



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



**THAIS VANESSA THEIS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE (1→6)-β-D-GLUCANA  
(LASIODIPLODANA) CARBOXIMETILADA COM DIFERENTES  
GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PATO BRANCO  
2018**

THAIS VANESSA THEIS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE (1→6)-β-D-GLUCANA  
(LASIODIPLODANA) CARBOXIMETILADA COM DIFERENTES  
GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO**

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

Professor Orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

PATO BRANCO  
2018

T377o Theis, Thais Vanessa.  
Obtenção e caracterização de (1→6)-D-glucana (Lasiodiplodana) carboximetilada com diferentes graus de substituição / Thais Vanessa Theis. -- 2018.  
61 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2018.  
Bibliografia: f. 55 - 91.

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

CDD (22. ed.) 660.281

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



---

---

## TERMO DE APROVAÇÃO Nº 65

### Título da Dissertação

**Obtenção e caracterização de (1→6)-β-D-Glucana (Lasiodiplodana)  
carboximetilada com diferentes graus de substituição**

### Autora

**Thais Vanessa Theis**

Esta dissertação foi apresentada às 9h do dia 23 de fevereiro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Mario Antonio Alves da Cunha  
UTFPR/PB  
Orientador

---

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira  
UTFPR/PB  
Examinadora

---

Profa. Dra. Anelize Bauermeister  
Examinadora

Visto da Coordenação

---

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

Dedicado à família e amigos...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida. A família e amigos pelo apoio, incentivo e compreensão. Especialmente aos meus pais Paulo e Felícia, meus irmãos Mayco e Jean e meu companheiro Aglaer pela presença constante, principalmente pelo amparo nas dificuldades.

Ao Professor Dr. Mário Antônio Alves da Cunha pelos anos de orientação, e sobretudo pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos colegas amigos que tornaram esta trajetória acadêmica agradável e prazerosa.

À UTFPR Câmpus Pato Branco, especialmente ao corpo docente pelo aprendizado e pela amizade.

A CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida e a oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, os mais profundos agradecimentos.

*Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,  
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa  
ou uma concha mais bonita que as outras,  
enquanto o imenso oceano da verdade  
continua misterioso diante  
de meus olhos”.*  
*(Isaac Newton)*

## RESUMO

THEIS, Thais Vanessa. **Obtenção e caracterização de (1→6)-β-D-glucana (Lasiodiplodana) carboximetilada com diferentes graus de substituição**. 2018. 61p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2018

As diversas possibilidades de aplicações tecnológicas e biológicas das β-glucanas têm despertado o interesse das indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos. Algumas se destacam por apresentarem atividades anticoagulante, antitrombótica, antioxidante, anti-inflamatória, sendo outras efetivas no tratamento de doenças virais e infecciosas. O potencial biológico das β-glucanas está diretamente associado à estrutura primária da macromolécula, e portanto pequenas modificações estruturais podem potencializar ou conferir funcionalidades a esta biomacromolécula. Neste contexto, o presente trabalho propôs a carboximetilação da (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana) produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, avaliando a influência de diferentes concentrações do agente derivatizante no grau de substituição. As macromoléculas derivatizadas foram caracterizadas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Térmica (TG/DTA), difração de raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), atividade antioxidante e solubilidade em água. Derivados carboximetilados com diferentes graus de substituição (DS: 0,32; 0,47; 0,51; 0,58 e 0,68) foram obtidos, havendo correlação entre a concentração do agente derivatizante e o DS. A análise por FT-IR indicou a inserção de grupos carboximetila na estrutura da macromolécula pelo surgimento de bandas de intensidade forte em  $1600\text{ cm}^{-1}$  e banda de absorção em  $1421\text{ cm}^{-1}$ , resultantes das vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo  $\text{COO}^-$  da carboximetila. A Análise Térmica (TG/DTA) demonstrou que a lasiodiplodana nativa (LN) e os derivados carboximetilados (LC) apresentaram elevada estabilidade térmica (200-210 °C). O perfil difratográfico das amostras de LN e LC demonstrou que as amostras apresentam natureza predominantemente amorfa. A análise por MEV revelou que a carboximetilação promoveu alterações morfológicas na superfície do biopolímero, sendo observado o surgimento de porosidade e estruturas alveolares ao longo da superfície. A introdução de grupos carboximetila na lasiodiplodana potencializou a capacidade de remoção do radical hidroxila, parecendo haver uma correlação concentração-dependente. A carboximetilação também promoveu aumento da solubilidade da lasiodiplodana em água sendo obtidos derivados com solubilidade entre 45,5 a 67,9 mg.100 mL<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** Exopolissacarídeo. Derivatização química. Carboximetilação. Atividade antioxidante.



## ABSTRACT

THEIS, Thais Vanessa. **Preparation and characterization of carboxymethylated (1→6)- $\beta$ -D-glucan (Lasiodiplodan) with different degrees of substitution.** 2017. 61p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2017

The diverse possibilities of technological and biological applications of  $\beta$ -glucans have aroused the interest of the chemical, pharmaceutical and food industries. Some of them are notable for their anticoagulant, antithrombotic, anti-inflammatory and anti-inflammatory activities, while others are effective in the treatment of viral and infectious diseases. The biological potential of  $\beta$ -glucans is directly associated with the primary structure of the macromolecule, and therefore structural chemical modifications may potentiate or confer functionalities to the biomacromolecule. In this context, the present study proposed the chemical derivatization of (1→6)- $\beta$ -D-glucan (lasiodiplodan) by carboxymethylation and the evaluating of the influence of different concentrations of the derivatizing agent on the degree of substitution. The derivatized macromolecules were characterized by Fourier Transform-Infrared (FT-IR) spectroscopy, thermal analysis (TG/DTA), X-ray diffractometry (XRD), scanning electron microscopy (SEM), antioxidant activity and water solubility. Carboxymethyl derivatives with different degrees of substitution (DS 0.32; 0.47; 0.51; 0.58 and 0.68) were obtained and there seems to be a correlation between concentration of the derivatizing agent and the DS. The (FT-IR) spectroscopy analysis indicated the insertion of carboxymethyl groups in the macromolecule structure by the appearance of bands of strong intensity at  $1600\text{ cm}^{-1}$  and the band at  $1421\text{ cm}^{-1}$  resulting from the asymmetric and symmetrical stretching vibrations of the  $\text{COO}^-$  group of carboxymethyl. Thermal analysis (TG/DTA) showed that native lasiodiplodan (LN) and carboxymethylated derivatives (LC) presented high thermal stability (200-210 °C). The diffractive profile of the LN and LC samples demonstrated that the samples have a predominantly amorphous nature. SEM analysis revealed that carboxymethylation promoted morphological changes on the surface of the biopolymer, arising porosity and alveolar structures along the surface. The introduction of carboxymethyl groups in the lasiodiplodan potentiated the

hydroxyl radical removal ability, and there appears to be a concentration-dependent correlation. Carboxymethylation also promoted increased solubility of lasiodiplodan in water and derivatives with solubility between 45.5 a 67.9 mg/100mL were obtained.

**Keywords:** Exopolysaccharide. Chemical Derivatization. Carboxymethylation. Antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI cultivado em ágar sabouraud com cloranfenicol .....	19
Figura 2. Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana. ....	19
3. Representação da reação de formação dos íons alcóxidos. ....	21
Figura 4. Conversão do ácido monocloroacético no seu sal monocloroacetato de sódio.....	21
Figura 5. Esquema da síntese da carboximetilglucana via mecanismo SN <sub>2</sub> .....	22
Figura 6 Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana modificada através de carboximetilação. ....	22
Figura 7. Espectros de infravermelho (IV) da lasiodiplodana nativa (LN) e derivados carboximetilados LC1 (DS: 0,32), LC2 (DS: 0,47), LC3 (DS: 0,51), LC4 (DS: 0,58) e LC5 (DS: 0,68). ....	34
Figura 8. Curvas de Análise Termogravimétrica (A) e Termogravimétrica Diferencial (B) da lasiodiplodana nativa e derivados carboximetilado.....	36
Figura 9. Difratoograma da LN e dos derivados LC com DS de 0,32; 0,47; 0,51, 0,58 e 0,68 .....	40
Figura 10. Micrografias (MEV) da lasiodiplodana nativa (LN) e dos derivados carboximetilados (LC) com diferentes graus de substituição (DS: 0,32, 0,47, 0,51, 0,58 e 0,68) em amplitudes de 200 X, 600 X e 1200 X. ....	43
Figura 11. Porcentagem de remoção do radical hidroxila (HO●) verificado nos ensaios com lasiodiplodana nativa (LN), lasiodiplodana carboximetiladas (LC), glicose e ácido ascórbico (padrão antioxidante).....	47
Figura 12. Porcentagem de remoção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> verificado nos ensaios com lasiodiplodana nativa (LN), lasiodiplodana carboximetiladas (LC), glicose e ácido ascórbico (padrão antioxidante). ....	50
Figura 13. Poder redutor do íon do ferro (III) verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LN), lasiodiplodana carboximetiladas (LC), glicose e do padrão antioxidante (ácido ascórbico).....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Percentual de grupamentos carboximetila e valores de DS .....	32
Tabela 2. Conteúdo de perda de massa das amostras de lasiodiplodana bruta e modificada em intervalos de temperatura determinados.....	38
Tabela 3. Relação entre o grau de substituição (DS) das amostras e a solubilidade em água. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BRM</b>	Modificadores da Resposta Biológica
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>DRX</b>	Difração de Raios-x
<b>TG</b>	Análise Termogravimétrica Derivada
<b>DTA</b>	Análise Térmica Diferencial
<b>EPS</b>	Exopolissacarídeo
<b>DS</b>	Grau de Substituição
<b>BHA</b>	Butylated Hydroxyanisole
<b>BHT</b>	Butylated Hydroxytoluene
<b>RPM</b>	Rotação por Minuto
<b>VMSM</b>	Meio de Sais Minerais de Vogel
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>LN</b>	Lasiodiplodana Nativa
<b>LC1</b>	Lasiodiplodana Carboximetilada DS 0,38
<b>LC2</b>	Lasiodiplodana Carboximetilada DS 0,47
<b>LC3</b>	Lasiodiplodana Carboximetilada DS 0,51
<b>LC4</b>	Lasiodiplodana Carboximetilada DS 0,58
<b>LC5</b>	Lasiodiplodana Carboximetilada DS 0,68

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 POLISSACARÍDEOS</b> .....	<b>15</b>
β-D-Glucanas .....	16
<b>3.2 FUNGO <i>Lasiodiplodia theobromae</i></b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 LASIODIPLODANA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 CARBOXIMETILAÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>23</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 PREPARO DO INÓCULO</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 OBTENÇÃO DE LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)</b> .....	<b>26</b>
<b>4.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.8 ANÁLISE TÉRMICA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.9 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)</b> .....	<b>28</b>
<b>4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)</b> .....	<b>28</b>
<b>4.11 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>29</b>
4.12.1 Atividade de sequestro do radical hidroxila (HO•) .....	29
4.12.2 Atividade de remoção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
4.12.3 Poder Redutor .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1 PRODUÇÃO DA LASIODIPLODANA</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA NATIVA E CARBOXIMETILADA</b> .....	<b>31</b>
5.2.1 Avaliação do grau de carboximetilação dos derivados.....	31

5.2.2 Análise dos espectros de Infravermelho (FT-IR).....	33
5.2.3 Análise Térmica.....	35
5.2.4 Análise por Difração de Raios-X (DRX).....	39
5.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	41
5.2.6 Análise da solubilidade em água.....	44
5.2.7 Atividade Antioxidante .....	45
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos naturais oriundos de plantas, algas, bactérias e fungos têm despertado o interesse das indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos devido a diferentes propriedades tecnológicas e biológicas que apresentam. Pesquisas revelam que alguns polissacarídeos podem atuar sobre o sistema imunológico, sendo estes denominados de Modificadores da Resposta Biológica (BRM). Tais biomoléculas podem apresentar atividade anticoagulante, antitrombótica, antioxidante, anti-inflamatória e têm sido descritas como efetivas no tratamento de várias enfermidades, como câncer, diabetes, alterações dos níveis de colesterol, infecções microbianas e ainda, auxiliar na redução de riscos de problemas cardiovasculares.

Dentre os polissacarídeos com função biológica, destacam-se as  $\beta$ -glucanas, as quais, em escala comercial, são extraídas da parede celular de cereais como aveia e cevada ou da parede celular de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*. Podem também ser extraídos da parede celular de hifas e de corpos de frutificação (basideocarpo). Alguns estudos recentes demonstram a produção extracelular de  $\beta$ -glucanas por fungos filamentosos em cultivos submersos. Açúcares simples como glicose ou sacarose podem ser empregados como substratos eficientes para a produção de glucanas por fermentação submersa. Nesse caso, as glucanas podem ser recuperadas do caldo fermentado por processos simples e relativamente baratos, como precipitação com etanol, centrifugação e secagem (liofilização ou por calor).

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

Os agentes oxidantes e antioxidantes apresentam-se normalmente em um estado de equilíbrio no interior das células. Esse equilíbrio pode ser alterado quando ocorre aumento na produção de radicais livres ou quando os níveis de antioxidantes são diminuídos; causando o chamado estresse oxidativo, que resulta em efeitos danosos em proteínas, lipídios, hidratos de carbono e até mesmo no DNA. Tais danos podem levar ao desenvolvimento de aterosclerose, doenças auto-imunes e



neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Estes efeitos nocivos podem ser reduzidos pela presença de substâncias antioxidantes, capazes de impedir a oxidação de outras substâncias através da eliminação de radicais livres, produzidos naturalmente pelo metabolismo.

Nesse contexto, foi proposto no presente trabalho a obtenção de (1→6)- $\beta$ -D-glucana (lasiodiplodana) produzida em cultivo submerso pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI e o estudo da carboximetilação do biopolímero avaliando diferentes concentrações do agente derivatizante. Os derivados obtidos foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Térmica (TG/DTA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise por Difractometria de Raios X (DRX). A influência dos diferentes graus de substituição da biomolécula sobre a solubilidade e o potencial antioxidante também foram avaliados.

