 2012).

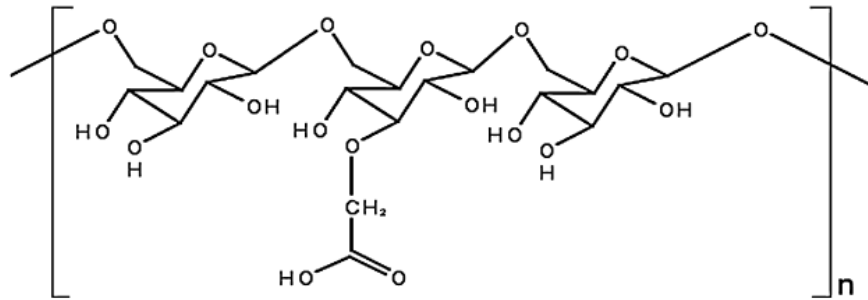


Figura 4. Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana modificada através de carboximetilação.
Fonte: Kagimura et al. 2015b.



Figura 5. Lasiodiplodana modificada por carboximetilação.

Polissacarídeos derivatizados por carboximetilação têm demonstrado propriedades antioxidantes, atividade de inibição de peroxidação lipídica e capacidade de ligação de ácido biliar de maneira dose-dependente (KAGIMURA et al. 2015a). Inclusive, polissacarídeos derivados tem demonstrado atividade anti-tumor mais intensa comparado aos polissacarídeos não modificados (CHEN et al. 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

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 sob refrigeração a 4°C, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos de ensaio contendo meio ágar Sabouraud com cloranfenicol.

4.1. PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, o micélio fúngico foi transferido para placas de Petri contendo meio ágar sabouraud com cloranfenicol. As placas com o micélio inoculado foram incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica a 28 °C. Após o crescimento do micélio, o conteúdo micelial da placa foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de Meio de Sais Minerais de Vogel - VMSM (VOGEL, 1956) e glicose (5 g/L) e então cultivados a 28 °C sob agitação (150 rpm) por 48 horas. Esta pré-cultura foi centrifugada de modo a recuperar o micélio, o qual foi misturado com solução fisiológica esterilizada e triturado em mixer para obtenção de uma suspensão celular com absorvância entre 0,4 e 0,5 em 400 nm.

4.2. PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO

A produção de lasiodiplodana (LAS) foi realizada através de cultivo submerso em shaker de piso (Marq Labor), utilizando frascos de Erlenmeyer de 500 mL e volume de trabalho de 200 mL, 28 °C, velocidade de agitação de 150 rpm, por 72 horas. O pH inicial do meio fermentativo foi ajustado para 5,5 através de adição de soluções de ácido clorídrico 1 mol/L. O meio de cultivo foi constituído por meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956) e glicose (20g/L) e foi empregado volume de inóculo de 20 mL (Figura 6).

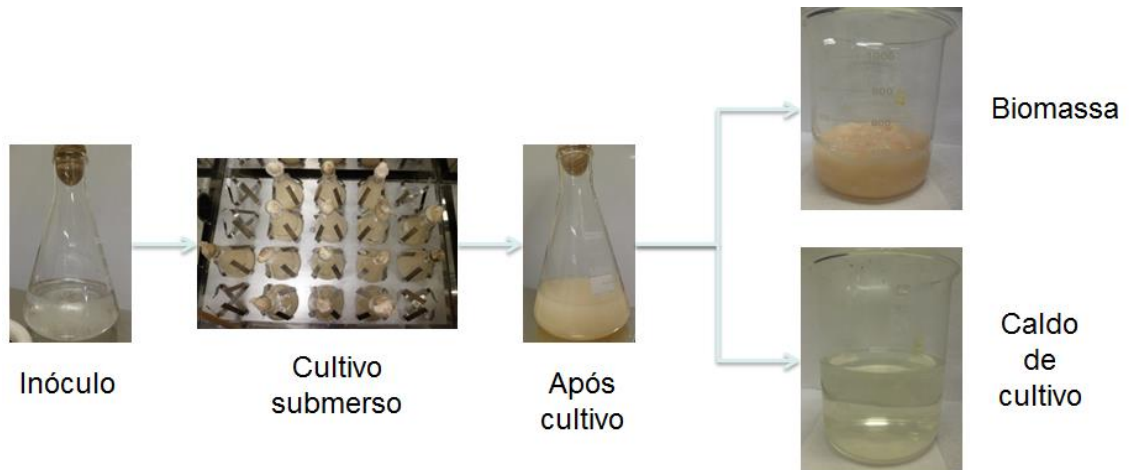


Figura 6. Fluxograma do processo de cultivo submerso do *Lasiodiplodia theobromae*.

