



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



NATAN DA SILVA MIRANDA SECHI

**FOSFORILAÇÃO DA (1→6)- β -D-GLUCANA (LASIODIPLODANA):
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL**

Dissertação de Mestrado

Pato Branco
2017

NATAN DA SILVA MIRANDA SECHI

**FOSFORILAÇÃO DA (1→6)- β -D-GLUCANA (LASIODIPLODANA):
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” - Área de Concentração: Química de Materiais.

Orientadora: Professora Dra. Patricia Teixeira Marques.

Coorientador: Professor Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Pato Branco
2017

S444f Sechi, Natan da Silva Miranda.
Fosforilação da (1→6)-β-D-glucana (Iasiodiplodana): caracterização físico-química e estrutural / Natan da Silva Miranda Sechi. -- 2017.
79 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Teixeira Marques
Coorientador: 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, 2017.
Bibliografia: f. 67 – 78.

1. Polissacarídeos. 2. Fosforilação. 3. Esteres. 4. Análises físico-químicas. I. Marques, Patricia Teixeira, orient. II. Cunha, Mário Antônio da, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

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



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 59

Título da Dissertação

Fosforilação da (1→6)-β-D-Glucana (Lasiodiplodana): Caracterização Físico-Química e Estrutural

Autor

Natan Da Silva Miranda Sechi

Esta dissertação foi apresentada às 13h30min do dia 23 de fevereiro de 2017, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Materiais – 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^a. Patricia Teixeira Marques - UTFPR
Presidente

Prof. Dr. Antônio Guilherme Basso – UTFPR/DV
Examinador

Prof^a. Dr^a. Marcia Margarete Meier –
UDESC/Joinville
Examinadora

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima –
UTFPR/PB
Examinador

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

Visto da Coordenação

Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e demais atividades ao longo deste trajeto acadêmico.

Especial agradecimento à minha professora e orientadora Patricia Teixeira Marques pela paciência, por todas formas de apoio ao longo deste trabalho, pelas lições, respeito e conduta admiráveis. Também ao meu coorientador Mário Antônio Alves da Cunha por sua importantíssima contribuição.

À minha companheira Mari Simone Gonçalves de Lima pelo apoio em tudo quanto necessário, pela força e alegria que me manteve no caminho.

À central de Análises e ao laboratório de ensino N002 da UTFPR - Pato Branco pelo apoio técnico e prestatividade em diversas técnicas utilizadas neste trabalho.

Ao Professor Carlos Alberto Policiano Almeida e a técnica de laboratório Joslaine Kosman pelo apoio e disponibilização do uso do equipamento Zetasizer do departamento de química da Unicentro – Guarapuava.

Aos colegas de pesquisa e estudo que são muitos, especialmente ao grupo de pesquisa GTBIO.

RESUMO

SECHI, Natan da Silva Miranda. Fosforilação da (1→6)-β-D-glucana (*Lasiodiplodana*): caracterização físico-química e estrutural. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2017.

Polissacarídeos são muito estudados e aplicados a processos industriais e biotecnológicos, devido à grande variedade e versatilidade. As β-glucanas, polissacarídeos à base de glicose, por sua vez podem apresentar diversas aplicações biológicas interessantes tais como, atividade antitumoral, antioxidante e imunomoduladora e têm sido obtidas em vários estudos, por meio de fungos na forma de exopolissacarídeos. Todavia algumas β-glucanas fúngicas apresentam limitações nas aplicações biológicas devido à baixa solubilidade em água. Para melhorar este aspecto e ainda possibilitar aumento das atividades biológicas são sugeridas derivatizações químicas, a exemplo da fosforilação, que possibilitam obtenção de materiais mais solúveis em água e com aumento das atividades e do potencial tecnológico. Assim, este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de derivados fosforilados da (1→6)-β-D-glucana (*Lasiodiplodana*) produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, visando macromoléculas mais solúveis em relação à *Lasiodiplodana* nativa e ainda apontar outras modificações passíveis de ampliação de potenciais tecnológicos. A determinação da modificação estrutural por fosforilação foi obtida por meio das técnicas espectroscópicas FTIR e RMN (¹³C e ³¹P) sobretudo ³¹P RMN que possibilitou identificar sinais atribuídos a ésteres de fosfato. As amostras fosforiladas apresentaram DS baixos entre 0,0251 e 0,0499, com indicação de relação inversa entre DS e concentração dos derivatizantes TMFS e TPFS utilizados para fosforilação. Com processo de fosforilação foram alcançados aumentos na solubilidade em água para todas amostras em relação a *Lasiodiplodana* nativa. Também foram alcançados maiores valores de potencial zeta relacionados ao caráter mais aniônico dos derivados fosforilados, bem como redução dos tamanhos médios

de partícula, de 1002 para até 252,5 nm. Os padrões de difração das amostras de lasiodiplodana nativa e das fosforiladas evidenciaram característica de materiais parcialmente cristalinos. A macroestrutura das amostras fosforiladas, apresentou formações de fibrilas como resultado da inserção dos grupamentos fosfato. Tanto a lasiodiplodana nativa, quanto as amostras fosforiladas, apresentaram boa estabilidade térmica, com etapas de perda de massa associadas à perda de água, degradação térmica e carbonização, com pequenas diferenças entre as amostras. De acordo com os resultados, a fosforilação da lasiodiplodana contribuiu para ampliação dos potenciais de aplicação biológica e tecnológica.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo. Derivatização. Solubilidade. Ésteres de Fosfato.

ABSTRACT

SECHI, Natan da Silva Miranda. Phosphorylation of (1→6)- β -D-glucan (lasiodiplodana): physical-chemical and structural characterization. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2017.

Polysaccharides have been extensively studied and applied to industrial and biotechnological processes, due to the great variety and versatility. β -glucans, glucose-based polysaccharides, in turn may present several interesting biological applications such as antitumor, antioxidant and immunomodulatory activity and have been obtained in several studies, through fungi in the form of exopolysaccharides. However, some fungal β -glucans have limitations in biological applications due to the low solubility in water. In order to improve this aspect and to increase the biological activities, chemical derivations are suggested, such as phosphorylation, which make it possible to obtain more soluble materials in water and with increased activities and technological potential. Thus, this work had the objective of obtaining and characterizing phosphorylated derivatives of (1→6)- β -D-glucan (lasiodiplodan) produced by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, aiming at more soluble macromolecules in relation to the native lasiodiplodana and to point out other modifications technological potential. The determination of the structural modification by phosphorylation was obtained by FTIR and RMN (^{13}C and ^{31}P) spectroscopic techniques, especially ^{31}P RMN, which enabled the identification of signals attributed to phosphate esters. Phosphorylated samples showed low DS between 0.0251 and 0.0499, indicating the inverse relationship between DS and concentration of the derivatives TMFS and TPFS used for phosphorylation. Phosphorylation process increased the water solubility for all samples compared to native lasiodiplodana. Higher zeta potential values related to the more anionic character of the phosphorylated derivatives were also achieved, as well as reduction of the average particle sizes from 1002 to 252,8 nm. The diffraction patterns of native and phosphorylated lasiodiplodana samples showed the

characteristic of partially crystalline materials. The macrostructure of the phosphorylated samples presented fibril formations as a result of the insertion of the phosphate groups. Both the native lasiodiplodana and the phosphorylated samples presented good thermal stability, with mass loss stages associated with loss of water, thermal degradation and carbonization, with small differences between the samples. According to the results, the phosphorylation of lasiodiplodana contributed to the amplification of biological and technological application potentials.

Keywords: Exopolysaccharide. Derivatization. Solubility. Phosphate Esters.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estruturas de β -Glucanas fúngicas: (a) (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucana; (b) (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana; (c) (1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 4)- β -D-Glucana; (d) (1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana; (e) (1 \rightarrow 6:1 \rightarrow 3)- β -D-Glucana | 19 |
| Figura 2 - Colônia do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol | 22 |
| Figura 3 - Representação Estrutural de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Acetilada | 24 |
| Figura 4 - Representação Estrutural de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Carboximetilada | 25 |
| Figura 5 - Representação Estrutural de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Sulfatada | 25 |
| Figura 6 - Representação Estrutural de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Mono-Metilada | 26 |
| Figura 7 - Representação Estrutural de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Fosforilada | 27 |
| Figura 8 – Representação das Estruturas Químicas de a) TPFS e b) TMFS..... | 28 |
| Figura 9 - Difratogramas de raios X das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TPFS e TMFS | 45 |
| Figura 10 - Gráficos de distribuição do potencial zeta das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS..... | 47 |
| Figura 11 - Espectros ^{13}C RMN das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS..... | 53 |
| Figura 12 - Espectros ^{31}P RMN das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TPFS e TMFS..... | 54 |
| Figura 13 - Espectros FTIR das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFE e TPFS | 56 |
| Figura 14 - Espectros FTIR ampliados na faixa de 1750 e 750 cm^{-1} das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS | 57 |
| Figura 15 - Micrografias eletrônicas obtidas à 15 kV das amostras com aproximações: (A) LAS-N x800, (B) LAS-N x1200, (C) LAS-TP-1:1 x800, (D) LAS-TP-1:1 x1500, (E) LAS-TP-2:1 x800, (F) LAS-TP-2:1 x2000, (G) LAS-TM-1:1 x100, (H) LAS-TM-1:1 x800, (I) LAS-TM-2:1 x800 e (J) LAS-TM-2:1 x1500..... | 60 |
| Figura 16 - Gráfico da curva TG das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Figura 17 - Gráfico da curva DTG das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS | 62 |
| Figura 18 - Gráfico da curva DTA das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Estruturas de Ligação e Atividades Biológicas em β -Glucanas..... | 20 |
| Tabela 2 – Nomenclatura das Amostras de Lasiodiplodana Nativa e Fosforiladas... | 36 |
| Tabela 3 - Dados de Teor de Fósforo e Grau de Substituição (DS)..... | 42 |
| Tabela 4 - Dados de Solubilidade em Água | 43 |
| Tabela 5 - Dados de Potencial Zeta | 48 |
| Tabela 6 - Dados de Tamanho Médio de Partícula e Índice de Polidispersão | 49 |
| Tabela 7 - Sinais Espectroscópicos de ^{13}C RMN | 51 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Objetivo geral | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 15 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 3.1 Polissacarídeos | 16 |
| 3.2 Exopolissacarídeos..... | 17 |
| 3.3 β -Glucanas | 18 |
| 3.4 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | 21 |
| 3.5 Solubilidade em β -Glucanas | 23 |
| 3.6 Derivatizações Químicas de β -Glucanas..... | 23 |
| 3.7 Caracterização de β -Glucanas | 29 |
| 3.7.1 Caracterização Estrutural..... | 29 |
| 3.7.2 Caracterização Morfológica, Térmica e Superficial..... | 31 |
| 4 MÉTODOS | 34 |
| 4.1 Obtenção da β -Glucana fúngica exocelular de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . | 34 |
| 4.2 Obtenção de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Fosforilada com Tripolifosfato de Sódio (TPFS) e Trimetafosfato de Sódio (TMFS)..... | 35 |
| 4.3 Determinação de Grau de Substituição (DS) | 36 |
| 4.4 Solubilidade em Água | 37 |
| 4.5 Difração de Raios X..... | 38 |
| 4.6 Potencial Zeta e Tamanho Médio de Partículas..... | 38 |
| 4.7 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C e ^{31}P RMN) | 38 |
| 4.8 Espectroscopia na Região Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 39 |
| 4.9 Análise de Superfície por SEM..... | 39 |
| 4.10 Análise Térmica..... | 40 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 Obtenção da <i>Lasiodiplodana</i> Nativa..... | 40 |
| 5.2 Grau de Substituição (DS)..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3 Solubilidade em Água | 42 |
| 5.4 Difração de Raios X..... | 44 |
| 5.5 Potencial Zeta e Tamanho Médio de Partículas..... | 46 |
| 5.6 Ressonância Magnética Nuclear (¹³C e ³¹P RMN)..... | 50 |
| 5.7 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 56 |
| 5.8 Análise de Superfície por SEM..... | 59 |
| 5.9 Análise Térmica..... | 61 |
| 6 CONCLUSÃO | 64 |
| 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 65 |
| APÊNDICES | 79 |

1 INTRODUÇÃO

As β -Glucanas são polissacarídeos constituídos de unidades de D-Glicose unidas por ligações glicosídicas orientadas na posição β . São biomacromoléculas, podendo variar de tamanho dependendo da fonte onde são produzidas. Como constituintes majoritários de células microbianas possuem a função vital de estruturação da parede celular nestes organismos. Também são encontradas em espécies vegetais como cereais e plantas, em algas e cogumelos.

Diversos microrganismos possuem a capacidade de sintetizar exopolissacarídeos (EPS), entre os quais se incluem algumas β -Glucanas que são excretadas das células para os meios onde se desenvolvem. Entre os organismos sintetizadores de β -Glucanas exocelulares estão inclusas algumas espécies fúngicas como a *Lasiodiplodia theobromae*, que é capaz de produzir via fermentação submersa de glicose o exopolissacarídeo linear (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana (Lasiodiplodana).

Têm sido relatados vários tipos de β -Glucanas que possuem atividades biológicas de interesse, porém algumas delas apresentam algumas limitações quanto a aplicação in natura em humanos, associadas à baixa solubilidade. Por isso tem se investigado formas de melhorar tal propriedade dessas glucanas, sendo bastante usual a modificação química por derivatização, que consiste na inclusão de grupos químicos nas moléculas das glucanas atribuindo maior hidrofiliabilidade as mesmas.

Dentre as modificações realizadas em glucanas a fosforilação tem sido empregada via inclusão de agentes polifosfatados como o Tripolifosfato de Sódio (TPFS) nas estruturas polissacarídicas. Alguns processos de fosforilação são realizados em condições controladas para obtenção de produtos com maior solubilidade, maior potencial zeta (estabilidade de suspensões), menores tamanhos de partícula entre modificações de propriedade que podem melhorar a biocompatibilidade das glucanas através da influência no transporte dos compostos no organismo humano.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de novos materiais a partir da fosforilação da (1 \rightarrow 6)- β -Glucana (Lasiodiplodana) por dois agentes diferentes, o Tripolifosfato de Sódio (TPFS) e o Trimetafosfato de Sódio (TMFS), contribuindo na ampliação dos estudos acerca das β -Glucanas bem como de suas possíveis aplicações tecnológicas e principalmente biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter e Caracterizar (1→6)- β -D-Glucana Fosforiladas com Tripolifosfato de Sódio (TPFS) e Trimetafosfato de Sódio (TMFS).

2.2 Objetivos específicos

- Obter a (1→6)- β -D-Glucana fúngica produzida pelo *Lasiodiplodia Theobromae*;
- Preparar β -Glucanas fosforiladas com Tripolifosfato de Sódio e Trimetafosfato de Sódio em suspensões aquosas alcalinas;
- Determinar a Solubilidade das amostras em Água;
- Determinar Grau de Substituição de Grupos Fosfato
- Realizar caracterização das β -Glucanas pura e modificadas por meio de análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Difratomia de Raios X (DR-X), Análise Térmica (TG, DTG e DTA), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^{31}P ;
- Determinar Potencial Zeta através da mobilidade eletroforética e Distribuição de Tamanhos de Partículas das amostras por meio de técnicas de Espalhamento de Luz, via sistema multianálise Zetasizer Nano.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas naturais presentes em todos os seres vivos, representam uma vasta gama de compostos, entre os quais, alguns dos mais abundantes na biosfera como o amido e a celulose, importantes constituintes de plantas e o glicogênio reserva energética de animais (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; CALLIGOI; DOS SANTOS; CAVALCANTI, 2004). São polímeros constituídos de unidades monossacarídicas unidas entre si por meio de ligações glicosídicas, e podem diferir no tipo de unidade, grau de ramificação, comprimento das cadeias, tipos de ligação, podendo portanto comportar uma enorme diversidade de composições e conseqüentemente de funcionalidades (DA SILVA et al., 2006; ZONG; CAO; WANG, 2012).

Os polissacarídeos constituem uma grande percentagem das células fúngicas, sendo constituintes majoritários nas paredes das hifas, com valores superiores a 75% (DA SILVA et al., 2006).

Polissacarídeos podem ser facilmente modificados quimicamente e biologicamente, possuem alta estabilidade, são seguros, não-tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, sendo portanto, bem aceitos em produtos como alimentos e matrizes de fármacos (MIZRAHY; PEER, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SINHA; KUMRIA, 2001). Quando modificados podem resultar em materiais com diferente solubilidade, hidrofobicidade e propriedades físico-químicas (MIZRAHY; PEER, 2012).

As aplicações de polissacarídeos em processos industriais são muito vastas, sendo que algumas das principais estão relacionadas ao potencial de modificação de propriedades de meios aquosos, entre elas a capacidade de engrossar caldos, quelar compostos, função de estabilizante, emulsificante, encapsulante, floculante, inchamento em suspensão, formação de géis, filmes e membranas (LAPASIN; PRICL, 1995). Também têm-se observado estudos direcionados a aplicações

nanotecnológicas, como formulação de nanocompósitos a base de polissacarídeos (ZHENG; MONTY; LINHARDT, 2015).

3.2 Exopolissacarídeos

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos de elevada massa molecular que são sintetizados por células microbianas e secretados para o meio externo ou sintetizados por enzimas ancoradas no exterior das paredes celulares (NWODO; GREEN; OKOH, 2012; POLI; ANZELMO; NICOLAUS, 2010). Podem ser classificados de acordo com sua composição monomérica em dois grupos, homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos são constituídos de apenas um tipo de unidade monomérica, por exemplo o dextrano, enquanto os heteropolissacarídeos são formados por duas ou mais unidades de repetição de variados tamanhos desde dissacarídeos até heptassacarídeos, sendo os heteropolissacarídeos majoritários em EPS bacteriano (DONOT et al., 2012; NWODO; GREEN; OKOH, 2012).

Os EPS bacterianos são capazes de atuar com diferentes funções como, proteger a superfície da bactéria produtora, como adesivos para interações com outras superfícies bacterianas ou substratos, agentes de proteção contra ação do ambiente, substância de agregação de colônias bacterianas na região da rizosfera, estabilizante de estruturas de biofilmes e como sinalizador molecular (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Exopolissacarídeos tem demonstrado potencial em múltiplas aplicações médico-cirúrgicas, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas entre outras (MADHURI; PRABHAKAR, 2014; POLI et al., 2011).

Devido ao baixo rendimento na produção da maioria dos EPS, os mesmos não são muito empregados em processos industriais de larga escala, onde existe então a predominância de polissacarídeos extraídos de plantas e algas. Sendo os EPS, portanto, mais amplamente utilizados em escala laboratorial (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). Porém, existem alguns EPS já difundidos em processamento industrial, principalmente em alimentos, como é o caso dos três principais EPS

comerciais, a Xantana, Gelana e Curdlan (MADHURI; PRABHAKAR, 2014; SUTHERLAND, 2001).

