



Universidade Estadual Paulista - UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Campus de São José do Rio Preto

Jéssica Moreli Ferreira

Oligossacarídeos obtidos por hidrólise química de
polissacarídeos fúngicos: purificação e atividade
anticoagulante.

São José do Rio Preto

2017

Jéssica Moreli Ferreira

Oligossacarídeos obtidos por hidrólise química de polissacarídeos fúngicos: purificação e atividade anticoagulante.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos

São José do Rio Preto

2017

Ferreira, Jéssica Moreli.

Oligossacarídeos obtidos por hidrólise química de polissacarídeos fúngicos: purificação e atividade anticoagulante/
Jéssica Moreli Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2017
99 f.: il., tabs.

Orientador: Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva

Coorientador: Ana Flora Dalberto Vasconcelos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioquímica. 2. Polissacarídeos fúngicos. 3. Oligossacarídeos. 4. Glucanas. 5. Hidrólise. 6. Cromatografia em gel. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU - 577.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Moreli Ferreira

Oligossacarídeos obtidos por hidrólise química de polissacarídeos fúngicos: purificação e atividade anticoagulante.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva

FCT/UNESP- Presidente Prudente
Orientadora

Prof^a Dra Maria Antonia Pedrini Colabone Celligoi.

Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Valdemiro Pereira Carvalho Junior

FCT/UNESP - Presidente Prudente

São José do Rio Preto

03 de março de 2017

Para meus pais, Maria Inês e Eliezer, que sempre fizeram de tudo para que eu concluísse esse sonho.

E ao meu noivo, Bruno, por todo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter despertado em mim esse sonho, e por todo o cuidado que teve comigo durante esses dois anos.

Aos meus amados pais, Maria Inês e Eliezer, que nunca mediram esforços para que eu concluísse essa etapa, por todo amor, carinho, apoio e dedicação.

Ao meu noivo, Bruno, por toda compreensão, carinho, conselhos, e principalmente paciência comigo, sempre disposto a ouvir um desabafo, me dando forças para seguir em frente. Eu te amo imensamente.

Ao meu irmão Juninho, por todo apoio, todas as idas e vindas da rodoviária, conselhos e afins, muito obrigada.

Aos meus queridos avós, Mário e Maria (maternos) e Francisco e Florinda (paternos), por todas as orações, apoio e carinho.

Às minhas queridas professoras Maria de Lourdes e Ana Flora, por terem me acolhido, orientado, confiado que eu seria capaz de desenvolver esse trabalho, por todos os ensinamentos, conselhos, puxões de orelha, sempre construtivos, pela amizade e carinho. Pessoas admiráveis, que sempre serão espelho para mim. Muito obrigada.

À minha querida amiga Samara, pela parceria inestimável, todo apoio, ensinamentos, amizade e carinho em casa e no laboratório. Sem você Sá eu não teria conseguido, uma pessoa iluminada por Deus, que tornou meus dias muito mais leves e animados. Muito obrigada.

À minha amiga Nagyla, por todo apoio, conselhos e risadas, que assim como a Samara, me acolheu em sua casa com tanto carinho, muito obrigada por tudo o que fez por mim.

À minha amiga Angélica por todo carinho, apoio e companheirismo durante esses anos. Uma pessoa alegre, sempre com uma palavra amiga e um sorriso para oferecer.

Aos meus amigos de luta Fernanda, Airton, André Lucas e Edy pelo companheirismo durante todo o tempo em que estive em Presidente Prudente, desde a graduação até o mestrado, sempre dispostos a ajudar, sempre aconselhando,

apoiando, um dando forças ao outro. Vocês são anjos que Deus colocou na minha vida, com alegria contagiante, que tornaram meus dias muito mais felizes.

À dona Margarida, por todo o carinho, ajuda, conselhos e amizade.

Aos técnicos Sidnei, Gabriel, e principalmente Murillo, pela disponibilidade, sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof^o Dr. Homero Marques Gomes pela disponibilidade, ajuda e ensinamentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química por todos os ensinamentos para a minha formação.

Ao Programa de Pós Graduação em Química.

Às secretárias do departamento Fernanda e Juvanir, sempre dispostas a ajudar.

À todos que de uma maneira direta ou indireta ajudaram para que esse trabalho fosse concluído e para meu crescimento pessoal e profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

No mesmo instante em que recebemos pedras
em nosso caminho, flores estão sendo
plantadas mais longe. Quem desiste não as vê.

Willian Shakespeare

RESUMO

Polissacarídeos e oligossacarídeos de plantas, algas, bactérias e fungos representam um grupo de moléculas com potencial para aplicação em terapia medicamentosa e em biotecnologia. Os oligossacarídeos podem ser obtidos, a partir dos respectivos polissacarídeos, por degradação química, física ou bioquímica. β -glucanas secretadas pelo fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* (EPSgraviola, EPSlaranja e EPSmanga), cujas soluções apresentam elevado grau de viscosidade, dificultando os testes de atividade biológica, foram hidrolisadas parcialmente com TFA 0,2 M, 100 °C, em tempos variáveis, para a obtenção dos respectivos oligossacarídeos, que foram analisados por cromatografia líquida de íons. O EPSmanga mostrou-se, nas condições estudadas, o substrato ideal para a produção de oligossacarídeos, especialmente aos 45 minutos de hidrólise. As frações solúveis, contendo o material hidrolisado, foram submetidas, inicialmente, à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15, que forneceu dois picos, um composto predominantemente por mono e dissacarídeos e outro contendo oligossacarídeos maiores, de onde foi separada a Fração I, a qual foi submetida à cromatografia de adsorção em carvão-Celite, utilizando um gradiente descontínuo de etanol-água 0 a 60% (v/v). A fração etanol-água a 50%, denominada Fração II, contendo a maior proporção de oligossacarídeos com maior DP foi submetida a uma segunda condição de eluição, utilizando um gradiente contínuo de etanol-água 42-49%, gerando frações ainda compostas por mais de um oligossacarídeo. A Fração II contendo oligossacarídeos com DP > 5 foi sulfatada, e os oligossacarídeos com DS de 0,80 foram submetidos à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15, para remoção de sal. Após análises por FT-IR para acompanhar o aparecimento de novas bandas, provenientes dos grupos sulfatos, os oligossacarídeos derivatizados foram utilizados em testes de atividade anticoagulante. O aumento do tempo para a formação do coágulo, nos testes do aPTT e TT, foram concentração-dependente, indicando que os oligossacarídeos sulfatados apresentam ação anticoagulante.

Palavras Chaves: β -glucanas fúngicas, hidrólise ácida parcial, HPAEC/PAD, cromatografia, oligossacarídeos sulfatados, atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Polysaccharides and oligosaccharides of plants, algae, bacteria and fungi represent a group of molecules that have potential to application in drug therapy and in biotechnology. The oligosaccharides can be obtained, from their respective polysaccharides, by chemical, physical or biochemical degradation. β -glucans secreted by the fungus Lasiodiplodia theobromae (EPSgraviola, EPSorange e EPSmango), whose solutions have high viscosity, what makes the tests of biological activity difficult, were partially hydrolyzed with TFA 0,2 M, 100 °C, in variable times, in order to obtain their respective oligosaccharides, that were analyzed by liquid chromatography of ions. The EPSmango was, in the studied conditions, the ideal substrate to the production of oligosaccharides, especially at 45 minutes of hydrolysis. The soluble fractions, that contain the hydrolyzed material, were initially submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G-15, that provided two peaks, one peak with mono and disaccharides and the other one containing bigger oligosaccharides, named Fraction I. That fraction I was submitted to charcoal-Celite adsorption chromatography using a discontinuous gradient ethanol-water 0 to 60% (v/v). The fraction containing oligosaccharides with higher DP (ethanol-water 50%) was named Fraction II, that was submitted to charcoal-Celite adsorption chromatography using a continuous gradient ethanol-water 42-49%, generating fractions still composed of a mixture of oligosaccharides. So, the Fraction II was sulfated, and the produced oligosaccharides with DS = 0,80 were submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G-15, in order to remove the salt. After FT-IR analysis, to accompany the appearance of new bands from the sulfate groups, the oligosaccharides were used in anticoagulant activity tests. The increases of time to clot formation, in the aPTT and TT tests, were concentration-dependent, indicating that the sulfated oligosaccharides have anticoagulant action.

Keywords: *fungal β -glucans, partial acid hydrolysis, HPAEC/PAD, chromatography, sulfated oligosaccharides, anticoagulant activity.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmula estrutural das glucanas β -(1→6) isoladas dos cogumelos <i>Agaricus bisporus</i> e <i>Agaricus brasiliensis</i>	24
Figura 2: Mecanismo geral de hidrólise ácida de polissacarídeos proposto por Edward (1955).....	31
Figura 3: Oligossacarídeo purificado obtido pelo fungo ascomiceto <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05.....	33
Figura 4: Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . (a) em placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel, 5 dias de crescimento, (b) proliferação em folhas, 45 dias após a inoculação. ...	37
Figura 5: EPS liofilizados. a) EPSmanga, b) EPSgraviola e c) EPSlaranja.	42
Figura 6: Coluna de gel Sephadex G-15 usada na Cromatografia de filtração em gel.....	45
Figura 7: Primeira coluna Teste usada para Cromatografia de carvão-Celite.....	47
Figura 8: Sistema utilizado para Cromatografia de adsorção em carvão-Celite com gradiente da concentração de etanol. (1) erlenmeyer contendo etanol 49% e (2) erlenmeyer contendo etanol 42%.....	48
Figura 9: Coluna de gel Sephadex G-15 usada na Cromatografia de filtração em gel para "desalting".....	51
Figura 10: Fluxograma das etapas de obtenção e purificação dos oligossacarídeos do EPSmanga.....	56
Figura 11: Fluxograma do procedimento de sulfatação.....	57

Figura 12: Rendimento de material hidrolisado a partir dos respectivos EPS, nos diferentes tempos de hidrólise. 61

Figura 13: Análise por HPAEC/PAD da mistura de padrões de glucose (1), gentiobiose (2), laminaribiose (3) e laminaritriose (4) com RT (min) de 4,60, 7,62, 8,80 e 12,38, respectivamente. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. 63

Figura 14: Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado proveniente do EPSgraviola (TFA 0,2 M, 100 °C), nos diferentes tempos, indicados na figura. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenção dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicada: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada. 64

Figura 15: Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado proveniente do EPSlaranja (TFA 0,2 M, 100 °C), nos diferentes tempos, indicados na figura. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenção dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada. 65

Figura 16: Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado proveniente do EPSmanga (TFA 0,2 M, 100 °C), nos diferentes tempos, indicados na figura. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenção dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada. 66

Figura 17: Cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 do hidrolisado ácido parcial (TFA 0,2 M, 100 °C, 45 minutos) do EPSmanga. Fluxo: 0,45 mL/min., frações coletadas: 2 mL/tubo, eluente: água destilada, material aplicado: 10 mg do hidrolisado, volume da coluna: 72 mL. 70

Figura 18: Análise por HPAEC/PAD das frações constituintes dos Picos I e II, provenientes da Cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenções dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada. 71

Figura 19: Fração I referente aos tubos 10 e 11 eluídos da cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15. Coluna CarboPac PA1. Condição de análise: gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Quantidade de material aplicado: 1,3 µg de 25 µL de H₂O deionizada. 72

Figura 20: Primeira Coluna teste da Cromatografia de adsorção em carvão-Celite da Fração I. Fase móvel: gradiente etanol-água de 40, 50 e 60%. Fluxo: 0,1 mL/min (23 °C), Fração: 5 mL/tubo. Volume da coluna: 138 mL. 74

Figura 21: Análise por HPAEC/PAD das frações obtidas na primeira coluna teste da cromatografia de carvão-Celite. Coluna CarboPac PA1. Condição de análise: gradiente contínuo de 0 a 100% de 500 mM de acetato de sódio em NaOH 100 mM, 55 minutos. Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada. 75

Figura 22: Cromatografia de adsorção em carvão-Celite da Fração II utilizando um gradiente contínuo etanol-água de 42-49%. Fluxo: 0,08 mL/min (23 °C) Volume das frações: 2,4 mL/tubo. Volume da coluna: 78 mL. 76

Figura 23: Análise por HPAEC/PAD das frações obtidas na cromatografia de carvão-Celite da Fração II utilizando um gradiente contínuo etanol-água de 42-49%. Coluna CarboPac PA1. Eluição: gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.. 77

Figura 24: Cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 para “desalting” da Fração II sulfatada. Volume da coluna: 170 mL. fluxo: 0,55 mL/min., volume das frações: 3 mL/tubo, eluente: água destilada, quantidade material aplicado: 6 mg. 80

Figura 25: Espectros do material (Fração II), antes e após procedimento de sulfatação, no FT-IR (região de 4000 a 400 cm⁻¹). 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações das amostras e do padrão para os ensaios da atividade anticoagulante TT,PT e aPTT..... 54

Tabela 2: Quantificação de açúcares totais dos sobrenadantes etanólicos, após hidrólise ácida parcial dos EPS produzidos pelo *L. theobromae* retirado dos frutos graviola, laranja e manga. Amostras de 1 mg foram hidrolisadas em diferentes tempos (minutos) com TFA 0,2 M à 100 °C. 61

Tabela 3: Atividade anticoagulante de plasma normal humano na presença da Fração II, da Fração II sulfatada e heparina em diferentes concentrações, determinada pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (PT). Os resultados representam média e desvio padrão..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPTT	-Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
DMSO	-Dimetil sulfóxido
DP	-Grau de polimerização
DS	-Grau de sulfatação
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador de Fourier
HILIC	-Cromatografia líquida com interação hidrofílica
HPAEC/PAD	-Cromatografia líquida de íons a alta pressão com detecção amperométrica pulsada
HPLC	-Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ O _d	-Água deionizada
IL 10	-Interleucina 10
NF	-Nanofiltração
Rpm	-Rotações por minuto
RT	-Tempo de retenção
PT	-Tempo de Protrombina

TCA	- Ácido tricloroacético
TFA	-Ácido trifluoroacético
TT	- Tempo de Trombina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 POLISSACARÍDEOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	20
2.2 EXOPOLISSACARÍDEOS	22
2.3 β -GLUCANAS	23
2.4 SULFATAÇÃO COMO PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA.....	26
2.5 OLIGOSSACARÍDEOS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO	28
2.6 FONTES BIOLÓGICAS DE OLIGOSSACARÍDEOS	35
2.7 ASCOMICETO <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVOS GERAIS	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAIS	40
4.1.1 Equipamentos.....	40
4.1.2 Micro-organismos.....	41
4.1.3 Reagentes.....	41
4.2 MÉTODOS GERAIS	42
4.2.1 Condições de cultivo para a produção dos exopolissacarídeos (EPS).....	42
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	42
4.3.1 Quantificação de açúcares totais – Método de fenol-ácido sulfúrico	42
4.4. CURVA DE HIDRÓLISE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS	43
4.5 MÉTODOS CROMATOGRAFICOS PARA PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL	44
4.5.1 Cromatografia de Filtração em Gel – Coluna de Sephadex G-15.	44
4.5.2 Cromatografia de adsorção – Coluna de Carvão-Celite.....	46
4.6 ANÁLISES DAS FRAÇÕES OLIGOSSACARÍDICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ÍONS (HPAEC- HIGH PERFORMANCE ANIONIC EXCHANGE CHROMATOGRAPHY).....	49
4.7 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA POR SULFATAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-15 E CROMATOGRAFIA DE CARVÃO-CELITE.	50

4.7.1 Cromatografia de filtração em gel para “desalting” – Gel Sephadex G-15.....	50
4.7.2 Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador de Fourier (FT-IR)	52
4.7.3 Determinação do grau de substituição (D.S.)	52
4.8 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>in vitro</i>	53
4.8.1 Teste de protrombina (PT)	54
4.8.2 Teste de tromboplastina parcial ativada (aPTT)	54
4.8.3 Teste de trombina (TT)	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 CURVA DE HIDRÓLISE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS	58
5.2 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL – COLUNA DE SEPHADEX G-15	68
5.3 CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO – COLUNA DE CARVÃO-CELITE.....	73
5.4 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO II POR SULFATAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	79
6 CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido voltada aos polissacarídeos, principalmente no campo da bioquímica e farmacologia devido às suas inúmeras aplicações. Considerando as diferentes funções dos polissacarídeos no sistema biológico é esperado que as suas estruturas químicas sejam distintas e isso se confirma pelo tipo e sequência de monossacarídeos, posição da ligação glicosídica, configuração e conformação de suas unidades monoméricas.

Algumas dessas moléculas apresentam limitação para a aplicação em testes de atividade biológica, devido à alta viscosidade de suas soluções, como as β -glucanas que, não raro, necessitam de modificações químicas, seja por despolimerização (hidrólise química, bioquímica ou física) ou por derivatização (sulfatação, carboximetilação, fosfatação), para apresentarem ação farmacológica, sendo convertidas a moléculas menores (oligossacarídeos) e mais solúveis (ZEKOVIĆ, KWIATKOWSKI, 2005).

Estudos revelam que oligossacarídeos constituídos de seis ou mais unidades monoméricas têm a ação biológica potencializada em relação à molécula nativa devido à maior solubilidade, relacionada com uma menor massa molecular, mas que ainda assim preserva a conformação original (BLAND, KESHAVARZ, BUCKE, 2004; GIESE et al.; 2011).

Estabelecidos os parâmetros ideais para a produção de oligossacarídeos ($DP \geq 6$) a partir dos respectivos polissacarídeos, a purificação e separação das moléculas com as características desejadas é efetuada através de procedimentos cromatográficos, utilizando colunas com carvão ativado, resinas de troca iônica ou Bio-géis (ZHOU et al.; 2011).

Alguns oligossacarídeos têm apresentado ação imunomoduladora e antitumoral (JIAO et al., 2014). Gluco-oligossacarídeos bioativos provenientes de glucanas β -(1 \rightarrow 3) têm sido reportados na literatura como agentes imunomoduladores e promotores de respostas anti-inflamatórias, através da mediação de células do sistema imune, por meio da indução de mediadores pró- e anti-inflamatórios. O mecanismo de ação antitumoral, por sua vez, vem sendo associado à ativação de células "*natural killer*" induzindo às respostas imunológicas (BARBOSA, DEKKER, GIESE, 2010; PANG et al., 2005). Outros oligossacarídeos quimicamente modificados por inserção de grupos sulfato têm sido

estudados, comparando a atividade anticoagulante com o grau de sulfatação (DU et al.; 2016).

Com o advento da crescente busca pela funcionalização de polissacarídeos e diante da disponibilidade das β -glucanas, isoladas a partir de cultivos efetuados por Vasconcelos e colaboradores (2008), o presente trabalho investiga a obtenção de oligômeros com diferentes graus de polimerização a partir da hidrólise ácida parcial dos respectivos polissacarídeos, bem como a purificação por métodos cromatográficos, para a obtenção de moléculas biologicamente ativas, após derivatização por sulfatação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLISSACARÍDEOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Polissacarídeos são biopolímeros constituídos por longas cadeias formadas a partir de unidades monossacarídicas como, por exemplo, glucose, galactose, manose, arabinose, entre outras, unidas por ligações glicosídicas, podendo assumir desde estruturas lineares até altamente ramificadas dependendo da ocorrência de cadeias laterais. Os carboidratos possuem a fórmula geral $(CH_2O)_n$; no caso dos polissacarídeos também podem ser representados por $(C_6H_{10}O_5)_n$, desde que as unidades monossacarídicas repetitivas sejam de seis carbonos, onde n é um número entre 40 e 3000. Os polissacarídeos não possuem massas moleculares totalmente definidas porque para a síntese dos mesmos não existe um molde, à exemplo das proteínas. O mecanismo de síntese dos polissacarídeos é intrínseco às enzimas que catalisam a polimerização das unidades monoméricas, não havendo, para esse processo, um sinal específico de término da cadeia, o que gera produtos de tamanhos variados (NELSON, COX, 2014; WU, et al., 2016b; ZONG, CAO, WANG, 2012).

A função biológica dos polissacarídeos nos organismos vivos – amido nas plantas e glicogênio para fungos e animais - está associada aos processos metabólicos geradores de energia. Polissacarídeos como celulose, quitina e peptidoglicanas, entre outros, apresentam função estrutural, formando paredes celulares de vegetais, fungos e da maioria das bactérias e componentes de exoesqueletos de animais (NELSON, COX, 2014).

As estruturas polissacarídicas diferem, entre si, de acordo com a composição e sequência monossacarídica, posição e configuração (α e/ou β) da ligação glicosídica, e conformação de suas unidades monoméricas, podendo ser homo- ou heteropolissacarídeos. Diferentes atividades biológicas têm sido relacionadas com características químicas especiais assim, esse grupo de biomoléculas tem se tornado alvo de muitas investigações científicas (VASCONCELOS et al., 2009; XIE et al., 2016). Estudos recentes apontam para a aplicação dos polissacarídeos na área médica, atuando como moduladores do sistema imunológico (GILL et al., 2016), antioxidantes (QU et al., 2016), anticoagulantes (CAI et al, 2016), antivirais (PUJOL et al., 2012), antitumorais (ZHENG et

al., 2016), antidiabetes (WANG et al., 2016), dentre outros. Entretanto, a maneira como esses polissacarídeos são extraídos de suas fontes naturais deve ser feita com muita cautela, a fim de não alterar suas características químicas originais e, portanto, preservar os princípios bioativos dessas moléculas (LIU, WILLFÖR, XU, 2015).

Há muitos relatos na literatura sobre propriedades químicas e atividade biológica de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação e da biomassa de micro-organismos (LEUNG et al., 2009). Nesse caso, os procedimentos de extração e de purificação seguem um protocolo complexo, uma vez que além dos polissacarídeos as demais moléculas biológicas, proteínas e ácidos nucleicos, são igualmente obtidas.

Estudos têm mostrado que os polissacarídeos atuam como inibidores do crescimento tumoral (ORLANDELLI et al., 2016a; ZHENG et al., 2016). Inicialmente, postula-se que, quando consumidos por via oral, atuam na prevenção do desenvolvimento de neoplasias. Como drogas anti-câncer acredita-se que eles induzem a apoptose das células tumorais, ativam o sistema imunológico, ideal para pacientes em tratamento com quimioterápicos e, finalmente, inibem as metástases (ZONG, CAO, WANG, 2012). Segundo Meng e colaboradores (2016) alguns polissacarídeos do tipo β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas, isolados de cogumelos, respondem de forma positiva aos ensaios de inibição do crescimento tumoral e modulação do sistema imunológico; segundo os autores isso se deve, provavelmente, à mediação de células T ou de outras células do sistema imunológico.

Alguns polissacarídeos também são utilizados na indústria de alimentos, atuando geralmente como espessantes para aumentar a viscosidade de algum líquido, emulsificantes, agentes gelificantes e estabilizantes, sendo empregados ainda para atenuar processos de desidratação que acontecem no armazenamento de alguns alimentos industrializados. As propriedades físicas e químicas desses polímeros devem ser bem conhecidas e levadas em consideração para a escolha do polissacarídeo mais adequado, para que o alimento produzido apresente as características desejadas. As condições de processamento como temperatura e concentração, também devem ser investigadas. (TONELI et al., 2005).

Os polissacarídeos secretados por micro-organismos, denominados de exopolissacarídeos (EPS) têm sido, mais recentemente, objeto de investigação científica.

As razões para isso são a facilidade de obtenção, uma vez que as condições ideais de cultivo podem ser obtidas em laboratório e a relativa simplicidade de purificação (BARBOSA et al., 2004; MISHRA, JHA, 2013).

2.2 EXOPOLISSACARÍDEOS

Fungos e bactérias são os principais micro-organismos produtores de exopolissacarídeos que, em seus *habitats* naturais, são secretados ao meio na forma de limo, podendo estar ligados à superfície das células (SUTHERLAND, 1998). Há estudos mostrando que alguns micro-organismos secretam mais de um tipo de polissacarídeo (OLIVEIRA et al., 2015), enquanto poucos secretam apenas um polissacarídeo, em cultivo submerso (VASCONCELOS et al., 2009).

Sabe-se que para a produção *in vitro* de EPS por micro-organismos alguns parâmetros devem ser estabelecidos tais como pH, tempo de incubação, temperatura e composição nutricional do meio de cultivo. Essas variáveis devem ser cuidadosamente investigadas, pois influenciam na síntese, composição e produção efetiva das moléculas de interesse (NEHAD, EL-SHAMY, 2010). Orlandelli e colaboradores (2016) estabeleceram parâmetros para a produção de EPS pelo fungo ascomiceto *Diaporthe* sp. JF766998, através de cultivo submerso. O polissacarídeo secretado (15,2 mg/100 mL de cultivo) foi identificado como uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana, com massa molecular de 46,6 kDa e apresentou atividade citotóxica contra células tumorais de mama (MCF-7) e de fígado (HepG2-C3A) (ORLANDELLI et al., 2017).

O polissacarídeo extracelular, denominado N1, produzido pelo ascomiceto *Aspergillus versicolor* N₂bc, após procedimentos de purificação por métodos cromatográficos, foi caracterizado como uma manogluco galactana com unidades galactofuranosídicas nas cadeias laterais e apresentou atividade antioxidante em ensaios *in vitro* (YAN et al., 2016). O exopolissacarídeo solúvel em água, designado Os2-1, produzido pelo fungo *Oidiodendron truncatum* GW também demonstrou atividade antioxidante em testes *in vitro* (GUO et al., 2013).

As condições fermentativas e de crescimento micelial para a produção de EPS pelo ascomiceto *Hirsutella* sp foram estudadas por Li e colaboradores (2010), o EPS secretado

foi investigado quanto à ação bactericida, sendo eficaz contra algumas bactérias gram-positivas.

