

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**ELOÍSA CRISTINA PASQUALI**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LASIODIPLODANA  
((1→6)- $\beta$ -D-GLUCANA) SULFONADA COM BAIXO GRAU DE  
SUBSTITUIÇÃO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO  
2018**

ELOÍSA CRISTINA PASQUALI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIA DE LASIODIPLODANA  
((1→6)-β-D-GLUCANA) SULFONADA COM BAIXO GRAU DE  
SUBSTITUIÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Co-Orientadora: Gabrielle Cristina Calegari

PATO BRANCO

2018

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

O trabalho de diplomação intitulado **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LASIODIPLODANA ((1→6)-β-D-GLUCANA) SULFONADA COM BAIXO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 4.2.2018 de 2018.

Fizeram parte da banca os professores.

Mário Antônio Alves da Cunha  
Orientador

Davi Costa Silva  
Membro da Banca

Edilson Ferreira  
Membro da Banca

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer primeiramente a Deus e a minha família, por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial.

Agradeço ao meu orientador por todos os ensinamentos repassados. À minha coorientadora, Gabrielle, por estar sempre comigo, auxiliando muito na minha adaptação no laboratório e por estar sempre disposta a me ajudar, e me acalmar quando foi necessário.

Sou muito grata, também, a todos que estiveram comigo neste período, me ajudando pessoal e academicamente. Minhas amigas, amigos e a todo pessoal do laboratório N 009, meu muito obrigada.

## RESUMO

PASQUALI, Eloísa Cristina. Obtenção e caracterização parcial de Lasiodiplodana ((1→6)-β-D-glucana) sulfonada com baixo grau de substituição. 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares produzidos por microrganismos como bactérias e fungos. Estas macromoléculas têm ganhado o cenário industrial devido a suas aplicações em diversos setores da indústria, como farmacêutica e alimentícia, atuando como estabilizantes, gelificantes e emulsionantes. Entre a enorme variedade de polissacarídeos existentes, as β-glucanas destacam-se devido a suas propriedades demonstradas por recentes estudos. Tais propriedades possibilitam sua aplicação como agente anticarcinogênico, anticoagulante e antitumoral. A modificação química demonstrou ser uma alternativa para potencializar as atividades biológicas intrínseca destes polissacarídeos, além de, em alguns casos, criar novas propriedades. Entre estas modificações está a sulfonação, que consiste na inserção de grupamentos sulfonato ( $S^+O_2OH$ ) na molécula de interesse. A presente pesquisa estudou a modificação química da molécula de lasiodiplodana ((1→6)-β-D-glucana), EPS produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, por sulfonação utilizando dimetilsulfóxido ( $Me_2SO$ ) como solvente, piridina como catalisador e ácido clorosulfônico como agente derivatizante, para a substituição dos grupamentos hidroxila por sulfonato. As condições experimentais de derivatização estudada possibilitaram a obtenção de um derivado com baixo grau de substituição (DS) de 0,17. As análises antioxidantes não demonstraram resultados significativos nas concentrações utilizadas, tanto para a lasiodiplodana nativa quanto para a molécula sulfonada. A sulfonação contribuiu para o surgimento de atividade antimicrobiana. Lasiodiplodana sulfonada apresentou atividade de inibição contra *C. albicans* (MIC 0,71 mg mL<sup>-1</sup>), atividade bacteriostática contra *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *E. Coli* e fungistáticas contra *C. tropicalis*.

Palavras-chave: Derivatização química, biopolímero, antimicrobiana.

## ABSTRACTS

PASQUALI, Eloísa Cristina. Obtention and partial characterization of sulfonated Lasiodiplodan ((1→6)-β-D-glucan) with low degree of substitution. 2018. 54 p. Final Work for the Undergraduation – Bachelor of Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2018.

Exopolysaccharides are extracellular polysaccharides produced by microorganisms such as bacteria and fungi. These macromolecules have getting industry attention due to their applications in several sectors, including pharmaceutical and food industries, where they act as stabilizers, gellifiers and emulsifiers. Among the huge variety of existing polysaccharides, β-glucans stand out due to their properties demonstrated by recent studies. Such properties make it possible to be used as anticarcinogenic, anticoagulant and antitumor agents. The chemical modification proved to be an alternative to potentiate the intrinsic biological activities of these polysaccharides, besides, in some cases, to create new properties. Among these modifications is sulfonation, which consists of the insertion of sulfonate groups ( $S^+O_2OH$ ) in the molecule of interest. The present study studied the chemical modification of lasiodiplodane (1 → 6) -β-D-glucan molecule (EPS produced by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI) by sulfonation using dimethylsulfoxide ( $Me_2SO$ ) as solvent, pyridine as catalyst and chlorosulphonic acid as derivatizing agent, for the substitution of hydroxyl groups by sulfonate. The experimental conditions of derivatization studied allowed to obtain a derivative with a low degree of substitution (DS) of 0.17. The antioxidant analyzes did not show significant results in the concentrations used for both the native lasiodiplodan and the sulfonated molecule. Sulfonation contributed to the appearance of antimicrobial activity. Sulfonated lasiodiplodan showed inhibition activity against *C. albicans* (MIC  $0.71\text{ mg mL}^{-1}$ ), bacteriostatic activity against *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* and *E. coli*, and fungistatic activity against *C. tropicalis*.

Keywords: Chemical derivatization, biopolymer, antimicrobial.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Solubilidade das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada.....	28
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da molécula do polissacarídeo lasiodiplodana.....	13
Figura 2- Representação de uma D-glucana modificada por sulfonação.....	14
Figura 3- representação da molécula de quitina. ....	16
Figura 4: fungo repicado crescido em placa com meio Ágar Sabouraud-cloranfenicol. .....	17
Figura 5: fluxograma de obtenção da Lasiodiplodana nativa. ....	19
Figura 6: Lasiodiplodana nativa liofilizada. ....	20
Figura 7: Lasiodiplodana sulfonada liofilizada. ....	21
Figura 8: atividade de inibição do radical DPPH. ....	29
Figura 9: atividade de redução de Fe <sup>3+</sup> . ....	31
Figura 10: porcentagem de remoção de peróxido de hidrogênio. ....	32
Figura 11: atividade antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> . ....	34
Figura 12: atividade antimicrobiana frente a <i>S. typhimurium</i> . ....	34
Figura 13: atividade antimicrobiana frente a <i>L. monocytogenes</i> . ....	35
Figura 14: atividade antimicrobiana frente a <i>E. Coli</i> . ....	35
Figura 15: atividade antimicrobiana frente a <i>C. tropicalis</i> . ....	36
Figura 16: atividade antimicrobiana frente a <i>C. albicans</i> . ....	36
Figura 17: curva padrão de glicose (fenol-sulfúrico).....	47
Figura 18: curva padrão de sulfato ferroso (FRAP). ....	48



## LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIações

DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
DS	Grau de substituição
EPS	Exopolissacarídeo
FRAP	Potencial Redutor do íon férrico
LAS-N	Lasiodiplodana nativa
LAS-S	Lasiodiplodana sulfonada
MIC	Concentração mínima inibitória
VMSM	Meio de Sais Minerais de Vogel

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	6
2 OBJETIVOS .....	8
2.1 objetivo GERAL .....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
3.1 POLISSACARÍDEOS.....	9
3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS .....	10
3.3 GLUCANAS .....	10
3.4 <i>LASIODIPLODIA THEOBROMAE</i> .....	11
3.5 LASIODIPLODANA .....	12
3.6 SULFONAÇÃO: MODIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	13
3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	14
3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1. BIOPRODUÇÃO DA LASIODIPLODANA E MODIFICAÇÃO POR SULFONAÇÃO.....	17
4.1.1 Cepa fúngica.....	17
4.1.2 Preparo do inóculo.....	17
4.1.3 Produção por cultivo submerso e recuperação da lasiodiplodana.....	18
4.2 SULFONAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	20
4.2.1 Derivatização química .....	20
4.2.2 Análise por Espectroscopia de Infravermelho .....	21
4.2.3 Determinação do grau de sulfonação (DS).....	21
4.2.4 Avaliação da solubilidade .....	22
4.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	22
4.3.1 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH• .....	23
4.3.2 Determinação da atividade antioxidante utilizando íon férrico (FRAP) ..	23
4.3.3 Capacidade de Remoção do Peróxido de Hidrogênio .....	24
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1 Espectro de Infravermelho.....	26
5.2 Grau de sulfonação .....	27
5.3 Solubilidade .....	27
5.4 Atividade de captura do radical DPPH•.....	29

5.5 Poder redutor antioxidante do íon férrico (FRAP).....	30
5.6 Capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio .....	31
5.7 Atividade antimicrobiana .....	33
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos estão presentes em diferentes fontes de recursos naturais e comumente apresentam propriedades biológicas e tecnológicas relevantes, as quais têm despertado o interesse de setores industriais como farmacêutico e alimentício. Algumas aplicações clássicas dos polissacarídeos incluem o uso como emulsificantes, estabilizantes em sistemas alimentares, aglutinantes, gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filmes, espessantes e agentes suspensores de alimentos (TONELLI et al., 2005).

Entre os diferentes polissacarídeos naturais existentes, destacam-se as  $\beta$ -glucanas, que são polímeros compostos por monômeros de D-glicose unidos por ligações  $\beta$ -glicosídicas. As  $\beta$ -glucanas apresentam variadas aplicações industriais, especialmente nas indústrias de alimentos, onde tem sido utilizada como agente de textura, umectante, mimetizador de gordura, fibra alimentar e ingrediente pré-biótico. Algumas propriedades biológicas como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral, quelante, atividade imunoprotetora e potencial para auxiliar no tratamento de doenças como hipercolesterolemia, diabetes e problemas cardiovasculares, tornam estas macromoléculas atrativas para as indústrias farmacêuticas (BAUERMEISTER et al., 2010; KHOURY et al., 2012; SILVA et al, 2006).

$\beta$ -glucanas são encontradas como agente estruturante da parede celular de leveduras e fungos filamentosos, onde contribuem para a resistência mecânica e proteção contra estresses ambientais (SILVA et al, 2006). Entretanto, é importante destacar que alguns microrganismos tem a capacidade de produzir  $\beta$ -glucanas de forma extracelular, quando cultivados em culturas submersas. A lasiodiplodana, uma glucana do tipo (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana, é um exemplo de polissacarídeo extracelular produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Trabalhos descritos da literatura científica demonstram algumas propriedades da lasiodiplodana como atividade antioxidante, atividade protetora contra danos no DNA induzidos pela doxorubicina, atividades hipoglicêmica e transaminase e atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama MCF-7 (CUNHA et al., 2012; TURMINA et al., 2012). Outro aspecto importante é que modificações químicas na estrutura primária das  $\beta$ -glucanas tem demonstrado ser uma ferramenta interessante para a

potencialização de suas propriedades, e mesmo indução de novas atividades biológicas.

Dentre as modificações químicas comumente empregadas em polissacarídeos, encontra-se a sulfonação. Esta derivatização consiste em uma reação onde há substituição de grupos hidroxila presentes na molécula, por grupos sulfonatos ( $S^+O_2OH$ ). Polissacarídeos sulfonados tem sido descritos como agentes anticoagulantes e antitrombóticos, além de alguns demonstrarem atividade antimicrobiana (LI et al., 2017; WANG et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de moléculas de lasiodiplodana, ((1→6)- $\beta$ -D-glucana), modificação química por sulfonação, e avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano do derivado obtido.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Derivatização química da lasiodiplodana por sulfonação e avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano do polissacarídeo nativo e sulfonado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção de lasiodiplodana a partir de cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI, em sistema descontínuo;
- Modificação estrutural da glucana por sulfonação, utilizando como agente sulfonante o ácido clorossulfônico;
- Avaliação do grau de substituição e solubilidade da molécula derivada;
- Avaliação da atividade antioxidante pelo uso do radical DPPH, redução do íon férrico e sequestro de peróxido de hidrogênio;
- Avaliação da atividade antimicrobiana (MIC) contra bactérias e leveduras.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos são biopolímeros encontrados na natureza sobre diversas formas nos organismos vivos (TONELLI et al., 2005), sendo constituídos por unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas. O que diferencia estas macromoléculas entre si, são o tipo de unidades monossacarídicas constituinte, o grau de ramificação da estrutura, tipos de ligações entre os monômeros e o comprimento de cadeia. São denominados heteropolissacarídeos, os que possuem duas ou mais unidades monoméricas diferentes, e como homopolissacarídeos, os que são constituídos por apenas um tipo de unidade monomérica, como a celulose (CORRADI et al., 2006).

