



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



**WILLIAM NORBEY SÁNCHEZ LUNA**

**ACETILAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO (1→6)- β-D-GLUCANA  
(LASIODIPLODANA): DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PATO BRANCO  
2016**

WILLIAM NORBEY SÁNCHEZ LUNA

**ACETILAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO (1→6)- β-D-GLUCANA  
(LASIODIPLODANA): DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO**

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

Orientador: Dr. Mário Antônio A. da Cunha

PATO BRANCO  
2016

S211a Sánchez Luna, William Norbey.  
Acetilação do exopolissacarídeo (1 $\rightarrow$ 6)-  $\beta$ -D-glucana (Iasiodiplodana):  
derivatização química e caracterização / William Norbey Sánchez Luna. -- 2016.  
64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e  
Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2016.  
Bibliografia: f. 56 – 61.

1. Antioxidantes. 2. Biopolímeros. 3. Polissacarídeos. 4. Modificação química.  
I. Cunha, Mário Antônio Alves da, orient. II. Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos  
Químicos e Bioquímicos. III. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

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



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



## **TERMO DE APROVAÇÃO Nº 47**

### **Título da Dissertação**

**“ACETILAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO (1→6)-β-D-GLUCANA  
(LASIODIPLODANA): DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO”**

### **Autor**

**William Norbey Sanchez Luna**

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas e 30 minutos do dia 31 de maio de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. O autor foi arguido pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha  
UTFPR/PB  
Presidente

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira  
UTFPR/PB  
Examinadora

Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti  
UNICENTRO  
Examinador

Profa. Dra. Patricia Teixeira Marques  
UTFPR/PB  
Examinadora

Visto da Coordenação

**Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz**

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

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

*Dedico este trabalho a meu país (Colômbia), a meus pais e a Sandra, minha esposa.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Sandra, minha esposa, pelas suas contribuições tanto intelectuais como anímicas no dia a dia. Aos meus pais, pela presença constante mesmo distantes.

Agradeço ao professor Mário A. A. Cunha pela ajuda e orientação constante no desenvolvimento do projeto e o interesse por procurar o melhor para seus alunos. À professora Sirlei pela colaboração e auxílio em dúvidas teóricas e analíticas.

Ao CNPq pela bolsa concedida e ao Programa Estudante Convênio Pós-graduação PEC-PG.

À UTFPR Câmpus Pato Branco, especificamente ao corpo docente e administrativo do programa PPGTP, pela oportunidade de estudar nesta instituição.

Ao Brasil, uma nação que inspira liberdade e sentimento.

## RESUMO

SÁNCHEZ, William. Acetilação do exopolissacarídeo (1→6)-β-D-Glucana (Lasiodiplodana): derivatização química e caracterização. 2016. 79 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

A lasiodiplodana é uma β-glucana exocelular que apresenta funcionalidades biológicas como atividade antioxidante, antiproliferativa, hipocolesterolêmica, atividade protetora contra danos no DNA induzidos por doxorubicina e atividade hipoglicêmica. A derivatização química de macromoléculas polissacarídicas tem sido considerada como um mecanismo potencializador de bioatividade. Neste contexto, o presente trabalho propôs a derivatização da lasiodiplodana por acetilação. Anidrido acético foi utilizado como agente derivatizante e piridina como catalisador e meio reacional. Os derivados obtidos foram avaliados quanto a hidrossolubilidade, grau de substituição (DS), potencial antioxidante, e caracterizados por espectroscopia no infravermelho (FT-IR), análise termogravimétrica, calorimetria diferencial de varredura, difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Derivados acetilados com diferentes graus de substituição (1,26; 1,03; 0,66 e 0,48) foram obtidos, havendo correlação entre a concentração do agente derivatizante e o DS. A análise de espectroscopia FT-IR confirmou a inserção de grupos acetil nas biomacromoléculas derivatizadas (LAS-AC) através de bandas específicas referentes a grupo carbonila (C=O) e aumento na vibração C-O. Análise por MEV indicou que a lasiodiplodana nativa apresenta estrutura morfológica na forma de filme fino, com aspecto translúcido e dobras ao longo de sua extensão. A derivatização levou a mudanças morfológicas no polímero, incluindo aspectos de espessura, translucidez e aglomeração do filme. A análise térmica indicou que a amostra nativa e o derivado com DS 0,48 apresentaram três estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorreu até 125 °C (perda de água) e houve dois eventos consecutivos de perda de massa (200 °C - 400 °C) atribuídos a degradação da molécula. As amostras com DS 1,26; 1,03 e 0,66 apresentaram quatro estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorreu até 130 °C (perda de água), na sequência dois eventos consecutivos de perda de massa (200°C – 392 °C) atribuídos a degradação do biopolímero foram verificados. O quarto estágio ocorreu entre 381 °C e 532 °C (decomposição final) com picos exotérmicos entre 472 °C e 491 °C. Os padrões da difração de raios X demonstraram que a lasiodiplodana nativa e acetilada apresentam estrutura amorfa com regiões semicristalina. A derivatização não contribuiu para a solubilidade da macromolécula mas potencializou sua capacidade antioxidante. A acetilação da lasiodiplodana permitiu a obtenção de uma nova biomacromolécula com maior potencial antioxidante do que a molécula nativa e com propriedades tecnológicas aplicáveis em diversos setores industriais.

**Palavras- Chave:** Atividade biológica. Biopolímero. Derivatização. Exopolissacarídeo. Modificação química.

## ABSTRACT

SÁNCHEZ, William. Acetylation of exopolysaccharide (1→6)- $\beta$ -D-Glucan (Lasiodiplodan): chemical derivatization and characterization. 2016. 79 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Lasiodiplodan is an exocellular  $\beta$ -glucan with biological functionalities such as antioxidant, antiproliferative, hypocholesterolemic, protective activity against DNA damage induced by doxorubicin and hypoglycemic activity. Chemical derivatization of polysaccharide macromolecules has been considered as a potentiating mechanism for bioactivity. In this context, this work proposes the derivatization of lasiodiplodan by acetylation. Acetic anhydride was used as derivatizing agent and pyridine as catalyst and reaction medium. The derivatives obtained were evaluated by its water solubility, degree of substitution (DS), antioxidant potential, and characterized by infrared spectroscopy (FT-IR), thermal analysis, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and scanning electron microscopy. Acetylated derivatives with different degrees of substitution (1.26; 1.03; 0.66 and 0.48) were obtained, and there was correlation between the concentration of derivatizing agent and DS. FT-IR spectroscopy analysis confirmed the insertion of acetyl groups into derivatized macromolecules (LAS-AC) through of specific bands concerning to carbonyl group (C=O) and increase in C-O vibration. SEM analysis indicated that native lasiodiplodan presents morphological structure in the form of thin films with translucent appearance and folds along its length. Derivatization led to morphological changes in the polymer, including aspects thickness, translucency and agglomeration. Thermal analysis indicated the native sample and derivative with DS 0.48 presented three weight loss stages. The first stage occurred until 125 °C (loss of water) and there were two consecutive events of weight loss (200 °C - 400 °C) attributed to molecule degradation. Samples with DS 1.26; 1.03 and 0.66 demonstrated four weight loss stages. The first stage occurred until 130 °C (loss of water), following by two consecutive events of weight loss (200 °C - 392 °C) attributed to degradation of the biopolymer. The fourth stage was between 381 °C and 532 °C (final decomposition) with exothermic peaks between 472 °C and 491 °C. X-ray diffraction patterns showed that native and acetylated lasiodiplodan have amorphous structure with semicrystalline regions. Derivatization did not contribute to increased solubility of the macromolecule, but potentiated its antioxidant capacity. Acetylation of lasiodiplodan allowed to obtaining a new macromolecule with higher antioxidant potential than the native molecule and with technological properties applicable in various industrial sectors.

**Keywords:** Biological activity. Biopolymer. Derivatization. Exopolysaccharide. Chemical modification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um dissacarídeo ( $\beta$ -D-Glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glicopiranoose) formado a partir da condensação dos respectivos monômeros .....	4
Figura 2 - Parede celular de alguns fungos. A parede celular do fungo está composta principalmente por polissacarídeos como a quitina que é usada como base para conectar as (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucanas, as quais servem como unidades estruturais..	7
Figura 3 - Reconhecimento das $\beta$ -glucanas por células imunológicas.....	8
Figura 4 - Imunomodulação das $\beta$ lucanas .....	10
Figura 5 - Enzimas envolvidas na remoção dos radicais livres .....	13
Figura 6 - Reação de acetilação da lasiodiplodana. Usado o software ACD/Chemsketch (Advanced Chemistry Development Inc. ACD/Labs 2014).....	16
Figura 7 - Representação molecular da lasiodiplodana. A lasiodiplodana é um polissacarídeo linear, sem ramificações do tipo $\beta$ glucana com ligações glicosídicas $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6). Elaborado a partir do software ACD/Chemsketch (Advanced Chemistry Development Inc. ACD.....	18
Figura 8 - Diagrama esquemático dos protocolos experimentais envolvidos na produção e caracterização da lasiodiplodana nativa e modificada.....	22
Figura 9 - Cinética da produção da lasiodiplodana em cultivos conduzidos em frascos agitados. Consumo de glicose ( $\blacktriangle$ ), Crescimento da biomassa micelial ( $\bullet$ ), Produção de lasiodiplodana ( $\blacksquare$ ).....	29
Figura 10 - Cultivo submerso do <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI (A). Aspecto da biomassa celular no final do cultivo, 72 h (B).....	31
Figura 11 – Representação esquemática da hidrólise alcalina da ligação ester pela solução de hidróxido de sódio .....	32
Figura 12 - Espectros de infravermelho da LAS-N e os derivados acetilados com diferentes DS.....	34
Figura 13 - Ampliação das regiões dos espectros normalizados da LAS-N e LAS-AC com DS de 1,26. (A) região 3800 - 2800 $\text{cm}^{-1}$ , (B) região entre 1800 e 1350 $\text{cm}^{-1}$ , (C) 1300 e 800 $\text{cm}^{-1}$ .....	36

Figura 14 - Micrografias (MEV) da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e dos derivados acetilados (LAS-AC) com diferentes graus de substituição (DS: 1,26; 1,03; 0,48) em amplitudes de 400 X, 800 X e 1500 X.....	38
Figura 15 - Curvas de análise termogravimétrica (A), termogravimétrica derivada (B) e calorimetria diferencial de varredura (C) de lasiodiplodana nativa e derivados acetilados .....	40
Figura 16 - Difratoograma da LAS-N e dos derivados LAS-AC com DS de 1,26; 1,03; 0,66 e 0,48 .....	42
Figura 17 - Potencial de redução do íon férrico verificado nas amostras lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose .....	45
Figura 18 - Poder redutor do íon do ferro (III) verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose .....	47
Figura 19 - Porcentagem de remoção do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose .....	48
Figura 20 - Porcentagem de remoção do radical hidroxila (HO●) verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos do processo de produção da lasiodiplodana ..	30
Tabela 2 - Percentual de grupamentos acetila (AG) e valores de DS .....	33
Tabela 3 - Conteúdo de perda de massa das amostras de LAS-N e LAS-AC .....	41
Tabela 4 - Solubilidade da LAS-N e derivados LAS-AC a 25 °C .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)
AC <sub>2</sub> O	Anidrido acético
AC-EPS	Exopolissacarídeo acetilado
ANOVA	Análise de Variância
APTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
CAT	Catalase
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CR3	Receptor complemento 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DS	Grau de substituição
EPS	Exopolissacarídeo
EtOH	Etanol
FRAP	Potencial Redutor do íon férrico
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GSH-Px	glutathiona peroxidase
ICAM	Moléculas de adesão intercelulares
IL	Interleucina
ITAM	Imunorreceptor baseado em tirosina com motivo de ativação
LAS-AC	Lasiodiplodana acetilada
LAS-AC-M	Lasiodiplodana acetilada metodologia
LAS-N	Lasiodiplodana nativa
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RMN	Ressonância Nuclear Magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SIGNR	Proteína da família das lectinas do tipo C
SOD	Superoxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
THP	Macrófagos humanos THP
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TROLOX	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
TP	Tempo de Protrombina
TT	Tempo de Trombina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$P_p$	Produção de Lasiodiplodana
$P_x$	Produção de biomassa
$Q_p$	Produtividade volumétrica em produto
$Q_s$	Taxa global de consumo do substrato
$Q_x$	Produtividade volumétrica em biomassa
$Y_{p/s}$	Fator de conversão de Substrato em Produto
$Y_{p/x}$	Produto Formado por Unidade de Células
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de Substrato em Biomassa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
3.1 POLISSACARÍDEOS .....	4
3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS .....	5
3.3 $\beta$ -GLUCANAS .....	6
3.3.1 $\beta$ -glucanas e atividade imunomoduladora .....	8
3.3.2 $\beta$ -glucanas e atividade anticancerígena .....	11
3.3.3 $\beta$ -glucanas e atividade antioxidante .....	12
3.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS .....	14
3.5 ACETILAÇÃO .....	14
3.6 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	17
3.7 Lasiodiplodana .....	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 ORGANISMO E REAGENTES .....	20
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	20
4.2.1 Produção Biotecnológica da Lasiodiplodana .....	20
4.2.1.1 Preparo do Inóculo .....	20
4.2.1.2 Cultivo Submerso de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e Recuperação da Lasiodiplodana .....	21
4.2.2 Acetilação da Lasiodiplodana .....	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DA LASIODIPLODANA NATIVA E MODIFICADA .....	25
4.3.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR) .....	25
4.3.2 Análise Térmica .....	25
4.3.3 Análise por Difração de Raios-X .....	25
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	25
4.3.5 Análise da solubilidade em água .....	26
4.4 Atividade Antioxidante .....	26
4.4.1 Avaliação do poder de redução do íon férrico (FRAP) .....	26

4.4.2 Poder redutor .....	27
4.4.3 Atividade de sequestro do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	27
4.4.4 Atividade de sequestro do radical hidroxila (HO•) .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
5.1 Perfil cinético da produção da lasiodiplodana .....	29
5.2 Caracterização estrutural da lasiodiplodana nativa e modificada .....	32
5.2.1 Grau de acetilação dos derivados .....	32
5.2.2 Análise dos espectros de Infravermelho (FT-IR).....	34
5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	37
5.2.4 Análise Térmica.....	39
5.2.5 Análise por Difração de Raios-X .....	42
5.2.6 Análise da solubilidade em água.....	43
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	44
5.3.1 Avaliação do Poder de Redução do íon férrico (FRAP) .....	45
5.3.2 Poder redutor .....	46
5.3.3 Atividade de sequestro do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	48
5.3.4 Atividade de sequestro de radical hidroxila (HO•) .....	49
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>7. TRABALHOS DIVULGADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são biomoléculas produzidas por algumas espécies de fungos e bactérias e liberadas no meio líquido de cultivo na forma de polímeros solúveis ou insolúveis. A produção microbiana de EPS tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa no mundo, uma vez que são biopolímeros de elevado valor agregado com amplo campo de aplicações industriais. Tais macromoléculas são exploradas pelas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos como biofloculantes, bioabsorventes, agentes removedores de metais pesados, agentes formadores de filme, agentes de suspensão, agentes de liberação controlada de drogas, gelificantes, espessantes, coagulantes, lubrificantes e estabilizantes.

Alguns exopolissacarídeos, em especial as  $\beta$ -glucanas, apresentam atividades biológicas e fazem parte de um grupo de macromoléculas naturais com potencial farmacológico. Muitas destas macromoléculas apresentam atividade anti-inflamatória, antimutagênica, antioxidante, antiviral, anticoagulante e antitrombótica. Diferentes propriedades farmacológicas conferem a estas biomacromoléculas importância tecnológica e um potencial e promissor mercado.

$\beta$ -Glucanas têm sido empregadas como ingredientes na formulação de produtos alimentícios para melhorar algumas propriedades físicas (características reológicas, textura) e sensoriais. Além de melhorias tecnológicas no produto podem promover benefícios à saúde do consumidor devido suas funções biológicas em especial sua capacidade de estimulação do sistema imunológico.

As  $\beta$ -Glucanas fazem parte da constituição da parede celular de cereais como cevada e aveia e da parede celular de muitos microrganismos. A maioria das  $\beta$ -glucanas disponíveis no mercado são extraídas da parede celular de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*.

Recentemente, relatos na literatura tratam de alguns fungos filamentosos que produzem glucanas extracelulares, quando cultivados em cultivos submersos. A produção extracelular de glucanas em meios líquidos têm algumas vantagens quanto comparadas à extração dessas glucanas da parede celular, especialmente pela maior facilidade de recuperação do biopolímero do meio de cultivo.

As  $\beta$ -glucanas extracelulares de origem fúngica mais comumente descritas na literatura são as do tipo (1 $\rightarrow$ 3)- e (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucanas. (1 $\rightarrow$ 6)-  $\beta$ -D-glucanas são encontradas na parede celular de ascomicetos e basidiomicetos, no entanto, a

produção extracelular deste tipo de glucana é bastante incomum. Neste contexto, a cepa MMPI do ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* (isolado de fruta-do-conde, *Annona squamosa*) tem se mostrado um promissor produtor desta glucana.

Além dos aspectos técnicos e de engenharia bioquímica envolvidos na produção biotecnológica de polissacarídeos extracelulares, mais recentemente tem sido reportados trabalhos científicos descrevendo a derivatização química destas biomacromoléculas. A obtenção de moléculas modificadas quimicamente através da introdução de grupos químicos na estrutura tem revelado ser estratégico para a obtenção e potencialização de propriedades biológicas.

No presente projeto foi proposto a produção biotecnológica da lasiodiplodana em cultivo submerso, a derivatização da biomolécula por acetilação, bem como a caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos derivados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar derivados acetilados de lasiodiplodana ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana) produzida em cultivos submersos pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir lasiodiplodana em sistema submerso descontínuo;
2. Recuperar a macromolécula do meio líquido por precipitação etanólica e posterior diálise e desidratação por liofilização, obtendo um biomaterial na forma sólida;
3. Avaliar a influência da concentração do agente derivatizante (anidrido acético) sobre o grau de substituição (DS) da macromolécula;
4. Avaliar e correlacionar o grau de substituição dos derivados com a solubilidade em água e a atividade antioxidante;
5. Caracterizar os derivados acetilados por análises de FT-IR, DRX, DS, Análise térmica (TG, DTG e DSC) e MEV.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são polímeros compostos de unidades monossacarídicas, contendo dez ou mais unidades monoméricas, sendo alguns compostos por até milhares delas. As unidades estão unidas por ligações glicosídicas (Figura 1), as quais ocorrem entre um grupo hidroxila de um monossacarídeo e o carbono anomérico de outro. Podem possuir cadeias lineares ou ramificadas, bem como diferentes funções e propriedades biológicas. Os polissacarídeos constituem a maior parte dos carboidratos encontrados na natureza e diferenciam-se em relação as unidades de monossacarídeos repetidas, grau de ramificação, tipos e configuração das ligações, além do tamanho da cadeia. Como possuem grupos hidroxila, as ligações de hidrogênio desempenham papel importante no dobramento da estrutura linear, promovendo consequentemente, maior estabilidade a estrutura da macromolécula (NELSON; COX, 2009).

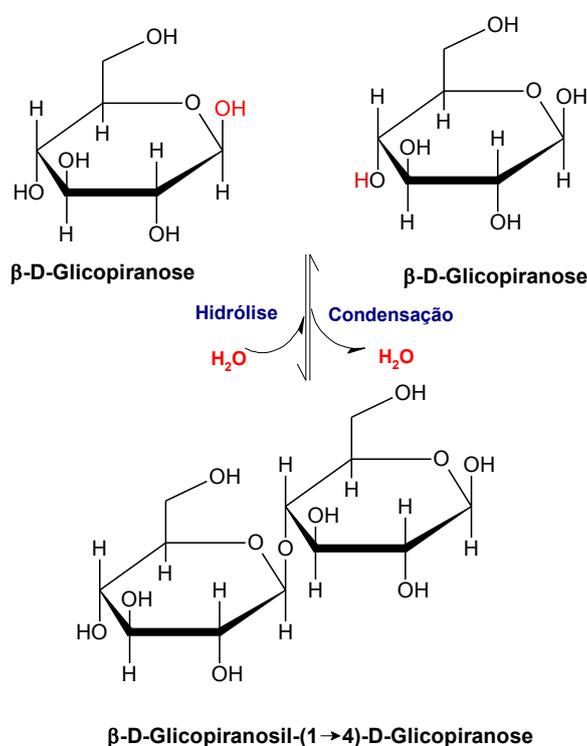


Figura 1 - Representação esquemática de um dissacarídeo (β-D-Glicopiranosil-(1→4)-D-Glicopiranoose) formado a partir da condensação dos respectivos monômeros

Os polissacarídeos podem ser agrupados em dois grupos: os que são produzidos naturalmente como os oriundos de algas, plantas, microrganismos e animais e os polissacarídeos semissintéticos. Os semissintéticos são produzidos por modificação química ou enzimática a partir de uma molécula mãe. Dependendo de sua estrutura química, diferentes propriedades físico-químicas como solubilidade, efeito osmótico e gelificação são observadas (ZONG et al., 2012). Devido a grande diversidade estrutural, fazem parte de diversos processos biológicos, como os processos de armazenamento de energia, de sinalização celular, participando nos processos do sistema imune, fertilização, prevenção de patogêneses e desenvolvimento celular (CHANDRA et al., 2011).