Os exopolissacarídeos produzidos por fungos que têm sido caracterizados como glucanas podem apresentar ligações do tipo α e/ou do tipo β . Entretanto a maioria se caracteriza como β -D-glucanas (BARBOSA et al., 2004; SEVIOUR et al., 1992).

2.3 β -GLUCANAS

De modo geral, essas moléculas são homopolímeros de glucose unidas por ligações do tipo β , podendo apresentar diferenças na posição da ligação glicosídica - (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- e (1 \rightarrow 6)- para β -glucanas microbianas – podem apresentar ramificações ao longo da cadeia, com resíduos únicos ou múltiplos de glucose que se repetem de maneira regular em β -glucanas bacterianas ou de maneira irregular nas β -glucanas de fungos e algas (KAGIMURA et al., 2015a; NOVAK, VETVICKA, 2008). Tais moléculas vêm sendo estudadas pela aparente interação com alguns receptores em células de humanos, micro-organismos e invertebrados. A maneira pela qual este tipo de glucana interage com tais receptores não está completamente elucidada, mas grande parte dos receptores que identificam glucanas β -(1 \rightarrow 3) possuem características comuns, apresentando inclusive alta homologia. As respostas imunológicas e inflamatórias desencadeadas pelas glucanas β -(1 \rightarrow 3) envolvem mecanismos complexos, que provavelmente dependem da maneira como essas moléculas interagem com os receptores, além dos parâmetros estruturais das mesmas, como massa molecular, solubilidade, grau de ramificação e conformação tridimensional (LEGENTIL et al.; 2015).

Estudos revelam que as β -glucanas ativam os macrófagos, podendo modular positivamente a imunidade inata e adaptativa. Alguns resultados sugerem que alimentos funcionais que possuem o cogumelo *Coriolus versicolor*, contendo β -glucanas, aumentam a proteção alimentar contra micro-organismos (SHI et al., 2016).

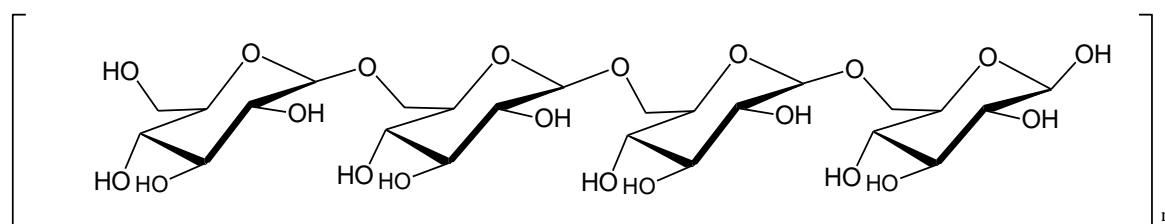
Existe a perspectiva de que algumas β -glucanas podem atuar no tratamento e na prevenção de doenças alérgicas, Jesenak e colaboradores (2014) apontam resultados promissores em testes realizados *in vitro* e também em estudos clínicos com animais e humanos, revelando a atuação de β -glucanas como potenciais antialérgicos. As β -

glucanas cíclicas, por sua vez, apresentam potencial de encapsular moléculas hidrofóbicas, o que indica a possível aplicação dessas moléculas nas indústrias farmacêutica e alimentícia (NAIR, GUMMADI, DOBLE, 2016).

A lentinana, uma glucana β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6), obtida a partir do Shiitake (*Lentinus edodes*), inibe o crescimento de tumores sólidos (sarcoma-180) quando em conformação em tripla-hélice, o que não ocorre quando a molécula apresenta-se na conformação simples, indicando a importância do arranjo espacial para a ação antitumoral da lentinana (SMIDERLE et al., 2013; ZHANG et al., 2005).

Smiderle e colaboradores (2013) isolaram glucanas β -D-(1 \rightarrow 6), dos cogumelos *Agaricus bisporus* e *Agaricus brasiliensis*, e avaliaram a atividade imunoestimuladora de cada molécula, observando que as mesmas apresentavam ação biológica quando administradas com células THP-1, derivadas de paciente com leucemia monocítica aguda. A fórmula estrutural encontrada para tais glucanas é ilustrada na Figura 1.

Figura 1: Fórmula estrutural das glucanas β -(1 \rightarrow 6) isoladas dos cogumelos *Agaricus bisporus* e *Agaricus brasiliensis*.



Fonte: Smiderle et al., 2013.

Segundo Chen e Seviour (2007) as β -glucanas vêm se mostrando benéficas para indivíduos com o sistema imunológico enfraquecido, ou mesmo com doenças como o câncer. Para eles, o mecanismo de ação das β -glucanas parece depender de como essas moléculas interagem com alguns receptores celulares, incluindo dectina-1, CR3, LacCer e receptores scavenger, levando-se em consideração que cada tipo de β -glucana promoverá respostas marcadamente diferentes para a mesma atividade, provavelmente por apresentarem interações diferentes de acordo com o tipo de ligação que possuem. Alertam ainda para o fato de que algumas β -glucanas, parecem precisar de modificações químicas para apresentar efeito biológico, sendo muitas vezes convertidas a moléculas menores e mais solúveis.

Um estudo com o intuito de elucidar a ação de β -glucanas com diferentes graus de polimerização (DP) comparou a atividade indutora de defesa de oligossacarídeos com a de β -glucanas, em plantas de tabaco. Foi observado que as moléculas estudadas ofereciam uma resposta positiva para os testes, entretanto, constatou-se que as moléculas com DP menores, desempenharam papel ativo nas reações de defesa precoces, mostrando respostas rápidas, enquanto as moléculas com DP maiores, exerceram respostas de efeito à longo prazo (FU et al., 2011).

Há uma limitação para a aplicação de β -glucanas em testes de atividade biológica devido à baixa solubilidade dessas moléculas quando em solução aquosa, principalmente quando concentrações maiores são necessárias. Algumas β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas foram responsáveis por efeitos colaterais significativos como microembolização, formação de granulomas, inflamação e dor, quando administradas. Há estudos sobre formas de contornar essa situação por meio de processos de derivatização - sulfatação, carboximetilação e fosfatação – que pela inserção de grupos ionizáveis aumenta a solubilidade do polímero. Experimentos de fragmentação química, bioquímica ou física das glucanas como hidrólise ácida e alcalina, hidrólise enzimática, ou irradiação com ultrassons – despolimerizam esses substratos gerando moléculas menores, denominadas oligossacarídeos, com solubilidade aumentada (ZEKOVIĆ, KWIATKOWSKI, 2005).

Zhang e colaboradores (2004a) inseriram grupos carboximetilados em uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana proveniente do cogumelo *Pleurotus tuber-regium*. Os autores constataram que a reação conferiu maior solubilidade à glucana, auxiliando no melhor desempenho da atividade antitumoral, tanto *in vitro* (cultura de células tumorais HL-60) quanto *in vivo* (tumor sólido sarcoma 180 implantado em ratos BALB/c), assim como na ação imunomoduladora da β -glucana.

A modificação química de polissacarídeos por sulfatação, por sua vez, além de aumentar a solubilidade em água, pode alterar a conformação da cadeia dessas moléculas, o que interfere diretamente na ação biológica apresentada (QIU et al., 2007; ZHANG et al., 2011). Portanto, a adição de grupos sulfatos, por derivatização, é considerada um excelente procedimento para obtenção de compostos com maior potencial de aplicação biológica.

2.4 SULFATAÇÃO COMO PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA

Os polissacarídeos sulfatados caracterizam-se como moléculas onde alguns grupos hidroxila das unidades glicosídicas são substituídos por grupos sulfato, podendo apresentar-se de maneira complexa, heterogênea e possuindo ação bioativa (KIM et al., 2011; MOURAO, 2007). Alguns estudos evidenciam a manifestação de atividades biológicas para estes materiais, entre elas ação antioxidante (PEASURA et al., 2016), anticoagulante (KRICHEN et al. 2017), antitrombótica (LATEEF, OJO, OLADEJO, 2016), imunomoduladora e anticâncer (WIJESEKARA, PANJESTUTI, KIM, 2011). Os polissacarídeos naturalmente sulfatados podem ser encontrados em algas marinhas (NGO, KIM, 2013; RODRIGUES et al., 2016), principalmente na forma de fucanas, fucoidanas e carragenanas (MESTECHKINA, SHCHERBUKHIN, 2010), em animais (KALE et al., 2013; ZHANG et al., 2013) e em plantas (MULLOY, MOURÃO, GRAY, 2000).

Peasura e colaboradores (2016) avaliaram o potencial antioxidante de um polissacarídeo naturalmente sulfatado, isolado a partir da alga *Ulva intestinalis*. O polissacarídeo quando analisado por cromatografia em coluna de sílica apresentou uma fração com grau de sulfatação (DS) de 0,62 e massa molecular (MW) de 110 kDa, com atividade antioxidante superior ao material não fracionado, cujo DS era de 2,96 e MW 330 kDa. Segundo os autores, apesar da ação biológica estar associada ao maior percentual de sulfatação, a massa molecular é também um fator fundamental a ser considerado.

Estudos relatam que a modificação química de polissacarídeos microbianos por sulfatação, pode desenvolver ações biológicas nessas moléculas semelhantes àquelas apresentadas por polímeros naturalmente sulfatados, ou até mesmo potencializar uma ação já existente, visto que a bioatividade depende das características estruturais da molécula (VASCONCELOS et al., 2009). Por essa razão, paralelamente à procura de fontes de polissacarídeos naturalmente sulfatados, cresce também a busca pelos derivados sulfatados provenientes de polissacarídeos microbianos, de animais e de plantas, que são sintetizados por derivatização química (MESTECHKINA, SHCHERBUKHIN, 2010).

Procedimentos de sulfatação também vêm sendo largamente empregados para melhorar a solubilidade de β -glucanas. Wang e colaboradores (2014) obtiveram um

polímero sulfatado a partir de uma glucana β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6) proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A atividade imunológica da molécula derivatizada foi avaliada através de dois experimentos envolvendo frangos. Experimentos realizados *in vitro* indicaram que a glucana sulfatada poderia estimular a proliferação de linfócitos do baço dos frangos, o que também foi evidenciado nos testes *in vivo*, envolvendo a vacinação dos frangos com a glucana sulfatada, indicando que a mesma poderia melhorar significativamente a eficácia da vacina Newcastle contra a doença em frangos.

Uma β -glucana, insolúvel em água, produzida pelo fungo *Pleurotus tuber-regium* foi sulfatada para a obtenção de um polímero solúvel em água. Duas frações com DS de 1,14 e 1,74 foram obtidas e avaliadas quanto à atividade antiviral. Foram submetidas a ensaios *in vitro* com quatro tipos de vírus, incluindo herpes simplex tipo 1 (HSV-1), herpes simplex tipo 2 (HSV-2), vírus influenza A (Flu A) e vírus respiratório sincicial (RSV). Os resultados apontaram para atividade antiviral das moléculas sulfatadas contra os vírus HSV-1 e HSV-2 impedindo-os de infectarem células hospedeiras (ZHANG et al., 2004b).

A ação anticoagulante, por sua vez, está entre as atividades biológicas mais pesquisadas para polissacarídeos sulfatados. Os únicos polissacarídeos sulfatados utilizados atualmente como agentes anticoagulantes em fármacos são a heparina não fracionada e a heparina com baixo peso molecular. Entretanto, tais compostos apresentam efeitos secundários quando administrados, tais como sangramento e trombocitopenia, o que eleva a necessidade de encontrar fontes alternativas como novos agentes anticoagulantes (COSTA et al., 2010; NADER et al., 2004).

Glicosaminoglicanas sulfatadas obtidas a partir da pele de peixes tiveram sua atividade anticoagulante avaliada por Krichen e colaboradores (2017). Tais moléculas apresentaram respostas marcadamente positivas tanto nos testes realizados *in vitro* quanto *in vivo*, e passaram a ser consideradas como potenciais anticoagulantes obtidos de uma fonte barata e abundante.

Um exopolissacarídeo isolado do *Lachnum* foi sulfatado por Du e colaboradores (2016), o material resultante apresentou DS de 1,97, e teve sua atividade anticoagulante investigada, prolongando satisfatoriamente o tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de trombina (TT) em plasmas sanguíneos de ratos, tendo assim, efeito inibitório sobre a via de coagulação intrínseca.

Alguns polissacarídeos sulfatados estão sendo despolimerizados e as frações resultantes, de menor massa molecular, têm suas atividades biológicas avaliadas. A hidrólise ácida parcial (HCl 0,04 M, 60 °C, 5 horas) de uma fração polissulfatada, proveniente da alga vermelha *Acanthophora muscoides*, produziu oligômeros que mostraram-se mais eficazes, nos testes *in vitro*, sobre a geração de trombina do que a fração não hidrolisada, com o aumento do poder de anticoagulante (RODRIGUES et al., 2016).

Experimentos envolvendo a fragmentação dos polissacarídeos para obtenção de moléculas menores que conservem as propriedades de aplicação da molécula original têm sido efetuados (KÄSBAUER, PAPER, FRANZ, 2001). Os oligossacarídeos e seus derivados têm ampla aplicação na medicina (reduzem triglicérides, estabilizam a glicemia, favorecem a absorção dos nutrientes e fortalecem o sistema imunológico, entre outros), na agronomia (indutores da resistência das plantas contra doenças) e, principalmente, na indústria alimentícia como prebióticos, que equilibram a flora intestinal e nutrem seletivamente as bactérias benéficas tais como *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* (COMBO et al., 2013; LI et al., 2016).

2.5 OLIGOSSACARÍDEOS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO

São designados oligossacarídeos, moléculas contendo de 2 à 20 unidades monossacarídicas. Os oligossacarídeos naturalmente sintetizados como moléculas simples (somente açúcar) e com função biológica específica para as suas células têm, geralmente, duas unidades monossacarídicas – sacarose, trealose, lactose e maltose, entre outras – mais raramente 3, 4 e 5 unidades monossacarídicas, como rafinose, estaquiose e verbascose, respectivamente (SUMIYOSHI et al., 2015; VÁZQUEZ et al., 2000). Oligossacarídeos maiores são naturalmente encontrados ligados a proteínas - glicoproteínas e proteoglicanas - e aos lipídeos – glicolipídeos, e são conhecidos como oligossacarídeos complexos. No glicocálix, uma estrutura presente na célula animal, os oligossacarídeos complexos participam do reconhecimento celular, funcionando como centro receptor e sítio de reconhecimento, sendo também importante para os sistemas de defesa e de adesão entre as células (NELSON, COX, 2012).

De acordo com a literatura (BLAND, KESHAVARZ, BUCKE, 2004; GIESE et al., 2011) oligossacarídeos constituídos de seis unidades monossacarídicas ou mais, mantêm ou até mesmo potencializam as ações biológicas do polissacarídeo original, o que pode ser atribuído ao fato de possuírem frequentemente maior solubilidade, devido à menor massa molecular, mas ainda assim preservando a conformação das moléculas nativas.

Para obtenção de oligossacarídeos maiores são usados como substratos glicoproteínas ou proteoglicanas. Nesse caso a hidrólise enzimática é adotada e uma mistura de oligossacarídeos é obtida. A despolimerização de polissacarídeos, que pode ser efetuada por hidrólise enzimática, química ou física, também é um procedimento comum. Já, a síntese orgânica de oligossacarídeos é pouco utilizada por envolver reações demoradas, dispendiosas e, que na maioria das vezes, proporciona oligossacarídeos com baixo DP (COURTOIS, 2009; GIESE et al., 2011).

A produção de oligossacarídeos por processos de despolimerização física é pouco utilizada, mas algumas técnicas empregando irradiação- γ , ultrassonicação, temperatura e micro-ondas vêm sendo desenvolvidas. A despolimerização de polissacarídeos, através da utilização de raios gama e ultravioleta, se dá pelo fornecimento de energia suficiente para clivar as ligações glicosídicas rapidamente, contudo são métodos não seletivos e que se administrados sob longos períodos de exposição podem provocar a degradação do material (DELATTRE et al., 2005; DELATTRE, VIJAYALAKSHM, 2009).

Vodeničarova e colaboradores (2006) empregaram micro-ondas e a ultrassonicação para degradar uma xiloglucana extraída de sementes de tamarindo. Os resultados revelaram que os tratamentos usados, além de promoverem a redução da massa molecular, também foram capazes de modificar a estrutura primária do polissacarídeo original, provocando a cisão da cadeia principal, acompanhada por decomposição de resíduos de glucose, produzindo oligossacarídeos de diferentes tamanhos.

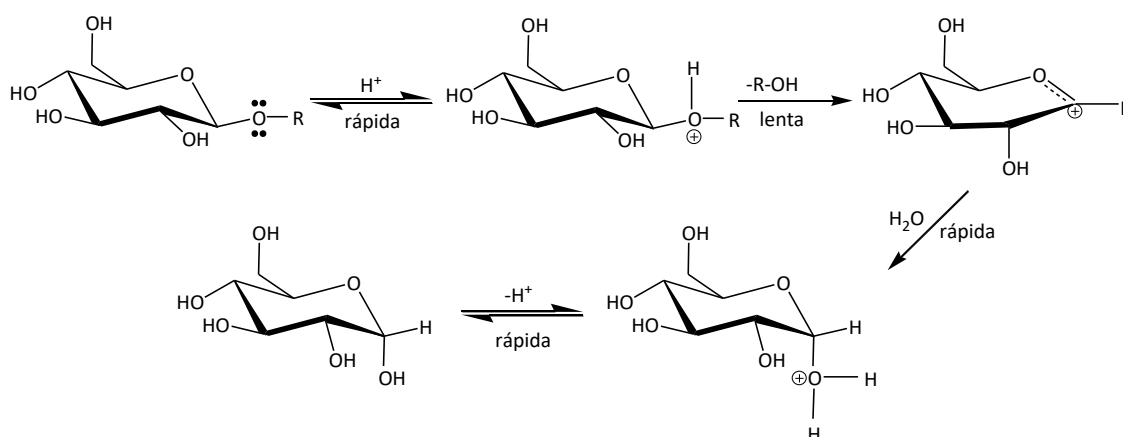
O uso de enzimas têm se mostrado uma alternativa bastante promissora para a produção de oligossacarídeos, devido à especificidade que estas proteínas possuem quanto aos seus substratos, podendo atuar principalmente por meio de reações enzimáticas como hidrólise, isomerização e transglicosilação (GIESE et al., 2011). Os procedimentos de hidrólise enzimática são geralmente mais brandos e, algumas vezes, se

faz necessário o uso de pré-tratamentos para tornar o polissacarídeo mais acessível à enzima (ZHANG, Y. et al., 2016). Kumagai e colaboradores (2016) obtiveram oligossacarídeos biologicamente ativos a partir da curdlana, uma glucana. Um pré-tratamento térmico, seguido da hidrólise pela enzima GH64 (KfGH64), em condições previamente estabelecidas (pH 5,5, 37 °C, 100 rpm, 24 horas, 10 µg enzima/g de substrato), gerou principalmente laminaripentaoses e oligômeros com DP entre 13 e 130, não havendo produtos com DP menor que 5.

A obtenção de oligossacarídeos, a partir da hidrólise ácida parcial de polissacarídeos, é realizada com aquecimento (80 à 100 °C), ácidos diluídos (~0,1 a 2 M) tais como H₂SO₄, HCl e TFA e tempos relativamente pequenos de reação (30 a 150 min) (DELATTRE et al., 2005). Lembrando que polissacarídeos são completamente degradados com ácidos diluídos a quente, uma investigação detalhada das condições de hidrólise para a obtenção de oligossacarídeos deve ser estabelecida a partir de um estudo cinético de tempo e temperatura de reação bem como concentração do ácido utilizado (DI et al., 2003; FIGUEIREDO, 2013; GRANDPIERRE et al, 2008; SINGH et al., 2003).

Uma das grandes vantagens da hidrólise ácida para a produção de oligossacarídeos é a possibilidade de utilização de aquecimento, que auxilia na solubilização inicial do polímero, tornando o procedimento mais eficaz. No caso da catálise enzimática o aquecimento, se necessário, inviabiliza o procedimento, uma vez que enzimas são proteínas e como tal, geralmente, sofrem desnaturação em temperaturas maiores que 40 °C. Esta limitação molecular torna o processo de hidrólise química mais efetivo (AKPINAR et al., 2010). O mecanismo mais aceito para a hidrólise ácida de polissacarídeos é descrito na Figura 2.

Figura 2: Mecanismo geral de hidrólise ácida de polissacarídeos proposto por Edward (1955).



Fonte: EDWARD, 1955 apud CORRÊA, 1971.

Dos catalisadores ácidos utilizados, o TFA apresenta vantagem sobre os demais, pois sendo volátil, pode ser removido por simples evaporação ou pelo uso de evaporação à pressão reduzida (BUBB et al, 1997; DONG et al., 2002; SAMUELSEN et al., 1999; SILVA et al., 2008). Já as hidrólises realizadas com os ácidos H_2SO_4 e HCl precisam ser neutralizadas e os íons formados retirados pelo uso de resinas de troca iônica (CHOW et al. 2005; DI et al., 2003; FU et al., 2015; ZHANG, H. et al, 2016).

Em um estudo comparativo para a produção de oligossacarídeos a partir de curdlana, usando o ácido trifluoroacético (TFA) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), foi constatado que o H_2SO_4 atuou mais rapidamente que o TFA, quando submetidos à mesma concentração (1 M), temperatura (60 °C) e tempo de hidrólise (GRANDPIERRE et al., 2008).

Akpinar e colaboradores (2009) prepararam uma série de xilooligossacarídeos, a partir de resíduos agrícolas ricos em xilana, utilizando H_2SO_4 0,25 M, 30 minutos e 100 °C. Os oligossacarídeos gerados foram analisados por HPLC. Segundo os autores, além da determinação dos parâmetros tempo, temperatura e concentração do ácido utilizado, deve-se evitar a formação, em grande quantidade, de monossacarídeos e de seus subprodutos furfural e hidroximetilfurfural. β -(1 \rightarrow 4)-D-xilooligossacarídeos (SUN et al., 2002) foram obtidos por hidrólise ácida parcial (H_2SO_4 0,125 M, 90 °C, 15 min.) de xilanas, extraídas de sementes de algodão. Os oligossacarídeos foram purificados por

cromatografia de filtração em gel com as colunas Bio-Gel P-4 e Toyopearl HW-40F, conectadas em série e usando água como eluente.

Uma glucana cíclica do tipo β -D-(1 \rightarrow 2) foi despolimerizada parcialmente por hidrólise ácida (HCl 0,01 M, 100 °C, 120 minutos e agitação) para gerar oligômeros com DP de 2 a 10. A mistura reacional foi neutralizada pela ação de NaOH e o sal formado foi removido pela utilização de uma coluna de gel Sephadex G-10 e, em seguida, os oligossacarídeos foram fracionados em coluna de Bio-Gel P-4 (ZHANG, H. et al, 2016).

Fu e colaboradores (2015) produziram nove oligossacarídeos diferentes com DP de 2 a 10, a partir de uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana que foi inicialmente solubilizada em DMSO, sendo a solução resultante mantida em agitação, “overnigt”. A hidrólise foi efetuada pela adição de ácido clorídrico, 105 °C, 150 minutos. O hidrolisado foi neutralizado com NaOH e as frações oligossacarídicas foram separadas por precipitação com acetona. Os oligossacarídeos foram separados por um sistema HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), em coluna de X-amida. Foi verificado, separadamente, o efeito dos oligossacarídeos sobre a liberação de H₂O₂ em plantas de tabaco, e os resultados mostraram que oligossacarídeos maiores induziam respostas de defesa mais fortes nas plantas.

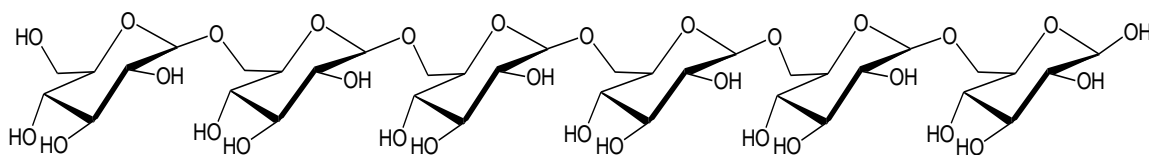
Uma vez estabelecidos os parâmetros cinéticos ideais para a produção de oligossacarídeos com DP \geq 6, a separação e a purificação desses oligômeros são feitas convencionalmente por procedimentos cromatográficos, utilizando colunas com carvão ativado, resinas de troca iônica ou Bio-géis (ZHOU et al., 2011). Outro procedimento usado é a nanofiltração (NF), que segundo Goulas e colaboradores (2002) é eficiente para a purificação de misturas oligossacarídicas em escala industrial. Novas técnicas de separação de alto desempenho por membranas como eletrofiltração, reatores de membrana, módulo de membrana vibracional e retrolavagem de alta frequência (backflushing ou backshocking) (PINELO et al., 2009), vêm sendo estudadas. Entretanto, todas essas técnicas que utilizam membranas têm custos elevados, sendo portanto inacessíveis para a maioria dos laboratórios de pesquisa. A dificuldade de purificação dos oligossacarídeos faz com que esses experimentos sejam realizados em menor escala, devido à produção de séries homólogas de oligossacarídeos cujas propriedades químicas

e físicas são tão semelhantes que os procedimentos de separação nem sempre são efetivos.

Sun e colaboradores (2002) separaram xilooligossacarídeos por cromatografia de adsorção, usando como fase estacionária carvão ativo e fase móvel uma mistura etanol-água, em diferentes proporções. A elevada capacidade de carga e o baixíssimo custo do carvão são as principais vantagens deste método, juntamente com a separação eficiente de uma série homóloga de oligossacarídeos. As principais desvantagens referem-se ao tempo prolongado de separação, principalmente para oligossacarídeos com DP maiores e a baixa recuperação dos oligômeros.

