



## Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano da lasiodiplodana sulfonada ( $\beta$ -1,6-D-Glucana)

### RESUMO

**Gabrielle Cristina Calegari**  
[gabrieleccalegari@gmail.com](mailto:gabrieleccalegari@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Mário Antônio Alves da Cunha**  
[mcunha@utfpr.edu.br](mailto:mcunha@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Vidiany Aparecida Queiroz Santos**  
[vidianyqueiroz@yahoo.com.br](mailto:vidianyqueiroz@yahoo.com.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Robert F.H Dekker**  
[xylanase@me.com](mailto:xylanase@me.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**OBJETIVO:** As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos encontrados na parede celular de alguns microrganismos e cereais e também podem ser produzidas extracelularmente por determinados fungos filamentosos. Estas macromoléculas podem apresentar propriedades biológicas, como atividade anticoagulante, antioxidante, anticarcinogênica, hipocolesterolêmica, além de auxiliarem na redução de riscos cardiovasculares e diabetes. Tais propriedades podem ser potencializadas a partir de modificações químicas na molécula, incluindo a derivatização por sulfonação, onde grupos sulfonatos são inseridos na estrutura. No presente trabalho a (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana (lasiodiplodana) produzida pelo fungo *L. theobromae* MMPI foi derivatizada por sulfonação e o derivado obtido foi caracterizado quanto ao potencial antioxidante e antimicrobiano. O protocolo de sulfonação empregado levou a obtenção de um derivado sulfonado com baixo grau de substituição (DS: 0,24). A sulfonação contribuiu para a potencialização da atividade antioxidante, sendo verificada aumento da capacidade de remoção de peróxido de hidrogênio do meio e do potencial redutor. Lasiodiplodana sulfonada apresentou atividade bacteriostática em concentrações acima de 325  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *S. aureus*. Estudos posteriores são importantes para obtenção de derivados com maior grau de sulfonação, os quais possivelmente apresentarão maior atividade antioxidante, habilidade antimicrobiana, além de outras funcionalidades biológicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade biológica. Derivatização química. Exopolissacarídeo. Sulfonação.

## INTRODUÇÃO

O interesse comercial em polissacarídeos vem crescendo consideravelmente e inúmeros estudos relativos a investigação de suas propriedades tem sido verificada na literatura científica. Dentre os polissacarídeos que apresentam funções biológicas destacam-se as  $\beta$ -glucanas, que apresentam diversas atividades como potencial anticoagulante, antioxidante e anticarcinogênico. Além de auxiliarem no tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes e dislipidemias (WENG et al., 2011; KAGIMURA et al., 2015). As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos encontrados na parede celular de alguns microrganismos e cereais e também podem ser produzidas extracelularmente por determinados fungos filamentosos (KAGIMURA et al., 2015).

Diferentes parâmetros físico-químicos podem influenciar as atividades biológicas que as  $\beta$ -glucanas podem apresentar. Afim de potencializar tais atividades biológicas, modificações químicas na estrutura primária destas macromoléculas vêm sendo estudadas. Dentre as modificações descritas até o momento, há a sulfonação, onde grupos sulfonatos ( $S^+O_2OH$ ) são inseridos na estrutura da biomolécula e atuam como uma ferramenta para aperfeiçoar ou introduzir algumas propriedades biológicas (KAGIMURA et al., 2015).

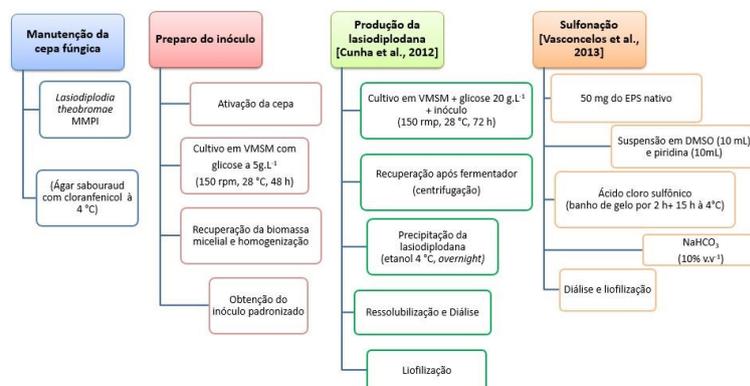
Neste contexto, este trabalho apresenta como objetivo a derivatização química por sulfonação da lasiodiplodana ((1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana), bem como sua e avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana (MIC) do derivado.