4.3. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

O caldo de cultivo foi centrifugado (1500 x g, 30 min) de modo a separá-lo da biomassa, em seguida dialisado intensamente contra água destilada (refrigerado a 4 °C) em tubos de diálise ($\cong 12000$ Da, 1.3 in. MW 11331, Sigma-Aldrich). Posteriormente, foi adicionado etanol absoluto na proporção 1:3 (caldo fermentado:etanol) ao caldo para precipitar o exopolissacarídeo (EPS) *overnight* a 4 °C. O precipitado então foi separado por filtração e na sequência solubilizado em água destilada sob agitação e aquecimento (60 °C). A solução obtida também foi submetida à intensa diálise (3 dias) contra água destilada e então liofilizada (Figura 7).

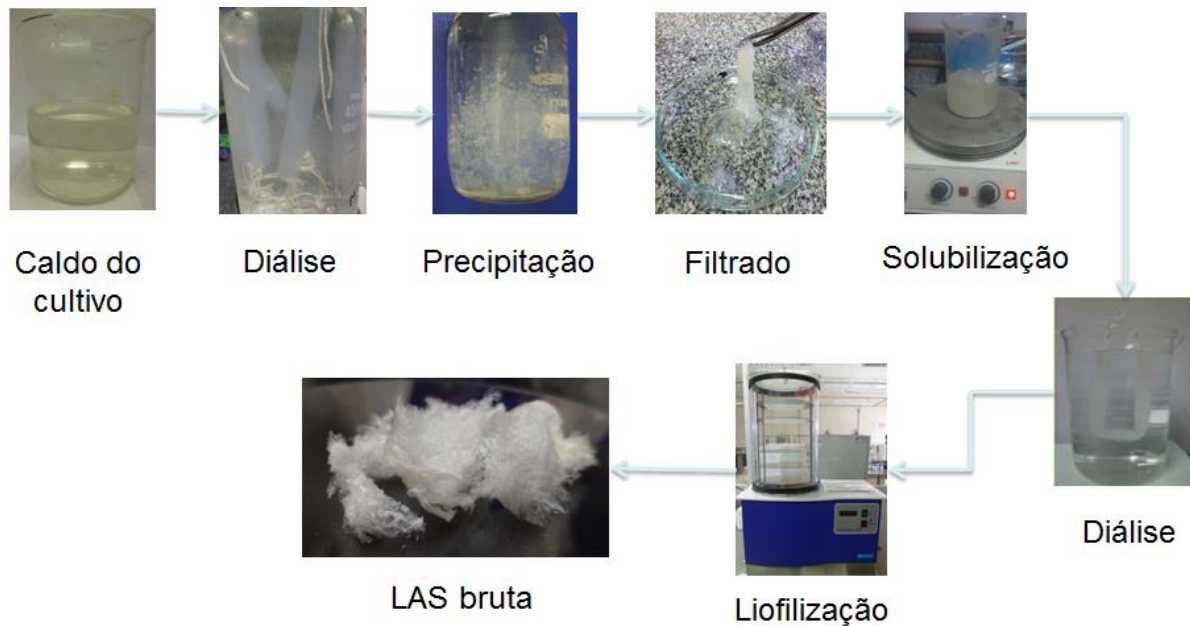


Figura 7. Fuxograma do processo de recuperação e purificação da lasiodiplodana.

4.4. DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA

A carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizada adotando o protocolo descrito por Wang et al., (2012) com adaptações. A lasiodiplodana (1,5 g) foi suspensa em 65 mL de isopropanol com vigorosa agitação por 15 minutos. Em seguida 25 mL de NaOH 20% (m/v) foi adicionado gota a gota e a mistura foi mantida sob agitação por 3 h em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se lentamente sob agitação uma solução contendo ácido monocloroacético nas proporções de 3,75 g ou 5,0 g ou 6,25 g dissolvidos em 12,5 mL de NaOH 5 mol/L (20% m/v) e 31,5 mL de isopropanol de modo a obter os derivados denominados LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3 a partir das respectivas concentrações de ácido monocloroacético. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 3 horas, em seguida a temperatura foi elevada para 60 °C por 30 minutos. A seguir, foi novamente adicionada uma solução de ácido monocloroacético contendo 3,75 g ou 5,0 g ou 6,25 g do ácido dissolvido em 12,5 mL de NaOH 5 mol/L (20% m/v) e 31,5 mL de isopropanol, manteve-se a mistura reacional a 60 °C sob agitação durante 1 hora. A reação foi encerrada através do resfriamento da mistura até a temperatura ambiente e neutralização com solução de ácido clorídrico 1,5 mol/L até pH 7. Na

sequência o isopropanol foi removido da mistura através de rotaevaporação. A solução resultante contendo a lasiodiplodana carboximetilada foi dialisada por 7 dias contra água destilada em tubos de diálise (MW 12000, da Sigma-Aldrich) e liofilizada, obtendo assim três derivados carboximetilados da lasiodiplodana (Figura 8).