Silva e colaboradores (2008) obtiveram um oligossacarídeo solúvel a partir de uma β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucana, produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Os oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial (TFA 0,2 M, 100 °C, 240 minutos) foram separados pela ação consecutiva da cromatografia de filtração em gel e de adsorção em carvão-Celite. Por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 e espectrometria de massa ficou estabelecido que um oligossacarídeo puro, contendo unicamente unidades glucopiranosídicas β -(1 \rightarrow 6), com DP igual a 6 foi obtido nessas condições, a fórmula estrutural do oligossacarídeo purificado encontra-se na Figura 3.

Figura 3: Oligossacarídeo purificado obtido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.



Fonte: Silva et al., 2008.

As possibilidades de aplicação dos oligossacarídeos vêm sendo progressivamente investigadas e estudos mostram esses resultados em bactérias, plantas e mamíferos. Acredita-se que a atividade biológica esteja relacionada com a estrutura química dos oligossacarídeos e isso implica em atenção especial aos métodos de produção e de purificação desses oligômeros (COURTOIS et al., 2009). Ações antioxidantes (NGO et al.,

2008; YUAN et al. 2005,)), anticoagulantes (ZHANG, X. et al., 2016), anti-tumorais (ZOU et al., 2016) e imunomoduladoras (JIAO et al., 2014) já foram detectadas para diferentes oligossacarídeos.

Oligossacarídeos solúveis em água, provenientes de raízes da planta *Panax ginseng* C.A. Meyer, utilizados em experimentos *in vitro*, inibiram o crescimento tumoral por fortalecimento do sistema imunológico e ativação de macrófagos (JIAO et al., 2014).

Em um estudo efetuado por Jia e colaboradores (2016) ficou evidenciado o efeito neuroprotetor de oligossacarídeos provenientes da quitosana. Essas moléculas inibiram o stresse oxidativo, reduzindo os níveis de malondialdeído e 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, aumentando a atividade de glutathione peroxidase e superóxido-dismutase, inibindo ainda respostas neuroinflamatórias pela diminuição na liberação de citosinas pró-inflamatórias. A administração oral dos quito-oligossacarídeos minimizou significativamente o déficit de aprendizado e de memória em ratos, reduzindo inclusive a apoptose de neurônios.

Szabó e colaboradores (1995) sugeriram a existência de receptores para heptaoligossacarídeos de glucose β -(1→3) em monócitos humanos e Bao e colaboradores (2002) relatam a manutenção da atividade imuno-estimulatória pelos polissacarídeos de pequeno peso molecular, em camundongos.

Não há dúvida, que os oligossacarídeos têm efeitos positivos na saúde humana, tanto na prevenção como no tratamento de doenças crônicas. Oligossacarídeos de diferentes fontes são usados como suplementos farmacológicos, ingredientes de alimentos processados para auxiliar no controle do peso, na regulação do controle de glucose em pacientes diabéticos e no controle dos níveis de lipídeo sérico em hiperlipidemias, além de outras doenças agudas e crônicas (QIANG, YONGLIE, QUIANBING, 2009). Os oligossacarídeos apresentam 0,3 a 0,6 vezes menos doçura que a sacarose, além de menos calorias, substituindo-a muitas vezes na composição de alimentos. Alguns oligossacarídeos não digeríveis são utilizados em dietas, como componentes de adoçantes (PATEL, GOYAL, 2011).

2.6 FONTES BIOLÓGICAS DE OLIGOSSACARÍDEOS

Todos os seres vivos do planeta Terra (bactérias, algas, protozoários, fungos, animais e vegetais) têm em sua composição química os quatro grupos de biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e polissacarídeos. De acordo com evolução bioquímica essas moléculas podem ser encontradas livres no citossol ou fazerem parte de estruturas de endomembranas (organelas) mais específicas. Os polissacarídeos, substratos utilizados como fonte de oligossacarídeos com maior grau de polimerização (DP), podem ser encontrados no citossol das células (função metabólica de produção de energia), na parede celular (função estrutural) e, dependendo do organismo, secretados ao meio para se protegerem do ataque de outros organismos, da dessecação, entre outras funções (NELSON, COX, 2014).

Para a pesquisa, organismos passíveis de serem cultivados em laboratório, são os mais apropriados como fonte de polissacarídeos. Quando o organismo é capaz de secretar o polissacarídeo, denominado exopolissacarídeo, ele passa a ser alvo da atenção. Bactérias e fungos são micro-organismos eleitos para esse propósito.

Embora as bactérias tenham um tempo de cultivo menor, a rápida variação genética pode comprometer a qualidade do produto formado que, por si só, se caracteriza como mistura complexa de heteropolímeros e glicoproteínas; para as bactérias essas moléculas atuam como biofilme (SUTHERLAND, 2001). A heterogeneidade molecular dificulta os procedimentos de purificação dos polissacarídeos, tornando-os substratos quase inacessíveis para obtenção de oligossacarídeos. Embora os fungos necessitem de um maior tempo de cultivo, são capazes de secretar uma população mais homogênea de moléculas biológicas, sob condições de cultivo pré-estabelecidas.

Os fungos constituem um grupo de micro-organismos eucarióticos, majoritariamente aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e quimio-heterotróficos, pois necessitam absorver componentes orgânicos do ambiente, usando-os como fonte de carbono para obtenção de energia (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). A absorção de nutrientes se faz pelo auxílio de enzimas, que são secretadas no meio para a degradação das moléculas orgânicas em fragmentos menores, que são mais facilmente transportados para o interior da célula fúngica (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996).

A diversidade bem como a facilidade de disseminação dos fungos faz com que esses organismos se tornem versáteis e desempenhem diferentes papéis na natureza. Sofrem interações mutualísticas com cianobactérias ou algas gerando os líquens e, com as raízes de plantas, formando as micorrizas; em ambos os casos tanto o fungo como o outro ser vivo associado beneficiam-se da interação. Podem ainda ser encontrados em relações de parasitismo ou na predação (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Os fungos são organismos multicelulares formados por longos filamentos chamados de hifas, que crescem pelas extremidades como redes, formando uma massa compacta, consistindo o micélio. A parede celular fúngica é composta de uma trama de macromoléculas, prevalecendo os polissacarídeos tais como quitina, presente na maioria dos fungos, além de mananas, galactanas, glucanas e quitosanas (MADIGAN et al, 2010; STEVENSON, 1974; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Os fungos são organizados dentro do Reino Fungi em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota, de acordo com as características morfológicas e estruturais presentes nos diferentes ciclos de vida desses organismos (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010). Para a obtenção de polissacarídeos da parede celular tanto Basidiomycota quanto Ascomycota podem ser investigados, entretanto, para a produção de exopolissacarídeos são os ascomicetos, preferencialmente investigados.

2.7 ASCOMICETO *Lasiodiplodia theobromae*

Fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae são ascomicetos que podem ser encontrados em duas formas diferentes no seu ciclo de vida: como *Lasiodiplodia theobromae* quando no estágio anamorfo (sexuado) e *Botryodiplodia theobromae* quando no estágio teleomorfo (assexuado), ambos pertencentes ao gênero *Botryosphaeria* (SALDANHA et al., 2006). Este gênero é formado por fungos fitopatogênicos que apresentam inconvenientes do ponto de vista econômico, provocando danos em madeiras comerciais, árvores frutíferas e ornamentais (Figura 4). A fitopatogenicidade se caracteriza em lesões necróticas nos galhos e troncos, produção de

gomose, acarretando a morte gradativa do ápice das árvores, designado *dieback* (SALDANHA et al., 2006).

Isolados de *Lasiodiplodia theobromae* das frutas caju, manga, maracujá, coco e mamão foram estudados por Pereira e colaboradores (2006) e apresentaram variações, quanto à esporulação, crescimento e coloração.

Figura 4: Fungo *Lasiodiplodia theobromae*. (a) em placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel, 5 dias de crescimento, (b) proliferação em folhas, 45 dias após a inoculação.



Fonte da figura: (a) autoria própria; (b): Muniz et al., 2011.

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ, isolado de berinjela, secretou três β -glucanas diferentes sob fermentação submersa: uma glucana β -(1 \rightarrow 3);(1 \rightarrow 6) insolúvel em água fria, e as outras duas como glucanas lineares β -(1 \rightarrow 6) solúveis, com massas moleculares de 7 e 1800 kDa. A glucana linear com maior massa molecular foi adicionada em cultivos de macrófagos e os resultados encontrados indicaram que o polissacarídeo induz uma resposta pró-inflamatório, pela secreção de interleucina 10 (IL 10), que pode estar relacionado com uma possível ação antitumoral (OLIVEIRA et al., 2015). A modificação química por carboximetilação da β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana secretada pelo *L. theobromae*, gerou uma molécula mais solúvel, apresentando propriedades antioxidantes, não detectada no polissacarídeo original (KAGIMURA et al., 2015b).

Uma glucana secretada pelo *L. theobromae*, isolado de laranja (VASCONCELOS et al, 2013) foi sulfatada através de três ciclos, envolvendo o uso de formamida como solvente, piridina como catalisador e ácido clorossulfônico, gerando um polissacarídeo sulfatado com DS de 0,97. A atividade anticoagulante da molécula quimicamente

modificada foi atribuída aos grupos sulfatos, uma vez que no polímero original a propriedade de anticoagulante não foi apresentada.

O fungo *L. theobromae*, isolado dos frutos de graviola, laranja e manga, foi cultivado no laboratório de Microbiologia. O material secretado no meio de cultivo, para cada um dos isolados, se mostrou extremamente viscoso e de difícil solubilização e foi identificado como exopolissacarídeo. A caracterização química desses polímeros mostrou tratar-se de β -glucanas com elevada massa molecular (VASCONCELOS et al., 2009). Devido à dificuldade de solubilização e a elevada viscosidade, essas glucanas não puderam ser ensaiadas em testes biológicos e, portanto, foram selecionadas como substratos, neste trabalho, para a despolimerização química por hidrólise ácida parcial e obtenção de oligossacarídeos com $DP \geq 5$, que possam ser utilizados em ensaios de atividade biológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem por objetivo obter oligossacarídeos a partir da hidrólise ácida parcial de β -glucanas, secretadas pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* isolado dos frutos laranja, graviola e manga. Tais moléculas serão ensaiadas em testes de atividade anticoagulante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer uma condição de hidrólise ácida parcial (concentração do ácido e tempo de hidrólise) para gerar oligossacarídeos de tamanhos variáveis, selecionando aqueles com seis ou mais unidades monossacarídicas.

Acompanhar a composição dos oligossacarídeos produzidos a cada condição de hidrólise por cromatografia líquida de íons em alta pressão (HPAEC/PAD).

Purificar os oligossacarídeos por cromatografia de filtração em gel e por carvão-Celite. Acompanhar a purificação de cada fração por análise em cromatografia líquida de íons. Derivatizar os oligossacarídeos purificados por sulfatação.

Realizar testes de atividade anticoagulante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos

- Agitadores magnéticos Quimis, modelo Q261-22 e Fisatom, modelo 752.
- Agitador de tubos Phoenix, modelo AP-56.
- Balança analítica Mettler-Toledo, modelo AB204.
- Balança semi-analítica Gehaka BG2000.
- Bomba peristáltica Pump P-1, Amersham Pharmacia Biotech e coletor Frac-100, Amersham Pharmacia Biotech.
- Bomba de vácuo Fanem, Dia Pump.
- Centrifuga refrigerada Cientec, modelo 5000R.
- Coluna de vidro (28 x 1,8 cm), para cromatografia de Filtração em gel.
- Coluna de vidro (33 x 2,8 cm), para cromatografia em coluna de carvão-Celite.
- Coluna de vidro (28 x 2,8 cm) para Cromatografia de filtração em gel (desalting).
- Condutivímetro CienLab.
- Cromatógrafo líquido de troca iônica (HPAEC- High Performance Anionic Exchange Chromatography) com detector eletroquímico, modelo ED 40, bomba gradiente, modelo GP 40 e integrador Dionex, modelo 4600.
- Deionizador Labconco, Water Pro Ps.
- Destilador Quimis.
- Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-Vis 1601.
- Espectrômetro de infravermelho IRAffinity – 1, Shimadzu. A aquisição dos dados foi realizada através do programa IR Solution.
- Estufa Quimis.
- Estufa Nova Ética, modelo 400/*ND.
- Evaporador rotativo Büchi, modelo R-114, bomba à vácuo V-100 e banho maria Büchi, modelo B-169.

- Fotocolorímetro Micronal, modelo B440.
- Liofilizador Edwards, modelo E-C.
- Microcentrifuga Beckman, modelo 365606.
- Sistema para filtração à vácuo.

4.1.2 Micro-organismos

A produção dos EPS foi efetuada a partir de isolados fúngicos obtidos de diferentes espécimes vegetais (graviola, manga e laranja), identificados morfológicamente como *Lasiodiplodia theobromae* pela Prof. Dr^a Maria Menezes da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE e classificados posteriormente como *Botryosphaeria rhodina* (forma anamórfica), denominados *B. rhodina* MMGR (isolado da graviola, *Annonamuricata*), *B. rhodina* MMFR (isolado da manga, *Mangifera sp.*) e *B. rhodina* MMLR (isolado da laranja, *Citrus sp.*). (VASCONCELOS, A. F, 2009; SALDANHA et al., 2007).

4.1.3 Reagentes

Os reagentes químicos utilizados para o preparo de soluções, efetuação de experimentos, preparo de eluentes e aplicação dos métodos utilizados, foram de grau analítico obtidos principalmente da Fluka, Merck ou Sigma.

Os sais e reagentes empregados para o preparo dos eluentes utilizados no HPAEC/PAD foram adquiridos da Fluka.

O gel Sephadex G-15 utilizado para as purificações por cromatografia de filtração em gel foi obtido da Pharmacia.

O carvão e a Celite utilizados para as colunas de cromatografia de adsorção foram adquiridos da Sigma.

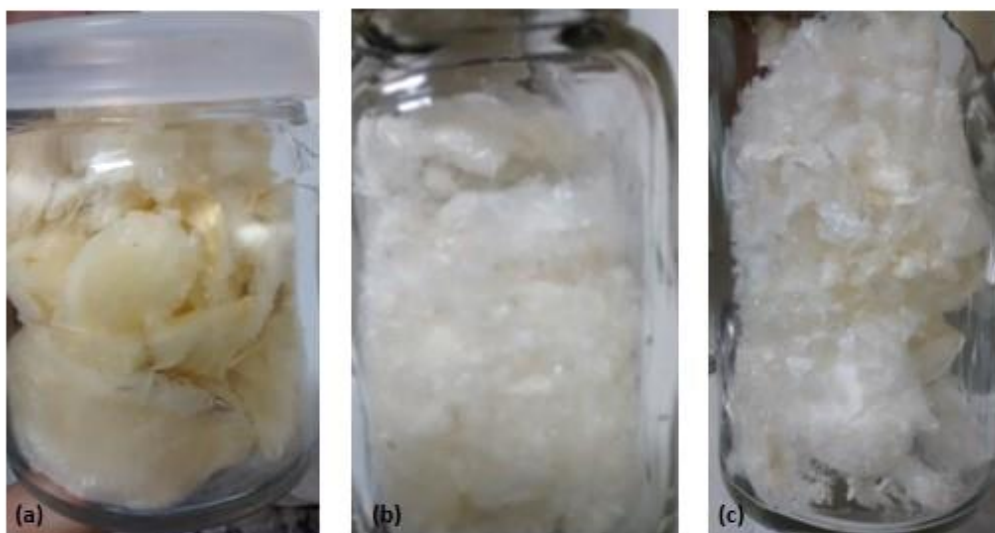
Os padrões de oligossacarídeos utilizados para análises em HPAEC/PAD dos hidrolisados foram: glucose, gentiobiose, laminaribiose e laminaritriose, adquiridos da Sigma.

4.2 MÉTODOS GERAIS

4.2.1 Condições de cultivo para a produção dos exopolissacarídeos (EPS)

Os EPS utilizados como substratos para este trabalho foram obtidos por Vasconcelos e colaboradores (2009) após cultivos submersos do fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* isolado dos frutos laranja (EPSlaranja), graviola (EPSgraviola) e manga (EPSmanga) (Figura 5).

Figura 5: EPS liofilizados. a) EPSmanga, b) EPSgraviola e c) EPSlaranja.



4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Quantificação de açúcares totais – Método de fenol-ácido sulfúrico

O método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi utilizado para detectar a presença de carboidratos, bem como para quantificá-los, determinando assim sua concentração, durante cada etapa do trabalho. O método consiste na formação do derivado furfural a partir de pentoses, ou hidroximetilfurfural a partir de hexoses, na

presença de ácido sulfúrico concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de coloração amarela. A utilização do método foi feita seguindo o protocolo original:

Reagentes: solução de fenol 5% e H₂SO₄ concentrado.

Procedimento: em um tubo de ensaio, foram adicionados à 0,5 mL de amostra, 0,5 mL de solução de fenol e, através de um jato único, 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após 15 minutos em repouso, as leituras foram efetuadas no fotocolorímetro a 480 nm.

Para o cálculo da concentração de carboidratos, utilizou-se uma curva padrão de glucose (0,1 g%), na faixa de concentração de 5 a 50 µg.

4.4. CURVA DE HIDRÓLISE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Para verificação e padronização de uma condição ideal de hidrólise ácida para obtenção dos oligossacarídeos a partir dos respectivos exopolissacarídeos, foram efetuadas curvas de hidrólise ácida parcial, variando-se o tempo de hidrólise, em uma concentração de ácido trifluoroacético (TFA) previamente estabelecida de 0,2 M (BAO et al., 2002; SILVA et al., 2008), buscando evitar a degradação excessiva do material e visando a produção de moléculas de tamanhos variáveis, principalmente aquelas com DP maiores.

Amostras: foram distribuídas alíquotas de 1,0 mg de cada EPS em tubos próprios para hidrólise, para cada tempo determinado (45, 60, 90, 120, 180, 210, 240 e 300 minutos).

Procedimento: adicionou-se 800 µL de TFA 0,2 M às respectivas amostras contidas nos tubos de hidrólise. Cada tubo foi cuidadosamente fechado, para evitar a evaporação do ácido e, então submetidos à agitação vigorosa até completa solubilização das amostras, sendo posteriormente colocados em estufa com temperatura ajustada à 100 °C, durante o tempo determinado para cada tubo, de acordo com a curva de hidrólise, sendo cada amostra periodicamente agitada para uma melhor solubilização.

Após o tempo de hidrólise, cada tubo foi recolhido em banho de gelo, o TFA foi removido por evaporação e a solução resultante foi liofilizada e, em seguida, solubilizada em 1 mL de água destilada. Posteriormente, cada amostra foi precipitada em álcool etílico (3 volumes) e mantidas “overnight” em câmara fria a 4°C. Em seguida, o material

foi centrifugado por 30 minutos à 10000 xg, originando um sobrenadante, contendo os oligossacarídeos e um precipitado, formado por moléculas maiores que resistiram a hidrólise e foram insolúveis em etanol. A fração contendo os oligossacarídeos foi evaporada a secura para remoção do etanol e solubilizada em água, apresentando-se totalmente solúvel. Cada fração foi quantificada para açúcares totais e analisada por HPAEC/PAD.

A partir dos resultados obtidos optou-se por dar sequência ao trabalho com o EPSmanga, devido ao maior rendimento de oligossacarídeos. Foi efetuada, então, a hidrólise do EPSmanga em maior escala. À cada tubo de hidrólise contendo 8,0 mL de ácido TFA 0,2 M, eram adicionados pequenas porções de EPS, seguido de vigorosa agitação, até a solubilização de um total de 10 mg, que foram submetidos à hidrólise. A quantidade máxima de material a ser hidrolisado, por tubo, foi determinada pela total solubilização do mesmo.

4.5 MÉTODOS CROMATOGRAFICOS PARA PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL

Uma massa total referente à cerca de 500 mg do EPSmanga foi hidrolisada nas condições estabelecidas como ideais, em porções de 10 mg por tubo de hidrólise, de acordo com o procedimento de hidrólise adotado, que consistia em TFA 0,2 M, 100 °C, 45 minutos. Aproximadamente 419 mg de hidrolisado (fração sobrenadante, após precipitação em etanol) foram obtidos, sendo, posteriormente, submetidos à purificação por cromatografia, primeiramente por filtração em gel Sephadex G-15 e, posteriormente, por cromatografia de adsorção em carvão-Celite.

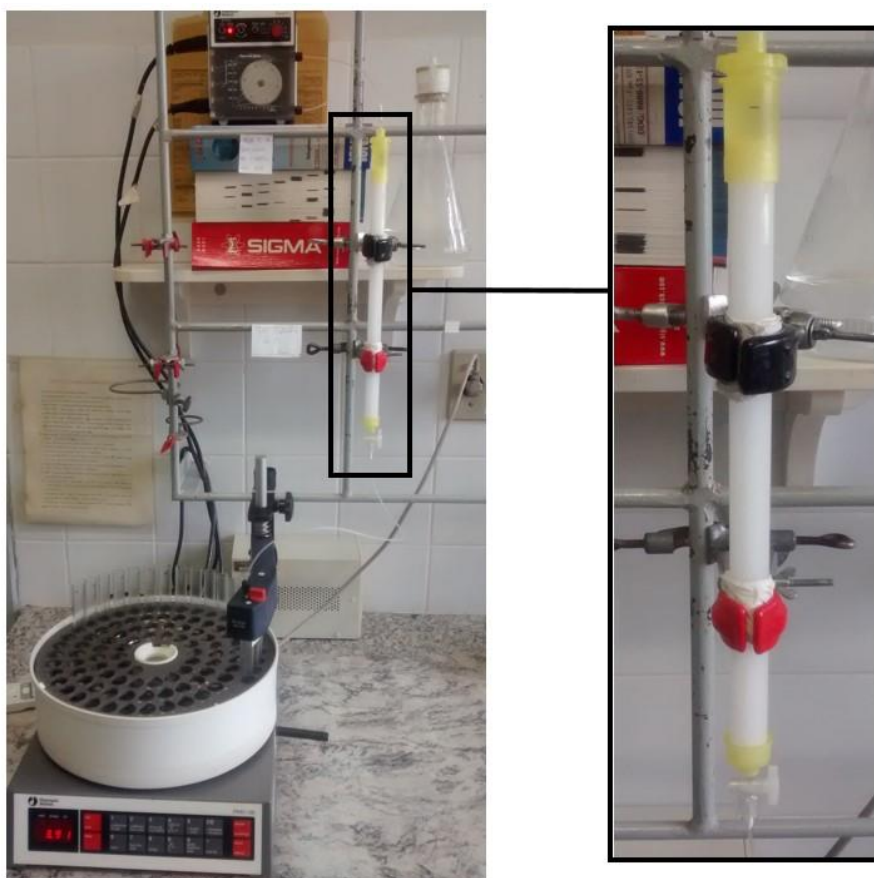
4.5.1 Cromatografia de Filtração em Gel – Coluna de Sephadex G-15.

O gel Sephadex é formado por dextrana, um polímero natural, o Sephadex G-15 por sua vez, possui uma faixa de fracionamento de 0 a 1500 daltons para polissacarídeos (BOYER, 1993; CHAMBERS, RICKWOOD, 1993).

Condições da coluna: uma coluna de vidro (28 x 1,8 cm) foi preenchida com gel Sephadex G-15 apresentando um volume de aproximadamente 72 mL (Figura 6). Como eluente utilizou-se água destilada, o fluxo de eluição da coluna foi ajustado em 0,45 mL/minuto e o volume de coleta em 2,0 mL/tubo. O experimento ocorreu em ambiente climatizado a 23 °C.

Procedimento: os sobrenadantes remanescentes de cada hidrólise, representando uma massa total de 419 mg de hidrolisado, após análise por HPAEC/PAD, foram reunidos, liofilizados, solubilizados em água destilada e aplicados na coluna, em porções de 10 mg por coluna. As frações coletadas de 2 mL/tubo eram recolhidas e quantificadas quanto à açúcares totais pelo método fenol-ácido sulfúrico. O perfil de eluição foi determinado, e as frações referentes aos picos formados foram reunidas e liofilizadas.

Figura 6: Coluna de gel Sephadex G-15 usada na Cromatografia de filtração em gel.



4.5.2 Cromatografia de adsorção – Coluna de Carvão-Celite

A utilização deste método tem-se mostrado eficiente para a separação de moléculas com massas moleculares muito próximas, sendo empregado principalmente para a separação de séries homólogas de oligossacarídeos, de acordo com os respectivos graus de polimerização (WHISTLER E BEMILLER, 1962). Conciliar o uso da cromatografia de filtração em gel com a de adsorção em carvão-Celite é uma alternativa para a separação e purificação de oligossacarídeos.

