

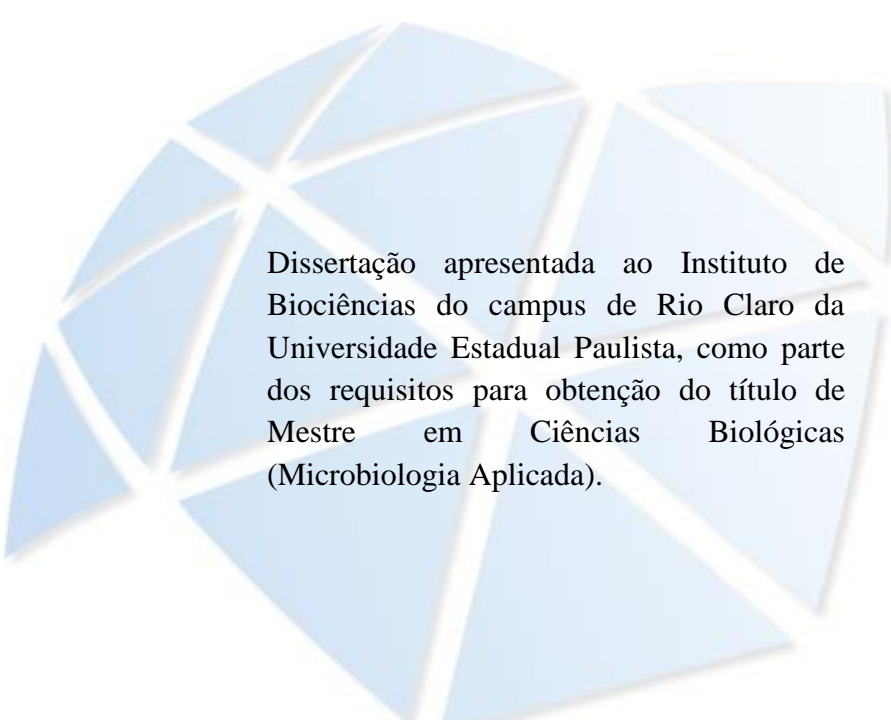
---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(Área: Microbiologia Aplicada)

---

$\beta$ - glucanas de *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: avaliação da atividade imunomoduladora e como filme transportador de fármaco

MIRELA SILVA DI BASTIANI



Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro

-2014-

Unesp – Universidade estadual paulista – “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Biociências de Rio Claro – IB  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada  
Av. 24 A,1515 – Rio Claro –SP  
CEP: 13506-900

Unesp – Universidade Estadual Paulista –“ Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências e Letras de Assis – FCLA  
Departamento de Ciências Biológicas  
Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos  
Av. Dom Antônio, 2100 – Assis- SP  
CEP: 19.800-000

$\beta$ - glucanas de *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: avaliação da atividade imunomoduladora e como filme transportador de fármaco

Aluna: Mirela Silva Di Bastiani

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Valéria Marta Gomes do Nascimento

Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos

**Mirela Silva Di Bastiani**

$\beta$ - glucanas de *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: avaliação da atividade imunomoduladora e como filme transportador de fármaco

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, João e Ana, que sem o apoio e carinho, eu não teria chegado até aqui.

**Agradecimentos:**

Primeiramente agradeço a Professora.Dra. Valéria Marta Gomes do Nascimento, por me aceitar no laboratório por mais esse período do mestrado e ser a melhor orientadora que se pode desejar.

A Professora Dra. Karina Alves de Toledo, por aceitar ser a co-orientadora deste trabalho, e pelos novos ensinamentos em imunologia.

Agradeço aos meus pais, João e Ana, por todo apoio e amor que sempre recebi em toda minha carreira acadêmica.

Meu irmão, Enzo, por simplesmente existir .

Aos amigos que fiz durante o período que estive em Rio Claro, Luana Morão , Juliane Miranda, Cristina Rocha Pereira, Giordani Cabral, sem eles as disciplinas não teriam a mesma graça.

Aos amigos de Assis, Ana Beatriz Aranha, Yara Bueno, Rachid Évora dos Santos, Kassandra Sussi Mustafé Oliveira, Maíra Coradi ,Gabrielle Carvalho (que mesmo longe sempre se manteve por perto e quando voltava pra perto parecia que nem tinha saído) Leticia Rolfini, Antônio Assay Júnior, por me aguentarem todo esse tempo, me dando apoio, carinho e amizade.

A minha pupila Ana Beatriz Aranha, que sem ela esse trabalho não teria sido possível.

A Kassandra Sussi Mustafé Oliveira , por me ensinar desde meus primeiros passos dentro do laboratório até o fim do meu mestrado e que sem ela esse trabalho também não teria sido possível.

A Mírian Costa, por me auxiliar nas técnicas até então desconhecidas por mim de imunologia.

Aos amigos e companheiros do LBBIO, pela amizade e companheirismo todos os dias durante o trabalho.

Ao Sérgio Moraes, técnico do LBBIO, pela ajuda durante toda execução do trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Meu muito obrigada a todos!!!!De alguma maneira vocês foram importantes nessa etapa da minha formação, jamais serão esquecidos!

"Devemos fazer da interrupção,  
um caminho novo..  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sono, uma ponte..  
E da procura..um encontro.."