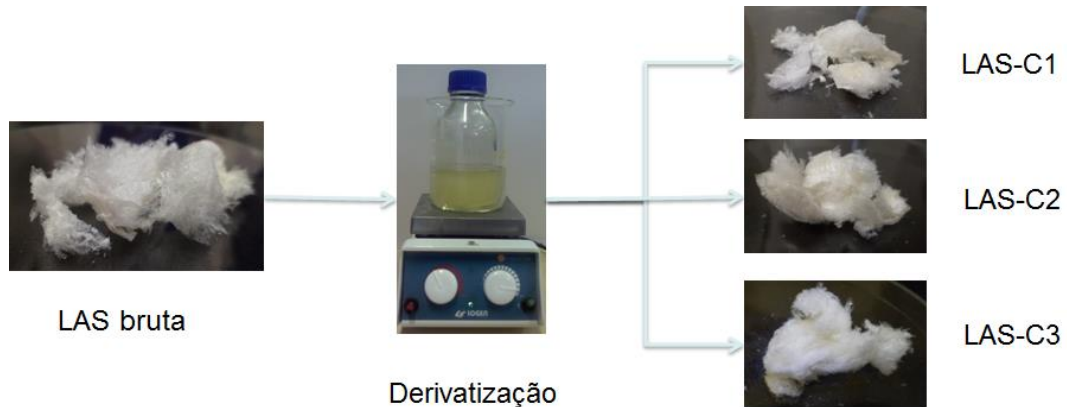


Figura 8. Fluxograma simplificado da obtenção dos derivados carboximetilados LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3 da lasiodiplodana.

4.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV-TF)

Os espectros de infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) do EPS original e das amostras de EPS modificados foram obtidos em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer, USA), com varredura na região de $4000-500\text{ cm}^{-1}$, resolução espectral de 4 cm^{-1} , usando o método de discos de KBr.

O KBr foi seco em mufla a 550 °C por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Na sequência foi macerado em gral de ágata, desidratado em estufa a 100 °C por 24 horas e posteriormente mantido em dessecador até análise. Para a análise foi utilizado a proporção amostra:KBr de 1:100. Os discos foram preparados por prensagem (8 toneladas) e estes submetidos a análise em espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier.

4.6. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)

O grau de substituição (DS) dos derivados carboximetilados foi determinado pelo método de titulação por neutralização, segundo Tatongjai e Lumdubwong (2010). Uma massa de 150 mg da molécula carboximetilada 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 (LAS-C-Na) foi convertido para a forma ácida (LAS-C-H) através de percolação em coluna de troca iônica (Amberlite IR-120) empregando fluxo de 3 mL/min. A coluna foi construída usando uma seringa de 10 mL, empacotada com a resina (6 cm x 1,5 cm) . Após a eluição da solução de LAS-C-H, a coluna foi lavada com 400 mL de água ultra pura (Milli-Q) e toda solução eluída foi coletada (500 mL). A solução foi submetida a liofilização e o material sólido 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 0,1 mol/L. A mistura foi titulada com HCl 0,1 mol/L e água sendo usada como branco. O DS foi calculado pela seguinte equação:

$$W_c = \frac{c * M_c * (V_b - V_s) * 100\%}{m}$$

$$DS = \frac{W_c * M_a}{(100\% - W_c) * M_c}$$

Sendo que:

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

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

M_c: massa molar do grupo funcional carboximetil que reagiu com a LAS (58 g/mol).

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

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

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

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

DS: grau de substituição de grupos carboximetil na amostra.

4.7. ANÁLISE DE 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 quantificado o conteúdo de açúcares totais (DUBOIS, 1956), sendo este, relacionado com a quantidade de amostra solúvel, considerando-se 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA MODIFICADA E NÃO MODIFICADA

5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV-TF)

Os espectros FT-IR da lasiodiplodana original (LAS) e dos derivados carboximetilados (LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3) estão demonstrados na Figura 9. Os espectros FT-IR foram semelhantes entre si e exibiram absorções características de polissacarídeos entre 4000 e 400 cm^{-1} .