### 3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

A biossíntese de polissacarídeos em microrganismos, comumente ocorre na fase de crescimento microbiano. Estes bioprodutos podem ser classificados em função de sua localização celular, como polissacarídeos citosólicos (fornecem recursos energéticos à célula), polissacarídeos de parede celular (peptidoglicanos e lipopolissacarídeos) e os polissacarídeos extracelulares também chamados exopolissacarídeos (EPS). Os EPS estão divididos em dois grupos principais: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos são constituídos por unidades monoméricas (monossacarídeos) unidas por ligações glicosídicas, como a dextrana (unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose) ou a levana (unidades de  $\beta$ -D-frutopirranose). Já, os heteropolissacarídeos são constituídos por vários monossacarídeos como as gomas xantana (unidades de  $\beta$ -D-glicopirranose,  $\beta$ -D-manopirranose, ácido  $\beta$ -D-glucurônico e  $\alpha$ -D-manopirranose) e gelana (unidades de  $\beta$ -D-glicopirranose,  $\alpha$ -L-ramnose e ácido  $\beta$ -D-glucurônico) (DONOT et al., 2012).

O processo de biossíntese dos EPS microbianos é composto por três partes principais: assimilação do carbono, síntese intracelular e a exsudação para fora da célula. Este processo depende da fonte de carbono e nitrogênio disponível no meio de cultivo, em geral a produção do EPS aumenta em condições em que há excesso de substrato (fonte de carbono) e uma maior relação carbono/nitrogênio. A produção de EPS em organismos microbianos tem diferentes funções, como a promoção do ataque inicial por adesão das células à superfície sólida a ser utilizada como

substrato, formação e manutenção da microcolônia e a proteção das células por biofilmes (CZACZYK; MYSZKA, 2007).

Em função da diversidade em estrutura e propriedades reológicas, os exopolissacarídeos têm encontrado amplo campo de aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica como agente espessante, estabilizante, emulsificante, texturizante, gelificante (NAMPOOTHIRI et al., 2003), floculante de partículas e encapsulador de materiais (SELITRENNIKOFF, 1995). Além disso, comumente apresentam atividades biológicas como ação antitumoral, antiviral e anti-inflamatória (ISHIBASHI et al., 2004; SARANGI et al., 2006).

Outras aplicações de EPS produzidos microbiologicamente incluem as indústrias de petróleo e o campo médico, sendo produtos da biotecnologia amplamente aceitos (ONBASLI; ASLIM, 2009). Estas propriedades tornam essas biomoléculas tecnologicamente importantes, com um mercado promissor. Atualmente, os polissacarídeos extraídos de plantas (tais como, goma guar, goma arábica ou pectinas), de algas marinhas (como alginato, goma carragena ou agar) e de crustáceos (quitina) ainda dominam o mercado, com polissacarídeos microbianos (como goma xantana, gelana, pullulana e alginato bacteriano) representando somente uma pequena fração do mercado de biopolímeros (FREITAS et al., 2009). No entanto, nos últimos anos têm havido um crescente interesse no isolamento e identificação de novos polissacarídeos microbianos que podem competir com polissacarídeos tradicionais devido a suas propriedades físico-químicas e reológicas.

A produção microbiana de polissacarídeos é uma alternativa de pesquisa atrativa e estratégica, já que tais produtos possuem propriedades similares a dos obtidos a partir de plantas e algas. Em alguns casos são obtidos polissacarídeos com características específicas para o desenvolvimento de novos produtos. Além disso, produtos microbianos podem ser produzidos através de técnicas e processos controlados, sendo obtidos produtos com qualidade mais uniforme comparando-se aos processos de extração química.

### 3.3 $\beta$ -GLUCANAS

As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos homogêneos compostos exclusivamente por monômeros de D-glicopirranose com ligações glicosídicas em configuração  $\beta$ . As características moleculares destes biopolímeros dependem quase que

exclusivamente da fonte de obtenção e do método de purificação. A glucana mais reportada na literatura é a (1→3)- $\beta$ -D-glucana, a qual tem sido encontrada tanto em organismos procarióticos como eucarióticos. Outro grupo de  $\beta$ -glucana bastante mencionada e estudada é a (1→3; 1→4)- $\beta$ -D-glucana, encontrada na parede celular de cereais e grãos. As  $\beta$ -glucanas podem variar em termos de frequência e número de átomos de carbono nas ramificações, grau de ramificação, massa molecular (de  $10^2$  até  $10^6$  Da), carga polimérica, solubilidade, bem como a estrutura conformacional em solução aquosa, a qual pode apresentar-se como espiral aleatória com hélice tripla ou simples. Todas essas características têm influência direta nas propriedades biológicas que tais biomoléculas podem apresentar (KHOURY; CUDA, 2011).

As paredes celulares dos fungos são compostas tipicamente por 80-90% de polissacarídeos associados com outros componentes como lipídeos, proteínas, polifosfatos e íons inorgânicos que compõem a matriz da parede celular. A compreensão da composição química da parede celular dos fungos é importante para a exploração e bioprospecção futura do fungo. Além disso, a composição química da parede celular dos fungos tem sido determinante na classificação destes para pesquisa ou para propósitos industriais (MADIGAN et al., 2009).

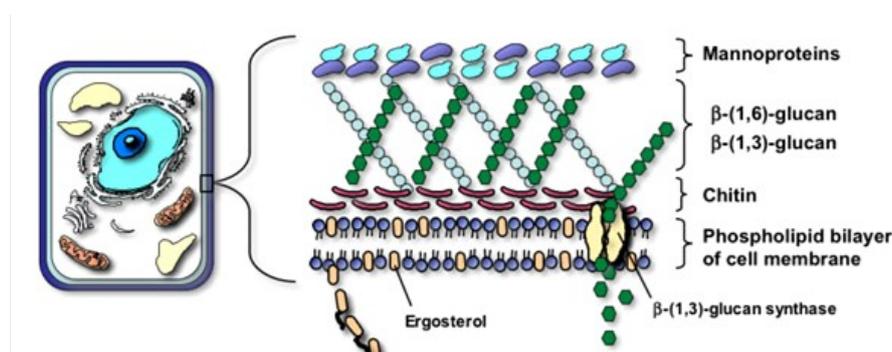


Figura 2 - Parede celular de alguns fungos. A parede celular do fungo está composta principalmente por polissacarídeos como a quitina que é usada como base para conectar as (1→3; 1→6)- $\beta$ -D-glucanas, as quais servem como unidades estruturais

Fonte: <http://www.doctorfungus.org/thedrugs/images/drug-targets.jpg> "Fungal Cell Wall" (2014)

Volman et al. (2008) destacam que as  $\beta$ -glucanas são os principais polissacarídeos que compõem a parede celular de alguns microrganismos como os fungos filamentosos, as leveduras e algumas bactérias. Alguns microrganismos, também contêm na parede celular a quitina, um polímero com unidades do derivado da glicose N-acetilglicosamina. A quitina está organizada nas paredes celulares em

feixes microfibrilares, como a celulose nas paredes celulares das plantas, junto com as (1→3, 1→4 ou 1→6)- $\beta$ -glucanas e as manoproteínas (Figura 2).

As  $\beta$ -glucanas têm despertado interesse devido a sua relação entre a estrutura química, potenciais funções biológicas e propriedades bioativas e funcionais que têm sido demonstradas tais como atividade anti-tumoral, imunomoduladora, estimulação da hematopoiese, antioxidante e anti-inflamatória (LEI et al., 2015). Outra propriedade que tem atraído a atenção é o fato de que as  $\beta$ -glucanas são fibras dietéticas, apresentando resultados satisfatórios na prevenção e tratamento de síndromes metabólicas e controle da obesidade (KHOURY et al. 2011).

### 3.3.1 $\beta$ -glucanas e atividade imunomoduladora

De acordo com Chan et al. (2009) as  $\beta$ -glucanas encontradas em paredes celulares de fungos e bactérias ou como polissacarídeos extracelulares têm envolvimento na iniciação da resposta imune antimicrobiana. Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstram que as  $\beta$ -glucanas atuam sobre vários receptores imunes, incluindo dectina-I, CR3 e TLR 2/6 e desencadeiam o funcionamento de um grupo de células imunes como macrófagos, neutrófilos, monócitos, células *Killers* naturais e células dendríticas.

Como pode ser verificado na Figura 3, as  $\beta$ -glucanas exercem a função da estimulação imune pelo reconhecimento da dectina-1 e TLR que reconhecem o polissacarídeo, o qual é encapsulado pelo endossomo do macrófago e é digerido em pequenos fragmentos aos granulócitos, onde são unidos ao CR3. Deste modo, promovendo toxicidade nas células cancerosas iC3b-revestidas (BONIFACIO, 2014).

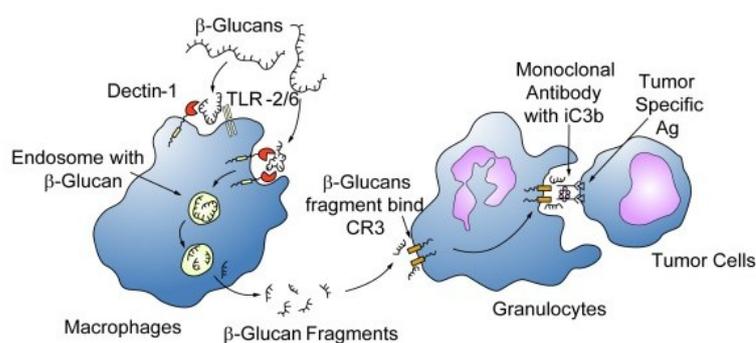


Figura 3 - Reconhecimento das  $\beta$ -glucanas por células imunológicas  
Fonte: Bonifacio (2014)

Como consequência a resposta imune inata e adaptativa podem ser ativadas pelas  $\beta$ -glucanas e, de fato, podem melhorar a fagocitose opsônica e não opsônica. Muitas  $\beta$ -glucanas ingressam na parte próxima do intestino delgado e algumas delas são capturadas pelos macrófagos, fragmentadas intracelularmente e esses fragmentos são transportados à medula óssea e ao sistema endotélio reticular. Os pequenos fragmentos são liberados pelos macrófagos e tomados por outras células imunes liderando outras respostas (Figura 3).

A habilidade para que o sistema imune inato possa reconhecer rapidamente um organismo patógeno invasor é imprescindível para o controle da infecção. A dectina-I é uma proteína transmembranar do tipo II, que reconhece e liga-se a glucanas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) iniciando a resposta imune. Esta proteína reconhece glucanas presentes na parede celular de fungos e bactérias com a grande vantagem das  $\beta$ -glucanas estarem ausentes nas células humanas.

No desencadeamento dos efeitos da resposta imune estão incluídos a fagocitose e produção de fatores pro-inflamatórios para conduzir o processo de eliminação de agentes infecciosos. A porção caudal da dectina-I no citoplasma contém um imunoreceptor que é ativado por um motivo tirosina (ITAM) o qual é sinalizado pela tirosina quinase com a colaboração dos receptores Toll-like 2 e 6 (TLR-2/6). Embora o mapa metabólico não seja elucidado por completo ainda existem vários sinais moleculares reportados, entre eles NF- $\kappa$ B, o adaptador de sinalização CARD9 e o fator nuclear de ativação das células T. Tais sinais moleculares podem conduzir a liberação das citocinas como a interleucina IL-12, IL-6, o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a IL-10 (Figura 4).

Em células dendríticas as proteínas ICAM-3 e SIGNR1 junto com a dectina-I cooperam no reconhecimento não opsônico das  $\beta$ -glucanas para realizar a fagocitose. Outro mecanismo de ação das  $\beta$ -glucanas é mediado pela via de ativação do receptor complemento 3 (CR3) o qual se encontra em células *killers* naturais, neutrófilos e linfócitos e é responsável pelo reconhecimento opsônico das  $\beta$ -glucanas, conduzindo assim, a fagocitose e lise celular (CHAN et al., 2009).

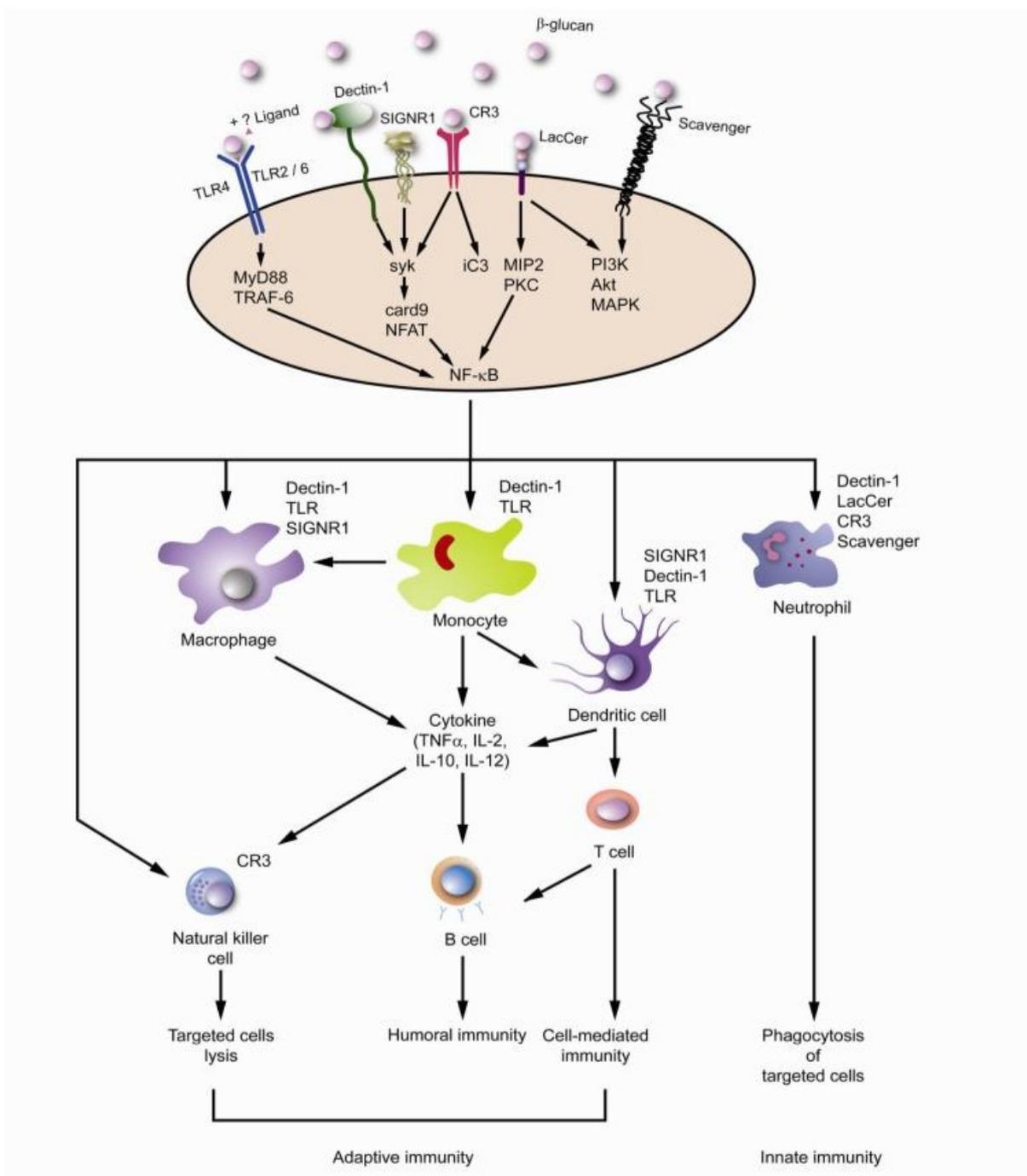


Figura 4 - Imunomodulação das  $\beta$ glucanas  
 Fonte: Chan et al. (2009)

Na última década as  $\beta$ -glucanas têm despertado o interesse por suas potenciais aplicações biológicas e médicas. Existem estudos sobre a capacidade imunoestimuladora da (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana oriunda dos fungos *Agaricus bisporus* e *Agaricus brasiliensis* sobre macrófagos humanos THP-1 (SMIDERLE et al., 2013). Nesta pesquisa as biomoléculas foram colocadas no meio de cultivo dos macrófagos e assim foi avaliado por *Real time*-PCR o nível de expressão do mRNA dos genes

pro inflamatórios IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sendo observado um aumento na expressão desses genes. Segundo Chen et al. (2014) polissacarídeos extraídos do *Ganoderma atrum* apresentaram atividade antioxidante e atividade imunomoduladora depois da obtenção de derivados acetilados e carboximetilados. A atividade antioxidante foi avaliada por ensaios de redução do íon férrico, ácido  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e pela captura do radical DPPH. A atividade imunomoduladora foi avaliada pela atividade pinocítica e pela quantificação da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ . Além disso, pesquisas em cultivos *in vitro* e com animais têm demonstrado que (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanas de levedura e de fungos são capazes de incrementar a resposta ou a função de células imunes, embora estudos em humanos sejam relativamente escassos (VOLMAN et al., 2008).

### 3.3.2 $\beta$ -glucanas e atividade anticancerígena

Alguns polissacarídeos e, especificamente, algumas  $\beta$ -glucanas, têm apresentado atividade positiva sobre a prevenção e tratamento do crescimento de células cancerosas. Alguns estudos demonstram que certos proteoglicanos têm demonstrado resultados efetivos na antiproliferação de células cancerígenas em ensaios *in vitro* (SARANGI et al., 2006). Segundo Smiderle et al. (2013) os polissacarídeos ativos, incluindo  $\beta$ -glucanas, são reconhecidos por receptores da membrana celular dos leucócitos e os macrófagos, como o CR3, dectina-1 e TLR (Figura 4), os quais induzem a proliferação e diferenciação das células imunes; tais atividades são responsáveis pela resposta imune inata mediada por células, expressando genes pró-inflamatórios, e assim, a indução de efeitos antitumorais. Existem evidências que sugerem que alguns polissacarídeos, principalmente as  $\beta$ -glucanas, podem inibir o crescimento tumoral através de diferentes mecanismos: 1) atividade anticancerígena direta, como a indução da apoptose de células tumorais; 2) prevenção da genesis tumoral pelo consumo oral de preparações ativas; 3) atividade imunopotenciadora quando combinada com quimioterapia; 4) inibição da metástase tumoral (ZONG et al., 2012). Tem sido reportado na literatura que glucanas oriundas de fungos apresentam alguns dos mecanismos mencionados acima, mas principalmente as glucanas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) (STELUTI et al., 2004).

Pesquisa desenvolvida por Chen et al. (2010), mostrou evidências da atividade antitumoral de  $\beta$ -glucanas carboximetiladas e sulfatadas extraídas da planta *Poria cocos* sobre células tumorais Sarcoma 180.

Também tem sido estudado o uso de  $\beta$ -glucanas extraídas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente inibidor da metástase. Yoon et al. (2008) analisaram células de carcinoma do cólon 26-M3.1, melanoma B16-BL6 e linfoma L5178Y-ML25 em ratos e relataram atividade antiproliferativa de tais macromoléculas (YOON et al., 2008).

### 3.3.3 $\beta$ -glucanas e atividade antioxidante

O dano celular pode ser induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) que são ânions reativos que contêm átomos de oxigênio ou moléculas que contêm átomos de oxigênio que podem produzir radicais livres. Como exemplo podem ser mencionados o radical hidroxila, os superóxidos, o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito. O principal recurso de ROS provém da respiração aeróbia, da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, do metabolismo dos compostos xenobióticos, estimulação da fagocitose por patógenos ou por lipopolissacarídeos, metabolismo da arginina, etc. O maior dano celular ocorre quando os ROS induzem a alteração de macromoléculas como ácidos graxos poliinsaturados nas membranas lipídicas, proteínas essenciais e DNA. Adicionalmente o estresse oxidativo tem sido associado com malefícios como o alzheimer, parkinson, câncer e também ao envelhecimento (BEDARD; KRAUSE, 2007 e NEWSHOLME et al., 2012).

Em condições normais os radicais livres presentes na célula são inativados pela ação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px). A SOD catalisa a redução do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio; a CAT catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; a GSH-Px catalisa a reação da glutathione à glutathione oxidada usando o peróxido de hidrogênio.

A literatura reporta inúmeras pesquisas em relação a atividade antioxidante das  $\beta$ -Glucanas. Um grupo de pesquisa da Sérvia (USKOKOVIĆ et al., 2013) verificou que a administração de um extrato comercial de cereal com alta quantidade de  $\beta$ -Glucana em ratos preveniu o diabetes relacionado com a peroxidação lipídica. Nandi et al. (2014) verificaram potencial antioxidante de  $\beta$ -Glucana produzida pelo

fungo *Russula albonigra*, através dos ensaios *in vitro* do radical hidroxila, radical superóxido, poder de redução do íon férrico e pelo ensaio com  $\beta$ -caroteno.