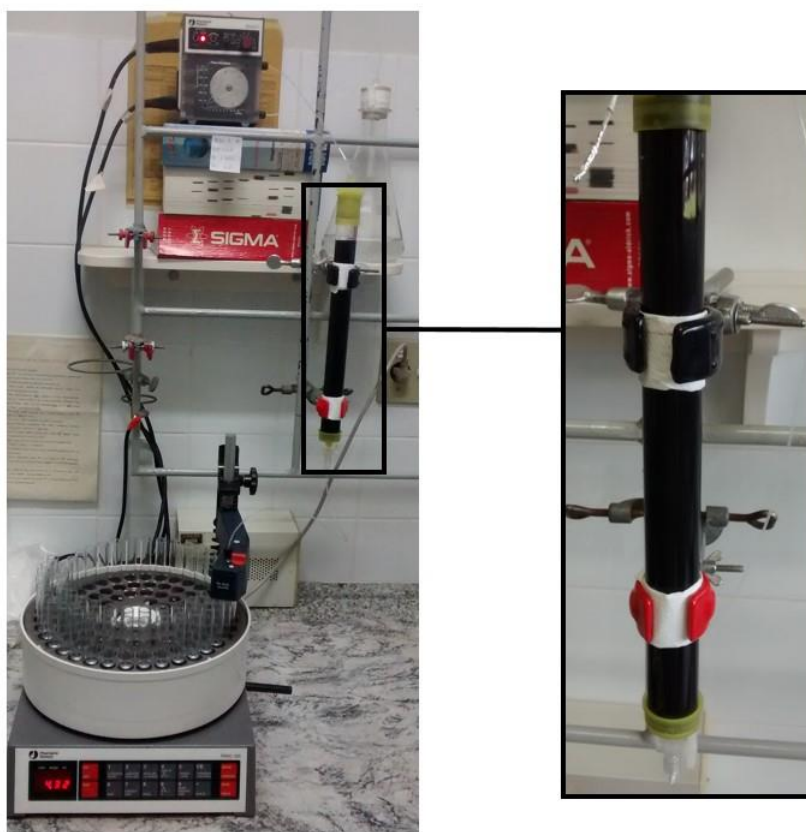
Inicialmente adotou-se uma coluna teste, para identificação do oligossacarídeo presente em maior quantidade na Fração I, proveniente da cromatografia de filtração em gel e, também, para verificação das condições ideais para uma separação eficiente do mesmo. Além da coluna teste, foi realizada outra coluna de carvão-Celite, de menor tamanho, com o objetivo de purificar a Fração I, proveniente da Cromatografia de filtração em gel.

Primeira Coluna Teste: foi utilizada uma coluna de vidro (33 x 2,8 cm) empacotada com a “papa” carvão-Celite, em um volume de 138 mL (Figura 7). Como eluente, utilizou-se a princípio água destilada e, em seguida, um gradiente descontínuo de etanol/água (v/v) nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%. O fluxo médio da coluna foi de 0,1 mL/min (23 °C), o qual variou um pouco com a mudança dos eluentes. O volume de coleta foi de 5 mL.

Procedimento de preparo da “papa” carvão-Celite: porções iguais de carvão e de Celite foram misturadas com água, resultando em uma “papa”, que foi empacotada na coluna de vidro. Para remoção de traços de metais e cinzas alcalinas, a papa foi lavada com aproximadamente 10 mL de HCl concentrado e, em seguida, com água destilada até pH neutro (WHISTLER, BEMILLER, 1962).

Para a primeira coluna teste, uma alíquota (15 mg) da Fração I, proveniente da filtração em gel, foi aplicada à coluna, a mesma foi submetida a uma eluição, primeiramente com água destilada, seguida pelo gradiente de etanol/água. Foram eluídos aproximadamente 300 mL de cada eluente. As frações coletadas, correspondendo a 5 mL, foram evaporadas para remoção do etanol e, em seguida, solubilizadas em 2 mL de água destilada, o material remanescente foi designado Fração II.

Figura 7: Primeira coluna Teste usada para Cromatografia de carvão-Celite.



Segunda coluna teste: foi utilizada uma coluna de vidro (33 x 2,8 cm) empacotada com a “papa” carvão-Celite para dar um volume de 78 mL (Figura 8). À bomba peristáltica que estava ligada a coluna, conectou-se um sistema de gradiente contínuo de concentração de etanol, que variou de 42 à 49% etanol/água (v/v), para separação dos oligossacarídeos de maior DP da Fração II, proveniente da primeira coluna teste de cromatografia de carvão-Celite.

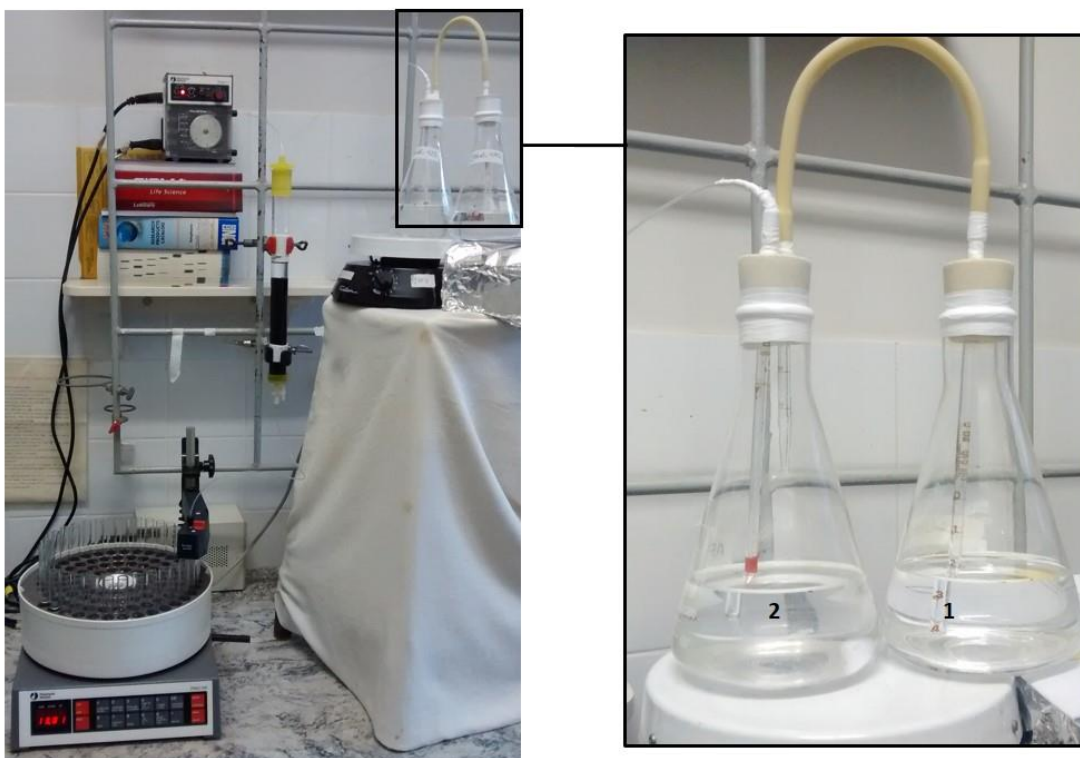
O fluxo médio da coluna foi de 0,08 mL/min (23 °C), o que mudou um pouco com a mudança da concentração do gradiente, e o volume de coleta foi de aproximadamente 2,4 mL. A “papa” carvão-Celite foi preparada de acordo com o procedimento de preparação para a primeira coluna teste.

Uma alíquota com massa de aproximadamente 6 mg, referente à Fração II, foi aplicado na segunda coluna, que foi submetida a uma eluição sob gradiente contínuo de etanol/água 42 à 49% (v/v). Foram eluídos aproximadamente 300 mL do gradiente

etanólico contínuo. Cada tubo coletado, contendo 2,4 mL, foi evaporado até secar para total remoção do etanol sendo, em seguida, solubilizados em 2 mL de água destilada.

Sistema para o gradiente etanol-água: utilizou-se de um sistema fechado, composto por dois erlenmeyers (500 mL) cuidadosamente vedados, conectados por um tubo de silicone. No erlenmeyer 1, havia 300 mL do eluente etanol-água de maior concentração (49%), que através do tubo de silicone, gotejavam lentamente no erlenmeyer 2, contendo o eluente etanol-água de menor concentração (42%, 300 mL) à medida que a bomba peristáltica retirava o conteúdo do erlenmeyer 2 levando-o para o interior da coluna, de forma que a concentração do conteúdo do erlenmeyer 2 aumentava continuamente, o que se tornou possível em função do vácuo criado no sistema (Figura 8).

Figura 8: Sistema utilizado para Cromatografia de adsorção em carvão-Celite com gradiente da concentração de etanol. (1) erlenmeyer contendo etanol 49% e (2) erlenmeyer contendo etanol 42%.



Foram submetidos um total de 106 mg da Fração I à cromatografia de carvão-Celite utilizando etanol-água 50% como eluente, o material remanescente, denominado Fração II, foi posteriormente sulfatado.

4.6 ANÁLISES DAS FRAÇÕES OLIGOSSACARÍDICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ÍONS (HPAEC- HIGH PERFORMANCE ANIONIC EXCHANGE CHROMATOGRAPHY)

A cada etapa do trabalho, hidrólise ácida parcial, coluna de filtração em gel e coluna carvão-Celite, as amostras foram quantificadas para açúcares totais pelo método fenol-ácido sulfúrico e frações referentes à 25 μ L, contendo cerca de 1,5 μ g de carboidratos totais, foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida de íons (HPAEC/PAD).

Utilizou-se, desta forma, para fins comparativos, uma mistura de padrões contendo 300 ng de glucose, 400 ng de gentiobiose, 400 ng de laminaribiose e 400 ng de laminaritriose, em injeções de 25 μ L.

As análises por cromatografia líquida de alta pressão foram efetuadas em um sistema Dionex DX500 com detector de Amperometria Pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os oligossacarídeos foram separados usando um gradiente de 0 a 100% de acetato de sódio e uma coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm) equipada com guarda coluna PA1 em um fluxo de 1 mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando solução de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM (eluente 1) e solução NaOH 100 mM (eluente 2), preparadas a partir de solução NaOH 50%. A coluna foi regenerada por 10 minutos, após o término da corrida (40 minutos), com 100% do eluente 1, seguida pelo retorno das condições iniciais de análise, que consistia em 100% do eluente 2, por 15 minutos, antes da injeção da próxima amostra.

4.7 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA POR SULFATAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-15 E CROMATOGRAFIA DE CARVÃO-CELITE.

Tendo em vista a dificuldade para separação dos oligossacarídeos, optou-se pela derivatização por sulfatação da mistura de oligossacarídeos com maior DP (Fração II). Os oligossacarídeos produzidos por hidrólise ácida parcial e purificados por cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 e posteriormente por cromatografia de carvão-Celite, utilizando o gradiente etanol-água 50% (Fração II) foram derivatizados quimicamente através de uma reação de sulfatação conforme descrito por O'Neill (1995), com modificações. Foram adicionados 10,0 mL de formamida sobre a Fração II (30 mg) liofilizada. A solução resultante foi submetida à agitação magnética vigorosa, durante 3 horas. Após esse período foram adicionados 10,0 mL de piridina (catalisador) ao meio, continuando sob agitação por mais 24 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de ácido clorossulfônico gota a gota, tomando-se os devidos cuidados para evitar a hidratação do sistema reacional, que foi mantido sob agitação vigorosa a 4 °C por 6 horas. A reação foi interrompida com a adição de gelo e neutralizada com uma solução de bicarbonato de sódio 10 % (m/v), até pH 7.

O material foi evaporado à pressão reduzida, para remoção da piridina, sendo na sequência liofilizado, solubilizado em 12 mL de água destilada e submetido à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15, para remoção do sal formado.

4.7.1 Cromatografia de filtração em gel para "desalting" – Gel Sephadex G-15.

Para remoção do sal formado durante a reação de neutralização efetuada após o procedimento de sulfatação, optou-se pela utilização da cromatografia de filtração em gel, utilizando o gel Sephadex G-15.

Condições da coluna: uma coluna de vidro (2,8 x 28 cm) foi preenchida com gel Sephadex G-15 apresentando um volume de aproximadamente 170 mL (Figura 9). Como eluente utilizou-se água destilada, o fluxo de eluição da coluna foi ajustado em

0,55 mL/minuto e o volume de coleta em 3,0 mL/tubo. O experimento ocorreu em ambiente climatizado a 23 °C.

Procedimento: o material submetido ao procedimento de sulfatação, representando uma massa total de 30 mg (Fração II sulfatada), foi liofilizado, solubilizado em água destilada e aplicado na coluna, em porções de 6 mg, aproximadamente. As frações coletadas de 3 mL/tubo eram recolhidas e quantificadas quanto à açúcares totais pelo método fenol-ácido sulfúrico, tendo na sequência a condutividade aferida. O perfil de eluição foi determinado, e as frações referentes aos picos formados foram reunidas, liofilizadas e pesadas. Este procedimento foi repetido duas vezes para remoção do sal.

Figura 9: Coluna de gel Sephadex G-15 usada na Cromatografia de filtração em gel para "desalting".



4.7.2 Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador de Fourier (FT-IR)

As análises de FT-IR foram efetuadas para acompanhar a reação de sulfatação, com o aparecimento de bandas relacionadas ao grupamento sulfato e ao desaparecimento dos sinais de OH da mistura de oligossacarídeos da Fração II. A espectroscopia no infravermelho foi realizada em espectrômetro IRAffinity – 1, marca SHIMADZU e a aquisição dos dados foi feita pelo programa IR Solution.

Uma alíquota liofilizada de cada material (0,8 mg), não sulfatado (Fração II) e sulfatado (Fração II sulfatada), foi macerada com 250 mg de KBr, grau espectroscópico. As pastilhas utilizadas para as análises foram feitas à pressão de 60 KN por 180 segundos. Os espectros foram obtidos no modo transmitância na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

4.7.3 Determinação do grau de substituição (D.S.)

O grau de substituição (D.S.) do material sulfatado foi determinado por meio do método turbidimétrico descrito por Dodgson e Price (1962), utilizando o reagente cloreto de bário-gelatina.

Amostras contendo 2 mg do material sulfatado (Fração II sulfatada) foram hidrolisadas com 2 mL de ácido clorídrico 2 M por 5 horas a 100°C. Após o procedimento de hidrólise, uma alíquota de 0,2 mL do hidrolisado foi adicionada a 3,8 mL de TCA a 3% (m/v) e a 1 mL de solução protetora recém preparada. Para o preparo da solução protetora, dissolveu-se 6 g de cloreto de sódio em 20 mL de água destilada com 0,5 mL de HCl concentrado e 2,5 mL de gelatina a 1% (m/v). A mistura reacional foi agitada por 1 minuto e deixada em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo na sequência realizada a leitura em espectrofotômetro a 360 nm.

A determinação do D.S foi feita utilizando a seguinte fórmula:

$D.S. = 162 \times S / (3200 - 102 \times S)$ para hexoses, onde:

162 – representa 1 mol da unidade repetitiva (hexose);

3200 – representa a massa atômica do enxofre (S), (32g x 100);

102 – representa 1 mol do éster substituinte (SO_3Na)⁻¹;

S – representa o teor de enxofre em porcentagem.

A porcentagem de enxofre nas moléculas oligossacarídicas foi determinada utilizando a relação descrita previamente por Whistler e Spencer (1964), apresentada a seguir:

$$\%S = [\text{BaSO}_4 (\mu\text{g})] \times 0,1374 \times 100 / [\text{massa da amostra sulfatada} (\mu\text{g})]$$

O teor de enxofre foi determinado por meio da relação com uma curva de calibração de íons sulfato (0,005 g%) na faixa de concentração de 20 a 180 μg .

4.8 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *in vitro*

O potencial anticoagulante da mistura de oligossacarídeos sulfatados foi analisado pelos testes clássicos para determinação da atividade anticoagulante, TT (tempo de trombina), PT (tempo de protrombina) e aPTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) seguindo os protocolos de execução dos Kits da marca In Vitro diagnóstica. Para os testes, utilizou-se de heparina sódica (5000 UI/mL) como padrão e solução salina fisiológica (0,9% m/v).

Os ensaios foram efetuados com amostras dos oligossacarídeos sem sulfatar (Fração II), dos oligossacarídeos sulfatados (Fração II sulfatada), e do padrão heparina, solubilizados em solução salina fisiológica. O plasma foi obtido por meio da centrifugação de sangue de doadores saudáveis (1000xg, 20 minutos). Para os controles, adicionou-se salina fisiológica ao plasma sanguíneo em uma proporção de 1:10 (10 μL de salina e 90 μL do plasma), mantendo-se esta proporção para as diferentes concentrações testadas de acordo com a Tabela 1, apresentada a seguir:

Tabela 1: Concentrações das amostras e do padrão para os ensaios da atividade anticoagulante TT,PT e aPTT.

Fração II	Fração II sulfatada	Heparina
1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/MI
5 µg/mL	5 µg/mL	2 µg/mL
10 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL
15 µg/mL	15 µg/mL	
20 µg/mL	20 µg/mL	
	30 µg/mL	
	40 µg/mL	

4.8.1 Teste de protrombina (PT)

O tempo de protrombina determina o tempo de coagulação do plasma sanguíneo após a adição de uma fonte de fator tecidual (tromboplastina) e cálcio. A tromboplastina ativa o fator VII, que quando ativado ativa o fator X, transformando protrombina em trombina, que atua sobre o fibrinogênio formando assim o coágulo de fibrina (SILVA, HASHIMOTO, 2006).

Para cada tubo pré-aquecido (37 °C) adicionou-se 100 µL da mistura plasma/amostra (10 µL da amostra ou padrão - nas diferentes concentrações - ou salina 0,9% e 90 µL de plasma). Os tubos foram então incubados à 37 °C por aproximadamente 3 - 5 minutos, adicionando-se em seguida 200 µL do reagente PT, previamente aquecido e reconstituído com 2 mL de água deionizada estéril. O cronômetro foi acionado imediatamente após a adição do reagente, para que o tempo de formação do coágulo pudesse ser registrado. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.8.2 Teste de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

Trata-se do teste mais demorado, pois para tal deve ocorrer a ativação da fase-contato para posterior desencadeamento da via intrínseca da coagulação. Este teste

contém um ativador plasmático e fosfolipídios que atuam como substituintes das plaquetas. A mistura reacional deve ser recalcificada e a formação do coágulo cronometrada (VASCONCELOS, 2009).

Para cada tubo pré-aquecido (37 °C) adicionou-se 100 µL da mistura plasma/amostra (10 µL da amostra ou padrão - nas diferentes concentrações - ou salina 0,9% e 90 µL de plasma) e 100 µL do reagente específico aPTT. Os tubos foram então incubados à 37 °C por aproximadamente 3 - 5 minutos, adicionando-se em seguida 100 µL de cloreto de cálcio previamente aquecido. Os tubos foram então agitados rapidamente e o cronômetro foi acionado, para que o tempo de formação do coágulo pudesse ser registrado. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.8.3 Teste de trombina (TT)

Para este teste, uma trombina de baixa potência é adicionada ao plasma promovendo a formação do coágulo. Trata-se de um teste simples que permite avaliar as deficiências do fibrinogênio e a presença de anticoagulantes que possam interferir na conversão de fibrinogênio em fibrina (SILVA, HASHIMOTO, 2006).

Para cada tubo pré-aquecido (37 °C) adicionou-se 200 µL da mistura plasma/amostra (20 µL da amostra ou padrão - nas diferentes concentrações - ou salina 0,9% e 180 µL de plasma). Os tubos foram então incubados à 37 °C por aproximadamente 3 - 5 minutos, adicionando-se em seguida 100 µL do reagente RGT. O cronômetro foi acionado imediatamente após a adição do reagente, para que o tempo de formação do coágulo pudesse ser registrado. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Figura 10: Fluxograma das etapas de obtenção e purificação dos oligossacarídeos do EPSmanga.

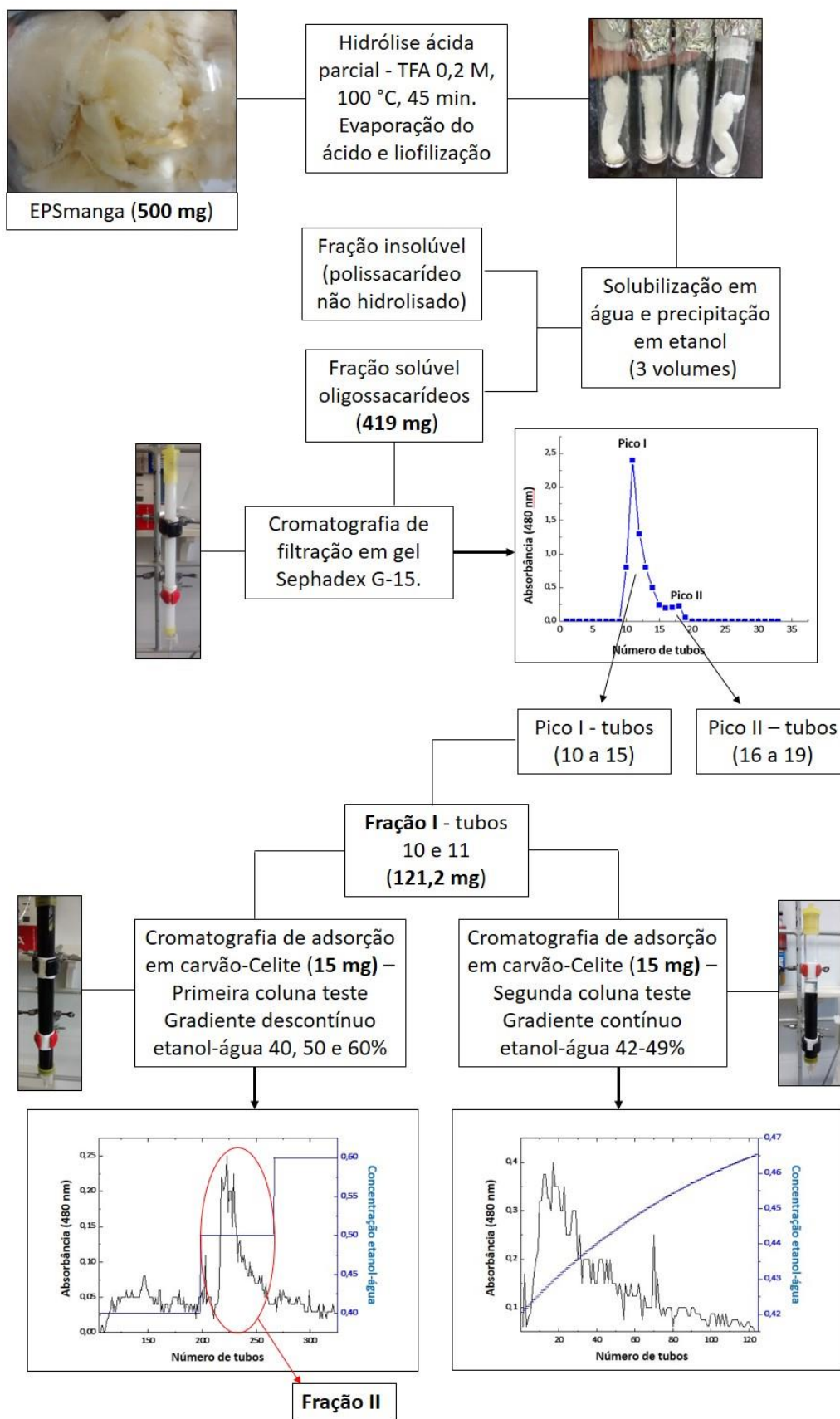
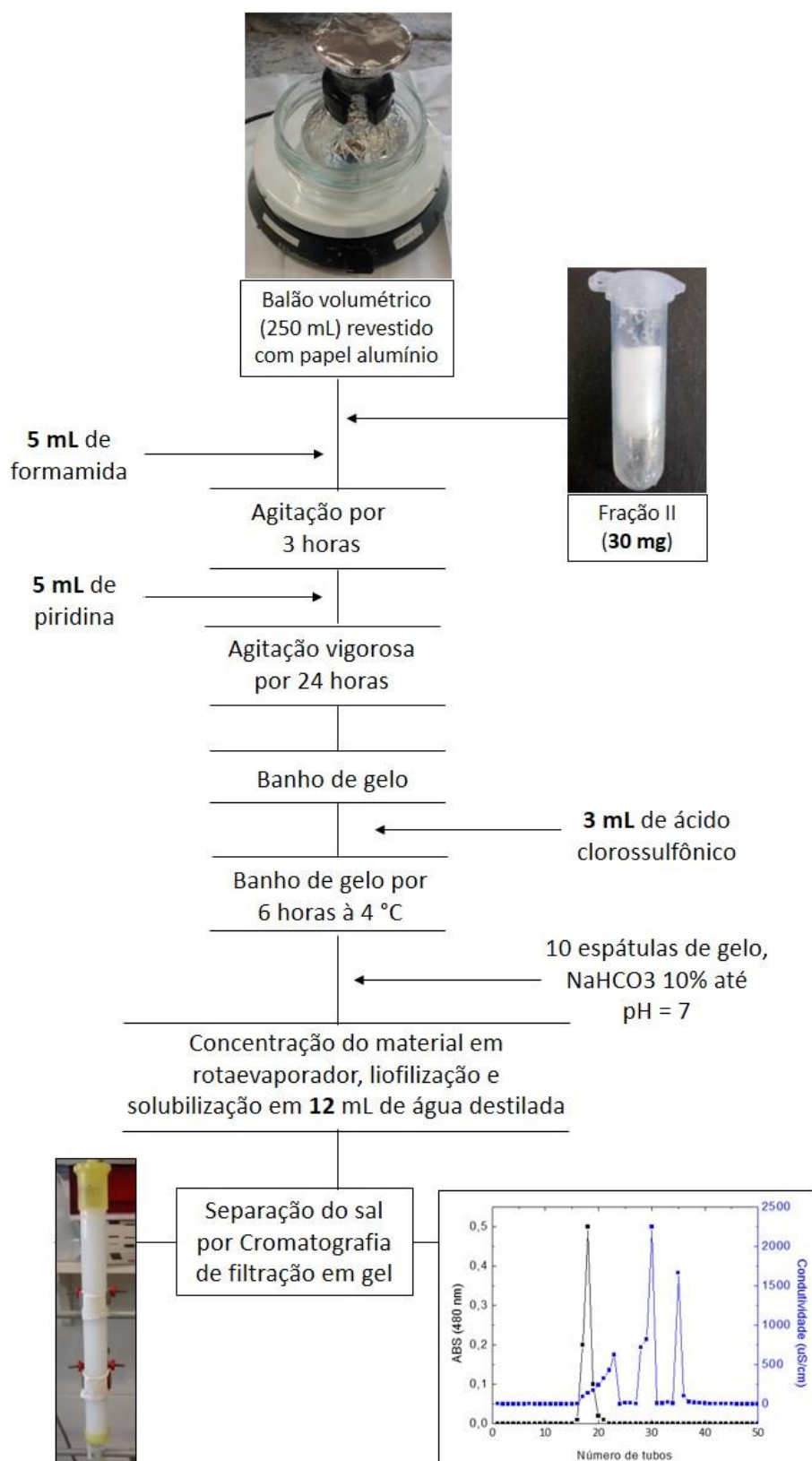


Figura 11: Fluxograma do procedimento de sulfatação.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oligossacarídeos constituem uma classe de moléculas biologicamente ativas de grande importância e os efeitos positivos dessas moléculas funcionais sobre a saúde humana vêm sendo progressivamente investigados.