## 2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Obtenção e caracterização de derivados carboximetilados de (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana) produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Carboximetilar a lasiodiplodana produzida em cultivo submerso por *L. theobromae* MMPI usando diferentes concentrações de ácido monocloroacético como agente derivatizante.
- Determinar o grau de substituição dos derivados obtidos.
- Caracterizar os derivados através de análises por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Térmica (TG/DTA), Difração de Raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Avaliar a solubilidade em água dos derivados obtidos.
- Avaliar a atividade antioxidante da lasiodiplodana original e dos derivados.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 POLISSACARÍDEOS

A grande maioria dos carboidratos encontrados na natureza estão na forma de polissacarídeos, com peso molecular variando de médio a alto. Estes polímeros são formados a partir da condensação de mais de dez unidades monossacarídicas através de ligações covalentes denominadas ligações glicosídicas. O que difere uns dos outros é a natureza das unidades monossacarídicas (constituídas por um único ou por diversos tipos de unidades monoméricas); o comprimento das cadeias, o tipo de ligação entre os monossacarídeos e o grau de ramificação (NELSON et al. 2011; WANG et al. 2016a; ALVES DA CUNHA et al. 2017).

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

Diversos polissacarídeos naturais demonstram efeitos terapêuticos benéficos e propriedades promotoras da saúde. O alginato e a laminarina (algas pardas), a fucoídiana (algas marrons) e a carragenana (algas vermelhas) são exemplos de polissacarídeos extraídos de algas marinhas com amplas aplicações biológicas e biomédicas, sendo empregadas na cicatrização de feridas, na engenharia de tecidos vivos, como veículo de liberação controlada de drogas e ainda em biossensores (WANG et al. 2016a). Um grande número de polissacarídeos têm sido estudado por apresentarem diversas atividades biológicas, sendo muitos considerados modificadores da resposta biológica (BRM). A ação biológica provocada pelo polissacarídeo está diretamente relacionada com sua estrutura molecular, incluindo a composição monomérica, o tipo de ligação glicosídica da cadeia principal, os monossacarídeos que o compõe, o grau de ramificação, o grau de substituição e sua conformação estrutural (KAGIMURA et al. 2015a; ALVES DA CUNHA et al. 2017). Por isso, a modificação da estrutura química dos polissacarídeos com a finalidade de sintetizar derivados com atributos funcionais desejáveis tem atraído cada vez mais atenção, em especial da indústria de fármacos (WANG et al. 2010; MA et al. 2012; CHEN et al, 2017).

Dentre as respostas biológicas que tais macromoléculas podem apresentar, estão incluídas atividades anti-inflamatória, antioxidante, anti-hipertensiva, antitumoral, hipoglicemiante, além de serem consideradas imunoestimuladoras e imunomoduladoras. Além dos inúmeros benefícios de tais macromoléculas, é importante ainda destacar a ausência ou baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais, quando existentes (BAI et al. 2017; MENG et al. 2017; ZHENG et al. 2017).

Produzidos por fungos e bactérias, os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares. Alguns são produzidos e permanecem aderidos à superfície celular formando cápsulas e tornando-se parte da parede celular. Outros são secretados para o meio na forma de limos que se difundem e provocam mudanças no meio de cultivo, alterando a viscosidade e a reologia do sistema. Microrganismos com maior potencial de produção de EPS são capazes de gerar meios de cultivo com elevada viscosidade (MAHAPATRA & BANERJEE 2016; BHUNIA et al. 2018; DU et al. 2017).

Estudos *in vitro* sugerem que a atividade biológica está ligada ao peso molecular do biopolímero, sendo que  $\beta$ -glucanas de baixo peso molecular de cadeia muito curta são geralmente consideradas biologicamente inativas (OLIVEIRA et al. 2015).

### $\beta$ -D-Glucanas

As  $\beta$ -glucanas pertencem a um grupo heterogêneo de polímeros de glicose e todas são formadas por uma cadeia linear composta de unidades de D-glucose unidas entre si através de ligações beta glicosídicas, contendo ou não ramificações (ALVES DA CUNHA et al., 2017). Comumente, as ligações glicosídicas são do tipo (1 $\rightarrow$ 3), mas também podem ser do tipo (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6), (1 $\rightarrow$ 6) e (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4). Diferenças na estrutura química e conformacional podem ter grandes implicações na bioatividade das  $\beta$ -glucanas, incluindo também a massa molecular (KAGIMURA et al. 2015a).

$\beta$ -glucanas provenientes de diferentes fontes apresentam variações na sua estrutura. Podem ser encontradas na parede celular de alguns cereais, como aveia e cevada, além de outros organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos; e ainda podem ser produzidos e secretados para o meio de cultivo.

São constituintes da parede celular de diversos microrganismos, como *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, e também de fungos não patogênicos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (KHAN et al. 2016).

Conhecidas pela capacidade imunomoduladora (ZHOU et al. 2013), tais macromoléculas são consideradas modificadoras da resposta biológica (BRM), pois são inofensivos ao organismo, mas o auxiliam na adaptação ao ambiente frente aos estresses biológicos (CHEN et al. 2010). A literatura demonstra que as respostas imunitárias específicas e não específicas de mamíferos são estimuladas pelas  $\beta$ -glucanas, através de mecanismos de ação que incluem a ativação de macrófagos, neutrófilos e o aumento da fagocitose (ZHOU et al. 2013).

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

### 3.2 FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 1) pertencente a família *Botryosphaeriaceae* e ao gênero *Lasiodiplodia* (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2014). Apresenta forma reprodutiva mitospórica ao contrário de seu teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*. Estando amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, esta espécie está associada a 500 plantas hospedeiras, sendo em muitas culturas considerado o principal patógeno (OLIVEIRA et al. 2015; PAOLINELLI-AFONSO et al. 2016).

Este fungo tem sido associado a manchas foliares, necrose, gomose e até mesmo à morte de muitas plantas hospedeiras, incluindo herbáceas como mandioca e beringela, e plantas lenhosas como mangueira, coqueiro, eucalipto e pessegueiros. E ainda, a contaminação dos frutos pode levar a perda da sanidade e redução do tempo de armazenamento (CHEN et al. 2016). Menos frequentemente também tem sido associado com micoses e pneumonia em humanos (MUNIZ et al. 2011; CHE et al. 2015). Em plantas, podem estar presentes nos tecidos vegetais

colonizando endofiticamente, porém a patogenicidade pode ser desencadeada quando os hospedeiros são submetidos a estresse abiótico (PAOLINELLI-AFONSO et al. 2016). A cultura de caju sob as condições semiáridas do Nordeste do Brasil pode apresentar comprometimento no transporte de água e nutrientes decorrente da infecção de *L. theobromae* no caule, reduzindo a fotossíntese e podendo ocasionar a morte da planta. Contudo, eventualmente quando os fatores que induzem o estresse cessam, mecanismos de resistência são ativados através da manutenção da homeostase celular, cicatrizando o caule infectado e inibindo a proliferação fúngica no tecido vegetal (CIPRIANO et al. 2015).

A frequente associação com doenças em inúmeras culturas não é o único estímulo das pesquisas com espécies de *L. theobromae*. Eles têm sido amplamente estudados sobretudo pela capacidade de biossíntese de compostos bioativos. Sendo que, alguns destes metabólitos apresentam importantes atividades biológicas, destacando-se o ácido jasmônico, o teobróxido e as lasiodiplodinas. (TSUKADA et al. 2010). O ácido jasmônico é um hormônio vegetal que coordena as respostas de defesa de plantas frente a estresses ambientais além de aspectos de crescimento e desenvolvimento, sendo ainda, capaz de acelerar a senescência das plantas (TSUKADA et al. 2010; ANDOLFI et al. 2014). Teobróxido é um metabólito do tipo epoxi cicloexano, capaz de induzir a floração e estimular a biossíntese do ácido jasmônico nas plantas (LI et al. 2007), e ainda induzir a formação de flores e tubérculos em batatas (*Solanum tuberosum*) em condições geralmente não indutoras (YOSHIHARA et al. 2000). Classificadas como lactonas de ácido resorcílico, as lasiodiplodinas são micotoxinas capazes de funcionar como potentes inibidores do crescimento vegetal. Também tem sido atribuída a elas uma variedade de propriedades biológicas, incluindo atividade antileucêmica e antimicrobiana (KASHIMA et al. 2009; SULTAN et al. 2014).

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

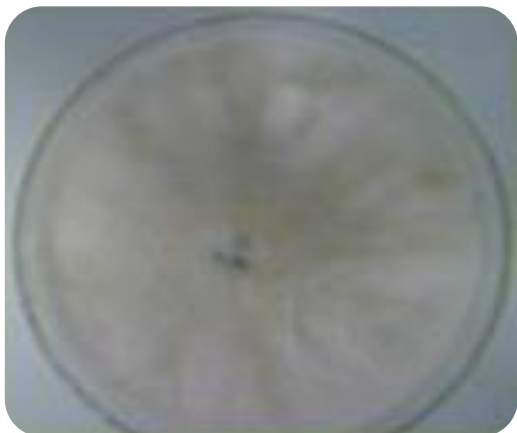


Foto: Autoria própria.

### 3.3 LASIODIPLODANA

Descrita recentemente na literatura, a lasiodiplodana é uma (1→6)-β-D-glucana (Figura 2) produzida extracelularmente pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (VASCONCELOS et al. 2008, CUNHA et al. 2012). As (1→6)-β-D-glucanas são comumente encontradas como compostos insolúveis da parede celular de ascomicetos e basidiomicetos (LESAGE; BUSSEY, 2006). O isolamento destas é complicado e envolve múltiplas etapas de extração com hexano (remoção de lipídios), seguida por extração com água quente e fria e com álcali (CORRADI DA SILVA et al. 2008). No entanto, a lasiodiplodana é secretada no meio de cultivo (cultivo submerso) e é facilmente precipitada com etanol, sendo seu isolamento mais simples e econômico do que a extração da parede celular de fungos.

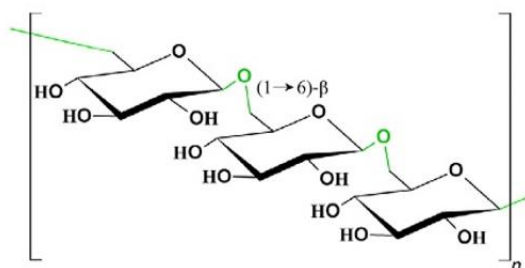


Figura 2. Representação estrutural de (1→6)-β-D-glucana.

Fonte: ALVES DA CUNHA et al. 2017

Túrmina et al. (2012) avaliaram os efeitos da lasiodiplodana em ratos albinos suíços (*Mus musculus*) alimentados por gavagem durante 28 dias. Os autores

relataram não haver sinais de toxicidade, alterações hematológicas ou histopatológicas (rins, baço, fígado e coração), além de haver atividade hipoglicemiante em machos e redução de transaminases em machos e fêmeas. Cunha et al. (2012), demonstraram atividade antiproliferativa dose dependente da lasiodiplodana frente a células de câncer de mama (MCF-7) em ensaios *in vitro*. Vasconcelos et al. (2013) avaliaram a atividade anticoagulante de lasiodiplodana oriunda da cepa MMLR de *Lasiodiplodia theobromae* após sulfonação, demonstrando que, a derivatização da molécula resultou em atividade anticoagulante. Kagimura et al. (2015b), investigaram a atividade antioxidante da lasiodiplodana bruta e carboximetilada e relataram que a carboximetilação contribuiu para melhorar a solubilidade em água e o potencial antioxidante do polissacarídeo.

### 3.4 CARBOXIMETILAÇÃO

Diversos relatos publicados nos últimos anos têm demonstrado que as atividades biológicas têm sido relativamente melhoradas com a modificação da estrutura química de polissacarídeos (MA et al. 2012). Derivados solúveis em água preparados a partir de sulfonação e carboximetilação de polissacarídeos insolúveis têm apresentado ação antiviral e antitumoral relativamente mais elevada (WANG et al. 2009). A introdução de grupos químicos com apropriado grau de substituição, pode influenciar a bioatividade das glucanas, para tal, comumente são preparados derivados por sulfonação, carboximetilação, acetilação e fosforilação (KAGIMURA et al. 2015a).

É recente o interesse químico na modificação da estrutura dos polissacarídeos, mas tem atraído muitos pesquisadores, uma vez que as derivatizações químicas podem intensificar a bioatividade e/ou criar novas propriedades funcionais. Derivatização por carboximetilação tem sido estudada pois favorecem diversas funções fisiológicas, incluindo atividade antitumoral, anticoagulante, antioxidante, atividade de inibição de peroxidação lipídica e capacidade de ligação a ácidos biliares de maneira dose-dependente (KAGIMURA et al. 2015a; WANG et al. 2012).

A reação de carboximetilação consiste em uma reação de eterificação que objetiva a substituição nas hidroxilas presentes nas unidades monoméricas de glicose por grupos carboximetila ( $^+CH_2COOH$ ) MACHOVÁ et al. 2014a). Tal reação consiste em formar grupos alcóxidos e reagi-los com um agente alquilante.



Os grupos alcóxidos são formados pela reação entre o hidróxido de sódio e os hidrogênios dos grupos hidroxilas presentes na macromolécula polissacarídica (lasiodiplodana) (Figura 3).

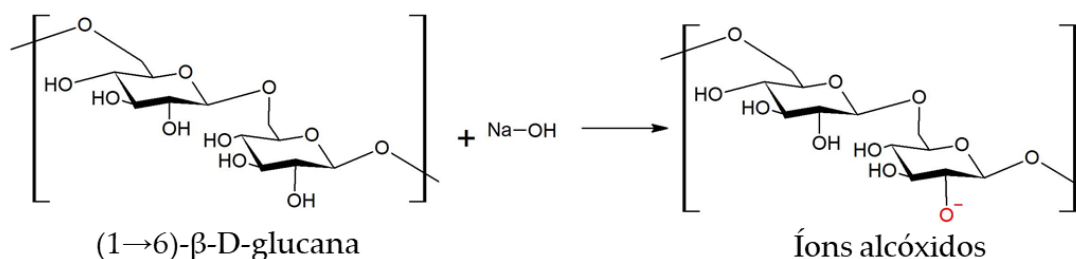


Figura 3. Representação da reação de formação dos íons alcóxidos.

Em meio alcalino, o ácido monocloroacético é convertido a sal monocloroacetato de sódio (Figura 4).

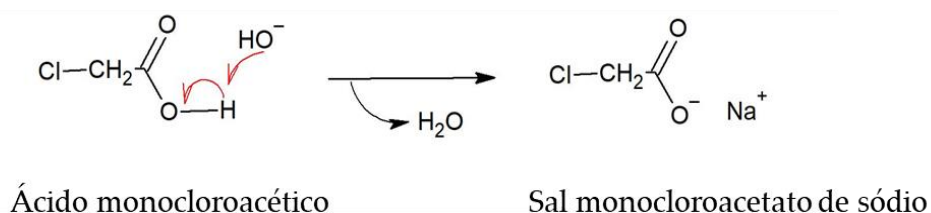


Figura 3. Conversão do ácido monocloroacético em seu sal monocloroacetato de sódio.