As fortes bandas de absorção na região de 1421 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , são resultantes das vibrações de estiramento simétrico e assimétricos do grupo COO^- , respectivamente, e indicam a carboximetilação do polímero (XU et al. 2009; WANG & ZHANG, 2009). O espectro FT-IR da LAS original não apresentou tais picos, contudo, eles estão presentes de forma intensa no espectro dos derivados sendo um indicativo de que a derivatização ocorreu. As bandas de absorção decorrentes das vibrações de estiramento simétrico do grupo COO^- , são observadas em 1422 cm^{-1} , 1429 cm^{-1} e 1429 cm^{-1} , e para as vibrações de estiramento assimétricas em 1598 cm^{-1} , 1598 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} respectivamente para o LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3.

A banda de absorção forte entre 3311 cm^{-1} e 3424 cm^{-1} em todos os espectros é atribuída a vibrações de alongamento de O–H (Xu et al. 2009). A absorção correspondente a frequências inferiores a 3000 cm^{-1} (3000-2840 cm^{-1}) é atribuída ao estiramento C–H sp^3 . (PAVIA et al. 2010). As vibrações de alongamento simétricas e assimétricas das ligações C–O–C (grupo característico de açúcares) são atribuídas às bandas entre 1246 cm^{-1} e 1276 cm^{-1} para as vibrações assimétricas e entre 1071 cm^{-1} e 1078 cm^{-1} para as simétricas (XU et al. 2009). A absorção em 1642 cm^{-1} presente apenas no espectro da LAS original é atribuído ao anel de glucose e está ausente nos espectros dos polímeros modificados devido a sobreposição da banda de estiramento assimétrico do grupo COO^- . A banda em 1159 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} visualizadas somente no espectro da lasiodiplodana bruta são atribuídas por Corradi

da silva et al. (2008) como absorções indicativas de glucanas. Wang et al. (2013) atribui as absorções entre 542 e 705 cm^{-1} às vibrações de balanço da ligação simples C–H. A absorção na região 890 cm^{-1} caracteriza configuração do tipo β - da lasiodiplodana, sendo enfraquecida nos derivados carboximetilados (WANG et al. 2011; WANG & ZHANG, 2009; VASCONCELOS et al. 2008; HUANG et al. 2007). As ligações glicosídicas de configuração β - também são atribuídas por Vasconcelos et al. (2008) e por Corradi da Silva et al. (2008) à banda de absorção de média intensidade em 1378 cm^{-1} presente em todos os espectros. Kagimura et al. (2015b) relatou observações semelhantes das bandas espectrais a partir da carboximetilação da lasiodiplodana em condições reacionais distintas.