Os polissacarídeos são muito versáteis, atuando como reserva de energia e constituinte da parede celular de vegetais, onde ajudam a fortalecer a força mecânica de plantas terrestres e marinhas (LAPASIN, PRICL, 1999). Na indústria, destacam-se os amidos, seus derivados e os polissacarídeos não-amiláceos. O uso industrial destes está relacionado à diferentes propriedades como capacidade espessante, gelificante, estabilizante de emulsões, além da possibilidade de modificar a viscosidade de um líquido e eliminar efeitos indesejáveis da liberação de água em um alimento (TONELLI et al., 2005).

Polissacarídeos microbianos, chamados de biopolímeros, tem ganhado destaque devido algumas características de produção como produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno (DE SOUZA, GARCIA CRUZ, 2004).

Seu custo comparado com polissacarídeos vegetais ainda é elevado, mas suas características físico-químicas aumentam seu custo-benefício, como a alta compatibilidade com diversos sais em ampla faixa de pH e temperatura, a estabilidade em elevadas concentrações iônicas e ação em conjunto com outros polissacarídeos (SILVA et al., 2006)

### 3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos extracelulares (EPS) são produzidos por alguns tipos de fungos e bactérias e possuem como principal função a proteção contra estresses ambientais (DONOT et al., 2012). São encontrados na superfície das células ou excretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1998).

Os EPS afetam diretamente a maneira como o microrganismo interage com o ambiente externo, e sua produção tem relação com fatores de estresse bióticos e abióticos, e adaptação do microrganismo a um ambiente de condições extremas. Alguns tipos de exopolissacarídeos podem formar cápsulas ao redor da célula com alto teor de água, protegendo-a de dessecação e ataque de protozoários (DONOT et al., 2012).

Entre as aplicações industriais dos EPS, têm-se o uso destes como emulsificantes, estabilizantes, aglutinantes, gelificantes, lubrificantes, formadores de filmes e espessantes (SOUZA, CRUZ 2004).

O exopolissacarídeo produzido pelo microrganismo pode permanecer solto no meio extracelular como muco, ou podem fazer ligações covalentes com lipídio ou fosfodiéster presentes na superfície da célula (DE SOUZA, GARCIA CRUZ, 2004) Destaca-se também que a natureza aniônica da camada de exopolissacarídeo que envolve algumas células microbianas, possibilita a captura de minerais e nutrientes essenciais, degradação e capacidade de quelar alguns metais e íons e, regular a difusão de certas moléculas entre o ambiente extracelular e intracelular, possibilitando que algumas bactérias resistam a surfactantes e antibióticos (DONOT et al., 2012).

As condições de cultivo em que o microrganismo se encontra interferem diretamente na quantidade e variação da estrutura do exopolissacarídeo (BARBOSA et al., 2004). Fatores como a composição do meio de cultivo, o pH, a temperatura de incubação, volume de ar e de meio, presença ou ausência de agitação, o volume do inóculo, a quantidade e a composição de micronutrientes e principalmente a relação entre carbono e nitrogênio, são essenciais para um bom rendimento do processo de obtenção do polissacarídeo (FARIA, 2002).

### 3.3 GLUCANAS



As glucanas são polímeros compostos por centenas ou milhares de unidades monossacarídicas. Elas diferem entre si pelas ligações glicosídicas entre as unidades monoméricas, comprimento das cadeias polissacarídicas e grau de ramificação, quando presente (BAUERMEISTER et al., 2010).

As  $\beta$ -glucanas são grupos heterogêneos de macromoléculas, sendo a mais simples a  $\beta$ -(1,3)-D-glucana encontrada em procariontes e eucariontes. Há diversas fontes naturais destes polissacarídeos, como leveduras, cogumelos, bactérias, algas e cereais como cevada e aveia (KHOURY et al., 2012). Sua função nos corpos fúngicos ainda não está completamente elucidada, mas estudos sugerem que a principal função seria auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular (SILVA et al, 2006).

As propriedades biológicas das glucanas estão associadas à sua massa molecular, portanto, sua origem tem influência em suas atividades. Glucanas com elevada massa molecular tem menor permeabilidade nas células e são mais viscosas (LEI et al., 2015). As que possuem menor massa molecular demonstram propriedades biológicas de grande utilidade industrial, como, por exemplo  $\beta$ -glucanas derivadas de aveia, que apresentam atividade antitumoral, sem toxicidade para as células normais (CHOROMANSKA, 2015) e capacidade de redução de parâmetros de estresse oxidativo (BŁASZCZYK, 2015).

Glucanas de origem microbiana ainda possuem algumas barreiras para uso clínico, em função da insolubilidade em água. Porém, já demonstram enorme gama de aplicações como agentes antitumorais, efeito anticancerígeno por impedir colonização por células cancerígenas, controle da formação de leucócitos, tendo efeito anti-inflamatório, entre outros usos de valiosa importância (SILVA et al, 2006). As glucanas oriundas de cogumelos (basidiomas) apresentam atividade antioxidante, com habilidade de eliminação de radicais livres e capacidade quelante do íon  $Fe^{2+}$  (LIU et al., 2010).

### 3.4 LASIODIPLODIA THEOBROMAE

*L. theobromae* é um ascomiceto cosmopolita, pertencente à família *Botryosphaeriaceae* e ao gênero *Lasiodiplodia* (MUNIZ et al., 2011). Sua colônia pura

em meio Agar Batata Dextrose (BDA) apresenta coloração acinzentada a negra, foscas, com abundante micélio aéreo, e tem seu pleno desenvolvimento em temperaturas entre 12 °C e 25 °C (RODRIGUES, 2003). As características morfológicas e fisiológicas de isolados de *L. theobromae*, como coloração da colônia e crescimento micelial, podem variar de acordo com o hospedeiro e a região geográfica que se encontra (PEREIRA et al., 2006).

Encontrado em regiões de clima tropical e subtropical, este fungo é considerado um fitopatógeno leve, porém de grande importância. Sua enorme gama de hospedeiros torna difícil o controle de sua proliferação, resultando na perda de diversas culturas. Pode afetar plantas e frutas que estão submetidas a estresse ou por meio de ferimentos, tanto os naturais como os provocados por animais, insetos, entre outros (PEREIRA et al., 2006; TORRES et al., 2008).

Importante patógeno da madeira, *Lasiodiplodia theobromae* tem sido frequentemente relatado como responsável pela morte de plantas por dificultar o transporte de nutrientes e água, causando a redução do processo de fotossíntese, além de murcha e podridão basal de seus frutos e raízes, infectando-os também por meio das sementes, causando problemas pós-colheita em mais de 500 hospedeiros, incluindo árvores perenes de frutas e nozes, hortaliças e plantas ornamentais. (TORRES et al., 2008; CIPRIANO et al., 2015). Entretanto, é importante ressaltar que algumas moléculas biológicas de interesse industrial são obtidas a partir de microrganismos fitopatógenos como a goma xantana (PETRI et al., 2015) e obtidas em bioprocessos a partir da bactéria *Xanthomonas campestris*.

### 3.5 LASIODIPLODANA

A lasiodiplodana, cuja a estrutura está representada na Figura 1, é um polissacarídeo extracelular, do tipo (1→6)-β-D-glucana produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI quando em cultivo submerso. Glucanas do tipo (1→6)-β-D-glucana são mais comuns de serem encontradas como componente insolúvel da parede celular de fungos, onde o processo de isolamento é mais difícil quando comparado a produção extracelular (CUNHA et al., 2012).

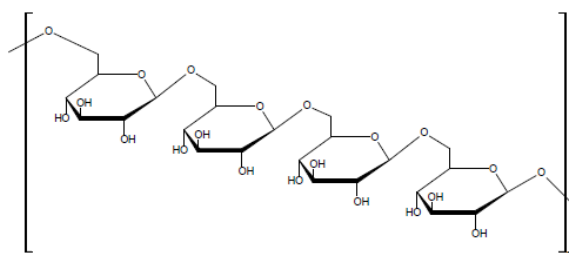


Figura 1- Representação da molécula do polissacarídeo lasiodiplodana.

Fonte: LUNA (2016)

Diferentes propriedades biológicas da lasiodiplodana produzida pelo ascomiceto *L. theobromae* MMPI tem sido descrita na literatura. Turmina et al., 2012 demonstrou que ratos tratados com lasiodiplodana por 28 dias apresentaram significativa diminuição dos níveis glicose no sangue, sem alterações hematológicas e histopatológicas. Cunha et al., (2012) verificou atividade antiproliferativa da lasiodiplona contra células cancerígenas MFC-7 em ensaios *in vitro*. Giese et al. (2015) reportaram que a lasiodiplodana apresenta atividade antioxidante.

### 3.6 SULFONAÇÃO: MODIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Modificações químicas na estrutura de polissacarídeos podem ser obtidas pela substituição de grupos hidroxila presentes na macromolécula por algum grupo de interesse, a fim de criar ou potencializar algumas funcionalidades biológicas (KAGIMURA et al., 2015a).

A reação de sulfonação consiste na substituição de grupos hidroxila por grupos sulfonato ( $S^+O_2OH$ ), como demonstrado na Figura 2, e tal derivatização tem promovido a potencialização de propriedades biológicas de alguns polissacarídeos (LI et al., 2017; WANG et al., 2015).

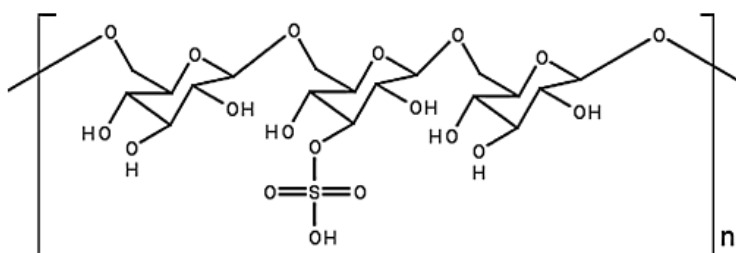


Figura 2- Representação de uma D-glucana modificada por sulfonação.

Fonte: KAGIMURA et al., (2015b).

A derivatização por sulfonação comumente é conduzida com o uso de ácido clorossulfônico, ácido sulfúrico anidro ou complexos de trióxido de enxofre-piridina como agentes de derivatização. O grau de substituição da reação é dado pela quantidade de grupos hidroxila substituído pelo grupo sulfonato (WANG et al., 2015).

A sulfonação de polissacarídeos tem ganhado destaque após estudos revelarem sua influência na solubilidade de macromoléculas e alteração da conformação da cadeia, atuando diretamente na melhoria da atividade anticoagulante, antiviral, antioxidante e antitumoral (WANG et al., 2009). Esse processo de derivatização química ainda possibilita o uso destes polissacarídeos industrialmente como agentes texturizantes em alimentos, como suplementos alimentares e no desenvolvimento de novas drogas (JINDAL et al., 2013).

Vasconcelos et al., 2013, avaliou os efeitos antitumorais de lasiodiplodana produzida por *L. theobromae* e sulfonada com DS de 0.95 e verificou atividade anticoagulante. Tao et al. (2006), também estudou atividade antitumoral de polissacarídeo fúngico sulfonado, bem como suas características físico-químicas e constatou que a sulfonação contribuiu para a atividade antitumoral.