Na sequência, os grupos carboximetila são formados através da síntese de Williamson, pela reação de substituição nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2) entre os íons alcóxidos formados (agente nucleofílico) e o substrato (sal monocloroacetato de sódio) (WANG et al. 2016b; LI et al. 2017). Nesta etapa, o par de elétrons do oxigênio dos íons alcóxidos ataca o carbono alfa carbonila do substrato. O Cl<sup>-</sup> começa a se afastar com o par de elétrons que o ligava ao carbono, formando um estado de transição (Figura 5). A reação é finalizada pela saída do íon Cl<sup>-</sup> e a formação da ligação entre o carbono do substrato e o oxigênio do alcóxido.

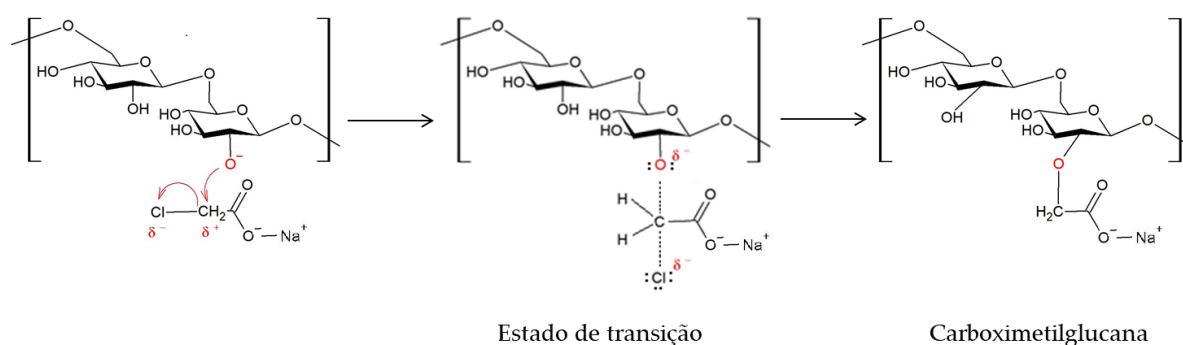


Figura 4. Esquema da síntese da carboximetilglucana via mecanismo  $S_N2$ .

Na Figura 6 está demonstrada a representação estrutural da (1→6)- $\beta$ -D-glucana modificada por carboximetilação.

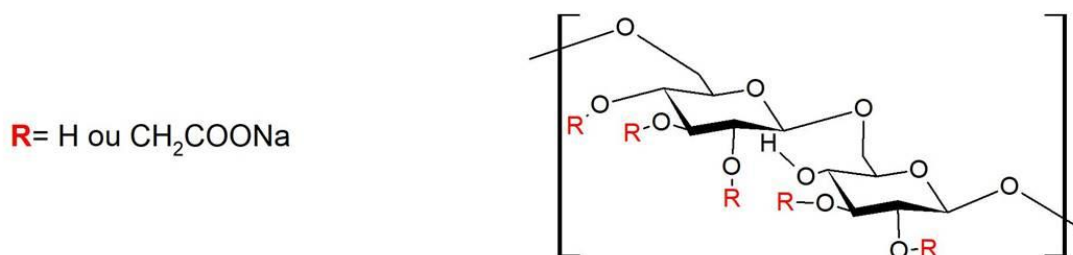


Figura 5. Representação estrutural de (1→6)- $\beta$ -D-glucana modificada através de carboximetilação.

Reações de substituição geralmente promovem uma melhora significativa nas propriedades funcionais do derivado (TATONGJAI & LUMDUBWONG, 2010). Estudos têm demonstrado que as propriedades funcionais de polissacarídeos modificados são influenciadas pelo grau de substituição (DS) resultante da reação. O DS de um derivado corresponde ao número médio de grupos substituintes da hidroxila ligados a uma unidade de glucose (LIU et al. 2012).

Machová et al. (2014b), derivatizou por carboximetilação três polissacarídeos (manana,  $\beta$ -glucana e dextrana) e verificou que a atividade antioxidante de todos os derivados foi superior a seus respectivos polissacarídeos originais. Wiater et al. (2012) avaliaram a (1→3)- $\alpha$ -D-glucana produzida pelo fungo *Ganoderma lucidum* após carboximetilação, e observaram um decréscimo na atividade metabólica de células de carcinoma cervical. De acordo com esses autores, tal propriedade está baseada na ativação do sistema imune com consequente ação na morfologia, metabolismo e viabilidade das células tumorais.

### 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As espécies reativas de oxigênio, tais como o íon superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são gerados por processos metabólicos normais ou por fatores exógenos (XU et al. 2009; LEI et al. 2015). Tais espécies reativas são fundamentais para muitos processos bioquímicos, como regulação na transdução de sinal e expressão gênica além de desempenhar papel vital na fagocitose (CHEN et al. 2014; ALVES DA CUNHA et al. 2017). No entanto, a acumulação excessiva destas espécies pode causar vários efeitos patológicos, como danos oxidativos ao DNA, as proteínas e a outras macromoléculas, além da degeneração celular. O excesso de produção de radicais livres está relacionado com a indução de várias doenças como cancro, aterosclerose, diabetes, artrite reumatoide, asma, doenças cardiovasculares, carcinogênese (XU et al. 2009; LIU et al. 2009). Compostos antioxidantes naturais e alimentos que contenham altas concentrações de antioxidantes ajudam a reduzir os danos oxidativos e assim apresentam efeito imunoestimulador (CHEN et al. 2014).

O intenso uso de substâncias antioxidantes sintéticas, como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) na conservação de alimentos, tem sido considerado responsável por danos ao fígado e causador de câncer. Por isso, é essencial a obtenção de antioxidantes alternativos e atóxicos como os antioxidantes naturais para proteger o corpo humano contra o ataque de radicais livres e no tratamento de doenças crônicas. Em testes *in vitro*, alguns polissacarídeos têm-se mostrado efetivos no sequestro de radicais livres, sendo que a bioatividade dos polissacarídeos depende principalmente de sua solubilidade (XU et al. 2009; SHENG; SUN, 2014).

A atividade antioxidante de polissacarídeos depende geralmente de vários parâmetros estruturais como grau de ramificação, peso molecular, composição monossacarídea e presença de grupos funcionais. A derivatização química altera vários parâmetros físico-químicos e com isso pode melhorar a atividade antioxidante dos polissacarídeos, sendo o grau de substituição (DS) fator primordial (CHEN et al. 2014).

Giese et al. (2015) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes biomacromoléculas, como botriosferana ((1→3,1→6)- $\beta$ -glucana) produzida pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, da lasiodiplodana ((1→6)- $\beta$ -glucana), da

laminarina ((1→3,1→6)-β-glucana) e da curdlana ((1→3)-β-glucana). Os autores relataram que todos os polissacarídeos avaliados apresentaram atividades antioxidantes, sendo que a botriosferana mostrou melhor capacidade em relação aos demais.

Kagimura et al. (2015b) avaliaram a atividade antioxidante do polímero (1→6)-β-glucana e de seu derivado carboximetilado (DS 1,27) e relataram que ambos apresentam atividade antioxidante, porém, a carboximetilação contribuiu para potencializar tal bioatividade.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi utilizado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*). O fungo foi mantido em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol sob refrigeração a 5 °C, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos de ensaio contendo meio novo. Os reagentes utilizados foram adquiridos com o grau de pureza adequado aos experimentos.

### 4.1 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, o micélio fúngico foi transferido para placas de Petri contendo meio ágar sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica a 28 °C. O conteúdo micelial crescido nas placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de Meio de Sais Minerais de Vogel - VMSM (VOGEL, 1956) e glicose (5 g.L<sup>-1</sup>) e então cultivados a 28 °C sob agitação (150 rpm) por 48 horas. Esta pré-cultura foi centrifugada e o micélio recuperado foi suspenso em solução fisiológica esterilizada e triturado em mixer para obtenção de uma suspensão celular com absorvância entre 0,4 e 0,5 em 400 nm.

### 4.2 OBTENÇÃO DE LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO

A produção da lasiodiplodana (LN) foi realizada por cultivo submerso em frascos de Erlenmeyer (72 horas, 150 rpm e 28 °C). Foram utilizados frascos de 500 mL com volume de trabalho de 200 mL e como meio de cultivo foi empregado meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956) contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 mL de volume de inóculo. O pH inicial do meio fermentativo foi ajustado para 5,5 através de adição de soluções de ácido clorídrico 1 mol L<sup>-1</sup>.

### 4.3 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

O caldo de cultivo foi centrifugado (1500 x g, 30 min) e separado da biomassa micelial. Posteriormente, foi adicionado etanol absoluto (3 volumes) ao caldo para precipitação do exopolissacarídeo (EPS) a 5 °C durante 12 horas. O precipitado foi

então separado por filtração e na sequência solubilizado em água destilada sob agitação e aquecimento (60 °C). A solução obtida foi submetida à intensa diálise contra água destilada (5 dias) usando tubos de diálise MW 12000 (Sigma-Aldrich) e então liofilizada.

#### 4.4 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA

A carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizada de acordo com protocolo descrito por Wang et al. (2012), com pequenas adaptações. Lasiodiplodana (1,5 g) foi suspensa em 65 mL de isopropanol com vigorosa agitação por 15 minutos. Em seguida 25 mL de NaOH 20% (m/v) foi adicionado gota a gota e a mistura foi mantida sob agitação por 3 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado lentamente, sob agitação, uma solução do agente de carboximetilação (uma mistura de 2,5 g ou 3,75 g ou 5,0 g ou 6,25 g ou 8,75 g de ácido monocloroacético dissolvido em 12,5 mL de NaOH a 20% (m/v) e 31,5 mL de isopropanol) visando a obtenção dos derivados denominados LC1, LC2, LC3, LC4 e LC5 com diferentes DS. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 3 horas, em seguida a temperatura foi elevada para 60 °C por 30 minutos. A seguir, novamente adicionado uma solução de ácido monocloroacético contendo as mesmas e respectivas quantidades do agente de carboximetilação dissolvidos em 12,5 mL de NaOH a 20% (m/v) e 31,5 mL de isopropanol. A mistura reacional foi mantida a 60 °C sob agitação durante 1 hora. A reação foi encerrada através do resfriamento da mistura até a temperatura ambiente e neutralização com solução de ácido clorídrico 1,5 mol L<sup>-1</sup> até pH 7. Na sequência o isopropanol foi removido da mistura sob pressão reduzida em rotaevaporador. As soluções resultantes contendo as lasiodiplodanas carboximetiladas foram dialisadas por 7 dias contra água destilada em tubos de diálise MW 12000 (Sigma-Aldrich) e liofilizadas, sendo obtidos cinco derivados carboximetilados da lasiodiplodana.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)

O grau de substituição (DS) dos derivados foi determinado pelo método de titulação por neutralização, segundo Tatongjai e Lumdubwong (2010). Uma massa de 150 mg da molécula carboximetilada foi dissolvida em 100 mL de água ultra pura

(Milli-Q), homogeneizada vigorosamente por 3 minutos e centrifugada. O sobrenadante na forma de um sal (EPS-C-Na) foi convertido para a forma ácida (EPS-C-H) em coluna de troca iônica (Amberlite IR-120) empregando fluxo de 3 mL min<sup>-1</sup>. A coluna foi construída usando uma seringa de 10 mL, empacotada com a resina (6 cm x 1,5 cm). Após a eluição da solução de EPS-C-H, a coluna foi lavada com 400 mL de água ultra pura (Milli-Q) e toda solução eluída foi coletada (500 mL) e posteriormente a água foi removida através de secagem a 60 °C em estufa com circulação de ar. O produto resultante foi dissolvido em 100 mL de água destilada e misturado com 3 gotas de fenolftaleína, 2 mL de metanol e 15 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi titulada com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e água foi utilizada como branco. O DS foi calculado pela seguinte equação:

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

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

Sendo que:

W<sub>c</sub>: conteúdo de grupos carboximetil na solução da amostra (m/m %).

c: concentração da solução de HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) utilizado na titulação.

M<sub>c</sub>: massa molar do grupo funcional carboximetil que reagiu com o LN (58 g mol<sup>-1</sup>).

M<sub>a</sub>: massa molar de uma unidade de glicose anidra (162 g mol<sup>-1</sup>).

V<sub>b</sub>: volume de HCl usado para titulação do branco (mL).

V<sub>s</sub>: volume do HCl utilizado para titulação da amostra (mL).

m: massa correta da amostra LC (mg).

DS: grau de substituição de grupos carboximetil na amostra.

#### 4.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os espectros de infravermelho de lasiodiplodana nativa (LN) e das amostras de lasiodiplodana modificados (LC) foram obtidos em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer Inc, USA) com varredura na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>, 32 acumulações e usando o método de discos de KBr (proporção de amostra: KBr de 1 : 100).

#### 4.8 ANÁLISE TÉRMICA

Amostras liofilizadas do EPS bruto e derivatizados foram submetidas a Análise Térmica Diferencial (DTA) e Análise Termogravimétrica (TGA), realizadas em equipamento SDT Q600 TA (TA Instruments, USA). A perda de massa foi acompanhada entre 30 °C e 800 °C, sendo empregada uma taxa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e ar sintético com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.9 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Para obtenção dos padrões de difração de raios-X (DRX) das amostras foi utilizado um difratômetro MiniFlex600 (Rigaku), com fonte de radiação de lâmpada de cobre (CuK $\alpha$  = 1,5418 Å), corrente de 15 mA e tensão de 40 kV, ângulo de varredura de 10 ° a 60 ° (2 $\theta$ ), velocidade de 5 ° min<sup>-1</sup> e passo de 0,02 graus (2 $\theta$ ).

#### 4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia superficial do polímero nativo e seus derivados. As micrografias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada (Hitachi, modelo TM3000, USA) a partir das amostras liofilizadas. As amostras foram dispostas no suporte do equipamento aderidas em fitas de carbono e imagens foram obtidas com amplitude de 200 vezes, 600 vezes e 1200 vezes.

#### 4.11 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA

A solubilidade em água da lasiodiplodana bruta e modificada 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 a 25 °C. Após centrifugação à 8000 X g por 15 minutos, foi determinado o conteúdo de carboidratos totais no sobrenadante. O conteúdo de carboidratos totais foi relacionado com a quantidade de amostra solúvel e o resultado foi expresso como porcentagem (m/v) de EPS dissolvidos em 100 mL de água. Os carboidratos



totais do sobrenadante foram determinados pelo método Fenol – Sulfúrico (DUBOIS et al. 1956). A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante da molécula bruta e dos derivados carboximetilados foram avaliados através da determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxila (HO•), da capacidade de eliminação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do poder redutor. A atividade antioxidante das amostras foram avaliadas nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg mL<sup>-1</sup>.