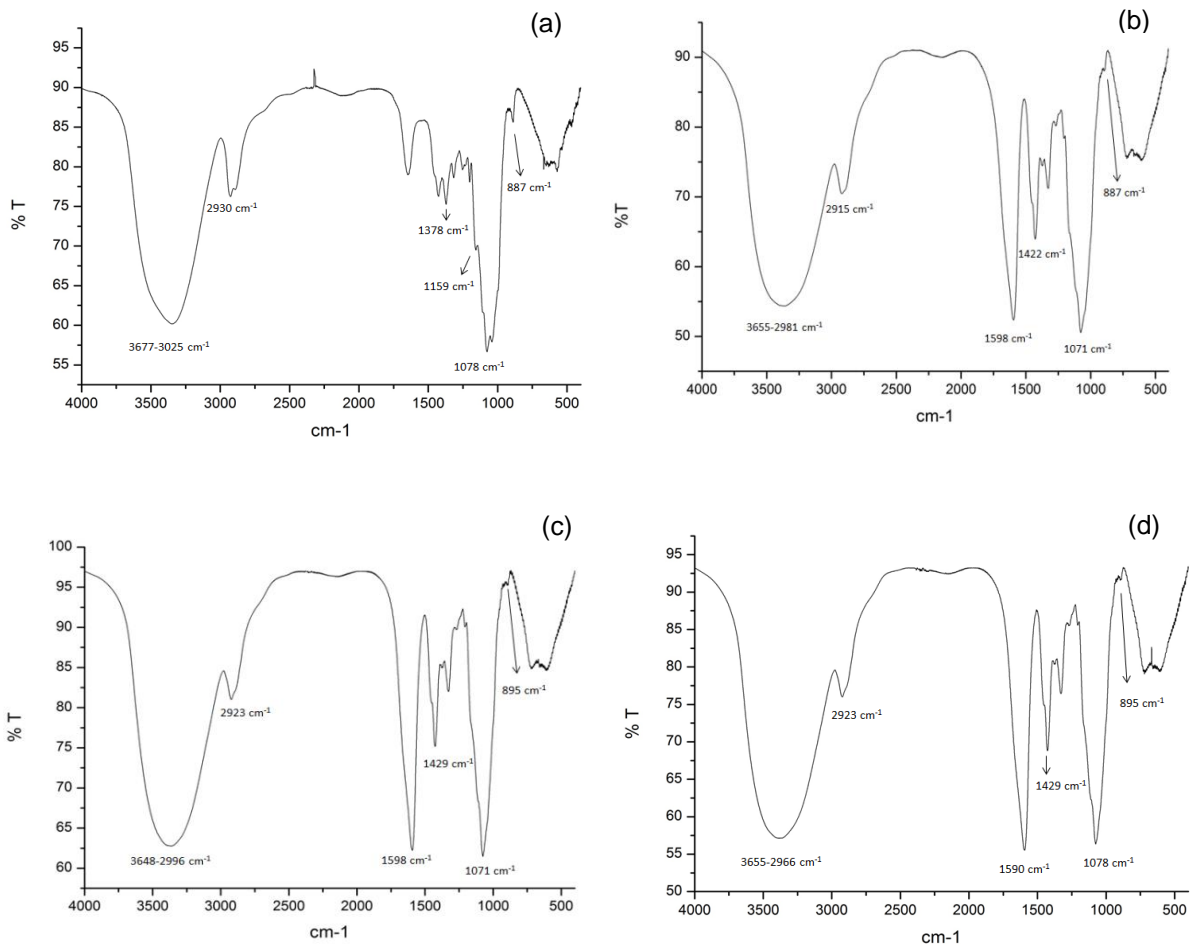


Figura 9. Espectro de infravermelho (FT-IR) da lasiodiplodana não modificada (a) e derivados carboximetilados LAS-C1 (b), LAS-C2 (c) e LAS-C3 (d)

5.1.2. Determinação do Grau de Substituição das Glucanas Carboximetiladas (DS)

Após a reação química de carboximetilação, seguindo os parâmetros indicados no item 4.4, verificou-se que o grau de substituição das hidroxilas por grupos carboximetil foi de 0,47, 0,51 e 0,58 para as amostras LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3, respectivamente quando empregando as proporções LAS:agente derivatizante (ácido monocloroacético): 1:5 (LAS-C1), 1:6,5 (LAS-C2) e 1:8 (LAS-C3).

O grau de substituição (DS) de derivados carboximetila é considerado como o número médio de grupo substituinte em cada resíduo de açúcar (CHEN et al. 2014). A avaliação do DS é importante na compreensão da nova estrutura obtida além de auxiliar a otimização das condições da reação de substituição (HEINZE, 2005).

Diversas metodologias são encontradas na literatura para obtenção de polissacarídeos derivatizados por carboximetilação, os quais utilizam os mesmos agentes químicos, o ácido monocloroacético (agente derivatizante), NaOH (agente de solvatação) porém com distintas condições reacionais. A obtenção de derivados carboximetilglucanas a partir de diferentes concentrações do agente derivatizante tem sido amplamente reportado. Bai et al. (2014) obteve derivados de β -glucana com DS equivalentes a 0.325, 0.449, 0.771 e 0.945 utilizando quatro concentrações distintas de ácido monocloroacético durante a derivatização. (a reação foi mantida por 2 horas a 70°C e utilizando proporções de amostra:agente derivatizante de 1:0,2, 1:0,4, 1:0,7 e 1:1 para obtenção dos respectivos DS).

O aumento da concentração do agente derivatizante na reação de modificação química da lasiodiplodana resultou no aumento do grau de substituição do derivado. As relações de massa LAS:ácido monocloroacético foram de 1:5, 1:6,5 e 1:8, respectivamente para os derivados LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3. Denotando que para cada grama de polímero havia crescentes quantidades do agente derivatizante. Kagimura et al. (2015b) em condições reacionais diferentes (8 horas de reação à 50°C), usou quantidade de ácido monocloroacético com relação de 1:12 e obteve um derivado com DS 1,27.

5.1.3. Solubilidade em Água das Lasiodiplodanas Bruta e Modificadas

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).

Kagimura et al. (2015b) determinou a pureza da lasiodiplodana produzida em cultivo submerso pelo ascomiceto *Lasiodiplodia Theobromae* indicando elevado grau de pureza da molécula bruta. Foi verificado conteúdo de carboidratos de 95% e 3% de proteínas. Com isso, a solubilidade da lasiodiplodana foi calculada considerando a composição em carboidratos do EPS. Os autores relataram uma solubilidade de 3% da molécula bruta e aumento da solubilidade para 63% após carboximetilação.

