

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

GABRIELLE CRISTINA CALEGARI

**LASIODIPLODANA (1→6)-β-D-GLUCANA: BIOPRODUÇÃO,
OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS DERIVATIZADAS POR SULFONAÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2016**

GABRIELLE CRISTINA CALEGARI

**LASIODIPLODANA (1→6)-β-D-GLUCANA: BIOPRODUÇÃO, OBTENÇÃO DE
MOLÉCULAS DERIVATIZADAS POR SULFONAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

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: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

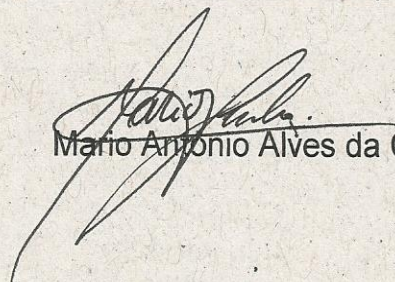
Co-orientadora: Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos

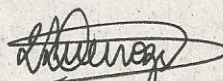
Pato Branco – PR
2016

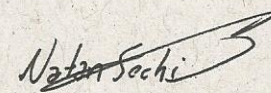
TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Lasiodiplodana (1-6)-B-D-Glucana: bioprodução, obtenção de moléculas derivadas por sulfonação e caracterização**, foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 15.2.2016 de 2016.

Fizeram parte da banca os professores.


Mario Antonio Alves da Cunha


Vidiany Aparecida Queiroz Santos


Natan da Silva Miranda Sechi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela força que me foi concedida nesta caminhada.

A minha família, meu pai Celso, minha mãe Izabel, e aos meus irmãos Matheus e Marcelle, por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem. Obrigada pela força, carinho, paciência e amor, ao lado de vocês esta caminhada tornou-se mais leve.

Agradeço as minhas amigas Jéssica e Marcieli, por compartilharem comigo, dia-a-dia, alegrias e também frustrações. A Giulia e a Larissa por estarem presentes em todos os momentos. A Aline por todo companheirismo e cumplicidade durante esses anos. A família Rondon e todos os meu amigos e amigas que de alguma forma participaram desta caminhada, tornando meus dias mais alegres e vivos, meu muito obrigada.

Aos meus colegas e amigos de laboratório de biotecnologia, que sempre me deram apoio, incentivo e que tornaram a rotina do laboratório, seja em dias da semana, noites, fins de semana e feriados mais agradáveis e felizes, Thaís, Michel, Natan e Otto.

A minha co-orientadora, amiga, e segunda mãe Dra. Vidianny, por tudo. Obrigada pelos ensinamentos, por sempre estar ao meu lado, por toda ajuda e orientação nesta caminhada. Obrigada pela palavra amiga e pelos ótimos momentos.

Ao meu orientador Dr. Mário por confiar a mim este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e orientações que foram, com certeza, fundamentais em minha formação acadêmica e profissional. Meu profundo agradecimento.

*“Os outros... Os que amaram sem pedir compensações,
os que não lhe exigiram nada e lhe deram tudo.”*

Olhai os lírios do campo

Érico Veríssimo

RESUMO

CALEGARI, Gabrielle Cristina. Lasiodiplodana (1→6)-β-D-glucana: Bioprodução, obtenção de moléculas derivatizadas por sulfonação e caracterização. 2016. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Polissacarídeos microbianos são macromoléculas cujo interesse industrial vem crescendo consideravelmente em função de suas propriedades biológicas e tecnológicas. Dentre estes, destacam-se as β-glucanas, as quais têm demonstrado diferentes funcionalidades biológicas, incluindo propriedades anticoagulantes, antioxidantes, antivirais e anticarcinogênicas. Além de apresentarem potencial no tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes e dislipidemias. Modificações químicas na estrutura primária destas macromoléculas têm demonstrado ser uma ferramenta importante na potencialização de suas funcionalidades biológicas, e dentre as modificações descritas na literatura científica tem-se a sulfonação, onde grupos sulfonato (S^+O_2OH) são inseridos em sua estrutura. Nesse contexto, no presente estudo a lasiodiplodana ((1→6)-β-D-glucana), produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, foi derivatizada por sulfonação. Esta modificação foi conduzida utilizando dimetilsulfóxido (Me_2SO) como solvente e piridina como catalisador. Os grupamentos sulfonato que substituem na molécula os grupos hidroxila, foram obtidos utilizando o ácido clorosulfônico como agente derivatizante. As condições de sulfonação levaram a obtenção de um derivado com grau de substituição de 0,24. Análises por FT-IR confirmaram a introdução de grupos sulfonato na estrutura primária da β-D-glucana, sendo verificado o surgimento de três bandas características nas faixas espectrais de 1186 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , as quais correspondem a vibração de estiramento simétrico e assimétrico (forte) S=O, respectivamente, e banda na região de 810 cm^{-1} , indicativa de vibração simétrica C-O-S, associado ao grupo C-O-SO₃. Microscopia eletrônica de varredura mostrou mudanças morfológicas na macroestrutura polimérica da lasiodiplodana após derivatização, com o surgimento de microfibrilas ao longo da estrutura, e a análise por DRX revelou o surgimento de regiões com certa organização molecular após derivatização, com surgimento picos em $11,64^\circ$, $19,63^\circ$, $29,15^\circ$ e $31,15^\circ$ em 2θ .

Palavras-chave: Derivatização. Exopolissacarídeo. Glucanas.

ABSTRACTS

CALEGARI, Gabrielle Cristina. Lasiodiplodia (1→6)-β-D-glucan – Bioproduction, obtaining molecules derived by sulfonation and characterization. 2016. 34 f. Final Work for the Undergraduation – Bachelor of Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2016.