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

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

$$\% \text{ de Remoção de HO} \bullet = \left[ 1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%$$

Onde, A<sub>1</sub> representa a absorbância da amostra ou do ácido ascórbico. A<sub>0</sub> a absorbância do controle e A<sub>2</sub> a absorbância do branco sem salicilato de sódio.

##### 4.12.2 Atividade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A capacidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurada de acordo com Liu et al. (2010a). A mistura reacional continha 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mmol L<sup>-1</sup>, recém preparado), 0,5 mL da LN ou derivados (na concentração desejada), 0,05 mL de

molibdato de amônio (3% m/v), 5 mL de  $H_2SO_4$  (2 mol  $L^{-1}$ ), e 3,5 mL de KI (1,8 mol  $L^{-1}$ ). A mistura foi titulada com  $Na_2S_2O_3$  (2,5 mmol  $L^{-1}$ ) até que a cor amarela desapareça. A atividade de remoção foi calculada como:

$$\text{Remoção de } H_2O_2 = \frac{(V_0 - V_1)}{V_0} \times 100\%$$

Onde  $V_0$  é volume da solução de  $Na_2S_2O_3$  utilizada para titular a mistura controle e  $V_1$  o volume da titulação das misturas contendo amostras.

#### 4.12.3 Poder Redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com Liu et al. (2010a). Volume de 1 mL de solução de amostra (LAS ou derivados) ou ácido ascórbico (padrão antioxidante) foi misturado com 1 mL de ferricianeto de potássio (1% m/v) e incubado a 50 °C por 20 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 1 mL de solução TCA (ácido tricloroacético 10% m/v) seguido da adição de 2 mL de água ultra pura (Mili-Q) e 0,4 mL de solução de cloreto férrico (0,1% m/v).

A absorbância foi mensurada a 700 nm. Uma maior absorbância da mistura indicava maior poder redutor da amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DA LASIODIPLODANA

O fungo ascomiceto *L. theobromae* MMPI demonstrou elevada eficiência tanto no crescimento micelial como na produção do exopolissacarídeo. A produção média ( $P_F$ ) de lasiodiplodana nos cultivos submersos foi de  $6,99 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ , sendo observado um rendimento em exopolissacarídeo ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,49 \pm 0,55 \text{ g/g}$ , uma produtividade volumétrica em EPS ( $Q_P$ ) de  $0,09 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e consumo de substrato ( $Y_C$ ) de 72%, acompanhado por uma taxa global de consumo de substrato ( $Q_S$ ) de  $0,11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Elevada produção de biomassa micelial ( $P_X = 16,8 \text{ g L}^{-1}$ ) e produtividade volumétrica em biomassa ( $Q_X = 0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) também foi observada nos cultivos.

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA LASIODIPLODANA NATIVA E CARBOXIMETILADA

#### 5.2.1 Avaliação do grau de carboximetilação dos derivados

O tempo de reação e a concentração do agente derivatizante são parâmetros que influenciam fortemente o grau de substituição (DS) de uma molécula. O grau de substituição (DS) de uma macromolécula corresponde ao número médio de grupos funcionais introduzidos em cada monômero de glicose constituinte do polissacarídeo. A avaliação do DS é importante para a compreensão da nova estrutura obtida, bem como para a otimização das condições reacionais de derivatização (CHEN et al. 2014).

A concentração do agente derivatizante influenciou o conteúdo de grupos carboximetila inseridos na estrutura primária da macromolécula. O aumento da concentração do ácido monocloroacético na reação de modificação química levou a obtenção de derivados com maior grau de substituição. As relações de massa LN : ácido monocloroacético empregadas nas derivatizações foram de 1:3, 1:5, 1:6,5, 1:8 e 1:11,5 e tais relações mássicas levaram a obtenção dos derivados LC1, LC2, LC3 LC4 e LC5, respectivamente (Tabela 1).

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados referentes ao grau de substituição (DS) encontrados nas amostras carboximetiladas obtidas nas condições reacionais.

Tabela 1 - Percentual de grupamentos carboximetila e valores de DS

Amostra	Relação lasiodiplodana / agente derivatizante (g/g)	Grupos carboximetila (%) <sup>#</sup>	DS
LAS-C1	1:3	10,28	0,32
LAS-C2	1:5	14,40	0,47
LAS-C3	1:6,5	15,44	0,51
LAS-C4	1:8	17,19	0,58
LAS-C5	1:11,5	19,58	0,68

Fonte: Autoria própria

<sup>#</sup>percentual de grupos carboximetila introduzidos na macromolécula.

Segundo Wang et al. (2016b), o aumento da quantidade do agente derivatizante no meio reacional proporciona a potencialização da reação com o polissacarídeo, com isso promovendo a obtenção de derivados com maiores DS. Considerando que o valor teórico máximo do grau de substituição na (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana) é 3, uma vez que existem 3 grupos hidroxilas potencialmente livres em cada resíduo de glicose da macromolécula, a eficiência da derivatização foi calculada. Os valores de eficiência da carboximetilação encontrados foram 10,7% (DS 0,32), 15,7% (DS 0,47), 17% (DS 0,51), 19,3% (DS 0,58) e 22,7% (DS 0,68%).

Lasiodiplodana carboximetilada com maior grau de substituição (DS = 1,27) foi obtida por Kagimura et al. (2015b) empregando relação polissacarídeo/agente derivatizante (1:12) similar a maior relação mássica empregada no presente trabalho (LC5 - 1:11,5). Entretanto, é importante destacar que tais autores empregaram maior tempo reacional (8 horas) do que o empregado no presente estudo (4,5 horas).

Diversas metodologias são encontradas na literatura para obtenção de polissacarídeos derivatizados por carboximetilação, as quais comumente utilizam os mesmos agentes químicos (ácido monocloroacético e hidróxido de sódio), porém com diferentes concentrações e condições reacionais. A obtenção de

carboximetilglucanas a partir de diferentes concentrações do agente derivatizante tem sido amplamente reportada. Bai et al. (2014), produziram derivados de  $\beta$ -glucana, oriunda de parede celular de *Saccharomices cerevisiae*, com graus de carboximetilação crescentes (0,325, 0,449, 0,771 e 0,945) em função da quantidade de agente derivatizante empregado na reação. Tais autores utilizaram quantidades de ácido monocloroacético entre 2,25 g e 10,05 g para 10 g de glucana.

Similarmente, Wang et al. (2016b) descreveu que o uso de maiores concentrações de agente derivatizante na carboximetilação do polissacarídeo extraído de folhas de *Cyclocarya paliurus* também promoveu a obtenção de derivados com maiores graus de substituição (0,025, 0,171 e 0,193). Neste trabalho o polissacarídeo foi derivatizado empregando 1,0 g, 2,0 g e 3,0 g de ácido monocloroacético para 0,5 g de polissacarídeo.

Wang et al. (2015) também obtiveram polissacarídeos carboximetilados com diferentes graus de substituição. As condições reacionais empregadas por tais autores consistiram de 5 g do extrato polissacarídico extraído do corpo de frutificação do fungo *Tremella fuciformis* e concentrações ácido monocloroacético entre 9,45 g e 23,63 g. As condições reacionais levaram a obtenção de quatro derivados com DS de 0,36, 0,47, 0,54 e 0,70.

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

Na Figura 7 estão demonstrados os espectros de infravermelho (normalizados) da lasiodiplodana nativa (LN) e dos derivados carboximetilados (LC1, LC2 e LC3, LC4 e LC5).

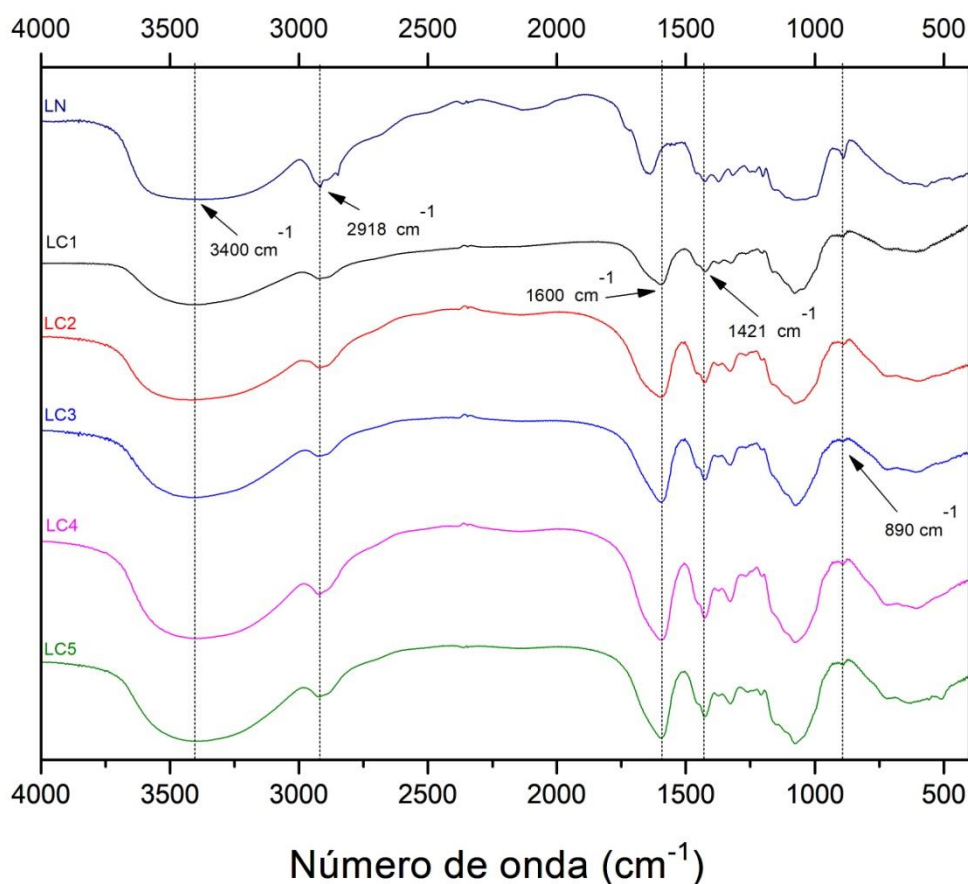


Figura 6. Espectros de infravermelho (IV) da lasiodiplodana nativa (LN) e derivados carboximetilados LC1 (DS: 0,32), LC2 (DS: 0,47), LC3 (DS: 0,51), LC4 (DS: 0,58) e LC5 (DS: 0,68).

A banda larga de intensidade forte na região entre  $3311\text{ cm}^{-1}$  e  $3424\text{ cm}^{-1}$  em todos os espectros é atribuída a vibrações de estiramento O–H (RANI & AHUJA 2017; SHARMA & RANA 2017). A absorção correspondente a frequências inferiores a  $3000\text{ cm}^{-1}$  ( $3000\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ ) é atribuída ao estiramento C–H  $sp^3$  (PAVIA et al. 2010; WANG et al. 2016b).

A banda de intensidade forte em  $1600\text{ cm}^{-1}$  e a banda de absorção em  $1421\text{ cm}^{-1}$  são resultantes das vibrações de estiramento assimétricos e simétrico do grupo  $\text{COO}^-$  respectivamente e indicam a carboximetilação do polímero (XU et al. 2009; WANG & ZHANG, 2009; WANG et al. 2016b).

As vibrações de alongamento simétricas e assimétricas das ligações C–O–C (grupo característico de açúcares) são atribuídas às bandas entre  $1246\text{ cm}^{-1}$  e  $1276\text{ cm}^{-1}$  para as vibrações assimétricas e entre  $1071\text{ cm}^{-1}$  e  $1078\text{ cm}^{-1}$  para as simétricas (XU et al. 2009). A banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$  verificada na amostra LN é atribuída a

adsorção de água (ASHORI et al. 2014; WU et al. 2014), estando esta banda sobreposta pela banda de vibração de estiramento assimétrico do grupo  $\text{COO}^-$  nas amostras derivatizadas. Wang et al. (2013) atribui as absorções entre  $542$  e  $705\text{ cm}^{-1}$  às vibrações de balanço (wag) da ligação simples C–H. A absorção na região  $890\text{ cm}^{-1}$  indica a configuração do tipo  $\beta$ - da lasiodiplodana, sendo enfraquecida nos derivados carboximetilados (TANG et al. 2017; WANG et al. 2011; WANG & ZHANG, 2009; VASCONCELOS et al. 2008; KAGIMURA et al. 2015b). As ligações glicosídicas de configuração  $\beta$ - também são atribuídas por Vasconcelos et al. (2008) e por Corradi da Silva et al. (2008) à banda de absorção de fraca intensidade em  $1378\text{ cm}^{-1}$  presente em todos os espectros.

### 5.2.3 Análise Térmica

Os parâmetros termofísicos analisados forneceram informações sobre a estabilidade térmica do biopolímero, o que é importante com relação a possibilidades de aplicações industriais.

Nas Figura 8a e 8b estão descritos as curvas termogravimétrica (TGA) e termogravimétrica diferencial (DTA) das amostras de lasiodiplodana nativa e dos derivados carboximetilados.