Na maioria dos casos a composição do EPS é independente do carboidrato utilizado como substrato, porém a intensidade de produção pelos microrganismos é muito dependente do tipo e concentração da fonte de carbono (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

3.3 β -Glucanas

As β -Glucanas são biomacromoléculas de carboidratos, que consistem de moléculas de D-Glicose ligadas sequencialmente por meio de ligações β -glucosídicas (GRAUBAUM, 2012; KAGIMURA et al., 2015a; VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Principais componentes estruturais de paredes celulares de fungos e bactérias se destacam como uma das formas de polissacarídeo mais abundantes nestes organismos, podendo ser encontradas também nas paredes celulares de diversos cereais tais como aveia, trigo e cevada, em leveduras, plantas, algas e cogumelos (BRENNAN; CLEARY, 2005; CHAN; CHAN; SZE, 2009; DALMO; BØGWALD, 2008; VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008; ZECHNER-KRPAN; PETRAVIĆ-TOMINAC; GRBA, 2009).

Apesar de possuir usualmente a denominação de β -Glucanas, estes polissacarídeos podem possuir diferentes pesos moleculares e estruturas químicas, de acordo com a fonte de onde são extraídos (ZECHNER-KRPAN; PETRAVIĆ-TOMINAC; GRBA, 2009).

As estruturas das β -Glucanas podem variar de mais simples como as lineares e homopoliméricas a outras mais complexas como heteropoliméricas ramificadas, sendo função de suas fontes.

β -Glucanas de origem fúngica consistem de polissacarídeos formados por unidades de D-Glicose conectadas por ligações glucosídicas, geralmente do tipo (1 \rightarrow 3), podem ser encontradas com ligações dos tipos (1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 4) (DA CUNHA et al., 2012; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Em cereais as β -Glucanas presentes no endosperma, são geralmente solúveis em água e possuem

estruturas lineares contendo estruturas de ligação (1→3:1→4), sendo majoritárias as do tipo (1→3) (BRENNAN; CLEARY, 2005; LAZARIDOU et al., 2004).

De acordo com a proposição de Synytsya & Novák (2013) são apresentadas diferentes estruturas presentes em β -Glucanas fúngicas (Fig. 1).

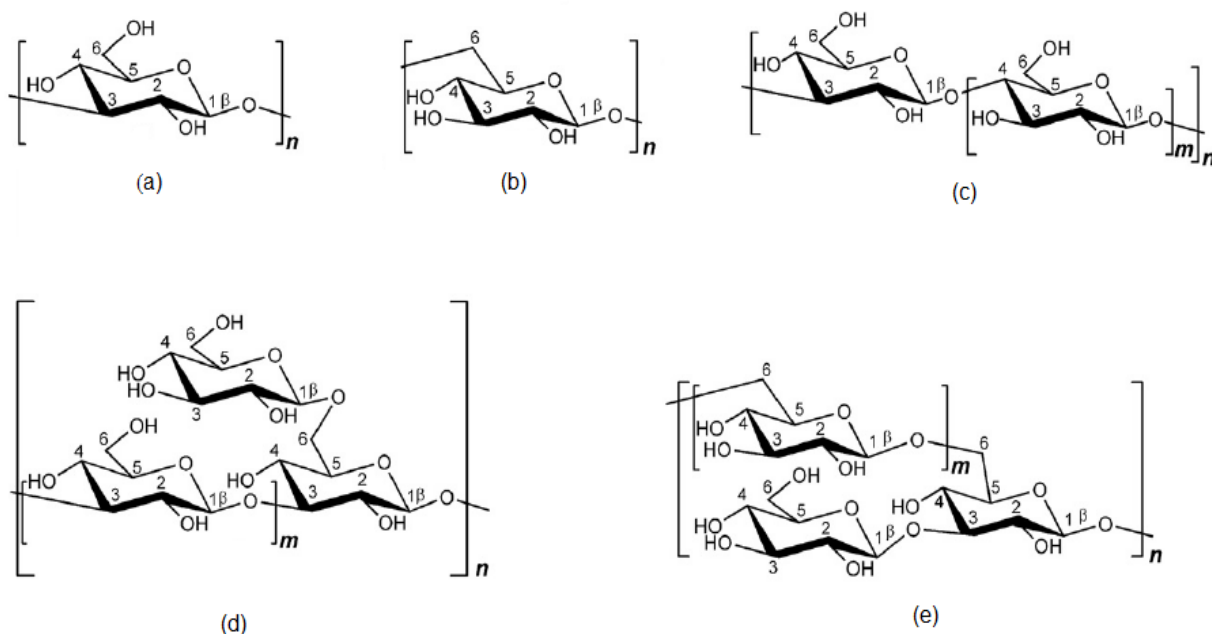


Figura 1 - Estruturas de β -Glucanas fúngicas: (a) (1→3)- β -D-Glucana; (b) (1→6)- β -D-Glucana; (c) (1→3:1→4)- β -D-Glucana; (d) (1→3:1→6)- β -D-Glucana; (e) (1→6:1→3)- β -D-Glucana

Em alguns microrganismos, como alguns fungos e leveduras, podem existir além das β -Glucanas de parede celular, demais β -Glucanas produzidas como exopolissacarídeos, que são excretadas para o meio onde as células se desenvolvem (BACIC; FINCHER, 2009; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

Algumas β -Glucanas bacterianas e fúngicas possuem atividades biológicas interessantes, podendo ser relacionadas com o tipo de estrutura e fonte (Tabela 1).

Tabela 1 – Estruturas de Ligação e Atividades Biológicas em β -Glucanas

| Tipo de Estrutura β-Glucana | Fonte | Atividade Biológica | Referência |
|---|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucana | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Atividade Imunomoduladora | (KOGAN et al., 1999) |
| | <i>Lyophyllum decastes</i> Sing | Atividade Antitumoral | (UKAWA; ITO; HISAMATSU, 2000) |
| (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana | <i>Lentinula edodes</i> | Antiinflamatório | (NISHITANI et al., 2013) |
| | <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 | Antioxidante | (GIESE et al., 2015) |
| (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana | <i>Lyophyllum decastes</i> Sing. | Atividade Antitumoral | (UKAWA; ITO; HISAMATSU, 2000) |
| | <i>Bulgaria inquinans</i> | Atividade Imunomoduladora | (BI et al., 2013) |

De acordo com Synytsya e Novák (2013, p.804) β -Glucanas fúngicas tem suas funções biológicas dependentes, além da estrutura, também do peso molecular do polissacarídeo.

Em estudo de revisão realizado por Nörnberg, Liberali e Coutinho (2012) foram relatados três trabalhos indicando que as β -Glucanas possuem potencial de melhoramento do perfil lipídico, relacionado com redução do colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL), dados avaliados in vivo em ratos e ramsters machos.

Segundo Ruthes, Smiderle e Iacomini (2015) apesar de alguns estudos sobre atividade biológica já haverem sido desenvolvidos com glucanas de cogumelos, na

maior parte deles utilizou-se extratos de cogumelos, portanto, glucanas não purificadas, ou seja, misturas de glucanas com demais compostos.

3.4 *Lasiodiplodia theobromae*

O *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo da família *Botryosphaeriaceae*, muito encontrado em espécies vegetais do norte do Brasil, patogênico que infecta plantas em regiões de clima tropical e subtropical (BAUTISTA-BANOS, 2014; CARDOSO et al., 2010; TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010). Apesar de raramente infectar humanos, o fungo já foi relatado como causador de infecção subcutânea, sinusite e pneumonia (KINDO et al., 2010; PAPACOSTAS et al., 2015; WOO et al., 2008).

Lasiodiplodia theobromae é a forma anamorfa do *Botryosphaeria rhodina*, e no estado mitospórico pertence a classe dothideomycetes (MOHALI; BURGESS; WINGFIELD, 2005; NUNES et al., 2008). Suas colônias se desenvolvem com coloração que varia do branco até um tom cinza escuro em função do tempo de cultura, dependendo também do substrato e possuem abundância de micélios aéreos (KHALIL, 2014) como demonstrado na Figura 2. Em algumas situações de estresse podem produzir pigmentos de coloração rosa-avermelhada.



Figura 2 - Colônia do fungo *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol

Causador da resinose-do-cajueiro principal doença associada ao cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no Semiárido Nordeste Brasileiro, ainda capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas (CARDOSO; WILKINSON, 2008; CARDOSO et al., 2010).

Por outro lado, o fungo *Lasiodiplodia theobromae* pode produzir alguns compostos bioativos de grande interesse (ALDRIDGE et al., 1971). Como exemplo, o taxol, importante composto com atividade antitumoral (PANDI et al., 2011) ou o ácido jasmônico (TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010). Este fungo, por meio de fermentação submersa com fonte de carbono de glicose, pode produzir a (1→6)-β-D-Glucana exocelular (DA CUNHA et al., 2012).

3.5 Solubilidade em β -Glucanas

As Glucanas são macromoléculas que possuem abundância de grupamentos hidroxila (-OH), que ocasionam várias interações de hidrogênio e que podem gerar uma conformação de cadeia muito compactada, tal como do tipo tripla hélice, que por sua vez contribui para sua baixa solubilidade em água (WANG et al., 2005).

Em muitas Glucanas fúngicas observa-se presença de polissacarídeos com baixa solubilidade em água, que são então modificados quimicamente com finalidade de se melhorar tal propriedade (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). O aumento na solubilidade de β -Glucanas é bastante interessante para sua aplicação em sistemas biológicos, uma vez que pode propiciar melhoras em algumas atividades, tais como a imunomodulação e atividade antitumoral conforme observado por Sutherland (1998 apud GIESE; BARBOSA, 2003, p.101).

Quando reduzido o peso molecular de polissacarídeos, por exemplo, por meio de despolimerização, pode ocorrer conseqüente aumento na solubilidade e na facilidade de derivatizações químicas (KOGAN et al., 1999), assim como modificações em suas atividades biológicas tal como aumento da atividade antitumoral conforme observado por Surenjav et al. (2006).

3.6 Derivatizações Químicas de β -Glucanas

Além de alterações na solubilidade das β -Glucanas, as derivatizações químicas tem demonstrado potencial para aumento de atividades biológicas, tais como: antitumoral, antioxidante, anticoagulante e imunomodulatórias (KAGIMURA et al., 2015a).

As derivatizações químicas ocorrem majoritariamente com substituição de grupos hidroxila de posições mais distante das ligações β -glucosídicas e do oxigênio do anel de D-Glucose por outros grupamentos químicos de interesse. A maior

facilidade de modificação na posição indicada ocorre em função de seu menor impedimento estéreo.

Dentre as modificações por derivatizações químicas em β -Glucanas já realizadas se encontram, Acetilação, Carboximetilação, Sulfonação, Sulfatação, Fosforilação, Metilação, Hidroxietilação e Hidroxipropilação (ANUSUYA; SATHIYABAMA, 2014; DE SOUZA et al., 2015; SHI; SHI; LI, 2014; VASCONCELOS et al., 2013; WANG; ZHANG, 2009). As principais modificações são abordadas e representadas adiante.

De Souza et al. (2015) realizaram acetilação de β -Glucana extraída de aveia e constataram modificações nas propriedades reológicas, tais como, aumento de coesão, de elasticidade e gomosidade, apresentando ainda diminuição da viscosidade para maiores graus de substituição de grupos acetila, características interessantes para aplicações industriais, sobretudo na indústria de alimentos.

Na figura 3 é demonstrada uma predição de estrutura de uma (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana acetilada.

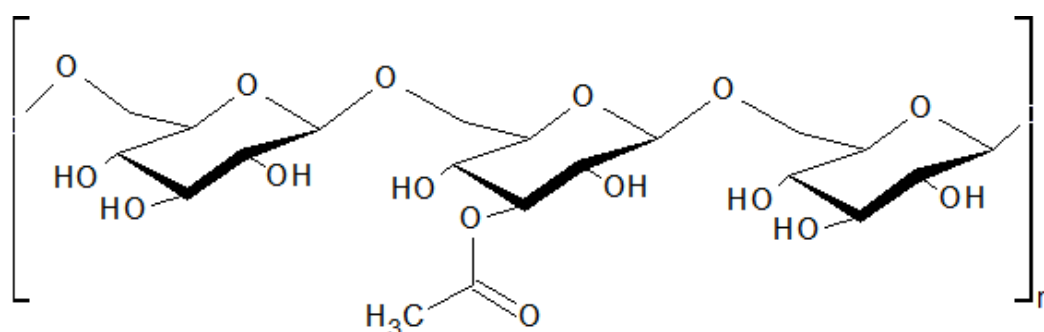


Figura 3 - Representação Estrutural de (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana Acetilada

A carboximetilação tem sido relatada exercendo principalmente a função de aumento de solubilidade das β -Glucanas. O que foi observado por Zhang et al. (2004) , foi que além do aumento da solubilidade, a carboximetilação pode promover ainda uma melhora na atividade antitumoral e imunomoduladora de β -Glucanas extraídas de cogumelos sclerotium *Pleurotus tuber-regium*.

Na figura 4 é apresentada uma predição de estrutura de uma (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana carboximetilada.

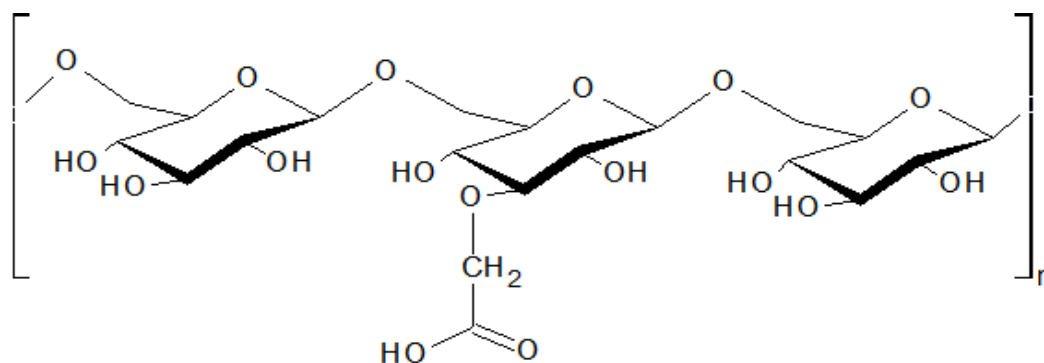


Figura 4 - Representação Estrutural de (1→6)-β-D-Glucana Carboximetilada

Modificações químicas por sulfonação foram realizadas por Vasconcelos et al. (2013), que em seus estudos também observou uma relação entre a modificação e aumento nas atividades biológicas, sendo relatado um produto sulfonado com potencial anticoagulante.

Estudos de modificações de polissacarídeos por sulfatação têm sido empregados na busca por produtos com atividade antiviral (ZHANG et al., 2003). Mas vale ressaltar que a sulfatação pode atribuir não somente características relacionadas ao potencial antiviral, mas possivelmente, também desenvolver outras formas de bioatividade de interesse, como exemplo, antitumorais como já relatado em modificação em α-Glucanas (HUANG et al., 2006).

Na figura 5 é representada sulfatação de uma (1→6)-β-D-Glucana.

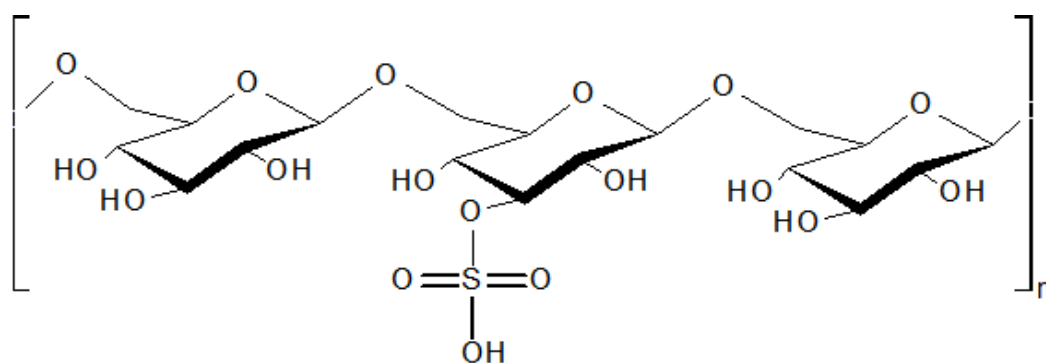


Figura 5 - Representação Estrutural de (1→6)-β-D-Glucana Sulfatada

Wang e Zhang (2009) realizaram em um mesmo estudo derivatizações por carboximetilação, sulfatação, metilação, hidroxietilação e hidroxipropilação em (1→3)-β-D-Glucanas extraídas do corpo do fungo *Ganoderma Lucidum*, onde observaram que o material extraído, inicialmente insolúvel em água, adquiriu certa solubilidade em decorrência das modificações realizadas.

A Metilação, representada na figura 6, é uma derivatização utilizada para estudos de aumento potencial de funcionalidades. Porém é mais extensivamente empregada para determinação de estruturas de β -Glucanas nativas, tipos de ligações glicosídicas presentes. Esta análise comumente é chamada por “Análise de Metilação” (VETVICKA et al., 2013). A Metilação pode ocorrer em todas as hidroxilas das cadeias das β -Glucanas, portanto, pode ocorrer uma mono, di ou trimetilação, sendo que para o caso da análise de estrutura, é necessário atingir o grau máximo de Metilação, ou seja, Metilação em todas as hidroxilas.

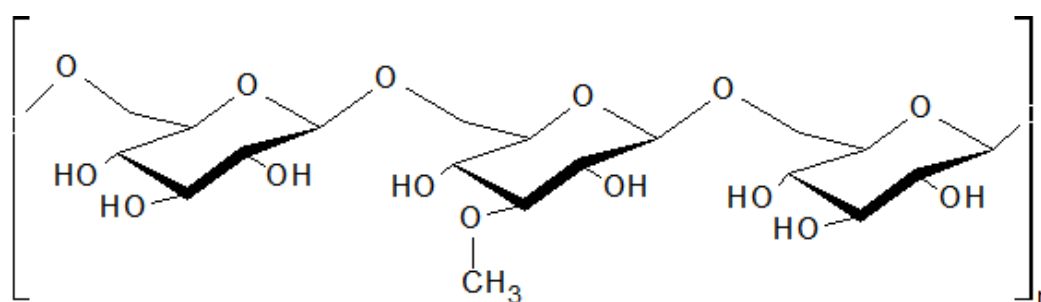


Figura 6 - Representação Estrutural de (1→6)- β -D-Glucana Mono-Metilada

Outro tipo de modificação química que pode ser alcançada em β -Glucanas, é a de inserção de fosfato às estruturas com formação de partículas nanométricas conforme Anusuya e Sathiyabama (2014), que realizaram a fosforilação de uma (1→3;1,6)- β -D-Glucana de *P. aphanidermatum*, utilizando o Tripolifosfato de Sódio (TPFS) em meio básico, um método de obtenção de derivatização rápido e simples, e constataram a propriedade antifúngica adquirida pela glucana fosforilada.

No trabalho realizado por Ye et al. (2013), a fosforilação de uma (1→3)- β -D-Glucana exocelular do fungo *Lachnum* YM120 foi obtida por meio da combinação do Tripolifosfato de Sódio (TPFS) com outro reagente polifosfatado, o Trimetafosfato de Sódio (TMFS). Segundo os autores houve um aumento significativo na atividade antitumoral, já presente na glucana pura, observada em testes in vivo com ratos. As glucanas pura e fosforilada não apresentaram efeitos colaterais significativos o que pode sugerir potencial aplicação como novo medicamento antitumoral em terapias de tumores.