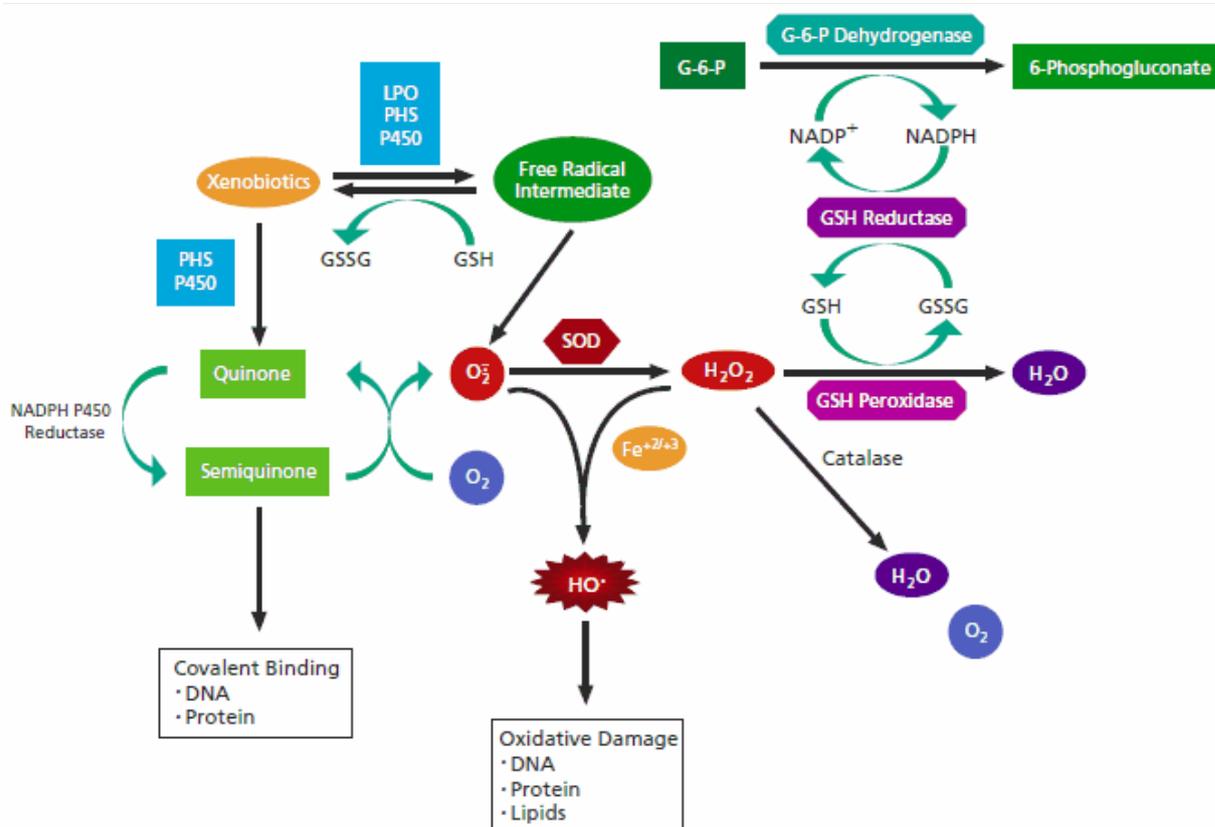


Figura 5 - Enzimas envolvidas na remoção dos radicais livres  
Fonte: SIGMA-ALDRICH 2006

Yuan et al. (2009) avaliando a atividade antioxidante *in vivo* de uma  $\beta$ -glucana extraída de *Phellinus ribis*, verificaram níveis reduzidos de TBARS e níveis de atividade enzimática maiores de superóxido dismutase e glutathiona peroxidase (GSH-Px) em amostras de sangue de ratos tratados com a  $\beta$ -glucana.

Nosso grupo de pesquisa (GTBio) verificou recentemente que a lasiodiplodana (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana) produzida pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI apresenta atividade antioxidante, a qual foi avaliada pelos métodos ABTS<sup>+</sup>, DPPH e poder redutor do íon férrico (KAGIMURA et al., 2015). No referido trabalho foi verificado que a modificação química da glucana por carboximetilação contribuiu para o aumento do potencial antioxidante da macromolécula.

### 3.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

A atividade biológica dos polissacarídeos depende da sua estrutura molecular: composição do monossacarídeo, tipo de ligação glicosídica da cadeia principal, grau de substituição, grau de ramificação e conformação estrutural das cadeias principais. Tem crescido a atenção sobre a modificação molecular e a relação entre atividade biológica e a estrutura dos polissacarídeos. A introdução de grupos iônicos com o apropriado grau de substituição pode potencializar as atividades biológicas (MA et al., 2012).

As modificações químicas nos polissacarídeos são ferramentas importantes para a obtenção de novos agentes antioxidantes e imunomoduladores. Basicamente, tem sido sugerido que os derivados dos polissacarídeos são biologicamente ativos, isso é atribuído a seus grupos hidroxila e à introdução de novos grupos substituintes como -SH, -COOH, -C-O- e NH<sub>2</sub>, os quais podem mudar a estrutura dos polissacarídeos nativos (incluindo a massa molecular, composição do monossacarídeo e configuração espacial) e diminuir as ligações intramoleculares e intermoleculares (CHEN et al., 2014).

Além disso, muitas  $\beta$ -glucanas oriundas de fontes biológicas são insolúveis em água, o que dificulta a ingestão na dieta alimentícia e utilização como possível fármaco. Então, a derivatização química desses polissacarídeos pode favorecer a solubilidade e facilitar o processo de metabolização e potencializar a atividade biológica que apresentam (BAI et al., 2014).

### 3.5 ACETILAÇÃO

A acetilação de polissacarídeos como celulose e amido usando ácido acético ou anidrido acético como agente derivatizante é bem conhecida há décadas (CHENG et al., 2009). Nesse contexto, a acetilação de polissacarídeos é um tipo de modificação que pode aumentar suas aplicações no campo médico e industrial, visto que pode melhorar propriedades físico-químicas e biológicas (XU et al., 2010). Esta modificação consiste basicamente na esterificação de grupos hidroxilas livres dos monômeros constituintes do polímero através de uma reação com anidrido acético. Os grupos hidroxila são, portanto, convertidos em acetatos (Figura 6). Tais modificações químicas sofrem influência de diferentes parâmetros como o pH,

temperatura, tempo de reação, quantidade de anidrido acético e o grau de substituição (SOARES LAROTONDA 2002; SONG; YANG; ZHANG; DUAN; ZHOU; NI 2013; SOUZA et al. 2015 e ZHANG et al. 2014).

Na reação de acetilação, três elementos destacam-se: o polissacarídeo, o anidrido acético e o catalisador que pode ser a piridina (XU et al., 2010), a iodina (REN et al., 2007), o ácido perclórico e o ácido sulfúrico (CHENG et al., 2009; HU et al., 2011), a 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) e a *N*-bromosuccinimida (NBS). A piridina e a 4-DMAP têm sido os catalisadores mais empregados no processo de esterificação. A piridina tem demonstrado bons resultados nas reações, mas além de apresentar odor desagradável, é tóxica e não adequada para ser implementada em larga escala. Por outro lado, a 4-DMAP é demasiadamente cara o que dificulta seu uso a nível industrial. Neste contexto, tem sido reportada a *N*-bromosuccinimida (NBS) como um novo e altamente efetivo catalisador para acetilação de uma longa variedade de alcoóis com anidrido acético em condições suaves e existem evidências de que a NBS pode ser usada em reações de acetilação em polissacarídeos (ZHANG et al., 2014).

Na Figura 6 está representada a reação de acetilação de uma glucana com ramificações conhecidas e a utilização do anidrido acético como agente derivatizante. O anidrido transfere um grupo acetila a uma das hidroxilas dos carbonos livres de cada monômero.

A acetilação dos polissacarídeos tem sido amplamente usada para melhorar e potencializar diferentes propriedades destes polímeros. Chen et al. (2014) derivatizaram mediante acetilação e carboximetilação um polissacarídeo extraído do fungo *Ganoderma atrum* e verificaram que a acetilação com o grau de substituição adequado promoveu melhorias nas atividades antioxidante e imunomoduladora.

Ma et al. (2012) realizaram a derivatização de polissacarídeos (extraídos do fungo *Inonotus obliquus*) por acetilação, carboximetilação e sulfatação e verificaram que o polissacarídeo acetilado teve a menor distribuição de peso molecular, menor viscosidade intrínseca, conformação hiper ramificada, além de elevada atividade antioxidante.

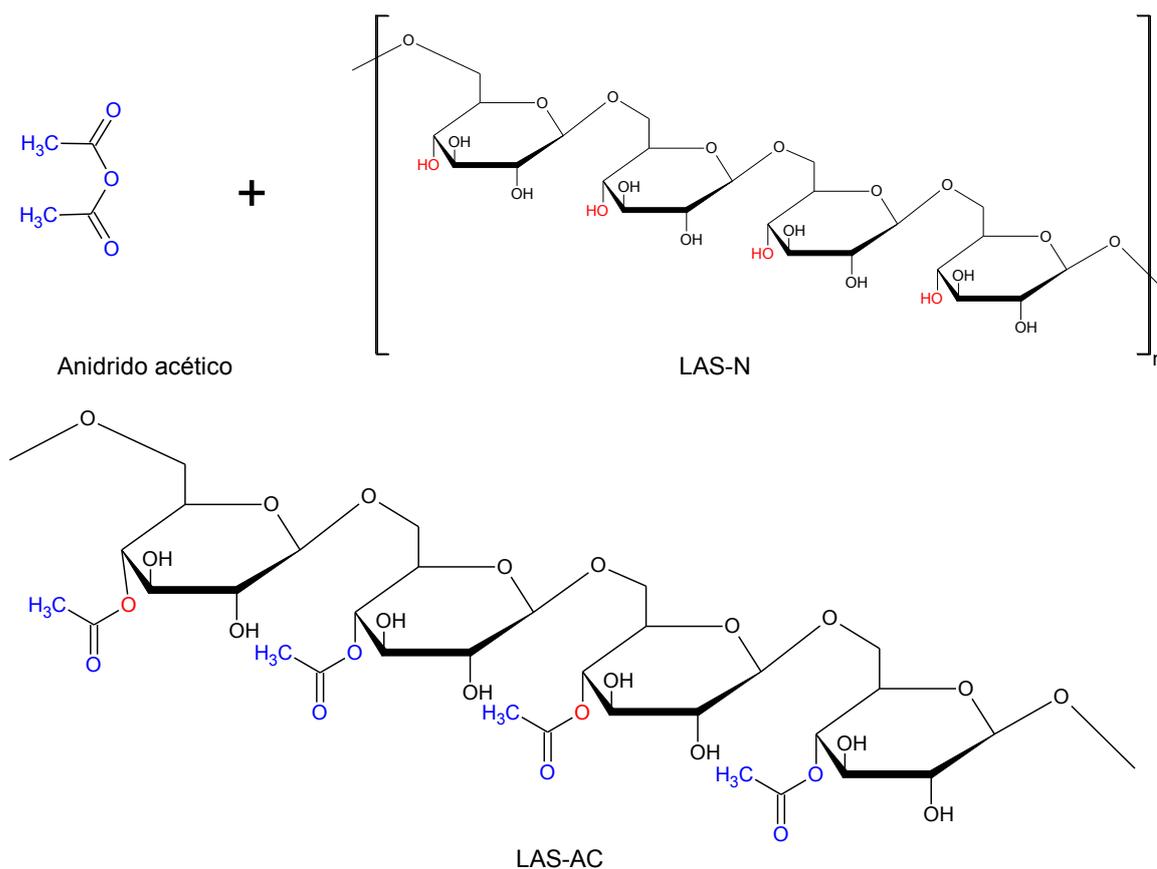


Figura 6 - Reação de acetilação da lasiodiplodana. Usado o software ACD/Chemsketch (Advanced Chemistry Development Inc. ACD/Labs 2014)

Song; Yang; Zhang; Duan; Zhou; Ni; et al. (2013) modificaram quimicamente polissacarídeos solúveis da *Cucurbita pepo* por acetilação com uso do anidrido acético e piridina como catalisador. Os autores encontraram um significativo aumento da atividade antioxidante das amostras acetiladas em relação as não acetiladas e inibição da morte celular induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mesmo da apoptose celular em linfócitos de timo de ratos.

Shibakami et al. (2012) estudaram a modificação da superfície do paramilo, uma (1→3)-β-glucana de armazenamento da microalga *Euglena gracilis*. A modificação foi feita mediante acetilação e os autores destacam que a forma original do polissacarídeo era de esfera e que a modificação por acetilação promoveu a mudança para a forma de *donut*, melhorando assim a função granular da macromolécula.

As β-glucanas modificadas quimicamente por acetilação têm grande aplicabilidade a nível biológico, farmacêutico e industrial, como novas moléculas com propriedades antioxidantes, imunomoduladores e anticancerígenas ou como

novos materiais como biofilmes ou microgrânulos com ampla aplicabilidade industrial.

### 3.6 *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaerales, família Botryosphaeriaceae e gênero *Lasiodiplodia* (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2014) e representa o estado assexuado do *Botryosphaeria rhodina*. Está distribuído em diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo e infecta diferentes hospedeiros como plantas lenhosas e culturas de frutas (MOHALI et al., 2005), dissemina-se pelo vento, insetos e pelas práticas agrícolas que permitem que fungo penetre nas plantas. Segundo Oliviera et al. (2013) os principais sintomas da infecção são a seca-descendente; cancro em ramos, caules e raízes; e lesões em estacas, folhas, frutos e sementes.

O fungo *L. theobromae* tem sido utilizado como modelo biológico e de pesquisa para a produção de três substâncias de grande interesse na agricultura e na indústria, como o ácido jasmônico (TSUKADA et al., 2010), que é um hormônio que controla a resposta ao estresse do meio ambiente e o desenvolvimento das flores nas plantas; o theobroxido, um metabólito do tipo epóxi ciclo-hexano que induz o crescimento das flores, o crescimento do tubérculo na batata e estimula a biossíntese do ácido jasmônico (LI et al., 2007); e as lasiodiplodinas (SULTAN et al., 2014) compostos derivados do ácido orselínico, do qual tem sido reportadas atividades antimicrobiológicas, anti-leucemia, inibição da biossíntese das prostaglandinas e produção de microtubérculos.

### 3.7 Lasiodiplodana

Recentemente na literatura foi reportado o uso do fungo *Lasiodiplodia theobromae* na produção de polissacarídeos e sua possível aplicabilidade biológica (CUNHA et al. 2012). A lasiodiplodana é uma (1→6)-β-D-glucana (Figura 7) extracelular com conformação de tripla hélice. As glucanas do tipo β-(1→6) são estruturas importantes nos fungos, pois fazem parte da parede celular junto com as

glucanas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e a quitina (Figura 2) (VOLMAN et al., 2008), porém não é comum encontrar tais moléculas secretadas no meio extracelular.

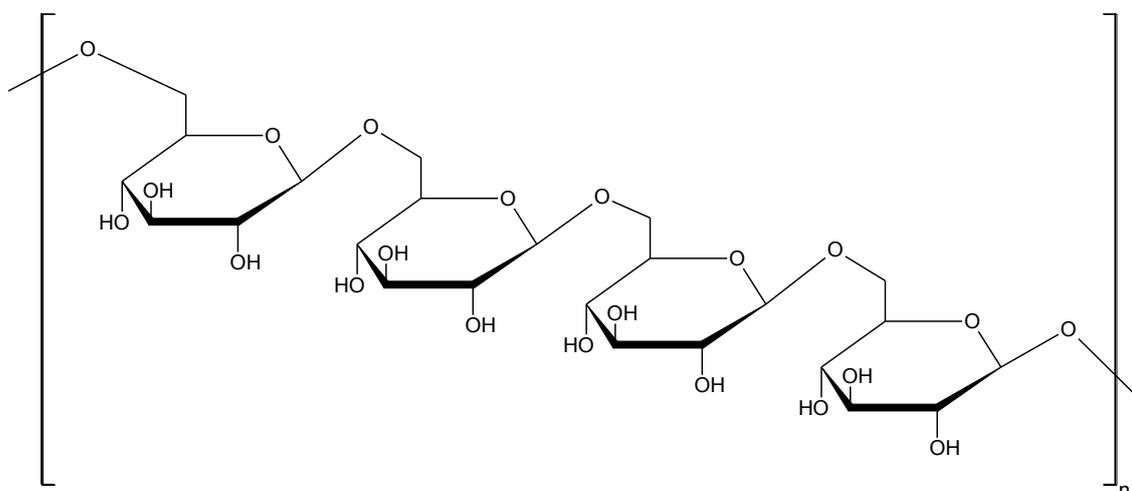


Figura 7 - Representação molecular da lasiodiplodana. A lasiodiplodana é um polissacarídeo linear, sem ramificações do tipo  $\beta$  glucana com ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6). Elaborado a partir do software ACD/Chemsketch (Advanced Chemistry Development Inc. ACD

A extração e purificação das glucanas de parede celular envolve uma série de passos como a extração sequencial por meio de solventes (como o hexano), esfriamento–aquecimento e tratamento alcalino (CORRADI et al., 2008).

Os resultados reportados por Cunha et al. (2012) revelam as condições ótimas de crescimento para a produção da lasiodiplodana a partir do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Na pesquisa foram avaliadas diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose, sucrose) e nitrogênio ( $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ureia, extrato de levedura, peptona), parâmetros reológicos, além da avaliação da atividade antiproliferativa. Os autores descreveram a glicose como fonte de carbono e o extrato de levedura como fonte de nitrogênio que proporcionaram maior rendimento em lasiodiplodana. A lasiodiplodana apresentou um comportamento pseudoplástico e atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama (MCF-7).

Pesquisa conduzida por Túrmina et al. (2012) avaliou os efeitos toxicológicos do tratamento sub-crônico da lasiodiplodana em ratos através da avaliação de alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. Os autores descreveram que o tratamento com lasiodiplodana não indicou sinais de toxicidade, não sendo verificado nenhuma alteração hematológica nem histopatológica. Os autores descreveram ainda efeito hipocolesterolêmico da lasiodiplodana quando administrada em doses de  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$ .

Vasconcelos et al. (2013) descreveram resultados da derivatização de lasiodiplodana (produzida por *L. theobromae* MMLR) por sulfonação e sua atividade anticoagulante mediante o método do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), Tempo de Trombina (TT) e o Tempo de Protrombina (TP) usando a heparina como controle. Os resultados obtidos mostram que a lasiodiplodana derivatizada apresentou um incremento dose-dependente de APTT e TT do que a lasiodiplodana nativa, além de não apresentar inibição no teste de coagulação controle.

Recentemente foi reportada a modificação química da lasiodiplodana por carboximetilação, a qual melhorou sua solubilidade em água e sua capacidade antioxidante (KAGIMURA et al., 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ORGANISMO E REAGENTES

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

Os reagentes foram adquiridos comercialmente com grau de pureza adequado aos experimentos.

### 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Na Figura 8 está descrito um fluxograma esquemático dos procedimentos experimentais. A primeira etapa corresponde aos procedimentos envolvidos no processo de produção da lasiodiplodana. Na sequência estão representadas as atividades envolvidas na derivatização por acetilação. Em seguida, são demonstradas as etapas de caracterização do biopolímero original e modificado e por fim, as atividades de avaliação do potencial antioxidante.

#### 4.2.1 Produção Biotecnológica da Lasiodiplodana

##### 4.2.1.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, inicialmente foi transferida uma alçada de micélio do fungo para placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 horas. O micélio crescido na superfície das placas foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de sais minerais de Vogel VMSM (VOGEL 1954) e glicose (5 g.L<sup>-1</sup>) e cultivado por 48 horas a 28 °C sob agitação (180 rpm).

A pré-cultura foi homogeneizada assepticamente em mixer por 30 segundos. O homogeneizado de células foi centrifugado e sobre o micélio recuperado foi adicionada solução fisiológica esterilizada para originar uma solução padrão com absorbância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (STELUTI et al. 2004).

#### 4.2.1.2 Cultivo Submerso de *Lasiodiplodia theobromae* e Recuperação da Lasiodiplodana.

Os cultivos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL em incubadora orbital (shaker) a 28 °C, 150 rpm por 72 horas. O pH inicial do meio fermentativo foi ajustado para 5,5 através de adição de solução de ácido clorídrico (1 mol.L<sup>-1</sup>). Foi empregado meio mínimo de Vogel (VOGEL 1954) com glicose (20 g. L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono (100 mL) e o volume de inóculo foi de 10 mL.