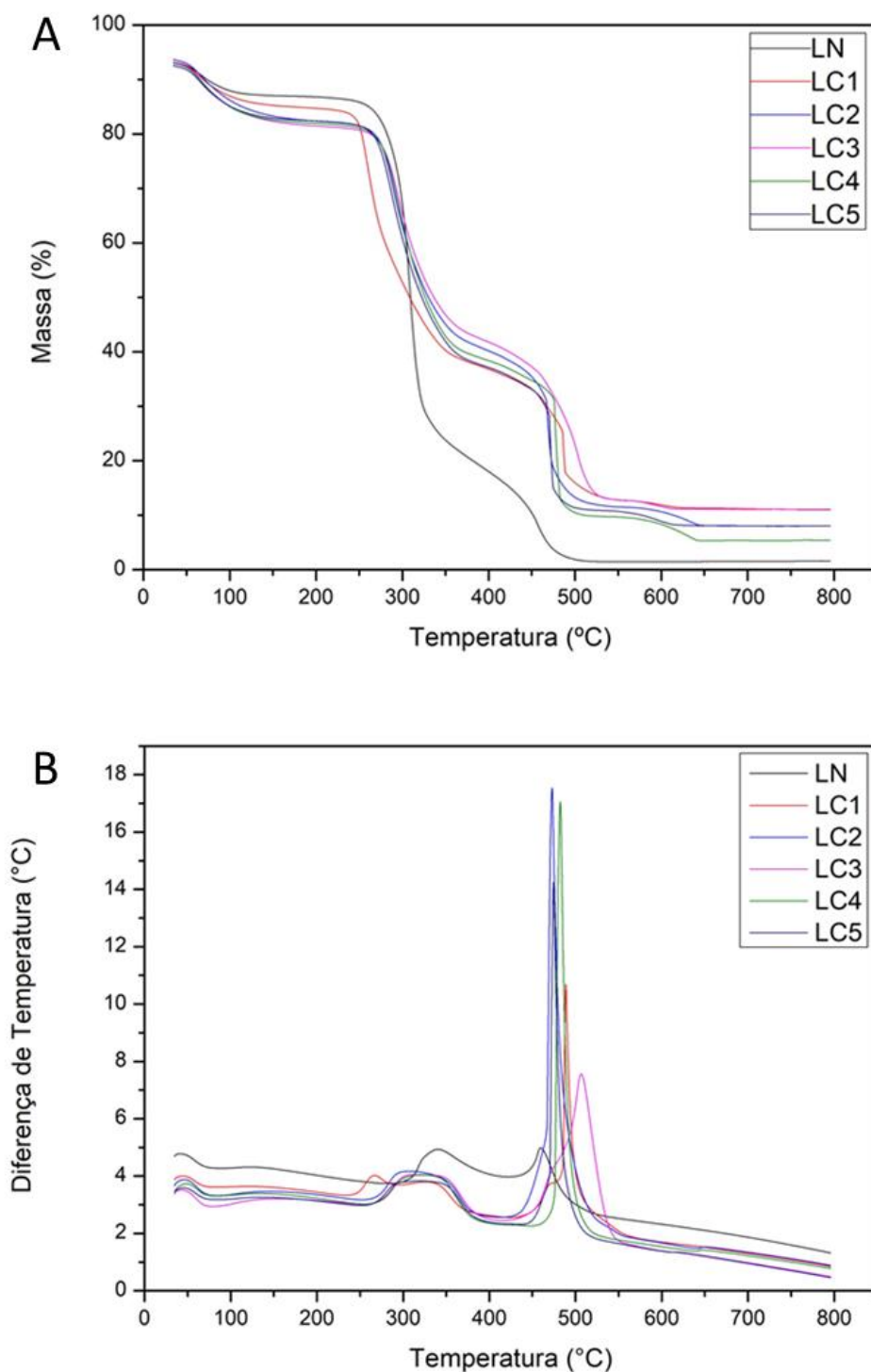


Figura 7. Curvas de Análise Termogravimétrica (A) e Termogravimétrica Diferencial (B) da lasiodiplodana nativa e derivados carboximetilado.

De acordo com os dados de análise térmica, verifica-se que a lasiodiplodana nativa e os derivados carboximetilados com graus de substituição 0,47 (LC2), 0,51



(LC3) 0,58 (LC4) e 0,68 (LC5) apresentaram quatro estágios de perda de massa, enquanto que o derivado com DS 0,38 (LC1) apresentou cinco estágios.

Na amostra de LN, o primeiro estágio de perda de massa ocorreu até 120 °C, sendo observado através de um pico exotérmico em 41 °C pela curva de DTA. Tal perda de massa é atribuída à eliminação de água de hidratação. Fenômeno similar foi relatado por Li et al. (2010) em amostra de amido, o qual descreveu um primeiro pico de água de hidratação entre 60 °C e 120 °C e um segundo pico correspondente a degradação do amido entre 252–378 °C.

O segundo estágio de perda de massa na amostra LN ocorreu entre 210 °C e 330 °C, sendo indicado por um pico endotérmico em 290 °C e correspondendo a decomposição da molécula. Foram identificados ainda, dois eventos consecutivos com perda de massa entre 330 °C e 500 °C, indicados por dois picos exotérmicos na curva DTA em 340 °C e 460 °C, respectivamente. Possivelmente, a perda de massa com pico exotérmico em 340 °C corresponde a uma degradação oxidativa. Por fim, o último estágio de perda de massa, com pico exotérmico na curva DTA em 460 °C corresponde a decomposição final (carbonização) da amostra.

Nos derivados carboximetilados o primeiro estágio de perda de massa ocorreu até 160 °C. Esta perda de massa é indicada por picos exotérmicos na curva DTA variando de 45 °C a 48 °C entre as amostras derivadas e sendo atribuída a perda de água da molécula.

O segundo e o terceiro estágios de perdas de massa verificados na amostra LC1 (DS 0,32) ocorreram de forma consecutiva entre 200 °C e 400 °C e foram indicados por dois picos exotérmicos (DTA) em 267 °C e 330 °C. O quarto e quinto eventos ocorreram entre 400 °C e 530 °C, também de forma consecutiva, e foram indicados por dois picos exotérmicos em 470 °C e 488 °C na curva DTA.

As demais amostras derivatizadas (LC2, LC3, LC4 e LC5) apresentaram comportamento térmico similar entre si. O segundo estágio de perda de massa em tais amostras ocorreu entre 200 °C e 400 °C e foram indicados por picos exotérmicos (DTA) que variaram de 310 °C a 320 °C. O terceiro estágio ocorreu entre 400 °C e 520 °C, indicado por picos exotérmicos da curva DTA ocorridos de 473 °C a 507 °C e atribuídos a degradação oxidativa das amostras. O quarto estágio correspondente à decomposição final dos derivados e foi identificado por picos endotérmicos da curva DTA que ocorreram de 610 °C a 640 °C decorrentes de perdas de massa das amostras entre 550 °C e 650 °C.

Como pode ser verificado na Tabela 2, no primeiro estágio de decomposição, referente à perda de água de hidratação, todas as amostras carboximetiladas demonstraram maiores perdas de massa comparadas a lasiodiplodana nativa. Tal fenômeno pode ser atribuído à redução da hidrofobicidade após a introdução de grupamento carboximetila pela derivatização química da macromolécula. De fato, o aumento de solubilidade dos derivados em relação à amostra nativa foi constatado no ensaio de avaliação da solubilidade. As curvas termogravimétricas diferenciais (DTA) da amostra LN e das amostras derivadas também indicam a obtenção de compostos mais hidrofílicos após a carboximetilação, visto que houve um pequeno deslocamento (de 41 °C para 45-48 °C) dos valores das temperaturas dos picos de perda de água nas curvas de DTA assim como observado por ALEKHINA et al. 2014.

**Tabela 2. Conteúdo de perda de massa das amostras de lasiodiplodana bruta e modificada em intervalos de temperatura determinados.**

	Eventos de perda de massa				
	1°	2°	3°	4°	5°
<b>LN (°C)</b>	30 - 120	210 – 330	330 – 500	N.A.	N.A.
<i>Perda de massa (%)</i>	12,92	72,16	98,3	N.A.	N.A.
<b>LC1 (°C)</b>	30 - 160	200 - 300	300 - 400	400 - 480	480 - 530
<i>Perda de massa (%)</i>	16,81	47,3	62,9	72,9	86,99
<b>LC2 (°C)</b>	30 – 160	200 – 400	400 - 520	550 – 640	N.A.
<i>Perda de massa (%)</i>	16,81	60,00	88,30	91,50	N.A.
<b>LC3 (°C)</b>	30 - 160	200 – 400	400 - 520	520 – 617	N.A.
<i>Perda de massa (%)</i>	17,21	57,89	85,91	88,6	N.A.
<b>LC4 (°C)</b>	30 - 160	200 - 400	400 - 519	551 – 641	N.A.
<i>Perda de massa (%)</i>	16,61	61,38	90,20	94,53	N.A.

<b>LC5 (°C)</b>	30 - 160	200 - 400	400 - 518	549 – 615	N.A.
<i>Perda de massa (%)</i>	16,61	62,74	89,12	91,69	N.A.

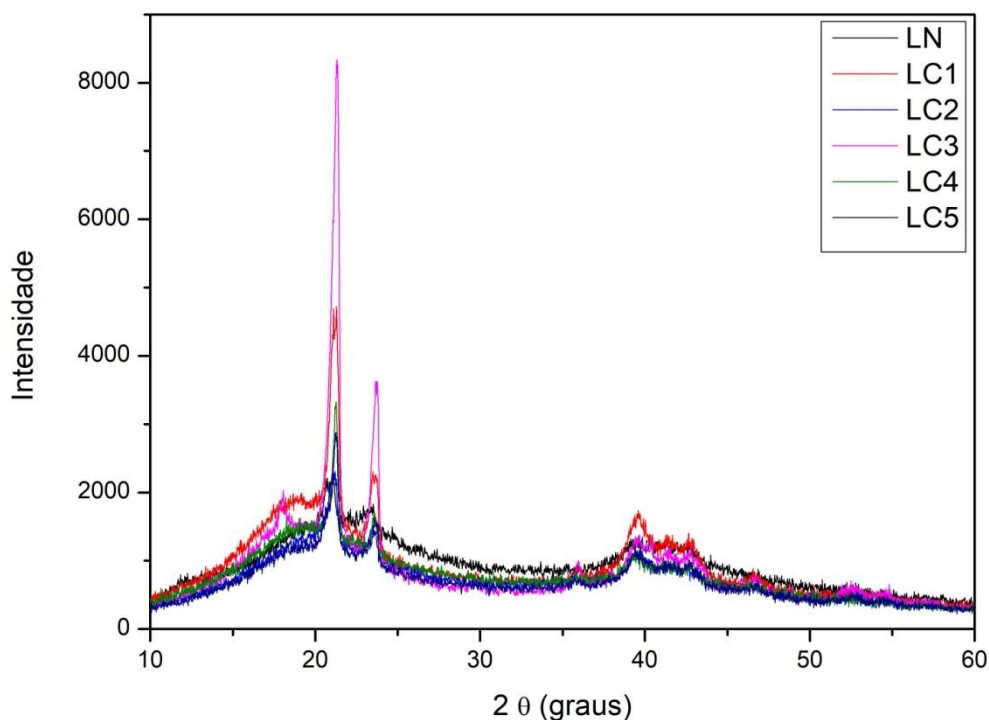
---

N.A.: Não aplicável.

Considerando os padrões de produção industrial de alimentos e fármacos, destaca-se que tanto a LN e os derivados LC apresentaram boa estabilidade térmica, visto que não ocorreu degradação térmica até 200 °C.

#### 5.2.4 Análise por Difração de Raios-X (DRX)

A análise de Difração de Raios-X é amplamente empregada para avaliar a cristalinidade, tamanho e orientação dos cristalitos (MITTAL & MATTU & KAUR 2016). A Figura 9 apresenta os perfis de difração de raios-X das amostras de LN e carboximetiladas.



**Figura 8.** Difratograma da LN e dos derivados LC com DS de 0,32; 0,47; 0,51, 0,58 e 0,68

O perfil difratográfico das amostras de LN e dos derivados é típico de amostras amorfas, sem predominância de picos agudos. Três picos de difração pronunciados a  $2\theta$  com valores próximos a  $21^\circ$ ,  $23^\circ$  e  $39^\circ$  ( $2\theta$ ) foram observados nos difratogramas das amostras de LN e derivatizadas. Estes picos sugerem que os polissacarídeos (nativo e derivatizado) estudados possuem estrutura amorfa, porém com regiões com certa orientação molecular. A intensidade do pico verificado a  $21^\circ$  ( $2\theta$ ) aumenta nas amostras carboximetiladas, o que possivelmente está associado a introdução de novo grupamento funcional (grupo carboximetila) nessa região após a derivatização.

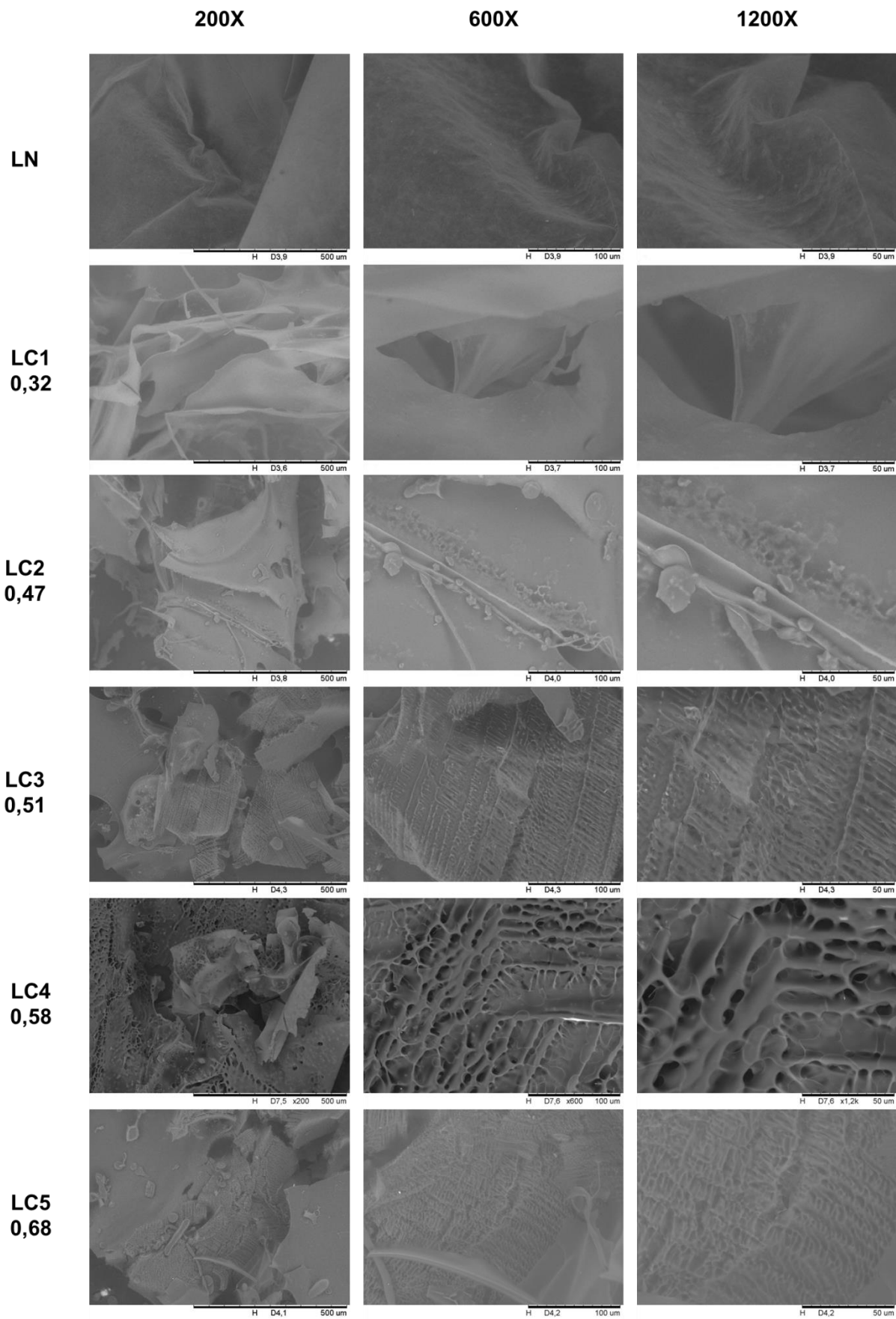
Em estudo anterior com a lasiodiplodana conduzido por Kagimura et al. (2015b), foi reportado a ocorrência de alterações no perfil difratográfico na amostra de carboximetilglucana (DS 1,27) comparadas a lasiodiplodana nativa. Tais autores verificaram o deslocamento, bem como o desaparecimento de alguns picos após carboximetilação, relacionando esses fenômenos ao possível surgimento de regiões fracamente cristalinas com uma orientação molecular não preferencial. Entretanto, salientam que embora tenham sido verificados modificações em pontos específicos

da macromolécula após a carboximetilação, a estrutura primária permaneceu preservada similarmente ao encontrado no presente estudo.