### 3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação pode ser descrita como um processo metabólico de geração de energia para as células. Esse processo, e outros fatores externos como poluição, fumaça de cigarro, radiação e medicação contribuem para a geração de radicais livres nos sistemas celulares (ADEGOKE et al., 1998; MCCORD et al., 1994; FREEMAN,

CRAPO, 1982). Radicais livres podem causar severos danos através do processo denominado estresse oxidativo, desencadeando doenças como câncer, malefícios cardíacos e doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson (CHRISTEN, 2000; AMES et al., 1993; AMES et al., 1995).

Os chamados antioxidantes não-enzimáticos dietéticos (exógenos) atuam juntamente com o sistema antioxidante endógeno para eliminar radicais livres no corpo. Compostos naturais como ácidos fenólicos, polifenóis, flavonóides, carotenóides, ácido l-ascórbico, tocoferol, ácidos graxos  $\Omega$ -3 e  $\Omega$ -6 demonstram ter alta atividade de remoção de radicais livres (PAIVA, RUSSELL, 1999). Polissacarídeos como a lasiodiplodana também possuem a capacidade de remover diferentes radicais livres.

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é grande produtor de glicosídeo colestanol, uma saponina com atividade antitumoral, mas principalmente, segundo Jinu et al. (2015) com atividade antioxidante frente ao radical DPPH. O estudo realizado por Calegari et al., (2017) pode ser mencionado em relação a capacidade antioxidante da lasiodiplodana. Neste trabalho, o EPS foi derivatizado por sulfonação e sua atividade antioxidante demonstrou significativa potencialização após tal modificação química.

Chen et al. 2006 estudou a capacidade antioxidante de polissacarídeo derivado do fungo *Cordyceps sinensis* e verificou significativa atividade antitumoral e antioxidante. Yang et al. 2005 modificou um polissacarídeo obtido do fungo *Phoma herbarum* por sulfonação e avaliou suas atividades antioxidantes após o processo e constatou que a modificação química aumentou as propriedades antioxidantes do polissacarídeo.

### 3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Microrganismos resistentes a antibióticos tem se tornado um problema de saúde mundial. De um total de 2 milhões de pessoas que chegam aos hospitais nos Estados Unidos com alguma infecção bacteriana, 70% dos casos envolvem alguma espécie que tem resistência a pelo menos um tipo de medicamento (CUSHNIE; LAMB, 2005).

A formação de biofilmes por microrganismos é uma das importantes razões que levam a falha dos tratamentos antimicrobianos. A formação destes filmes é observada em diversas espécies, entre elas, *Staphylococcus aureus* (VAN ACKER et al., 2014).

A modificação química da estrutura de compostos presentes em medicamentos na qual a resistência se desenvolveu mostrou ser uma alternativa efetiva para prolongar a vida útil de certos agentes que atuam nas drogas (JEU et al., 2003). Estudos desenvolvidos por Cushnie e Lamb (2005), demonstraram a possibilidade de produção de agentes quimioterapêuticos antifúngicos, antivirais ou antibacterianos a partir de flavonoides e ainda explana futuras produções de moléculas sintéticas mais potentes. Neste sentido, a modificação de biomoléculas ou aquelas produzidas sinteticamente, podem provocar aumento na atividade antimicrobiana.

Atividade antimicrobiana de polissacarídeos derivados do gênero *Ganoderma* foi estudada por Ferreira et al. (2015). Goy et al. (2009) estudou a atividade antimicrobiana da quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina (Figura 3). Os dois estudos provaram atividade antimicrobiana nos polissacarídeos fúngicos estudados, aumentando sua versatilidade.

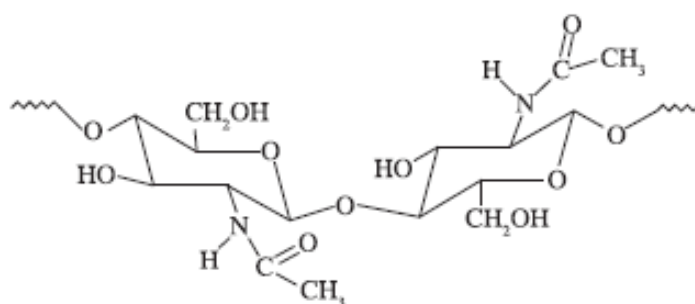


Figura 3- representação da molécula de quitina.

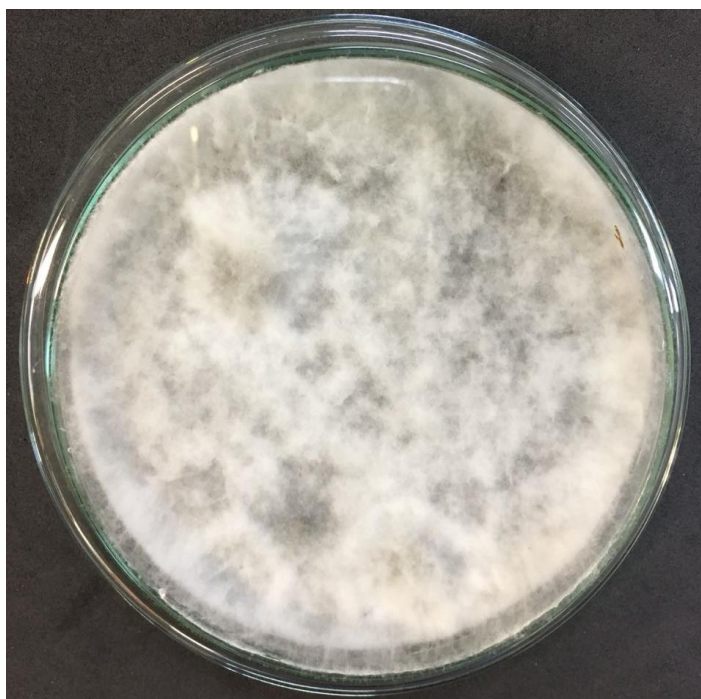
Fonte: GOY et al. (2009)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. BIOPRODUÇÃO DA LASIODIPLODANA E MODIFICAÇÃO POR SULFONAÇÃO.

#### 4.1.1 Cepa fúngica

O fungo utilizado no presente trabalho (*Lasiodiplodia theobromae* MMPI) foi isolado previamente da fruta tropical Pinha (*Annona squamosa*), e conservado em meio ágar sabouraud com cloranfenicol a 5 °C.



*Figura 4: fungo repicado crescido em placa com meio Ágar Sabouraud-cloranfenicol.*

*Fonte: autoria própria.*

#### 4.1.2 Preparo do inóculo

Uma porção do micélio fúngico foi inoculado em placas de Petri contendo meio Ágar sabouraud com cloranfenicol e incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 horas. Para o preparo do inóculo, uma alçada de micélio crescido na superfície das

placas foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Meio de Sais Minerais de Vogel (VOGEL, 1956) e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação de 150 rpm por 48 horas. O micélio fúngico foi isolado do caldo fermentado por centrifugação da pré-cultura e triturado em mixer de forma a produzir uma suspensão micelial homogênea. A suspensão micelial foi diluída em solução salina 0,9% de modo a ser obtidas leituras de absorção entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (CUNHA et al., 2012).

#### 4.1.3 Produção por cultivo submerso e recuperação da lasiodiplodana

A Lasiodiplodana foi produzida em cultivo submerso em incubadora de bancada (*shaker*). Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de um meio fermentativo composto por sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956), 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 15 mL de inóculo padronizado. As condições de cultivo foram as seguintes: 150 rpm, 28 °C e 72 horas de tempo de fermentação (CUNHA et al., 2012). Após fermentação os frascos foram submetidos a centrifugação para separação da biomassa do caldo fermentado em 1500 x g durante 15 min. O polissacarídeo lasiodiplodana foi isolado por precipitação com 3 volumes de etanol 95% (a 5 °C) por 24 horas. O precipitado obtido foi ressolubilizado em água destilada a 60 °C e posteriormente submetido a intensa diálise contra água destilada por aproximadamente cinco dias, com troca de água três vezes ao dia, como demonstrado na Figura 3. O material dialisado foi desidratado por liofilização e armazenado em condições adequadas (Figura 4). O produto resultante deste processo foi nomeado LAS-N para uso posterior nas análises e no processo de derivatização química.

A seguir é apresentado o fluxograma da produção:



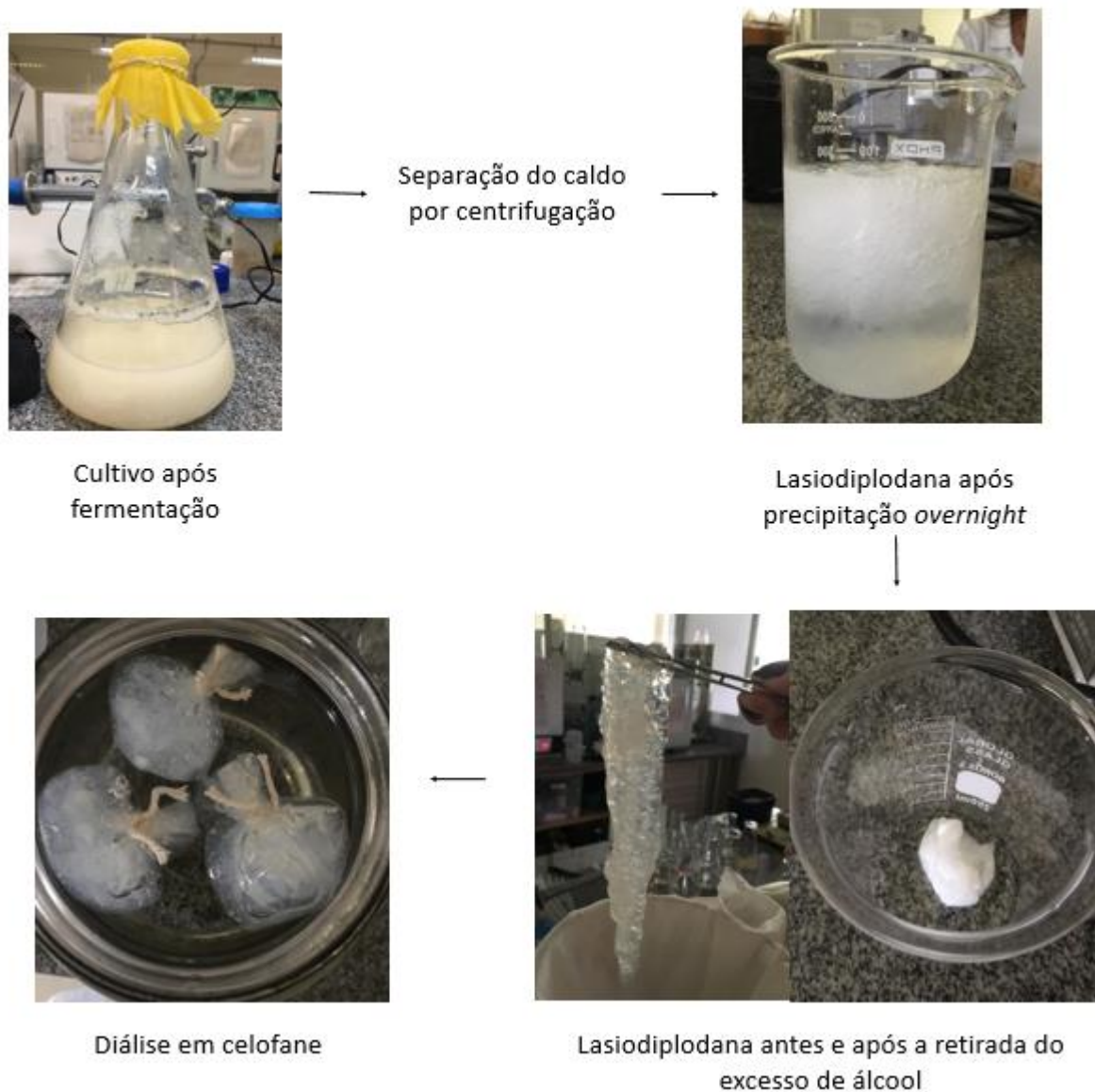


Figura 5: fluxograma de obtenção da *Lasiodiplodana* nativa.