No final do processo foram quantificados a biomassa celular, o conteúdo de açúcares redutores e o conteúdo de lasiodiplodana produzida e determinado os seguinte parâmetros de processo:

a) Fator de conversão (rendimento) do substrato em EPS ( $Y_{P/S}$ )

Foi determinado pela relação entre a quantidade de EPS produzido e a correspondente variação do substrato (fonte de carbono).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (1)$$

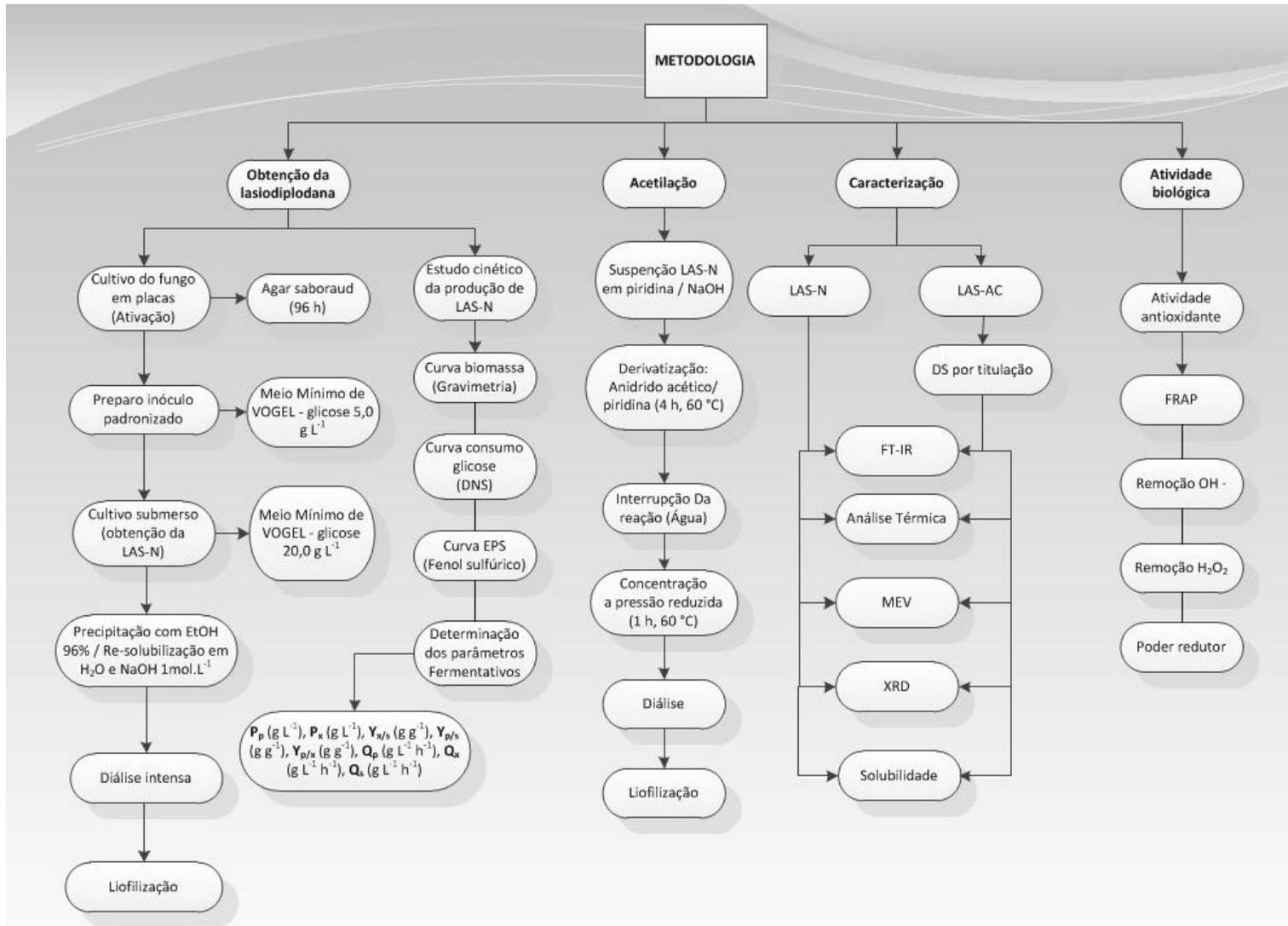


Figura 8 - Diagrama esquemático dos protocolos experimentais envolvidos na produção e caracterização da lasiodiplodana nativa e modificada

b) Fator de conversão (rendimento) do substrato em biomassa celular ( $Y_{X/S}$ )

Foi determinado pela relação entre a quantidade de biomassa celular produzida e a correspondente variação do substrato (fonte de carbono).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (2)$$

c) Produtividade volumétrica em biopolímero ( $Q_P$ )

Foi determinada pela razão entre a quantidade de EPS produzido e o intervalo do tempo correspondente.

$$Q_P = \frac{(P_f - P_i)}{\Delta t} \quad (3)$$

d) Percentual de consumo de substrato ( $Y\%$ )

O percentual de consumo de substrato foi determinado pela relação entre o conteúdo de substrato consumido e o conteúdo inicial do mesmo.

$$Y = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} \times 100 \quad (4)$$

O conteúdo de açúcar residual (consumo de substrato) presente no caldo de fermentação foi estimado através da quantificação de açúcares redutores pelo método DNS (MILLER, 1959). A produção do EPS foi determinada pela diferença entre o conteúdo de açúcares totais e açúcares redutores. O conteúdo de açúcares totais foi estimado pelo método de fenol sulfúrico (DUBOIS et al. 1956).

A biomassa fúngica foi quantificada gravimetricamente. O caldo de fermentação foi separado da biomassa por centrifugação (1500 x g 30 min.). A biomassa fúngica foi intensamente lavada com água destilada a 80 °C até completa remoção do EPS e seca a 50 °C até massa constante.

No final do processo fermentativo o EPS foi recuperado para ser empregado na etapa de modificação química. Para tanto, o caldo fermentado foi intensamente

dialisado contra água destilada (4°C) usando tubos de diálise (1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich). Posteriormente, o EPS foi precipitado com etanol absoluto a 4 °C (overnight em geladeira). O precipitado foi separado por filtração em papel filtro e foi ressolubilizado em água destilada a 60 °C sob agitação. O material obtido foi novamente submetido a intensa diálise contra água destilada e liofilizado.

#### 4.2.2 Acetilação da Lasiodiplodana

A acetilação do exopolissacarídeo foi realizada seguindo protocolo descrito por Ma et al. (2012) com pequena adaptação. O exopolissacarídeo liofilizado (1,5 g) foi disperso em 300 mL de piridina, e a mistura foi agitada a 60 °C durante 30 min, em seguida 300 mL de uma solução de piridina e anidrido acético (AC<sub>2</sub>O), (180:120, 240:60, 270:30 e 185:7,5 mL.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados. A mistura de reação foi mantida a 60 °C durante 4 h. Água destilada (250 mL) foi adicionada para reagir com o excesso de ácido acético, e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. Etanol anidro foi adicionado à solução concentrada e a mistura mantida sob refrigeração a 5 °C (toda a noite). O precipitado foi, então, filtrado em papel filtro e lavado três vezes com etanol anidro. O precipitado resultante foi suspenso em água destilada e liofilizado. Estas amostras foram nomeadas como LAS-AC.

O percentual de grupo acetila (AG) e o grau de substituição (DS) foram determinados conforme descrito por Das et al. (2010):

$$AG (\%) = \frac{[(b-s) \times M \times 43]}{w} \times 100 \quad (5)$$

Onde, b é o volume de HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup> utilizado para titulação em branco (L), s é o volume de HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup> utilizado para titulação da amostra (L), M é a concentração de HCl em mol.L<sup>-1</sup>, W é a massa da amostra (g, base seca) e 43 é a massa molecular (g.mol<sup>-1</sup>) do grupo acetil.

O grau de substituição (DS) foi determinado como segue:

$$DS = \frac{162 \times AG}{4300 - 42AG} \quad (6)$$

Onde, 42 a massa molecular ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) do grupo acetil desprotonado e 162 é a massa molecular ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) da unidade monomérica de glicose da lasiodiplodana.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DA LASIODIPLODANA NATIVA E MODIFICADA

#### 4.3.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos em espectrofotômetro (FT-IR Spectrometer Frontier, Perkin Elmer, USA) na região de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , com 32 acumulações e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , usando o método de discos de KBr com concentração final de amostra de 1% e refletância total atenuada (ATR).

#### 4.3.2 Análise Térmica

Amostras liofilizadas de lasiodiplodana nativa e acetilada foram submetidas à Análise Térmica Diferencial (DTA), Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimétrica Derivada (DTG), realizadas em equipamento SDT Q600 (TA Instruments, USA). A perda de massa foi acompanhada entre  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$  com taxa de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e ar sintético com fluxo de  $50\text{ mL.min}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Análise por Difração de Raios-X

Para obtenção dos padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras foi utilizado difratômetro Rigaku, modelo MiniFlex600, 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  $10^{\circ}$  a  $60^{\circ}$  ( $2\theta$ ), velocidade de  $5\text{ }^{\circ}.\text{min}^{-1}$  e passo de 0,02 graus.

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia superficial da lasiodiplodana nativa e dos derivados. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de bancada (Hitachi, modelo

TM3000, USA) a partir das amostras liofilizadas. As amostras foram dispostas no suporte do equipamento aderidas em fitas de carbono e as micrografias foram obtidas com amplitudes de 400 vezes, 800 vezes e 1500 vezes.

#### 4.3.5 Análise da solubilidade em água

Para analisar a hidrossolubilidade da lasiodiplodana nativa e dos derivados empregou-se o protocolo descrito por Wang et al. (2012) com adaptações. As amostras (100 mg) foram suspensas em água destilada (8 mL) e a suspensão foi agitada a 25°C por 24 horas. Após centrifugação a 3000 X g por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e quantificado o conteúdo de açúcares totais pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al. 1956). O conteúdo de açúcares totais foi diretamente relacionado com a quantidade de carboidratos solúveis, considerando o grau de pureza do biopolímero (95 % de carboidrato).

#### 4.4 Atividade Antioxidante

O potencial antioxidante das amostras de lasiodiplodana nativa e modificada foi avaliado através dos seguintes protocolos analíticos *in vitro*.

##### 4.4.1 Avaliação do poder de redução do íon férrico (FRAP)

A atividade antioxidante total foi determinada pelo método de FRAP, o qual avalia a capacidade antioxidante de redução do íon férrico. Este ensaio mede a mudança na absorbância a 593 nm devido a formação de coloração azul de Fe (II)-tripiridiltriazina gerada a partir do composto Fe (III) oxidado por doação de elétrons de um antioxidante. O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 10 volumes de tampão de acetato (300 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 3,6), 1 volume de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina, 10 mmol.L<sup>-1</sup>) dissolvido em solução de HCl (40 mmol.L<sup>-1</sup>) e 1 volume de FeCl<sub>3</sub> (20 mmol.L<sup>-1</sup>). O reagente de FRAP (1,5 mL) foi aquecido a 37 °C e a leitura do branco do reagente foi feita a 593 nm. Em seguida, 50 µL de amostra e 150 µL de água deionizada foram adicionados ao reagente de FRAP. A diluição final da amostra na mistura de reação foi 1:34. A análise foi feita em triplicata. Após a adição da amostra ao reagente FRAP, uma segunda leitura a 593 nm foi realizada

após 8 min. A leitura do branco inicial foi subtraída da leitura final do reagente FRAP com a amostra para determinar o valor da amostra de FRAP. Uma curva padrão foi preparada utilizando-se diferentes concentrações (100-1000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . O resultado final foi expresso como a concentração de antioxidantes com capacidade de reduzir o íon férrico equivalente ao de 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . As leituras espectroscópicas foram determinadas mediante espectrômetro UV-visível (Thermo scientific Evolution, 60S UV-Visible spectrophotometer).

#### 4.4.2 Poder redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com Liu et al. (2010), utilizando uma mistura de 2,5 mL das soluções com amostra ou ácido ascórbico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) incubado com 2,5 mL de ferricianeto de potássio ( $1\% \text{ m.v}^{-1}$ ) a  $50^\circ\text{C}$  por 20 minutos. A reação foi finalizada por adição de 2,5 mL de solução TCA (ácido tricloroacético  $10\% \text{ m.v}^{-1}$ ) seguido da adição de 5 mL de água deionizada e 1 mL de solução de cloreto férrico ( $0,1\% \text{ m.v}^{-1}$ ). A absorbância foi mensurada a 700 nm. Uma maior absorbância da mistura indica maior poder redutor da amostra.

#### 4.4.3 Atividade de sequestro do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

A capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi mensurada de acordo com Liu et al. (2010). O reagente continha 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , recém preparado), 1 mL de suspensão da amostra ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 0,1 mL de molibdato de amônio ( $3\% \text{ m.v}^{-1}$ ), 10 mL de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $2 \text{ mol.L}^{-1}$ ), e 7 mL de KI ( $1,8 \text{ mol.L}^{-1}$ ). A mistura foi titulada com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) até que a cor amarela desaparecesse. A atividade de remoção foi calculada como:

$$\% \text{ Remoção de } \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{(V_0 - V_1)}{V_0} \times 100 \quad (7)$$

Sendo que,  $V_0$  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 das misturas contendo as amostras.

#### 4.4.4 Atividade de sequestro do radical hidroxila (HO•)

A atividade de sequestro do radical hidroxila (HO•) foi analisada seguindo procedimento de Liu et al. (2010) com pequena adaptação. Os radicais hidroxila foram gerados a partir de FeSO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e detectados pela capacidade de hidroxilar o salicilato. A mistura reacional (2mL) continha 0,5 mL de FeSO<sub>4</sub> (1,5 mmol.L<sup>-1</sup>), 0,35 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mmol.L<sup>-1</sup>), 0,15 mL de salicilato de sódio (20mmol.L<sup>-1</sup>) e 1 mL das diferentes amostras. Ácido ascórbico (1g.L<sup>-1</sup>) foi utilizado como controle positivo. Após incubação por 1 hora a 37 °C, a absorvância do complexo salicilato-hidroxilado foi medido em espectrofotômetro a 562 nm. A porcentagem de remoção foi calculada conforme equação abaixo:

$$\% \text{ de Remoção de HO} \bullet = \left[ 1 - \frac{(A1-A2)}{A0} \right] \times 100 \quad (8)$$

Sendo que: A1 representa a absorvância da amostra ou do ácido ascórbico. A0 a absorvância do controle e A2 a absorvância do branco reagente com salicilato de sódio.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil cinético da produção da lasiodiplodana

As condições nutricionais fornecidas pelo meio de cultivo associada as condições de temperatura e agitação promoveram elevado crescimento celular e boa produção do exopolissacarídeo conforme pode ser observado no gráfico da Figura 9. Os dados descritos no gráfico da cinética de cultivo demonstram que houve efetivo consumo do substrato glicose até 36 horas de cultivo, sendo verificado consumo de quase todo o substrato ( $Y_C$ : 98.7%) neste período. A taxa global de consumo de substrato ( $Q_S$ ) em 72 h de cultivo foi  $0,31 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , a qual foi acompanhada por um rendimento em EPS ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,08 \text{ g.g}^{-1}$  e produtividade volumétrica em EPS ( $Q_P$ ) de  $0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  conforme descrito na Tabela 1.

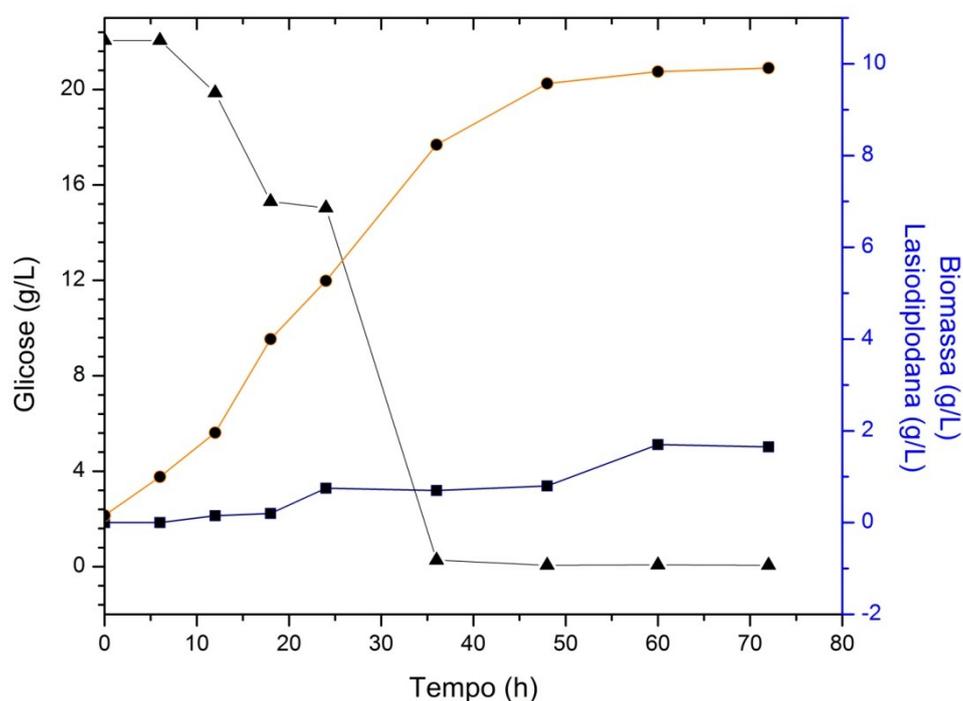


Figura 9 - Cinética da produção da lasiodiplodana em cultivos conduzidos em frascos agitados. Consumo de glicose (▲), Crescimento da biomassa micelial (●), Produção de lasiodiplodana (■)

O consumo do substrato glicose verificado nos cultivos submersos conduzidos em frascos Erlenmeyer no presente trabalho são superiores aos descritos por Kagimura et al. (2015) em ensaios conduzidos em biorreator de

bancada. Tais autores também empregaram glicose como substrato limitante na concentração de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e verificaram um percentual global de consumo de glicose de 81,3%. Similarmente, Cunha et al. (2012) também observaram menor consumo do substrato glicose tanto em cultivos em frascos agitados (69,6%) como em ensaios em biorreator (69,5%), entretanto tais autores empregaram concentração bem superior de glicose ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) no meio de cultivo.

Por outro lado, tanto Kagimura et al. (2015) e Cunha et al. (2012) obtiveram melhores resultados de rendimento em EPS ( $0,58 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente) e produtividade volumétrica ( $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $0,06 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente).

Concomitantemente a produção do exopolissacarídeo ocorreu intenso crescimento celular, sendo observado aumento linear do conteúdo de biomassa micelial até 48 horas de cultivo ( $9,57 \text{ g.L}^{-1}$ ). Possivelmente há uma correlação entre crescimento celular e produção do biopolímero. Este comportamento foi descrito por Kagimura et al. (2015) em cultivos conduzidos em biorreator de bancada, o qual foi mais pronunciado e portanto melhor visualizado pelas curvas de ajustes de crescimento celular e produção do biopolímero. Por outro lado, pouco crescimento celular foi verificado após 48 h, atingindo um conteúdo máximo de  $9,9 \text{ g.L}^{-1}$  em 72 h, o que pode ser explicado pela exaustão do substrato no meio após este período. Maiores conteúdos de biomassa celular ( $17,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram descritos por Cunha et al. (2012) em ensaios em frascos agitados mas em cultivos usando  $40 \text{ g.L}^{-1}$ .

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos do processo de produção da lasiodiplodana

Parâmetros fermentativos	Valores
$P_p \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$1,65 \pm 0,10$
$P_x \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$9,91 \pm 0,07$
$Y_{x/s} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,44
$Y_{p/s} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,08
$Y_{p/x} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0,17
$Q_p \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,02
$Q_x \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,14
$Q_s \text{ (g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0,30

$P_p$  - Produção de Lasiodiplodana,  $P_x$  - produção de biomassa,  $Y_{x/s}$  - Fator de conversão de substrato em Biomassa,  $Y_{p/s}$  - Fator de conversão de substrato em produto,  $Y_{p/x}$  - Produto formado por unidade de células,  $Q_p$  - Produtividade volumétrica em produto,  $Q_x$  - Produtividade volumétrica em biomassa,  $Q_s$  - Taxa global de consumo do substrato.

Em 72 h de cultivo foi observado uma conversão de substrato em biomassa celular ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,44 \text{ g.g}^{-1}$  e produtividade volumétrica em biomassa ( $Q_x$ ) de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Maiores valores de rendimento em biomassa ( $0,62 \text{ g.g}^{-1}$ ) foram encontrados por Cunha et al. (2012), entretanto tais autores obtiveram valores similares de produtividade em biomassa celular ( $0,14 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) considerando que o tempo de cultivo foi superior (120 h). No entanto, Kagimura et al. (2015) descreveram menores valores de rendimento em biomassa ( $0,23 \text{ g.g}^{-1}$ ) e produtividade volumétrica em biomassa ( $0,05 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

No final do bioprocesso foi observado o surgimento de pigmentação escura junto a biomassa micelial (Figura 10 B). Tal pigmentação pode estar associada a possível produção de melanina como resposta a uma condição de estresse do microrganismo (DONG; YAO 2012 e KAGIMURA et al. 2015) em função de possível limitação da disponibilidade de oxigênio e limitação nutricional.

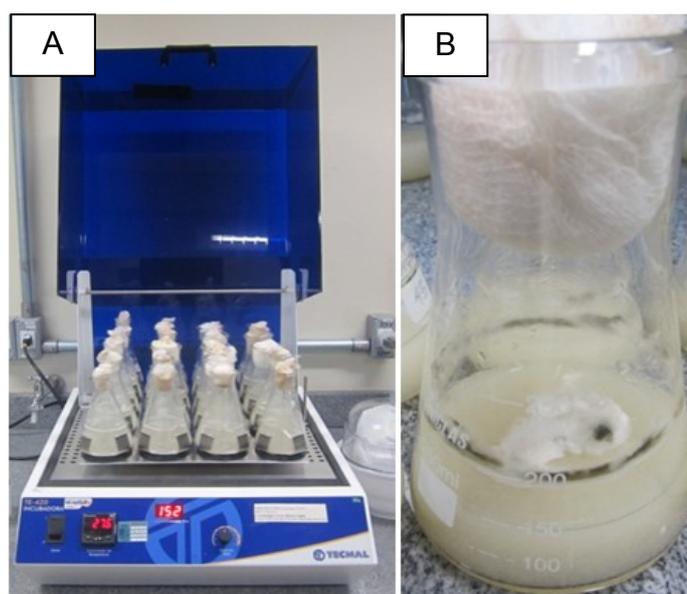


Figura 10 - Cultivo submerso do *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (A). Aspecto da biomassa celular no final do cultivo, 72 h (B)

O acúmulo de biopolímero no caldo de cultivo promove grande aumento da viscosidade do meio e conseqüentemente limita a transferência de oxigênio para as células. Da mesma forma, o acúmulo de biomassa celular também contribui para mudanças nas condições da dinâmica de transferência de massa. O surgimento de pigmentação escura junto a biomassa celular ou mesmo junto ao biopolímero como resultado de possível condição de estresse microbiano é descrito na literatura.

## 5.2 Caracterização estrutural da lasiodiplodana nativa e modificada

### 5.2.1 Grau de acetilação dos derivados

O grau de substituição (DS) é definido como a média do número de sítios por unidade de glicose que tem um grupamento substituinte, neste caso grupamentos acetila (DAS et al. 2010).