O aumento da cristalinidade em polissacarídeos após derivatização por carboximetilação tem sido reportado na literatura científica. Bhatia & Ahuja, (2015) descreveram o aumento da cristalinidade em amostras de arabinóxilana após carboximetilação. Ahuja & Kumar & Singh, (2012), verificaram difratograma de raios-X típico de substância amorfa em amostra de goma xantana. Entretanto a amostra de goma xantana carboximetilada apresentou perfil difratográfico típico de substância cristalina.

#### 5.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura nas amplitudes de 200 X, 600 X e 1200 X das amostras de lasiodiplodana nativa e carboximetiladas estão demonstradas na Figura 10.



**Figura 9. Micrografias (MEV) da lasiodiplodana nativa (LN) e dos derivados carboximetilados (LC) com diferentes graus de substituição (DS: 0,32, 0,47, 0,51, 0,58 e 0,68) em amplitudes de 200 X, 600 X e 1200 X.**

Conforme pode ser verificada na figura 10, a estrutura morfológica apresentada nas micrografias das amostras de lasiodiplodanas carboximetiladas diferiram da nativa e aparentemente o grau de substituição tem influência também no aspecto morfológico da macromolécula.

A amostra LN apresentou estrutura morfológica com aspecto de filmes finos, translúcido e com dobras ao longo de sua extensão. As estruturas granulares distribuídas nas placas verificadas por Kagimura et al, 2015(b) nas micrografias de lasiodiplodana nativa produzida em fermentador de tanque de mistura (STR) são quase inexistentes na lasiodiplodana deste estudo. Possivelmente a estrutura morfológica do biopolímero é influenciada pelas condições de cultivo do fungo, visto que no presente estudo as fermentações foram conduzidas em frascos agitados, cujas condições dinâmicas diferem das observadas em fermentadores de tanque de mistura.

A derivatização da lasiodiplodana promoveu mudanças morfológicas na superfície do biopolímero. Conforme pode ser observado na figura 7, a superfície da amostra LC1 demonstra menor homogeneidade do que a amostra não modificada (LN), sendo observado rasgos e orifícios ao longo de sua superfície favorecendo a aplicação na indústria farmacêutica como veículo de fármacos.

Menor uniformidade superficial foi observada a medida que o grau de substituição do biopolímero aumentou. Os derivados LC4 (DS: 0.58) e LC5 (DS: 0.68) apresentaram as superfícies mais heterogêneas entre as amostras analisadas. Regiões com certa porosidade e com presença de estruturas alveolares são verificadas especialmente nas amostras LC3 (DS: 0.47), LC4 (DS: 0.58) e LC5 (DS: 0.68).

Mittal, Mattu & Kaur (2016) avaliaram a morfologia de uma galactomana extraída de *Leucaena leucocephala* após carboximetilação. Os autores verificaram que a amostra não modificada apresentava grânulos irregulares sobre uma superfície lisa, e após a derivatização pequenos poros que resultavam em uma rugosidade superficial foram observados. Bhatia e Ahuja et al. (2015) observaram que a carboximetilação de arabinóxilana de *Psyllium* promoveu mudanças

morfológicas na estrutura do polímero. A estrutura fibrosa e estriada inicialmente verificada deu lugar a uma estrutura com superfície áspera e porosa.

### 5.2.6 Análise da solubilidade em água

A modificação química de polissacarídeos é frequentemente relacionada com mudanças na solubilidade da molécula. A inserção de grupos químicos no oxigênio das hidroxilas podem diminuir as interações intramoleculares e intermoleculares, tornando a molécula mais hidrofílica (YANG et al. 2011).

Conforme pode ser verificado na tabela 3, os resultados dos ensaios de solubilidade em água a 25 °C revelam que a introdução de grupos carboximetila na macromolécula levou a expressivo aumento de solubilidade.

**Tabela 3. Relação entre o grau de substituição (DS) das amostras e a solubilidade em água.**

Amostras	DS	Solubilidade (%) <sup>*</sup>
LN	-	4,02 <sup>a</sup> ± 0,07
LC1	0,32	67,99 <sup>b</sup> ± 0,86
LC2	0,47	54,30 <sup>c</sup> ± 1,29
LC3	0,51	51,20 <sup>cd</sup> ± 1,92
LC4	0,58	49,58 <sup>d</sup> ± 0,39
LC5	0,68	45,50 <sup>e</sup> ± 0,66

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa entre as porcentagens analisadas ao nível de significância de 95%.

\* Solubilidade (%) = mg de amostra / 100 mL

O derivado com menor grau de substituição (DS 0,32) apresentou uma solubilidade 17 vezes superior a macromolécula nativa. Os derivados LC2 (DS 0,47), LC3 (DS 0,51), LC4 (DS 0,58) e LC5 (DS 0,68) também apresentaram maior solubilidade, entretanto não foi verificado uma correlação direta entre aumento do grau de substituição e proporcional aumento da solubilidade.

De fato, a introdução de grupos carboximetila na macromolécula promove alterações estruturais que modificam a interação macromolécula-água, melhorando



sua hidrofobicidade. Polissacarídeos carboximetilados apresentam novo caráter polianiónico e a repulsão de cargas causa maior extensão da cadeia consequentemente provocando um aumento de tamanho hidrodinâmico (MACHOVÁ et al. 2014a)

Wang et al. (2012) avaliaram a solubilidade em água de cinco derivados carboximetilados da pachimana, uma (1→3)- $\beta$ -D-glucana extraída do escleródio de *Poria cocos*. Os derivados apresentaram diferentes graus de solubilidade em função do grau de substituição e similarmente ao encontrado no presente trabalho, parece não haver uma correlação direta entre o aumento do grau de substituição e o aumento da solubilidade. Os derivados com DS de 0,40 e 0,48 apresentaram solubilidade de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,30 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já os derivados com DS 0,63, 0,75 e 0,88 apresentaram valores de solubilidade similares (0,50 mg mL<sup>-1</sup>, 0,51 mg mL<sup>-1</sup> e 0,52 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) entre si.

Zhang, Zhang e Chen (2001) carboximetilaram  $\beta$ -(1→3)-D-glucana, extraída de *Ganoderma lucidum*, e obtiveram cinco derivados com DS entre 0,20 e 0,63. Os autores observaram que assim como o polissacarídeo bruto, os derivados com DS equivalentes a 0,20 e 0,63 eram insolúveis em água, ao passo que os derivados com DS 0,38, 0,43 e 0,51 eram solúveis. A insolubilidade dos derivados com DS de 0,20 e 0,63 foi justificada pela rigidez da cadeia macromolecular causada por interações de hidrogênio intermoleculares e repulsão eletrostática dos grupos carboximetila. De acordo com os autores, os derivados com DS relativamente mais altos apresentam cadeias mais estendidas do que as cadeias dos derivados com DS mais baixos. Possivelmente, a mesma justificativa pode ser aplicada aos derivados obtidos nesse trabalho, onde foi observado decréscimo da solubilidade com o aumento do grau de substituição da macromolécula. A inserção de grupos carboximetila possivelmente promoveu mudanças conformacionais na estrutura tridimensional do biopolímero, afetando diretamente sua solubilidade.

### 5.2.7 Atividade Antioxidante

Diversos são os compostos capazes de causar o estresse oxidativo nas células. Após sua formação, podem danificar várias biomoléculas na busca de sua estabilização, nesse sentido, compostos com potencial de combater e evitar as reações em cadeias são de grande importância biológica.

Os ensaios utilizados para determinar o potencial antioxidante da lasiodiplodana bruta e dos derivados neste estudo, incluem a avaliação da capacidade de eliminação de agentes oxidantes (radical  $\text{OH}\cdot$  e peróxido de hidrogênio) e avaliação da capacidade de redução (poder redutor do íon  $\text{Fe}^{3+}$ ) (WANG et al. 2016a). O íon  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  são os principais precursores da formação dos radicais hidroxila e superóxido, considerados os mais agressivos em sistemas biológicos. A elevada reatividade do radical hidroxila torna seu combate quase inviável, visto que ele necessita de poucos milissegundos para reagir com moléculas biológicas, ressaltando a maior importância em evitar sua formação, mas não dispensando a promoção de seu sequestro (SCHNEIDER & OLIVEIRA 2004).

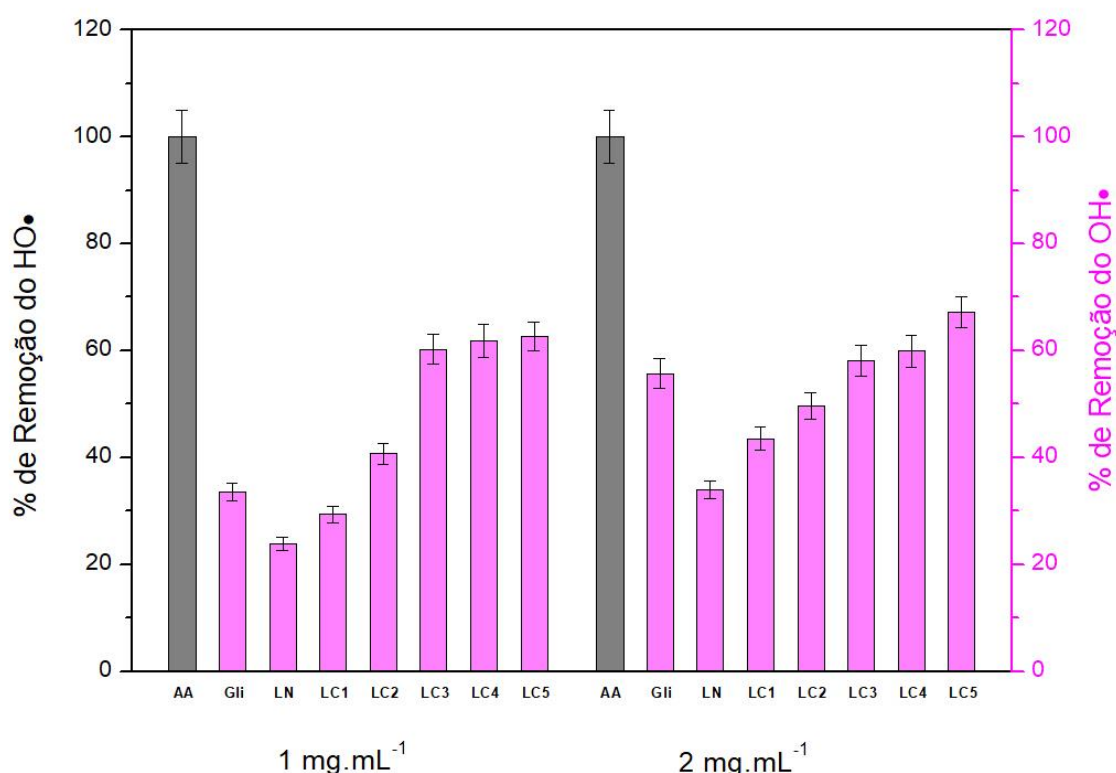
#### 5.2.7.1 Remoção do radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ )

A maior parte dos radicais hidroxila reativos em sistemas biológicos são gerados pela reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  com  $\text{Fe}^{2+}$ , conhecido por reação de Fenton (WANG et al. 2016a). O radical hidroxila apresenta uma reatividade extremamente elevada e pode promover severos danos a biomoléculas funcionais em células vivas, porém compostos antioxidantes são capazes sequestrar e interromper as reações radiculares desencadeadas pelo radical  $\text{OH}\cdot$  (SHI et al. 2017).

No ensaio espectrofotométrico de sequestro do radical  $\text{OH}\cdot$ , o salicilato compete com a amostra pela captura do radical hidroxila, e a hidroxilação do salicilato é acompanhada pela mudança de coloração. Assim, a medida do conteúdo de salicilato hidroxilado reflete a competição de ambos os antioxidantes, ou seja, a diminuição da absorvância da mistura reacional indica aumento da atividade de eliminação de radicais hidroxila pela amostra (MACHOVÁ et al. 2014b). Segundo Sheng & Sun, 2014 os radicais hidroxilas podem ser eliminados através de três tipos de mecanismos: transferência de elétrons ( $\text{OH}\cdot + \text{R} \rightarrow \text{OH}^- + \text{R}^+$ ), abstração de

hidrogênio ( $\text{RH} + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ ) e adição a um anel aromático ou quebra de dupla ligação produzindo um produto de adição ( $\text{OH}\cdot + \text{R} = \text{R} \rightarrow \text{HO} - \text{R} - \text{R}\cdot$ ).

A capacidade de remoção do radical hidroxila pela amostra de lasiodiplodana nativa, pelos derivados carboximetilados e pelo monômero glicose, foram determinadas pelo ensaio de salicilato e comparados com o padrão antioxidante ácido ascórbico, estando demonstrados na Figura 11.



**Figura 10. Porcentagem de remoção do radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) verificado nos ensaios com lasiodiplodana nativa (LN), lasiodiplodana carboximetiladas (LC), glicose e ácido ascórbico (padrão antioxidante).**

A carboximetilação da lasiodiplodana potencializou a capacidade de remoção do radical hidroxila. A habilidade de remoção do radical hidroxila variou de 23,83% (LN) a 62,64% (LC5, DS 0,68) na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e quando esta concentração foi aumentada para 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, a atividade de remoção do radical variou de 33,39% (LN) a 67,19% (LC5).