Fonte: autoria própria.



*Figura 6: Lasiodiplodana nativa liofilizada.*

*Fonte: autoria própria.*

## 4.2 SULFONAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

### 4.2.1 Derivatização química

A derivatização do exopolissacarídeo foi realizada seguindo metodologia descrita por ZHANG et al. (2011), com adaptação. Inicialmente, 200 mg do EPS nativo liofilizado foi solubilizado em 40 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) em frasco de dois pescoços, sob intensa agitação por 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados, 40 mL de piridina, e, gota-a-gota, 16 mL do reagente sulfonante ácido clorossulfônico. A solução permaneceu sob agitação por 3 horas a temperatura de 60 °C. A solução foi resfriada e a sulfonação interrompeu-se pela neutralização do meio (pH entre 7 e 8) com adição de NaOH (15% m.v<sup>-1</sup>). A solução resultante foi extensivamente dialisada contra água destilada por aproximadamente seis dias, com

várias trocas de água. Por fim, o produto dialisado também foi submetido a liofilização e nomeado como LAS-S, como demonstrado na Figura 5.



*Figura 7: Lasiodiplodana sulfonada liofilizada.*

*Fonte: autoria própria.*

#### 4.2.2 Análise por Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho das amostras liofilizadas foram obtidos em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer®, EUA), na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 16 acumulações, usando a técnica de discos de brometo de potássio (KBr).

#### 4.2.3 Determinação do grau de sulfonação (DS)

Na determinação do grau de sulfonação, é considerada a média de grupos sulfonatos que são inseridos por unidade de monossacarídeo do polissacarídeo nativo. A amostra sulfonada foi analisada em um analisador elementar CHNS 2400

série II (DE MOURA NETO et al., 2011), onde o enxofre presente foi quantificado e o grau de sulfonação foi determinado pela equação descrita abaixo:

$$DS = \frac{(S\%/massa\ atômica\ do\ S)}{(C\%/massa\ atômica\ do\ C\ x\ 6)} \quad \therefore \quad DS = 2,25 \left( \frac{S\%}{C\%} \right)$$

Onde, S% e C% correspondem aos conteúdos percentuais de enxofre e de carbono presentes na amostra, e o número 6 corresponde aos grupos sulfonatos com potencial de adição nos carbonos de cada resíduo do monômero de glicose.

#### 4.2.4 Avaliação da solubilidade

Para avaliar a solubilidade das lasiodiplodanas nativas e sulfonadas foi utilizado o método utilizado por WANG et al. (2012), com adaptações. Em 10 mg da amostra foi adicionado 10 mL de água destilada sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente.

A solubilidade também foi testada frente ao DMSO (20%) para análise antimicrobiana e antioxidante. Posteriormente as soluções foram centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos. Foram quantificados os açúcares totais do sobrenadante resultante por método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al. 1956) para identificar a porção solúvel da amostra, que foi expressa em porcentagem de massa (GALEANE et al., 2017).

### 4.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada foram avaliadas pelos métodos do radical DPPH, íon férrico (FRAP) e com base no potencial de remoção de peróxido de hidrogênio. As amostras foram testadas utilizando como agente solubilizante DMSO 20% (v.v<sup>-1</sup>). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.3.1 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH•

A atividade de remoção de radicais DPPH• foi realizada seguindo metodologia descrita por Fenglin et al. (2004), com adaptações. Todos os ensaios, bem como o preparo dos reagentes, foram procedidos em ambiente protegido de luz.

Para realização das análises, foram preparados DPPH em 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, solubilizado em etanol puro. As amostras, assim como a glicose e o Trolox, que foram utilizados como controle, foram preparados em concentrações de 0,3, 0,5 e 0,71 mg mL<sup>-1</sup>.

Foram adicionados, em tubos de ensaio, 500 µL de amostra, 3 mL de etanol 80% e 300 µL de DPPH. Nos tubos controle, foram adicionados apenas 3,5 mL de etanol 80% e 300 µL de DPPH. Após duas horas, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm.

A porcentagem de atividade foi calculada pela seguinte equação:

$$\%AA = 100 - \frac{(A_{amostra} \times 100)}{A_{controle}}$$

Onde  $A_{amostra}$  é a média da absorção obtida para triplicatas de cada concentração das amostras, e  $A_{controle}$  é a média da absorção obtida para os tubos controle.

#### 4.3.2 Determinação da atividade antioxidante utilizando íon férrico (FRAP)

A análise de poder redutor do íon férrico foi realizada seguindo metodologia descrita por Rufino et al. (2006) e Wootton-Beard et al. (2011), onde o ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

Para o preparo da solução FRAP, foi adicionado 25 mL de tampão acetato de sódio (pH 3,6), TPTZ (10 mmol.L<sup>-1</sup>) solubilizado em HCl (40 mmol.L<sup>-1</sup>) e 2,5 mL de cloreto férrico 20 mmol.L<sup>-1</sup>. Esta solução foi aquecida a 37 °C por 15 minutos.

LAS-S, LAS-N, glicose e ácido ascórbico foram preparados nas concentrações de 0,3, 0,5 e 0,71 mg mL<sup>-1</sup>. Onde, 90 µL destas amostras foram adicionadas em tubos

de ensaio, 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Todos os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Para a construção da curva padrão (anexos), no lugar das alíquotas da amostra, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso 4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . As leituras de absorção foram realizadas a 595 nm, utilizando o reagente FRAP como branco.

#### 4.3.3 Capacidade de Remoção do Peróxido de Hidrogênio

Para determinação da atividade de remoção do peróxido de hidrogênio, foi adotada a metodologia descrita por Liu et al. (2010). Foi preparado um reagente contendo 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , recém preparado), 1 mL das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada em concentrações 0,3, 0,5, e 0,71  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0,1 mL de molibdato de amônio (3%  $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$ ), 10 mL de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), e 7 mL de KI (1,8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Foi procedida titulação da solução preparada com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), até desaparecimento de coloração amarelada. A atividade foi calculada segundo a equação:

$$\% \text{ Remoção de } \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{(v_0 - v_1)}{v_0} \times 100$$

Onde,  $V_0$  corresponde ao volume da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilizada para titular a mistura controle e  $V_1$  corresponde ao volume da titulação da mistura contendo a amostra.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi analisada através da avaliação da concentração mínima inibitória (MIC), de acordo com o procedimento empregado por Krichen et al. (2015), com modificações. As amostras do polissacarídeo nativo e modificado foram avaliadas contra duas estirpes bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) e *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (LM)), e duas estirpes Gram-negativas (*Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 0028 (ST) e *Escherichia coli* ATCC

25922 (EC)). A atividade antimicrobiana também foi avaliada contra as leveduras *Candida tropicalis* ATCC 13803 (CT) e *Candida albicans* ATCC 118804 (CA).

Em placas de Elisa, com 96 poços, contendo 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 10 µL de suspensão microbiana previamente padronizada na escala de McFarland de 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), foram adicionadas alíquotas da amostra (100 µL) diluídas em 20% DMSO em concentrações 0,3, 0,5 e 0,71 mg mL<sup>-1</sup>.

As placas foram incubadas a 37 °C (ensaio com bactérias) ou a 28 °C (ensaio com leveduras), todas por um período de pelo menos 17 horas. Após este tempo, 20 µL do reagente corante resazurina (0,01%) foram adicionados aos tubos para identificar organismos vivos viáveis, os quais foram verificados após duas horas de reação. As amostras que apresentaram resultados positivos de inibição foram transferidas para placas de Petri contendo ágar nutriente (bactérias) ou ágar-sabourad com cloranfenicol (leveduras) e posteriormente incubadas por pelo menos 17 horas em estufa bacteriológica a 37 °C, para as bactérias, e a 28 °C para as leveduras, para então verificação da atividade bactericida e fungicida. Como controle positivo bacteriano foi utilizada a tetraciclina, e para controle fúngico o fluconazol. Como controle negativo, solução salina (0,9%) e DMSO 20% para bactéria e levedura, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Espectro de Infravermelho

Os espectros de infravermelho obtidos das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada (LAS-N e LAS-S) pode ser observado na Figura 6:

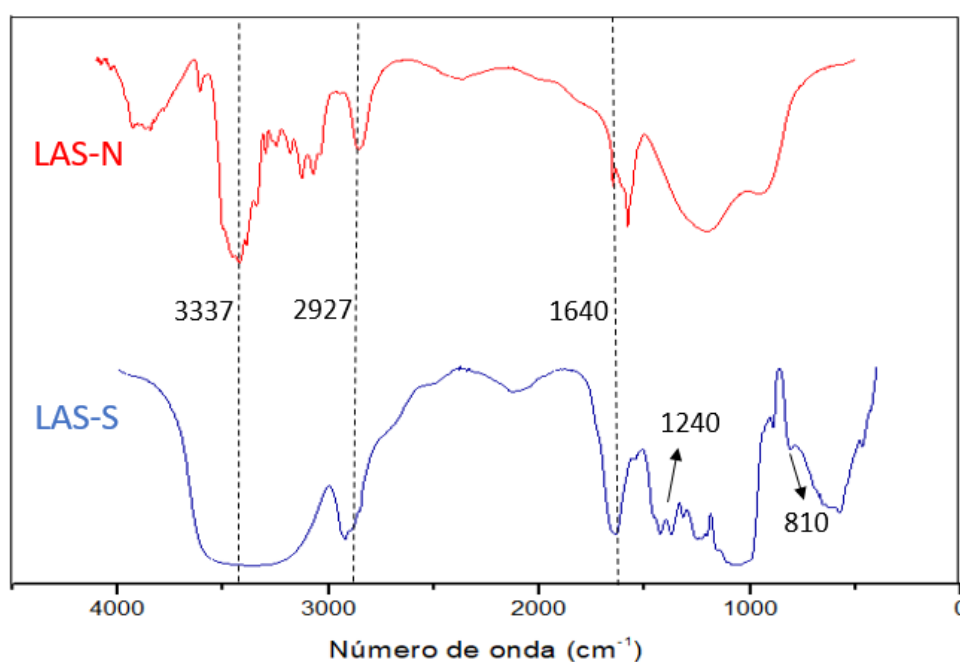


Figura 8- espectro de infravermelho da LAS-N e LAS-S.

As amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada apresentaram bandas em comum na região de  $3337\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes ao estiramento O-H. Em  $2927\text{ cm}^{-1}$ , ambas as amostras apresentaram banda correspondente a ligação C-H em hibridização  $sp^3$ . Na região de  $1640\text{ cm}^{-1}$  houve também a formação da banda típica de anel de glucose (WANG, ZHANG, 2009; VASCONCELOS et al., 2008).

Na amostra de lasiodiplodana sulfonada, houve a formação de banda na região correspondente a  $1240\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença da ligação de estiramento simétrico e assimétrico S=O. Na região de  $810\text{ cm}^{-1}$ , houve presença de banda correspondente a vibração simétrica C-O-S, assim confirmando a inserção dos grupamentos sulfonatos (C-O-SO<sub>3</sub>) na macromolécula (WANG, ZHANG, 2009; XU et al., 2009).



## 5.2 Grau de sulfonação

O grau de sulfonação da lasiodiplodana foi avaliado considerando o conteúdo de enxofre introduzido na macromolécula, o qual foi quantificado instrumentalmente por análise elementar, conforme descrito por Calegari et al., (2017).

O derivado sulfonado (LAS-S) apresentou grau de substituição (DS) de 0,17, o que significa uma média 0,17 grupos sulfonatos introduzidos em cada unidade de resíduo de glicose que compõe a lasiodiplodana. Considerando a possibilidade de substituição de até 3 grupos hidroxila por unidade de glicose (LUNA, 2016), a eficiência obtida no processo de derivatização foi de 5,67%.