Shi, Shi e Li (2014), realizaram fosforilação mecanoquímica de β -Glucana constituída de 80 % (1→3)- β -D-Glucana e 20 % (1→6)- β -D-Glucana extraída de levedura *Saccharomyces Cerevisiae* com reagente Hexametafosfato de Sódio, cujo

processo possibilitou segundo os autores um número mínimo de espécies reagentes, conseqüentemente obtendo um produto sem maiores interferentes e impurezas, o polissacarídeo fosforilado apresentou acentuado aumento na solubilidade e redução na massa molecular aparente.

Fosforilação de glucanas utilizando Ácido Fosfórico (H_3PO_4) foi empregada nos trabalhos de Du et al. (2012), Suflet; Chitanu e Popa (2006) e Suflet et al. (2011), sendo as mesmas dos tipos (1→3)- β -D-Glucana extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, (1→4)- β -D-Glucana (Celulose) e (1→3)- β -D-Glucana (Curdiana) respectivamente. Em todos estes trabalhos foram obtidas amostras fosforiladas totalmente solúveis em água.

Na figura 7 é demonstrada uma representação de um provável produto de fosforilação de uma (1→6)- β -D-Glucana.

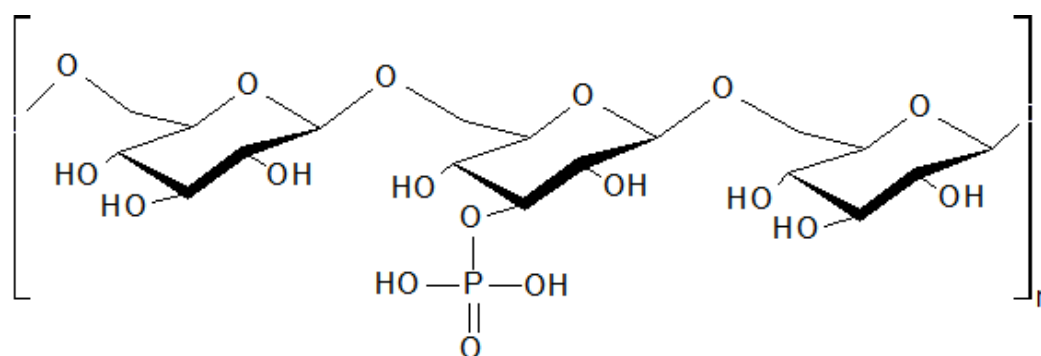


Figura 7 - Representação Estrutural de (1→6)- β -D-Glucana Fosforilada

O emprego de reagentes sais polifosfatados como o TPFS e o TMFS em derivatizações de polissacarídeos em geral, tem sido relatado nos últimos anos, pois vêm se mostrando efetivos nas reações de fosforilação e reticulação, são bastante acessíveis e os métodos de derivatização associados, que geralmente constituem de suspensões aquosas basificadas com Hidróxido de Sódio (NaOH), são mais simples e contém poucos interferentes, que por sua vez auxilia nas etapas de purificação.

O TPFS possui fórmula molecular $Na_5P_3O_{10}$ e massa molecular de $367,86 \text{ g.mol}^{-1}$, seu uso tem sido relatado na obtenção de Amido e β -Glucana fosforilados (monossustituídos) em meio básico a pH acima de 9 (ANUSUYA; SATHIYABAMA, 2014; LIM; SEIB, 1993) e também em quitosano reticulado (dissustituído) à pH abaixo de 9 por reticulação iônica (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006), causada pela interação de grupos protonados do quitosano com grupos trifosfato aniônicos do

TPFS. Nesta reticulação ocorre interação direta do TPFS com grupos amino e não com as hidroxilas próprias das Glucanas em geral.

O TMFS é um sal trifosfato cíclico de fórmula molecular $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ com massa molecular de $305,89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Similar ao TPFS também possibilita a obtenção de polissacarídeos fosforilados e reticulados, cuja reação a um pH acima de 8 origina um produto reticulado, conforme proposto por Lim e Seib (1993) em seu estudo sobre fosforilação de amido com TPFS e TMFS. Os autores também relataram que a pH abaixo de 7 ocorre formação de produtos fosforilados por grupos difosfato.

Na Figura 8 abaixo são mostradas as estruturas do TPFS e TMFS.

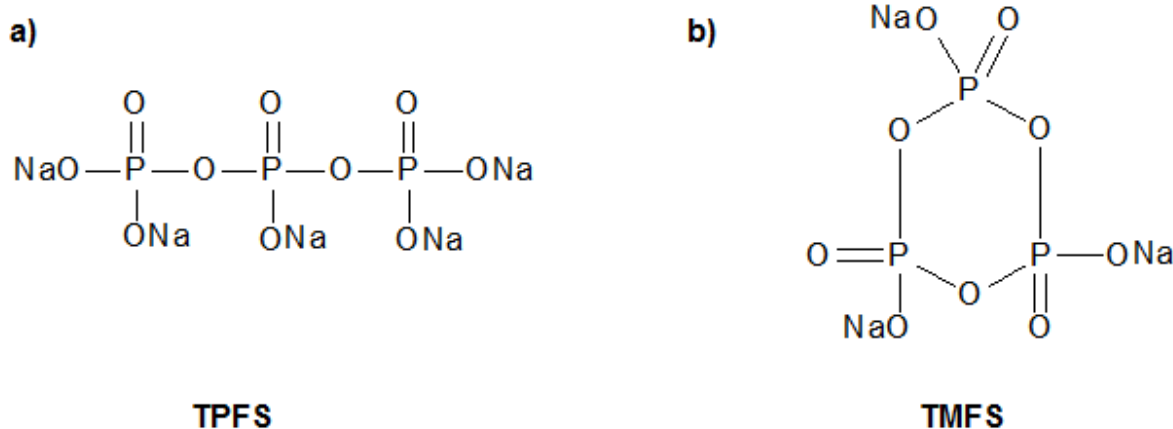


Figura 8 – Representação das Estruturas Químicas de a) TPFS e b) TMFS

A maneira pela qual normalmente se determinam quantitativamente as derivatizações em β -Glucanas é chamada de Grau de Substituição (DS) – do inglês Degree of Substitution. O DS é apresentado sem qualquer unidade dimensional, e representa a quantidade de grupos substituídos por cada unidade de repetição, no caso das β -Glucanas, unidades de anidroglicose (YALPANI, 1999). Para esta espécie química, que contém três hidroxilas substituíveis, o DS máximo atingido é 3,0. β -Glucanas fosforiladas costumam apresentar DS abaixo deste limite. Shi; Shi e Li (2014) alcançaram valores de DS entre 0,77 e 2,09, porém os mesmos foram determinados a partir apenas da parcela solúvel de amostras de β -Glucana fosforilada. Suflet, Chitanu e Popa (2006), por sua vez, alcançaram valores de DS de 0,62 à 1,06 em Celulose Fosforilada.

3.7 Caracterização de β -Glucanas

A caracterização das β -Glucanas é essencial na busca de sua compreensão e sobretudo no apontamento de suas potenciais aplicações. Várias técnicas têm sido aplicadas para se determinar características estruturais, morfológicas, térmicas, superficiais e biológicas. A caracterização estrutural pode ser realizada por meio da associação das técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raios X. Características morfológicas podem ser observadas por Microscopia Eletrônica de varredura (SEM) e as térmicas por meio de Análises Térmicas como a Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Térmica Diferencial (DTA). Caracterização superficial pode ser realizada através da determinação de Potencial Zeta e ainda por meio de modelos matemáticos aplicados a Isotermas de Adsorção como a de Brunauer, Emmett e Teller (BET). É muito importante também caracterizar as β -Glucanas quanto a sua Massa Molecular e Tamanho de Partícula, principalmente quando na hipótese de aplicações biológicas onde a biocompatibilidade é imprescindível, e para tal podem ser utilizadas técnicas de Espalhamento de Luz Estático (SLS) e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

3.7.1 Caracterização Estrutural

A técnica de Difração de Raios X se baseia na medição de difração de radiação incidente específica por amostras sólidas. Como as difrações são influenciadas pela organização estrutural das amostras, pode se estabelecer uma relação entre ângulos de difração e cristalinidade, dado que a cristalinidade é definida por repetições estruturais tridimensionais periódicas, o que por sua vez determina o caminho das radiações incididas. Kagimura et al. (2015b) caracterizaram a (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana (Lasiodiplodana) e observaram por meio da Difractometria de Raios X que a mesma possui baixa cristalinidade com perfil de difração apresentando um pico de grande intensidade, mas muito largo na região de 20 ° (2θ) e outros dois picos menores na

região entre 3 e 15 ° (2 θ). Na mesma glucana, derivatizada por carboximetilação, observaram modificação no perfil, com aparente supressão dos picos entre 3 e 15 ° (2 θ), o que foi relacionado com uma diminuição na cristalinidade da glucana. Bhumkar e Pokharkar (2006) ao modificar o Quitosano por reticulação com Tripolifosfato de Sódio, também observaram diminuição nos picos do reticulado em relação ao polissacarídeo natural, apontando processo de amorfização.

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) se mostra como técnica imprescindível para elucidação de estruturas de macromoléculas orgânicas, sendo uma das mais importantes dentre as técnicas aplicadas ao estudo de polissacarídeos. Através da análise por RMN de amostras polissacarídicas podem ser obtidos dados qualitativos e quantitativos de estruturas químicas e ligações.

Vasconcelos et al. (2008) elucidaram as estruturas de três glucanas exocelulares isoladas de cepas fúngicas de *Lasiodiplodia theobromae* extraídas dos frutos Manga, Pinha e Laranja, utilizando principalmente a técnica de espectroscopia de RMN através dos sinais associados a carbonos ¹³C, sendo todas determinadas como (1→6)- β -D-Glucanas.

Kagimura et al. (2015b) puderam através de espectros de ¹³C RMN, confirmar a reação de carboximetilação da glucana Lasiodiplodana através de desvios químicos relacionados ao grupamento carboximetil. Em outro trabalho de derivatização de β -Glucanas, Ye et al. (2013) confirmaram a fosforilação de uma (1→3)- β -D-Glucana exocelular obtida do fungo *Lachnum* YM120 através de um pico de fósforo (P) característico de grupamento fosfato (-H₂PO₃), observado no espectros de ³¹P RMN da amostra. Similarmente Suflet et al. (2011) confirmaram a fosforilação da glucana Curdlana em espectro de ³¹P RMN, relacionando também picos observados no espectro de ¹H RMN.

A Espectroscopia na Região do Infravermelho tem sido frequentemente utilizada no estudo de polímeros e polissacarídeos, conseqüentemente, de β -Glucanas, e baseia-se na absorção da radiação na faixa de cerca de 4000 a 400 cm⁻¹, trata-se de uma ferramenta muito sensível e rápida, qual apresenta um espectro de absorção característico para cada amostra/molécula, o que por vezes o leva a ser chamado de impressão digital da molécula (KACURÃ;KOVÃ; WILSON, 2001; SYNYSYA; NOVAK, 2014). Os espectros são normalmente coletados na região do infravermelho médio entre 4000 e 400 cm⁻¹ através da técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), que permite obter

informações sobre os grupos funcionais das moléculas analisadas, sendo assim muito útil na elucidação de estruturas químicas, além de possibilitar, associada à quimiometria, a obtenção de dados quantitativos, uma vez que a intensidade de absorção é proporcional a quantidade/concentração das espécies absorptivas (KACURÁ; KOVÁ; WILSON, 2001; PRADO et al., 2005).

Por meio de técnica FTIR vários autores têm discutido diversas modificações químicas em polissacarídeos, entre elas a fosforilação. Na maioria dos casos de fosforilação de glucanas e polissacarídeos em geral, as modificações observadas nos espectros FTIR são muito pequenas, o que pode ser relacionado com os baixos graus de substituição alcançados por esta modificação.

Du et al. (2012) confirmaram a reação de fosforilação por Ácido Fosfórico (H_3PO_4) em uma (1→3)- β -D-Glucana a partir da formação de ligações éster de fosfato identificadas através da técnica de espectroscopia FTIR, além de determinarem a presença de grupos carboxila presentes na amostra. Similarmente Shi, Shi e Li (2014) também confirmaram a fosforilação por Hexametáfosfato de Sódio de uma β -Glucana com frações de (1→3)- β -D-Glucana (1→6)- β -D-Glucana, através de bandas características surgidas nos espectros gerados por espectroscopia FTIR. Anusuya e Sathiyabama (2014) observaram uma banda de absorção em 2508 cm^{-1} característica de estiramento de grupo fosfórico, que levou a confirmação da fosforilação de uma (1→3;1→6)- β -D-Glucana ocasionada por Tripolifosfato de Sódio (TPFS).

3.7.2 Caracterização Morfológica, Térmica e Superficial

Análise por meio da técnica de SEM possibilita, em amostras de polissacarídeos, se observar características de superfície tais como, morfologia, porosidade, rugosidade além de estimativa de tamanho de partícula e homogeneidade de tamanhos das partículas. Anusuya e Sathiyabama (2014), por exemplo, verificaram através de SEM, que uma β -Glucana extraída de parede celular de *Pythium aphanidermatum*, após ser fosforilada com Tripolifosfato de Sódio apresentou tamanhos de partícula diminuídos. Por outro lado Kagimura et al. (2015b) observaram que a glucana Lasiodiplodana Carboximetilada apresentou perda das estruturas

granulares em relação à glucana bruta, sendo verificadas estruturas sem forma ou dimensões bem definidas.

Wang et al. (2005) observaram através de micrografias por SEM que após derivatização de uma (1→3)- β -D-Glucana por sulfatação sua morfologia foi afetada, aparentemente mais relaxada indicando menor ocorrência de ligações de hidrogênio.

Técnicas de Análise Térmica como Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) são essenciais para o estudo de comportamento térmico de substâncias/materiais pois permitem através de curvas de aquecimento/resfriamento controlado determinar etapas de perda/ganho de massa e energias de transição e as faixas de temperaturas associadas a cada uma delas. Dessa forma é possível caracterizar eventos de transição de fase em sólidos, decomposições, processos oxidativos, determinar grau de hidratação, pureza e estabilidade térmica, o tipo do evento (endotérmico/exotérmicos) e ainda auxiliar na quantificação de espécies químicas presentes numa dada amostra.

Análise Térmica de β -Glucanas tem sido utilizada no estudo de estabilidade térmica, processo termodinâmico de gelificação e degradação (pirólise) (KAGIMURA et al., 2015b; KIVELÄ et al., 2011; WU et al., 2013).

Kagimura et al. (2015b) caracterizaram o comportamento térmico da glucana Lasiodiplodana pura e Carboximetilada com uso das técnicas TG, DTG e DTA, e apontaram elevada estabilidade térmica para ambas amostras.

A técnica DSC foi aplicada no estudo de Veverka et al. (2014), que observaram alguns picos endotérmicos característicos nos termogramas, quais sugeriam formação de complexos de β -Glucana com compostos nutraceuticos como Ácido Ascórbico, Ácido Fólico, Quercetina e Curcumina. Novák et al. (2012) observaram duas regiões características de transição vítrea em filme de (1→3;1→6)- β -D-Glucana com plastificante glicerol à 29 e 36 °C.

O Potencial Zeta é uma propriedade eletrostática de partículas em suspensão que está intimamente ligada à sua estabilidade e a morfologia da superfície. De acordo com XU (2008), comumente o potencial elétrico da superfície de pequenas partículas em suspensão é determinado em um local distante desta superfície, este local é chamado de plano de cisalhamento e o potencial medido neste plano é o Potencial Zeta. Existem três métodos para se determinar o Potencial Zeta, espalhamento de luz eletroforético, acústica e eletroacústica, sendo o primeiro, o mais utilizado.

A medição de Potencial Zeta geralmente é realizada em equipamentos multianálises, nos quais por demais técnicas como, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espalhamento de Luz Estático (SLS), é possível se determinar outras importantes propriedades de macromoléculas, o Tamanho de Partícula e Massa Molecular respectivamente.

O Potencial Zeta de uma amostra em dispersão é determinado de acordo com a velocidade de deslocamento em experimento de mobilidade eletroforética, o que está relacionado com sua carga superficial. Entretanto, outros parâmetros podem influenciar a mobilidade das espécies químicas, por exemplo, concentração iônica, pH, condutividade e temperatura do meio (WONGSAGONSUP et al., 2005). Assim, o comportamento de espécies como os polissacarídeos está condicionado a diferentes parâmetros e pode oscilar em uma mesma amostra em diferentes momentos, embora esperam-se apenas pequenas alterações.

Soto et al. (2012) confirmaram a produção de Glucanas catiônicas através da determinação de Potencial Zeta, uma vez que partindo de uma Glucana de Levedura comercial de Potencial Zeta neutro obtiveram amostras modificadas com valores de Potencial Zeta positivos elevados, entre 22,1 e 33,3. Anusuya e Sathiyabama (2014) caracterizaram nanopartículas de (1→3;1→6)-β-D-Glucana fosforilada com Tripolfosfato de Sódio (TPFS), e constataram Potencial Zeta negativo na amostra, indicativo de superfície aniônica. Pode se ressaltar que similarmente, derivatizações em demais polissacarídeos também podem vir a alterar suas características de carga de superfície e portanto o Potencial Zeta, e assim, até mesmo auxiliar na elucidação de demais propriedades. Wongsagonsup et al. (2005), por exemplo, observaram uma relação entre o Potencial Zeta e pequenos Graus de Substituição de grupamentos fosfato em amostras de amido de arroz mono e diesterificadas com TPFS e TMFS respectivamente, e assim propuseram que Graus de Substituição baixos podem ser estimados por meios do Potencial Zeta, o que está associado a consequente inserção de cargas negativas na superfície do amido quando efetuadas ligações de grupamentos fosfato (aniônico).

DLS tem sido utilizada na caracterização de tamanho de partículas de β-Glucanas e polissacarídeos em geral (DE MORAIS; PEREIRA; FONSECA, 2012; DE OLIVEIRA et al., 2012; MOCANU et al., 2014; ZHENG et al., 2011). Por meio da DLS é possível determinar tamanho e distribuição de tamanho de partículas bioativas, que por sua vez determinam sua aplicabilidade. Por exemplo, como demonstrado por Mi

et al. (2002), onde propuseram aplicação de microesferas de Quitosano reticulado em sistema de entrega de fármacos via implante intramuscular.

Em outros casos a DLS pode ser aplicada como técnica de confirmação de formação de materiais nanoparticulados (ANUSUYA; SATHIYABAMA, 2014).

4 MÉTODOS

4.1 Obtenção da β -Glucana fúngica exocelular de *Lasiodiplodia theobromae*

A (1 \rightarrow 6)- β -D-Glucana foi obtida seguindo-se o procedimento realizado por Kagimura et al. (2015b) com algumas modificações.

Primeiramente selecionou-se a cepa do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI extraído do fruto da pinha (*Annona squamosa*), a qual foi repicada temporariamente para manutenção de células viáveis.