Na Figura 10 pode ser observado que, após a centrifugação, os tubos contendo LAS-C1, LAS-C2 e LAS-C3 ainda continham material não solúvel, indicando hidrossolubilidade ainda parcial.

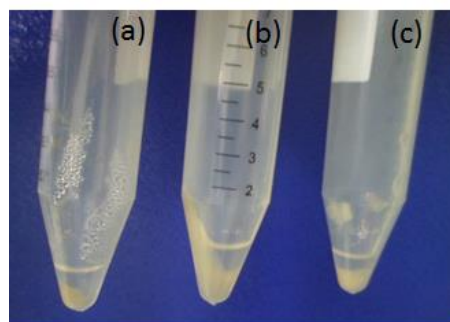


Figura 10. Tubos após centrifugação e descarte do sobrenadante da LAS-C1 (a), LAS-C2 (b) e LAS-C3 (c).

As porcentagens de solubilidade em água a 25 °C de acordo com o ensaio realizado são apresentados na Tabela 1. Os resultados revelam elevado aumento da solubilidade do biopolímero após a derivatização por carboximetilação, sendo verificado aumento de aproximadamente 7,5 vezes após a modificação química. Estes resultados indicam que de fato a introdução de grupos carboximetil na

macromolécula promove alterações estruturais que modificam a interação macromolécula-água melhorando sua hidrofobicidade.

Verifica-se, também, que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o grau de solubilidade dos derivados, o que indica que embora tenha ocorrido aumento no grau de substituição (DS) à medida que foi aumentado a relação entre biopolímero e agente derivatizante, na faixa entre 1:5 a 1:8 (massa/massa), o mesmo não foi verificado em relação a solubilidade. Parece não haver uma correlação direta entre grau de substituição e solubilidade na faixa de relação mássica biopolímero:ácido monocloroacético estudada.

Tabela 1. Solubilidade da lasiodiplodana bruta e de seus derivados carboximetilados.

Amostras	DS	Solubilidade (%)	Carboidratos totais solúveis (mg/mL)
LAS-B*	-	11,95 ^b ± 1,51	1,42 ± 0,18
LAS-C1	0,47	83,13 ^a ± 8,36	9,94 ± 1,00
LAS-C2	0,51	92,15 ^a ± 4,81	10,94 ± 0,57
LAS-C3	0,58	90,58 ^a ± 1,19	10,80 ± 0,14

Letras iguais na mesma coluna denotam que não há diferença estatística significativa, letras diferentes denotam que há diferença estatística significativa entre as porcentagens analisadas ao nível de significância de 95%.

* Lasiodiplodana original, sem modificação química.

Wang et al. (2012) avaliou a solubilidade em água de cinco derivados carboximetilados de pachyman, polissacarídeo extraído do escleródio de *Poria cocos*. Os derivados apresentaram solubilidade de 0,25 mg/mL, 0,30 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,51 mg/mL e 0,52 mg/mL e DS equivalentes a 0,40, 0,48, 0,63, 0,75 e 0,88 respectivamente. Todos os derivados obtiveram aumento pronunciado no DS, porém a solubilidade entre os três últimos derivados não diferiu acentuadamente.

Para avaliar a atividade antitumoral de frações polissacarídicas (α -(1→3)-D-glucana) extraídas do cogumelo *P. tuber-regium*, Zhang et al. (2004) promoveram a carboximetilação de seis frações do polissacarídeo. Os autores descreveram a obtenção de derivados solúveis em água com DS variando de 0,37 a 0,68. Foram observados resultados anti-proliferativos distintos e até ausentes entre os derivados, sendo tal propriedade atribuída à solubilidade e a conformação estrutural das moléculas.

Zhang e Chen (2001) produziram cinco derivados carboximetilados de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana com DS entre 0,20 e 0,63. Os autores observaram que assim como o polissacarídeo bruto, os derivados com DS equivalentes a 0,20 e 0,63 eram insolúveis em água, ao passo que os derivados com DS 0,38, 0,43 e 0,51 eram solúveis. A lasiodiplodana carboximetilada produzida por Kagimura et al. (2015b) apresentou DS superior (1,27) e solubilidade inferior (63%) comparado aos derivados obtidos no presente estudo.

A insolubilidade dos derivados com DS de 0,20 e 0,63 obtidos por Zhang e Chen (2001) foi justificada pelo fato de que a rigidez da cadeia é causada por ligações de hidrogênio intermoleculares e repulsão eletrostática dos grupos carboximetil carregados, além de que derivados com DS relativamente mais altos apresentam cadeia mais estendida comparado a DS mais baixos. Possivelmente a mesma justificativa possa ser aplicada comparando a inferioridade da solubilidade do derivado de Kagimura et al. (2015b) com os obtidos neste estudo, ou seja, derivados com DS muito elevados apresentam cadeia molecular mais estendida consequentemente interações intermoleculares mais fortes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do ácido monocloroacético como agente carboximetilante do exopolissacarídeo lasiodiplodana mostrou-se efetivo e o emprego de diferentes relações mássicas entre biopolímero e agente derivatizante levou a obtenção de derivados com diferentes graus de substituição (DS).