Microbial polysaccharides are macromolecules whose industrial interest has grown considerably in terms of their biological and technological properties. Among these, there are the β-glucans, which have shown different biological features, including anticoagulant properties, antioxidant, antiviral and anticarcinogenic. In addition to presenting potential in the treatment of cardiovascular diseases, diabetes and dyslipidemias. Chemical modifications in the primary structure of these macromolecules have been shown to be an important tool in potentiation of their biological functions, and of the modifications described in the scientific literature has sulfonation where sulphonates groups (S^+O_2OH) are inserted in their structure. In this context, the present study Lasiodiplodia ((1→6)-β-D-glucan) produced by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI was derivatized by sulfonation. This modification was conducted using dimethyl sulfoxide as a solvent (Me_2SO) and pyridine as catalyst. The sulfonate groups that replace hydroxyl groups in the molecule, were obtained by derivatizing agent chlorosulfonic acid. The sulfonation conditions led to obtain a derivative with degree of substitution of 0,24. Analysis by FT-IR confirmed the introduction of sulfonate groups in the primary structure of the glucan, and verified the appearance three characteristic bands at wavelengths 1186 cm^{-1} and 1240 cm^{-1} , which correspond to symmetric stretching vibration and asymmetric (strong) $S=O$, respectively, and the band in the region of 810 cm^{-1} , indicative symmetric vibration $C-O-S$, associated with the group $C-O-SO_3$. Scanning electron microscopy showed morphological changes in the polymeric macrostructure of lasiodiplodana after derivatization, with the emergence of microfibrils along the structure and XRD analysis showed the appearance of regions with a certain molecular organization after derivatization with emergence peaks at $11,64^\circ$, $19,63^\circ$, $29,15^\circ$ e $31,15^\circ$ at 2θ .

Keywords: Derivatisation. Exopolysaccharide. Glucan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI cultivado em ágar <i>sabouraud</i> com cloranfenicol, evidenciando o abundante micélio aéreo.	13
Figura 2 - Exemplos de tipos de conformações das β -glucanas, (a) β -1,3, (b) β -1,4 e (c) β -1,6.	15
Figura 3 - Representação estrutural de β -glucanas modificadas por: (a) Acetilação, (b) Carboximetilação, (c) Fosforilação e (d) Sulfonação.	16
Figura 4 – Representação da estrutura primária da lasiodiplodana sulfonada.	17
Figura 5 - Representação da estrutura primária da lasiodiplodana derivatizada por sulfonação.	23
Figura 6 - Espectros de FT-IR da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e derivatizada por sulfonação (LAS-S).	25
Figura 7 - Micrografias da LAS-N (a, b) e LAS-S (c, d), em amplitudes de 200x e 400x.	26
Figura 8 – Difractogramas (DRX) da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e sulfonada (LAS-S).	27

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIações

BRM	Modificadores de Resposta Biológica
EPS	Exopolissacarídeo
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
VMSM	Meio de Sais Minerais de Vogel

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 FUNGO <i>LASIODIPLODIA THEOBROMAE</i>	13
3.2 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR FUNGOS	14
3.2.1 Glucanas	14
3.3 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS	15
3.4 SULFONAÇÃO.....	16
3.4.1 Métodos de caracterização de biopolímeros	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO LASIODIPLODANA.....	19
4.1.1 Cepa fúngica	19
4.1.2 Preparo do inóculo	19
4.1.3 Produção de lasiodiplodana em cultivo submerso e recuperação do exopolissacarídeo	19
4.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFONAÇÃO (DS).....	20
4.3 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	21
4.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	21
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	21
4.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	22
5 RESULTADOS E DICUSSÃO	23
5.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFONAÇÃO (LAS-S).....	23
5.2 SOLUBILIDADE DA LASIODIPLODANA NATIVA (LAS-N) E SULFONADA (LAS-S).....	24
5.3 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FT-IR	24
5.4 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ...	26
5.5 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	27
6 CONCLUSÕES	29
7 REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

O interesse comercial em polissacarídeos de origem biológica está associado a suas propriedades reológicas, bem como a efeitos benéficos à saúde humana, os quais tem sido descritos na literatura científica. Polissacarídeos com diferentes estruturas são produzidos por algumas bactérias, fungos filamentosos, além de serem extraídos de plantas, grãos de cereais, algas, cogumelos e leveduras (1).

Dentre os polissacarídeos que apresentam funções biológicas, destacam-se as β -glucanas fúngicas. Algumas β -glucanas são produzidas como exopolissacarídeos em cultivos submersos e apresentam atividades biológicas como ação anticoagulante, antioxidante, anticarcinogênico e hipocolesterolêmica, auxiliando ainda na redução de riscos cardiovasculares (2).

As funcionalidades biológicas e tecnológicas das β -glucanas podem ser potencializadas por modificações químicas na estrutura primária da macromolécula. Dentre as modificações existentes tem-se a sulfonação, onde grupos sulfonato (S^+O_2OH) são inseridos na estrutura, a fim de mudar e aperfeiçoar as propriedades biológicas da molécula.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção e caracterização da lasiodiplodana (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana sulfonada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção e caracterização de lasiodiplodana (1→6)- β -D-glucana derivatizada por sulfonação.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Produção biotecnológica de lasiodiplodana (1→6)- β -D-glucana;
- Recuperação e precipitação em etanol do biopolímero, seguido de purificação por diálise;
- Liofilização do biopolímero e modificação química por sulfonação;
- Avaliação do grau de substituição e solubilidade da molécula;
- Caracterização do biopolímero por espectroscopia de FT-IR, microscopia eletrônica de varredura e difratometria de raios-X.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGO *LASIODIPLODIA THEOBROMAE*

O *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo filamentososo pertencente à família *Botryosphaeriaceae*, gênero *Lasiodiplodia*, anteriormente designado como *Botryodiplodia theobromae* (3). Este fungo é a representação do estado assexuado do *Botryosphaeria rhodina* porém, são isolados diferentes e podem apresentar características variáveis quanto a coloração e velocidade de crescimento (2). O *L. theobromae* apresenta abundante micélio aéreo e a coloração das colônias, como demonstrado na figura 1, pode variar de branco à cinza e até negro, dependendo do substrato (4).