O preparo do inóculo iniciou-se pela transferência de uma alçada de micélio do fungo para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud com cloranfenicol, que em seguida foram encaminhadas para incubação em estufa bacteriológica à 28 °C por 96 horas.

O micélio já crescido nas superfícies das placas foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de Meio de Sais Minerais de Vogel – VMSM (VOGEL, 1956) e glicose (5 g.L⁻¹) onde foi cultivado à 28 °C por 48 horas e sob agitação constante de 150 rpm. Esta etapa, também chamada de pré-cultura, é realizada principalmente para adaptação das células ao meio, acrescido sobretudo de glicose, substrato utilizado como fonte de carbono no processo de fermentação e produção do exopolissacarídeo.

Após período de incubação foram retiradas alíquotas dos frascos de Erlenmeyer e transferidas equitativamente para outros frascos de Erlenmeyer contendo meio de cultivo VMSM e glicose à 20 g.L⁻¹. Em seguida os recipientes de fermentação foram introduzidos em incubadora (Shaker) onde ocorreu o processo de fermentação por 72 horas à 28 °C e 175 rpm. As condições da fermentação foram pré-

estabelecidas como ótimas em estudo paralelo do grupo de pesquisa GTBio do departamento de química da UTFPR – Câmpus Pato Branco, conduzido por William Norbey Sanchez Luna.

Terminado o tempo de fermentação, as células foram separadas da solução contendo a glucana exocelular (lasiodiplodana), sais e resíduos de glicose por meio de centrifugação à 1500 x g. A lasiodiplodana em solução foi precipitada com adição de Etanol 96% em proporção de 3 volumes do álcool para 1 volume de solução, com mistura mantida sob refrigeração (4 °C) overnight. A lasiodiplodana precipitada foi ressolubilizada em água destilada e posteriormente dialisada em tubos de diálise com diâmetro de poro de 12 kD contra água destilada por período de 6 dias com três trocas diárias de água. A solução de lasiodiplodana purificada foi esterilizada em autoclave, sob pressão à 121 °C por 15 minutos e após arrefecimento foi congelada e liofilizada para obtenção da lasiodiplodana pura e seca.

4.2 Obtenção de (1→6)-β-D-Glucana Fosforilada com Tripolifosfato de Sódio (TPFS) e Trimetafosfato de Sódio (TMFS)

As (1→6)-β-D-Glucanas Fosforiladas foram preparadas de acordo com metodologia executada por Anusuya e Sathiyabama (2014) com modificações.

Suspensões de (1→6)-β-D-Glucana foram formadas a partir da adição de 0,1 % (m/v) de glucana em água destilada com ajuste de pH 11,5 com adição de NaOH 1 mol.L⁻¹, mantidas sob agitação constante por 2 h à 60 °C.

Às suspensões de (1→6)-β-D-Glucana 1 mg.mL⁻¹ foram adicionados os reagentes de fosforilação TMFS ou TPFS solubilizados em água destilada, sob proporções mássicas (Glucana:Fosforilante) de 2:1 e 1:1. As reações de fosforilação foram realizadas sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente e cessadas com neutralização do meio com HCl 0,5 mol.L⁻¹. As amostras fosforiladas foram dialisadas contra água destilada, em tubos de diálise de membrana de celulose com porosidade de 12 kD e liofilizadas. As amostras em pó, foram nomeadas de acordo com o reagente fosfato utilizado e estocadas em recipientes fechados dentro de dessecador.

Na Tabela 2 são apresentadas as nomações das amostras utilizadas neste estudo:

Tabela 2 – Nomenclatura das Amostras de Lasiodiplodana Nativa e Fosforiladas

| Nome da Amostra | Reagente Fosfato | Concentração de Reagente Fosfato % (m/v) |
|-----------------|------------------|--|
| LAS-N | - | - |
| LAS-TP-2:1 | TPFS | 0,05 |
| LAS-TP-1:1 | TPFS | 0,1 |
| LAS-TM-2:1 | TMFS | 0,05 |
| LAS-TM-1:1 | TMFS | 0,1 |

4.3 Determinação de Grau de Substituição (DS)

O grau de substituição (DS) de fosfatos foi determinado de acordo com o método proposto por Passauer, Bender e Fischer (2010), também aplicado por Shi, Shi e Li (2014) que mensuraram em amostras de glucanas fosforiladas com hexametáfosfato de sódio.

Primeiramente foram determinados os teores de fósforo (percentual) nas amostras pelo método espectrofotométrico Vanado-Molibdato, utilizando como padrão para curva de calibração de fósforo o reagente fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).

Aproximadamente 100 mg de amostra foram bem misturados à 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 3% (m/v) em cadinho de porcelana. A mistura foi seca à 100 °C e posteriormente calcinada à 550 °C por 8 horas. Após arrefecimento foram adicionados às cinzas 4 mL de HCl 1 mol.L⁻¹, completado para 10 mL com água destilada e feita filtração com papel filtro qualitativo em funil de vidro. Em tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de filtrado recolhido, 5 mL de água destilada e 1 mL

de reagente Vanado-Molibdato, após 45 minutos de repouso foram realizadas leituras espectrofotométricas à 435 nm.

O reagente Vanado-Molibdato é preparado pela mistura de volumes iguais de solução de Molibdato de Amônio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄. 4H₂O) 0,0429 mol.L⁻¹ e de solução ácida de Vanadato de Amônio (NH₄VO₃) 0,0214 mol.L⁻¹ contendo 35% (v/v) de Ácido Nítrico (HNO₃) P.A.

Com os teores de fósforo obtidos foram determinados os DS por meio da Equação 1.

$$DS = \frac{162 \times P\%}{3100 - 102 \times P\%} \quad (1)$$

Na equação 1, o número 162 refere-se a massa molecular de uma unidade de anidroglicose, a porcentagem de fosforo é representada por P%, 3100 corresponde à massa molecular do fósforo multiplicada por 100 e o número 102 é a massa molecular do substituinte fosfato (-NaHPO₃) subtraída pela massa molar do átomo de hidrogênio (H). As análises foram realizadas em triplicata.

4.4 Solubilidade em Água

A solubilidade em água foi determinada com base no conteúdo de carboidratos solúveis levando-se em consideração a pureza da glucana obtida.

Foram suspensos aproximadamente 10 mg das amostras em 10 mL de água ultrapura (Milli-Q), permanecendo sob agitação por 24 horas à 25 °C. Após centrifugação à 18000 x g por 15 minutos foi resgatado o sobrenadante, o qual foi utilizado para determinação de carboidratos totais, que por sua vez, foi relacionado com a quantidade de amostra solúvel.

Os carboidratos totais do sobrenadante foram determinados por meio do método Fenol – Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A análise foi realizada em triplicata.

4.5 Difração de Raios X

Os padrões de difração foram obtidos em difratômetro de raios X, equipado com fonte de radiação de lâmpada de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$) e funcionando com configuração de tensão em 40 kV, corrente de 30 mA, passo de $0,02^\circ (2\theta)$ à uma velocidade de $3^\circ (2\theta) \cdot \text{min}^{-1}$, na faixa de leitura de $2-60^\circ (2\theta)$.

4.6 Potencial Zeta e Tamanho Médio de Partículas

O Potencial Zeta, propriedade eletrocinética, foi determinado através de medidas de mobilidade eletroforética por anemometria *Laser Doppler*. Para tal as amostras foram suspensas em água ultrapura (Milli-Q) à $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, à pH 7 (neutro). A análise foi realizada à 25°C em equipamento Zetasizer Nano ZSP, utilizando-se cubeta descartável, própria para medição de potencial zeta.

Utilizando-se as técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), também no equipamento Zetasizer Nano ZSP, foram determinados os tamanhos médios de partículas das amostras. Para análise foram preparadas dispersões das amostras à $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, que foram transferidas para cubetas de poliestireno e direcionadas para leitura.

Os tamanhos médios de partículas foram obtidos por meio de leituras do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão aquosa à temperatura ambiente.

4.7 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C e ^{31}P RMN)

Espectros de ^{13}C e ^{31}P RMN de foram obtidos em espectrômetro de ressonância magnética nuclear com amostras em estado sólido. A espectroscopia de

^{13}C foi realizada à 400 MHz, com 1 hora de acúmulo de sinal. Para leituras espectroscópicas de ^{31}P RMN as configurações utilizadas foram 161,97 MHz e 4 horas de acúmulo de sinal.

4.8 Espectroscopia na Região Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi empregada neste trabalho semelhante ao método utilizado por Kagimura et al. (2015b).

As amostras secas foram trituradas e misturas com KBr também seco, na proporção de 14 mg:140 mg respectivamente. A mistura foi novamente triturada para obtenção de pós finos que posteriormente foram prensados em prensa hidráulica (80 Kgf.m⁻²) para obtenção de pastilhas circulares.

As pastilhas foram analisadas em Espectroscópio de Infravermelho com varreduras na região de 400 a 4000 cm⁻¹ com ajuste de resolução de 2 cm⁻¹, 32 varreduras.

4.9 Análise de Superfície por SEM

As micrografias das amostras foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura. As amostras foram analisadas na forma sólida sobre superfície de fitas de carbono, em equipamento configurado para ampliações na faixa de 800 à 2000 vezes, operando à 15 kV.

4.10 Análise Térmica

As amostras foram avaliadas quanto ao comportamento térmico aplicando-se as técnicas de Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Termogravimetria Derivada (DTG) em equipamento de análise simultânea. A partir dos dados obtidos nas técnicas citadas, foram determinados os estágios de perda de massa das amostras e avaliação da estabilidade térmicas das mesmas.

Baseando-se no estudo realizado por Kagimura et al. (2015b), a faixa de temperatura empregada nas análises simultâneas foi de 26 °C à 800 °C, com gradientes de temperatura de 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de ar sintético com fluxo controlado (50 mL.min⁻¹), e as amostras alocadas em recipiente de α -alumina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da Lasiodiplodana Nativa

A produção de lasiodiplodana pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* já foi relatada e discutida por Kagimura et al. (2015), os quais determinaram que a lasiodiplodana possui estrutura composta por moléculas de D-Glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow6)$ -Glicosídicas e elevada pureza (acima de 95%). Os autores obtiveram a lasiodiplodana por fermentação em fermentador de bancada, portanto algumas diferenças podem ser encontradas em relação a lasiodiplodana obtida no presente trabalho. No processo fermentativo em frascos de Erlenmeyer realizado para obtenção da lasiodiplodana (LAS-N) não ocorrem forças de cisalhamento como as ocasionadas pelas pás (chicanas) em fermentador, o que pode contribuir na manutenção da estrutura do exopolissacarídeo produzido. Assim, pode esperar-se que o tamanho de cadeia da lasiodiplodana obtida em frascos de Erlenmeyer seja maior que o da lasiodiplodana obtida em fermentador, o que por sua vez pode contribuir para modificações em demais propriedades destas macromoléculas, tais como, na solubilidade e cristalinidade.

5.2 Grau de Substituição (DS)

O DS de glucanas derivatizadas geralmente tem relação com demais propriedades destas espécies como solubilidade, cristalinidade, viscosidade, atividades biológicas entre outras (SONG et al., 2015). O DS de uma glucana fosforilada determina a quantidade de unidades de fosfato ligadas por unidade glicosídica, sendo o número máximo de substituições 3, relativo a quantidade de hidroxilas disponíveis para derivatização em cada unidade de glicose.

Os dados de teor de fósforo e DS obtidos para as amostras são apresentados na tabela 3. Na amostra LAS-N não foi detectado presença de fósforo, o que demonstra que a amostra de partida não continha fosfatos e nem mesmo resíduos de fosfatos do meio de cultivo.

As amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TP-2:1 apresentaram teores de fósforo muito próximos, mesmo preparadas com diferentes quantidades de derivatizante, o que sugere que a fosforilação com TPFS não ocorre com dependência de sua concentração. Wongsagonsup et al. (2014) também evidenciaram amostras de polissacarídeo fosforilado com DS muito semelhantes mesmo preparadas com até o triplo de diferença nas concentrações de derivatizante. No entanto, outros autores verificaram maiores diferenças nos valores de DS para diferentes concentrações de derivatizante. Passauer, Bender e Fischer (2010) obtiveram amostras de amido fosforilado com sais monofosfatados e observaram aumento de DS em consequência ao aumento das concentrações dos sais. Há ainda casos diferenciados na literatura, onde amostras fosforiladas apresentam DS variados e aparentemente sem relação direta com as proporções de derivatizante, por exemplo, como observado por Shi, Shi e Li (2014), onde amostras de β -glucana insolúvel foram fosforiladas com hexametáfosfato de sódio e apresentaram DS aleatórios em relação às concentrações de derivatizante utilizadas, mesmo mantidas as demais condições experimentais.

Tabela 3 - Dados de Teor de Fósforo e Grau de Substituição (DS)

| Amostra | Teor de Fósforo (%) | DS |
|------------|---------------------|-----------------|
| LAS-N | - | - |
| LAS-TP-1:1 | 0,4729 ± 0,0023 | 0,0251 ± 0,0001 |
| LAS-TP-2:1 | 0,4819 ± 0,0105 | 0,0256 ± 0,0005 |
| LAS-TM-1:1 | 0,4766 ± 0,0070 | 0,0253 ± 0,0003 |
| LAS-TM-2:1 | 0,9270 ± 0,0045 | 0,0499 ± 0,0002 |

As amostras LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 apresentaram DS diferentes, sendo o DS da segunda muito maior, apesar de uma menor concentração de TMFS utilizada para fosforilação desta amostra. Este comportamento também foi observado em algumas amostras de β -glucana fosforiladas por método mecanoquímico com derivatizante hexametáfosfato de sódio em trabalho realizado por Shi, Shi e Li (2014). Embora haja uma lacuna de dados de mecanismo de reação de fosforilação de polissacarídeos na literatura, para a fosforilação da lasiodiplodana com TMFS, aparentemente a reação é favorecida com maiores concentrações de polissacarídeos.

5.3 Solubilidade em Água

Na tabela 4 são apresentados os dados de solubilidade das amostras, obtidos pela determinação de carboidratos totais.

As amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TP-2:1 fosforiladas com TPFS apresentaram aumento de solubilidade em relação a amostra LAS-N, de forma que, LAS-TP-1:1 apresentou praticamente o dobro da solubilidade da amostra LAS-TP-2:1, o que pode estar relacionado a intensidade das modificações químicas ocorridas no processo de fosforilação, tal como demonstrado pelos valores de DS apresentados na tabela 3, que parecem demonstrar uma relação inversa entre solubilidade e grau de substituição na lasiodiplodana.

As amostras LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 também apresentaram aumento de solubilidade em relação a amostra LAS-N, sendo, LAS-TM-1:1 mais solúvel em água do que LAS-TM-2:1. Comportamento semelhante as amostras fosforiladas com TPFS, com uma diferença de solubilidade mais acentuada, o que por sua vez, pode ser relacionado com maior diferenciação em seus DS. Shi, Shi e Li (2014), obtiveram amostras de (1→3)- β -D-glucana fosforiladas que apresentaram comportamento diferente. Os autores observaram aumentos entre 24 e 31% na solubilidade em amostras fosforiladas com diferentes DS em relação à β -glucana nativa, porém com solubilidades iguais ou muito próximas entre si para alguns DS.

Tabela 4 - Dados de Solubilidade em Água

| Amostra | Solubilidade (mg.mL ⁻¹) |
|------------|-------------------------------------|
| LAS-N | 0,0200 ± 0,0001 |
| LAS-TP-1:1 | 0,4100 ± 0,0464 |
| LAS-TP-2:1 | 0,2635 ± 0,0203 |
| LAS-TM-1:1 | 0,3075 ± 0,0063 |
| LAS-TM-2:1 | 0,1130 ± 0,0070 |

Stahl et al. (2007) estudaram amostras de amido de pinhão fosforilado com três diferentes DS (baixo, médio e alto) e observaram aumento de solubilidade das amostras fosforiladas em relação ao amido nativo, também observaram maior solubilidade para a amostra de DS médio (66,6 %) e solubilidades mais próximas entre as amostras DS baixo e alto (24,3 e 28,4 % respectivamente). Deng et al. (2015) verificaram aumento de solubilidade em α -glucana após fosforilação com um único DS estudado, com valor 0,206.

Wongsagonsup et al. (2014) observaram comportamento de solubilidade em água bem característico para amostras de amido de mandioca fosforiladas (por reticulação) com mistura de derivatizantes TMFS/TPFS (99:1 proporção mássica respectiva), iniciando com aumento da solubilidade acompanhando o aumento dos DS até um máximo de solubilidade, seguindo com diminuição da solubilidade em DS

maiores, finalmente chegando ao pontos de DS mais alto que apresentaram solubilidades inferiores a do amido de mandioca não modificado.

De acordo com os resultados de solubilidade das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas e das observações relatadas nos trabalhos consultados, foi possível verificar que a solubilidade de glucanas derivatizadas por fosforilação (mono ou diéster fosfato) não possui comportamento único em relação a intensidade das modificações (DS), ou seja, cada amostra específica de glucana pode possuir um comportamento de solubilidade igualmente específico quando fosforiladas.

Cabe salientar que diversos estudos sobre β -glucanas, e sobretudo, relacionados a fosforilação destas macromoléculas, não apresentam dados de solubilidade, mesmo sendo essa uma propriedade fundamental e determinante nas aplicações biológicas. Um dos possíveis fatores pelo qual não são relatados dados de solubilidade é que grande parte das β -glucanas possuem baixa solubilidade e mesmo quando derivatizadas não possuem um acentuado aumento na solubilidade, que por sua vez, seria um fator de dificuldade para as aplicações biológicas, grande foco destes estudos nas últimas décadas. Outro fator importante está no mérito das técnicas de determinação de solubilidade, geralmente é indicada ou disponibilizada, como no presente trabalho, análise colorimétrica pelo método fenol-sulfúrico, muito sensível, e que requer para alta precisão dos dados, alíquotas solúveis estritamente homogêneas.

Por fim, em alguns casos a determinação de solubilidade das glucanas não é realizada, porém é determinado o poder de inchamento das amostras, também relacionado com comportamento em meio aquoso e importante para determinadas aplicações industriais e tecnológicas, por exemplo, como matriz de liberação de controlada de fármacos (ASCHERI; PEREIRA; BASTOS, 2014; FANG et al., 2008; SINGH; NATH, 2012).

5.4 Difração de Raios X

Os padrões de difração de raios X dos polissacarídeos são definidos por suas propriedades estruturais, que podem interferir ainda na solubilidade, poder de

inchamento, flexibilidade e outras propriedades físicas (GHRIBI et al., 2015). O arranjo estrutural, que está relacionado com a cristalinidade de um polissacarídeo é estritamente dependente do processo de secagem do mesmo (LI et al., 2016).