Segundo estudos realizados por Zhang et al. (2011), o volume de reagente sulfonante, o tempo de reação e a temperatura em que a derivatização é conduzida influenciam na modificação do polissacarídeo. Afirma ainda, que o volume de reagente derivatizante empregado na reação tem maior influência do que a temperatura em relação ao grau de substituição obtido.

Tao et al. (2006) procedeu a sulfonação do polissacarídeo solúvel em água produzido pelo fungo *Pleurotus tuberregium*, empregando piridina como catalisador e ácido clorossulfônico como agente derivatizante na proporção de 2:1, similar a relação empregada neste trabalho. Nestas condições, o autor relata a obtenção de derivado com DS de 0,28, pouco superior ao obtido no presente estudo (DS 0,17).

Para a obtenção de derivados com maior grau de substituição, mudanças no protocolo de derivatização são necessários, como aumento na concentração do agente derivatizante, tempo e temperatura reacional e mudanças na relação catalisador: agente derivatizante.

## 5.3 Solubilidade

A solubilidade das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada liofilizadas foram avaliadas em água e no solvente orgânico DMSO foram avaliadas. Os resultados de solubilidade estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1- Solubilidade das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada.**

Amostra	Solubilidade (% , mg/100 mL)	
	Água	DMSO (20%)
LAS-N*	25	48
LAS-S**	57	59,3

\*Lasiodiplodana nativa

\*\*Lasiodiplodana sulfonada

Conforme pode ser identificado na tabela 1, a LAS-N apresentou baixa solubilidade em água (25 mg/100 mL). De fato,  $\beta$ -glucanas comumente apresentam pouca ou nenhuma solubilidade em água quando desidratadas. De acordo com estudos realizados por Bauermeister et al. (2010), classes de  $\beta$ -glucanas possuem baixa solubilidade em água, por seus grupos hidroxila interagirem entre si criando ligações intramoleculares e elevada viscosidade, o que dificulta a solvatação pela água.

A derivatização por sulfonação proporcionou um aumento de 128% na solubilidade da amostra em água (57 mg/100 mL). Segundo Xie et al. (2016), o aumento da solubilidade em água após derivatização por sulfonação é justificado pela inserção dos grupamentos sulfonatos na molécula, os quais interagem melhor com o solvente polar, criando ligações intermoleculares.

Ambas as amostras (LAS-N e LAS-S) apresentaram maior solubilidade em DMSO 20% (LAS-N 48%, LAS-S 58,3%), o que demonstra que a polaridade do solvente tem grande influência sobre a solubilidade de tais macromoléculas. Maior solubilidade de  $\beta$ -glucanas microbianas em DMSO foram reportadas por Sietsma, Wessels (1981). Tais autores descreveram que  $\beta$ -glucanas nativas originárias de microrganismos apresentaram melhor solubilidade em dimetilsulfóxido, por ser um solvente orgânico polar e poder induzir ligações intermoleculares com as hidroxilas presentes. A LAS-S também demonstrou melhor solubilidade em DMSO 20% devido a inserção de grupamentos polares (sulfonato), que afasta as hidroxilas restantes na molécula impedindo ligações intramoleculares, favorecendo a solubilidade pelo solvente mais polar.

Considerando a melhor solubilidade em DMSO 20%, as amostras submetidas às análises de atividade antioxidante e antimicrobiana foram solubilizadas em tal solvente.

#### 5.4 Atividade de captura do radical DPPH•

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical estável, de coloração violeta devido a deslocalização de um elétron, que impede a dimerização da molécula. Quando misturado com uma substância capaz de doar elétrons e assim reduzir o radical, ele perde sua coloração (MOLYNEUX et al., 2004).

Os resultados obtidos são demonstrados na Figura 6, a seguir:

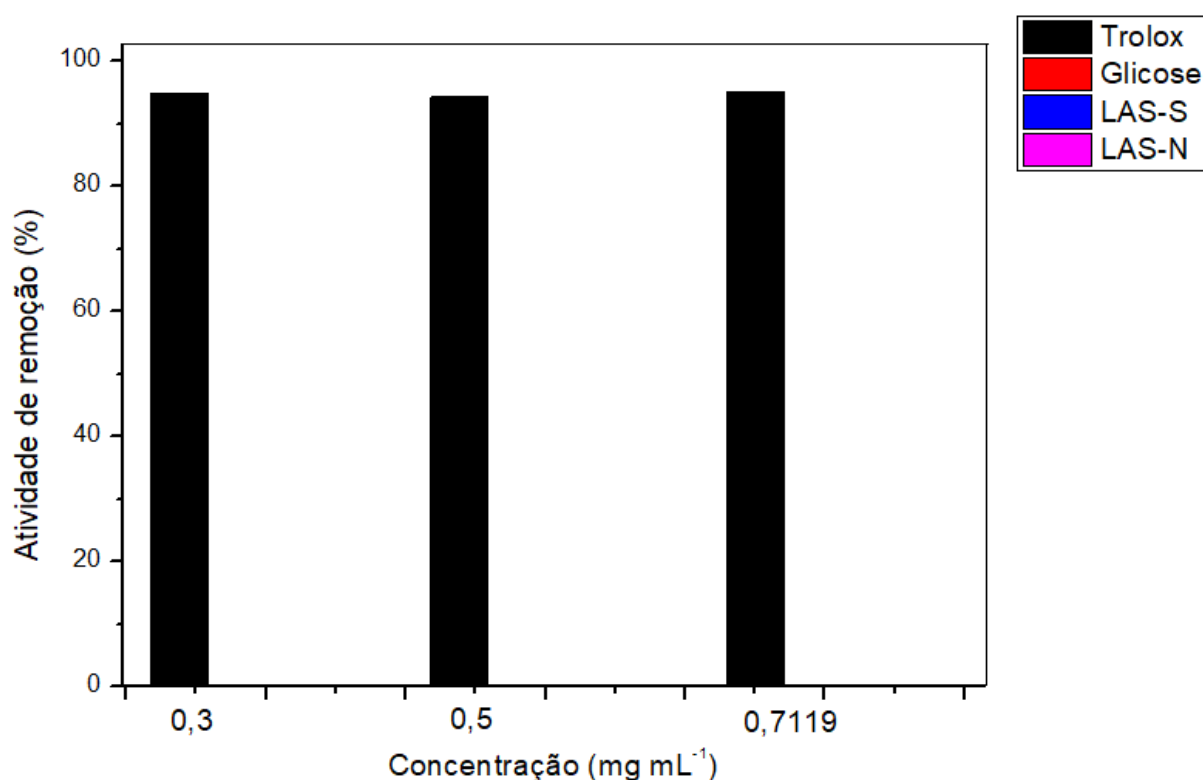


Figura 9: atividade de inibição do radical DPPH.

De acordo com a Figura 6, é possível verificar que a LAS-S e LAS-N não demonstraram capacidade de captura do radical DPPH nas concentrações estudadas. Da mesma forma a glicose, que é o monômero constituinte da lasiodiplodana, também não demonstrou atividade antioxidante contra o radical DPPH, em tais concentrações.

Segundo Somensi (2014), a inserção de grupamentos nas moléculas de  $\beta$ -glucanas poderia diminuir a capacidade de doação de hidrogênios para a estabilização do radical DPPH, diminuindo a quantidade de hidroxilas presentes, e como consequência diminuindo a disponibilidade de hidrogênios para serem doados, justificando a ausência de atividade da LAS-S.

Estudos realizados por Chen et al. (2014) com polissacarídeos extraídos do fungo *Ganoderma atrum*, mostraram que a atividade antioxidante de polissacarídeos está diretamente associada a concentração. Neste sentido, os resultados obtidos com a LAS-N podem ser justificados pela baixa concentração empregado no ensaio.

### 5.5 Poder redutor antioxidante do íon férrico (FRAP)

Segundo Pulido et al. (2000) e Huang et al. (2012), o método de avaliação do Poder Antioxidante de Redução do Ferro pelo método FRAP é uma das alternativas de estudo de poder antioxidante do ferro em fluídos biológicos e soluções aquosas, por método colorimétrico, onde há a formação de Fe (II)-tripiridiltriazina (coloração azul) a partir de Fe (III) incolor e antioxidantes doadores de elétrons, podendo quantificar a atividade por espectrofotômetro.

Seguindo protocolo presente no item 4.3.2, obteve-se os seguintes resultados, descritos na Figura 8:

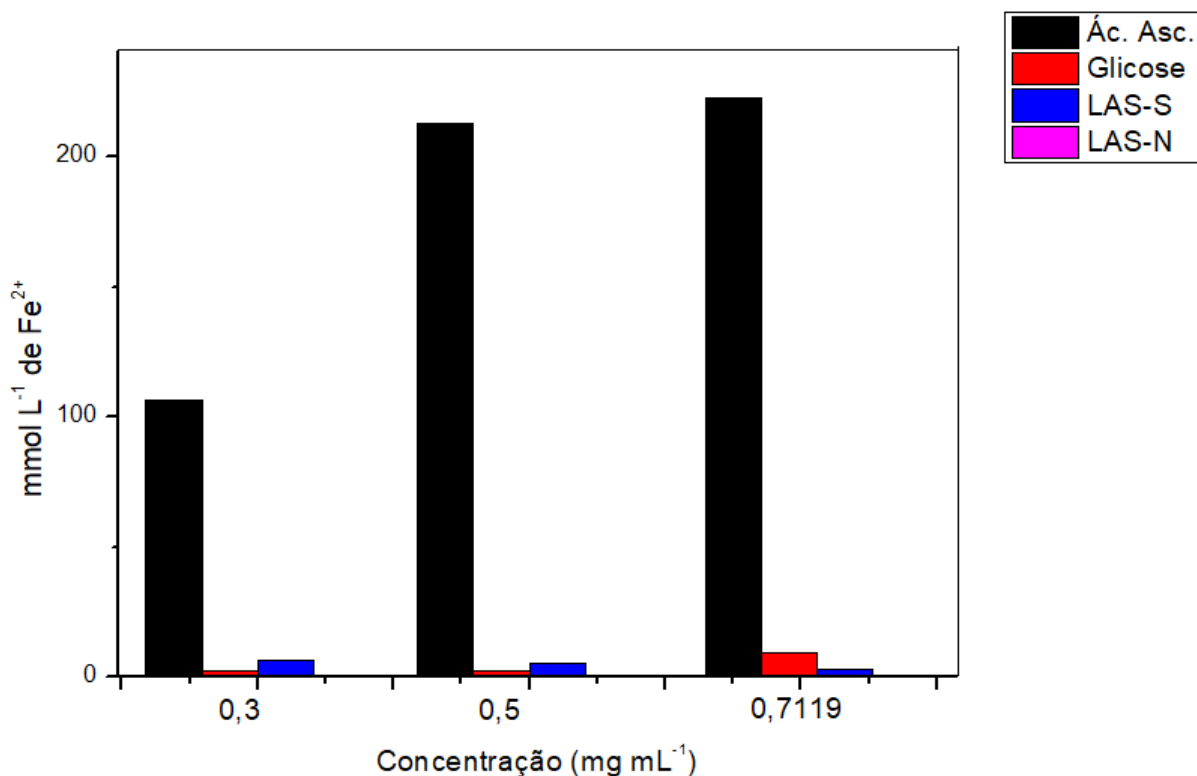


Figura 10: atividade de redução de  $Fe^{3+}$ .

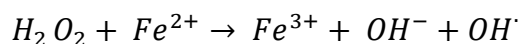
Os resultados apresentados são expressos em  $mmol L^{-1}$  de  $Fe^{2+}$  equivalentes por mL de amostra. O ácido ascórbico utilizado como controle positivo, apresentou grande atividade frente ao ferro.