Alguns oligossacarídeos têm demonstrado uma variedade de efeitos no sistema imune desempenhando ação imunomoduladora e antitumoral (JIAO et al., 2014). Gluco-oligossacarídeos bioativos provenientes de glucanas β -(1 \rightarrow 3) têm sido reportados na literatura como agentes imunomoduladores e promotores de respostas anti-inflamatórias, através da mediação de células do sistema imune, por meio da indução de mediadores pró- e anti-inflamatórios. O mecanismo de ação anti-tumoral, por sua vez, vêm sendo associado à ativação de células “*natural killer*” induzindo a respostas imunológicas (BARBOSA, DEKKER, GIESE, 2010; PANG et al., 2005).

Entretanto, poucos oligossacarídeos são produzidos naturalmente, desta forma, estratégias vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de produzir estes oligômeros por despolimerização de polissacarídeos ou por meio de síntese. Geralmente mecanismos de despolimerização são empregados por degradação química, física ou enzimática, a partir dos polissacarídeos originais (COURTOIS et al., 2009; DELATTRE et al., 2005).

Com o advento da crescente busca pela funcionalização de polissacarídeos e diante da disponibilidade das β -glucanas neste laboratório, isoladas a partir de cultivos efetuados por Vasconcelos e colaboradores (2008), o presente estudo investiga a obtenção de oligômeros com diferentes graus de polimerização a partir da hidrólise ácida parcial dos polissacarídeos, bem como a purificação por métodos cromatográficos, para a obtenção de moléculas biologicamente ativas.

5.1 CURVA DE HIDRÓLISE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Há poucos relatos na literatura sobre a obtenção de oligossacarídeos por meio de hidrólise ácida parcial. Alguns inconvenientes como não seletividade na quebra de ligações glicosídicas, fazem com que as reações de hidrólise ácida sejam muitas vezes difíceis de serem controladas, gerando frequentemente quantidades indesejadas de

monossacarídeos e outros produtos adversos (DELETTRE et al., 2005). A grande vantagem na utilização deste método está na possibilidade do uso de elevadas temperaturas, promovendo uma maior fluidez do material a ser hidrolisado, o que não é possível para a hidrólise enzimática, que apresenta como inconveniente a impossibilidade de serem realizadas à temperaturas acima de 40 °C (SILVA et al., 2005).

A despolimerização de moléculas contendo essencialmente açúcares neutros como glucanas, fucanas e galactanas pode ser realizada por métodos de hidrólise ácida utilizando ácidos diluídos (até 2 M) como HCl, H₂SO₄, TFA, fórmico ou nitroso, sob temperatura de 50 a 100 °C. Esse tipo de procedimento também é utilizado para determinar a composição e estrutura de polissacarídeos por meio de despolimerização total (COURTOIS et al., 2009; DELATTRE et al., 2005).

A velocidade com que as ligações glicosídicas dos polissacarídeos são quebradas, por meio de hidrólise, depende de alguns fatores que estão relacionados principalmente ao tipo e configuração das ligações glicosídicas e estrutura dos resíduos monossacarídicos. De modo geral, os polissacarídeos constituídos por ligações do tipo β são mais resistentes à hidrólise do que aqueles formados por ligações do tipo α . As ligações do tipo (1 \rightarrow 2) são mais susceptíveis à quebra do que ligações do tipo (1 \rightarrow 3), que por sua vez hidrolisam mais rapidamente que ligações do tipo (1 \rightarrow 6) (CHAPLIN, KENNEDY, 1994).

O procedimento de hidrólise adotado deve ser capaz de gerar oligossacarídeos com grau de polimerização suficiente para preservar a conformação da molécula original, pois o tamanho está intimamente relacionado com a ação dessas moléculas no sistema imunológico. Alguns estudos indicam que oligossacarídeos que são constituídos de seis unidades monossacarídicas ou mais, mantêm ou até mesmo melhoram as propriedades biológicas do polissacarídeo original, devido a maior solubilidade (BLAND, KESHAVARZ, BUCKE, 2004; GIESE et al., 2011).

Grandpierre e colaboradores (2008) obtiveram uma grande variedade de oligoglucanas β -(1 \rightarrow 3), através de hidrólise ácida parcial utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 1 M, durante 24 horas, sob temperatura de 60 °C. Outros estudos relatam a produção de oligossacarídeos utilizando tempos reacionais menores. Segundo Samuelson e colaboradores (1999) uma grande quantidade de oligossacarídeos com alta massa

molecular podem ser gerados por hidrólise ácida parcial usando TFA 0,1 M, por 1 hora à 100 °C.

O presente trabalho investigou, inicialmente, a hidrólise ácida parcial de três exopolissacarídeos (EPSmanga, EPSgraviola e EPSlaranja) secretados por 3 cepas do fungo *Lasiodiplodia theobromae* (VASCONCELOS et al., 2008).

Para a obtenção da condição ideal de hidrólise ácida parcial desses polímeros, foram realizadas curvas de hidrólise. A utilização do ácido TFA foi feita devido à vantagem de o mesmo poder ser removido por evaporação (por tratar-se de um composto bastante volátil) após o procedimento de hidrólise, eliminando a etapa de neutralização com NaOH ou BaCO₃, que se faz necessária quando outros tipos de ácidos são utilizados, como HCl e H₂SO₄ (CHOW et al. 2005; DI et al., 2003; FU et al., 2015; ZHANG, H. et al, 2016). Foi adotada uma concentração de TFA 0,2 M e temperatura de hidrólise de 100 °C, parâmetros estes que se mostraram eficientes para a geração de oligômeros por Silva e colaboradores (2008).

Ao término do tempo de reação, algumas amostras continham material insolúvel em suspensão, sendo por esse motivo, submetidas à centrifugação, para que estas porções insolúveis pudessem ser separadas. Os hidrolisados, submetidos à precipitação em etanol absoluto, geraram duas frações, uma contendo os componentes de pequena massa molecular (oligossacarídeos) que permaneceram solúveis em etanol, constituindo o sobrenadante, e outra na forma de precipitado, contendo os polissacarídeos residuais modificados.

As amostras solúveis contendo os oligossacarídeos foram solubilizadas em água destilada após remoção do etanol, para que pudessem ser quantificadas quanto a açúcares totais pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), um método colorimétrico de quantificação que envolve a ação de um ácido concentrado (H₂SO₄) sobre a amostra analisada, causando a hidrólise de todas as ligações glicosídicas, seguida pela desidratação das espécies monossacarídicas formadas, gerando derivados furfurais de coloração alaranjada (CHAPLIN, KENNEDY, 1994).

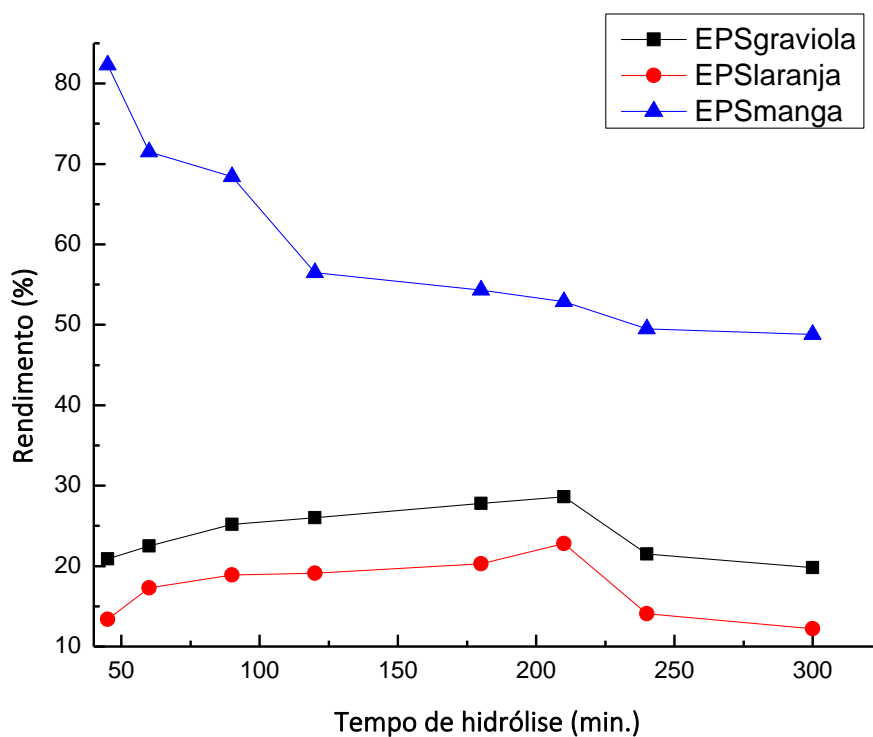
Os exopolissacarídeos utilizados como substratos para esse trabalho apresentavam, a princípio, aproximadamente 95% de carboidratos e menos de 5% de proteínas (VASCONCELOS et al., 2008). As quantificações de açúcares totais para cada material

hidrolisado, nos diferentes tempos de hidrólise, encontram-se na Tabela 2 e Figura 12, apresentados a seguir:

Tabela 2: Quantificação de açúcares totais dos sobrenadantes etanólicos, após hidrólise ácida parcial dos EPS produzidos pelo *L. theobromae* isolado dos frutos graviola, laranja e manga. Amostras de 1 mg foram hidrolisadas em diferentes tempos (minutos) com TFA 0,2 M à 100 °C.

Tempo de Hidrólise (min.)	45	60	90	120	180	210	240	300
Quantidade de hidrolisado EPSgraviola (µg)	209	225	252	260	278	286	215	198
Quantidade de hidrolisado EPSlaranja (µg)	134	173	189	191	203	228	141	122
Quantidade de hidrolisado EPSmanga (µg)	823	715	684	565	543	529	495	488

Figura 12: Rendimento de material hidrolisado a partir dos respectivos EPS, nos diferentes tempos de hidrólise.



Os resultados mostrados na tabela acima indicam que, nas condições utilizadas neste trabalho, tanto o EPSgraviola quanto o EPSlaranja, não foram bons substratos para produção de oligossacarídeos, provavelmente pela dificuldade de solubilização desses materiais, mesmo sob agitação vigorosa e temperatura elevada. A solubilização ineficiente pode ter contribuído para a baixa produção dos oligômeros, já que o material se encontrava majoritariamente insolúvel no meio, dificultando sua degradação.

O melhor tempo de hidrólise para o EPSgraviola e EPSlaranja, de acordo com a quantificação de açúcares totais, foi de 210 minutos, produzindo, nestas condições, cerca de 286 µg de hidrolisado (EPSgraviola) e 228 µg de hidrolisado (EPSlaranja), o que representa 28,6% e 22,8 %, respectivamente, em relação à quantidade de material inicial (1 mg).

Nas condições estudadas (0,2 M de TFA, 100 °C), o EPSmanga foi o melhor substrato para a obtenção de oligossacarídeos. No tempo de 45 minutos foram obtidos 823 µg de hidrolisado, o que representa um rendimento de 82,3% em relação à quantidade de polissacarídeo empregada (1 mg).

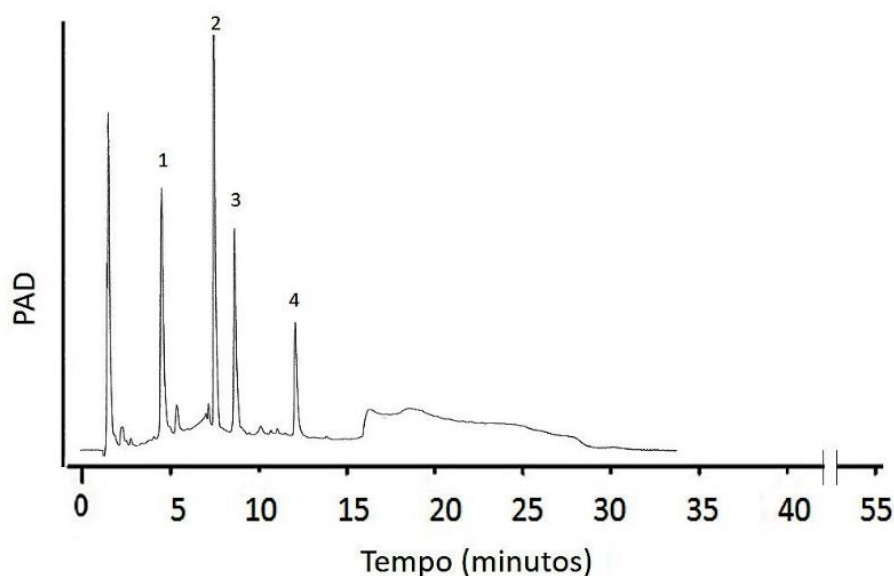
Entretanto, as amostras hidrolisadas precisavam ser investigadas quanto às espécies geradas, ou seja, o tempo necessário de reação para que oligossacarídeos com maior DP fossem produzidos. Portanto, as amostras hidrolisadas foram analisadas por cromatografia líquida de troca aniônica (HPAEC- High Performance Anionic Exchange Chromatography) em colunas CarboPac, que permitem a separação e análise efetiva de monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Tais colunas são compostas por uma resina polimérica não porosa, MicroBead, aglomeradas com aminas quaternárias funcionalizadas (TECHNICAL NOTE 20, 1993).

Na análise por HPAEC/PAD, os açúcares presentes na amostra são separados em uma coluna de troca aniônica, a um pH alcalino. A coluna com resina de troca aniônica é usada para separar analitos aniônicos ou espécies ionizadas a elevados valores de pH, como os carboidratos. Desta forma, a HPAEC utiliza eluentes com pH elevado, a base de hidróxidos, para gerar ânions a partir de espécies não aniônicas quando em pH neutro. A análise é seguida por detecção amperométrica pulsada (PAD), onde os grupos OH⁻ ligados aos carboidratos são oxidados sob uma superfície de eletrodo de ouro e a corrente de impulsos gerada é medida (ROHNER, 1993; TERMO SCIENTIFIC, 2016; YOKOTA et al.,

1999). A separação de oligossacarídeos por HPAEC/PAD requer, no entanto, o uso de uma alta concentração de hidróxido de sódio e acetato de sódio, para que os analitos sejam removidos completamente da resina da coluna (DAVIES et al., 1993).

A Figura 13 apresenta o cromatograma da mistura de padrões - glucose, gentiobiose (glucose $\beta(1\rightarrow6)$ glucose), laminaribiose (glucose $\beta(1\rightarrow3)$ glucose) e laminaritriose (laminaribiose $\beta(1\rightarrow3)$ glucose), indicados, respectivamente, como picos 1, 2, 3 e 4, nas mesmas condições de análise, utilizada para o estudo dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida dos exopolissacarídeos.

Figura 13: Análise por HPAEC/PAD da mistura de padrões de glucose (1), gentiobiose (2), laminaribiose (3) e laminaritriose (4) com RT (min) de 4,60, 7,62, 8,80 e 12,38, respectivamente. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos.



As figuras abaixo (14, 15 e 16), apresentam os resultados das análises por HPAEC/PAD, dos hidrolisados obtidos dos EPSgraviola, EPSlaranja e EPSmanga, nos diferentes tempos de hidrólise.

Figura 14: Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado proveniente do EPSgraviola (TFA 0,2 M, 100 °C), nos diferentes tempos, indicados na figura. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenção dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicada: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.

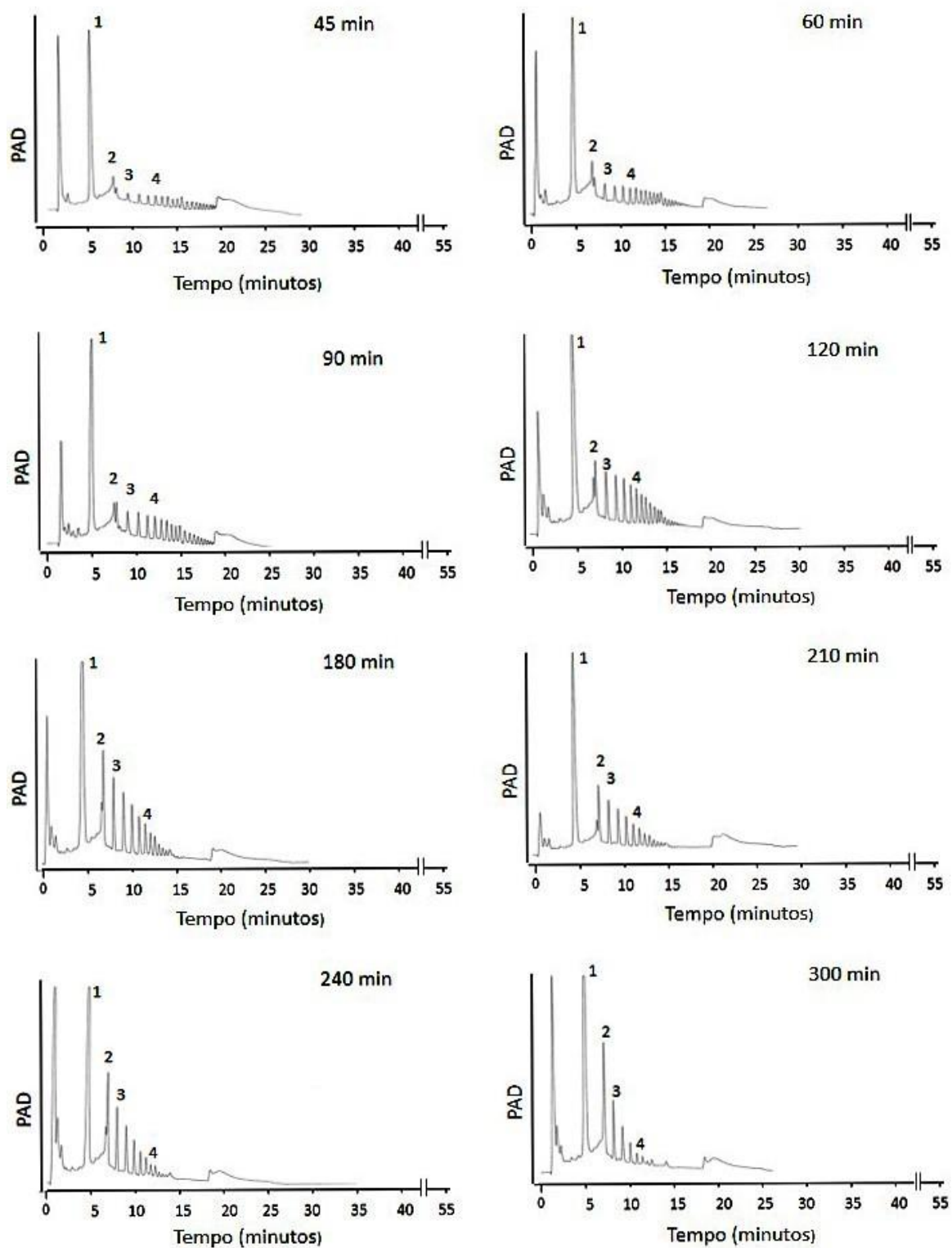


Figura 15: Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado proveniente do EPSlaranja (TFA 0,2 M, 100 °C), nos diferentes tempos, indicados na figura. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenção dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.

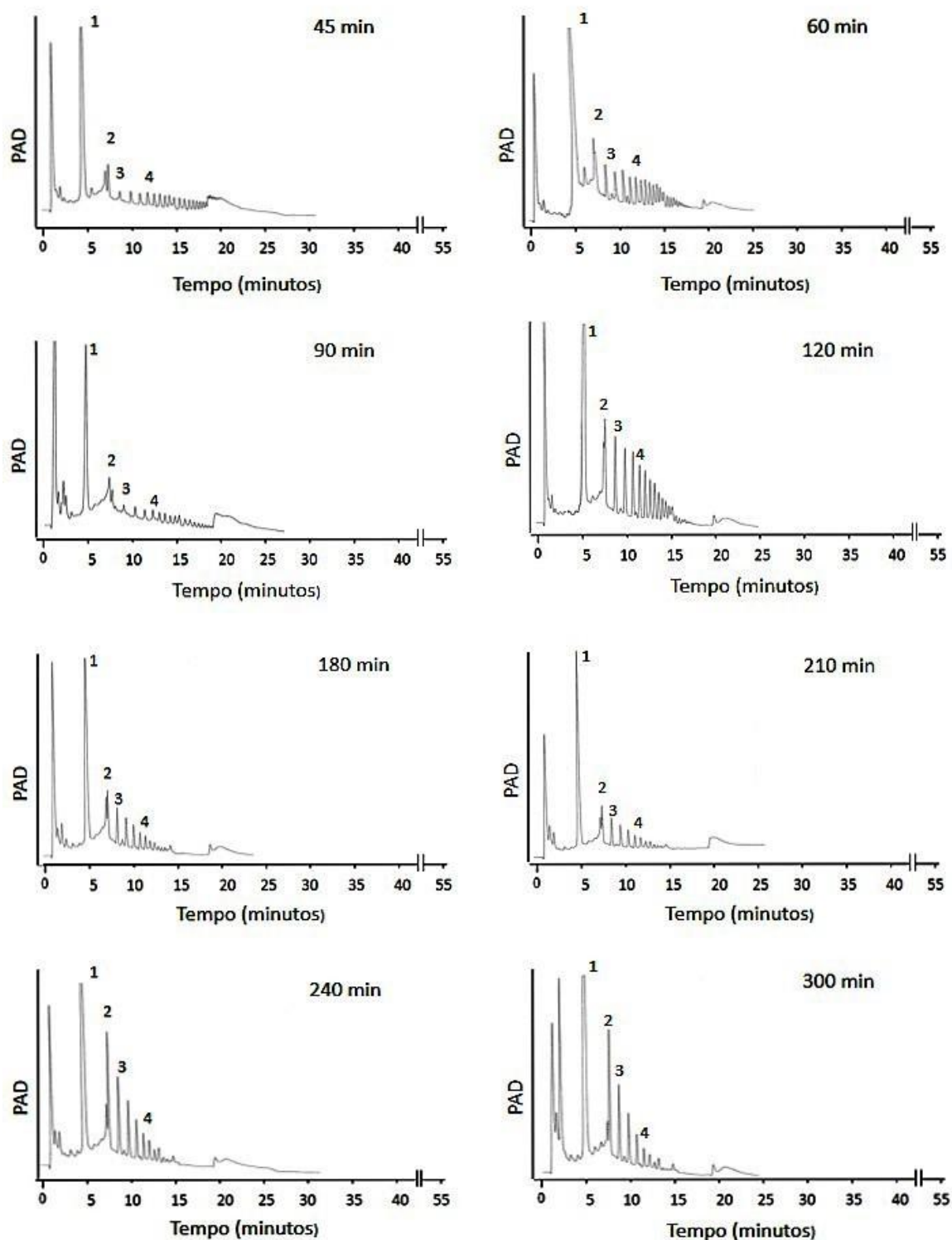
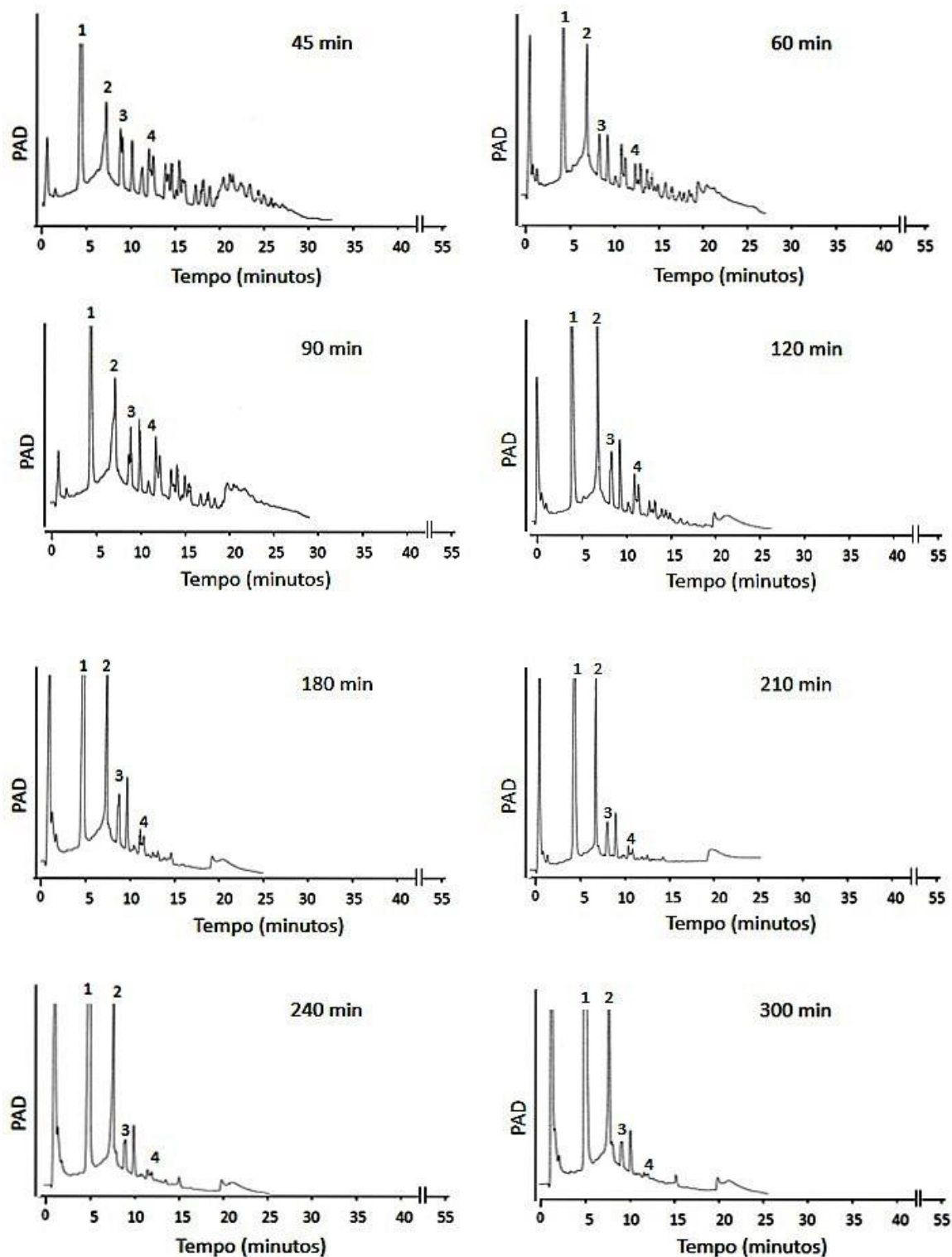


Figura 16: Análise por HPAEC/PAD do hidrolisado proveniente do EPSmanga (TFA 0,2 M, 100 °C), nos diferentes tempos, indicados na figura. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenção dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.