A carboximetilação da lasiodiplodana promoveu o aumento da solubilidade do biopolímero, no entanto não houve uma correlação direta entre aumento do grau de substituição e grau de solubilidade dentro da faixa de concentração de agente derivatizante empregado nas reações de modificação.

Para o melhor entendimento da relação entre grau de substituição e grau de solubilidade da molécula carboximetilada, são necessários ensaios posteriores usando diferentes relações entre concentração de lasiodiplodana e ácido monocloroacético no protocolo de derivatização.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar diferentes relações mássicas entre a concentração de lasiodiplodana e ácido monocloroacético no protocolo de derivatização (1 : 2,5 e 1 : 10).

Caracterizar a estabilidade térmica os derivados obtidos no presente trabalho e os obtidos nas demais condições de derivatização através de análises de TSC/TG/DTA.

Avaliar os aspectos morfológicos dos derivados por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Avaliar o potencial antioxidante dos derivados obtidos.

Avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade da lasiodiplodana bruta e dos derivados.

REFERÊNCIAS

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

AKRAMIENĖ, Dalia; KONDROTAS, Anatolijus; DIDŽIAPETRIENĖ, Janaina; KĖVELAITIS, Egidijus. Effects of β -glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**; v. 43(8), p. 597-606, 2007.

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.

BARROS-FILHO, Bartholomeu A.; NUNES, Fátima M.; OLIVEIRA, Maria da Conceição F.; LEMOS, Telma L. G.; MATTOS, Marcos C. de; GONZALO, Gonzalo de; GOTOR-FERNANDEZ, Vicente; GOTOR, Vicente. 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.

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

BAI, Nan, GU, Min, ZHANG, Wenbing, XU, Wei, MAI, Kangsen. Effects of β -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, V. 426–427, p. 66–73, 2014.

CHEN, Xiaoyu; XU, Xiaojuan; ZHANG, Lina; ZENG, Fanbo. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1→3)- β -D-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 581-587, 2009.

CHEN, Cong; WU, Wenhua; XU, Xiaojuan; ZHANG, Lina; LIU, Ying; WANG, Kaiping. Chain conformation and anti-tumor activity of derivatives of polysaccharide from *Rizhoma panacis japonica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 308-316, 2014.

CORRADI DA SILVA, Maria de Lurdes; FUKUDA, Eliane K.; VASCONCELOS, Ana Flora D.; DEKKER, Robert F. H.; MATIAS, Andreza C.; MONTEIRO, Nilson K.; CARDOSO, Marilsa S.; BARBOSA, Aneli M.; SILVEIRA, Joana L. M.; SASSAKI, Guilherme L.; CARBONERO, Elaine 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.

CUI, Hengxiang; LIU, Qin; TAO, Yongzhen; ZHANG, Hongfeng; ZHANG, Lina; DING, Kan. Structure and chain conformation of a (1→6)- α -D-glucan from the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the antioxidant activity of its sulfated derivative. **Carbohydrate Polymers**. V. 74 p. 771–778, 2008.

CUNHA, Mário Antônio Alves da; TÚRMINA, Janaina A.; IVANOV, Raphael C.; BARROSO, Roney R.; MARQUES, Patrícia T.; FONSECA, Eveline A. I.; FORTES, Zuleica B.; DEKKER, Robert F. H.; KHAPER, Neelam; BARBOSA, Aneli 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.

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

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

HUANG, Qilin; JIN, Yong; ZHANG, Lina; CHEUNG, Peter C. K.; KENNEDY, John F. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter. **Carbohydrate Polymers**. V. 70, p. 324–333, 2007.

KAGIMURA, Francini Yumi; DA CUNHA, Mário Antônio A.; BARBOSA, Aneli M.; DEKKER, Robert F.H.; MALFATTI, Carlos Ricardo Maneck. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015a.

KAGIMURA, Francini Y.; CUNHA, Mário Antônio A. da; THEIS, Thais V.; MALFATTI, Carlos R. M.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M.; TEIXEIRA, Sirlei D.; SALOMÉ, Kahlil. Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**. V. 127, p. 390–399, 2015b.

LESAGE, Gulherme; BUSSEY, Howard. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 70, p.317-343, 2006.