Os difratogramas das amostras são apresentados na figura 9. Foram observados picos de difração nas posições 5, 19 (ombro), 21, 23, 35 e entre 39 e 43,0 ° (2θ) nos difratogramas de todas as amostras, com exceção do primeiro pico na amostra LAS-TP-2:1. A similaridade entre os picos das amostras fosforiladas e da amostra LAS-N demonstram que a estrutura principal de cadeia foi mantida com a derivatização e a organização espacial das cadeias parece ter sido alterada apenas ligeiramente na amostra LAS-TP-2:1, indicado pela ausência do pico em 5,5 ° (2θ). Os picos de difração principais entre 21 e 23 ° (2θ) indicam certa cristalinidade nas amostras, apesar do padrão pouco mais amorfo esperado para a lasiodiplodana (KAGIMURA et al., 2015b). Uma provável causa das diferenças entre padrões de difração da lasiodiplodana obtida neste trabalho e no de Kagimura et al. (2015b) é a condução do processo de produção, fermentação em frascos de Erlenmeyer e em fermentador de bancada respectivamente.

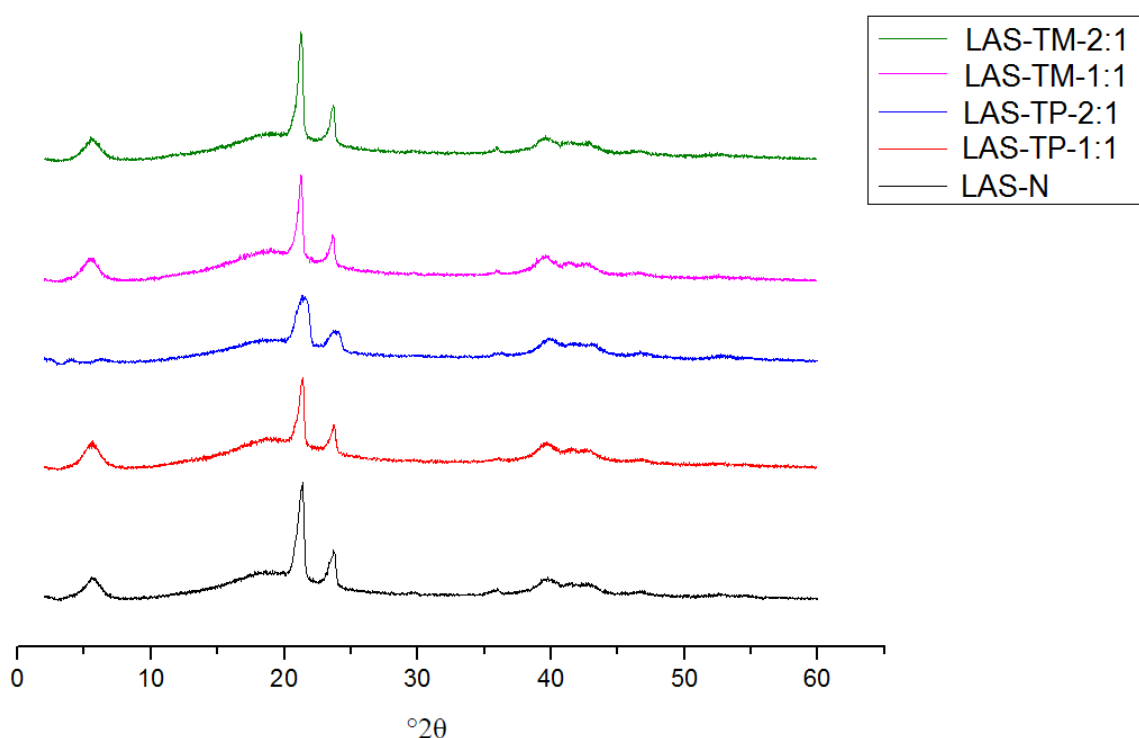


Figura 9 - Difratogramas de raios X das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TPFS e TMFS

Algumas β -glucanas são relatadas possuindo estrutura mais amorfa, indicada pela ausência de picos bem definidos (MANIKANDAN; SATHIYABAMA, 2016a; NOVÁK et al., 2012). Algumas outras podem possuir alta cristalinidade, tal como observado por Suflet, Chitanu e Popa (2006) em celulose microcristalina e por Ju et al. (2015) em relação a amostras de celulose com índices de cristalinidade de até 90%.

5.5 Potencial Zeta e Tamanho Médio de Partículas

Dados experimentais de determinação de potencial zeta das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas, são demonstrados na figura 10. Observa-se nos gráficos de potencial zeta que são realizadas ao menos três leituras por amostra para que se possam reduzir erros e determinar mais corretamente as potencias médios. Algumas amostras apresentam maior homogeneidade na carga de superfície ao longo das partículas dispersas do que outras. No caso das amostras fosforiladas podem ser observadas leituras de potencial zeta menos homogêneas do que para a amostra LAS-N, o que pode estar relacionado a heterogeneidade ao longo das cadeias das macromoléculas, decorrente da inserção de grupamentos fosfato em posições aleatórias nas cadeias.

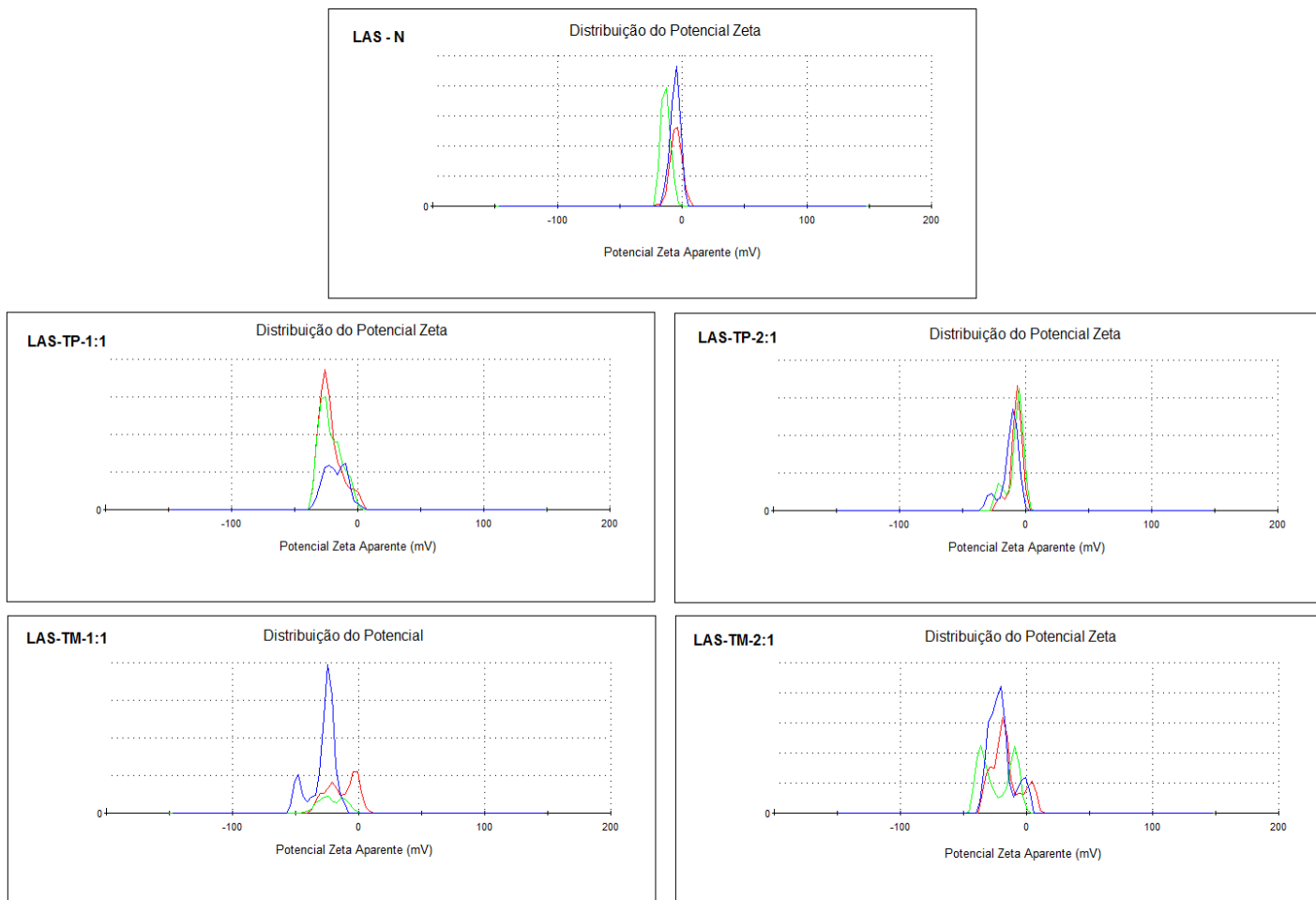


Figura 10 - Gráficos de distribuição do potencial zeta das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS

O potencial zeta médio das amostras são apresentados na tabela 5. Todas as amostras fosforiladas apresentaram potencial zeta superior (em módulo) ao da lasiodiplodana nativa (LAS-N). Tais resultados podem ser associados a inserção de grupamentos fosfato nas cadeias da β -glucana, estes grupamentos tendem a proporcionar caráter mais aniônico aos polissacarídeos, o que pode ser associado aos valores maiores negativos determinados (SOTO et al., 2012). Quando comparados os resultados de potencial zeta das amostras fosforiladas com seus respectivos DS parece não haver uma relação direta entre os dados, ao menos não para as amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TP-2:1, pois esta última mesmo apresentando DS ligeiramente maior apresentou menor potencial zeta.

Entre as amostras LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 foram observados resultados de potencial zeta mais próximos do que das amostras fosforiladas com TPFS, e neste

caso, foi verificado maior potencial zeta para a amostra LAS-TM-2:1, cuja incidência de modificações estruturais dadas pelo DS foi igualmente maior.

Tabela 5 - Dados de Potencial Zeta

| Amostra | Potencial Zeta Médio (mV) |
|-----------|---------------------------|
| LAS-N | -4,80 |
| GP-TP-1:1 | -22,1 |
| GP-TP-2:1 | -12,4 |
| GP-TM-1:1 | -13,2 |
| GP-TM-2:1 | -16,5 |

Wongsagonsup et al. (2005) avaliaram amidos fosforilados por TPFS e TMFS, verificaram que amostras fosforiladas com ambos derivatizante apresentaram potencial zeta superiores ao do amido puro, sendo todos negativos. Os autores ainda constataram que amostras de amido fosforilado com TPFS e TMFS apresentaram uma relação direta entre DS e potencial zeta, a medida que aumentaram os DS, aumentaram também os valores de potencial zeta.

As amostras LAS-N, GP-TP-1:1, GP-TP-2:1, GP-TM-1:1 e GP-TM-2:1 apresentaram valores de potencial zeta menores do que 30 (em módulo) o que sugere que as mesmas amostras, quando dispersas em água formem suspensões coloidais instáveis, ou seja, tendem a possuir alguma interação entre partículas, possivelmente formando aglomerados e com tendência a precipitação, o que de fato ocorre com as suspensões destas amostras em repouso (WONGSAGONSUP et al., 2005). Embora, de forma contrastante, Manikandan e Sathiyabama (2016) tenham considerado estáveis amostras de quitosana fosforilada com TPFS possuindo potencial zeta de -28 mV.

Em estudo sobre fosforilação de uma β -glucana fúngica fosforilada com TPFS, Anusuya e Sathiyabama (2014) obtiveram nanopartículas com potencial zeta de -32,5 mV, e assim determinaram a estabilidade coloidal da amostra.

O tamanho médio de partículas e índice de polidispersão das amostras são apresentados na tabela 6. Foi observado diminuição de tamanho médio de partícula em todas as amostras fosforiladas quando comparadas a amostra LAS-N, e para todos os casos esta diminuição foi de mais que metade do tamanho.

As diminuições de tamanho constatadas podem estar relacionadas a diminuição das interações intermoleculares nas macromoléculas fosforiladas, pois uma vez diminuídas tais interações, a exemplo das ligações de hidrogênio, a possibilidade de aglomeração é menor, há diminuição das estruturas tridimensionais que unem cadeias por estas interações (MOCANU et al., 2014). Entretanto, é importante ressaltar que os índices de polidispersão foram todos superiores à 0,5, o que indica grande distribuição de tamanhos de partícula das amostras (grande heterogeneidade), ainda estes índices foram bem diferentes entre cada amostra (HEBEISH A et al., 2015; N et al., 2012).

Tabela 6 - Dados de Tamanho Médio de Partícula e Índice de Polidispersão

| Amostra | Tamanho Médio (nm) | Índice de Polidispersão |
|------------|--------------------|-------------------------|
| LAS-N | 1002 | 0,902 |
| LAS-TP-1:1 | 304,4 | 0,733 |
| LAS-TP-2:1 | 484,8 | 0,903 |
| LAS-TM-1:1 | 497,2 | 0,678 |
| LAS-TM-2:1 | 252,8 | 0,516 |

Entre as amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TP-2:1, a primeira apresentou menor tamanho médio de partícula com menor distribuição de tamanho (maior homogeneidade). Já entre as amostras LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1, a primeira apresentou maior tamanho médio de partícula com maior distribuição. Quando relacionados estes dados com os respectivos DS das quatro amostras, não é observada uma relação clara, pois nas amostras fosforiladas com TPFS ocorreu maior tamanho médio na amostra com maior DS, enquanto que para as amostras fosforiladas com TMFS foi observado comportamento contrário. Entretanto, foi

observado que nos dois tipos de fosforilação as amostras que apresentaram menor índice de Polidispersão, apresentaram também menores tamanhos médios.

Naser et al. (2012) obtiveram nanopartículas de quitosana fosforilada com TPFS com tamanhos médios determinados por DLS na faixa de 132-300 nm. Já Anusuya e Sathiyabama (2014) e Manikandan e Sathiyabama (2016) obtiveram nanopartículas de β -glucanas também fosforiladas com TPFS com tamanhos médios determinados por DLS de 60 nm e 83,32 respectivamente. Em todos estes casos, foram observados tamanhos médios de partícula inferiores aos reportados nas amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas, o que por sua vez, pode estar relacionado as diferentes estruturas de cadeia e massas moleculares das amostras.

5.6 Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C e ^{31}P RMN)

As análises de RMN têm sido utilizadas com sucesso na determinação de estruturas de polissacarídeos, pois permitem obter espectros bem característicos para cada estrutura e ainda são realizadas de forma não destrutiva, o que permite a reutilização das amostras (DA SILVA et al., 2006).

Os espectros RMN ^{13}C das amostras LAS-N, LAS-TP-1:1, LAS-TP-2:1, LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 são apresentados na figura 11. Foram observados 6 picos correspondentes aos carbonos (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) das unidades de D-glicose que constituem as macromoléculas, para todas as amostras e nos mesmos desvios químicos (δ). Os desvios foram observados e associados aos carbonos de acordo com o disposto na tabela 7.

Tabela 7 - Sinais Espectroscópicos de ^{13}C RMN

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | Método | Frequência (MHz) |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------------|------------------|
| GP-TM (2:1) | 103,97 | 76,79 | 86,66 | 74,68 | 62,54 | 69,02 | Sólido | 400 |
| GP-TP (2:1) | 104,00 | 76,87 | 86,54 | 74,66 | 62,57 | 68,99 | Sólido | 400 |
| GP-TM (1:1) | 104,02 | 76,86 | 86,58 | 74,65 | 62,53 | 68,96 | Sólido | 400 |
| GP-TP (1:1) | 104,02 | 76,85 | 86,58 | 74,66 | 62,54 | 68,99 | Sólido | 400 |
| LAS-N | 104,04 | 76,61 | 86,62 | 74,67 | 62,56 | 69,02 | Sólido | 400 |
| LAS-N* | 103,70 | 74,09 | 75,98 | 71,11 | 61,59 | 69,01 | Líquido (D ₂ O) | 200 |

* Amostra de lasiodiplodana obtida no estudo de Kagimura et al. (2015b).

Apesar de ter sido anteriormente avaliada por ^{13}C RMN por Kagimura et al. (2015b) e determinada como uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana, a LAS-N, foi novamente analisada por se tratar de dados de RMN em estado sólido, o que proporciona pequenas diferenças nos desvios em relação ao trabalho anterior realizado por análise em meio líquido (D₂O, 99.9%), possibilita redução de gasto e tempo com solvente e solubilização, embora em contrapartida exija uma maior quantidade de amostra para análise. Além disso, visando também avaliar possíveis diferenças na estrutura base em função das condições de produção (fermentação em frascos de Erlenmeyer, menor controle de parâmetros e maior produtividade). Foi observada manutenção da estrutura base, sendo confirmada a configuração estrutural (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana, também comparada a resultados de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana reportados por Du et al. (2012).

As amostras fosforiladas não apresentaram diferenças nos desvios químicos ^{13}C RMN em relação a LAS-N, sendo verificado apenas diferença nas intensidades dos sinais espectrais, cujas amostras fosforiladas apresentaram maior intensidade. De forma semelhante outros autores relataram a impossibilidade de determinação da fosforilação por espectroscopia ^{13}C RMN, sendo reportada a possibilidade de relação com baixos DS dos polissacarídeos fosforilados (CHEN et al., 2009; CURY; KLEIN;

EVANGELISTA, 2008; YE et al., 2013). Desta forma a técnica de espectroscopia ^{31}P RMN, é utilizada para auxiliar na determinação de fosforilação de glucanas, junto com técnicas espectroscópicas como FTIR e espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT Raman) (LACK et al., 2007; PASSAUER; BENDER; FISCHER, 2010; SHI; SHI; LI, 2014; YE et al., 2013).

Schmieder et al. (2013) verificaram que a determinação das modificações por fosforilação de glucana com técnicas de RMN heteronuclear pode não ser possível, entretanto análises por correlação $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ facilitam uma determinação clara das estruturas modificadas. No presente trabalho não foram realizadas análises de ^1H em função da técnica de RMN em sólido não ser permitida para amostras que possibilitem absorção ou adsorção de água, além da abundância de hidroxilas.