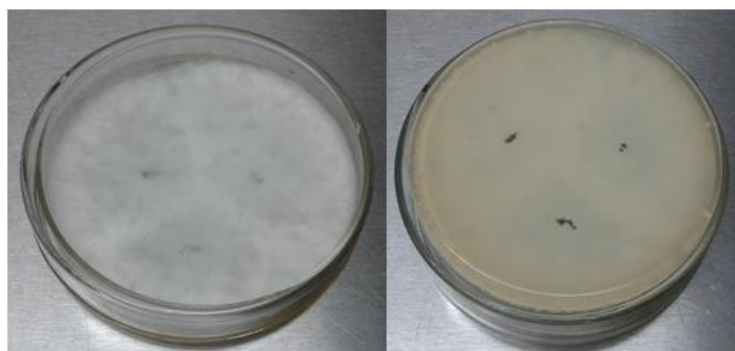


Figura 1 - Fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI cultivado em ágar *sabouraud* com cloranfenicol, evidenciando o abundante micélio aéreo.

Fonte: Autoria própria.

L. theobromae é um fitopatógeno típico das regiões tropicais e subtropicais, que causa sérios prejuízos a numerosas espécies vegetais cultivadas. Este fungo tem sido associado a manchas foliares, necrose, gomose e até mesmo a morte de plantas, incluindo herbáceas e plantas lenhosas. Estudos revelam que o *Lasiodiplodia theobromae* pode causar doenças em cajueiros (5), abacateiros (6) e flores como a *Rosa rugosa* (7). Menos frequentemente, também tem sido associado à micoses e pneumonia em humanos (3). Entretanto, o fungo tem se mostrado um eficiente produtor de (1→6)- β -D-glucana extracelular quanto cultivado em meio submerso (8).

3.2 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR FUNGOS

Polissacarídeos são polímeros constituídos de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas que podem diferir entre si na unidade monomérica, grau de ramificação, tipo de ligações e no comprimento de suas cadeias (2).

Além dos polissacarídeos oriundos de plantas, alguns microrganismos possuem a capacidade de sintetizar polissacarídeos com diferentes estruturas, como é o caso dos fungos *Poria cocos* (9), *Pleurotus tuber-regium* (10) e *Russula virescens* (11), dentre outros.

Há polissacarídeos que permanecem ligados à parede celular e os exopolissacarídeos (12), os quais são excretados para o meio extracelular (13). É interessante ressaltar que alguns fungos produzem diferentes exopolissacarídeos (EPS) e que uma mesma cepa é capaz de produzir EPSs com propriedades variadas. Um fator importante a ser considerado é que a composição do meio e as condições de cultivo interferem diretamente na produção dos exopolissacarídeos microbianos.

A produção de EPS por fungos filamentosos depende principalmente do tipo de cepa utilizada, bem como das condições de fermentação, tais como: composição do meio de cultivo; disponibilidade de oxigênio; pH do meio; temperatura (entre 22 °C e 30 °C); tempo de incubação; tipo e concentração da fonte de carbono (glucose, sacarose, maltose, entre outros); suplementação de nitrogênio (podendo ser fonte orgânica como peptona e inorgânica como sais de amônio); e fontes de fosfato (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (12).

3.2.1 Glucanas

As glucanas são polímeros de glicose geralmente encontrados nas paredes celulares de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) e de cereais, como aveia e cevada, ou ainda serem produzidas e excretadas para o meio de cultivo por algumas bactérias e fungos (8). Estas macromoléculas podem ser

classificadas de acordo com o tipo de ligação glicosídica, podendo apresentar configuração α ou β e estrutura linear ou ramificada (14).

As β -glucanas são constituídas de unidades repetidas de glicose em configuração β , unidas por diversos tipos de ligações glicosídicas, a depender da posição dos monômeros tais como: (1 \rightarrow 3); (1 \rightarrow 4); (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 6), representadas na figura 2 (8).

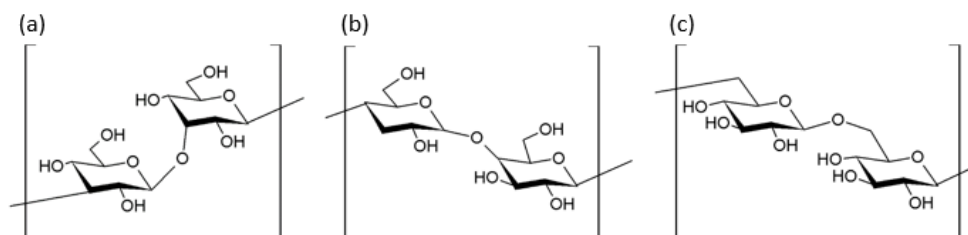


Figura 2 - Exemplos de tipos de conformações das β -glucanas, (a) β -1,3, (b) β -1,4 e (c) β -1,6.

Fonte: Autoria própria.

β -glucanas é a forma carboidrática predominante em fungos, nos quais atuam na manutenção da rigidez e integridade da parede celular (15). As β -glucanas têm ganhando importância no mercado mundial por apresentarem capacidade de atuar como modificadores de resposta biológica (BRM) (8), . Estas demonstram possuir importante atividade imunomoduladora e toxicológica (16), sendo eficazes no tratamento de infecções microbianas, diabetes e na redução de riscos cardiovasculares (17).

3.3 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS

A atividade biológica que as glucanas podem desempenhar está diretamente relacionada a sua estrutura molecular, incluindo a composição monomérica, a ligação glicosídica da cadeia principal, monossacarídeos que a compõe, o grau de ramificação, o grau de substituição e a conformação das principais cadeias. Por isso, modificações químicas de polissacarídeos, com a finalidade de sintetizar derivados com atributos funcionais desejáveis tem atraído cada vez mais atenção (16, 17, 18), além de expandir suas aplicações, aumentando também seu valor comercial.

Desta forma, modificações químicas vêm se tornando um meio eficiente para potencializar a capacidade de resposta biológica de biopolímeros, como as β -

glucanas. Nestas modificações são substituídos, na estrutura primária da macromolécula, grupos hidroxila por grupos funcionais, tais como: grupos sulfonato (S^+O_2OH) para sulfonação, grupos carboximetílicos ($+CH_2COOH$) para a carboximetilação, grupos fosfato ($(HO_2)POH^-$) para a fosforilação e grupos acetila (CH_3COO^-) para a acetilação. Tais modificações estão representadas na figura 3 (8).