LIMA, Joilson Silva; CARDOSO, José Emilson, MOREIRA, Renato Cesar.; ALVES, Edson Souza; MELO, José Glauber Moreira. 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.

LIU, Jun; LUO, Jianguang; YE, Hong; SUN, Yin; LU, Zhaoxin; ZENG, Xiaoxiong. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 275–281, 2009.

LIU, Jia; CHEN, Jia; DONG, Nan; MING, Jian; ZHAO, Guohua. Determination of degree of substitution of carboxymethyl starch by Fourier transform mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares. **Food Chemistry**, V. 132, p. 2224–2230, 2012.

LIU, Jun; LUO, Jianguang; YE, Hong; ZENG, Xiaoxiong. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 767–772, 2012.

LIU, Wei; WANG, Hengyu; PANG, Xiubing; YAO, Wenbing; GAO, Xiangdong. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 451–457, 2010.

LIU, Jun; LUO, Jianguang; YE, Hong; SUN, Yi; LU, Zhaoxin; ZENG, Xiaoxiong. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1278–1283, 2010.

MA, Lishuai; CHEN, Haixia; ZHANG, Yu; ZHANG, Ning; FU, Lingling. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 371-378, 2012.

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.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PAVIA, D. L. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo, SP: Cengage, 2010.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre Artmed, 2000.

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

SILVA, Maria de Lurdes Corradi da; MARTINEZ, Paula Felipe; IZELI, Nataly Lino; SILVA, Iara Ribeiro; VASCONCELOS, Ana Flora Dalberto; CARDOSO, Marilsa de Stefani; STELUTTI, Rosângela Maria; GIESE, Ellen Cristine; BARBOSA, Aneli de Melo. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1. p. 85-92, 2006.

TAO, Yongzhen; ZHANG, Yongyong, & ZHANG, Lina. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 109–115, 2009.

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

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

TÚRMINA, Janaína A; CARRARO, Emerson; CUNHA, Mário A. Alves da, DEKKER, Robert F. H., BARBOSA, Aneli M., SANTOS, Fábio Seidel dos, SILVA, Luiz A.; MALFATTI, Carlos R. M. Toxicological Assessment of β -(1→6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, p. 14298-14309, 2012.

VASCONCELOS Ana Flora D; MONTEIRO, Nilson K.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M.; CARBONERO, Elaine R.; SILVEIRA, Joana L. M.; SASSAKI, Guilherme L.; SILVA, Roberto da; SILVA, Maria de Lurdes Corradi da. Three exopolysaccharides of the β -(1→6)-D-glucan type and a β -(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VASCONCELOS, Ana Flora D.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M.; CARBONERO, Elaine R.; SILVEIRA, Joana L. M.; GLAUSER, Bianca; PEREIRA, Mariana Sá; SILVA, Maria de Lurdes Corradi da. Sulfonation and Anticoagulant Activity of Fungal Exocellular β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucan (Lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

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

XU, Jing; LIU, Wei; YAO, Wenbing; PANG, Xiubing; YIN, Dengke; GAO, Xiangdong. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 227-234, 2009.

ZHANG, Mei; CHEUNG, Peter C. K.; ZHANG, Lina; CHIU, Chi-Ming; OOI, Vicent E. C. Carboxymethylated b-glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. **Carbohydrate Polymers** . V.57, p. 319–325, 2004.

ZHOU, T.X.; JUNG, J.H.; ZHANG, Z.F.; KIM, I.H. Effect of dietary β -glucan on growth performance, fecal microbial shedding and immunological responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**. V. 179, p. 85-92, 2013.

YANG, Liuging; ZHAO, Ting; WEI, Hong; ZHANG, Min; ZOU, Ye; MAO, Guanghua; WU, Xiangyang. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1124– 1130, 2011.

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

WANG, Yongjiang; MO, Qing; LI, Zenan; LAI, Hongwu; LOU, Jian; Liu, Shiwang; MAO, Jianwei. Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1052-1056, 2012.

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

RODRIGUES, Regiane. **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.

WANG, Jianguo; WANG, Yutang; LIU, Xuebo; YUAN, Yahong; YUE, Tianli. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 33-38, 2013.

WANG, Jianguo; MA, Zhaocheng; ZHANG, Lina; FANG, Yapeng; JIANG, Fatang; PHILLIPS, Glyn O. Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**. V. 86, p. 844– 851, 2011.

WANG, Junlong; GUO, Hongyun; ZHANG, Ji; WANG, Xiaofang; ZHAO, Baotang; YAO, Jian; WANG, Yunpu. Sulfated modification, characterization and structure–antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 897–905, 2010.