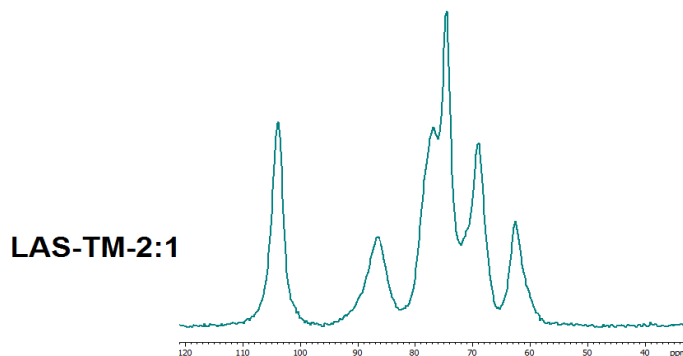
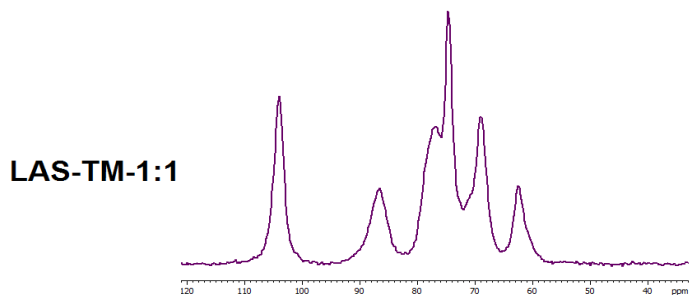
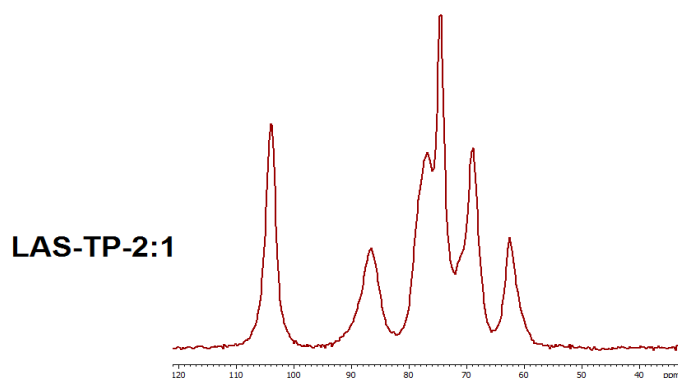
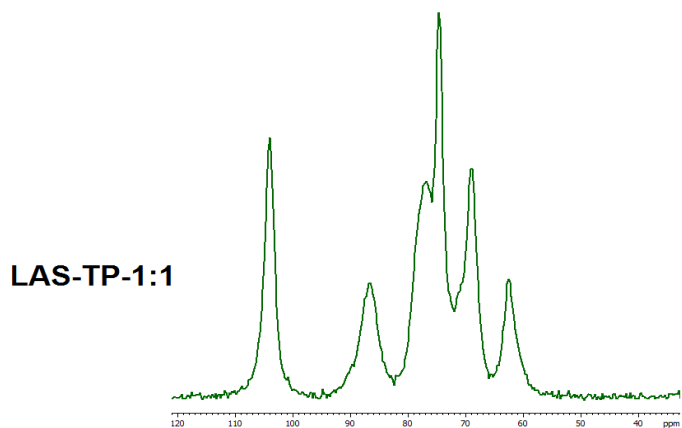
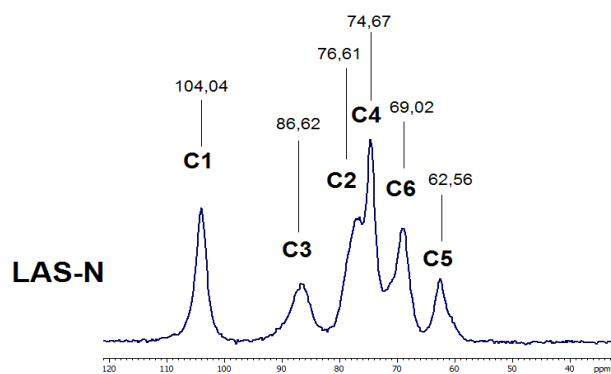


Figura 11 - Espectros ^{13}C RMN das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS

Análises de ^{31}P RMN das amostras fosforiladas possibilitaram a identificação de grupamentos fosfato presentes nas amostras, como observado nos espectros da figura 12.

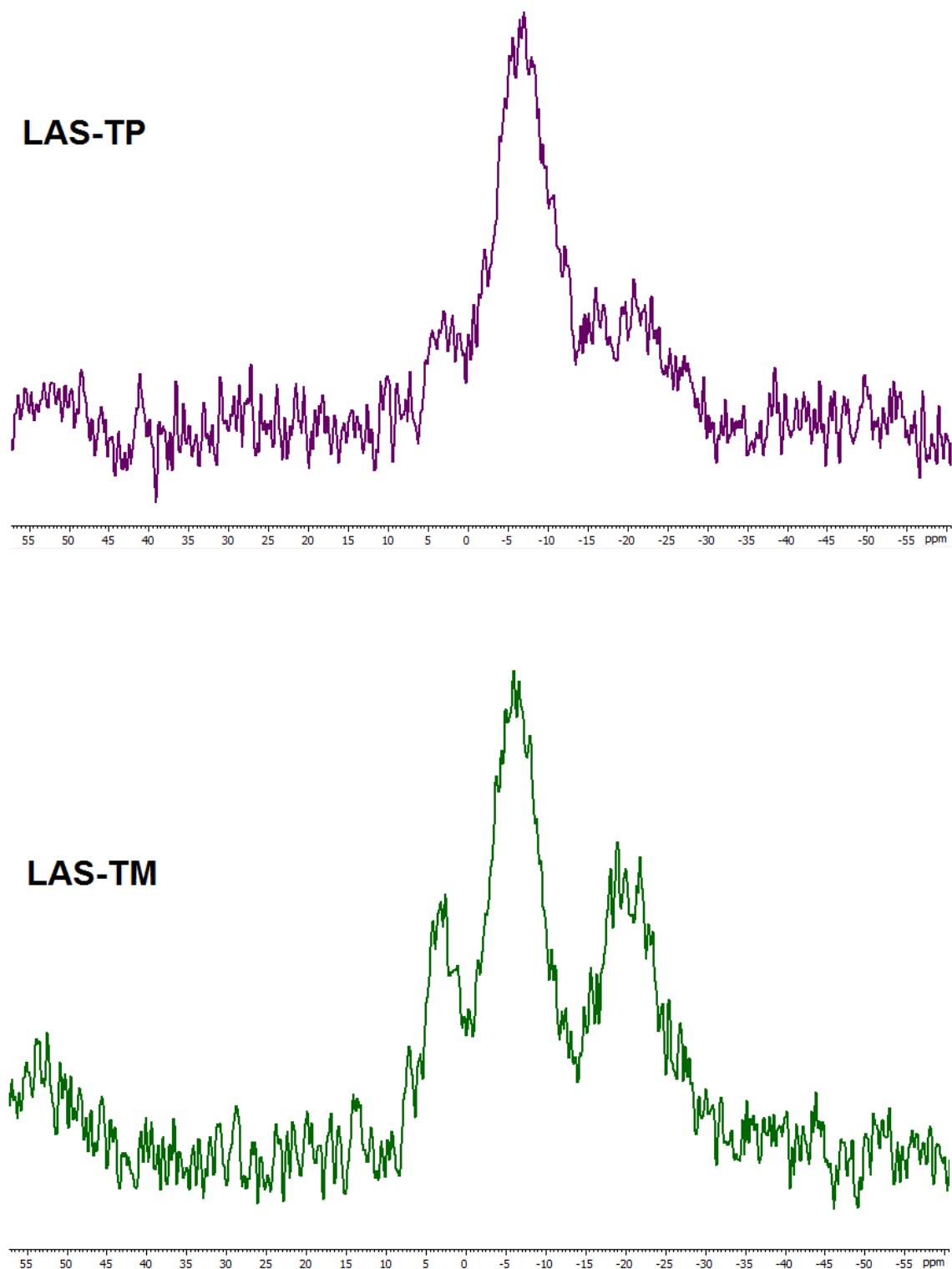


Figura 12 - Espectros ^{31}P RMN das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TPFS e TMFS

Nos espectros ^{31}P RMN das amostras fosforiladas tanto com TPFS quanto com TMFS foram identificadas três regiões com sinais semelhantes. A primeira região entre 1,9 e 4,5 ppm com sinais que podem estar associados a presença de monoéster monofosfato, bastante relatada em glucanas fosforiladas, sobretudo em (1→3)- β -D-

glucanas, mas possivelmente inédita em (1→6)-β-D-glucana (CHEN et al., 2009; GHOTRA et al., 2007; HE et al., 2015; PASSAUER; BENDER; FISCHER, 2010; SHI; SHI; LI, 2014; YE et al., 2013). Uma segunda região com sinal mais intenso com máximo em -6,8 ppm pode ser associada a presença de monoéster difosfato ou ainda a resíduos de difosfato e/ou pirofosfato inorgânicos (GHOTRA et al., 2007; PASSAUER; BENDER; FISCHER, 2010; SHI; SHI; LI, 2014). Finalmente uma terceira região com dois sinais em -15,9 e -20,7 ppm, o primeiro sinal semelhante ao que foi relatado por Shi, Shi e Li (2014) pode estar relacionado à frações de ortofosfatos livres. O segundo sinal, de acordo com dados reportados por Lack et al. (2007), pode ser atribuído a formação de monoéster trifosfatos. A formação de ésteres de trifosfato é raramente relatada, pois geralmente esta espécie química ocorre como intermediário, pois possui instabilidade em meio alcalino, condição muito utilizada em reações de fosforilação de polissacarídeos por sais polifosfatados (SANG; PRAKASH; SEIB, 2007).

Embora existam vários estudos com fosforilação de glucanas, e predominantemente amidos, as determinações dos pontos (carbonos) da ligação éster, bem como a própria determinação das espécies de fosfato ligadas, carece de dados mais específicos, uma vez que na maior parte dos casos, outros núcleos de RMN (por exemplo, ^{13}C e ^1H) não são avaliados ou os dados não são apresentados.

Segundo Schmieder et al. (2013) em amostras como as de lasiodiplodana fosforiladas, onde não há homogeneidade de massa molecular devido ao processamento, é praticamente impossível realizar uma determinação específica do ponto exato de inserção dos grupamentos, a heterogeneidade dos tamanhos de cadeia pode interferir nos resultados, o que para alguns casos, como em amidos fosforilados, pode ser minimizado por processos de hidrólise enzimática para utilizar-se apenas os monômeros, ou seja frações homogêneas para a análise. Assim a determinação dos carbonos da ligação éster fosfato na lasiodiplodana não foi possível, pois as amostras possuíam heterogeneidade e necessitavam ainda de técnicas de acoplamento envolvendo espectros de ^1H RMN. Ressalta-se que, a determinação por comparação também não foi possível devido à ausência de estudos com (1→6)-β-D-glucana fosforilada.

5.7 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas são apresentados na figura 13. Bandas de absorção nas regiões de 3364 cm^{-1} e 2935 cm^{-1} observadas em todas as amostras, são atribuídas à estiramento O-H relacionados às hidroxilas e vibração de estiramento C-H (grupos CH_2) do anel de piranose, ambas características das glucanas (DENG et al., 2012; NOVÁK et al., 2012; SHI; SHI; LI, 2014).

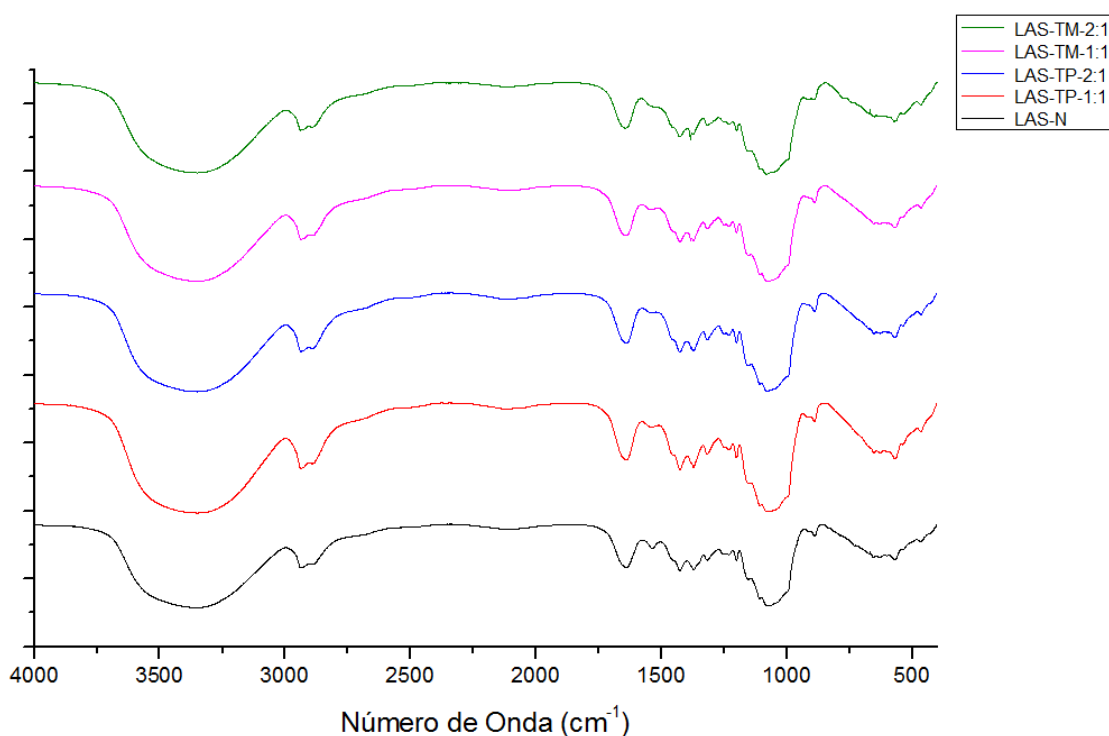


Figura 13 - Espectros FTIR das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFE e TPFS

Na região de 889 cm^{-1} foram verificadas bandas de absorção em todos os espectros (figura 13) relativas a ligação β -D-glicosídica (CHEN et al., 2015; DU et al., 2016; SUFLET et al., 2011).

Na figura 14 são apresentados os espectros das amostras LAS-N, LAS-TP-1:1, LAS-TP-2:1, LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 ampliados na faixa entre 1750 e 750 cm^{-1} . Bandas de absorção largas com intensidade máxima em 1075 cm^{-1} (figura 14), comum a todos os espectros, são atribuídas a vibrações de estiramento simétrico nas ligações

C-O-C do anel D-glicose (KAGIMURA et al., 2015b; LIMBERGER-BAYER et al., 2014). Outras bandas mais estreitas em 1202 cm^{-1} , podem estar relacionadas a vibrações de estiramento de ligação C-O no anel D-glicose (DENG et al., 2012; XU et al., 2012).

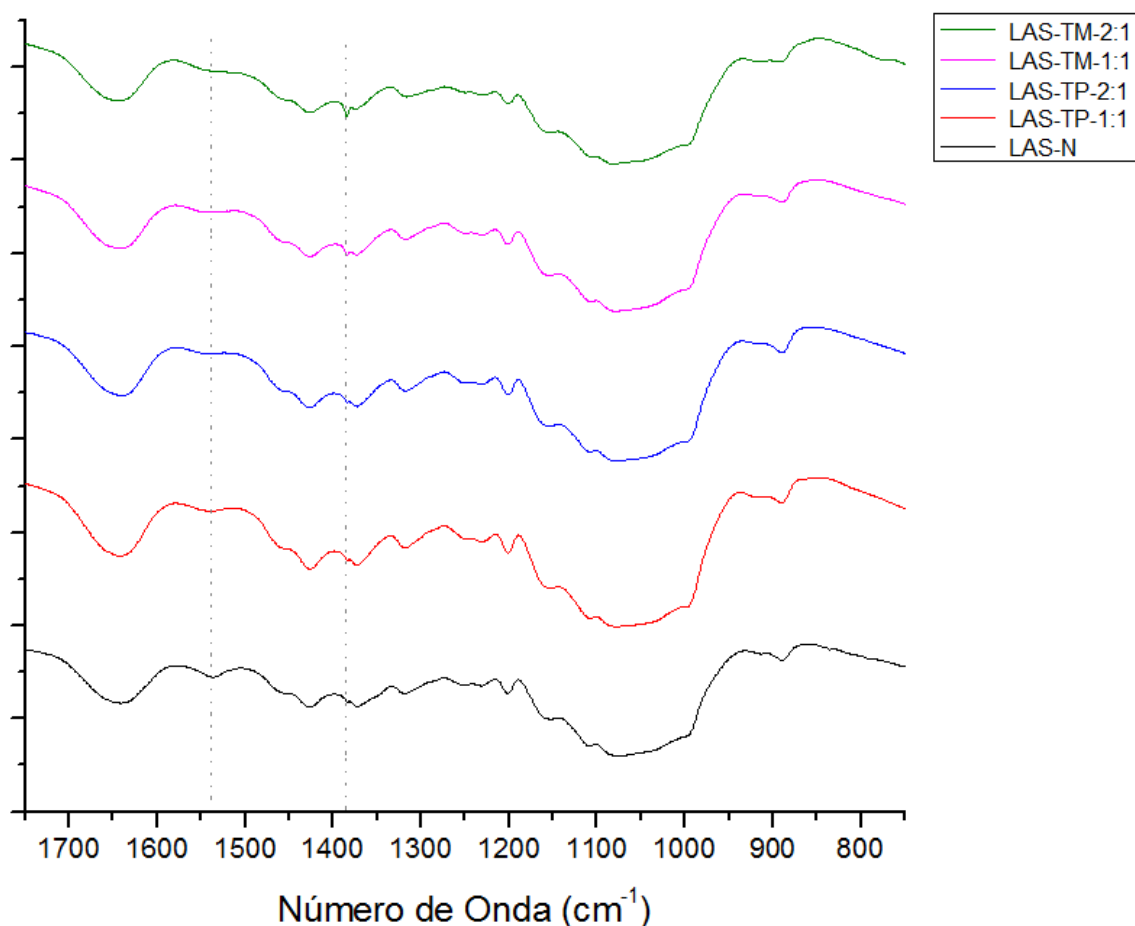


Figura 14 - Espectros FTIR ampliados na faixa de 1750 e 750 cm^{-1} das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS

Bandas de absorção também muito comuns às glucanas foram observadas na região de 1641 cm^{-1} em todos os espectros (figura 14), as quais são associadas à água (SUFLET et al., 2011; WANG et al., 2009). Foi observado diminuição de intensidade, com quase desaparecimento da banda 1536 cm^{-1} nos espectros de todas as amostras fosforiladas em relação à LAS-N (figura 14), o que pode estar relacionado as pequenas modificações estruturais causadas pela fosforilação. Outra modificação sutil observada, foi o surgimento de uma banda fraca em 1385 cm^{-1} somente no espectro da amostra LAS-TM-2:1, que pode ser atribuída a ligeiras mudanças no grupo CHO que possui absorção nesta região (DU et al., 2012).

Embora a técnica FTIR seja uma das principais ferramentas para caracterização de polissacarídeos, sobretudo derivatizados, a determinação da fosforilação de glucanas por FTIR não é muito simples, pois as bandas características dos grupamentos fosfato ligados (éster fosfato) muitas vezes têm baixa intensidade e são difíceis de detectar com clareza, provavelmente devido ao fato destas derivatizações por fosforilação ocasionarem produtos pouco modificados (com baixos DS) (PASSAUER; LIEBNER; FISCHER, 2006; YE et al., 2013).

Li et al. (2009) obtiveram micropartículas de amido fosforilado com TPFS, porém seus espectros FTIR não apresentaram bandas características das ligações P=O ou P-O-C como esperado, o que os autores atribuíram aos baixos graus de reticulação (substituição diéster fosfato). De forma semelhante, Gao et al. (2014) também não observaram as bandas características de ésteres de fosfato nos espectros FTIR de amostras de amido reticulado com TMFS, e sugeriram que estas bandas relativas à P=O e P-O-C poderiam ser detectadas em amostras com graus de reticulação maiores. Tais bandas referentes aos ésteres de fosfato foram relatadas por Suflet, Chitanu e Popa (2006) relativas a amostras de celulose fosforilada com DS muito superiores aos comumente verificados para este tipo de derivatização, com valores entre 0,62 e 1,06, sendo observadas nas regiões de 1210 cm^{-1} (P=O) e 810 cm^{-1} (P-O-C).