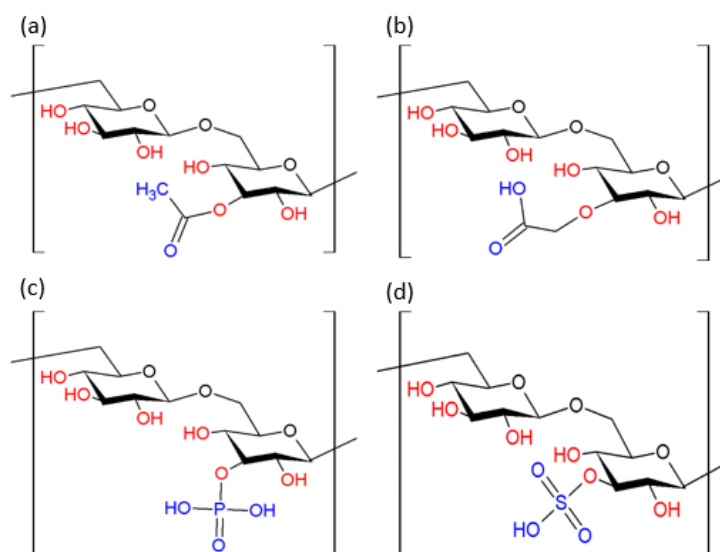


Figura 3 - Representação estrutural de β -glucanas modificadas por: (a) Acetilação, (b) Carboximetilação, (c) Fosforilação e (d) Sulfonação.

Fonte: Autoria própria.

Cada modificação tem a capacidade de melhorar algumas propriedades desses polissacarídeos. Em derivados carboximetilados por exemplo, tem sido reportada na literatura, o aumento da solubilidade, diminuição da viscosidade e aumento da atividade antioxidante (21). A fosforilação pode potencializar a capacidade de inibição de células tumorais (22); a acetilação pode promover aumento nas propriedades antioxidantes (23) e derivados sulfonados comumente apresentam grande capacidade anticoagulante (19, 13).

3.4 SULFONAÇÃO

As modificações na estrutura química das D-glucanas por sulfonação, podem contribuir para o melhoramento de suas propriedades biológicas como a atividade anticoagulante e antitrombótica (24).

A sulfonação consiste na substituição dos grupos hidroxila presentes nas unidades monoméricas de glicose por grupos sulfonato (S^+O_2OH). A Figura 4 representa a estrutura da (1→6)- β -D-glucana modificada por sulfonação.

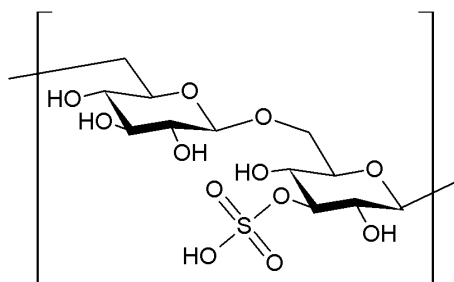


Figura 4 – Representação da estrutura primária da lasiodiplodana sulfonada.

Fonte: Autoria própria.

No ano de 1955, O'Neill apresentou em seu trabalho a relação entre a atividade anticoagulante e o grau de sulfonação em polissacarídeos. Além disso, mostrou que a alteração do grau de substituição pode ser realizada por meio de variações nas proporções do agente derivatizante utilizado, como por exemplo, o ácido clorossulfônico (25). A partir de então, muitos outros pesquisadores em todo mundo estudaram os efeitos da sulfonação sobre a atividade biológica de polissacarídeos.

Tong et al. (2010) avaliaram a atividade antiviral de α -glucanas sulfonadas sob a infecção do vírus da dengue sorotipo 2 (DV2). Tal resultado revelou que o modo de ação estudado exerceu efeito inibitório potente sobre DV2 (26). Já Mendes et al. (2009), e Vasconcelos et al. (2013) avaliaram o poder anticoagulante de β -glucanas sulfonadas, ambos apresentando resultados positivos em relação a esta atividade biológica (19, 13).

Zhang et al. (2016) realizaram estudos com polissacarídeos sulfonados oriundos de *Streptococcus thermophilus* e verificaram que derivados sulfonados com grau de substituição (DS) de 0,26, apresentaram atividades antimicrobianas contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium* (27).

Além disso, estudos desenvolvidos por Sun et al. (2009) avaliaram a atividade antitumoral de (1→3)- β -D-glucanas sulfonadas, oriundas da *Russula virescens*, com

diferentes graus de sulfonação. Tais estudos, demonstraram que a macromolécula nativa não apresentou atividade antitumoral, em contra partida, os derivados sulfonados tiveram tal atividade biológica melhorada (11).

3.4.1 Métodos de caracterização de biopolímeros

O potencial comercial e o interesse científico das modificações químicas sobre as glucanas têm feito com que pesquisadores desenvolvam investigações acerca das propriedades bioativas que tais moléculas adquirem após as derivatizações.

Chang et al. (2006) realizaram modificação por sulfonação em β -glucanas extraídas da parede celular de aveia e obtiveram grau de substituição de 0,68. Além disso, a confirmação da inserção de grupos sulfonato na molécula foi realizada por FT-IR por meio da identificação de bandas características. Outros métodos de caracterizações realizados foram a determinação da massa molecular da glucana sulfonada (68 kDa), viscosidade e solubilidade (diminuíram e aumentaram, respectivamente em comparação a glucana nativa), e atividade anticoagulante (28).

Vasconcelos et al. (2013) caracterizaram uma β -glucana derivatizada por sulfonação e avaliaram seu potencial anticoagulante. A estrutura da molécula sulfonada foi investigada por UV-VIS, FT-IR e ^{13}C RMN, além de serem avaliados o conteúdo de enxofre (11,73%) e grau de substituição (14).

Moura Neto et al. (2011) caracterizaram goma de cajueiro sulfonada. Realizaram análise por FT-IR, no qual houve a confirmação da sulfonação, determinaram a porcentagem de enxofre o grau de substituição (0,02, 0,24 e 0,88); além de analisarem tal molécula por RMN, TGA e viscosidade (29).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO LASIODIPLODANA

4.1.1 Cepa fúngica

No presente trabalho foi utilizado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado da fruta do conde (*Annona squamosa*). O fungo foi conservado em meio ágar *sabouraud* com cloranfenicol a 4 °C. Repiques do micélio fúngico foram feitos periodicamente para a manutenção da cultura.