Por comparação dos tempos de retenção dos padrões (Figura 13), os resultados das análises referentes aos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial mostram que os tempos de 45 a 120 minutos foram capazes de gerar fragmentos com maior DP, em maior quantidade, quando comparado a tempos superiores a 120 minutos. As hidrólises com tempos de 180 a 300 minutos produziram uma menor quantidade de oligossacarídeos com maior DP e isso se deve, provavelmente, à degradação desses em moléculas de baixo peso molecular, como mono e dissacarídeos, em função do maior tempo da reação.

O diferente comportamento dos três EPS frente às mesmas condições de hidrólise pode, como dito anteriormente, estar relacionado com a solubilidade da solução polissacarídica que, quanto mais viscosa, mais inacessível à reação. Vale ressaltar que o tipo de ligação glicosídica envolvendo os monossacarídeos da macromolécula pode estar intimamente relacionado à velocidade de formação dos respectivos oligossacarídeos por hidrólise ácida parcial. Sendo assim, a formação de uma alta quantidade de oligômeros com massas moleculares pequenas pode indicar que a molécula nativa seja composta por ligações glicosídicas mais susceptíveis às condições de hidrólise utilizadas, gerando fragmentos menores. Em contrapartida, a formação de oligossacarídeos com massas moleculares maiores, sob as mesmas condições, pode indicar a presença de ligações glicosídicas mais resistentes. Dessa forma, a formação de oligossacarídeos maiores pelo EPSmanga pode indicar que o mesmo seja constituído por ligações glicosídicas de caráter mais forte.

As glucanas secretadas pelos fungos são de mesma natureza química que as da parede celular: β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6) e β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6), sendo geralmente a última presente em maior quantidade. Essas moléculas, quando secretadas para defesa das células fúngicas, formam grandes complexos moleculares que raramente podem ser separados como moléculas puras. A quantidade de hidroxilas presentes nos açúcares permite que um número muito grande de ligações de hidrogênio seja efetuado, tanto intra- quanto intermolecular. Essas ligações consideradas individualmente fracas, quando em conjunto tornam-se fortes e raramente são desfeitas, sob condições que preservem as ligações glicosídicas. Portanto há possibilidade que embora os EPS produzidos pelo mesmo micro-organismo (*Lasiodiplodia theobromae*), nas mesmas condições de cultivo e sob às

mesmas condições de hidrólise, apresentem um comportamento diferente, que pode ser atribuído a diferentes percentuais das três glucanas no material secretado. Nas β -glucanas as ligações 1 \rightarrow 6 são menos lábeis que as 1 \rightarrow 3.

De acordo com os cromatogramas apresentados foi selecionado para estudo o EPSmanga. O tempo de hidrólise de 45 minutos foi escolhido porque além de gerar mais fragmentos hidrolisados (~83%), os resultados por HPAEC/PAD mostram que a relação percentual entre mono- e oligossacarídeos é menor, favorecendo a presença de moléculas com maior DP.

Estabelecida a melhor condição de hidrólise ácida parcial para obtenção de oligossacarídeos a partir do EPS manga (0,2 M de TFA, 100 °C, 45 minutos), partiu-se para uma produção em maior escala do material de interesse. Foram hidrolisados cerca de 500 mg sob as condições acima. Da massa total, obteve-se aproximadamente 419 mg de hidrolisado (fração sobrenadante, após precipitação em etanol) que foi submetido à purificação por cromatografia.

A formação de monossacarídeos e oligossacarídeos de pequena massa molecular nos procedimentos de hidrólise ácida torna o uso de métodos de separação e purificação imprescindíveis (DELETTRE et al., 2005). Foram, então, selecionados dois métodos para a purificação dos fragmentos oligossacarídicos produzidos, sendo a cromatografia de filtração em gel, utilizando o gel Sephadex G-15, adotada como primeiro procedimento.

5.2 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL – COLUNA DE SEPHADEX G-15

A cromatografia de filtração em gel consiste em uma técnica de separação de moléculas de acordo com a ordem decrescente de suas massas moleculares. É empregada para a purificação de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas e polissacarídeos. A fase estacionária consiste em partículas de gel inerte, que possuem pequenos poros com tamanho determinado (BOYER, 1993). O gel Sephadex G-15 possui uma faixa de fracionamento de 0 a 1500 daltons para carboidratos (BOYER, 1993; CHAMBERS, RICKWOOD, 1993), sendo, portanto, considerado adequado para uma separação parcial dos fragmentos oligossacarídicos gerados por hidrólise ácida parcial.

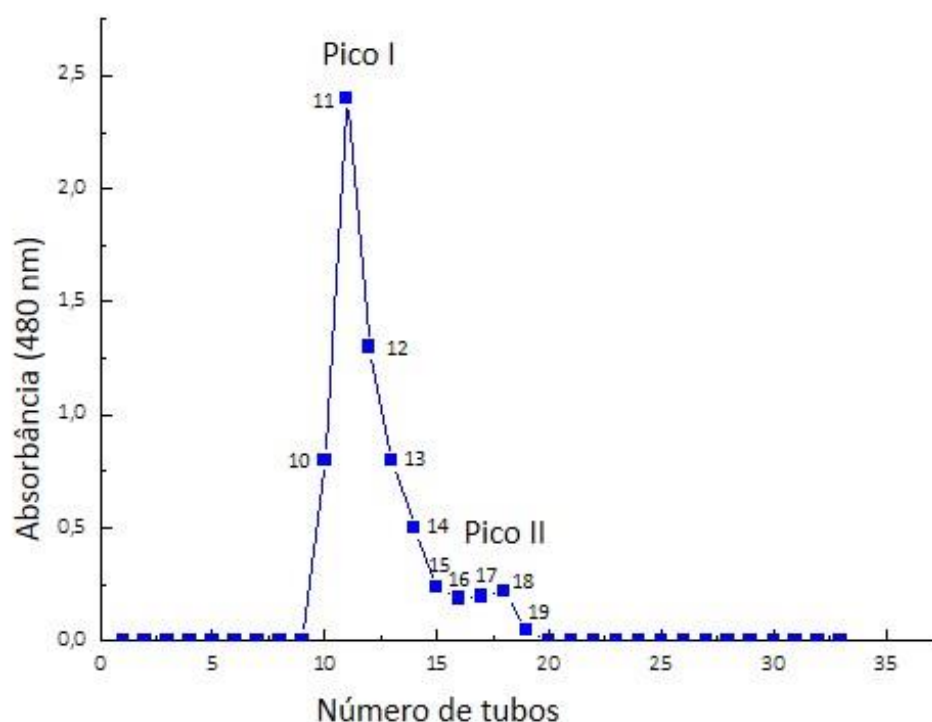
Uma amostra contendo moléculas de vários tamanhos elui pela coluna sob a interferência de um fluxo contínuo da fase móvel. As moléculas da amostra que possuem tamanhos superiores ao limite superior da faixa de fracionamento do gel, não penetram nos poros do gel, limitando-se aos espaços entre suas partículas, sendo excluídas mais rapidamente da coluna, arrastadas pela fase móvel. As moléculas menores, no entanto, são capazes de se difundirem para dentro e para fora dos poros do gel, tendo a eluição atrasada ao longo da coluna (BOYER, 1993).

Gutiérrez e colaboradores (1996) utilizaram a filtração em gel Sephadex G-15 para separar moléculas de glucose quimicamente modificados. As frações coletadas quando quantificadas pelo método fenol-ácido sulfúrico, geraram um cromatograma cujo perfil de eluição apresentou dois picos, um deles com menor tempo de retenção, composto por moléculas maiores, e outro, contendo monossacarídeos livres ou não modificados.

A cromatografia de filtração em gel foi usada por Moniz e colaboradores (2014) para a separação de uma mistura de xilo-oligossacarídeos, utilizando gel Superdex 30. Foram obtidas frações de xilo-oligossacarídeos purificados, de acordo suas massas moleculares, desde pequenos oligossacarídeos com $DP \geq 3$ até moléculas com $DP \geq 23$, as moléculas menores como os monossacarídeos foram as últimas a serem eluídas, logo depois dos dissacarídeos, sendo os oligossacarídeos com maior massa molecular os primeiros a eluírem da coluna.

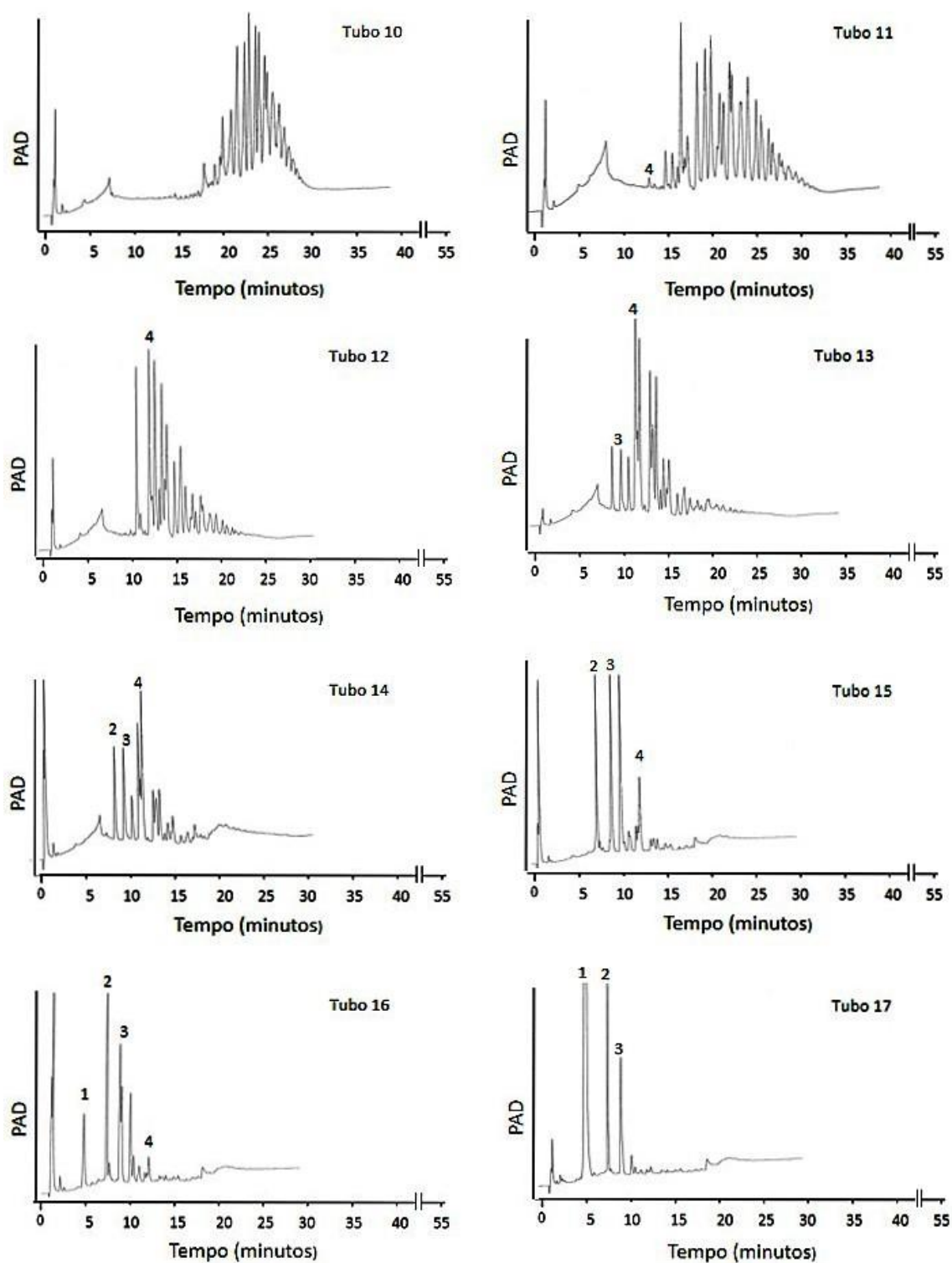
Todo o material hidrolisado obtido do EPSmanga, foi submetido à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15, à cada coluna foram aplicados 10 mg do material e, de acordo com quantificações pelo método fenol-ácido sulfúrico, foram eluídos dois picos para cada coluna, denominados I e II (Figura 17).

Figura 17: Cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 do hidrolisado ácido parcial (TFA 0,2 M, 100 °C, 45 minutos) do EPSmanga. Fluxo: 0,45 mL/min., frações coletadas: 2 mL/tubo, eluente: água destilada, material aplicado: 10 mg do hidrolisado, volume da coluna: 72 mL.



De acordo com o perfil de eluição apresentado e considerando o princípio de separação do método, podemos inferir, previamente, que o Pico I contém as moléculas maiores e o Pico II as moléculas menores. Esta suposição pôde ser confirmada pela análise das alíquotas de cada fração (tubo) constituinte dos dois picos. A Figura 18 mostra os resultados das análises por HPAEC/PAD dos tubos 10 ao 17, constituintes do Picos I e II. Os tubos 18 e 19, por sua vez, apresentaram perfil semelhante ao tubo 17, com predominância de mono e dissacarídeos.

Figura 18: Análise por HPAEC/PAD das frações constituintes dos Picos I e II, provenientes da Cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15. Condição de análise: Coluna CarboPac PA1, gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos tempos de retenções dos padrões (vide Figura 13). Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.

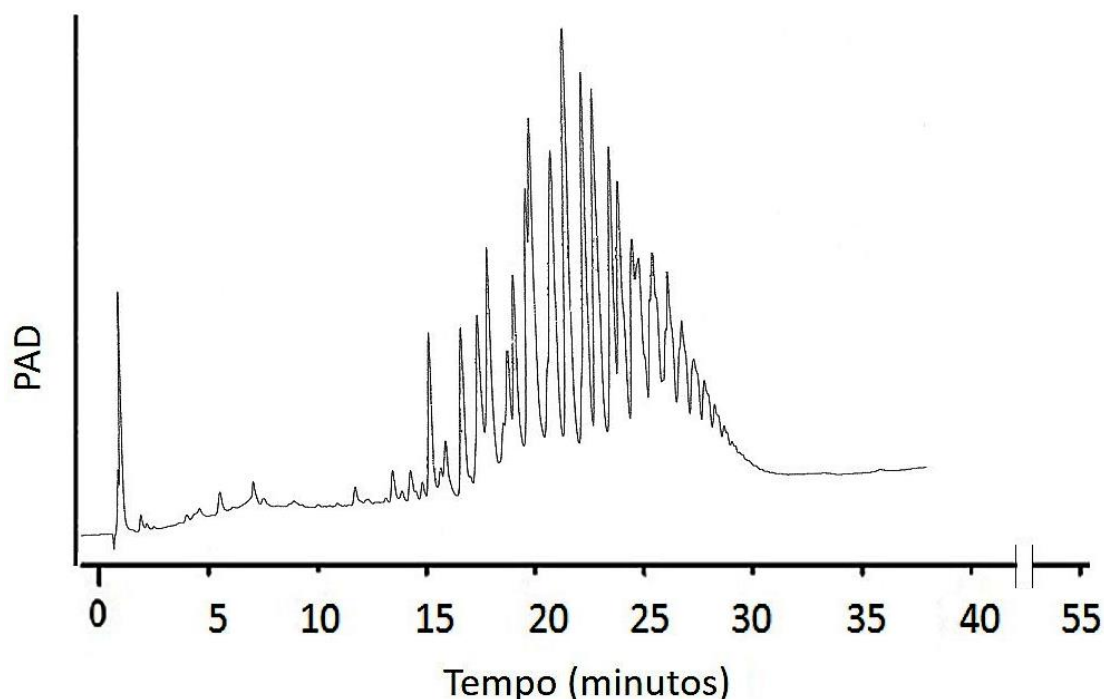


As análises por HPAEC/PAD confirmam que fragmentos oligossacarídicos maiores estavam presentes nas primeiras frações do Pico I (10, 11 e 12) seguido por oligossacarídeos menores (frações 13, 14, 15 e 16), apresentando por fim principalmente glucose, nas frações referentes ao Pico II (17, 18 e 19). Portanto, apesar da cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 não ser eficiente para a separação de uma série homóloga de oligossacarídeos, geralmente formados por hidrólise ácida parcial, foi capaz de separar mono- e dissacarídeos de moléculas maiores.

As frações correspondentes aos tubos 10 e 11, pertencentes ao Pico I, que se mostraram semelhantes por HPAEC/PAD, foram reunidas e denominadas de Fração I. Os demais tubos eluídos, foram liofilizados e armazenados.

Cerca de 121,2 mg de material referente à Fração I (Figura 19) foram utilizados para a cromatografia de adsorção em carvão-Celite, próxima etapa da purificação.

Figura 19: Fração I referente aos tubos 10 e 11 eluídos da cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15. Coluna CarboPac PA1. Condição de análise: gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Quantidade de material aplicado: 1,3 µg de 25 µL de H₂O deionizada.



5.3 CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO – COLUNA DE CARVÃO-CELITE

A escolha da cromatografia de adsorção em carvão-Celite, como segundo método de purificação, baseia-se no fato de que ela é considerada mais eficiente para a separação de uma série homóloga de oligossacarídeos, separando oligômeros com massas moleculares muito próximas (WHISTLER, BEMILLER, 1962; WHISTLER, DURSO, 1950). Baixo custo, grande área de superfície, volume de poros e alta capacidade de adsorção do carvão ativado, tornam esse método vantajoso e eficiente (NOBRE, TEIXEIRA, RODRIGUES, 2012).

A Celite, além de sua capacidade adsorvente, também é utilizado como suporte em vários métodos cromatográficos, por possuir uma excelente resistência mecânica e por ser inerte quimicamente (YAMADA et al., 1985), favorecendo um compactamento mais uniforme do leito, evitando a ocorrência de bolhas de ar e, por consequência, irregularidades no fluxo (HORWITZ, BLOOMQUIST, 1972).

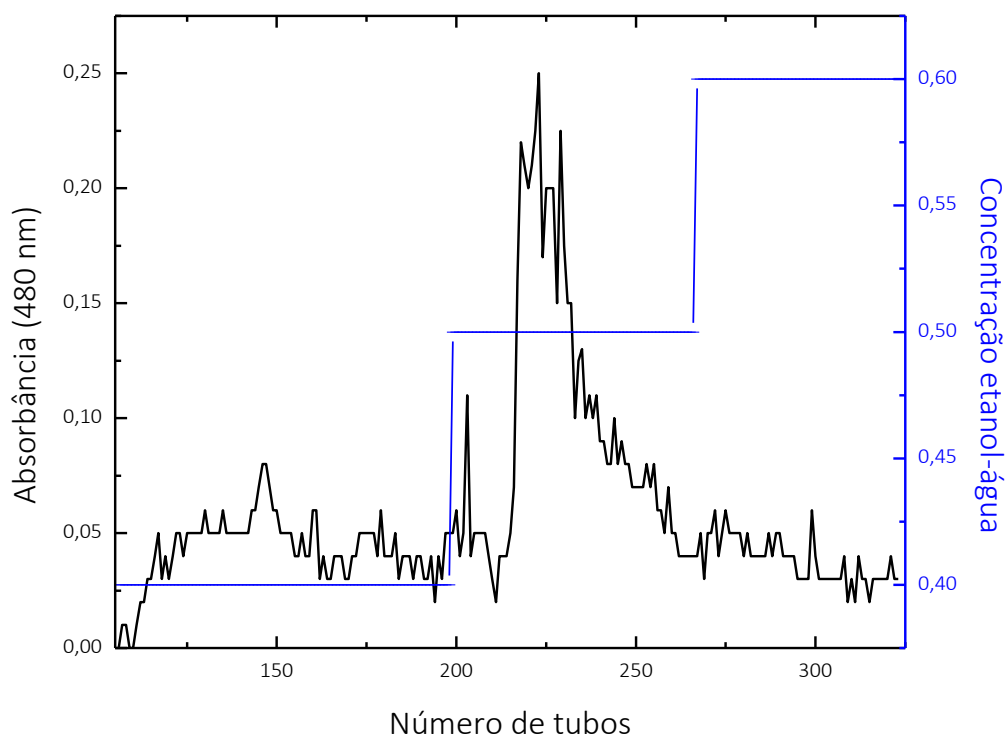
Desde que Whistler e Durso relataram em 1950 a utilização de carvão ativado combinado com Celite para separar açúcares em uma mistura, pela eluição dos mesmos por meio do uso de concentrações crescentes de etanol, alguns estudos investigaram o mesmo princípio para purificar oligossacarídeos provenientes de fontes naturais como do mel (MORALES et al., 2006) e do leite humano (PRIEM et al., 2002).

Para dar continuidade ao processo de purificação, realizou-se, inicialmente, uma primeira coluna teste para se estabelecer as condições de eluição dos oligossacarídeos presentes na Fração I. Quinze (15) mg foram aplicados à primeira coluna de carvão-Celite, sendo utilizado como fase móvel, um gradiente descontínuo de etanol-água (v/v) de 0% à 60%. As frações coletadas foram quantificadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico. As frações eluídas com água e etanol-água até 30% não removeram o material adsorvido. As concentrações de etanol-água 40% e 50% foram capazes de eluir o material adsorvido, sendo a concentração de 50% mais efetiva. A concentração de etanol-água 60%, por sua vez, foi responsável pela retirada de uma pequena quantidade de material da coluna (Figura 20).

A força da interação entre as moléculas do açúcar e as da fase estacionária (adsorvente) depende das características estruturais do açúcar. Para uma série homóloga,

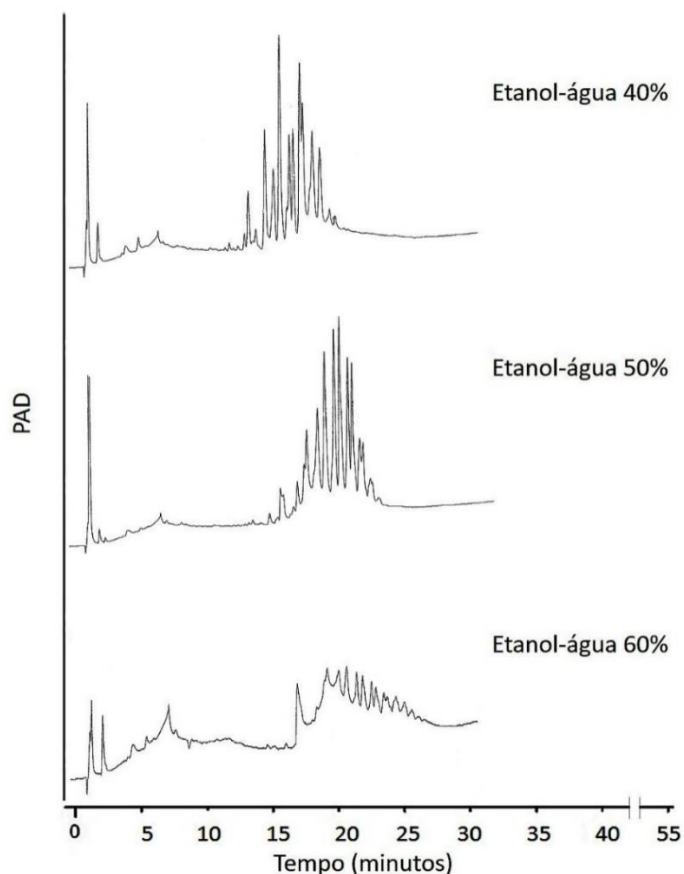
quanto maior for o tamanho da molécula, maior a concentração de etanol necessária para removê-la da fase estacionária. Desta forma, espera-se que os oligossacarídeos maiores mantenham uma interação mais forte com as partículas do carvão ativado, sendo, portanto mais difícil de serem removidas do que outras moléculas pequenas, como oligossacarídeos menores presentes na mistura (NOBRE, TEIXEIRA, RODRIGUES, 2012).

Figura 20: Primeira Coluna teste da Cromatografia de adsorção em carvão-Celite da Fração I. Fase móvel: gradiente etanol-água de 40, 50 e 60%. Fluxo: 0,1 mL/min (23 °C), Fração: 5 mL/tubo. Volume da coluna: 138 mL.



Alíquotas correspondentes às frações com as maiores absorbâncias provenientes das eluições de etanol-água 40%, 50% e 60% foram analisadas por cromatografia líquida de íons (Figura 21).