Os espectros das amostras LAS-TP-1:1, LAS-TP-2:1, LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 não apresentaram as bandas relacionadas à P=O e P-O-C esperadas, o que pode estar associado aos seus baixos DS, visto que mesmo em amostras com DS consideravelmente alto, Suflet, Chitanu e Popa (2006) observaram estas bandas sem grandes intensidades, embora bem distintas. Ainda, a semelhança entre os espectros das amostras fosforiladas e LAS-N indica que o processo de fosforilação não ocasionou modificações na estrutura básica da lasiodiplodana, sendo mantidas as cadeias de anéis de glicopiranosose, tal como observado por Ye et al. (2013) e em concordância com os dados de ^{13}C RMN e dos difratogramas de raios X das respectivas amostras.

5.8 Análise de Superfície por SEM

As análises macroestruturais das amostras foram realizadas por SEM em diferentes aproximações e permitiram avaliar as modificações ocorridas nas superfícies e morfologia. As micrografias das amostras são apresentadas na figura 15.

A amostra LAS-N (Figura 15A e B) apresentou macroestrutura na forma de placas finas onduladas, com superfície lisa homogênea. Tal estrutura pode estar associada a abundância de interações de hidrogênio que aproximam as cadeias da lasiodiplodana (WANG et al., 2005).

As amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TP-2:1, fosforiladas com TPFS (figura 15C e 15D, 15E e 15F respectivamente) apresentaram macroestruturas diferentes da LAS-N. A amostra LAS-TP-1:1 apresentou ligeiras modificações macroestruturais, com superfície predominantemente na forma de placas, porém com alguns pontos de ruptura, maior quantidade de torções e superfícies mais heterogêneas. LAS-TP-2:1, apresentou maiores modificações, com menor presença de placas finas onduladas, alguns pontos com várias torções (maior heterogeneidade) e formação de várias fibrilas, associadas a diminuição das interações de hidrogênio, causada pela inserção dos grupamentos fosfato de caráter aniônico, que induzem maiores repulsões entre as cadeias da macromolécula (WANG et al., 2005). A maior incidência de modificações na amostra LAS-TP-2:1 pode estar relacionada com seu maior DS. Bhumkar e Pokharkar (2006) também observaram grandes modificações na macroestrutura de quitosana fosforilada (reticulada) com TPFS, com estrutura de placas mais porosas, com formação de fibrilas.

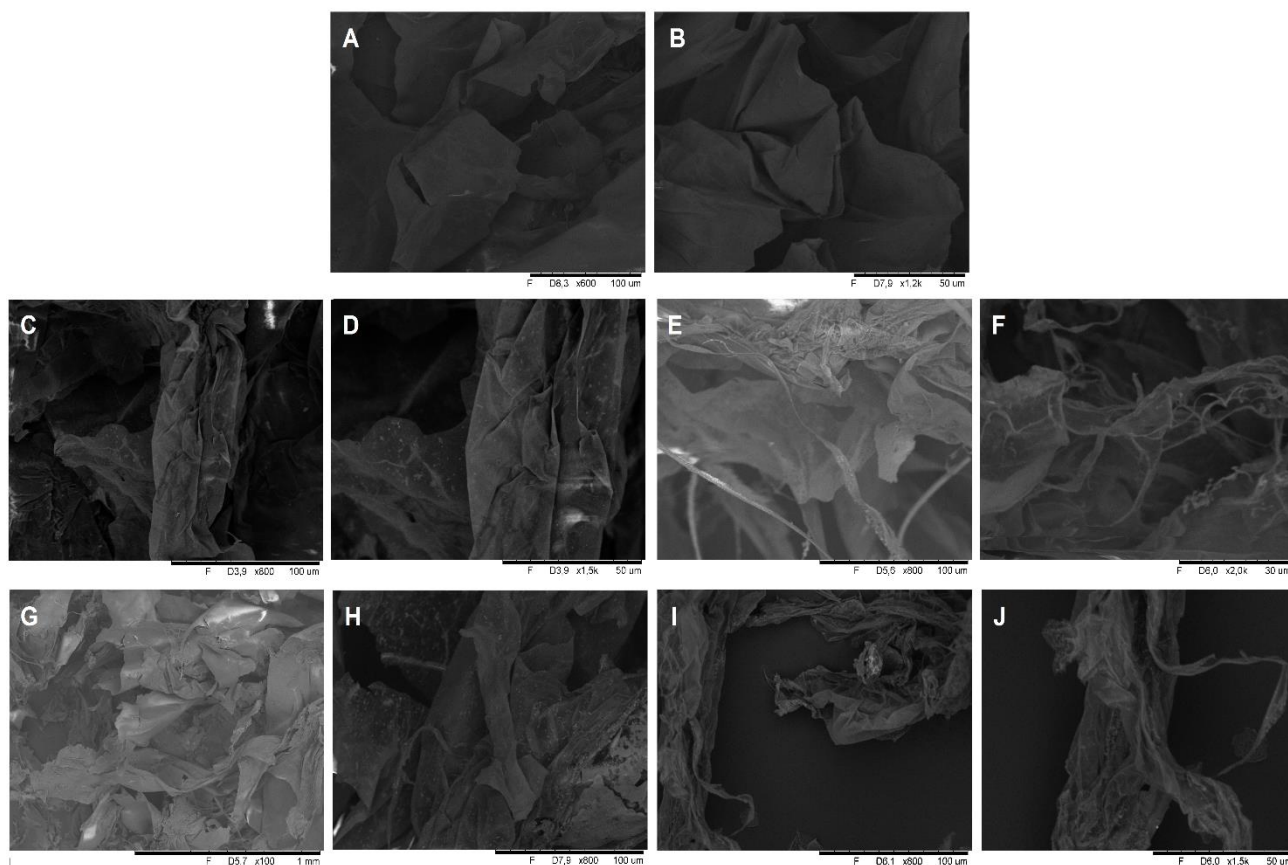


Figura 15 - Micrografias eletrônicas obtidas à 15 kV das amostras com aproximações: (A) LAS-N x800, (B) LAS-N x1200, (C) LAS-TP-1:1 x800, (D) LAS-TP-1:1 x1500, (E) LAS-TP-2:1 x800, (F) LAS-TP-2:1 x2000, (G) LAS-TM-1:1 x100, (H) LAS-TM-1:1 x800, (I) LAS-TM-2:1 x800 e (J) LAS-TM-2:1 x1500.

A amostra LAS-TM-1:1 apresentou macroestrutura na forma de placas torcidas, vários pontos de ruptura, mas com superfícies lisas, bem parecidas com a superfície da amostra LAS-N. Já a amostra LAS-TM-2:1 apresentou macroestrutura na forma de placas com menores rupturas, porém com grande quantidade de torções, o que levou a maior heterogeneidade das superfícies que pode ser verificada pelo aumento da rugosidade. Ainda foi verificado indício do surgimento de fibrilas na estrutura da LAS-TM-2:1 (figura 15J), que também podem estar relacionadas com a redução das interações de hidrogênio. Cury, Klein e Evangelista (2008) realizaram fosforilação (reticulação) de amido de alta amilose com diferentes níveis de modificação (determinados por %P), e por SEM observaram maior heterogeneidade nas superfícies das amostras com maiores teores de fósforo, consequentemente mais intensamente modificadas.

5.9 Análise Térmica

O comportamento térmico das amostras foi verificado através de dados termogravimétricos obtidos em atmosfera de ar sintético.

Nas figuras 16, 17 e 18 são apresentados dados do comportamento térmico das amostras, curva TG (perda de massa), curva DTG (derivada da perda de massa) e curva DTA (temperatura diferencial) respectivamente. A amostra LAS-N apresentou cinco estágios de perda de massa, o primeiro entre 35 e 127 °C que pode ser atribuído a eliminação de água, assinalado com pico endotérmico em 60 °C presente nas curvas DTG e DTA. Esta etapa de eliminação de água é muito comum, sendo observada em diversos polissacarídeos, inclusive já sendo relatada na lasiodiplodana anteriormente (KAGIMURA et al., 2015b; SOARES et al., 2013). O segundo e o terceiro estágio de perda de massa de LAS-N foram observados consecutivamente entre 210 e 420 °C, caracterizado por um pico exotérmico em 340 °C com pequeno ombro em 290 °C atribuídos à degradação térmica da amostra. O quarto e quinto estágios de perda de massa, foram observados consecutivamente entre 420 e 500 °C, assinalados por um grande pico endotérmico em 435 °C, e são atribuídos a finalização da decomposição da lasiodiplodana por carbonização (KAGIMURA et al., 2015b).

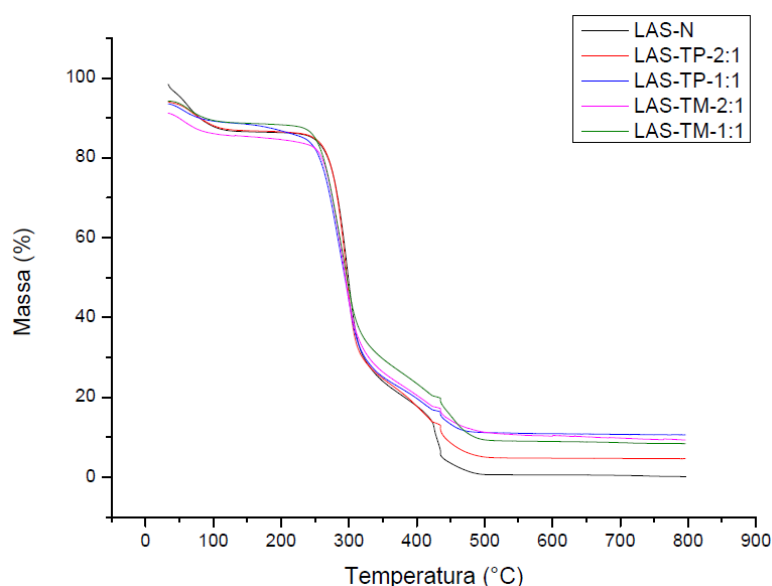


Figura 16 - Gráfico da curva TG das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS

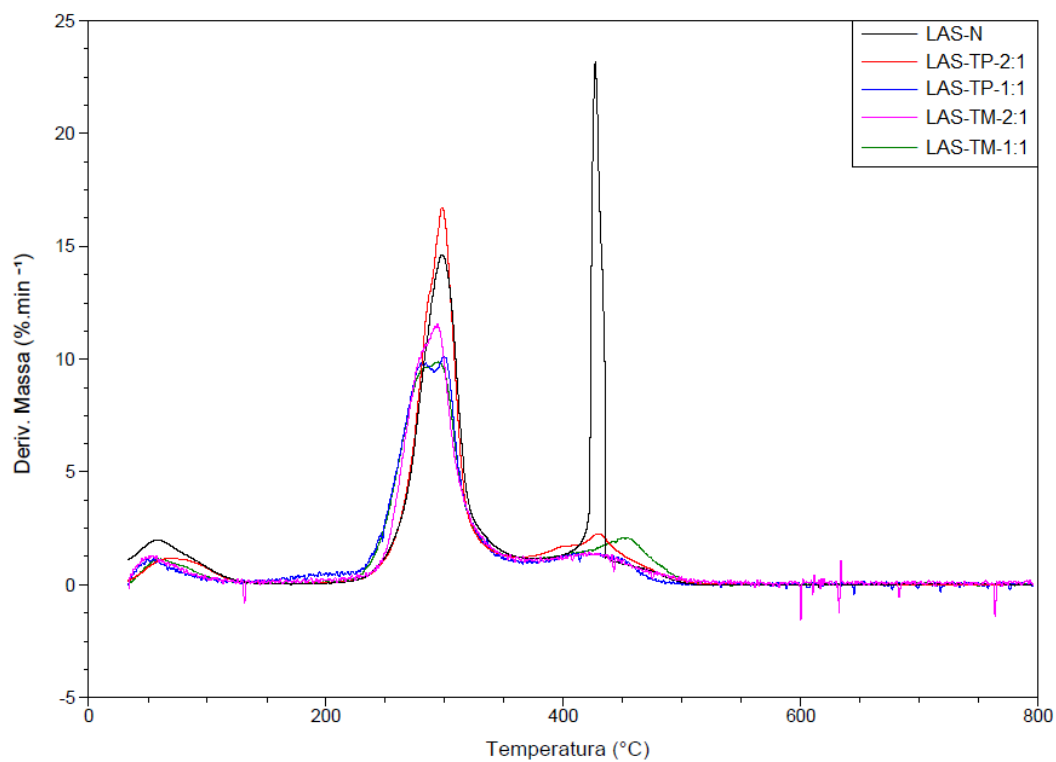


Figura 17 - Gráfico da curva DTG das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS

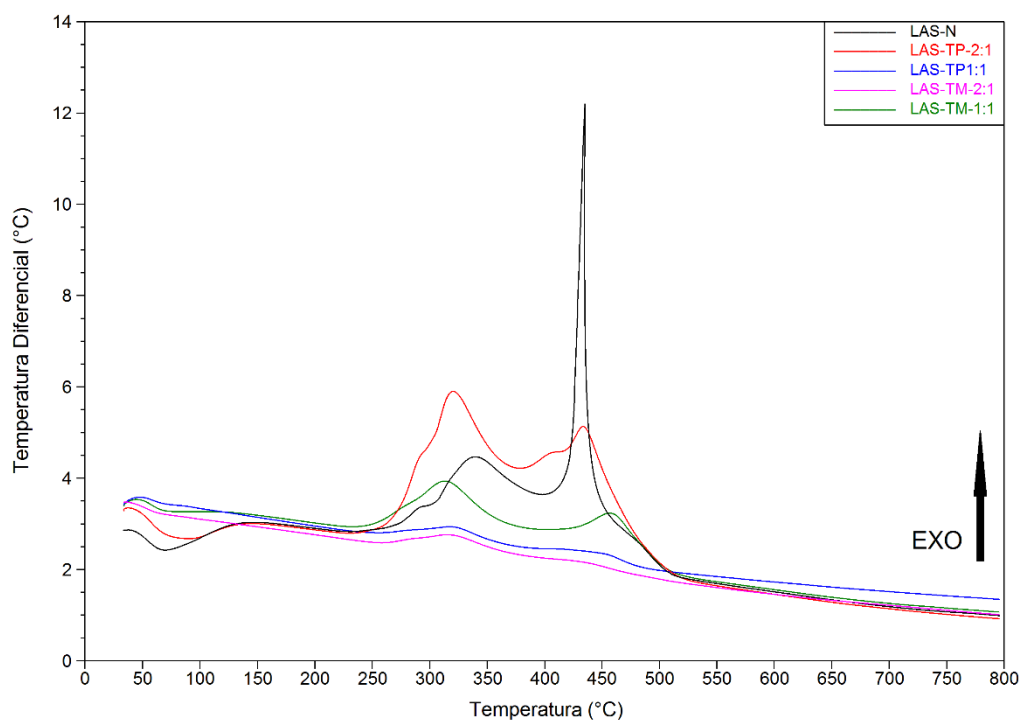


Figura 18 - Gráfico da curva DTA das amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas com TMFS e TPFS

A perda de massa por eliminação de água (primeiro estágio) também foi verificada nas amostras LAS-TP-1:1, LAS-TP-2:1, LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1 entre 35 e 130 °C com percentuais de perda de massa menores (figura 16) confirmados pela redução dos picos endotérmicos (DTA) observados na figura 18. Entretanto, as amostras fosforiladas apresentaram apenas quatro estágios de perda de massa, um a menos do que a amostra LAS-N.

O segundo e o terceiro estágio de perda de massa das amostras fosforiladas foram observados entre 190 e 420 °C bem semelhante à LAS-N, com exceção da amostra LAS-TP-1:1 que iniciou o segundo estágio em 150 °C. Estes estágios são identificados com picos exotérmicos em 320 °C para as amostras LAS-TM-2:1, LAS-TP-1:1 e LAS-TP-2:1 e em 314 °C para a amostra LAS-TM-1:1 observados na curva DTA e atribuídos à degradação térmica das macromoléculas fosforiladas. Na curva DTG (figura 17) da amostra LAS-TP-1:1 foi identificado ainda uma diferença em relação as demais amostras fosforiladas. No intervalo entre 150 e 420 °C foi observado a formação de pico duplicado, que pode ser relacionado com a diferença no início do intervalo, especificamente entre 150 e 190 °C.

O quarto estágio de perda de massa das amostras fosforiladas foi identificado entre 420 e 500 °C com perfil muito semelhante na curva TG entre todas. No entanto, os picos da curva DTA correspondentes, apresentaram diferenças entre si. Enquanto as curvas DTA das amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TM-2:1 (figura 18) não apresentaram picos perceptíveis entre 420 e 500 °C, embora observáveis na curva DTG, as curvas DTA de LAS-TP-2:1 e LAS-TM-1:1 apresentaram picos em 433 e 458 °C respectivamente, ambos atribuídos a carbonização dos biopolímeros. O quarto estágio de perda de massa das amostras LAS-TP-1:1 e LAS-TM-2:1 também é atribuído à carbonização, mesmo não sendo apresentados picos exotérmicos evidentes nas curvas DTA na região acima de 420 °C destas amostras. Esta possível ausência de pico exotérmico pode estar relacionada com a quantidade de massa inferior destas amostras no quarto estágio de perda de massa, com consequente transferência energética menor.

As amostras de lasiodiplodana nativa e fosforiladas apresentaram alta estabilidade térmica (por volta de 200 °C), em se tratando de biopolímero ou mesmo quando comparadas com padrões de produção e materiais para aplicação industrial (KAGIMURA et al., 2015b; WONGSAGONSUP et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

A etapa de obtenção da lasiodiplodana por fermentação submersa de glicose pelo fungo *lasiodiplodia theobromae* MMPI foi realizada com sucesso, a macromolécula (exopolissacarídeo) foi confirmada como (1→6)-β-D-glucana por meio de dados comparativos com trabalhos anteriores.

A fosforilação da lasiodiplodana pelos derivatizantes TMFS e TPFS foi alcançada, os produtos fosforilados apresentaram DS na faixa de 0,0251 à 0,0499 e apresentaram aumento entre 5 e 20 vezes na solubilidade em água em relação à lasiodiplodana nativa, ainda que, com comportamento de solubilidade não diretamente relacionado com os DS respectivos.

A caracterização estrutural das amostras pelas técnicas espectroscópicas de RMN (núcleos ^{13}C e ^{31}P) e FTIR permitiram evidenciar as alterações estruturais mesmo sendo brandas, conforme sugerido pelos valores de DS. Por meio de espectroscopia FTIR foram verificadas pequenas alterações relacionadas a fosforilação, embora não tenham sido evidenciadas bandas específicas dos grupamentos fosfato devido ao baixo DS. Já por espectroscopia RMN (^{13}C e ^{31}P) foram identificadas alterações de intensidade de sinais e outros sinais específicos das formas fosforiladas. Mais especificamente por ^{31}P RMN, as amostras de lasiodiplodana foram caracterizadas com presença de monoésteres de fosfato (mono, di e trifosfato), sugerindo efetivação do processo de fosforilação tanto por TMFS quanto por TPFS.