4.1.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, o micélio fúngico foi transferido assepticamente para placas de Petri contendo ágar *sabouraud* com cloranfenicol. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica a 28 °C. Em seguida, o fungo foi repicado para frascos de *Erlenmeyer* contendo 100 mL de Meio de Sais Minerais de Vogel - VMSM (VOGEL, 1956) e 5 g.L⁻¹ de glicose. Estes frascos foram incubados a 28 °C sob agitação (150 rpm) por 48 horas, com a finalidade de adaptar o microrganismo ao meio de produção. Esta pré-cultura foi centrifugada de modo a recuperar o micélio fúngico e então os *pellets* foram homogenizados e ressuspensos em solução salina 0,9% (30).

4.1.3 Produção de lasiodiplodana em cultivo submerso e recuperação do exopolissacarídeo

A produção de lasiodiplodana foi realizada por meio de cultivo submerso em agitador orbital de bancada (*shaker*), utilizando frascos de *Erlenmeyer* com capacidade de 250 mL. O volume de trabalho utilizado foi de 150 mL e o meio de fermentação foi composto pelo meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956), 20 g.L⁻¹ de glicose e 15 mL de inóculo composto pelo micélio fúngico ressuspendido. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, a 28 °C por 72 horas (17).

Após o bioprocesso, o meio de cultivo foi separado da biomassa por centrifugação (1500 x g, 15 min.) e então a lasiodiplodana foi precipitada com 3

volumes de etanol resfriado a 4 °C (*overnight*). A lasiodiplodana precipitada foi ressolubilizada em água destilada até 60 °C, e então submetida à intensa diálise contra água destilada por aproximadamente cinco dias (com três trocas diárias de água). Por fim, o material dialisado foi desidratado por liofilização e nomeado como LAS-N. Para quantificação da lasiodiplodana produzida, amostra de EPS precipitado foi desidrata até massa constante a 50 °C em estufa com recirculação de ar.

4.1.4 Derivatização química por sulfonação

A derivatização do exopolissacarídeo foi realizada seguindo protocolos descritos por Wang e Zhang (2009) e Mendes et al. (2009) com adaptações. Inicialmente, 50 mg do EPS nativo liofilizado foi solubilizado em 10 mL de dimetilsulfóxido (Me₂SO) com o uso de agitação magnética intensa por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 mL de piridina e então a solução permaneceu sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Na sequência, 4 mL de ácido cloro sulfônico foram adicionados sobre a solução, gota a gota, mantida em banho de gelo por um período de 2 horas e então, a mistura foi armazenada a 4 °C por 15 horas. A sulfonação foi interrompida pela adição de água refrigerada (4 °C, 5 mL) e neutralizada com adição de NaHCO₃ (10% v.v⁻¹) até completa eliminação de CO₂. A solução resultante foi extensivamente dialisada contra água destilada por aproximadamente seis dias, com várias trocas de água (29, 19). Por fim, o produto dialisado foi submetido à liofilização. A amostra sulfonada seca foi nomeada como LAS-S.

4.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFONAÇÃO (DS)

Para a determinação do grau de sulfonação da LAS-S, foi utilizado protocolo descrito por Mendes et al. (2009) com adaptações. Amostras de lasiodiplodana sulfonada (1 mg) foram submetidas a hidrólise com HCl concentrado, em banho termostático a 100 °C por 10 minutos. Para determinar o DS, 0,2 mL da amostra hidrolisada foram adicionados em tubos de ensaio contendo 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA, 3% m.v⁻¹), e então 1,0 mL de solução protetora (NaCl 6 g, HCl conc. 0,5 mL, gelatina 0,1 % m.v⁻¹, 47 mL de água destilada) e 0,03 g de BaCl₂

foram adicionados. Após a mistura ser agitada por um minuto, esta foi deixada em repouso por 15 minutos. O sulfato de bário resultante foi quantificado por leitura espectrofotométrica à 420 nm (24). O DS que designa o número médio de grupos sulfonil em cada resíduo de açúcar foi estabelecido a partir do conteúdo de enxofre, tomando como base as equações 1 e 2, onde S = % enxofre:

$$S(\%) = \frac{BaSO_4(\mu g) * 0,1374 * 100}{amostra(\mu g)} \quad (1)$$

$$DS = \frac{162 * S}{3200 - 102 * S} \quad (2)$$

4.3 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Para avaliação da solubilidade em água, foi empregado o protocolo descrito por Wang et al (2012), com algumas adaptações. As amostras de lasiodiplodana (10 mg) foram suspensas em água destilada (10 mL) e agitadas por 24 horas à 25 °C (32). Em seguida, foram centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e foram quantificados açúcares totais, sendo este, diretamente relacionado com a quantidade de amostra solúvel. A solubilidade em água foi expressa em porcentagem de massa solúvel % do EPS solúvel (2).

4.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros de infravermelho das amostras de LAS-N e LAS-S foram obtidos em espectrômetro Frontier, Perkin Elmer® (USA) na faixa espectral compreendida entre 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹, número de acumulações de 16 varreduras para cada espectro, utilizando a técnica de disco de KBr.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de bancada (Hitachi, modelo TM3000, USA) a partir das amostras liofilizadas de LAS-N e LAS-S.

4.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Para obtenção dos difratogramas das amostras de lasiodiplodana nativa e sulfonada foi utilizado difratômetro MiniFlex600 (Rigaku, USA), com fonte de radiação de lâmpada de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$), corrente de 15 mA e tensão de 40 kV, ângulo de varredura de 10° a 60° (2θ), velocidade de $5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e passo de $0,02$ graus (2θ).

5 RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFONAÇÃO (LAS-S)

A LAS-S apresentou grau de substituição (DS) de 0,24, o que corresponde a 0,24 sítios substituídos a cada resíduo de glicose, em um total de três potenciais sítios de substituição existentes, em cada unidade monomérica presente na macromolécula, como representado na figura 5 (supondo uma substituição no carbono 3). Dessa forma, o grau de sulfonação obtido pelas condições reacionais empregadas corresponde a uma eficiência de 7,6%.