Comparando a habilidade de remoção do radical hidroxila entre a amostra nativa (LN) e a amostra com DS 0,68 (LC5) foram verificados incrementos de 163% e 101% nas concentrações de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Parece

haver uma correlação dose dependente entre a concentração da glucana (entre 1,0 e 2,0 mg mL<sup>-1</sup>) e a capacidade de eliminação dos radicais hidroxila, especialmente nas amostras LN, LC1 (DS: 0,32) e LC2 (DS: 0,47).

Por outro lado, a lasiodiplodana nativa (LN) apresentou moderada atividade de remoção do radical hidroxila, tanto na concentração 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (23,83%) como na concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (33,39%). O padrão antioxidante ácido ascórbico, como já esperado, promoveu 100% de remoção em ambas concentrações de amostra. O monômero glicose também demonstrou habilidade de remoção do radical hidroxila, removendo 33,59% deste radical na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e 49,60% na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>.

Machová et al. (2014b) avaliaram a capacidade de sequestro de radicais hidroxila e de eliminação do radical DPPH por derivados carboximetilados de mananas (extraídas de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*) glucanas (extraídas de *Saccharomices cerevisiae*) e dextranas (extraídas de *Leuconostoc spp.*). Estes autores verificaram que as atividades antioxidantes dos derivados foram superiores as encontradas nos polissacarídeos nativos apenas quando avaliada pelo método de sequestro dos radicais hidroxila. Tais autores sugerem que a remoção do próton pelo radical OH• ocorre preferencialmente nos átomos de hidrogênio ligado a carbono do anel de piranose, ao invés dos grupos hidroxila. De acordo com os autores, a situação muda após a introdução de grupos carboximetila, sendo verificado aumento da eficácia antioxidante. Tal aumento é atribuído ao fato dos radicais hidroxila serem preferencialmente eliminados com porções do grupo carboximetila, os quais especula-se que contenham hidrogênios de metileno adicionais que são removidos com mais facilidade pelos radicais hidroxilas reativos.

Shi et al. (2017) produziram derivados carboximetilados (DS 0,849) de um polissacarídeo parcialmente hidrolisado, extraído da alga *Enteromorpha prolifera*, e reportaram significativa melhoria na atividade antioxidante do polissacarídeo degradado em comparação ao polissacarídeo nativo. Os autores atribuíram tal melhoria a uma maior exposição de porções químicas mais ativas da macromolécula na amostra parcialmente degradada. A atividade antioxidante também foi melhorada após a carboximetilação, sendo verificado um percentual de remoção de radical hidroxila de 89,4% na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> de amostra.

Wang, Zhang & Zhao (2015) carboximetilaram o polissacarídeo insolúvel extraído da *Tremella fuciformis* e obtiveram derivados com graus de substituição variando de 0,36 a 0,70. A derivatização contribuiu para melhoria da solubilidade e da atividade de eliminação de radicais hidroxilas. A melhor capacidade de eliminação de radicais hidroxila verificada pelos autores foi de 60,2% com o derivado com grau de substituição de 0,70 na concentração de 1,64 mg mL<sup>-1</sup>.

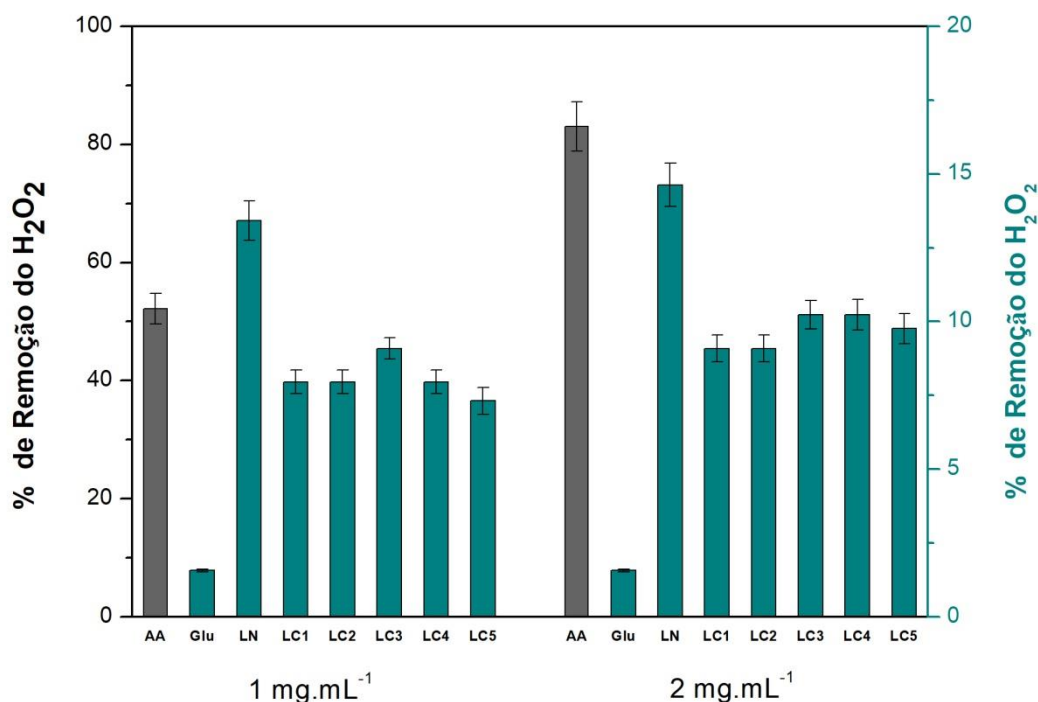
Tang et al. (2017) avaliaram o potencial de eliminação de radicais hidroxilas de (1→3)-β-D-glucanas modificadas por sulfatação, carboximetilação e fosforilação. Todos os derivados apresentaram poder de eliminação dos radicais hidroxila de forma dose-dependente. A amostra carboximetilada em concentração 1 mg mL<sup>-1</sup> eliminou, aproximadamente 30% dos radicais, enquanto que na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> a eliminação foi de aproximadamente 50%.

#### 5.2.7.2 Atividade de remoção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Apesar do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) não ser muito reativo é considerado um dos principais indutores do envelhecimento celular, atacando sistemas de produção de energia celular e desempenhando importante papel como intermediário na formação de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) ao reagir com Fe<sup>2+</sup> (LIU et al. 2010a; LIU et al. 2010b; XU et al. 2009).

No protocolo analítico baseado na capacidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o peróxido de hidrogênio não removido pelas amostras, oxida o iodeto de potássio tornando a solução amarela pela presença de iodo. Após todo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ter reagido, a quantidade de iodo formada é quantificada por titulação, utilizando o tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o qual reduzirá o iodo tornando a solução incolor novamente.

O potencial de eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas amostras LN, LC e monômero glicose foram determinadas e comparadas com o padrão antioxidante ácido ascórbico. Os resultados estão demonstrados na figura 12.



**Figura 11. Porcentagem de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificado nos ensaios com lasiodiplodana nativa (LN), lasiodiplodana carboximetiladas (LC), glicose e ácido ascórbico (padrão antioxidante).**

Como esperado, o padrão antioxidante ácido ascórbico apresentou elevada habilidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (52,2%) como na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> (83,01%). Por outro lado, o monômero glicose demonstrou baixa capacidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ambas concentrações avaliadas (1,57%).

A lasiodiplodana nativa (LN) foi capaz de remover 13,41% do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> e remover 14,63% na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, a derivatização da lasiodiplodana por carboximetilação não potencializou a habilidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como encontrado no ensaio com HO•. A habilidade de remoção do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das amostras derivatizadas (LC) variaram de 7,31% (DS 0,51) a 9,09% (DS 0,68) na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, e de 9,09% (DS 0,38 e 0,47) a 10,22% (DS 0,58 e 0,68) na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Não foi verificada correlação entre concentração da glucana e grau de substituição em relação a capacidade de remoção de peróxido de hidrogênio.

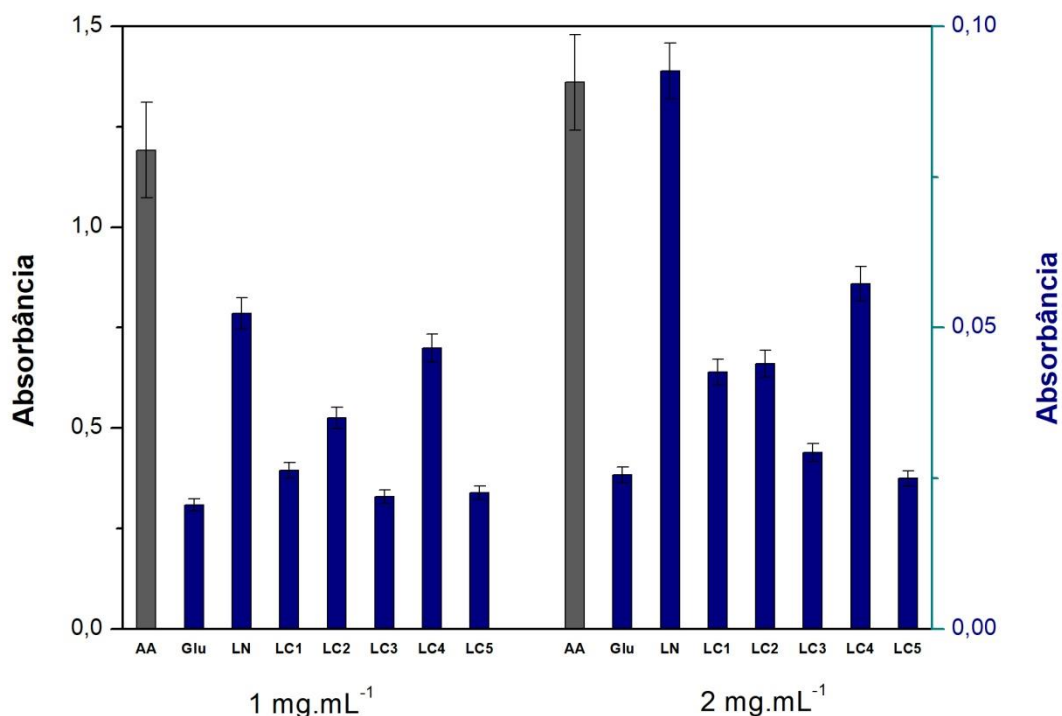
Liu et al. (2010a) avaliaram a atividade de eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de dois polissacarídeos de baixo peso molecular (5,2 e 15,4 kDa) extraídos do corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum*. Os polissacarídeos apresentaram elevada atividade de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (entre 50% e 30%) na concentração de  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ , mas ainda inferiores ao verificado no padrão antioxidante ácido ascórbico ( $\approx 62\%$ ).

Liu et al. (2017) verificaram que o potencial de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi influenciado pelo DS em amostras de quitosana carboximetilada. O potencial aumentou diretamente com o aumento do grau de substituição e com o aumento da concentração da amostra. Os autores encontraram valores superiores de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo que a amostra com DS 0,34 apresentou 30% e 50% de remoção nas concentrações de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente.

### 5.2.7.3 Poder Redutor

A habilidade de redução de um composto pode ser considerada como indicador de sua potencial atividade antioxidante. Com relação ao íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), a doação de elétrons o converte em espécie não reativa e mais estável, interrompendo a formação e/ou encerrando a reação em cadeia dos radicais livres (CHEN et al. 2014; MAITY et al. 2015). Neste ensaio, os compostos com ação antioxidante convertem o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) do cloreto férrico em íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). A reação de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  é acompanhada de mudança da coloração amarela para esverdeada, assim, o potencial antioxidante é mensurado pela intensidade da coloração esverdeada da mistura reacional (NANDI et al. 2014).

O poder redutor da lasiodiplodana bruta, dos derivados carboximetilados e do monômero glicose foram determinadas pelo método de redução do ferricianeto de potássio e comparados com o padrão ácido ascórbico. Maiores valores de absorvância indicam maior poder de redução. Os resultados estão demonstrados na Figura 13.



**Figura 12. Poder redutor do íon do ferro (III) verificado nas amostras da lasiodiplodana nativa (LN), lasiodiplodana carboximetiladas (LC), glicose e do padrão antioxidante (ácido ascórbico).**

Como pode ser observado na figura 13 o padrão ácido ascórbico apresentou elevado poder redutor, tanto na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> como na concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. O aumento da concentração de lasiodiplodana nativa de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> para 2,0 mg mL<sup>-1</sup> promoveu um aumento de 77% da atividade redutora. Por outro lado, assim como verificado na atividade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a derivatização por carboximetilação não potencializou o poder redutor da lasiodiplodana.

Os maiores resultados de atividade redutora foram verificados nas amostras LN (absorvância 0,092) e LC4 (absorvância 0,057) na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. O monômero glicose demonstrou poder redutor inferior ao observado na lasiodiplodana nativa.

O baixo poder redutor da lasiodiplodana possivelmente pode estar associado a rigidez estrutural característica da macromolécula (Vasconcelos et al. 2008), o que poderia contribuir para menor exposição de porções ativas da macromolécula (SHI et al. 2017). Na literatura científica, pode ser verificado que os polissacarídeos comumente apresentam poder redutor relativamente baixos.



Tang et al. (2017) avaliaram o poder redutor de amostras de  $\beta$ -glucanas quimicamente modificadas. A amostra modificada por sulfatação obteve o maior poder redutor, sendo de 0,32 na concentração de 3,2 mg mL<sup>-1</sup>. No mesmo estudo, a glucana carboximetilada apresentou poder redutor bem inferior (0,072) nessa concentração.

Wang et al. (2016b) carboximetilaram um polissacarídeo extraído da planta *Cyclocarya paliurus* e avaliaram seu poder redutor, correlacionando ao grau de substituição das moléculas modificadas. No referido trabalho, o aumento do DS levou a uma diminuição do poder redutor das amostras, enquanto que o polissacarídeo bruto demonstrou maior potencial redutor.

## CONCLUSÕES

O protocolo analítico empregado no processo de derivatização química da lasiodiplodana mostrou-se efetivo, promovendo a obtenção de derivados carboximetilados com diferentes graus de substituição,

O aumento da concentração do agente derivatizante na reação de modificação química da lasiodiplodana levou a obtenção de derivados com diferentes graus de substituição (DS: 0,32, 0,47, 0,51, 0,58 e 0,68).

A introdução de grupos carboximetila na macromolécula levou a expressivo aumento de solubilidade. O derivado com menor grau de substituição (LC1, DS: 0,32) apresentou maior grau de solubilidade (67,99 mg/100mL). Por outro lado, o aumento no grau de carboximetilação não promoveu subsequente aumento de solubilidade.