Figura 21: Análise por HPAEC/PAD das frações obtidas na primeira coluna teste da cromatografia de carvão-Celite. Coluna CarboPac PA1. Condição de análise: gradiente contínuo de 0 a 100% de 500 mM de acetato de sódio em NaOH 100 mM, 55 minutos. Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.



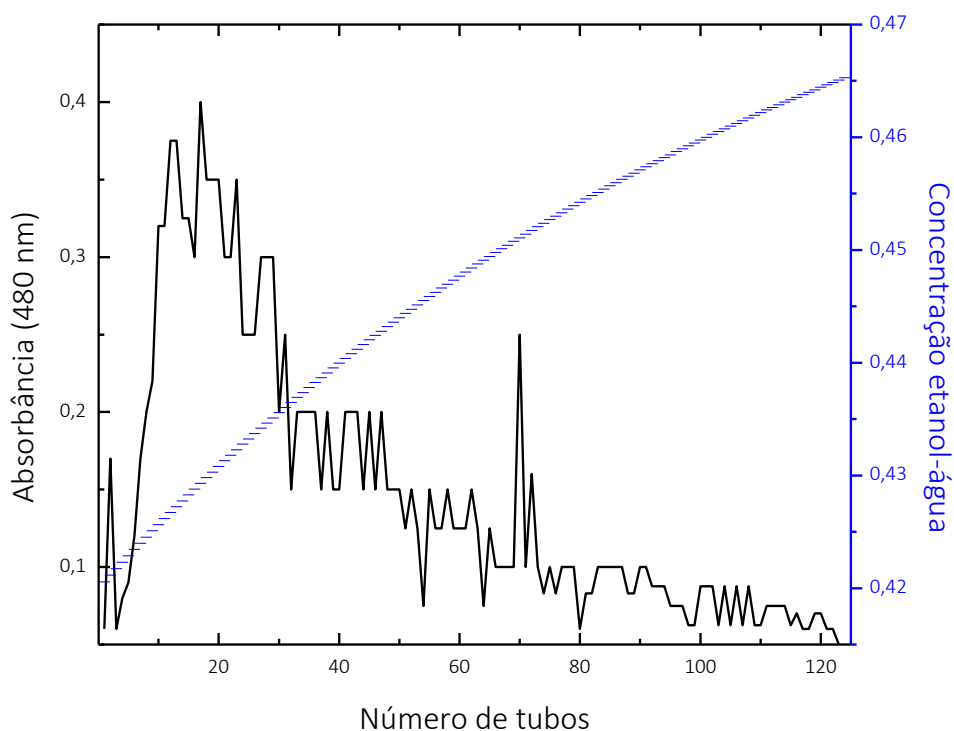
As concentrações de etanol-água 40 e 50% foram capazes de, parcialmente, separar a Fração I, entretanto a maior parte do material eluiu na fração etanol-água 50%, denominada a partir de agora de Fração II. A ocorrência de vários picos, dentro de cada concentração de eluente, indica que, provavelmente, uma sequência de oligossacarídeos com estrutura química muito semelhante permanece sem ser separada. Foi submetida uma massa total de 106 mg à cromatografia de carvão-Celite utilizando etanol-água 50%, o material remanescente obtido foi de 36 mg (Fração II).

Durante esse experimento foi observado que o fluxo da coluna diminuía significativamente com o aumento da concentração de etanol na mistura, chegando a 0,042 mL/min.

Uma segunda coluna, também preenchida com carvão-Celite, foi preparada com menor volume de leito (78 mL), para minimizar a redução do fluxo, uma condição que atrapalha a separação e consequentemente, a purificação. Nessas condições o fluxo foi mantido em 0,08 mL/min.

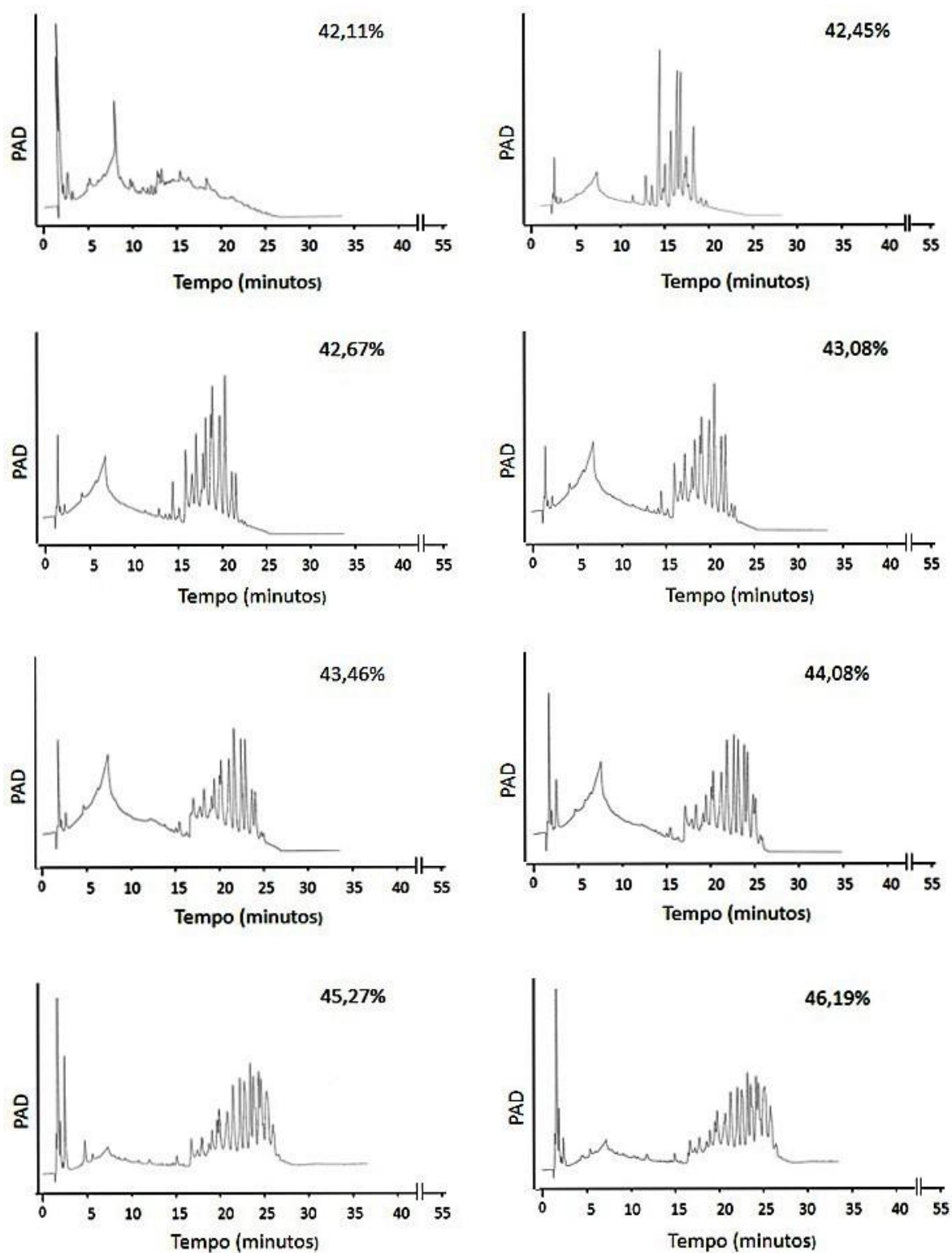
Considerando os resultados da coluna anterior que mostraram que os oligossacarídeos maiores foram desadsorvidos nas concentrações de etanol-água 50%, um gradiente contínuo etanol-água de 42 a 49% (v/v) utilizando a Fração II, foi adotado. As frações coletadas foram quantificadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Figura 22).

Figura 22: Cromatografia de adsorção em carvão-Celite da Fração II utilizando um gradiente contínuo etanol-água de 42-49%. Fluxo: 0,08 mL/min (23 °C) Volume das frações: 2,4 mL/tubo. Volume da coluna: 78 mL.



Praticamente todo o material aplicado eluiu em dois volumes da coluna (Figura 22), entretanto a maior parte foi desadsorvido entre 42,5 a 43,5% de etanol-água. Os resultados encontrados nas análises por HPAEC/PAD (Figura 23) indicam que a utilização de uma gradiente contínuo suave, para a separação, não foi eficiente.

Figura 23: Análise por HPAEC/PAD das frações obtidas na cromatografia de carvão-Celite da Fração II utilizando um gradiente contínuo etanol-água de 42-49%. Coluna CarboPac PA1. Eluição: gradiente contínuo de 0 a 100% de acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM, 55 minutos. Quantidade de material aplicado: 1,3 µg em 25 µL de H₂O deionizada.



A adsorção das espécies em estudo, pelo carvão ativado, está relacionada à natureza hidrofóbica da superfície das partículas de carvão. Assim, quanto mais hidrofóbica é uma espécie, mais adsorvida ela será pelas partículas de carvão (ABE et al., 1983). Portanto, oligossacarídeos maiores, que contêm uma maior quantidade de grupos (-CH) são mais fortemente adsorvidos pela fase estacionária, necessitando de uma concentração maior de etanol na fase móvel para serem removidos (NOBRE, TEIXEIRA, RODRIGUES, 2012).

A partir dos resultados encontrados até o momento, aventa-se a possibilidade do EPS em questão ter mais de uma série homóloga de oligossacarídeos, ou seja, o micro-organismo pode ter secretado uma mistura de β -(1→6) e β -(1→3;1→6)-D-glucana. Se essa hipótese for verdadeira os fragmentos gerados, de mesma massa molecular, mas com ligações glicosídicas diferentes serão mais resistentes a separação. Segundo Nelson e Cox (2014) a purificação de oligossacarídeos é um processo complicado, pois os mesmos podem ser ramificados e unidos por diferentes tipos de ligações glicosídicas. Entretanto, Sun e colaboradores (2002) relataram o uso da cromatografia de carvão-Celite para a separação de alguns tipos de moléculas, como xilo-oligossacarídeos com altos DP. Silva e colaboradores (2008) purificaram por cromatografias de filtração em gel e de carvão-Celite um oligossacarídeo, obtido por hidrólise ácida parcial de uma β -(1→3;1→6)-D-glucana. Os resultados das análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa mostraram que a molécula era constituída por seis unidades β -D-glucopiranosídicas substituídas em O-6. Segundo Whistler e BeMiller (1962) sempre há uma composição ideal do eluente capaz de separar os oligossacarídeos.

Entretanto, devido à dificuldade em se encontrar a condição ideal para a separação e purificação da mistura de oligossacarídeos presentes na fração II, contendo as moléculas produzidas por hidrólise ácida parcial de maior massa molecular, optou-se por derivatizar esta mistura por meio de sulfatação, a fim de se obter oligossacarídeos sulfatados bioativos e investigar a ação desses quanto à atividade anticoagulante.

5.4 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO II POR SULFATAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Polissacarídeos sulfatados podem apresentar atividade anticoagulante e antioxidante, em função de sua estrutura molecular. A manifestação dessas ações específicas está relacionada com parâmetros estruturais tais como grau de sulfatação, posição dos grupos sulfato, composição monossacarídica, massa molecular, estrutura da cadeia principal e ramificações (BOHN, BEMILLER, 1995; DUARTE et al., 2001; WANG et al., 2009).

A sulfatação de polissacarídeos neutros tem se mostrado uma alternativa eficaz para o aumento da atividade biológica. Uma β -(1 \rightarrow 4)-D-galactana foi sulfatada (XU et al., 2016) e apresentou um aumento da atividade antitumoral, em relação ao polissacarídeo original (não sulfatado), quando administrada em células de câncer de pulmão e de fígado. Glicosaminoglicanas sulfatadas (KRICHEN et al., 2017), obtidas da pele de peixes, mostraram-se como potenciais anticoagulantes, tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo*.

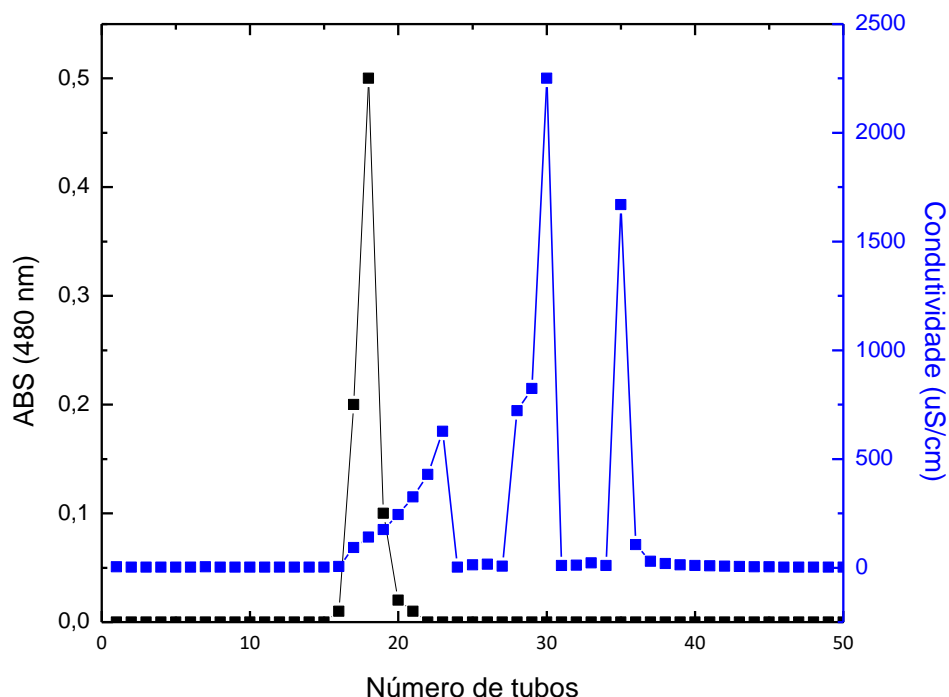
A despolimerização de polissacarídeos sulfatados também vem sendo relatada como uma proposta promissora. Käsbauer e colaboradores (2001) obtiveram por hidrólise ácida parcial (HCl 0,1 M, refluxo, 1 hora) de uma β -(1 \rightarrow 4)-D-galactana fragmentos oligossacarídicos que quando sulfatados, apresentaram ação antiangiogênica. Wang e Betti (2017) verificaram que o potencial anticoagulante de oligossacarídeos sulfatados, obtidos por hidrólise enzimática de um polissacarídeo naturalmente sulfatado, foi maior que do polímero original, sinalizando uma ação mais efetiva das moléculas menores.

A fração II, eluída pela cromatografia de adsorção em carvão-Celite com etanol-água a 50%, composta por oligossacarídeos de grau de polimerização provavelmente maior do que 5 (tempos de retenção superiores a 17 min), foi sulfatada. Um único ciclo de sulfatação foi realizado, utilizando formamida como solvente, piridina como catalisador e o ácido clorossulfônico como doador de grupos sulfato. A piridina, uma base orgânica forte, ataca nucleofilicamente as hidroxilas livres dos fragmentos oligossacarídicos e favorece a entrada dos grupos sulfato de maneira aleatória.

A sulfatação, ao final, envolve uma reação de neutralização que gera grande quantidade de sal, o qual não pode ser removido pela utilização de resinas de troca

iônica, uma vez que o material de interesse também tem grupamento ionizável fornecido pelo sulfito (SO_3^-). Para os polissacarídeos sulfatados essa etapa se faz, normalmente, pela diálise em tubos de celulose com poros de dimensões apropriadas (MWCO 10000) para a eliminação do sal e retenção do polímero. Entendendo, que esta última técnica também não pode ser aplicada aos oligossacarídeos que têm massas moleculares menores que 5 kDa, a Fração II, contendo os oligossacarídeos sulfatados, foi submetida à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15, para remoção do sal. O acompanhamento do “desalting” foi realizado pela leitura das alíquotas de cada tubo para reações do fenol-ácido sulfúrico (480 nm) e medidas da condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (Figura 24).

Figura 24: Cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 para “desalting” da Fração II sulfatada. Volume da coluna: 170 mL. fluxo: 0,55 mL/min., volume das frações: 3 mL/tubo, eluente: água destilada, quantidade material aplicado: 6 mg.

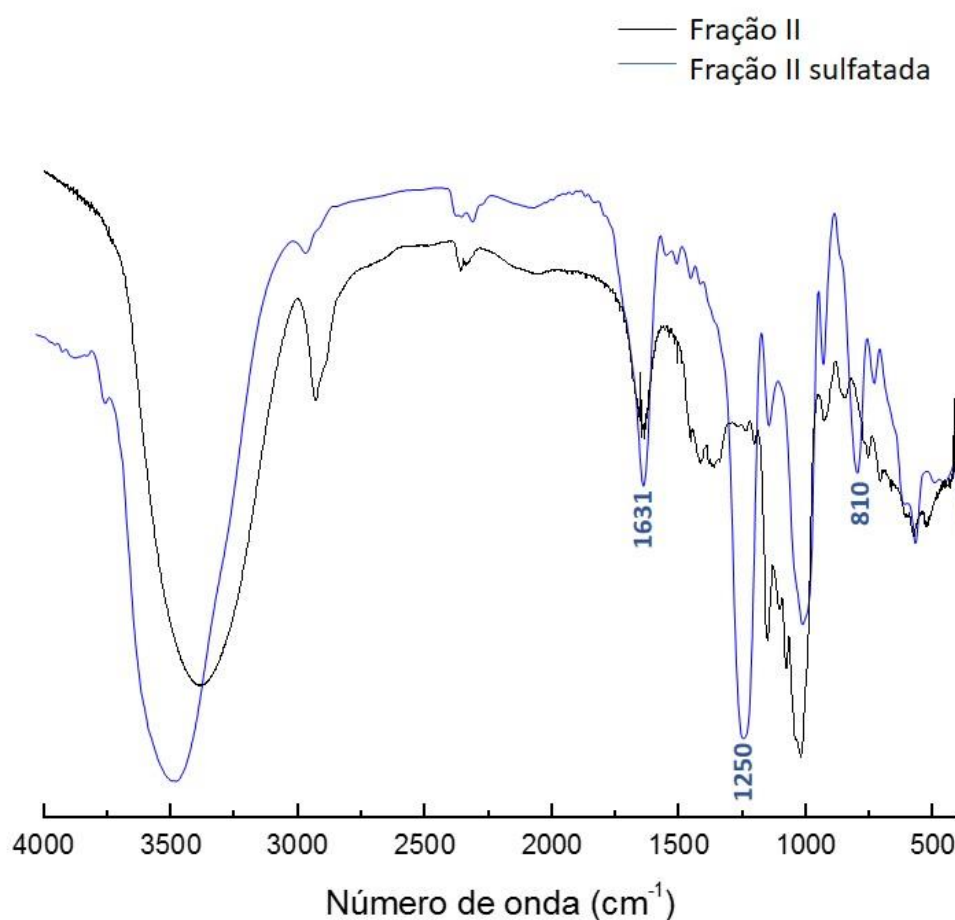


Após a submissão de todo o material sulfatado à cromatografia de filtração em gel, as frações coletadas contendo os oligossacarídeos sulfatados foram reunidas, liofilizadas e pesadas. Verificou-se por meio do elevado peso (180 mg) e do aspecto do liofilizado (pó granulado), que o material sulfatado ainda continha sal, sendo por esse

motivo submetido novamente a cromatografia de filtração em gel, sob as mesmas condições, para total remoção do sal. Após a segunda reaplicação, o material remanescente apresentou um peso de 38 mg (liofilizado), demonstrando assim, que praticamente todo o sal havia sido removido.

A eficácia do procedimento de sulfatação foi acompanhada por espectroscopia de FT-IR (Figura 25).

Figura 25: Espectros do material (Fração II), antes e após procedimento de sulfatação, no FT-IR (região de 4000 a 400 cm^{-1}).



A efetivação da reação de derivatização na Fração II pôde ser confirmada pelo surgimento de algumas bandas características de grupos sulfato no espectro de FT-IR (Figura 25). Se compararmos os espectros da Fração II sulfatada com a original, podemos observar o aparecimento de uma banda na região de 1250 cm^{-1} , atribuída ao estiramento assimétrico da ligação S=O, presente no grupamento SO_3 (TAO et al., 2009;

VASCONCELOS et al., 2013; YANG et al., 2003; ZHANG et al., 2000), bem como o surgimento de uma banda visualizada pela absorção na região de 810 cm^{-1} atribuída à vibração simétrica da ligação C-O-S do grupamento COSO_3 (TAO et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2013; YANG et al., 2003; ZHANG et al., 2000; ZHANG et al., 2010). Outra banda de absorção na região de 1631 cm^{-1} , pode estar relacionada com as insaturações provenientes do processo de sulfatação (VASCONCELOS et al., 2013; YANG et al., 2003). Em relação ao espectro da Fração II, é possível observar o deslocamento para baixo da banda em 2930 cm^{-1} , referente à vibração de estiramento da ligação C-H, do grupo CH_2 , e da banda em 1410 cm^{-1} referente à vibração de ângulo variável da ligação C-H do grupo CH_2 , o que pode estar relacionado com a substituição do C-6 das unidades monossacarídicas (DU et al.; 2016; YANG et al.; 2003). A partir dessas observações, acredita-se que a mistura de oligossacarídeos foi devidamente sulfatada através do procedimento empregado.

A porcentagem de enxofre (%S) encontrada na Fração II sulfatada foi de 10,54% e o grau de substituição (D.S.) foi de 0,8. Segundo a literatura o teor de grupos sulfato presentes nas moléculas sulfatadas é um fator de extrema importância para a manifestação da atividade anticoagulante (ZHANG et al., 2010). Du e colaboradores (2016) obtiveram um polissacarídeo quimicamente sulfatado a partir de um EPS produzido por *Lachnum*, e verificaram que o composto sulfatado aumentou significativamente os tempos de coagulação nos testes do aPTT e TT, em comparação ao polissacarídeo nativo, atuando como um anticoagulante sobre as vias intrínsecas da coagulação.

Não só a presença de grupos sulfatos, mas também o percentual desses grupos (D.S.) são essenciais para a molécula atuar como um anticoagulante. Valores de D.S. maiores ou iguais a 0,7 são geralmente necessários (YANG et al., 2002). Zhang e colaboradores (2010) sugerem que quanto maior o D.S., maior o poder anticoagulante.

Uma $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ -D-glucana, após três ciclos de sulfatação (MENDES et al., 2009), apresentou um D.S. de 0,8. A ação anticoagulante da glucana sulfatada foi demonstrada pelas respostas marcadamente positivas nos ensaios *in vitro*. Também após três ciclos de sulfatação, uma $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucana, alcançou um D.S. de 0,95. Tal glucana sendo

investigada quanto à sua ação anticoagulante, comportou-se como um possível inibidor da via intrínseca de coagulação (VASCONCELOS et al., 2013).

A Fração II sulfatada, com D.S. de 0,80, constituída, provavelmente, por oligossacarídeos com $DP \geq 5$ e bastante solúvel, pode ser considerada viável para os experimentos de atividade anticoagulante.

Os vários testes de atividade anticoagulante estão relacionados com a cascata de coagulação sanguínea, um processo bioquímico complexo, onde ocorrem reações enzimáticas sequenciais (por isso cascata), sendo o objetivo final a formação do coágulo de fibrina a partir do fibrinogênio. As substâncias envolvidas nessas reações são denominadas de fatores de coagulação (SILVA, HASHIMOTO, 2006).

A coagulação divide-se em dois modos de atuação: a via intrínseca, iniciada por substâncias estranhas presentes no plasma e a via extrínseca, desencadeada pelo fator tecidual ou tissular, presente em células que normalmente não entram em contato com o plasma (WANG et al., 2007). Ambas convergem para a ativação do fator X, geração de trombina e posterior estabilização do coágulo sanguíneo (GRACHER et al., 2016; MELNIKOVA, 2009; RENNÉ, NIESWANDT & GAILANI, 2006; VINE, 2009). Os ensaios clássicos para o estudo da atividade anticoagulante são: o teste do aPTT que está diretamente relacionado à via de coagulação intrínseca, e mede a função dos fatores XII, XI, IX e VIII na coagulação sanguínea; o teste do PT que está relacionado com a via extrínseca, dependente do fator tecidual no processo de ativação e mede a integridade da fase comum de coagulação e, o teste do TT que avalia a conversão do fibrinogênio plasmático em fibrina, na presença de trombina exógena. O tempo de coagulação no último estágio da cascata de coagulação é a conversão de fibrinogênio em fibrina pela trombina (MELO et al., 2004; MENDES et al., 2009; MESTECKINA, SHCHERBUKHIN, 2010; SILVA, HASHIMOTO, 2006; VASCONCELOS et al., 2013).

Esses testes, *in vitro*, verificam com precisão a potência anticoagulante, determinando-se os tempos de coagulação para as diferentes concentrações das moléculas sulfatadas, utilizando a heparina como padrão (MOURÃO, PEREIRA, 1999). A heparina é um polissacarídeo naturalmente sulfatado, possuindo em sua estrutura uma sequência pentassacarídica sulfatada que interage com os fatores plasmáticos e induz a

ativação conformacional da antitrombina, tornando-a mais ativa e, portanto, aumentando o tempo para formação do coágulo (MELO et al., 2008; NADER et al., 2004).

Uma fração polissulfatada proveniente da alga vermelha *Acanthophora muscoides* foi parcialmente hidrolisada (RODRIGUES et al., 2016) e os oligossacarídeos produzidos foram investigados quanto à ação anticoagulante em ensaios *in vitro*, os mesmos mostraram-se mais potentes sobre a não formação da trombina, do que a fração não hidrolisada.

Considerando o número de pesquisas que relatam a possível aplicabilidade de polissacarídeos e principalmente a pequena quantidade de estudos com oligossacarídeos sulfatados como potenciais anticoagulantes, foram ensaiados testes com o objetivo de avaliar a ocorrência da atividade anticoagulante pela Fração II sulfatada.