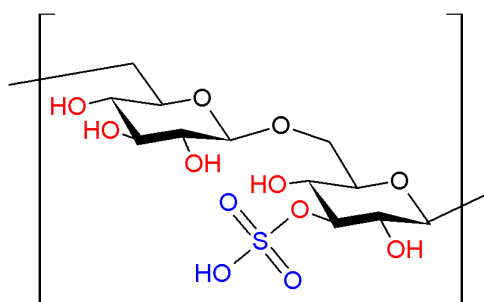


Figura 5 - Representação da estrutura primária da lasiodiplodana derivatizada por sulfonação.

Fonte: Autoria própria.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados por Zhang et al. (2016), os quais sugeriram que a sulfonação pode ser um eficaz método de modificação para melhorar a bioatividade de polissacarídeos (27). Os autores sulfonaram polissacarídeos oriundos de *Streptococcus thermophilus*, empregando dimetilformamida e complexo trióxido de piridina e obtiveram derivado com grau de substituição de 0,26.

Estudos desenvolvidos por Wang, Li e Chen, (2009) indicaram que variáveis como a proporção molar entre o agente derivatizante e o catalisador piridina, a temperatura e o tempo reacional influenciam diretamente no grau de substituição (33). Desta forma, derivatizados com maior DS poderiam ser obtidos através de protocolos de ressulfonação ou por modificações na proporção de agentes derivatizantes, como mencionado por Mendes et al. (2009) e Jindal et al. (2013), respectivamente (19,33).

5.2 SOLUBILIDADE DA LASIODIPLODANA NATIVA (LAS-N) E SULFONADA (LAS-S)

A inserção de heteroátomos na estrutura de polímeros alteram suas propriedades físico-químicas como, por exemplo, sua solubilidade. Neste estudo, a lasiodiplodana nativa (LAS-N), em temperatura de 25 °C apresentou solubilidade de 2,80%. Em contrapartida, após a sulfonação (LAS-S), a biomolécula apresentou solubilidade de 0,42%.

Este resultado pode estar associado ao baixo grau de substituição obtido na derivatização. A inserção de poucos grupos sulfonatos por unidade de glicose pode ter facilitado a formação de forças intramoleculares na macromolécula, dificultando dessa forma as interações de hidrogênio com a água. Tal comportamento poderia ser explicado pela possibilidade do oxigênio presente nas duplas ligações do grupo sulfonato, fazer interações de hidrogênio com hidrogênios presentes nas hidroxilas não substituídas do anel de glicose. De fato, considerando que a lasiodiplodana apresenta uma estrutura espacial na forma de tripa-helice (35), a ocorrência de diversas interações intramoleculares pode ser responsável pela formação de agregados macromoleculares, dificultando a solvatação da macromolécula.

Por outro lado, a introdução de um número maior de grupos S^+O_2OH na estrutura, poderia levar a uma maior solubilidade da molécula derivatizada. A presença de maior número de grupos sulfonatos, poderia possivelmente contribuir para o distanciamento das hidroxilas das macromoléculas em função do seu grande volume. A presença de maior número de grupos S^+O_2OH e o maior distanciamento intramolecular poderia levar ao surgimento de uma camada polar, o que favoreceria as interações de hidrogênio com a água, e conseqüentemente a solvatação.

5.3 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FT-IR

Os espectros da LAS-N e LAS-S estão apresentados na figura 6.

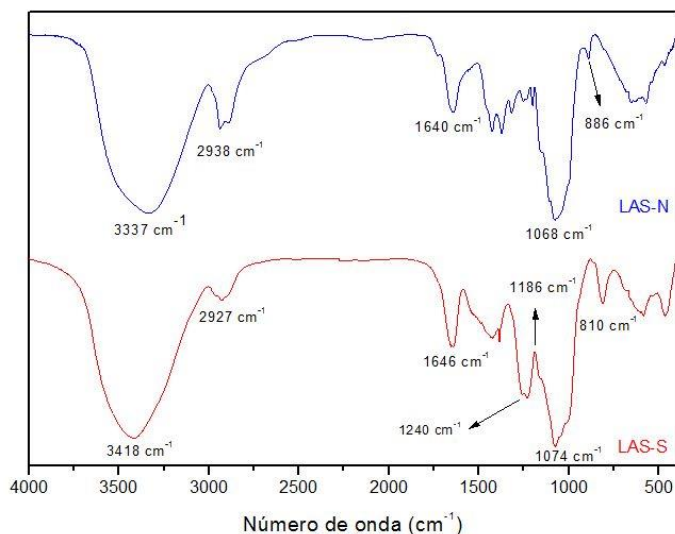


Figura 6 - Espectros de FT-IR da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e derivatizada por sulfonação (LAS-S).

Fonte: Autoria própria.

Os espectros de FT-IR das biomoléculas nativa e modificada apresentaram sinais típicos de polissacarídeos na região entre 4000 e 400 cm^{-1} . O espectro da amostra de lasiodiplodana nativa (LAS-N) apresentou bandas de absorção na região de 3337 cm^{-1} provenientes do estiramento O-H e na região de 2938 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento C-H. No espectro da amostra LAS-S foram observadas bandas de absorção da região de 3418 cm^{-1} e 2927 cm^{-1} , correspondentes a vibrações de estiramento O-H e C-H sp^3 , respectivamente (31, 34, 35).

As bandas de absorção verificadas em 1640 cm^{-1} (LAS-N) e 1646 cm^{-1} (LAS-S) foram atribuídas a vibração de estiramento do anel de glucose (38). Já as bandas nas regiões de 1425 a 1201 cm^{-1} indicam vibrações de deformação de CH e OH, típicas de carboidratos (36). Bandas de absorção forte em 1068 cm^{-1} (LAS-N) e 1074 cm^{-1} (LAS-S) correspondem a vibração de alongamento C-O do anel de piranose característico das glucanas (32, 37). A banda em 886 cm^{-1} no espectro da LAS-N foi atribuída à configuração característica do tipo β (29, 37).

Nos espectros da lasiodiplodana sulfonada, LAS-S, surgem bandas características nas faixas espectrais de 1186 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , as quais correspondem a vibração de estiramento simétrico e assimétrico (forte) S=O, respectivamente (13, 31). Bandas nas regiões 810 cm^{-1} são correspondentes a

vibração simétrica C-O-S, associado ao grupo C-O-SO₃, confirmando a derivatização por sulfonação (31, 38).