O método da hidrólise alcalina foi utilizado para a determinação do DS dos derivados acetilados obtidos, considerando que este é um método simples e amplamente descrito na literatura científica. O método baseia-se na hidrólise completa das ligações éster presentes na macromolécula com solução de hidróxido de sódio e a posterior titulação do excesso de NaOH com HCl. Conforme demonstrado na figura 11, a carga parcial negativa do carbono 4 (considerado apenas como um exemplo) gerada pela ligação éster de acetato é desestabilizada pelo grupamento hidroxila da molécula NaOH, produzindo acetato de sódio.

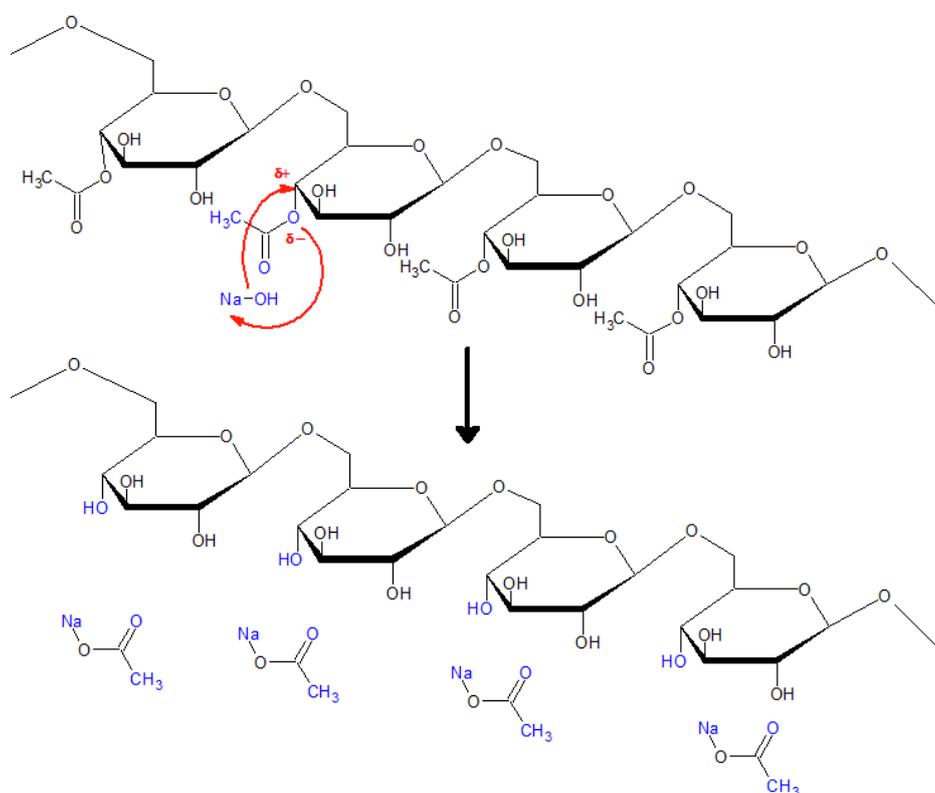


Figura 11 – Representação esquemática da hidrólise alcalina da ligação éster pela solução de hidróxido de sódio

Como as moléculas de NaOH reagem com os grupos acetila das macromoléculas acetiladas, a quantidade de HCl para neutralizar o meio alcalino deve ser menor que o controle branco (MULJANA et al. 2010), visto que não há esterificação na molécula nativa.

Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados referentes ao percentual de grupos acetila (AG) e o grau de substituição (DS) verificados nas amostras acetiladas obtidas nas reações de derivatização usando diferentes quantidades do agente derivatizante.

Tabela 2 - Percentual de grupamentos acetila (AG) e valores de DS

Volume de Anidrido Acético	NaOH 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (mL)	NaOH 0,45 mol.L <sup>-1</sup> (mL)	HCl 0,2 mol.L <sup>-1</sup> (mL)	Massa LAS-AC (g)	AG	DS
Branco	0,1	25,0	58,0	N. A	N. A	N. A
120 mL	0,1	25,0	52,1	0,2009	25,256	1,263
60 mL	0,1	25,0	52,9	0,2020	21,713	1,038
30 mL	0,1	25,0	54,4	0,2071	14,949	0,660
7,5 mL	0,1	25,0	55,3	0,2022	11,484	0,487

N.A: Não se aplica; AG: % Grupos acetila; DS: Grau de Substituição.

Os resultados do percentual de grupos acetila e DS de cada amostra acetilada, demonstram que a quantidade de anidrido acético influencia diretamente o grau de substituição do derivado. Considerando que o valor máximo teórico do DS na glucana estudada é 3, devido à existência de três grupos hidroxila livres por monômero de glicose constituinte do polímero, a eficiência da reação foi calculada. Os valores de eficiência da acetilação observado foram 16% (DS 0,48), 22% (DS 0,66), 34,3% (DS 1,03) e 42,1% (DS 1,26). O aumento do conteúdo de anidrido acético empregado no protocolo de derivatização levou ao aumento do grau de substituição.

O tempo de reação e a concentração do agente derivatizante são parâmetros que influenciam fortemente o grau de substituição (DS) de uma molécula. Souza et al., (2015) avaliaram a correlação entre a concentração do anidrido acético e o DS de uma  $\beta$ -glucana derivatizada extraída de aveia e verificaram que concentrações maiores de anidrido acético (6%) incorporaram maior número de grupos acetil (DS: 0,12) do que quando usando concentrações menores (4%) (DS 0,06) nas mesmas condições reacionais.

### 5.2.2 Análise dos espectros de Infravermelho (FT-IR)

A absorção na região do infravermelho ocorre quando uma molécula que contém ligações covalentes, as quais possuem momento dipolo, absorve energia gerando uma maior vibração (típica para cada ligação em seu ambiente molecular), em uma frequência específica que pode ser detectada e estudada mediante a geração de espectros (PAVIA et al. 2010).

Na Figura 12 estão demonstrados os espectros de infravermelho (normalizados) da lasiodiplodana nativa e dos derivados acetilados.

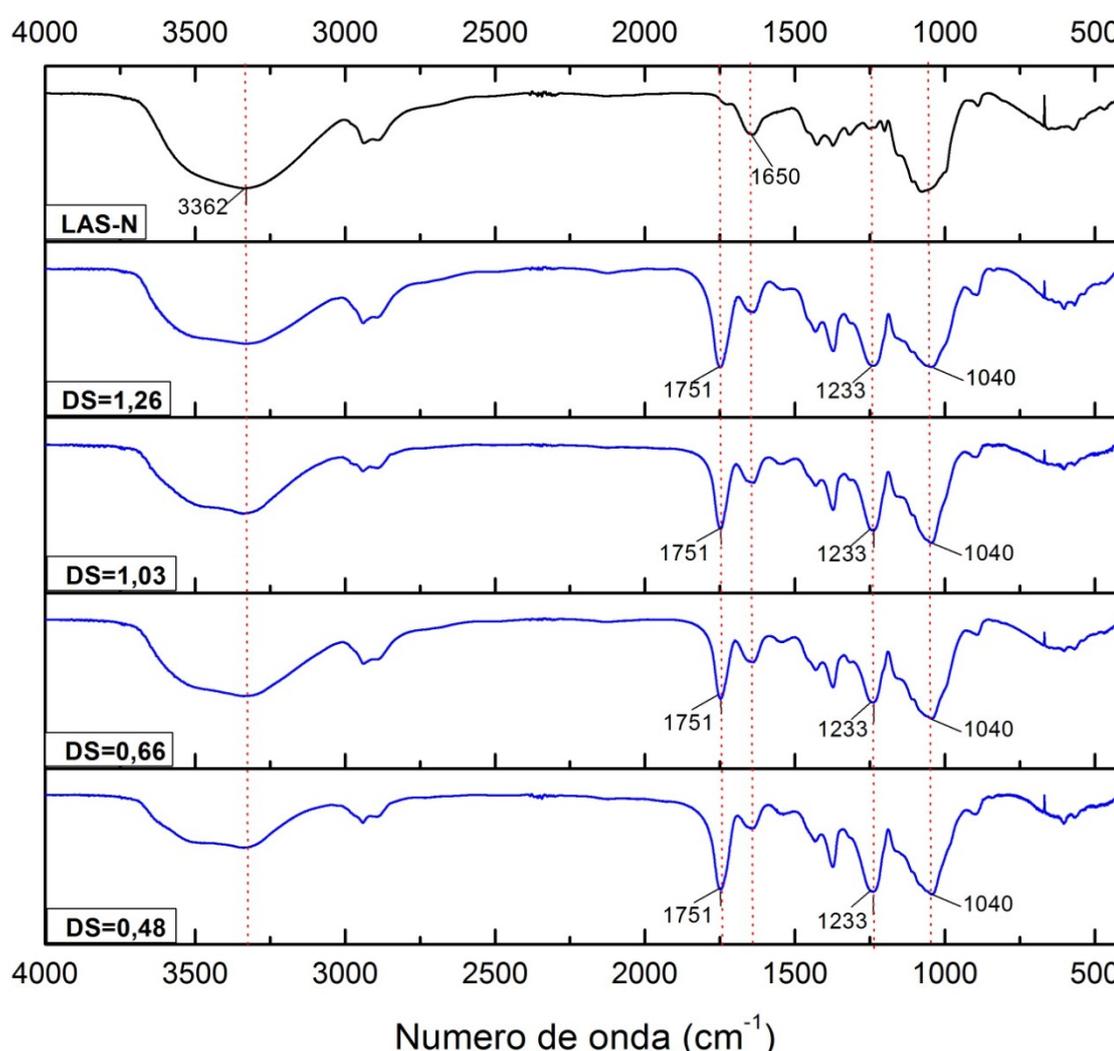


Figura 12 - Espectros de infravermelho da LAS-N e dos derivados acetilados com diferentes DS

Os espectros FT-IR da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e das amostras derivatizadas (LAS-AC) exibiram bandas de absorção características de polissacarídeos entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$  (Figura 13). No espectro da

lasiodiplodana nativa a banda larga de intensidade forte na região de  $3362\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento  $\text{-OH}$  (HU et al. 2011; PAVIA et al. 2010; REN et al. 2007; DE SOUZA et al. 2015) e a banda de intensidade média na região  $2926\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento  $\text{C-H}$  metilênico (REN et al. 2007; THOMAS 2015).

As bandas de intensidade média na região entre de  $2892\text{ cm}^{-1}$  e  $2130\text{ cm}^{-1}$ , correspondem à vibração dos acetais, incluindo os hemiacetais que são estruturas típicas de polissacarídeos, os quais são constituídos por monômeros com estrutura piranosídica ou furanosídica. A banda presente na região de  $1650\text{ cm}^{-1}$  corresponde a adsorção de água (ASHORI et al. 2014; JONOOBI et al. 2009; LE TROEDEC et al. 2008).

As bandas nas regiões  $1541\text{ cm}^{-1}$ ,  $1428\text{ cm}^{-1}$ ,  $1316\text{ cm}^{-1}$ ,  $1202\text{ cm}^{-1}$  e  $1152\text{ cm}^{-1}$  são oriundos da vibração de deformação  $\text{C-H}$  e  $\text{-OH}$ , típicas nos carboidratos e podem apresentar pequenas variações quanto ao número de onda e intensidade dependendo a natureza do polissacarídeo como descrito por Ren et al. (2007).

Vibração de deformação simétrica da ligação éster  $\text{C-O}$  das ligações glicosídicas, foram observadas na região de  $1375\text{ cm}^{-1}$  e  $1245\text{ cm}^{-1}$  com intensidade média (REN et al. 2007; THOMAS 2015). As bandas de intensidade média e fraca em  $1076\text{ cm}^{-1}$  e  $1029\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, são atribuídas à vibração de alongamento  $\text{C-O}$  que ocorre no anel de piranose presente na glucana. A banda com intensidade média na região  $888\text{ cm}^{-1}$  indica a configuração  $\beta$  da lasiodiplodana (CORRADI DA SILVA et al. 2008; REN et al. 2007; THOMAS 2015).

Nos espectros dos derivados acetilados da lasiodiplodana observa-se a banda de absorção em  $3343\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à vibração de estiramento própria do grupo  $\text{-OH}$  ligado a um carbono (HU et al. 2011; DE SOUZA et al. 2015; THOMAS 2015).

A absorção em  $2941\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento simétrico  $\text{CH}$  nos grupos  $\text{C-H}_2$ . Em  $1751\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda de absorção com intensidade muito alta que esta sendo atribuída ao grupo carbonila ligado ao monômero de glicose por ligação éster  $\text{-O(C=O)}$  (HU et al. 2011; REN et al. 2007; DE SOUZA et al. 2015; THOMAS 2015).

Nas regiões  $1384\text{ cm}^{-1}$  e  $1233\text{ cm}^{-1}$  bandas de absorção com intensidade forte são atribuídos à vibração da ligações  $\text{C-H}$  de metila e da ligação  $\text{C-O}$  de éster

respectivamente (REN et al. 2007). Vibração de alongamento simétrico é atribuída à banda  $1040\text{ cm}^{-1}$  (CHEN et al. 2014). Vibração do carbono anomérico em configuração  $\beta$  é atribuída à banda com alta intensidade em  $901\text{ cm}^{-1}$  e a banda com intensidade média em  $835\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de deformação C-H (CHEN et al. 2014; CORRADI DA SILVA et al. 2008; THOMAS 2015).

Conforme demonstrado na Figura 13 A, diferenças notórias nos espectros de infravermelho das amostras de lasiodiplodana nativa e acetilada (derivado com DS de 1,26) são verificadas.

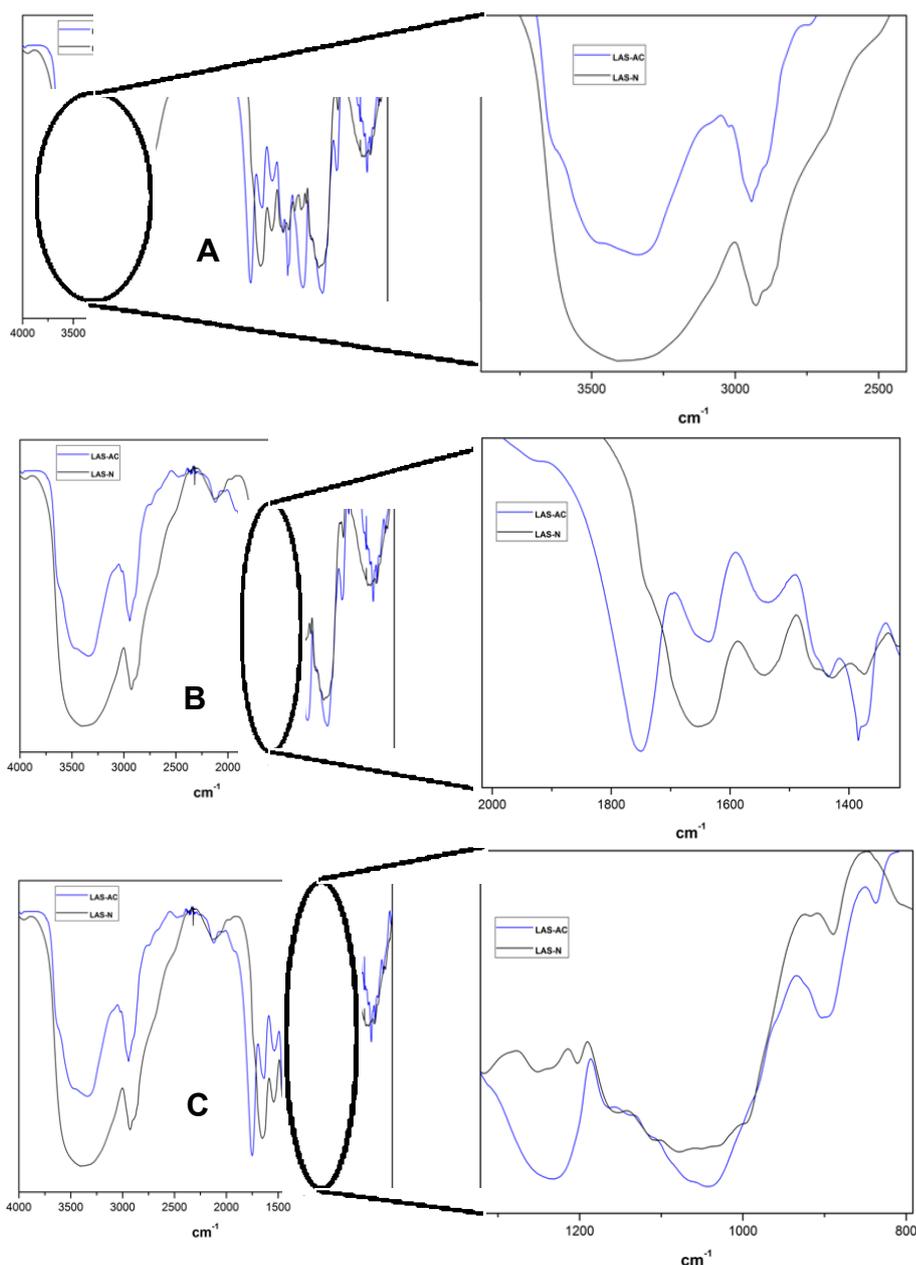


Figura 13 - Ampliação das regiões dos espectros normalizados da LAS-N e LAS-AC com DS de 1,26. (A) região  $3800 - 2800\text{ cm}^{-1}$ , (B) região entre  $1800$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$ , (C)  $1300$  e  $800\text{ cm}^{-1}$

Na região entre  $3800\text{ cm}^{-1}$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$  pode ser verificada que a intensidade da banda correspondente ao grupo  $-\text{OH}$  diminui bastante na LAS-AC (amostras acetiladas). Como consequência desta redução de absorção, novas bandas que estavam escondidas por sobreposição aparecem ( $3632\text{ cm}^{-1}$  e  $3480\text{ cm}^{-1}$ ). Tal fenômeno é justificado pela substituição dos grupos hidroxila por grupos acetila, o que de fato diminui a absorção característica do grupo  $-\text{OH}$  (HU et al. 2011), indicando a derivatização do polissacarídeo por acetilação. Duas novas bandas de intensidade baixa são encontradas nos espectros das amostras LAS-AC na região de  $3632\text{ cm}^{-1}$  e  $3480\text{ cm}^{-1}$  e correspondem a vibrações de interações intramoleculares e intermoleculares (THOMAS 2015).

Na região entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$  (Figura 13 B) uma nova banda aparece no espectro da LAS-AC. Banda de intensidade muito alta em  $1751\text{ cm}^{-1}$  atribuída à presença de grupos carbonila  $\text{C}=\text{O}$  (grupo acetil substituto do grupo  $-\text{OH}$ ) é verificada. Também foi verificado que nos espectros FT-IR das amostras acetiladas há diminuição na banda correspondente à adsorção de água. Possivelmente a introdução de grupos acetila na lasiodiplodana pode ter contribuído para maior organização da macromolécula (cristalinidade) e consequente redução na adsorção de água. Contreras et al. (2010) descreve que o aumento da cristalinidade em polissacarídeo pode resultar na redução da adsorção de água.

A ampliação do espectro na região compreendida entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  e  $800\text{ cm}^{-1}$  está representada na Figura 13 C. As bandas verificadas nas regiões  $1233\text{ cm}^{-1}$  e  $1041\text{ cm}^{-1}$  apresentam maior intensidade no espectro da LAS-AC comparado ao espectro da LAS-N. Tal condição pode ser explicada pela substituição de grupos hidroxilas do polissacarídeo nativo por grupamentos éster do acetato  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})$  (banda em  $1233\text{ cm}^{-1}$ ) presentes na molécula derivatizada, bem como ao aumento da vibração (C-O) (banda em  $1041\text{ cm}^{-1}$ ).

Nova banda com intensidade baixa que corresponde ao aumento na tensão C-H pelo grupamento acetila inserido na molécula nativa aparece em  $835\text{ cm}^{-1}$  nos espectros da amostras LAS-AC (THOMAS 2015)

### 5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura em diferentes amplitudes (400, 800 e 1500 vezes) das amostras de lasiodiplodana nativa e acetiladas estão demonstradas na Figura 14.