Nestas concentrações LAS-N não apresentou atividade de redução do íon férrico. Resultado condizente com estudos realizados por Du, Xu (2014), onde foi avaliada a atividade antioxidante pelo método FRAP de  $\beta$ -glucanas de diversas origens, e glucanas oriundas de fungos apresentaram os menores valores de atividade, na ordem de  $1 \mu mol$  de  $Fe^{2+}$  por 100 gramas de amostra.

Os valores da atividade de LAS-S e glicose foram muito próximos, mas ainda de pouca relevância comparados aos valores obtidos pelo padrão antioxidante ácido ascórbico.

## 5.6 Capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio tem papel muito importante em diversas reações de manutenção fisiológica, porém em algumas reações pode produzir radicais mais reativos como a hidroxila ( $OH^\cdot$ ), podendo causar danos às células (COMHAIR, ERZURUM, 2002), como mostra a equação química:



A atividade de remoção de  $H_2O_2$  pela LAS-N e LAS-S foi procedida seguindo o protocolo descrito no item 4.3.3, onde a reação entre o iodeto de potássio e o peróxido de hidrogênio geram iodo, que dá a coloração amarelada à solução. Ao prosseguir a titulação com o tiosulfato de sódio, íons diotionato são gerados, e estes são incolores. Os resultados obtidos são observados na Figura 9:

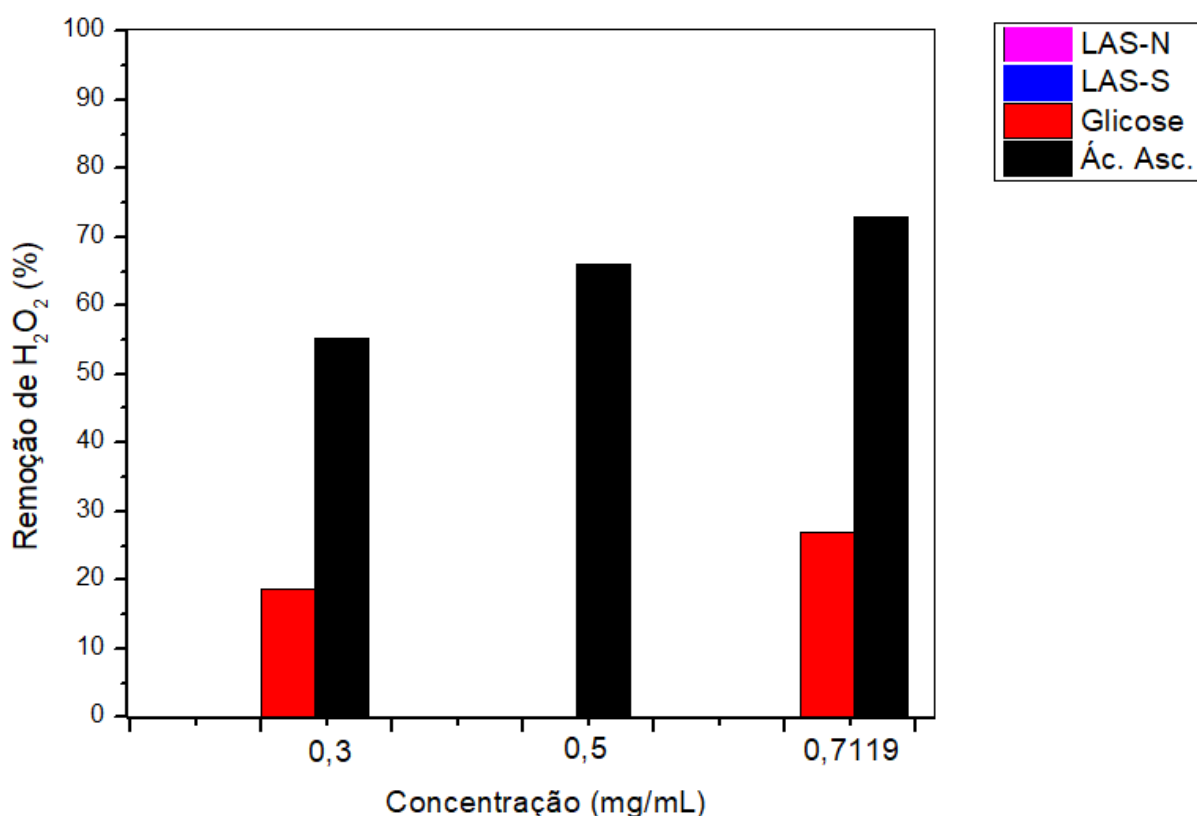


Figura 11: porcentagem de remoção de peróxido de hidrogênio.

Como verificado, as amostras LAS-N e LAS-S não apresentaram atividade frente ao peróxido. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, mostrou atividade considerável em todas as concentrações.

Fonseca et al. (2016), após isolar um fungo de casca de coqueiro e conduzir a produção de seu exopolissacarídeo por fermentação, observou atividade antioxidante de remoção de peróxido de hidrogênio dependente da concentração. Em 0,5 mg mL<sup>-1</sup> o EPS removeu apenas 1,66% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Em seus estudos, Gao et al. (2010) também conclui que a capacidade de remoção do peróxido por glucanas depende da concentração do EPS, e possui baixa capacidade quando comparada com o ácido ascórbico.

A atividade observada para a glicose, segundo estudos realizados por Saqib e Whitney (2011), deve-se ao grupamento aldeído existente na molécula e sua conformação em cadeia aberta. Açúcares monoméricos em soluções aquosas podem encontrar-se em equilíbrio entre suas cadeias abertas e fechadas, mas só atuam como açúcar redutor no formato de cadeia alifática.

Os resultados referentes ao potencial antioxidante obtidos no presente estudo sugerem que a sulfonação da macromolécula lasiodiplodana com baixo grau de substituição, não colabora para a potencialização de sua atividade antioxidante. De fato, em estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa foi verificado que lasiodiplodana com DS de 0,28 demonstrou atrativa capacidade antioxidante, quanto a capacidade de remoção do radical hidroxila, remoção de peróxido de hidrogênio e poder redutor (CALEGARI et al., 2017).

### 5.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da LAS-S e LAS-N foi avaliada seguindo protocolo descrito no item 4.4. Após adição do corante resazurina, poços contendo microrganismos vivos ficaram rosa, e onde houve inibição, ficaram azuis.

Nas placas onde houve a presença de poços azulados, o conteúdo foi assepticamente transferido para novas placas de Petri contendo ágar nutriente (para as bactérias) ou ágar-sabourad com cloranfenicol (para leveduras).

Os resultados obtidos são demonstrados nas imagens:

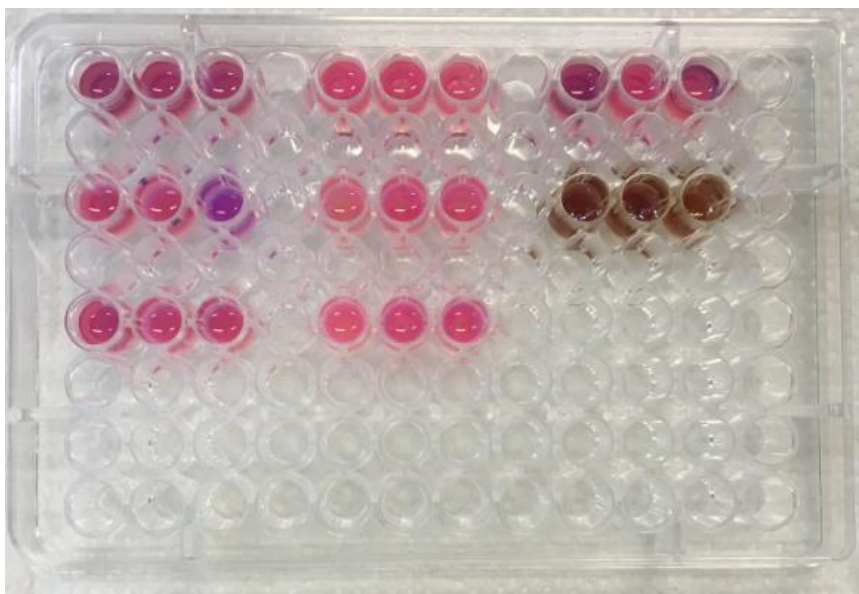


Figura 12: atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*.

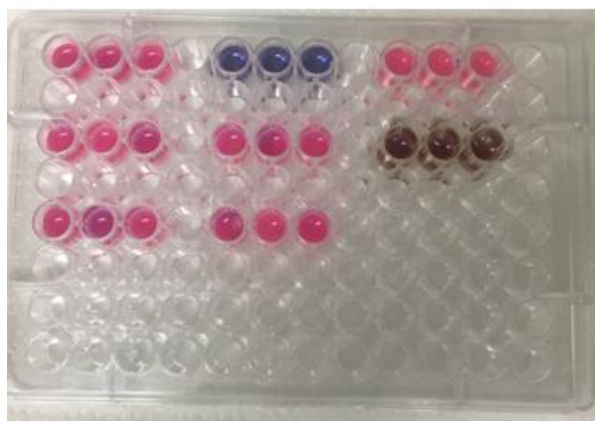
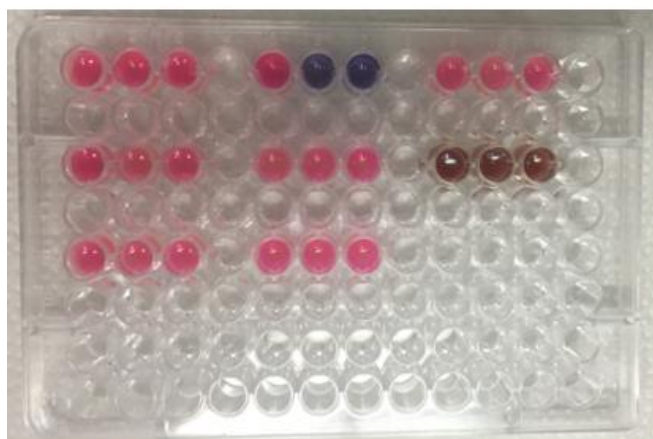
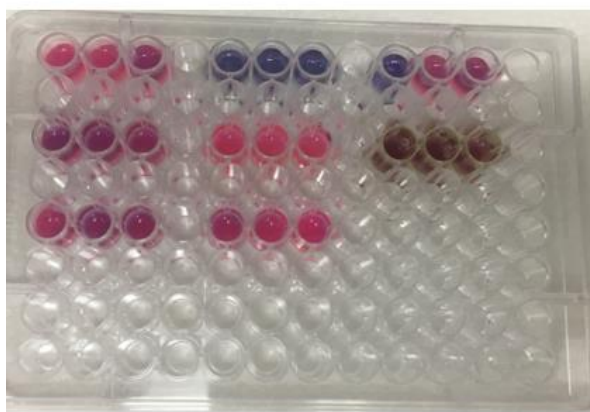


Figura 13: atividade antimicrobiana frente a *S. typhimurium*.