5.4 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Na figura 07 estão demonstradas as micrografias da LAS-N e LAS-S em amplitudes de 200x e 400x, nas quais é possível verificar diferenças morfológicas entre os biopolímeros nativo e modificado.

A amostra LAS-N apresentou macroestrutura na forma de filmes finos e translúcidos, com superfície irregular e regiões com presença de formações semelhantes a dobras e torções. A derivatização por sulfonação levou a mudanças morfológicas na macroestrutura do biopolímero, apresentando-se heterogênea, contendo estruturas fibrilares ao longo da superfície. O surgimento de fibrilas possivelmente está associado a diminuição nas interações de hidrogênio, uma vez que os grupamentos são inseridos em substituição de hidroxilas (41).

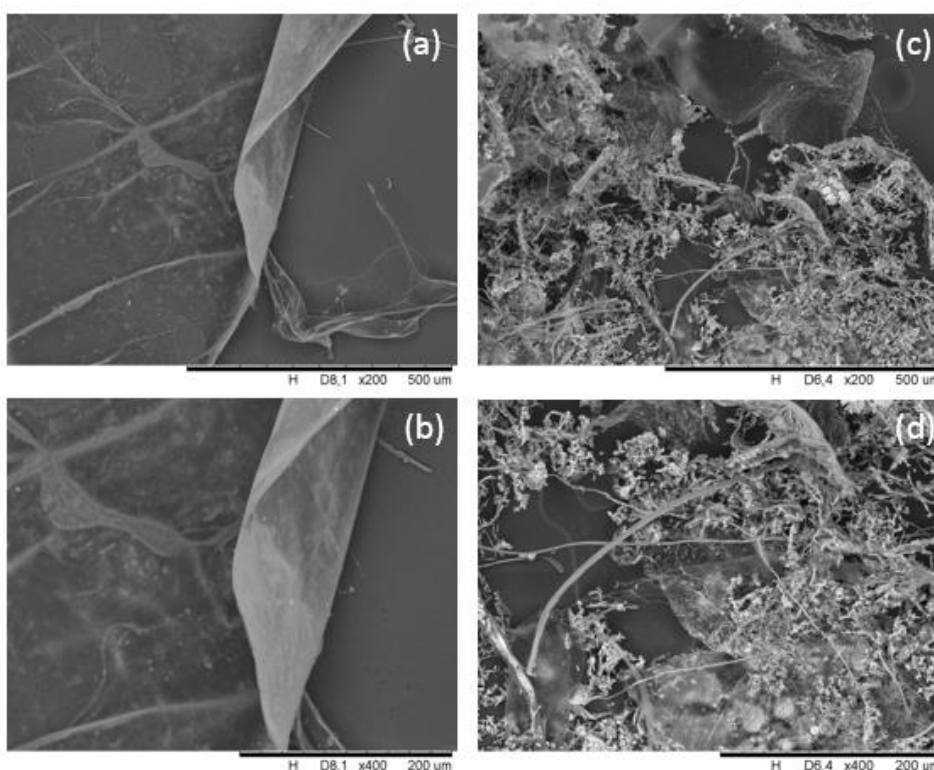


Figura 7 - Micrografias da LAS-N (a, b) e LAS-S (c, d), em amplitudes de 200x e 400x.

Fonte: Autoria própria.

Wang et al., (2015) demonstraram por meio da microscopia eletrônica de varredura que polissacarídeos oriundos de *Cyclocarya paliurus* e sulfonados pelo método ácido clorosulfônico-piridina, podem ter sua superfície modificada pela sulfonação, em função da utilização do ácido forte e temperatura utilizados (40).

5.5 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Na figura 8 estão apresentados os difratogramas das amostras de LAS-N e LAS-S.

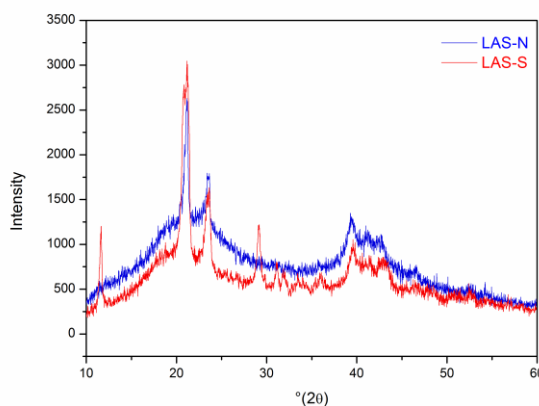


Figura 8 – Difratogramas (DRX) da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e sulfonada (LAS-S).

Fonte: Autoria própria.

Difratogramas de polissacarídeos comumente apresentam picos largos, característico de material amorfo (42). Tanto nas amostras LAS-N como LAS-S foram verificados picos mais estreitos, com valores próximos a 21,2°, 23,6°, 39,9° a 2θ . Tais picos indicam que a lasiodiplodana apresenta regiões com certa organização molecular em uma matriz amorfa. Na amostra sulfonada houve o aparecimento de quatro picos a 2θ com valores de 11,64°, 19,63°, 29,15° e 31,15°, sugerindo que a introdução de grupos sulfonatos na estrutura da β -glucana colaborou para o surgimento de regiões com maior organização molecular. Além disso, os picos pronunciados em 21 e 23,5° a 2θ tem sua intensidade aumentada após sulfonação, possivelmente devido a introdução de novos grupamentos na estrutura.

Possivelmente aumentando o grau de sulfonação da LAS-S, a organização molecular poderia aumentar também. Dessa forma, o aumento da cristalinidade da macromolécula sulfonada, poderia sugerir aplicações a este material, pois trata-se de um polímero que é capaz de formar filmes. Como por exemplo, filmes biodegradáveis ou bioadesivos ou ainda como filmes de liberação de fármacos.

6 CONCLUSÕES

O protocolo de derivação da lasiodiplodana por sulfonação mostrou-se efetivo, sendo obtida macromolécula sulfonada com grau de substituição de 0,24. A sulfonação não colaborou para o aumento da solubilidade da macromolécula, possivelmente em função do baixo grau de substituição obtido.