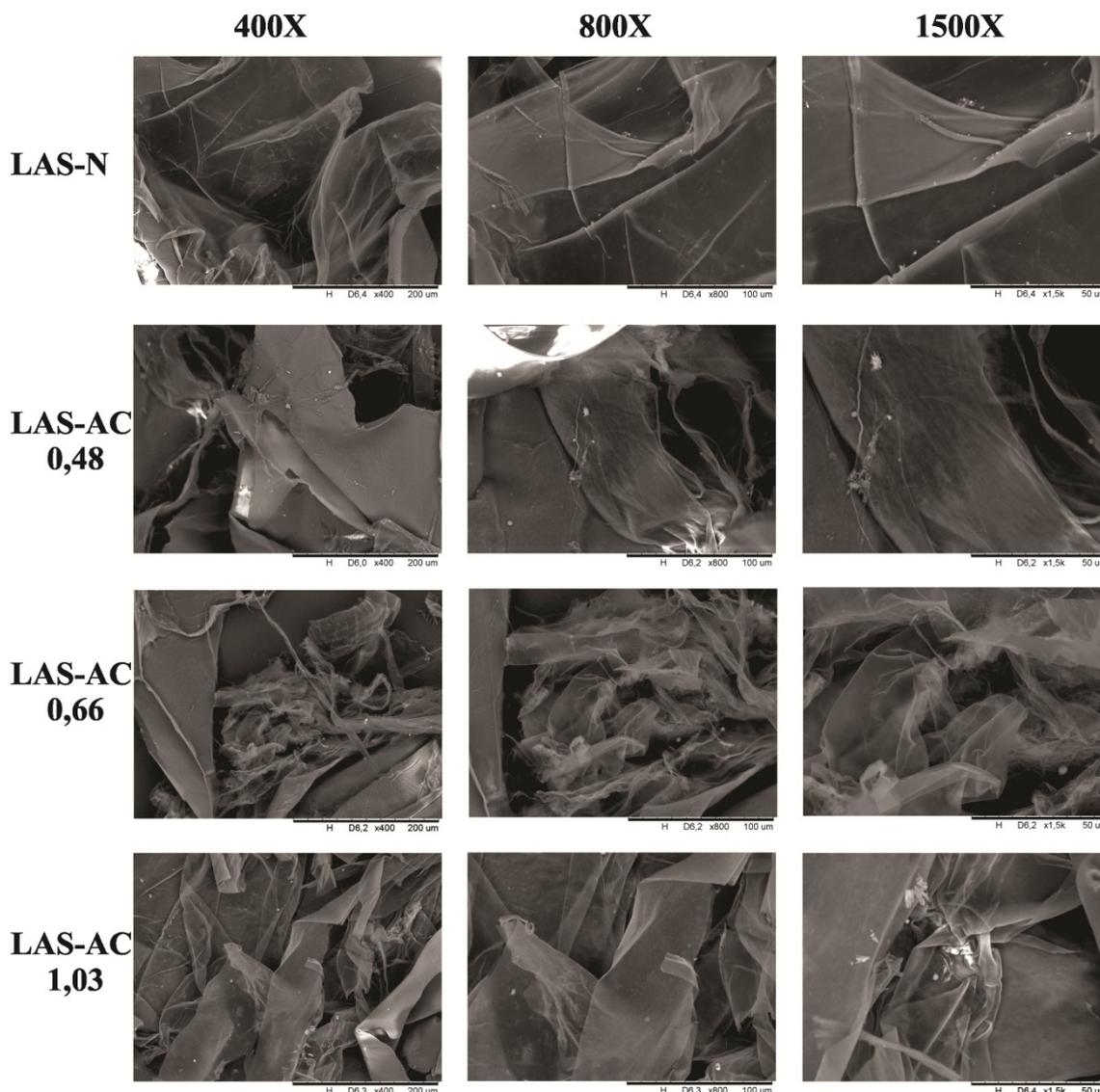


Figura 14 - Micrografias (MEV) da lasiodiplodana nativa (LAS-N) e dos derivados acetilados (LAS-AC) com diferentes graus de substituição (DS: 1,26; 1,03; 0,48) em amplitudes de 400 X, 800 X e 1500 X

As micrografias da LAS-N revelam que o biopolímero apresenta uma estrutura morfológica na forma de filme fino, com aspecto translúcido e dobras ao longo de sua extensão. Não foram evidenciadas estruturas granulares distribuídas sobre placas irregulares como descrito anteriormente por F. Kagimura et al., (2015) em micrografias de lasiodiplodana nativa produzida em fermentador STR. Possivelmente as condições de cultivo do fungo podem ter influência sobre a estrutura morfológica do biopolímero, visto que no presente estudo as fermentações

foram conduzidas em frascos agitados e portanto, as condições dinâmicas do sistema são diferentes.

As amostras de LAS-AC apresentaram estrutura morfológica um pouco diferente da LAS-N e aparentemente o grau de acetilação influencia o aspecto morfológico do biopolímero. Estrutura morfológica na forma de filmes continua sendo observada em todas as amostras acetiladas, independentemente do grau de substituição, porém com diferenças quanto a translucidez, espessura e homogeneidade do filme.

Filmes com menor translucidez e aparentemente mais espessos são verificados nas micrografias da LAS-AC com DS de 0,48. Por outro lado, filmes com maior translucidez, aparentemente mais finos e mais aglomerados são verificados nas amostras LAS-AC com DS de 0,66, comparada a amostra com DS de 0,48. Outro aspecto que chama a atenção é que as amostras com DS de 1,03 apresentam secções com o filme rompido ao longo de sua estrutura, o que não é verificado nas demais micrografias.

Hu et al. (2011) demonstraram por meio de ensaios em MEV, que a estrutura de nanofibras de celulose que formam uma rede ultrafina foi alterada quando modificada quimicamente por acetilação, gerando superfícies mais ásperas. Souza et al. (2015) analisaram a ultraestrutura de  $\beta$ -glucana extraída de aveia e seus derivados acetilados e verificaram diminuição na porosidade, compactação e suavidade na superfície dos derivados acetilados, quando comparados com a glucana nativa.

#### 5.2.4 Análise Térmica

Na Figura 15 estão descritos as curvas de análise termogravimétrica (TGA), termogravimétrica derivada (DTG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) da lasiodiplodana nativa e dos derivados acetilados.

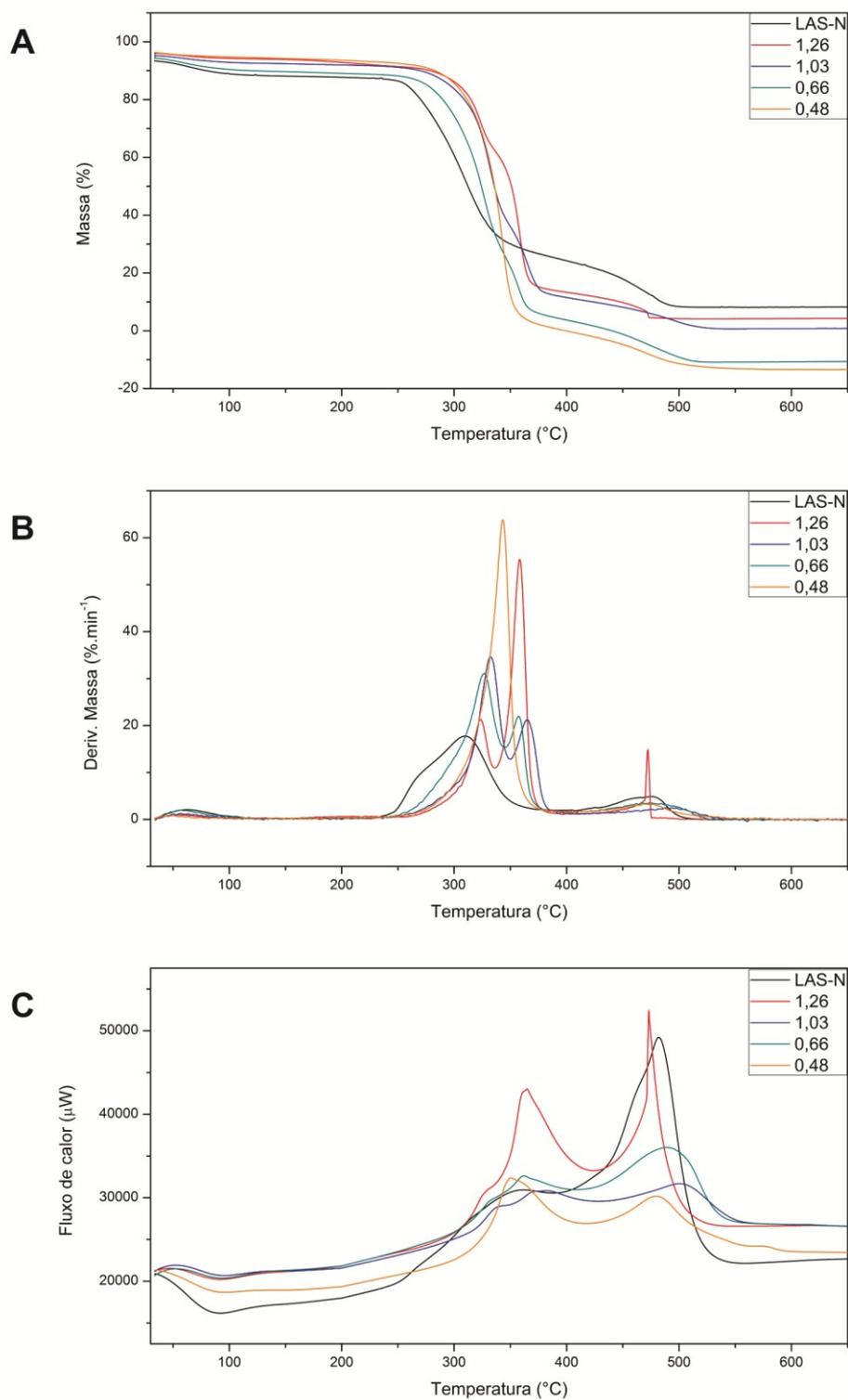


Figura 15 - Curvas de análise termogravimétrica (A), termogravimétrica derivada (B) e calorimetria diferencial de varredura (C) de lasiodiplodana nativa e derivados acetilados

De acordo com os dados obtidos pelas técnicas termo analíticas a lasiodiplodana nativa apresentou 3 estágios de perda de massa. O primeiro evento

de perda de massa ocorreu até 127 °C, sendo atribuído a eliminação de água e confirmado em 63 °C pela curva DTG e um pico endotérmico na curva DSC (222,55 J.g<sup>-1</sup>). Em seguida, dois estágios de perda de massa são evidenciados na curva TG entre 200 °C e 400 °C e confirmados na curva DTG a 310 °C e 475 °C e na curva DSC por dois picos exotérmicos (5752 J.g<sup>-1</sup>). Estes últimos dois eventos de perda de massa foram atribuídos à degradação térmica do biopolímero e a carbonização da amostra de LAS-N, consecutivamente.

Os derivados acetilados (com exceção do DS 0,48) apresentaram 4 estágios de perda de massa. O primeiro evento ocorreu entre 30 °C e 130 °C (85,28 J.g<sup>-1</sup> - 168,5 J.g<sup>-1</sup>) e foi atribuído a perda de água, correspondente com um pico endotérmico nas curvas DSC em todas as amostras acetiladas. O segundo estágio ocorreu entre 200°C e 393 °C e foi atribuído à decomposição dos derivados acetilados, sendo evidenciado pelos picos exotérmicos nos gráficos DSC. O terceiro evento de perda de massa foi atribuído a decomposição por oxidação e ocorreu na faixa de temperatura entre 334 °C e 392 °C (4104 J.g<sup>-1</sup> – 6868 J.g<sup>-1</sup>). O último estágio foi atribuído á decomposição final das amostras acetiladas verificadas pelos picos exotérmicos nas curvas DSC que ocorreram na faixa de temperatura entre 381°C e 480 °C. O derivado acetilado com menos grupos hidroxilas substituídos (DS 0,48) apresentou somente três estágios de perda de massa, assim como observado na amostra LAS-N. Tal similaridade de comportamento térmico possivelmente está associado ao fato da amostra derivada com DS 0,48 apresentar menor modificação quanto a estrutura original da lasiodiplodana.

Como pode ser verificado na Tabela 3, todas as amostras acetiladas demonstraram menor perda de água comparadas a lasiodiplodana nativa. Tal fenômeno também foi indicado pela análise por espectroscopia no infravermelho (FT-IR) através da diminuição da banda atribuída a adsorção de água (1650 cm<sup>-1</sup>) conforme mostrado na Figura 12.

Tabela 3 - Conteúdo de perda de massa das amostras de LAS-N e LAS-AC

Faixa	LAS-N	%	DS 1,26	%	DS 1,03	%	DS 0,66	%	DS 0,48	%
	°C	Perda de massa								
1	30-125	11,88	30-128	5,94	30-124	7,39	30-130	10,11	30-125	5,5
2	200-400	75,19	200-334	36,36	216-344	60,41	205-336	66,46	230-393	97,47
3	400-500	91,76	334-386	85,85	344-392	87,98	336-381	95,08	410-480	99,6
4	N/A	N/A	426-500	95,82	425-532	99,18	381-480		N/A	N/A

N/A: Não aplicável

Interessante destacar que tanto a LAS-N e os derivados LAS-AC apresentaram estabilidade térmica relativamente elevada (entre 200 °C e 230 °C) considerando os padrões de produção industrial da área farmacêutica e de alimentos.

### 5.2.5 Análise por Difração de Raios-X

A difração de raios X é uma técnica importante para analisar a cristalinidade da estrutura de polissacarídeos (JEDDOU et al. 2016). A Figura 16 apresenta os perfis de difração das amostras da LAS-N e LAS-AC. Foram identificados três picos de difração pronunciados a  $2\theta$  com valores próximos a 20,9°, 23,4° e 39,4° em cada um dos difratogramas dos derivados acetilados e da LAS-N. Tais picos sugerem que a lasiodiplodana possui uma estrutura amorfa com regiões semicristalinas, as quais podem ser evidenciadas com picos de alta intensidade.

São reportados na literatura alguns estudos que demonstram perfis de difração de raios X os quais indicam uma estrutura amorfa, mas contendo algumas regiões cristalinas típicas destas macromoléculas.

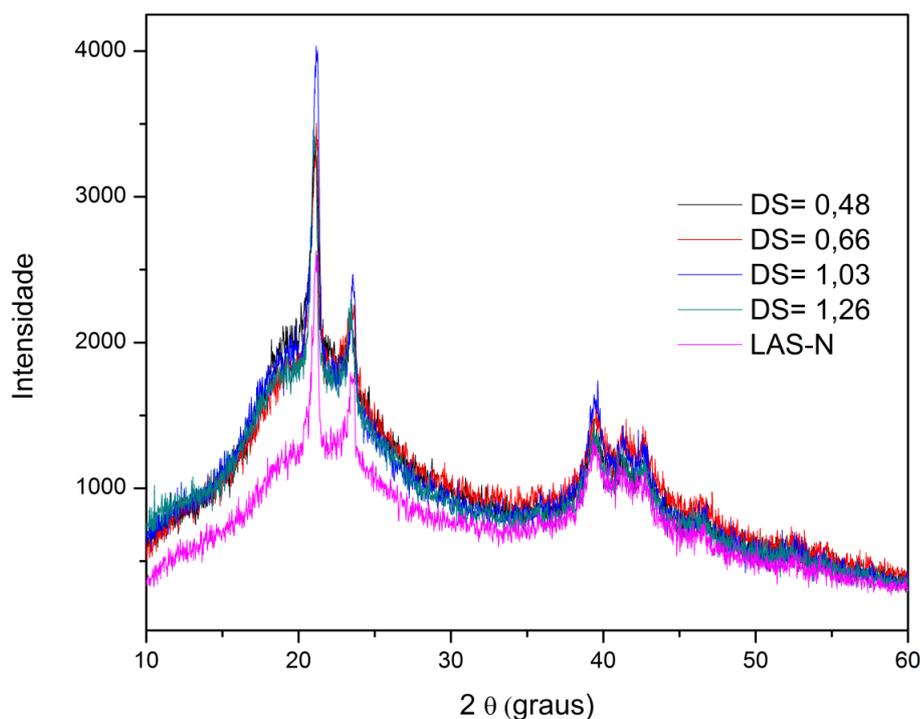


Figura 16 - Difratograma da LAS-N e dos derivados LAS-AC com DS de 1,26; 1,03; 0,66 e 0,48

A intensidade dos picos pronunciados aumenta principalmente a  $20,9^\circ$  ( $2\theta$ ) e  $23,4$  ( $2\theta$ ) nas amostras acetiladas. O aumento de tais picos possivelmente está associado a introdução de novos grupos funcionais (grupos acetil) nessa região após a derivatização. O perfil nos padrões de difração de raios X da molécula nativa é mantido nas amostras acetiladas. Entretanto, os grupos acetil contribuíram para o aumento da cristalinidade, indicando que houve modificação química nos derivados, mas sendo mantida a estrutura principal da macromolécula (Anusuya; Sathiyabama (2014) ISLAM et al. 2015, KASAT et al. 2007 e SINGH; BALA 2014).

Em estudo prévio conduzido por Kagimura et al (2015) foi verificado mudanças no perfil difratográfico em amostras de lasiodiplodana carboximetilada em relação a lasiodiplodana nativa. A amostra carboximetilada apresentou picos que sugerem uma estrutura levemente cristalina com uma orientação não preferencial. Os autores salientaram que os difratogramas indicaram modificações em pontos específicos da macromolécula após carboximetilação, mas que a estrutura principal permaneceu preservada, similarmente ao encontrado no presente estudo.

#### 5.2.6 Análise da solubilidade em água

A derivatização química de glucanas por ter influência direta na solubilidade devido a inserção de novos grupamentos químicos na molécula mãe, com conseqüente diminuição ou aumento da hidrofobicidade.

Como pode ser verificado na Tabela 4, a solubilidade da LAS-N a  $25^\circ\text{C}$  foi de  $0,93\text{ g.L}^{-1}$ . Todas as amostras derivatizadas (LAS-AC) com diferentes graus de substituição tornaram-se praticamente insolúveis à mesma temperatura após a inserção de grupamentos acetila nos grupamentos hidroxila livres da LAS-N inicial.

Tabela 4 - Solubilidade da LAS-N e derivados LAS-AC a  $25^\circ\text{C}$

DS	Massa inicial EPS (mg)	Volume de água (mL)	Massa dissolvida (mg)	Solubilidade ( $\text{g.L}^{-1}$ )
0,00	51,0	8	7,47	0,93
1,26	50,5	8	0,18	0,02
1,03	50,3	8	0,21	0,02
0,66	50,4	8	0,09	0,01
0,48	50,3	8	0,19	0,02

É esperado que a inserção de grupamentos químicos, como os grupamentos acetila, modifique a insolubilidade em água típica das  $\beta$  glucanas, pela possibilidade de redução do número de hidroxilas livres responsáveis por interações de hidrogênio intramolecular (BAI et al. 2014 e KAGIMURA et al. 2014).

No entanto, alguns trabalhos reportam que a solubilidade dos polissacarídeos diminui após a modificação química por acetilação. Liu et al. (2012) reportaram mudanças na viscosidade (como consequência de modificação na solubilidade) em bletillana (glucomanana) extraída da orquídea *Bletilla striata* modificada por acetilação. Os autores verificaram que a viscosidade era reduzida com o aumento do grau de substituição, mas em derivados com DS superiores a 0,4 o polímero tornava-se altamente viscoso.

Teleman et al. (2003) descreveram que amostras acetiladas de glicuronoxilana com altos graus de substituição ( $\geq 0,6$ ) apresentaram diminuição na solubilidade em solventes polares e foram solúveis em solventes apolares como o clorofórmio. Todas as amostras acetiladas foram solúveis em solventes polares apróticos, ou seja, aqueles que não podem doar ligações de hidrogênio.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Relatos da literatura científica sobre a atividade antioxidante de polissacarídeos, indicam que estas macromoléculas exibem resultados notórios e promissórios de atividade antioxidante, especialmente quando contém ao longo da cadeia primária moléculas como peptídeos, proteínas lipídeos, pigmentos, flavonas e compostos fenólicos. Tais moléculas conjugadas podem ser parcialmente responsáveis pela bioatividade. No entanto, os mesmos polissacarídeos em estado puro apresentam atividade moderada ou baixa (WANG et al. 2016).

Kozarski et al. (2012) afirmam que o efeito antioxidante dos carboidratos é baixo comparados aos agentes de captura clássicos dos radicais livres como Trolox, pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) e ácido ascórbico. Quando os carboidratos estão na forma polimérica (polissacarídeos) a atividade pode aumentar, porém segue sendo baixa.

A modificação química por acetilação, carboximetilação e sulfonação são mecanismos de derivatização para polissacarídeos extensamente estudados e que evidenciam que em alguns casos pode melhorar a capacidade antioxidante. Tal

bioatividade se deve ao fato de que em geral, moléculas que contenham grupamentos OH, -SH, -COOH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C=O, -NR<sub>2</sub>, -S-, e -O-, podem atuar como agentes quelantes (WANG et al. 2016).

### 5.3.1 Avaliação do Poder de Redução do íon férrico (FRAP)

O ensaio FRAP avalia o poder redutor antioxidante do íon férrico através de reação de transferência de elétrons. A reação baseia-se na redução do complexo Fe(TPTZ)<sup>3+</sup> ao complexo de cor azul Fe(TPTZ)<sup>2+</sup> que pode ser quantificado espectrofotometricamente. A Figura 17 apresenta o gráfico do potencial de redução do íon férrico expresso em  $\mu\text{Mol.L}^{-1}$  FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Neste ensaio avaliou-se a capacidade antioxidante da lasiodiplodana nativa, dos derivados acetilados, da D-glicose (unidade monomérica da lasiodiplodana) e do padrão ácido ascórbico na concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup>.