*Figura 14: atividade antimicrobiana frente a L. monocytogenes.*



*Figura 15: atividade antimicrobiana frente a E. Coli.*

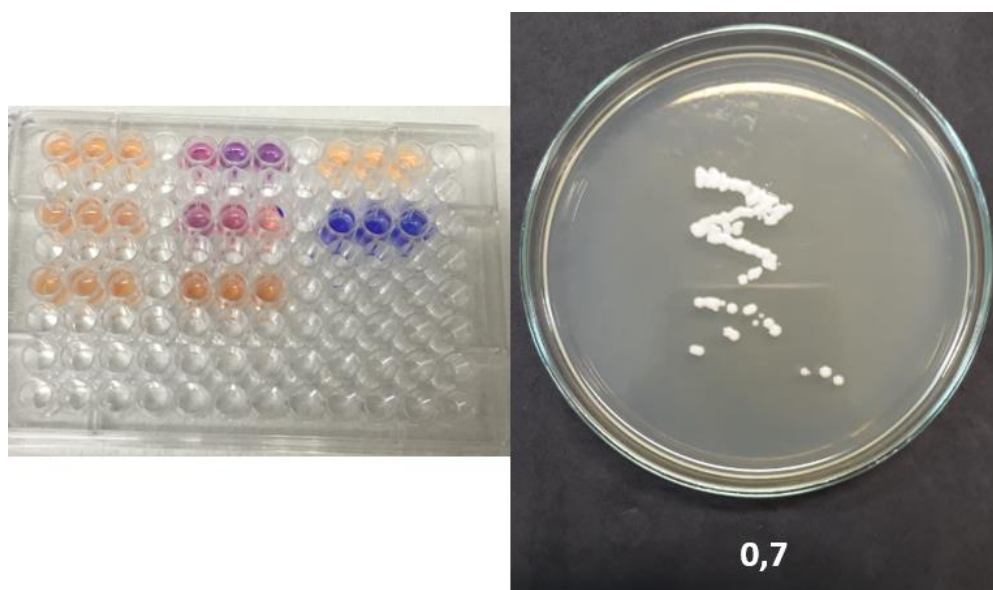


Figura 16: atividade antimicrobiana frente a *C. tropicalis*.

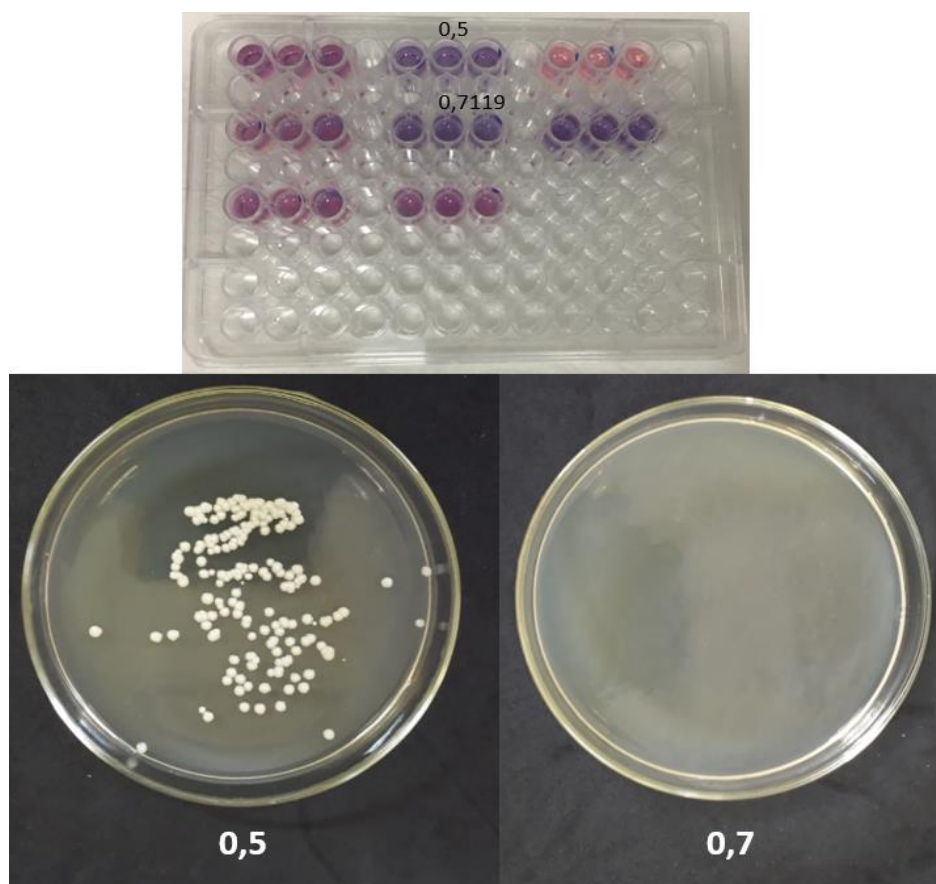


Figura 17: atividade antimicrobiana frente a *C. albicans*.

De acordo com os resultados, é possível verificar que não houve atividade inibitória nem biostática pela lasiodiplodana nativa (LAS-N) sobre os microrganismos estudados. Por outro lado, a sulfonação da macromolécula contribuiu para sua atividade antimicrobiana.

Conforme verificado na Figura 14, houve atividade de inibição da amostra LAS-S (sulfonada) contra a levedura *Candida albicans*, na concentração MIC 0,71 mg.mL<sup>-1</sup>.

Na placa de Elisa do microrganismo *Staphylococcus aureus* (SA), Figura 9, em todos os poços contendo amostras o microrganismo foi resistente, onde o corante apresentou coloração rosada. Ou seja, em todas as concentrações avaliadas, LAS-S e LAS-N não demonstraram efeito inibitório ou bacteriostático.

Nos ensaios com os microrganismos, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *E. Coli*, onde foram transferidos os conteúdos para placas de Petri novas, as amostras LAS-S na concentração de 0,71 mostrou efeito bacteriostático.

Da mesma forma, a lasiodiplodana sulfonada apresentou efeito fungistático na concentração 0,71 mg mL<sup>-1</sup> contra *C. Tropicalis* e na concentração 0,5 mg mL<sup>-1</sup> contra *C. albicans*.

Torello et al. (2010) avaliou a atividade da  $\beta$ -1,3-glucana nas concentrações de 150 e 300 mg/kg contra *Listeria monocytogenes*, em ensaios conduzidos durante 10 dias com ratos infectados. Os resultados obtidos demonstraram aumento de sobrevivência de 40%, protegendo os ratos de doses mortais do microrganismo. Por outro lado, doses de 50 mg/kg não demonstraram resultados.

Di Luzio, Williams (1978) demonstraram atividade protetora de uma glucana contra infecções secundárias em ratos leucêmicos, causadas por *Staphylococcus aureus*. A concentração utilizada no trabalho foi de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A administração intravenosa foi efetiva na modificação da morbidez e mortalidade dos ratos. Por este motivo, a profilaxia com glucanas se mostrou válida.

Huff et al. (2006) analisou a influência da alimentação com  $\beta$ -(1,3;1,6)-glucana em galinhas de corte contaminadas com *Escherichia coli*. As galinhas foram alimentadas com uma ração contendo 20 g ton<sup>-1</sup> de glucana purificada. Após 7 dias

não houve melhora significativa das taxas de mortalidade, mas aumentou o peso das galinhas, e melhorou a conversão de alimento em peso.

Contra a *Salmonella typhimurium*, Arellano-Reynoso et al. (2005) usou concentrações de 1 e 2 mmol.L<sup>-1</sup> de glucana derivada de microrganismo para modular a *S. typhimurium* em macrófagos. Com este estudo, observa-se que a glucana não inibe o microrganismo nestas concentrações.

A relação entre  $\beta$ -glucanas e *Candida albicans* foi relatada no trabalho escrito por Quintin et al. (2012) onde, em placas de 96 poços, foram colocados monócitos, células de *Candida* e glucana purificada, buscando avaliar a atividade fungicida e validar o conceito de imunidade treinada. Os autores observaram que monócitos pré incubados com  $\beta$ -glucanas aumentaram sua capacidade de inibição da levedura, observando ainda que a concentração de *Candida* e glucana influencia na capacidade de inibição do monócito.

Portanto, percebe-se a direta dependência das atividades de inibição ou estaticidade com a concentração da macromolécula estudada. Neste trabalho com a relativa baixa concentração da  $\beta$ -glucana, obteve-se apenas resultados nas maiores concentrações de LAS-S.

## 6 CONCLUSÃO

A metodologia de derivatização, empregando ácido clorossulfônico como agente derivatizante e piridina como catalisador possibilitou a obtenção de um derivado com baixo grau de substituição (DS 0,17).

As amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada apresentaram maior solubilidade em DMSO 20% do que em água. A derivatização por sulfonação promoveu aumento de solubilidade da lasiodiplodana tanto em DMSO (24%) quanto em água (128%).

Nas concentrações estudadas, tanto a lasiodiplodana nativa quanto a macromolécula sulfonada não apresentaram atividade antioxidante avaliada pelos métodos de captura do radical DPPH, FRAP e remoção do peróxido de hidrogênio.

A sulfonação promoveu a atividade antimicrobiana da molécula de lasiodiplodana. LAS-S na concentração de 0,71 mg mL<sup>-1</sup> apresentou efeito inibitório contra *Candida Albicans* ATCC 118804, efeito bacteriostático contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 0028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Apresentou efeito fungistático contra *Candida tropicalis* ATCC 13803. Na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> também apresentou efeito fungistático contra *C. Albicans*.

A sulfonação da lasiodiplodana, mesmo em condições de baixo grau de substituição, contribuiu para o aumento de solubilidade da macromolécula, bem como para sua atividade antimicrobiana. Estudos posteriores possivelmente mostrarão a potencialização tanto da atividade antimicrobiana quanto atividade antioxidante em derivados com elevados graus de sulfonação.

## REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G. O. et al., "Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal". **J. Food Sci. Technol.**, v. 35, p. 283-298, 1998. AMES, B. N. et al., "The causes and prevention of cancer". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U.S.A. v. 92, p. 5258-5265, 1995.
- AMES, B. N. et al., "Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U.S.A., v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- BARBOSA A. M. et al., "Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos," **Semin. Ciências Exatas e Tecnológicas**, vol. 25, no. 1, pp. 29–42, 2004.
- BAUERMEISTER, A. et al., "β-1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas," **Semin. Ciências Exatas e Tecnológicas**, vol. 31, no. 2, pp. 75–86, 2010.
- BŁASZCZYK, K. et al., "Impact of low and high molecular weight oat β-glucan on oxidative stress and antioxidant defense in spleen of rats with LPS induced enteritis". **Food Hydrocoll.** p. 51, 272–280, 2015.
- CALEGARI, G. C. et al., "Sulfonation of (1→6)-β-D-Glucan (Lasiodiplodan) and Its Antioxidant and Antimicrobial Potential," **J. Pharm. Pharmacol.**, vol. 5, no. 12, pp. 850–863, 2017.
- CHEN, J. et al. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice. **Life Sciences**, v. 78, n. 23, p. 2742-2748, 2006.
- CHEN, Y. et al. "Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities". **Food chemistry**, v. 156, p. 279–88, 2014. CHOROMANSKA, A. et al., "Anticancer properties of low molecular weight oat β-glucan—An in vitro study". **Int. J. Biol. Macromol.**, p. 80, 23–28, 2015.
- CHRISTEN, Y. "Oxidative stress and Alzheimer's disease". **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, n. 2, p. 621S-629S, 2000.
- CIPRIANO, A. K. A. L. et al. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Journal of Proteomics**, v.113, p. 90–109, 2015.

CORRADI, M. D. L. S. et al. "Caracterização química de glucanas fungicas e suas aplicações biotecnológicas," **Quim. Nova**, vol. 29, no. 1, pp. 85–92, 2006.

COMHAIR, S. A. A., ERZURUM, S. C. "Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases," **Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.**, vol. 283, no. 2, pp. L246–L255, 2002.

CUNHA, M. A. A. et al., "Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- $\beta$ -d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity," **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 39, no. 8, pp. 1179–1188, 2012.

CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. J. "Antimicrobial activity of flavonoids," **Int. J. Antimicrob. Agents**, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, 2005.

DE MOURA NETO, É. et al. "Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide". **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1953–1960, 2011.

DE SOUZA, D. M., GARCIA-CRUZ, C. H. "Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias". **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

DONOT, F. et al. "Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction," **Carbohydr. Polym.**, vol. 87, no. 2, pp. 951–962, 2012.

DU, B.; XU, B. "Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of  $\beta$ -glucans from different sources with various molecular weight". **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**, v. 3, n. 1, p. 11-16, 2014.

DUBOIS, M. et al. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo**. 2002. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FENGLIN, H. et al. "Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants". **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 14-23, 2004.