Análise por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier confirmou a introdução de grupos $\text{S}^+\text{O}_2\text{OH}$ na estrutura primária da macromolécula. Bandas características nas faixas espectrais de 1186 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} correspondentes a vibração de estiramento simétrico e estiramento assimétrico (forte) $\text{S}=\text{O}$, respectivamente. Bandas nas regiões 810 cm^{-1} referente a vibração simétrica $\text{C}-\text{O}-\text{S}$, associado ao grupo $\text{C}-\text{O}-\text{SO}_3$ confirmaram a sulfonação.

Microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a sulfonação promoveu mudanças morfológicas na macroestrutura polimérica da lasiodiplodana, com o surgimento de microfibrilas ao longo da estrutura da LAS-S.

Análise por difração de raios-X indicou que a introdução de grupos sulfonato na estrutura da β -glucana, colaborou para o surgimento de regiões com certa organização molecular, verificada através do aparecimento de picos a 2θ com valores de $11,6^\circ$, $19,6^\circ$, $29,2^\circ$ e $31,2^\circ$.

Estudos voltados para a avaliação das potenciais propriedades bioativas da lasiodiplodana sulfonada são necessários a fim de verificar as possíveis aplicações biomédicas e tecnológicas da biomolécula.

7 REFERÊNCIAS

- 1 LAROCHE, C.; MICHAUD, P. New developments and prospective applications for β (1,3) glucans. **Recent patents on biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 59–73, 2007.
- 2 SOMENSI, F.Y.K. Bioprodução de β -(1→6)-D-glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.
- 3 MUNIZ, C.R.; FREIRE, F.C.O.; et al. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. **Micron**, v. 42, n. 5, p. 419–428, 2011.
- 4 RODRIGUES, R. Caracterização morfológica e patológica de *lasiodiplodia theobromae* (pat.) griffon & maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira. 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2003.
- 5 CIPRIANO, A.K.A.L.; GONDIM, D.M.F.; 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.
- 6 MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H.S.; et al. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 2, p. 341–349, 2007.
- 7 CHEN, S.; LI, G.; et al. Characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* from *Rosa rugosa* in South China. **Crop Protection**, v. 79, n. 2016, p. 51–55, 2016.
- 8 KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; et al. Carboxymethylation of (1 → 6)- β -glucan (*lasiodiplodan*): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015.
- 9 HUANG, Q.; ZHANG, L.; et al. Evaluation of sulfated α -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 337–344, 2006.
- 10 ZHANG, M.; ZHANG, L.; et al. Chain conformation of sulfated derivatives of β -glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n.

24, p. 2863–2870, 2003.

11 SUN, Z.; HE, Y.; et al. Sulfation of (1,3)-b-D-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 628–633, 2009.

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

13 SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41–46, 1998.

14 VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R.F.H.; et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1→6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–1914, 2013.

15 Lourdes Corradi Da Silva, M. De; Martinez, P.F.; et al. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE GLUCANAS FÚNGICAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, 2006.

16 WENG, B.B.C.; LIN, Y.C.; et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 910–916, 2011.

17 CUNHA, M. A. A.; TURMINA, J.A.; et al. 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, n. 8, p. 1179–1188, 2012.

18 MA, L.; CHEN, H.; et al. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 371–378, 2012.

19 TAO, Y.; ZHANG, Y.; et al. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 2, p. 109–115, 2009.

20 WANG, J.; GUO, H.; et al. Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 897–905, 2010.

- 21 CHEN, S.; CHEN, H.; et al. Chemical modification, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 428–437, 2013.
- 22 YE, M.; YUAN, R.Y.; et al. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Lachnum YM120*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 690–694, 2013.
- 23 ZHANG, Z.; WANG, X.; et al. O-acetylation of low-molecular-weight polysaccharide from *Enteromorpha linza* with antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, n. October 2011, p. 39–45, 2014.
- 24 MENDES, S.F.; SANTOS, O. dos; et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 305–309, 2009.
- 25 O'NEILL, A.N. Sulphated derivatives of laminarin. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 1097–1101, 1955.
- 26 TONG, X.K.; QIU, H.; et al. WSS45, a sulfated α -D-glucan, strongly interferes with Dengue 2 virus infection in vitro. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 5, p. 585–592, 2010.
- 27 ZHANG, J.; CAO, Y.; et al. Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer from *Streptococcus thermophilus* GST-6. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 368–375, 2016.
- 28 CHANG, Y.J.; LEE, S.; et al. Structural and biological characterization of sulfated-derivatized oat β -glucan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3815–3818, 2006.
- 29 MOURA NETO, É. DE; S. MACIEL, J. DA; 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.
- 30 KAGIMURA, F.Y.; CUNHA, M.A.A. da; et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, n. 2015, p. 588–598, 2014.

- 31 WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 105–112, 2009.
- 32 WANG, Y.; MO, Q.; 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.
- 33 WANG, L.; LI, X.; et al. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 2, p. 211–214, 2009.
- 34 JINDAL, M.; RANA, V.; et al. Sulfation of Aegle marmelos gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1660–1668, 2013.
- 35 VASCONCELOS, A.F.D.; MONTEIRO, N.K.; 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.
- 36 ALZORQI, I.; SUDHEER, S.; et al. Ultrasonically extracted β - D - glucan from artificially cultivated mushroom , characteristic properties and antioxidant activity. **ULTRASONICS SONOCHEMISTRY**, p. 3–5, 2016.
- 37 LI, S.; SHAH, N.P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food Chemistry**, v. 165, p. 262–270, 2014.
- 38 XU, J.; LIU, W.; 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.
- 39 LIMIN, H.; ZHICUN, S.; et al. Characterization and antioxidant activities of extracellular and intracellular polysaccharides from *Fomitopsis pinicola*. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 54–59, 2016.
- 40 WANG, Z.; XIE, J.; et al. Sulfated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* reduce H₂O₂-induced oxidative stress in RAW264.7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, n. 2015, p. 410–417, 2015.

41 Wang, Y.J.; Yao, S.J.; et al. A novel process for preparation of (1,3)-B-D-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 1, p. 93–99, 2005.

42 VEVERKA, M.; DUBAJ, T.; et al. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: Synthesis, characterization, and stability. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 309–318, 2014.