Os espectros de FT-IR indicaram a derivatização da lasiodiplodana por carboximetilação, sendo verificadas bandas de intensidade forte em  $1600\text{ cm}^{-1}$  e banda de absorção em  $1421\text{ cm}^{-1}$ , resultantes das vibrações de estiramento assimétricos e simétrico do grupo  $\text{COO}^-$  da carboximetila.

A lasiodiplodana nativa (LN) e os derivados (LC) apresentaram estabilidade térmica relativamente elevada, até temperaturas entre  $200\text{ }^\circ\text{C}$  e  $210\text{ }^\circ\text{C}$ , o que é relevante considerando processos do setor alimentício e farmacêutico.

A análise difratográfica das amostras de lasiodiplodana nativa (LN) e dos derivados (LC) demonstraram que tais macromoléculas são biomateriais com perfil cristalográfico predominantemente amorfa típico de polissacarídeo.

A carboximetilação promoveu mudanças morfológicas na microestrutura da superfície do biopolímero, principalmente o surgimento de porosidade e estruturas alvéolares ao longo da superfície.

A carboximetilação potencializou expressivamente a capacidade de remoção de radical hidroxila pela lasiodiplodana. Entretanto, não promoveu aumento na capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio nem aumento do poder redutor.

Os dados obtidos neste estudo demonstraram a possibilidade de obtenção de derivados com diferentes graus de carboximetilação em função da concentração do agente derivatizante empregado na mistura reacional. Desta forma a reação pode ser guiada de acordo com o grau de substituição desejado.

## REFERÊNCIAS

- AHUJA, M. & KUMAR, A. & SINGH, K. Synthesis, characterization and *in vitro* release behavior of carboxymethyl xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 51, p. 1086– 1090, 2012.
- ALEKHINA, M.; MIKKONEN, K. S.; ALÉN, R.; TENKANEN, M.; SIXTA, H. Carboxymethylation of alkaline extracted xylan for preparation of bio-based packing films. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, p. 89–96, 2014
- ALVES DA CUNHA, M. A.; ALBORNOZ, S. L.; QUEIROZ SANTOS, V. A.; SANCHEZ, W. N.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H. Structure and Biological Functions of D-Glucans and Their Applications. In: Atta-ur-Rahman. Studies in Natural Products Chemistry. **Elsevier**, 2017, cap. 9.
- ANDOLFI, A.; MADDAU, L.; CIMMINO, A.; LINALDEDDU, B. T.; BASSO, S.; DEIDDA, A.; SERRA, S.; EVIDENTE, A. Lasiojasmonates A–C, three jasmonic acid esters produced by *Lasiodiplodia* sp., a grapevine pathogen. **Phytochemistry**, v. 103, p. 145–153, 2014.
- ASHORI, A.; BABAEE, M.; JONOABI, M.; HAMZEH, Y. Solvent-free acetylation of cellulose nanofibers for improving compatibility and dispersion. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 369–375, 2014.
- BAI, N.; GU, M.; ZHANG, W.; XU, W.; MAI, K. Effects of  $\beta$ -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, V. 426–427, p. 66–73, 2014.
- BAI, Y.; LIU, L.; ZHANG, R.; HUANG, F.; DENG, Y.; ZHANG, M. Ultrahigh pressure-assisted enzymatic extraction maximizes the yield of longan pulp polysaccharides and their acetylcholinesterase inhibitory activity *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 214–222, 2017.
- BHATIA, M. & AHUJA, M. Psyllium arabinoxylan: Carboxymethylation, characterization and evaluation for nanoparticulate drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 72, p. 495–501 2015.
- BHUNIA, B., UDAY, U. S. P., OINAM, G., MONDAL, A., BANDYOPADHYAY, T. K., TIWARI, O. N. Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. **Carbohydrate Polymers**. V. 179, p. 228-243, 2018.
- CHE, J., LIU, B., RUAN, C., TANG, J.; HUANG, D. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Crop Protection*, v. 67, p. 178-183, 2015.
- CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated  $\beta$ -(1→3)-D-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 398 – 405, 2010.

CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**. V. 156, p. 279-288, 2014.

CHEN, S.; LI, G.; LIU, Q.; LI, J.; LIU, F. Characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* from *Rosa rugosa* in South China. **Crop Protection**, v. 79, p. 51-55, 2016.

CHEN, Y.; LI, X.; ZHOU, L.; LI, W.; LIU, L.; WANG, D.; ZHANG, W.; HUSSAIN, S.; TIAN, X.; LU, Y. Structural elucidation of three antioxidative polysaccharides from *Tricholoma lobayense*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 484-492, 2017.

CIPRIANO, A. K. A. L.; GONDIM, D. M. F.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS, J. A. M.; MOURA, A. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MELO, J. G. M.; CARDOSO, J. E.; PAIVA, A. L. S.; OLIVEIRA, J. T. A. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Journal of Proteomics**, v. 113, p. 90-109, 2015.

CORRADI DA SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 793-798, 2008.

CUNHA, M. A. A.; TÚRMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, E. N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179-1188, 2012.

DU, B., YANG, Y., BIAN, Z., XU, B. Molecular weight and helix conformation determine intestinal anti-inflammatory effects of exopolysaccharide from *Schizophyllum commune*. **Carbohydrate Polymers**. V. 172, p. 68-77, 2017.

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

GIESE, E. C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; BARBOSA, A. M.; CUNHA, M. A. A. DEKKER, R. F. H. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β-D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2015

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2014. Classification of Genus: *Lasiodiplodia* Ellis & Everhart, 1896 - GBIF Portal. Disponível em: <<http://data.gbif.org/species/browse/taxon/2611221>>. Acesso em: 12/01/2017.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F.H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015a.

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; MALFATTI, C. R. M.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; TEIXEIRA, S. D.; SALOMÉ, K. Carboxymethylation of (1→6)- $\beta$ -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**. V. 127, p. 390–399, 2015b.

KHAN, A. A., GANI, A., MASOODI, F. A., AMIN, F., WANI, I. A., KHANDAY, F. A., GANI, A. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of  $\beta$ -D-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) – Effect of  $\gamma$  irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 442-450, 2016.

KASHIMA, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; NABETA, K. Biosynthesis of Resorcylic Acid Lactone Lasiodiplodin in *Lasiodiplodia theobromae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73 (5), p. 1118–1122, 2009.

LEI, N.; WANG, M.; ZHANG, L.; XIAO, S.; FEI, C.; WANG, X.; ZHANG, K.; ZHENG, W.; WANG, C.; YANG, R.; XUE, F. Effects of Low Molecular Weight Yeast  $\beta$ -Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 16, p. 21575-21590, 2015.

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

LI, P.; TAKEI, R.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of theobroxide and its related compounds, metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, v. 68, p. 819–823, 2007.

LI, X., GAO, W., HUANG, L., WANG, Y., HUANG, L., LIU, C. Preparation and physicochemical properties of carboxymethyl *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Starches*. **Carbohydrate Polymers**. V. 80, p. 768-773, 2010.

LI, Y.; YUAN, Y.; LEI, L.; LI, F.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHAO, G.; WU, S.; YIN, R.; MING, J. Carboxymethylation of polysaccharide from *Morchella angusticeps* Peck enhances its cholesterol-lowering activity in rats. **Carbohydrate Polymers**. V. 172, p. 85–92, 2017.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 275–281, 2009.

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

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**. V. 82, p. 1278–1283, 2010b.

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

LIU, M.; MIN, L.; ZHU, C.; RAO, Z.; LIU, L.; XU, W.; LUO, P.; FAN, L. Preparation, characterization and antioxidant activity of silk peptides grafted carboxymethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 732-738, 2017

MA, L.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; FU, L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 371-378, 2012.

MACHOVÁ, E.; BYSTRICKÝ, P.; MALOVÍKOVÁ, A.; BYSTRICKÝ, S. Preparation and characterization of carboxymethyl derivatives of yeast mannans in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**. V. 110, p. 219–223, 2014a.

MACHOVÁ, E. & ČÍŽOVÁ, A. & BYSTRICKÝ, P. Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radical degradation of mannans and glucans. **Carbohydrate Polymers**. V. 112, p. 603–607, 2014b.

MAITY, P.; SEN, I. K.; MAJI, P. K.; PALOI, S.; DEVI, K. S. P.; ACHARYA, K.; MAITI, T. K.; ISLAM, S. S. Structural, immunological, and antioxidant studies of  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. **Carbohydrate Polymers**. V. 123, p. 350–358, 2015.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 82, p. 182-191, 2016.

MENG, M.; CHENG, D.; HAN, L.; CHEN, Y.; WANG, C. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting body. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1134–1143, 2017.

MITTAL, N. & MATTU, P. & KAUR, G. Extraction and derivatization of *Leucaena leucocephala* (Lam.) galactomannan: Optimization and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 92, p. 831–841, 2016.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; COOKE, P.; WOOD, D.; GUEDES, M. I. F. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. **Micron**, v. 42, p. 419-428, 2011.

NANDI, A. K.; SAMANTA, S.; MAITY, S.; SEN, I. K.; KHATUA, S.; DEVI, K. S. P.; ACHARYA, K.; MAITI, T. K.; ISLAM, S. S. Antioxidant and immunostimulant  $\beta$ -glucan

from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate Polymers**. V. 99, p. 774–782, 2014.

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

OLIVEIRA, K. S. M.; DI BASTIANI, M.; CORDEIRO, L. M. C.; COSTA, M. F.; TOLEDO, K. A.; IACOMINI, M.; BABOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; NASCIMENTO, V. M. G. (1→6)- and (1→3)(1→6)- $\beta$ -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 539–546, 2015.

PAOLINELLI-ALFONSO, M.; GALINDO-SÁNCHEZ, C. E.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R. Quantitative real-time PCR normalization for gene expression studies in the plant pathogenic fungi *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 127, p. 82-88, 2016.

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

RANI, D., AHUJA, M. Carboxymethylation of *Lepidium sativum* polyuronide, its characterization and evaluation as a nanometric carrier. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 99, p. 233-240. 2017.

SCHNEIDER, C. D. & OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, V. 10, Nº 4, 2004

SHARMA, R., RANA, V. Effect of carboxymethylation on rheological and drug release characteristics of *Terminalia catappa* gum. **Carbohydrate Polymers**. V. 175, p. 728-738. 2017.

SHENG, J. & SUN, Y. Antioxidant properties of different molecular weight polysaccharides from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. **Carbohydrate Polymers**. V. 108, p. 41–45, 2014.

SHI, M.; WEI, X.; XU, J.; CHEN, BI.; ZHAO, D.; CUI, S.; ZHOU, T. Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: Preparation and *in vitro* antioxidant activity. **Food Chemistry**. V. 215, p. 76–83 2017.

SULTAN, S.; SUN, L.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G.; RAMASAMY, K.; WEBER, J. F. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. 3: further lasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophyte from *Mapania kurzii*. *Tetrahedron Letters*, v. 55, p. 453–455, 2014.

TANG, Q., HUANG, G., ZHAO, F., ZHOU, L., HUANG, S., LI, H. The antioxidant activities of six (1→3)- $\beta$ -D-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p.216-221, 2017.

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

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

TÚRMINA, J. A.; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A., DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M., SANTO, F. S., SILVA, L. A. MALFATTI, C. R. M. Toxicological Assessment of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, p. 14298-14309, 2012.

VASCONCELOS A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; SILVA, M. L. C. Three exopolysaccharides of the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan type and a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; SILVA, M. L. C. Sulfonation and Anticoagulant Activity of Fungal Exocellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucan (Lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

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

XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 227-234, 2009.

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

YANG, L.; ZHAO, T.; WEI, H.; ZHANG, M.; ZOU, Y.; MAO, G.; WU, X. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1124– 1130, 2011.

YOSHIHARA, T.; OHMORI, F.; NAKAMORI, K.; AMANUMA, M.; TSUTSUMI, T.; ICHIHARA, A.; MATSUURA, H. Induction of Plant Tubers and Flower Buds under Noninducing Photoperiod Conditions by a Natural Product, Theobroxide. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.19, p. 457–461, 2000.

WANG, Y., YU, Y., MAO, J. Carboxymethylated  $\beta$ -glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10913-10915, 2009.



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

WANG, J. L., GUO, H. Y., ZHANG, J., WANG, X. F., ZHAO, B. T., YAO, J. Sulfated modification, characterization and structure–antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 897–905, 2010.

WANG, J.; MA, Z.; ZHANG, L.; FANG, Y.; JIANG, F.; PHILLIPS, G. O. Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**. V. 86, p. 844– 851, 2011.

WANG, Y.; MO, Q.; LI, Z.; LAI, H.; LOU, J.; LIU, S.; MAO, J. Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1052-1056, 2012.

WANG, J.; WANG, Y.; LIU, X.; YUAN, Y.; YUE, T. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 33-38, 2013.

WANG, X.; ZHANG, Z.; ZHAO, M. Carboxymethylation of polysaccharides from *Tremella fuciformis* for antioxidant and moisture-preserving activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 72, p. 526–530, 2015.

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

WANG, Z.; XIE, J.; SHEN, M.; TANG, W.; WANG, H.; NIE, S.; XIE, M. Carboxymethylation of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* and their characterization and antioxidant properties evaluation. **Carbohydrate Polymers**. V. 136, p. 988–994, 2016b.

WIATER, A., PADUCH, R., CHOMA, A., PLESZCZYNSKA, M.; SIWULSKI, M.; DOMINIK, J.; JANUSZ, G.; TOMCZYK, M. SZCZODRAK, J. Biological study on carboxymethylated (1→3)- $\alpha$ -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1014-1023, 2012.

WU, Y.; YE, M.; DU, Z.; JING, L.; SURAHIO, M.; YANG, L. Carboxymethylation of an exopolysaccharide from *Lachnum* and effect of its derivatives on experimental chronic renal failure. **Carbohydrate Polymers**. V. 114, p. 190–195, 2014.

ZHANG, L. & ZHANG, M. & CHEN, J. Solution properties of antitumor carboxymethylated derivatives of  $\alpha$ -(1→3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. **Chinese Journal of Polymer Science**. V. 19, p. 283-289, 2001.

ZHENG, P.; FAN, W.; WANG, S.; HAO, P.; WANG, Y.; WAN, H.; HAO, Z.; LIU, J.; ZHAO, X. Characterization of polysaccharides extracted from *Platycodon grandiflorus* (*Jacq.*) A.DC. affecting activation of chicken peritoneal macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 96, p. 775–785, 2017.