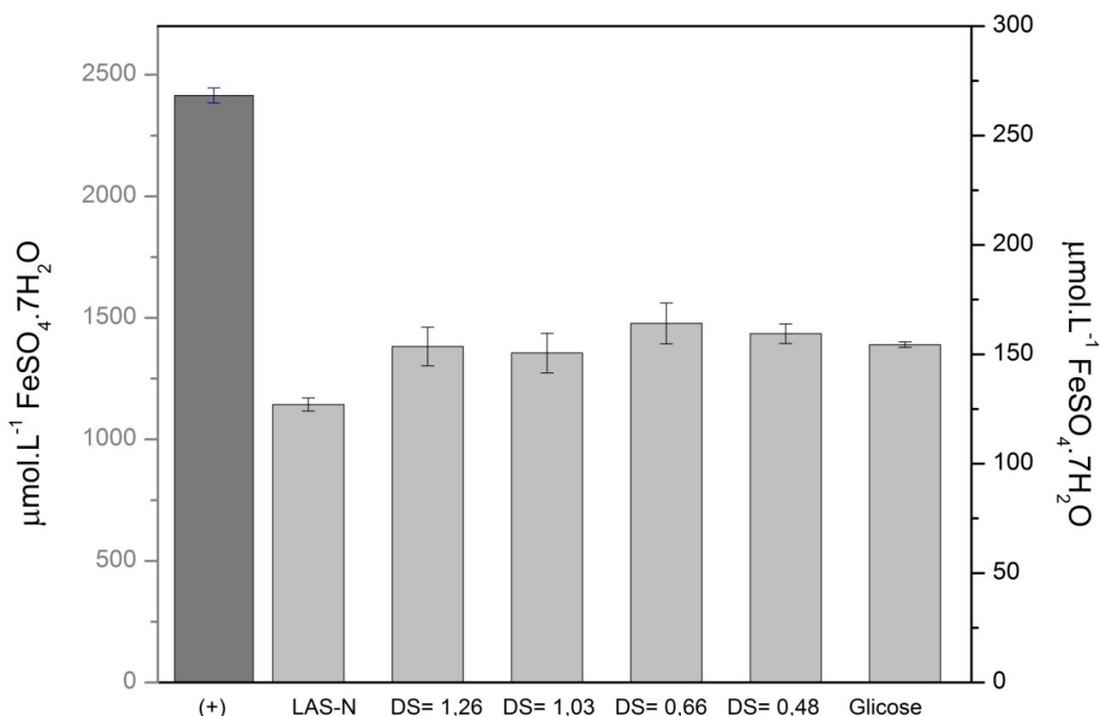


Figura 17 - Potencial de redução do íon férrico verificado nas amostras lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose

Os derivados acetilados apresentaram maior potencial de redução do íon férrico a ferroso comparados a LAS-N (127,03  $\mu\text{Mol.L}^{-1}$  de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Um aumento de 22,6% na capacidade de redução do íon férrico foi verificado no

derivado acetilado com DS de 0,66 ( $164.13 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ). Por outro lado, o derivado com DS de 1,03 ( $159.42 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ) apresentou capacidade redutora um pouco menor que o derivado com DS de 0,66.

A glicose ( $154.41 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ) apresentou potencial FRAP superior a LAS-N e similar a todos os derivados acetilados, cujo potencial redutor variou de  $153.53 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  a  $164.13 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ .

Kagimura et al.(2015) também relatou aumento do potencial FRAP em lasiodiplodana derivatizada por carboximetilação, sendo verificado valores entre  $\cong 200 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  equivalente (concentração de  $0,05 \text{mg.mL}^{-1}$ ) e  $536 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  equivalente (concentração de  $15 \text{mg.mL}^{-1}$ ). Chen et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante de polissacarídeos extraídos de *Ganoderma atrum* e modificados por acetilação e encontraram uma relação direta entre o aumento da atividade antioxidante e o grau de substituição. Entretanto, tais autores descreveram que a atividade de todos os derivados acetilados foi menor do que a molécula nativa.

### 5.3.2 Poder redutor

O ensaio do poder redutor baseia-se na avaliação da habilidade de doação de elétrons da amostra ao ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) que é reduzido a ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), gerando coloração azul da Prússia que é medida espectrofotometricamente. Na Figura 18 estão demonstrados os resultados da determinação da atividade antioxidante avaliada pelo poder redutor das amostras Giese et al. (2015) avaliaram o poder redutor de quatro diferentes  $\beta$ -glucanas (botriosferana, laminarina, curdlana e lasiodiplodana). As amostras foram analisadas em concentrações entre  $500$  e  $3000 \text{mg.L}^{-1}$ , e observaram que a lasiodiplodana apresentou dose dependência quanto a capacidade redutora. Ácido ascórbico foi utilizado como padrão e também apresentou capacidade redutora superior as glucanas avaliadas.

Deng et al. (2012) avaliaram o poder redutor de  $\beta$ -glucana extraída do fungo *Dictyophora indusiata* em concentrações entre  $100$  e  $1000 \text{mg.L}^{-1}$ . Os autores relataram dose dependência na atividade redutora e os valores de absorbância em  $700 \text{nm}$  das amostras de  $\beta$ -glucana foram menores do que o ácido ascórbico nas mesmas concentrações

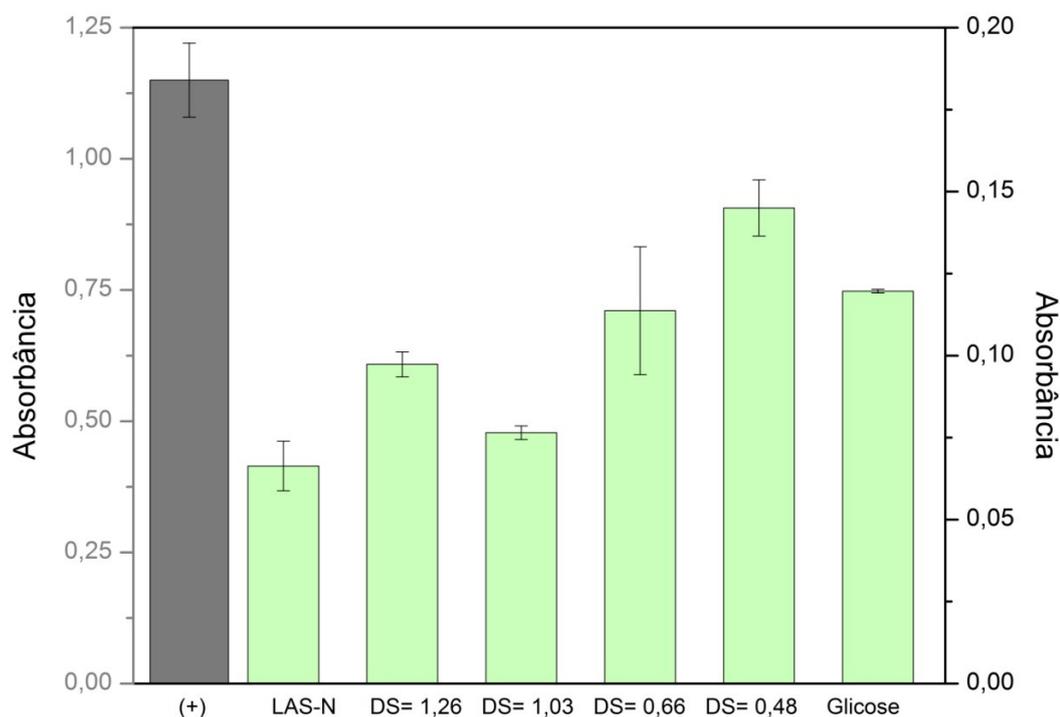


Figura 18 - Poder redutor do íon do ferro (III) verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose

O perfil geral do potencial redutor, das amostras de lasiodiplodana nativa e acetilada, avaliado pelos métodos FRAP e usando ferricianeto de potássio foi um pouco diferente. Entretanto, é importante considerar que o impedimento estérico de uma molécula pode interferir fortemente nos resultados da habilidade antioxidante, assim moléculas menores podem muitas vezes apresentar atividade antioxidante superior a moléculas maiores (TAN; LIM, 2015). Neste contexto, o complexo  $\text{Fe}^{3+/2+}$ -TPTZ gerado durante o ensaio FRAP consiste em uma estrutura química relativamente grande, contendo anéis de triazina em torno dos íons férrico/ferroso. Por outro lado, o reagente  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  empregado no protocolo de poder redutor é um sal inorgânico com estrutura mais simples que o TPTZ.

Considerando que a lasiodiplodana é uma macromolécula com rigidez estrutural característica de um polissacarídeo, possivelmente tem maior acessibilidade aos íons metálicos presentes no reagente  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  do que no complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, o que pode justificar as diferenças no perfil de redução do íon férrico verificado entre os dois métodos.

### 5.3.3 Atividade de sequestro do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante que está relacionado com a produção de radicais livres quando reage com o ferro. Embora o peróxido de hidrogênio não seja muito reativo, ele pode gerar muitos danos em sistemas de produção de energia devido a sua alta permeabilidade em membranas celulares (LIU et al. 2010).

A metodologia baseia-se na reação entre o iodeto de potássio (KI) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produzindo iodo ( $I_2$ ) o qual tem cor amarela. A subsequente titulação com o  $S_2O_3^{2-}$ , o qual reage com o  $I_2$  gerando o íon tiosulfato ( $S_4O_6^{2-}$ ) que é incolor junto com o íon iodeto ( $I^-$ ) que também não apresenta cor, assim os candidatos à remoção de  $H_2O_2$  podem atuar reagindo diretamente com esta espécie reativa de oxigênio (HUANG et al. 2005). A Figura 19 apresenta os resultados referentes a atividade antioxidante avaliada pela capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio.

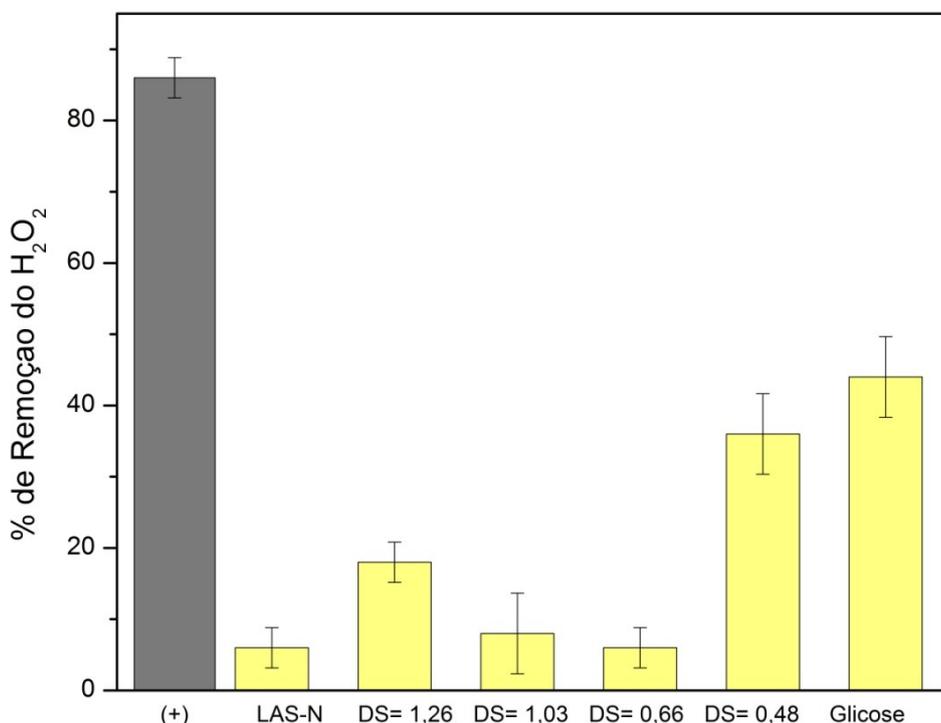


Figura 19 - Porcentagem de remoção do  $H_2O_2$  verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose

As amostras da LAS-N apresentaram capacidade de eliminação do peróxido de hidrogênio de 6%. Já os derivados acetilados demonstraram maior potencial, sendo verificado valores de remoção de 18,0% (DS 1,26); 8,0% (DS 1,03); 6,0% (DS

0,66) e 36,0% (DS 0,48). O monômero glicose apresentou porcentagem de remoção do peróxido de hidrogênio de 44% e o antioxidante padrão ácido ascórbico de 86%.

Tanto a LAS-N quanto o derivado acetilado com DS de 0,66, apresentaram a mesma capacidade de remoção (6%). A amostra derivatizada que apresentou a melhor capacidade de eliminação do peróxido de hidrogênio foi a com DS de 0,48 (36%), demonstrando uma atividade seis vezes superior macromolécula nativa. A glicose apresentou melhor capacidade para remover o  $H_2O_2$  tanto em relação a LAS-N, como em relação as amostras acetiladas. Este comportamento pode ser justificado, considerando que alguns monossacarídeos atuam como agentes redutores em função do grupo aldeído. A atividade redutora só ocorre quando estes estão na forma de cadeia aberta e não como anel, alguns deles se encontram em equilíbrio entre sua estrutura aberta e fechada, mas só são responsáveis pela redução aqueles que estão em estrutura aberta (SAQIB; WHITNEY 2011).

Alguns estudos demonstram que  $\beta$ -glucanas oriundas de fungos podem apresentar atividade de remoção do  $H_2O_2$ . Giese et al. (2015) avaliaram a capacidade de remoção do  $H_2O_2$  das glucanas botriosferana e laminarina em diferentes concentrações (500-3000 mg.L<sup>-1</sup>). Estes autores observaram que a botriosferana foi mais efetiva do que a laminarina, sendo verificada um conteúdo máximo de remoção de  $H_2O_2$  de 38%, quando empregado 3 g.L<sup>-1</sup> de concentração da glucana. Da mesma forma que observado no presente trabalho, os autores reportaram que a atividade antioxidante da LAS-N e dos derivados foi menor que o ácido ascórbico, o qual removeu 60% do peróxido de hidrogênio.

Gao et al. (2010) extraíram uma  $\alpha$ -glucana da planta *Aconitum kusnezoffi* e avaliaram a atividade antioxidante mediante a remoção do  $H_2O_2$ . Estes autores reportaram que a atividade antioxidante estava diretamente relacionada com a concentração da glucana e também verificaram menor capacidade de remoção do  $H_2O_2$  do que o ácido ascórbico.

#### 5.3.4 Atividade de sequestro de radical hidroxila (HO•)

O ensaio realizado para determinar a capacidade de remoção do radical hidroxila baseia-se na reação química conhecida como reação de Fenton. Esta reação ocorre quando o peróxido de hidrogênio em ambiente ácido e na presença de metais de transição como catalisadores, geralmente íons de  $Fe^{2+}$ , produz radicais

hidroxila (HUANG et al. 2005 e LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA 2013). A Figura 20 apresenta gráfico da remoção do radical hidroxila pela lasiodiplodana nativa, pelos derivados acetilados, D-glicopirranose e composto padrão ácido ascórbico.

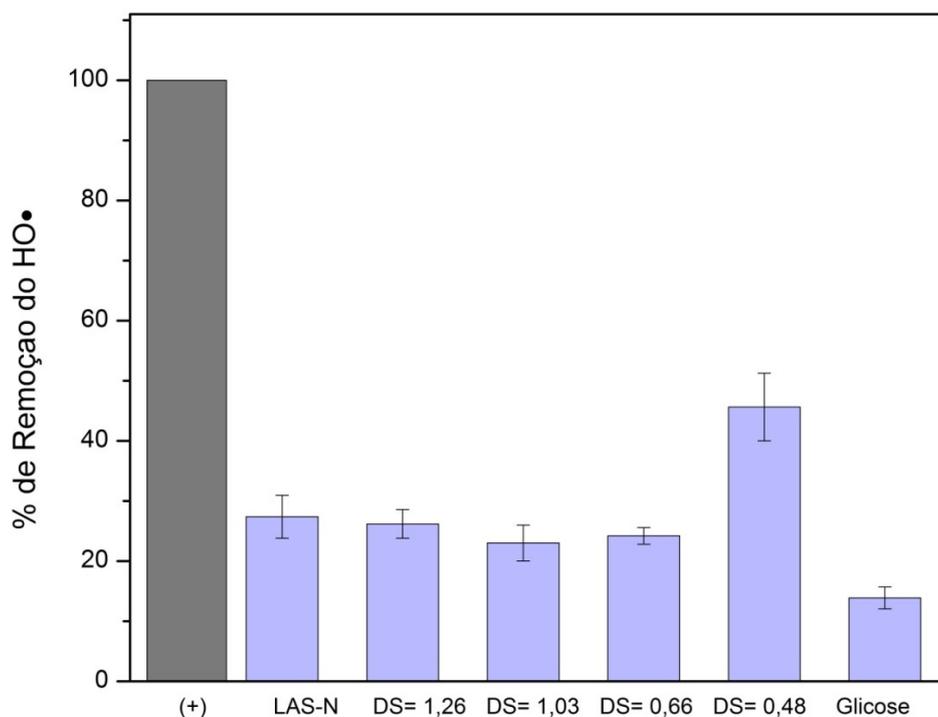


Figura 20 - Porcentagem de remoção do radical hidroxila (HO•) verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana acetilada (LAS-AC) e glicose

As amostras de LAS-N apresentaram potencial de remoção do radical OH• de 27,38 % e amostras acetiladas demonstraram atividades de 26,19% (DS 1,26), 23,02% (DS 1,03), 24,21% (DS 0,66) e 45,63% (DS 0,48). Diferentemente do observado nos ensaios anteriores, a glicose apresentou menor atividade, sendo verificado capacidade de remoção de 13,89%. O ácido ascórbico foi considerado como padrão com atividade de remoção de 100%.

A amostra derivatizada com DS de 0,48 demonstrou a maior capacidade de remoção do radical OH• (45,63%), sendo verificado atividade 66% superior a observada com a macromolécula nativa. Este resultado indica que de fato o DS pode determinar o potencial antioxidante da glucana. Assim como observado através dos ensaios de poder redutor e remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a amostra com menor valor de DS (0,48) apresentou maior atividade antioxidante do que os demais

derivados acetilados. A glicose também apresentou valores baixos, sendo menores do que a LAS-N e os derivados LAS-AC.

Lei et al. (2015) relataram comportamento similar de uma  $\beta$ -glucana modificada por sulfonação extraída da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual apresentou atividade de remoção do radical HO• em concentrações entre 1000 mg.L<sup>-1</sup> e 5000 mg.L<sup>-1</sup>. O potencial de remoção das amostras sulfonadas foi inferior ao padrão ácido ascórbico.

Maity et al. (2015) avaliaram o potencial antioxidante mediante captura do radical hidroxila de uma  $\beta$ -glucana extraída do fungo *Entoloma lividoalbum* usando hidroxitouleno butilado (BHT) como controle positivo (padrão). Os autores descrevem que a atividade antioxidante cresce a medida que a concentração da glucana é aumentada, e atribuem o mecanismo antioxidante ao fornecimento de hidrogênio pelo polissacarídeo, o qual se combina com os radicais e forma uma estrutura estável que finaliza a reação em cadeia.

## 6. CONCLUSÕES

O ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi efetivo na produção de lasiodiplodana ((1→6)- $\beta$ -D glucana) em cultivos submersos conduzidos em frascos agitados.

Quatro derivados acetilados com diferentes graus de substituição (1,26; 1,03; 0,66 e 0,48) foram obtidos, em função da concentração do agente derivatizante empregada no protocolo de derivatização.

Maiores concentrações do agente derivatizante levaram à obtenção de derivados com maior grau de substituição.

Os espectros de FT-IR confirmaram a derivatização por acetilação da lasiodiplodana, sendo verificada nova banda em  $1751\text{ cm}^{-1}$  atribuída à presença de grupos carbonila C=O. Foram verificadas bandas de maior intensidade nas regiões  $1233\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a grupos éster do acetato  $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})$  e em  $1041\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a vibração C-O.

A lasiodiplodana nativa e os derivados acetilados apresentaram estabilidade térmica até temperaturas de  $200^\circ\text{C}$  e  $230^\circ\text{C}$ , respectivamente.

Os resultados da análise de calorimetria diferencial de varredura indicaram a presença de dois eventos exotérmicos na amostra de lasiodiplodana nativa e no derivado acetilado com DS de 0,48. Três eventos exotérmicos foram verificados nos demais derivados acetilados, sendo atribuídos a processos de decomposição do biopolímero.

A análise por difração de raios X demonstrou que a lasiodiplodana nativa e acetilada apresentam estrutura amorfa com regiões semicristalinas.

A derivatização por acetilação da lasiodiplodana diminuiu a hidrossolubilidade da macromolécula independentemente do grau de substituição.

O potencial antioxidante, avaliado pelos ensaios FRAP, poder redutor, remoção do peróxido de hidrogênio e remoção do radical hidroxila, foi superior nas moléculas derivatizadas comparado com a lasiodiplodana nativa.

Maior capacidade antioxidante foi verificada no derivado com grau de substituição de 0,48.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que a acetilação da lasiodiplodana pode ser uma ferramenta viável para melhorar suas propriedades biológicas e viabilizar futuras aplicações clínicas. No entanto, ainda é

preciso serem estudadas suas propriedades imunológicas e metabólicas em modelos biológicos de pesquisa e posteriormente em humanos para uso farmacológico futuro.