## METODOLOGIA

### 1. PRODUÇÃO E DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA POR SULFONAÇÃO.

O fluxograma a seguir apresenta as etapas experimentais realizadas desde a conservação do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, passando pelo preparo do inóculo, produção por cultivo submerso em *shaker* de bancada da glucana até derivatização química por sulfonação.

Figura 1 – Fluxograma da metodologia adotada para cultivo da cepa fúngica, preparo do inóculo, bioprocesso e recuperação do EPS e sulfonação (CUNHA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2013).



Fonte: Autoria própria

### 2. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFONAÇÃO.

A determinação do grau de substituição seguiu o protocolo adotado por Vasconcelos et al. (2013), no qual utiliza o método cloreto de bário-gelatina.

### 3. POTENCIAL ANTIOXIDANTE.

Para avaliação da capacidade antioxidante da biomolécula foram empregadas as metodologias baseadas na habilidade de remoção do radical  $H_2O_2$  e poder redutor, ambas baseadas no protocolo seguido por Liu et al. (2010), utilizando como agente diluente dimetilsulfóxido (DMSO) 20%. Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante foram expressos como médias, as quais foram comparadas entre si pelo teste de Tukey.

### 4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (MIC).

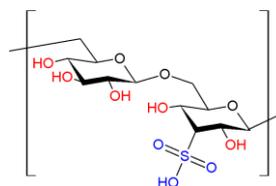
Os ensaios de atividade antimicrobiana foram conduzidos conforme protocolo descrito por KRICHEN et al. (2015), utilizando como agente diluente DMSO 20%. As concentrações de amostra de lasiodiplodana nativa ou derivatizada utilizadas nas análises foram de 825, 725, 625, 525, 425, 325, 225, 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Neste estudo, foram testadas quatro linhagens bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Salmonella typhimurium* ATCC 0028; *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Bacillus subtilis*) e duas leveduras (*Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida albicans* ATCC 118804).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFONAÇÃO (DS).

A lasiodiplodana derivatizada (figura 2) neste trabalho apresentou DS igual a 0,24, ou seja, existem 0,24 sítios substituídos a cada molécula de glicose, em um total de três sítios de substituição, apresentando dessa forma uma eficiência de 8% da derivatização. Possivelmente o uso de condições reacionais mais drásticas seja necessária para obtenção de derivados com maior grau de sulfonação. Maiores tempos reacionais ou maiores concentrações de agente derivatizante no processo de derivatização possa contribuir para maior eficiência do processo. No entanto, é importante salientar que tal reação é bastante intensa e precisa de bastante controle, de forma a evitar uma possível hidrólise e degradação na macromolécula nativa.

Figura 2 – Representação da lasiodiplodana derivatizada por sulfonação.



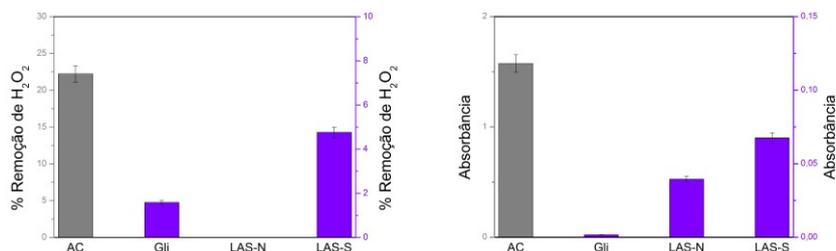
Fonte: Autoria própria

### 2. POTENCIAL ANTIOXIDANTE

#### HABILIDADE DE REMOÇÃO DO RADICAL $H_2O_2$ E PODER REDUTOR.

O perfil de remoção do peróxido de hidrogênio e poder redutor referente às amostras de lasiodiplodana nativa (LAS-N), lasiodiplodana sulfonada (LAS-S), glicose (Gli) e ácido ascórbico (AC) estão apresentados na figura 3.

Figura 3 – A esquerda: potencial de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a direita: potencial de poder redutor. Ácido ascórbico (AC), glicose (Gli), lasiodiplodana nativa (LAS-N) e sulfonada (LAS-S).



Fonte: Autoria própria

O monômero glicose apresentou uma baixa capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio (1,58%), já a macromolécula lasiodiplodana nativa não demonstrou efetividade em sua remoção nas condições do ensaio. Por outro lado, após sulfonação a lasiodiplodana foi capaz de remover 4,8% do peróxido de hidrogênio, embora tal potencial ainda seja inferior ao verificado com o antioxidante padrão ácido ascórbico (22%).