Os padrões de difração das amostras fosforiladas não se diferenciaram muito da LAS-N, apesar da inserção de grupamentos fosfato, pois a estrutura básica e organização espacial da lasiodiplodana foram mantidas praticamente intactas. Por outro lado, outras propriedades apresentaram modificações que corroboram com os resultados positivos à fosforilação. A macroestrutura das amostras fosforiladas, avaliada por SEM, apresentou diversas modificações, destacando-se a formação de fibrilas relativas à redução de interações de hidrogênio resultante da fosforilação. O aumento do potencial zeta, bem como, redução dos tamanhos médios de partícula e alterações no comportamento térmico também são indicativos de modificações relacionadas à derivatização química por fosforilação das amostras LAS-TP-1:1, LAS-TP-2:1, LAS-TM-1:1 e LAS-TM-2:1.

Todas as amostras apresentaram alta estabilidade térmica, a maioria iniciando processo de degradação próximo a 200 °C. Apenas a LAS-TP-1:1 iniciou a degradação em menor temperatura (150 °C).

Os resultados reportados neste trabalho contribuem para estudo de novos biomateriais à base de polissacarídeos e, sobretudo, para as possibilidades de transformação desta classe de compostos (biopolímero) por derivatizações químicas visando o alcance de características desejadas para aplicações tecnológicas e biológicas. Com as evidentes melhoras causadas em propriedades, tais como solubilidade e potencial zeta da lasiodiplodana, a fosforilação apresenta potencial promissor na busca de novos bioprodutos para aplicações farmacológicas e biológicas de modo geral.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para aprimoramento do estudo da fosforilação de β -Glucanas pontuamos as seguintes ideias:

- Avaliar produtos de fosforilação da lasiosiplodana em temperaturas mais elevadas, ou mesmo realizar estudo de relação entre temperaturas de fosforilação e DS;
- Avaliar produtos de fosforilação com misturas dos sais derivatizante TPFS e TMFS, conforme já reportado em literatura de polissacarídeos;
- Avaliar outros métodos de secagem, por exemplo, por atomização e à vácuo, relacionando modificações estruturais, físicas e potencial de atividades biológicas;
- Realizar estudo de fosforilação da lasiodiplodana com TPFS e TMFS com graus de substituição (DS) diferentes dos determinados neste trabalho e buscar aprimorar a relação do DS com propriedades físico-químicas, sobretudo com a solubilidade;
- Realizar estudos de fosforilação da lasiodiplodana por outros derivatizante como ácido fosfórico em meio DMSO/Uréia ou hexametáfosfato de sódio em meio aquoso, como já reportado na fosforilação de outras glucanas;

- Avaliar reações de fosforilação por método mecanoquímico em moinho de bolas, tal como já reportado na fosforilação de β -Glucana, com possibilidade de grandes aumentos de solubilidade.

REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, D. C. et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, n. 0, p. 1623–1627, 1 jan. 1971.

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.

ASCHERI, D. P. R.; PEREIRA, L. D.; BASTOS, S. M. C. Chemical, morphological, rheological and thermal properties of *Solanum lycocarpum* phosphorylated starches. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 458–466, ago. 2014.

BACIC, A.; FINCHER, G. B. **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides**. 1. ed. Academic Press, 2009.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 1, p. 54–66, jan. 2011.

BAUTISTA-BANOS, S. **Postharvest Decay: Control Strategies**. 1. ed. Academic Press, 2014.

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E50, 1 jan. 2006.

BI, H. et al. Structures of (1 \rightarrow 6)- β -d-glucans from *Bulgaria inquinans* (Fries) and their immunological activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 547–552, 2013.

BRENNAN, C. S.; CLEARY, L. J. The potential use of cereal (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -d-glucans as functional food ingredients. **Journal of Cereal Science**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 2005.

CALLIGOI, M. P. C.; DOS SANTOS, L. F.; CAVALCANTI, O. A. Produção e aplicação de exopolissacarídeos : um enfoque na levana e os potenciais dispositivos de liberação modificada de fármacos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 254–270, 2011.

CARDOSO, J. E. et al. Interação enxerto e porta-enxerto na incidência da resinose do cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 847–854, set. 2010.

CARDOSO, J. E.; WILKINSON, M. J. Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 55–57, fev. 2008.

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.

CHEN, J. et al. Preparation and structural characterization of a partially depolymerized beta-glucan obtained from *Poria cocos sclerotium* by ultrasonic treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 1–9, 2015.

CHEN, X. et al. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1→3)- β -d-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 581–587, 15 out. 2009.

CURY, B. S. F.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 1: Synthesis and polymer characterization. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 8, p. 1200–1206, 2008.

DA CUNHA, M. A. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 2012.

DA SILVA, M. DE L. C. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, fev. 2006.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 4, p. 384–96, out. 2008.

DE MORAIS, W. A.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Characterization of gelification of chitosan solutions by dynamic light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2376–2380, mar. 2012.

DE OLIVEIRA, V. A. V. et al. Dynamic light scattering in semidilute and concentrated chitosan solutions. **European Polymer Journal**, v. 48, n. 11, p. 1932–1939, nov. 2012.

DE SOUZA, N. L. et al. Functional, thermal and rheological properties of oat β -glucan modified by acetylation. **Food Chemistry**, v. 178, p. 243–250, 2015.

DENG, C. et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 1-2, p. 70–5, jan. 2012.

DENG, C. et al. Physicochemical and biological properties of phosphorylated polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 894–899, 2015.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, jan. 2012.

DU, H. et al. Development, physicochemical characterization and forming mechanism of *Flammulina velutipes* polysaccharide-based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 214–221, 2016.

DU, L. et al. Preparation of Water Soluble Yeast Glucan by Four Kinds of Solubilizing Processes. **Engineering**, v. 04, n. 10, p. 184–188, 16 jan. 2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FANG, Y. Y. et al. Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 379–384, 2008.

GAO, F. et al. Preparation and characterization of starch crosslinked with sodium trimetaphosphate and hydrolyzed by enzymes. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 310–8, 15 mar. 2014.

GHOTRA, B. S. et al. ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of phosphorus in oat and barley β -glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1056–1061, 2007.

GHRIBI, A. M. et al. Structural, functional and ACE inhibitory properties of Water-Soluble Polysaccharides from Chickpea flour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 276–282, 2015.

GIESE, E. C. et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 125–30, jan. 2015.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. D. M. Glucanases Fúngicas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 97–104, 2003.

GRAUBAUM, H.-J. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Study Using an Insoluble Yeast Beta-Glucan to Improve the Immune Defense System. **Food and Nutrition Sciences**, v. 03, n. 06, p. 738–746, 2012.

HE, Y. et al. Preparation, characterization and bioactivities of derivatives of an exopolysaccharide from Lachnum. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 788–796, 2015.

HEBEISH A, G. S. EL et al. Utilization of Crosslinked Starch Nanoparticles as a Carrier for Indomethacin and Acyclovir Drugs. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 06, n. 01, 2015.

HUANG, Q. et al. Evaluation of sulfated α -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 337–344, 2006.

JIA, X. et al. Construction of selenium nanoparticles / β -glucan composites for enhancement of the antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 434–442, 2015.

JU, X. et al. An improved X-ray diffraction method for cellulose crystallinity measurement. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 476–481, jun. 2015.

KACURÁĽKOVÁĽ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 4, p. 291–303, abr. 2001.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2015a.

KAGIMURA, F. Y. et al. Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015b.

KHALIL, O. Lasiodiplodia Theobromae Associated with Gummosis in Neem Tree (Azadirachta indica A . Juss .) in The Sudan. **University of Africa Journal of Sciences**, v. 2, p. 105–117, 2014.

KINDO, A. J. et al. Maxillary sinusitis caused by Lasiodiplodia theobromae. **Indian journal of medical microbiology**, v. 28, n. 2, p. 167–9, 1 jan. 2010.

KIVELÄ, R. et al. Oxidative and radical mediated cleavage of β -glucan in thermal treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 645–652, jun. 2011.

KOGAN, G. et al. Microbial (1 → 3)- β -d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate polymers**, v. 38, n. 3, p. 247–253, 1999.

LACK, S. et al. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 7, p. 943–53, 21 maio 2007.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. 1^a edição ed.[s.l.] Springer Science & Business Media, 1995.

LAZARIDOU, A. et al. A comparative study on structure–function relations of mixed-linkage (1→3), (1→4) linear β -d-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 837–855, set. 2004.

LI, B. et al. Physical properties and loading capacity of starch-based microparticles crosslinked with trisodium trimetaphosphate. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 3, p. 255–260, jun. 2009.

LI, X. et al. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of Hohenbuehelia serotina polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 270–276, 2016.

LIM, S.; SEIB, P. A. Preparation and Pasting Properties of Wheat and Corn Starch Phosphates. **Cereal Chem**, v. 70, n. 2, p. 137–144, 1993.

LIMBERGER-BAYER, V. M. et al. Barley β -glucans extraction and partial characterization. **Food Chemistry**, v. 154, p. 84–89, 2014.

MADHURI, K. V.; PRABHAKAR, K. V. Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 1401–1410, 23 set. 2014.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology insights**, v. 6, p. 1–16, jan. 2013.

MANIKANDAN, A.; SATHIYABAMA, M. Preparation of Chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Pyricularia grisea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 58–61, 2016a.

MANIKANDAN, A.; SATHIYABAMA, M. Preparation of Chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Pyricularia grisea*. **International journal of biological macromolecules**, v. 84, p. 58–61, mar. 2016b.

MI, F.-L. et al. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 181–191, jan. 2002.

MIZRAHY, S.; PEER, D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 7, p. 2623–40, 7 abr. 2012.

MOCANU, G. et al. Preparation and characterization of anionic pullulan thermoassociative nanoparticles for drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 892–900, 13 out. 2014.

MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, v. 35, n. 6, p. 385–396, dez. 2005.

NASER, M. D. et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 44–52, 2012.

NISHITANI, Y. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial cells. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62441, jan. 2013.

NÖRNBERG, F. R.; LIBERALI, R.; COUTINHO, V. F. EFEITO DA β -GLUCANA DA AVEIA SOBRE O PERFIL LÍPIDICO IN VIVO. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 6, n. 36, p. 357–363, 2012.

NOVÁK, M. et al. Yeast $\beta(1-3),(1-6)$ -d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, 2012.

NUNES, F. M. et al. A new eremophilane-type sesquiterpene from the phytopatogen fungus *Lasiodiplodia theobromae* (Sphaeropsidaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 478–482, 2008.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002–15, jan. 2012.

OLIVEIRA, W. D. C. et al. Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, p. 49–67, 2013.

PANDI, M. et al. Isolation and detection of taxol , an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae* , an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1428–1435, 2011.

PAPACOSTAS, L. J. et al. An unusual skin lesion caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Medical mycology case reports**, v. 8, p. 44–6, jun. 2015.

PASSAUER, L.; BENDER, H.; FISCHER, S. Synthesis and characterisation of starch phosphates. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 809–814, out. 2010.

PASSAUER, L.; LIEBNER, F.; FISCHER, K. Synthesis and properties of novel hydrogels from cross-linked starch phosphates. **Macromolecular Symposia**, v. 244, p. 180–193, 2006.

POLI, A. et al. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Archaea**, v. 2011, 13 p., 2011.

POLI, A.; ANZELMO, G.; NICOLAUS, B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. **Marine drugs**, v. 8, n. 6, p. 1779–802, jan. 2010.

PRADO, B. M. et al. Differentiation of carbohydrate gums and mixtures using fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2823–9, 20 abr. 2005.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. d-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate polymers**, v. 117C, p. 753–761, 6 mar. 2015.

SANG, Y.; PRAKASH, O.; SEIB, P. A. Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by ^{31}P nuclear magnetic resonance (^{31}P RMN) spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 2, p. 201–212, jan. 2007.

SCHMIEDER, P. et al. Determination of glucan phosphorylation using heteronuclear ^1H , ^{13}C double and ^1H , ^{13}C , ^{31}P triple-resonance RMN spectra. **Magnetic resonance in chemistry : MRC**, v. 51, n. 10, p. 655–61, out. 2013.

SHI, F.; SHI, J.; LI, Y. Mechanochemical Phosphorylation and Solubilisation of β -D-Glucan from Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Its Biological Activities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.

SINGH, A. V.; NATH, L. K. Synthesis and evaluation of physicochemical properties of cross-linked sago starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 14–18, 2012.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19–38, ago. 2001.

SOARES, G. A. et al. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135–142, 2013.

SONG, Y. et al. Effect of phosphorylation on antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady godiva) polysaccharide. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 41–8, nov. 2015.

SOTO, E. R. et al. Glucan particles for macrophage targeted delivery of nanoparticles. **Journal of drug delivery**, v. 2012, p. 143524, jan. 2012.

STAHL, J. A. et al. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1206–1214, 2007.

SUFLET, D. M. et al. Phosphorylated polysaccharides. 3. Synthesis of phosphorylated curdlan and its polyelectrolyte behaviour compared with other phosphorylated polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1176–1181, mar. 2011.

SUFLET, D. M.; CHITANU, G. C.; POPA, V. I. Phosphorylation of polysaccharides: New results on synthesis and characterisation of phosphorylated cellulose. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 11, p. 1240–1249, nov. 2006.

SURENJAV, U. et al. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)- β -d-glucans from different *Lentinus Edodes*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 97–104, 2006.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41–6, jan. 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663–674, jan. 2001.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, p. 17, fev. 2014.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 30 jan. 2013.

TSUKADA, K.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 17-18, p. 2019–2023, dez. 2010.

UKAWA, Y.; ITO, H.; HISAMATSU, M. Antitumor effects of (1→3)- β -d-glucan and (1→6)- β -d-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 98–104, jan. 2000.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Three exopolysaccharides of the beta-(1→6)-D-glucan type and a beta-(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 14, p. 2481–5, 22 out. 2008.

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

VETVICKA, V. et al. **Beta-glucan, Structure, Chemistry and Specific Application**. 1. ed., v. 2, Bentham Books, 2013.

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

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 3, p. 42–47, 1956.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276–284, 2008.

WANG, J. et al. Structural characterization, chain conformation, and morphology of a β -(1→3)-d-glucan isolated from the fruiting body of *Dictyophora indusiata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5918–5924, 2009.

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

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

WONGSAGONSUP, R. et al. Zeta Potential (δ) and Pasting Properties of Phosphorylated or Crosslinked Rice Starches. **STARCH - STÄRKE**, v. 57, n. 1, p. 32–37, jan. 2005.

WONGSAGONSUP, R. et al. Effect of cross-linking on physicochemical properties of tapioca starch and its application in soup product. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 656–65, 30 jan. 2014.

WOO, P. C. Y. et al. Lasiodiplodia theobromae pneumonia in a liver transplant recipient. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 1, p. 380–4, 1 jan. 2008.

WU, C. et al. Synthesis of β -1,3-glucan esters showing nanosphere formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 807–812, 2013.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, abr. 2008.

XU, X. et al. Chain structures of glucans from Lentinus edodes and their effects on NO production from RAW 264.7 macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1855–1862, jan. 2012.

YALPANI, M. Chemistry of Polysaccharide Modification and Degradation. In: FINCH, P. (Ed.). . **Carbohydrates: Structures, Syntheses and Dynamics**. Egham: Springer Science & Business Media, 1999. p. 294–295.

YE, M. et al. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from Lachnum YM120. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 690–4, 12 set. 2013.

ZECHNER-KRPAN, V.; PETRAVIĆ-TOMINAC, V.; GRBA, S. Potential Application of Yeast β -Glucans in Food Industry. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 74, n. 4, p. 277–282, 2009.

ZHANG, M. et al. Chain conformation of sulfated derivatives of β -glucan from sclerotia of Pleurotus tuber-regium. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 24, p. 2863–2870, 2003.

ZHANG, M. et al. Carboxymethylated β -glucans from mushroom sclerotium of Pleurotus tuber-regium as novel water-soluble anti-tumor agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 3, p. 319–325, 2004.

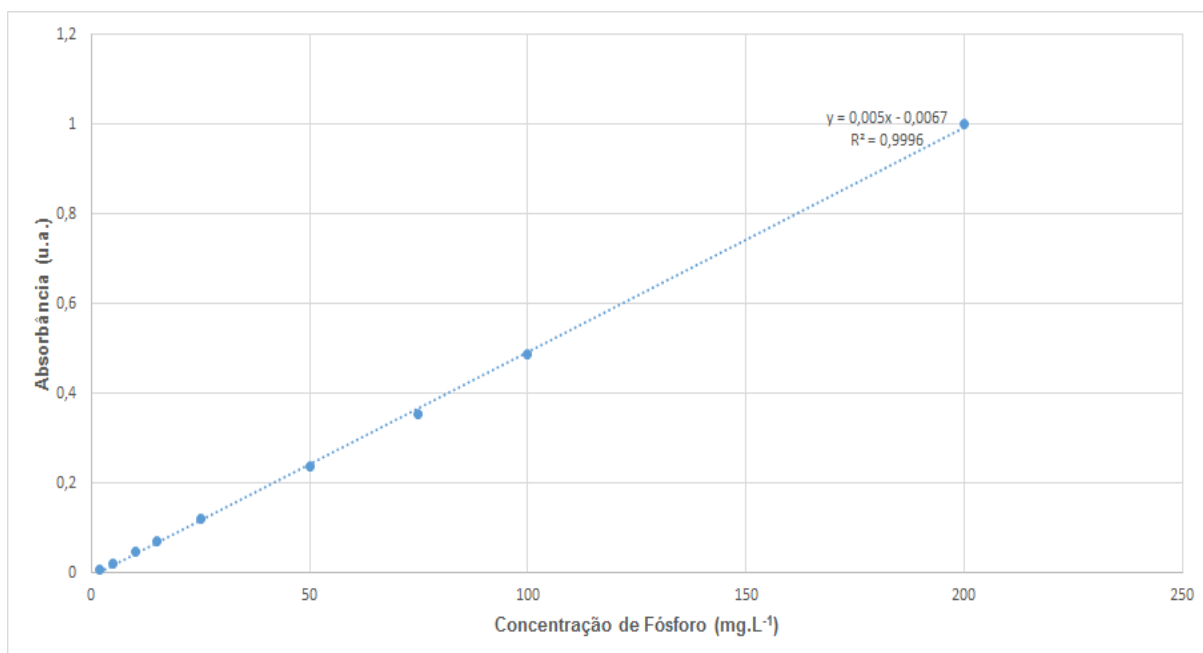
ZHENG, H. et al. Preparation, characterization, and tissue distribution in mice of lactosaminated carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1139–1145, 30 jan. 2011.

ZHENG, Y.; MONTY, J.; LINHARDT, R. J. Polysaccharide-based nanocomposites and their applications. **Carbohydrate research**, v. 405, p. 23–32, 20 mar. 2015.

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, 6 nov. 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva de Calibração (Padrão) de Fósforo



APÊNDICE B – Curva de Calibração (Padrão) de D-Glicose (Fenol-Sulfúrico)