FERREIRA, I. C. F. R. et al., "Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities". **Phytochemistry**, v. 114, p. 38-55, 2015.

FONSECA, M. S. et al., "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE UM NOVO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR FUNGO FILAMENTOSO EM MEIO A BASE DE GLICOSE". **XI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, 2016.

FREEMAN, B. A., CRAPO J. D., "Biology of disease: free radicals and tissue injury". **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, 47(5), p. 412-426, 1982.

GALEANE, M. C. et al. "Phytochemical screening of *Azadirachta indica* A. Juss for antimicrobial activity". **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 4, p. 117–122, 2017.

GAO, T. et al., "Structure elucidation and antioxidant activity of a novel  $\alpha$ -(1→3),(1→4)-d-glucan from *Aconitum kusnezoffii* Reichb". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 85–90, 2010.

GIESE, E. C., et al. "Free-Radical Scavenging Properties and Antioxidant Activities of Botryosphaeran and Some Other B-D-Glucans." **International Journal of Biological Macromolecules**, vol 72, p. 125-30, 2015

GOY, R. C. et al., "A review of the antimicrobial activity of chitosan". **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T.. "Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*". **Carbohydrate Research**, Kidlington, v.281, p.143-154, 1996.

Huang, S.Q. et al., "Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 1183–1187, 2012.

JEU, L. et al., "Voriconazole". **Clin Ther**, vol. 25, p. 1321–81, 2003.

Jl, Y.-B. et al. Optimization of Synthesis of Seleno- *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. Polysaccharide by Response Surface Methodology, Its Characterization, and Antioxidant Activity. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

JINDAL, M. et al., "Sulfation of Aegle marmelos gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization" **Carbohydr. Polym**, vol 92, p.1660–1668, 2013.



JINU, M.V. et al., "Research Article In vitro antioxidant activity of cholestanol glucoside from an endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from *Saraca asoca*," **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, vol. 7, no. 1, pp. 952–960, 2015.

KAGIMURA, F. Y., et al. "Carboxymethylation of (1→6)- $\beta$ -Glucan (*Lasiodiplodan*): Preparation, Characterization and Antioxidant Evaluation." **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390-9, 2015a

KAGIMURA, F. Y. et al., "Biological activities of derivatized D-glucans: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 588–598, 2015b.

KAGIMURA, F. Y., "Production of the Exopolysaccharide *Lasiodiplodan* in a Stirred-Tank Bioreactor," **Synerg. scyentifica UTFPR**, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2015c.

KHOURY, D. E. et al., "Beta glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome," **J. Nutr. Metab.**, vol. 2012, 2012.

KRICHEN, F. et al.. "Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 283–289, 2015.

LEI, N. et al. "Effects of low molecular weight yeast  $\beta$ -glucan on antioxidant and immunological activities in mice". **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 21575–21590, 2015.

LAPASIN, R., PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides** – theory and applications. Gaithersburg: Aspen Publishers. 1999. 620p

LI, S., et al., "Sulfonation and Antioxidative Evaluation of Polysaccharide from *Pleurotus Mushroom* and *Streptococcus thermophilus* Bacteria: A Review." **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol 16, p. 282-94, 2017.

LIU, W.; WANG, H.; PANG, X.; YAO, W.; GAO, X. "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, n. 4, p. 451–7, 2010.

LU, Y. et al. "Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV". **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 180–186, 2008.

LUNA, W. N. S. “**Acetilação do exopolissacarídeo (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana): derivatização química e caracterização**”. 63 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MCCORD, J. M. “Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition”. **Food Technol.** v. 48, n. 3, p. 106-110, 1994.

MOLYNEUX, Philip et al. “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”. **Songklanakarín J. Sci. Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MUNIZ, C. R. et al. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. **Micron**, v. 42, n. 5, p. 419–428, 2011.

PAIVA, S.A.R., RUSSELL R.M., “Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants” **Journal of the American College of Nutrition**, 18(5), p. 426-433, 1999.

PEREIRA, A. L. et al., “Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*,” **Fitopatol. Bras.**, vol. 31, no. 6, pp. 572–578, 2006.

PETRI, D. F.S. “Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications.” **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, 2015.

PULIDO, R. et al., “Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay”. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RODRIGUES, R. “**Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., Agente causal das podridões de tronco e raízes da videira**”. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, 2003.

RUFINO, M. S. M. et al., “Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro- FRAP” **EMBRAPA, Comunicado Técnico online**, Fortaleza, 2006.

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. “Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars.” **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4748–4750, 2011.

SIETSMA, J. H.; WESSELS, J. G. H. "Solubility of (1-3)- $\beta$ -D/(1-6)- $\beta$ -D-glucan in fungal walls: Importance of presumed linkage between glucan and chitin". **Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 209-212, 1981.

SILVA, M. L. C. et al. "Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas". **Química Nova**, p. 85-92, 2006.

SOUZA, D. M., CRUZ C. H. G. "Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias," **Semin. Ciências Agrárias**, vol. 25, no. 4, pp. 331–340, 2004.

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

TAO, Y. et al., "Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides". *Carbohydrate Research*, v. 341, n. 13, p. 2261-2269, 2006.

TONELI, J. T. D. C. L. et al. "Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos," **Rev. Bras. Prod. Agroindustriais**, vol. 7, no. 1517–8595, pp. 181–204, 2005.

TORELLO, C. O. et al. "Immuno-hematopoietic modulation by oral  $\beta$ -1, 3-glucan in mice infected with *Listeria monocytogenes*". **International immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1573-1579, 2010.

TORRES, J. R. U., et al. "Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico". **Plant Dis**. 92:519-529, 2008.

TURMINA, J. A. et al., "Toxicological assessment of beta-(1- > 6)-glucan (lasiodiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage" **Molecules**, vol. 17, p. 14298-14309, 2012.

VAN ACKER, H. et al., "Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms". **Trends in microbiology**, v. 22, n. 6, p. 326-333, 2014.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. "Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$  6)-D-glucan (lasiodiplodan)". **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908-1914, 2013.

VASCONCELOS, A.F.D. et al. "Three exopolysaccharides of the B-(1,6)-d-glucan type and a B-(1,3;1,6)-d-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit". **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 14, p. 2481–2485, 2008.

VOGEL, H. J.. "A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N)". **Microbial Genetic Bulletings**, v. 13, p. 42–43, 1956.

WANG, J.; ZHANG, L. "Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a  $\beta$ -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*". **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 105–112, 2009.

WANG, L et al., "Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities". **Int J Biol Macromol** 44:211–4. 2009.

WANG, Y. et al. "Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1052–1056, 2012.

WANG, Z., et al., "Sulfated Polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* Reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in RAW264.7 Cells." **International Journal of Biological Macromolecules** vol. 80, p. 410-7, 2015.

WOOTTON-BEARD, P. C. et al., "Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and folin-Ciocalteu methods." **Food Research International**, v.44, n. 1, 217-224, 2011.

XIE, J.H. et al., "Sulfated modification: characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*". **Food Hydrocolloids** v. 53, p. 7–15, 2016.

XU, J. et al. "Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro". **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 227–234, 2009.

YANG, X. B. et al. "Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties in vitro". **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1725, n. 1, p. 120-127, 2005.

ZHANG, Y. et al. "Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives". **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1084–1090, 2011.

ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch, Weinheim**, v. 40, p. 44-50, 2006.

## ANEXOS

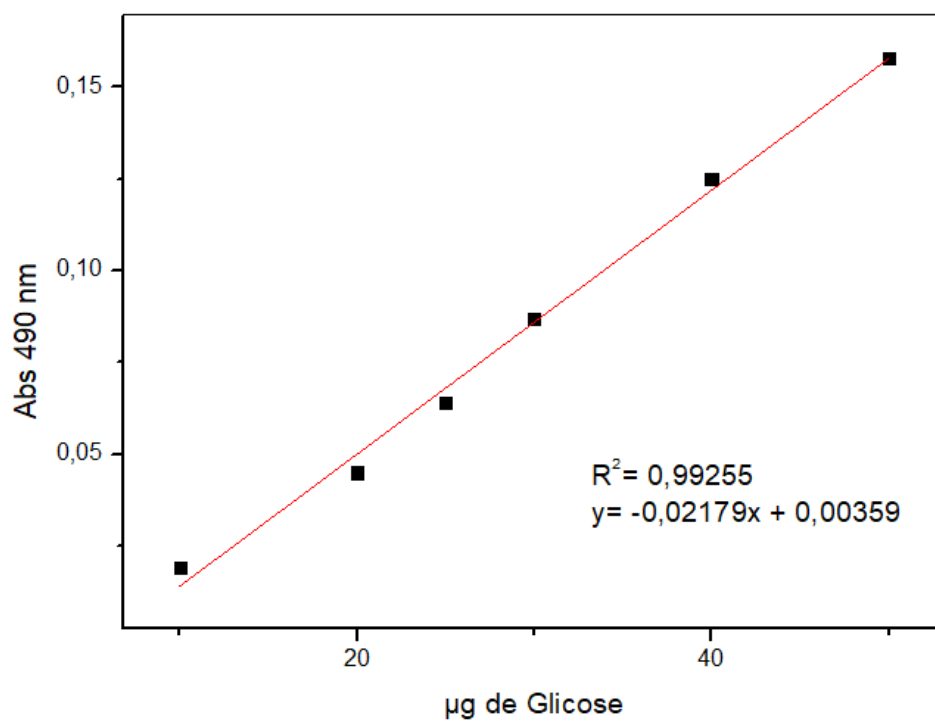


Figura 18: curva padrão de glicose (fenol-sulfúrico).

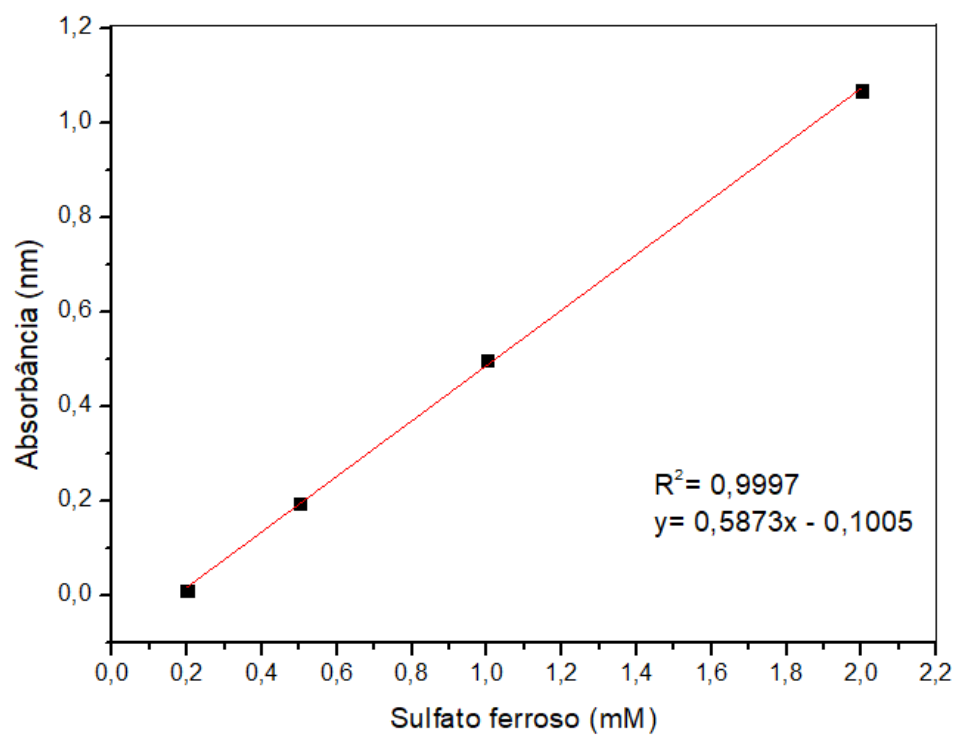


Figura 19: curva padrão de sulfato ferroso (FRAP).