Como pode ser observado, o monômero glicose não demonstrou potencial redutor sobre o íon férrico, diferentemente das amostras de LAS-N e LAS-S. Entretanto, houve apenas uma pequena diferença ( $p < 0,05$ ) entre o potencial redutor da amostra nativa e sulfonada. Possivelmente, é necessário um ajuste no grau de sulfonação da macromolécula, para o incremento do poder redutor.

### 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (MIC).

Na tabela 1 são apresentados os resultados referentes ao potencial antimicrobiano das  $\beta$ -glucanas sulfonada.

Tabela 1 – Potencial antimicrobiano da lasiodiplodana sulfonada

Microrganismos	Inibição		Bascterioestática/ Fungistática		Bactericida/Fungi cida	
	LAS-N	LAS-S	LAS-N	LAS-S	LAS-N	LAS-S
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	R	> 325 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	R	> 325 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R
<i>Salmonella typhimurium</i> (-)	$\geq 525$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	R	$\geq 525$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R	R
<i>Escherichia coli</i> (-)	R	R	R	R	R	R
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	R	R	R	R	R	R
<i>Candida tropicalis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Candida albicans</i>	R	R	R	R	R	R

R: resistência; I: Inibição; (+) gram positiva; (-) gram negativa

Fonte: Autoria própria

A lasiodiplodana modificada por sulfonação (DS 0,24), apresentou atividade inibitória (bacterioestática) nas concentrações acima de 325  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *S.*

*aureus*. Além disso, LAS-N apresentou atividade bacterostática frente a *S. typhimurium* em concentrações superiores ou iguais a  $525 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Possivelmente a concentração da amostra tem influência sobre as atividades antimicrobianas, e neste sentido concentrações superiores poderiam demonstrar maior capacidade inibitória. Entretanto, a baixa solubilidade das amostras dificulta tal estudo.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que a modificação química da lasiodiplodana por sulfonação, possivelmente é uma ferramenta que pode contribuir para melhorias nas propriedades biológicas da macromolécula e potenciais aplicações industriais. Estudos posteriores são necessários para a otimização das condições reacionais que levem a obtenção de derivados com maior grau de substituição, bem como estudos biológicos mais específicos para avaliar as potenciais funcionalidades biológicas destes derivados.

## Evaluation of the antioxidante and antimicrobial potential of sulfonated lasiodiplodana ( $\beta$ -1,6-D-Glucan)

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** As  $\beta$ -glucans are polysaccharides found in the cell wall of some microorganisms and cereals and can also be produced extracellularly by certain filamentous fungi. These macromolecules may have biological properties, such as anticoagulant activity, antioxidant, anticarcinogenic, hypocholesterolemic, reduction of cardiovascular risks and diabetes. Such properties may be potentiated from chemical modifications in the molecule, including sulphonation derivatization, where sulfonate groups are inserted into the structure. In the present work the (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan (lasiodiplodana) produced by the fungus *L. theobromae* MMPI was derivatized by sulfonation and the derivative obtained was characterized as to the antioxidant and antimicrobial potential. The sulphonation protocol employed led to the production of a sulfonated derivative with a low degree of substitution (DS: 0.24). The sulfonation contributed to the potentialization of the antioxidant activity, being verified an increase of the hydrogen peroxide removal capacity of the medium and the reducing potential. Lasiodiplodana sulfonated presented bacteriostatic activity in concentrations above 325  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  against *S. aureus*. Subsequent studies are important to obtain derivatives with a higher degree of sulfonation, which may present higher antioxidant activity, antimicrobial ability, and other biological functionalities.

**KEYWORDS:** Biological activitie; Derivatization. Glucan. Sulfonation.

## REFERÊNCIAS

CUNHA, M. A. A. da; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; BARBOSA, A.M. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- $\beta$ -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.

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

KRICHEN F.; KAROUD, W.; SILA, A.; ABDELMALEK, B. E.; GHORBEL, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; BOUGATEF, A. Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 283-289, 2015.

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, 2010.

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→6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

WENG, B. B. C.; LIN, Y. C.; HU, C-W.; KAO, M-Y.; WANG, S-H.; LO, D-Y.; LAI, T-Y., KAN, L-S.; CHIOU, R. Y-Y. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran ( $\beta$ -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 910–916, 2011.

**Recebido:** 31 ago. 2017.

**Aprovado:** 02 out. 2017.

**Como citar:**

CALEGARI, G. C. et al. Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano da lasiodiplodana sulfonada ( $\beta$ -1,6-D-Glucana). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: 07 out. 2017.

**Correspondência:**

Gabrielle Cristina Calegari

Via do Conhecimento, Km 01, s/n – Departamento de Química, Bairro Fraron, Pato Branco, Paraná, Brasil.

**Direito autoral:**

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