Os ensaios realizados foram efetuados com plasma sanguíneo humano, determinando-se o efeito da Fração II sulfatada sobre o tempo de coagulação e os resultados obtidos foram comparados com diferentes concentrações de heparina. Os tempos de coagulação obtidos encontram-se na Tabela 3.

A partir dos valores obtidos nos testes é possível afirmar que o aPTT e o TT foram significativamente prolongados pela ação da Fração II sulfatada, diferentemente do PT, que não foi afetado. O prolongamento no aPTT sugere a inibição da via intrínseca e/ou comum de coagulação, enquanto que, o aumento de TT, indica inibição na atividade de trombina, ou na polimerização de fibrina. A não ocorrência no aumento do tempo de coagulação no teste do PT sugere que a Fração II sulfatada não exerce influência sobre a via extrínseca de coagulação (MATSUBARA et al., 2001; LI et al., 2017). A Fração II original (não sulfatada), não apresentou atividade anticoagulante nos testes efetuados, o que demonstra a importância da presença de grupos sulfato para o prolongamento no tempo da formação do coágulo.

O aumento no tempo de coagulação para os testes de aPTT e TT mostraram-se concentração-dependente, sendo que em ambos, quanto maior a concentração da Fração II sulfatada, maior o tempo para a formação do coágulo. Em comparação com os tempos de coagulação exibidos pela heparina, observa-se, que para o aPTT, a administração de 10-15 µg/mL e para o TT 30 µg/mL da Fração II sulfatada ofereceu um tempo de coagulação semelhante ao observado para 3 µg/mL de heparina.

Tabela 3: Atividade anticoagulante de plasma normal humano na presença da Fração II, da Fração II sulfatada e heparina em diferentes concentrações, determinada pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (PT). Os resultados representam média e desvio padrão.

Material	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo de coagulação (s)		
		aPTT	TT	PT
Fração II	Controle (0)	41,98 \pm 0,2	17,12 \pm 0,0	16,19 \pm 0,7
	1	41,98 \pm 2,2	19,85 \pm 0,4	17,49 \pm 0,1
	5	41,52 \pm 0,9	19,88 \pm 1,0	16,79 \pm 0,0
	10	40,07 \pm 0,3	17,76 \pm 0,6	15,73 \pm 0,2
	15	40,32 \pm 0,5	18,24 \pm 0,2	16,71 \pm 0,4
	20	38,77 \pm 0,3	18,44 \pm 0,0	17,33 \pm 0,0
Fração II sulfatada	Controle (0)	41,98 \pm 0,2	17,12 \pm 0,0	16,19 \pm 0,7
	1	47,19 \pm 1,1	22,66 \pm 1,7	17,12 \pm 0,1
	5	69,50 \pm 2,8	28,54 \pm 0,0	15,95 \pm 0,1
	10	91,84 \pm 1,4	33,51 \pm 1,1	16,53 \pm 0,3
	15	151,3 \pm 10	39,64 \pm 0,9	15,49 \pm 0,1
	20	161,1 \pm 15	64,11 \pm 2,6	18,00 \pm 0,0
	30	449,5 \pm 3,9	132,6 \pm 5,0	18,45 \pm 0,1
	40	580,8 \pm 11	357,7 \pm 8,8	19,62 \pm 0,1
Heparina	Controle (0)	41,98 \pm 0,2	17,12 \pm 0,0	16,19 \pm 0,7
	1	44,16 \pm 0,2	29,02 \pm 1,0	16,80 \pm 0,1
	2	74,00 \pm 0	56,82 \pm 5,2	15,60 \pm 0,0
	3	113,5 \pm 12	123,8 \pm 8,5	16,73 \pm 1,6

Wall e colaboradores (2001) investigaram o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) de 17 oligossacarídeos diferentes, e elencaram alguns fatores que estão possivelmente relacionados à manifestação da atividade anticoagulante apresentada

pelos mesmos. Além da importância da composição monossacarídica e da influência do tipo de ligação glicosídica, ressaltaram a relevância do comprimento da cadeia oligossacarídica, como parte fundamental para manifestação da atividade, através da constatação de que o aumento de apenas uma unidade monossacarídica na cadeia, aumenta significativamente a ação anticoagulante.

Para Wu e colaboradores (2016a) a atividade anticoagulante está diretamente relacionada ao peso molecular do oligossacarídeo, ou seja, moléculas muito pequenas não apresentam essa ação. Dessa forma, quanto maior o peso molecular da fração de oligossacarídeos, melhores serão os resultados para os testes de ação anticoagulante. Para o prolongamento no teste do aPTT, os autores observaram que o oligossacarídeo deveria conter no mínimo 6 a 8 unidades monoméricas (WU et al., 2010).

Considerando os resultados obtidos bem como as informações da literatura é possível inferir que, a Fração II sulfatada apresentou um grau de sulfatação adequado (D.S=0,8) assim como um comprimento de cadeia (D.P) satisfatório para a manifestação da atividade anticoagulante.

Deve-se ressaltar que um dos maiores benefícios na sulfatação de oligossacarídeos é a eficiência da reação, pois um único ciclo de reação foi capaz de produzir moléculas com DS de 0,80, diferentemente de polissacarídeos que necessitam de 3 a 4 ciclos para obter valores próximos desse. Adicionalmente, a solubilidade da molécula menor, quando comparada ao polímero original também sulfatado (VASCONCELOS et al, 2013) favorece a reação biológica, aumentando o potencial anticoagulante.

6 CONCLUSÕES

As curvas de hidrólise ácida parcial efetuadas com três exopolissacarídeos (EPSgraviola, EPSlaranja e EPSmanga) secretados por cepas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, utilizando TFA 0,2 M, 100 °C em tempos variáveis, indicaram que quanto menor o tempo de hidrólise, maior a formação de oligômeros com alto D.P.

De acordo com as análises por HPAEC/PAD e quantificações pelo método fenol-ácido sulfúrico, é possível concluir que o EPSmanga apresentou uma maior produção de oligossacarídeos provavelmente devido à sua maior solubilidade, chegando a oferecer aos 45 minutos de hidrólise 83% de rendimento em relação à massa empregada, sendo portanto, hidrolisado em maior quantidade para dar sequência ao estudo.

A cromatografia de filtração em gel Sephadex G-15 do material hidrolisado, foi capaz de separar os oligossacarídeos em dois picos: Pico I, composto por moléculas maiores (Fração I), e o Pico II composto predominantemente por mono- e dissacarídeos, sendo, desta forma, eficiente para a separação de glucose e outros oligômeros pequenos dos oligossacarídeos maiores.

A cromatografia de adsorção em carvão-Celite da Fração I, considerada a mais apropriada para a separação de uma série homóloga de oligossacarídeo, utilizando um gradiente descontínuo de etanol-água 0 a 60%, teve a maior parte dos compostos eluídos com etanol-água 50% (Fração II). Quando essa fração foi submetida à mesma análise utilizando então, um gradiente contínuo de etanol-água 42 a 49%, não foi capaz de separar individualmente os oligossacarídeos, provavelmente por terem suas massas moleculares muito próximas.

Considerando que a Fração II não continha oligossacarídeos de pequeno tamanho, uma vez que o tempo de retenção, no HPAEC/PAD, da primeira molécula da mistura era superior a 17 minutos, ela, a Fração II, foi selecionada para a reação de derivatização, cujo D.S., após um único ciclo de sulfatação, foi de 0,80.

A fração II sulfatada apresentou atividade anticoagulante nos testes de aPTT e TT, pois os tempos de formação do coágulo aumentaram com o aumento de sua concentração, indicando uma provável inibição da via intrínseca e/ou comum da coagulação.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, I.; HAYASHI, K.; KITAGAWA, M. Adsorption of saccharides from aqueous solution onto activated carbon. **Carbon**, Elmsford, v. 21, n. 3, p. 189-191, 1983.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, p. 660–666, 2009.
- _____ et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie = Food Science and Technologie Alimentaire**, London, v. 43, p. 119–125, 2010.
- BAO, X. F. et al. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, p. 175-181, 2002.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; GIESE, E. C. Bioactive oligosaccharides: production, biological functions and potential commercial applications. Handbook of Carbohydrate Polymers: New York, cap. 8, p. 279-309, 2010.
- _____ et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: ciências exatas e tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BLAND, E. J.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C. The influence of small oligosaccharides on the immune system. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 1673-1678, 2004.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→4)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BOYER, R. F. **Modern experimental biochemistry**. 2 ed. Redwood City: Benjamin: Cummings, 1993. 555p.
- BUBB, W. A. et al. Structural characterisation of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 301, p. 41-50, 1997.
- CAI, W. et al. Purification, characterization and in vitro anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 140, p. 308-313, 2016.
- CHAMBERS, J. A. A.; RICKWOOD, D. **Biochemistry Labfax**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1993. 361p.
- CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate analysis: a practical approach**. New York: IRL Press, 1994. 324p.
- CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β-(1→3),(1→6)-glucans. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 3, p. 635–652, 2007.
- CHOW, J. T.-N. et al. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 1131–1142, 2005.

COMBO, A. M. M. et al. Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 52, p. 148-156, 2013.

CORRÊA, J. B. C. **Métodos químicos para a determinação da estrutura de polissacarídeos**. Monografia Didática. Curitiba, 1971. 62p.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 64, p. 21–28, 2010.

COURTOIS, J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 261–273, 2009.

DAVIES, M. J. et al. Use of a porous graphitised carbon column for the high-performance liquid chromatography of oligosaccharides, alditols and glycopeptides with subsequent mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 646, p. 317-326, 1993.

DELATTRE, C.; VIJAYALAKSHM, M. A. Monolith enzymatic microreactor at the frontier of glycomics toward a new route for the production of bioactive oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, Amsterdam, v. 60, p. 97–105, 2009.

_____ et al. Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics. **Minerva Biotechnologies**, Berlin, v. 17, p. 107-117, 2005.

DI, X. et al. Fingerprint profiling of acid hydrolyzates of polysaccharides extracted from the fruiting bodies and spores of Lingzhi by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1018, p. 85–95, 2003.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, London, v. 84, p. 106-109, 1962.

DONG, Q. et al. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, p. 1417–1421, 2002.

DU, Z. et al. Anticoagulant activity of a sulfated *Lachnum* polysaccharide in mice with a state of hypercoagulability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdam, v. 26, p. 5550–5556, 2016.

DUARTE, M. E. R. et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 333, p. 281–293, 2001.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, New York, v. 28, p. 350-356, 1956.

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento de um método por eletroforese capilar para quantificação e identificação de oligossacarídeos sulfatados**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba. 2013.

FU, Y. et al. β -1,3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 86, p. 774–782, 2011.

FU, Y. et al. (1→3)- β -D-Glucan oligosaccharides monomers purification and its H₂O₂ induction effect study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 81, p. 1069–1073, 2015.

GIESE, E. C. et al. Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 683-700, 2011.

GILL, S. K. et al. Immunomodulatory effects of natural polysaccharides assessed in human whole blood culture and THP-1 cells show greater sensitivity of whole blood culture. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 36, p. 315-323, 2016.

GOULAS, A. K. et al. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 209, p. 321–335, 2002.

GRACHER, A. H. et al. A procoagulant chemically sulfated mannan. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 136, p. 177–186, 2016.

GRANDPIERRE, C. et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1→3) oligoglucans. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 71, p. 277–286, 2008.

GUO, S. et al. Preparation, structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Oidiodendron truncatum* GW. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 48, p. 539–544, 2013.

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 281, p. 143-154, 1996.

HORWITZ, E. P.; BLOOMQUIST, C. A. A. The preparation, performance and factors affecting band spreading of high efficiency extraction chromatographic columns for actinide separations. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, New York, v. 34, p. 3851-3871, 1972.

JESENAK, M. et al. β -Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. **Allergologia et Immunopathologia**, Madrid, v. 42, p. 149-156, 2014.

JIA, S. et al. Chitosan oligosaccharides alleviate cognitive deficits in amyloid- β 1–42-induced rat model of Alzheimer's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 83, p. 416–425, 2016.

JIAO, L. et al. Anti-tumour and immunomodulatory activities of oligosaccharides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 65, p. 229–233, 2014.

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

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

KALE, V. et al. Sulphated polysaccharide from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4(+) T cells in vitro. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Amsterdam, v. 2, p. 108–117, 2013.

KÄSBAUER, C. W.; PAPER, D. H.; FRANZ, G. Sulfated β -(1→4)-galacto-oligosaccharides and their effect on angiogenesis. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 330, p. 427–430, 2001.

KIM, J.-K. et al. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 49, p. 1051–1058, 2011.

KRICHEN, F. et al. In vitro and in vivo anti-coagulant activity and toxicological studies of marine sulfated glycosaminoglycans. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Amsterdam, v. 69, p. 45–53, 2017.

KUMAGAI, Y.; OKUYAMA, M.; KIMURA, A. Heat treatment of curdlan enhances the enzymatic production of biologically active β -(1,3)-glucan oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 146, p. 396–401, 2016.

LATEEF, A.; OJO, S. A.; OLADEJO, S. M. Anti-candida, anti-coagulant and thrombolytic activities of biosynthesized silver nanoparticles using cell-free extract of *Bacillus safensis* LAU 13. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 51, p. 1406–1412, 2016.

LEGENTIL, L. et al. Molecular interactions of β -(1→3)-glucans with their receptors. **Molecules**, Basel, v. 20, p. 9745–9766, 2015.

LEUNG, P. H. et al. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 114, p. 1251–1256, 2009.

LI, N. et al. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 159, p. 195–206, 2017.

LI, R.; JIANG, X.-L.; GUAN, H.-S. Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella* sp. in submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 9, p. 195–202, 2010.

LI, Y. et al. Purification and characterization of polysaccharides degradases produced by *Alteromonas* sp. A321. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 86, p. 96–104, 2016.

LIU, J.; WILLFÖR, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Amsterdam, v. 5, p. 31–61, 2015.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Tradução: Andrea Queiroz Maranhão, Beatriz Dolabela de Lima, Cynthia Maria Kyaw. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MATSUBARA, K. et al. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 28, p. 395-399, 2001.

MELNIKOVA, I. The anticoagulants market. **Nature Reviews: drug discovery**, London, v. 8, p. 353-354, 2009.

MELO, F. R. et al. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 20824–20835, 2004.

MENDES, S. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 45, p. 305-309, 2009.

MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 424, p. 30-41, 2016.

MESTECKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 46, p. 267-273, 2010.

MISHRA, A.; JHA, B. Microbial exopolysacchrides. In ROSENBERG, E. et al. **The prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology**. 4 ed. Berlin Springer, 2013. p. 179–192.

MONIZ, P. et al. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 62, p. 460-465, 2014.

MORALES, V. et al. Rapid separation on activated charcoal of high oligosaccharides in honey. **Chromatographia**, Madrid, v. 64, n. 3/4, p. 233-238, 2006.

MOURÃO, P. A. S. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, p. 5-17, 2007.

_____; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, Amsterdam, v. 9, p. 225–232, 1999.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 77, p. 123-135, 2000.

MUNIZ, C. R. et al. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: microscopical features. **Micron**, Amsterdam, v. 42, p. 419–428, 2011.

NADER, H. B. et al. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 10, p. 951–66, 2004.

NAIR, A. V.; GUMMADI, S. N.; DOBLE, M. Process optimization and kinetic modelling of cyclic (1→3;1→6)-glucans production from *Bradyrhizobium japonicum* MTCC120. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 226, p. 35–43, 2016.

NEHAD, E. A.; EL-SHAMY, A. R. Physiological studies on the production of exopolysaccharide by Fungi. **Agriculture and Biology Journal of North America**, New York, v. 1, p. 1303-1308, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga, Angélica Rosat Consiglio, Carla Dalmaz, Carlos Termignoni, Lúcia Rebello Dillemburg, Luís Fernando Marques Dorvillé, Maria Luiza Saraiva Pereira, Michele Bastiani, Sandra Estrazulas Farias, Simone Kobe de Oliveira, Tarso B. L. Kist. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NGO, D.-H.; KIM, S.-K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 62, p. 70–75, 2013.

NGO, D.-N. et al. Aminoethyl chitooligosaccharides inhibit the activity of angiotensin converting enzyme. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 119–123, 2008.

NOBRE, C.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 395-401, 2012.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Beta-glucans, history, and the present; immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**, London, v. 5, p. 47-57, 2008.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry = Revue Canadienne de Chimie**, Ottawa, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

OLIVEIRA, K. S. M. et al. (1→6)- and (1→3)(1→6)-β-glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 133, p. 539-546, 2015.

ORLANDELLI, R. C. et al. Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: preliminary characterization of crude exopolysaccharide produced by submerged culture of *Diaporthe* sp. JF766998 under different cultivation time. **Biochimie Open**, Amsterdam, v. 2, p. 33-40, 2016.

_____ et al. β-(1→3,1→6)-D-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: purification, chemical characterization and cytotoxic activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 94, p. 431–437, 2017.

PANG, Z. et al. Structure of β-glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, London, v. 69, p. 553–558, 2005.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 27, p. 1119–1128, 2011.

PEASURA, N. et al. Assessment of biochemical and immunomodulatory activity of sulphated polysaccharides from *Ulva intestinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 91, p. 269-277, 2016.

PELCZAR JR. M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. Tradução: Sueli Fumie Yamada, Tania Ueda Nakamura, Tereza Cristina R. M. Oliveira, Benedito Prado Dias Filho, Lourdes Botelho Garcia. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 572-578, 2006.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 70, p. 1–11, 2009.

PRIEM, B. et al. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. **Glycobiology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 235-240, 2002.

PUJOL, C. A. et al. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 51, p. 412-416, 2012.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QUIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 77, p. 435-441, 2009.

QIU, H. et al. Structure elucidation and sulfated derivatives preparation of two α -D-glucans from *Gastrodia elata* Bl. and their anti-dengue virus bioactivities. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, p. 2230–2236, 2007.

QU, Y. et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 148, p. 345-353, 2016.

RENNÉ, T.; NIESWANDT, B.; GAILANI, D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. **Blood Cells Molecules and Diseases**, Amsterdam, v. 36, p. 148–151, 2006.

RODRIGUES, J. A. G. et al. Mild-acid hydrolysis of a native polysulfated fraction from *Acanthophora muscoides* generates sulfated oligosaccharides displaying in vitro thrombin geration inhibition. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 38, n. 1, p. 7-15, 2016.

ROHNER, J. **Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)**. Sunnyvale: Dionex, 1993. 12p. (Technical note, 20).

SALDANHA, L. **Diversidade genética de isolados de *Botryosphaeria* e a produção de lacases, pectinases**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto agrônômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina. 2006.

SALDANHA, R. L. et al. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 259-264, 2007.

SAMUELSEN, A. B. et al. Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* L. seeds by partial hydrolysis, HPAEC-PAD, methylation and GC– MS, ESMS and ESMS:MS. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 315, p. 312 – 318, 1999.

SEVIOUR, R. J. et al. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, p.279-298, 1992.

SHI, S.-H. et al. β -glucans from *Coriolus versicolor* protect mice against *S. typhimurium* challenge by activation of macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 86, p. 352–361, 2016.

SILVA, I. R. **Purificação e caracterização parcial de oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida controlada do polissacarídeo produzido pelo *Botryosphaeria* sp.** 2005. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2005.

_____. et al. Purificação e caracterização de uma gentioexaose obtida de botriosferana por hidrólise ácida parcial. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1015-1019, 2008.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. Coagulação: visão laboratorial da homeostasia primária e secundária, Rio de Janeiro, Revinter, 2006, 136p.

SINGH, V. et al. Hydrolysis of plant seed gums by microwave irradiation. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 54, p. 523–525, 2003.

SMIDERLE, F. R. et al. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 94, p. 91-99, 2013.

STEVENSON, G. B. **Biologia dos fungos, bactérias e vírus.** Tradução de Denise Navas Pereira. São Paulo: Polígono: EDUSP, 1974. 267p.

SUMIYOSHI, W. et al. An alternative strategy for structural glucanomics using β -gluco-oligosaccharides from the brown algae *Ecklonia stolonifera* as models. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Amsterdam, v. 5, p.137-145, 2015.

SUN, H.-J. et al. Preparation of (1→4)- β -D-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1→4)- β -D-xylooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, p. 657–661, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 11, p. 663-674, 2001.

_____. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Limerick, v. 16, p. 41-46, 1998.

SZABÓ, T.; KADISH, J. L.; CZOP, J. K. Biochemical properties of the ligand-binding 20-kDa subunit of the β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 270, p. 2145-2151, 1995.

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

TERÇARIOLI, G. R.; PALEARI, L. M.; BAGAGLI, E. **O incrível mundo dos fungos**. São Paulo: Ed. da Unesp, 2010. 125p.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection**. Waltham, 2017. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/products/ion-chromatography/ic-rfic-solutions/hpae-pad/lp-111613.html>> Acesso em: 25 ago. 2016.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução de Aristóbolo Mendes da Silva. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. v. 1. 934p.

VASCONCELOS, A. F. **β - Glucanas de isolados fúngicos do gênero *Botryosphaeria*: produção, caracterização química e atividade anticoagulante**, 2009. 19 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro. 2009.

_____ et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 92, p. 1908–1914, 2013.

_____ et al. Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 11, p. 387–393, 2000.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**: – the journal of retinal and vitreous diseases, Hagerstown, v. 29, p. 1–7, 2009.

VODENIČAROVA M. et al. Xyloglucan degradation using different radiation sources: a comparative study. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 13, p. 157–164, 2006.

WALL, D. et al. Characterisation of the anticoagulant properties of range of structurally diverse sulfated oligosaccharides. **Thrombosis Research**, Amsterdam, v. 103, p. 325–335, 2001.

WANG, H.; BETTI, M. Sulfated glycosaminoglycan-derived oligosaccharides produced from chicken connective tissue promote iron uptake in a human intestinal Caco-2 cell line. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 220, p. 460–469, 2017.

WANG, L. et al. Characterization and anti-tumor activities of sulfated polysaccharide SRBPS2a obtained from defatted rice bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 45, p. 427–431, 2009.

WANG, M. et al. Sulfated glucan can improve the immune efficacy of Newcastle disease vaccine in chicken. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 70, p. 193–198, 2014.

WANG, P.-C. et al. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: a review. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 148, p. 86-97, 2016.

WANG, Z. M.; LI, L.; ZHENG, B. S.; NORMAKHAMATOV, N.; GUO, S. Y. Preparation and anticoagulant activity of sodium cellulose sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 41, p. 376-382, 2007.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. Carbon column chromatography. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 42-44, 1962.

_____; DURSO, D. F. Chromatographic separation of sugars on charcoal. **Journal American Chemical Society**, New York, v. 72, p. 677-679, 1950.

_____; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York. v. 4, p. 235-275, 1964.

WIJESEKARA, I.; PANJESTUTI, R.; KIM, S.-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 84, p. 14-21, 2011.

WU, J. et al. Anticoagulant and FGF/FGFR signal activating activities of the heparinoid propylene glycol alginate sodium sulfate and its oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 136, p. 641–648, 2016a.

_____ et al. Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: a review. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 144, p. 474-494, 2016b.

WU, M. et al. Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulphate from sea cucumber *Thelenata ananás*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 122, p. 716–723, 2010.

XIE J.-H. et al. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: structures and functionalities. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 60, p. 148-160, 2016.

XU, F. et al. Optimization, characterization, sulfation and antitumor activity of neutral polysaccharides from the fruit of *Borojoa sorbilis* cuter. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 151, p. 364–372, 2016.

YAMADA, H. et al. Chitin-coated celite as an affinity adsorbent for high-performance liquid chromatography of lysozyme. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 146, p. 71-74, 1985.

YAN, M.-X. et al. Extracellular polysaccharide with novel structure and antioxidant property produced by the deep-sea fungus *Aspergillus versicolor* N2bc. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 147, p. 272-282, 2016.

YANG, J. et al. Chemical modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of chinese lacquer polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 31, p. 55-62, 2002.

_____ et al. Sulfation of chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 52, p. 397–403, 2003.

YOKOTA, H. et al. Monosaccharide composition analysis of pamineplase by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 21, p. 767-774, 1999.

YUAN, H. et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of k-carrageenan oligosaccharides and their over sulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 685–692, 2005.

ZEKOVIĆ, D. B.; KWIATKOWSKI, S. Natural and modified (1→3)- β -D-glucans in health promotion and disease alleviation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 25, p. 205–230, 2005.

ZHANG, D. et al. Three sulphated polysaccharides isolated from the mucilage of mud snail, *Bullacta exarata philippi*: characterization and antitumour activity. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 138, p. 306–314, 2013.

ZHANG, H. et al. Generation and characterization of β 1,2-gluco-oligosaccharide probes from *Brucella abortus* cyclic β -glucan and their recognition by C-type lectins of the immune system. **Glycobiology**, Oxford, v. 4, p. 1–11, 2016.

ZHANG, L. et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 1515-1521, 2005.

_____ et al. Solution properties of antitumor sulfated derivate of α - (1→3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, Abingdon, v. 64, p. 2172-2178, 2000.

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

ZHANG, M. et al. Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 2297–2301, 2004b.

ZHANG, X. et al. Low anticoagulant heparin oligosaccharides as inhibitors of BACE-1, the Alzheimer's β -secretase. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 151, p. 51–59, 2016.

ZHANG, Y. et al. Hemicellulose isolation, characterization, and the production of xylo-oligosaccharides from the wastewater of a viscose fiber mil. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 141, p. 238–243, 2016.

_____et al. Modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of persimmon polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 82, p. 515-520, 2010.

_____et al. Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, p. 1084–1090, 2011.

ZHENG, Y. F. et al. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 142, p. 98-104, 2016.

ZHOU G. et al. Large scale enzymatic synthesis of oligosaccharides and a novel purification process. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdam, v. 21, p. 311–314, 2011.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 90, p. 1395-1410, 2012.

ZOU, P. et al. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 190, p. 1174–1181, 2016.