## 7. TRABALHOS DIVULGADOS

Até o presente momento foi apresentado um trabalho na forma de resumo (*Kinetic profile of the production of lasiodiplodan: a (1→6)-β-D-glucan produced by Lasiodiplodia theobromae MMPI*) em congresso internacional (*23<sup>rd</sup> Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology*) e foi aceito para publicação uma revisão bibliográfica (*STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTIONS OF D-GLUCANS AND THEIR APPLICATIONS*) que aborda a correlação entre estrutura química de glucanas e funções biológicas, a ser publicada na edição do livro "Studies in Natural Products Chemistry - Bioactive Natural Products" a ser editado pelo professor Dr. ATTA-UR-RAHMAN e publicado pela Elsevier Science publisher no presente ano 2016.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR DE OLIVIERA, M. Z.; PATES JÚNIOR, P.; BARBOSA, C. D. J.; ASSMAR, C. C. Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para a agricultura baiana. **Revista Bahia Agrícola**, v. 9, n. 2, p. 24–29, 2013. Disponível em: <[www.seagri.ba.gov.br/.../3\\_comunicacao03v9n2.pdf](http://www.seagri.ba.gov.br/.../3_comunicacao03v9n2.pdf)>. .
- ALVES DA CUNHA, M. A.; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; 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 & biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–88, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399240>>. Acesso em: 23/7/2014.
- ANUSUYA, S.; SATHIYABAMA, M. Preparation of β-D-glucan nanoparticles and its antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 440–443, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.011>>. .
- ASHORI, A.; BABAEI, M.; JONOBI, M.; HAMZEH, Y. Solvent-free acetylation of cellulose nanofibers for improving compatibility and dispersion. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 369–375, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713012071>>. Acesso em: 8/2/2014.
- BAI, N.; GU, M.; ZHANG, W.; XU, W.; MAI, K. Effects of β-glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 66–73, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848614000349>>. Acesso em: 23/9/2014.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237347>>. .
- BONIFACIO, E. Cereals and mushrooms: therapeutic uses. Disponível em: <<http://flipper.diff.org/app/items/6337>>. Acesso em: 24/8/2014.
- CHAN, G. C.-F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M.-Y. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **Journal of hematology & oncology**, v. 2, p. 25, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2704234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/9/2014.
- CHANDRA, N.; SUSHIMITA, Y.; MANJUSHA, O.; et al. Quantitative evaluation of Carbohydrado levels in diferent natural foodstuffs by uv-visible spectrophometer. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 44–45, 2011.
- CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated beta-(1→3)-d-glucan from *Poria cocos*. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 398–405, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093198>>. Acesso em: 18/8/2014.
- CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, 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. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629969>>. Acesso em: 23/7/2014.
- CHENG, H. N.; BUCHANAN, C. M.; BISWAS, A.; et al. Iodine-catalyzed esterification of polysaccharides. **Chemistry today**, v. 27, n. August, p. 33–35, 2009.
- CONTRERAS, H. J.; TRUJILLO P., H. A.; ARIAS O., G.; PÉREZ C., J. L.; DELGADO F., E. ATR-FTIR spectroscopy of cellulose : instrumental aspect and mathematical treatment of spectra. **e-Gnosis**, v. 8, p. 1–13, 2010.
- CORRADI DA SILVA, M.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; et al. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 4, p. 793–8, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237722>>. Acesso em: 30/10/2014.
- CUNHA, M. A. DA; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; 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 & biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–88, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399240>>. Acesso em: 17/10/2014.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances ( EPS ) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 6, p. 799–806, 2007.

DAS, A. B.; SINGH, G.; SINGH, S.; RIAR, C. S. Effect of acetylation and dual modification on physico-chemical, rheological and morphological characteristics of sweet potato (*Ipomoea batatas*) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 725–732, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861709007231>>. Acesso em: 24/7/2014.

DENG, C.; HU, Z.; FU, H.; et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a  $\beta$ -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 1-2, p. 70–5, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579869>>. Acesso em: 23/7/2014.

DONG, C.; YAO, Y. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 474–479, 2012. The Society for Biotechnology, Japan. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.001>> .

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711007673>>. Acesso em: 30/4/2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; TON, J. K. H.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 859–65, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713662>>. Acesso em: 8/5/2014.

Fungal Cell Wall. Disponível em: <<http://www.doctorfungus.org/thedrugs/images/drug-targets.jpg>>. Acesso em: 14/5/2014.

GAO, T.; BI, H.; MA, S.; LU, J. 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. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813009002347>> .

GIESE, E. C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other  $\beta$ -D-glucans. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 125–30, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014005212>> .

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. Classification of Genus: *Lasiodiplodia* Ellis & Everhart, 1896 - GBIF Portal. Disponível em: <<http://data.gbif.org/species/browse/taxon/2611221>>. Acesso em: 16/4/2014.

HU, W.; CHEN, S.; XU, Q.; WANG, H. Solvent-free acetylation of bacterial cellulose under moderate conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1575–1581, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710008222>>. Acesso em: 11/2/2014.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

ISHIBASHI, K.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; et al. The solubilization and biological activities of *Aspergillus beta*-(1 → 3)-D-glucan. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 155–66, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364099>>. Acesso em: 8/5/2014.

ISLAM, M. S.; RAHAMAN, M. S.; YEUM, J. H. Electrospun novel super-absorbent based on

- polysaccharide-polyvinyl alcohol-montmorillonite clay nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 69–77, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.086>>. .
- JEDDOU, K. BEN; CHAARI, F.; MAKTOUF, S.; et al. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. **Food Chemistry**, v. 205, p. 97–105, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616302783>>. .
- JONOBI, M.; HARUN, J.; SHAKERI, A.; MISRA, M.; OKSMAND, K. Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers. **BioResources**, v. 4, n. 2, p. 626–639, 2009.
- KAGIMURA, F. **Bioproduction of beta-(1→6)-D-glucan (Lasiodiplodan) and obtain derived by carboxymethylation aiming biological activity.**, 2015. Pato Branco-PR, Brazil: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/1096>>. .
- KAGIMURA, F.; DA CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; et al. Carboxymethylation of (1→6)- $\beta$ -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715002581>>. .
- KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2015. Elsevier B.V.
- KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A.; THEIS, T. V.; BARBOSA, A.; DEKKER, R. Production of the Exopolysaccharide Lasiodiplodan in a Stirred-Tank Bioreactor. **Synergismus scientifica UTFPR**, v. 10, n. 1, 2015.
- KASAT, R. B.; WANG, N. H. L.; FRANCES, E. I. Effects of backbone and side chain on the molecular environments of chiral cavities in polysaccharide-based biopolymers. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1676–1685, 2007.
- KHOURY, D. EL; CUDA, C.; LUHOVYY, B. L.; ANDERSON, G. H. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 1–28, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/851362/abs/>>. Acesso em: 14/5/2014.
- KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKŠIĆ, M.; et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1-2, p. 144–153, 2012.
- LEI, N.; WANG, M.; ZHANG, L.; 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.
- LI, P.; TAKEI, R.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of theobroxide and its related compounds, metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 819–23, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17258244>>. Acesso em: 14/10/2014.
- LIU, J.; WANG, H.; YIN, Y.; et al. Controlled acetylation of water-soluble glucomannan from *Bletilla striata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 158–162, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.065>>. .
- 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. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153767>>. Acesso em: 25/11/2014.
- LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>>. .
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Fundamentos Básicos da Análise Térmica. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. p.213–281, 2001. Rio de Janeiro: e-papers.
- MA, L.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; FU, L. Chemical modification and antioxidant activities of

- polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 371–378, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712002275>>. Acesso em: 28/1/2014.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Brock Biology of Microorganisms**. 12<sup>o</sup> ed. San Francisco, United States of America: Pearson Education, 2009.
- MAITY, P.; SEN, I. K.; MAJI, P. K.; et al. Structural, immunological, and antioxidant studies of  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 350–358, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.051>>. .
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428, 1959. Disponível em: <<http://nsrdec.natick.army.mil/LIBRARY/59-69/R59-36.pdf>>. .
- MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiopodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, v. 35, n. 6, p. 385–396, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x>>. .
- MULJANA, H.; PICCHIONI, F.; HEERES, H. J.; JANSSEN, L. P. B. M. Green starch conversions: Studies on starch acetylation in densified CO<sub>2</sub>. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 653–662, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004303>>. Acesso em: 11/2/2014.
- NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1513–1519, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959202003217>>. Acesso em: 7/5/2014.
- NANDI, A. K.; SAMANTA, S.; MAITY, S.; et al. Antioxidant and immunostimulant  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 774–82, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24274569>>. Acesso em: 24/8/2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5<sup>o</sup> ed, p.235 – 270, 2009. Porto Alegre - RS, Brasil: Artmed.
- NEWSHOLME, P.; REBELATO, E.; ABDULKADER, F.; et al. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and -cell function: a critical role for amino acids. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 11–20, 2012. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JOE-12-0072>>. .
- ONBASLI, D.; ASLIM, B. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas* spp. strains. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 1, p. 64–7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304385>>. Acesso em: 8/5/2014.
- PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVAN, J. Espectroscopia no infravermelho. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução d ed., p.15–98, 2010. São Paulo-SP: Cengage Learning.
- REN, J. L.; SUN, R. C.; LIU, C. F.; CAO, Z. N.; LUO, W. Acetylation of wheat straw hemicelluloses in ionic liquid using iodine as a catalyst. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 406–414, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861707002354>>. Acesso em: 11/2/2014.
- 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. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>>. .
- SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLICK, S. K.; MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 8, p. 1287–97, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782541>>. Acesso em: 8/5/2014.
- SELITRENNIKOFF, C. P. **Antifungal Drugs: (1,3-Glucan Synthase Inhibitors)**. 1<sup>o</sup> ed. R G Landes Co, 1995.
- SHIBAKAMI, M.; SOHMA, M.; HAYASHI, M. Fabrication of doughnut-shaped particles from spheroidal

paramylon granules of *Euglena gracilis* using acetylation reaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 452–456, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711006734>>. Acesso em: 11/2/2014.

SINGH, B.; BALA, R. Polysaccharide based hydrogels as controlled drug delivery system for GIT cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 524–533, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.004>>. .

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z.; et al. Agaricus bisporus and Agaricus brasiliensis (1→6)- $\beta$ -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 91–9, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23544515>>. Acesso em: 15/5/2014.

SOARES LAROTONDA, F. D. **Desenvolvimento de biofilmes a partir da fécula de mandioca**, 2002. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.

SONG, Y.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; DUAN, L.; ZHOU, C.; NI, Y. Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (Cucurbita pepo, lady godiva). **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 686–691, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.049>>. .

SONG, Y.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; DUAN, L.; ZHOU, C.; NI, Y.; et al. Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (Cucurbita pepo, lady godiva). **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 686–91, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23987399>>. Acesso em: 11/2/2014.

SOUZA, N. L.; BARTZ, J.; ZAVAREZE, E. D. R.; et al. Functional, thermal and rheological properties of oat  $\beta$ -glucan modified by acetylation. **Food Chemistry**, v. 178, p. 243–250, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615000904>>. .

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus Botryosphaeria sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of basic microbiology**, v. 44, n. 6, p. 480–6, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558819>>. Acesso em: 24/7/2014.

SULTAN, S.; SUN, L.; BLUNT, J. W.; et al. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. 3: further lasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophyte from *Mapania kurzii*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 2, p. 453–455, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403913020078>>. Acesso em: 28/10/2014.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.141>>. .

TELEMAN, A.; GATENHOLM, P.; GRÖNDAHL, M. Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 359–366, 2003.

THOMAS, S. Spectroscopic Tools. Disponível em: <<http://www.science-and-fun.de/tools/index.html>>. Acesso em: 3/7/2015.

LE TROEDEC, M.; SEDAN, D.; PEYRATOUT, C.; et al. Influence of various chemical treatments on the composition and structure of hemp fibres. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 39, n. 3, p. 514–522, 2008.

TSUKADA, K.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 17-18, p. 2019–23, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952041>>. Acesso em: 18/10/2014.

TÚRMINA, J. A.; CARRARO, E.; ALVES DA CUNHA, M. A.; et al. Toxicological assessment of  $\beta$ -(1→6)-glucan (lasiodiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 12, p. 14298–309, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23208465>>. Acesso em: 17/10/2014.

USKOKOVIĆ, A.; MIHAILOVIĆ, M.; DINIĆ, S.; et al. Administration of a  $\beta$ -glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1966–1974, 2013. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461300217X>>. Acesso em: 21/8/2014.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan (lasiiodiplodan). **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–14, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399236>>. Acesso em: 3/11/2014.

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

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 2, p. 276–84, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18222501>>. Acesso em: 28/4/2014.

WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on Mechanisms of in Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

XU, C.; LEPPÄNEN, A.-S.; EKLUND, P.; et al. Acetylation and characterization of spruce (*Picea abies*) galactoglucomannans. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 6, p. 810–6, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144827>>. Acesso em: 5/2/2014.

YOON, T. J.; KIM, T. J.; LEE, H.; et al. Anti-tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 36–42, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18068098>>. Acesso em: 18/8/2014.

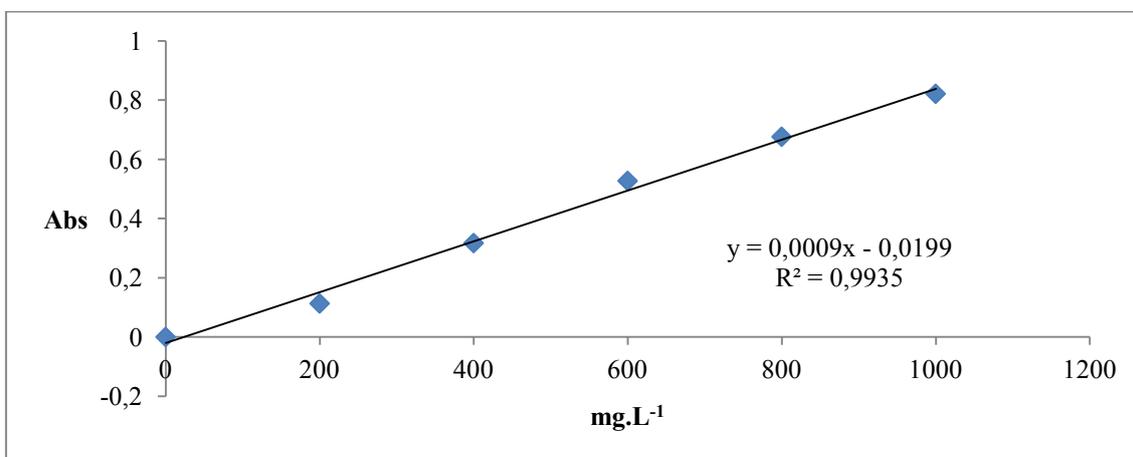
YUAN, C.; HUANG, X.; CHENG, L.; et al. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 581–584, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608015239>>. Acesso em: 24/8/2014.

ZHANG, Z.; WANG, X.; ZHAO, M.; QI, H. 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. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854210>>. Acesso em: 9/9/2014.

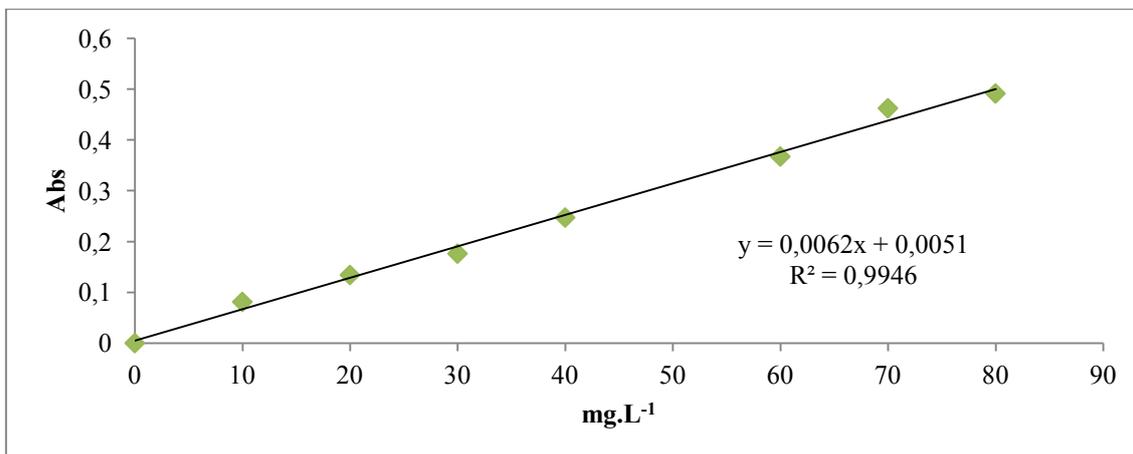
ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–410, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22944395>>. Acesso em: 30/4/2014.

## APÊNDICES

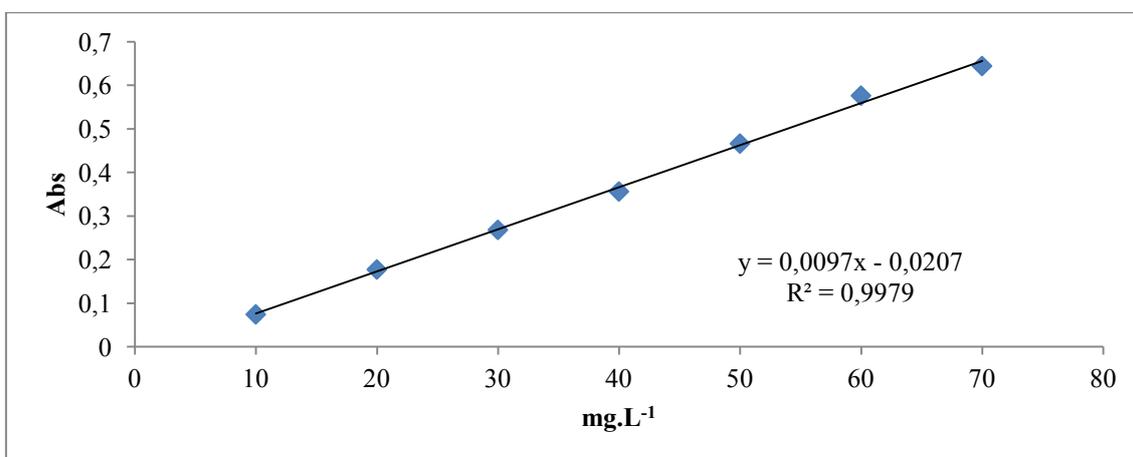
### APÊNDICE A –Curva Padrão DNS



### APÊNDICE B –Curva Padrão Fenol Sulfúrico (cinética)



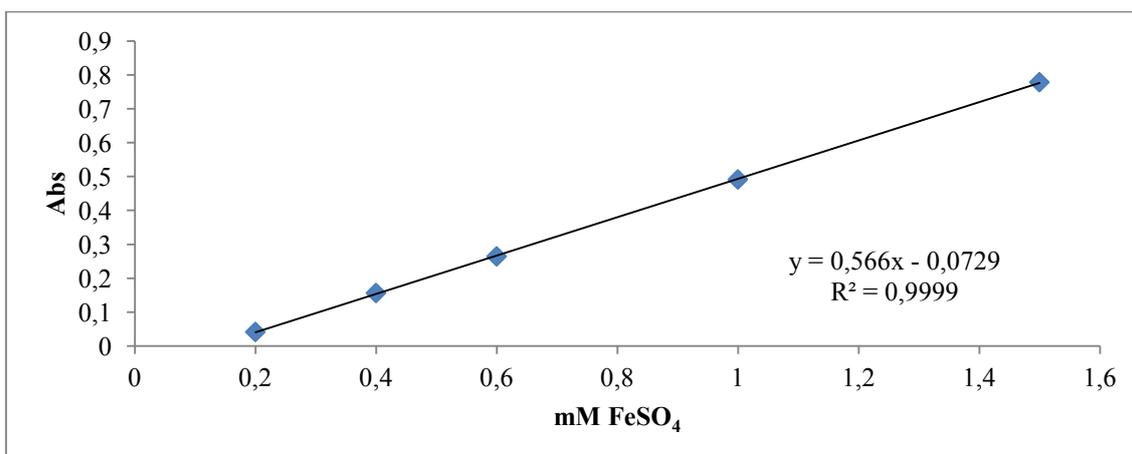
### APÊNDICE C –Curva Padrão Fenol Sulfúrico (solubilidade)



**APÊNDICE D –. Bandas correspondentes à absorção na região do infravermelho das amostras de LAS-N e LAS-AC.**

LAS-N				LAS-AC			
Banda	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Intensidade	Vibração	Banda	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Intensidade	Vibração
				1	3632	Baixa	Pontes de hidrogênio
				2	3480	Baixa	Interações intra e inter moleculares (OH)
1	3362	Muito Alta	OH	3	3343	Alta	OH
2	2926	Média	C-H simétrico	4	2941	Alta	C-H simétrico a OH
3	2892	Baixa	Acetais				
				5	2739	Baixa	Aldeídos y Acetais
				6	2464	Baixa	Acetais
4	2130	Média	Acetais	7	2120	Média	Acetais
						Muito	
				8	1751	Alta	C=O
5	1650	Alta	Adsorção de água	9	1637	Alta	Adsorção de água
			C-H e O-H				
			deformação				
6	1541	Média	(carboidratos)	10	1531	Média	C-H e O-H deformação (carboidratos)
			C-H e O-H				
			deformação				
7	1428	Média	(carboidratos)	11	1437	Média	C-H e O-H deformação (carboidratos)
				12	1384	Alta	C-CH <sub>3</sub>
8	1375	Média	Vibração éster				
			C-H e O-H				
			deformação				
9	1316	Média	(carboidratos)				
10	1245	Média	Vibração éster	13	1233	Alta	C-O (Ester de acetato)
			C-H e O-H				
			deformação				
11	1202	Média	(carboidratos)				
			C-H e O-H				
			deformação				
12	1152	Média	(carboidratos)				
			Compostos				
13	1076	Média	piranose(C-O)				
			Compostos				
14	1029	Baixa	piranose(C-O)				
						Muito	
				14	1041	Alta	Vibração simétrica C-O
				15	901	Alta	Compostos β-piranose
15	888	Média	Compostos β-piranose				
				16	835	Média	deformação CH carboidratos

### Apêndice E – Curva Padrão FRAP



### Apêndice F – Caracterização dos picos descritos nas curvas de calorimetria diferencial de varredura DSC.

AMOSTRA	TEMPERATURA (°C)	NATUREZA Endotérmico/ exotérmico	ENERGIA (J.g <sup>-1</sup> )
LAS-N	62,78	Endotérmico	222,55
	309,86	Exotérmico	5752
	475,55		
1,26	55,38	Endotérmico	85,28
	323,67	Exotérmico	4104
	359,22		
	472,67		
1,03	58,01	Endotérmico	155,6
	332,25	Exotérmico	6189
	364,65		
	491,83		
0,66	56,61	Endotérmico	155,51
	326,56	Exotérmico	6868
	355,69		
	473,62		
0,48	49,12	Endotérmico	168,5
	341,88	Exotérmico	4667
	473,09		