Fernando Sabino

**Resumo:**

Polissacarídeos são empregados em diversos segmentos industriais como espessantes, detergentes, laxantes, fibras, e coberturas de alimentos. Novas pesquisas tem focado o potencial anti-inflamatório, anti-mutagênico e imunomodolador de exopolissacarídeos (EPS) microbianos, bem como sua aplicação em sistemas de liberação controlada de medicamentos. Diversas pesquisas têm empregado  $\beta$ -glucanas fúngicas e verificado diversas atividades biológicas. O objetivo do presente projeto foi estudar a ação imunomoduladora do EPS de *Lasiodiplodia theobromae*, avaliar a capacidade do exopolissacarídeo na forma de blendas com látex de atuarem como carreadores de medicamentos e algumas propriedades mecânicas do EPS em blendas com látex. O micro-organismo foi cultivado em meio Vogel, com sacarose 50 g/L, a 28°C, 180 rpm, por 72 h. O EPS foi precipitado com etanol (3:1v/v), dialisado e purificado por congelamento/degelo e ultrafiltração. O rendimento em EPS em cada cultivo foi em média de 1,9 g/L. A ação imunomoduladora *in vitro* foi realizada apenas com a fração de EPS  $\beta$ - glucana (1→6) purificada, adicionando diferentes concentrações de polissacarídeo a macrófagos humanos de linhagem U937 e verificando-se viabilidade celular e perfil de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10). Quanto aos ensaios de imunomodulação, o EPS purificado  $\beta$ - glucana (1→6) se mostrou capaz de ativar a resposta de macrófagos com a liberação da citocina TNF- $\alpha$  nas primeiras 24h, decaindo em 48h, sem apresentar ativação da resposta de IL-10, o que sugere uma resposta pró-inflamatória e anti-tumoral. Os filmes foram avaliados quanto a espessura, perda de umidade, solubilidade em água e resistência mecânica. A avaliação dos filmes como carreador de medicamento foi realizada pela adição de cetoprofeno a blenda EPS e látex, e acompanhamento da liberação do fármaco por espectrofotometria. Os filmes apresentaram espessuras entre 2 a 3,5 mm; mínima perda de umidade (entre 0,5 e 3%); solubilidade variou de 3 a 6,5 g e boa resistência mecânica, suportando forças de deformação de 17 a 37 N. Nos filmes preparados com cetoprofeno, a liberação do fármaco foi intensa nas primeiras 5 h, e estendeu-se até 24 h para filmes de EPS bruto e látex e apenas nas 5 primeiras horas para filmes de EPS purificado e látex. Espera-se a partir desses estudos a obtenção futura de forma farmacêutica de uso tópico, com ação imunomoduladora devido a presença do EPS, além de atuar simultaneamente como sistema de liberação controlada de outros medicamentos inseridos no próprio filme. Os filmes foram preparados pela técnica de liofilização, utilizando EPS bruto ou frações purificadas em diferentes proporções juntamente com látex.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo, resposta imunomoduladora, *Lasiodiplodia theobromae*, sistemas de liberação controlada, ensaios mecânicos.

**Abstract:**

Polysaccharides are employed in various industries as thickeners, detergents, laxatives, fiber and food toppings . New research has focused on the anti - mutagenic anti-inflammatory and immunomodulator potential of microbial exopolysaccharides (EPS), as well as in their application in controlled drug delivery systems. Several studies have employed fungal  $\beta$  -glucans and verified high biological activity. The goal of this project is to study the immunomodulatory action of EPS produced by *Lasiodiplodia theobromae*, evaluate the ability to act as drug carriers of blends formed by exopolysaccharide and latex and also some mechanical properties of these blends. The micro-organism was grown on Vogel medium with sucrose 50 g / L at 28 ° C, 180 rpm for 72 h. The EPS was precipitated with ethanol ( 3:1 v/v), dialyzed and purified by freezing / thawing and ultrafiltration. The yield of EPS in each culture was on average 1.9 g / L. The study of the immunomodulating effects was performed *in vitro*, only with the fraction of EPS  $\beta$ -glucan ( 1  $\rightarrow$  6 ) purified by adding different concentrations of polysaccharide in human U937 macrophages lineage and verifying cell viability and cytokine ( TNF -  $\alpha$  and IL - 10 profile ). Concerning the tests of immunomodulation, the EPS purified  $\beta$ - glucan ( 1  $\rightarrow$  6 ) has shown to be capable of activate the macrophage response to the release of TNF -  $\alpha$  cytokine in the first 24h , decreasing after 48h, without showing response activation of IL - 10 , which suggests a pro-inflammatory and anti- tumor response. The films were evaluated for thickness, moisture loss, water solubility and mechanical strength. The evaluation of the films as a carrier of drugs was performed by the addition of ketoprofen to EPS and latex blend, and monitoring of drug release by spectrophotometry.

The films presented thicknesses between 2 and 3.5 mm; minimal moisture loss (between 0.5 and 3%); solubility varying from 3 to 6,5 and good mechanical strength, tolerating deformation forces of 17 to 37 N. In films prepared with ketoprofen, drug release was intense in the first 5 h, and extended up to 24 h, for films of raw EPS and latex, and only in the first 5 hours for films of purified EPS and latex. It is expected from these studies to obtain future pharmaceutical form for topical use, with immunomodulating effects due to the presence of EPS, as well as a simultaneous action as a controlled release system of other medicines inserted into the film. The films were prepared by freeze-drying technique using raw EPS, or purified fractions in different proportions combined with latex.

Keywords : exopolysaccharide , immunomodulatory response, *Lasiodiplodia theobromae* , controlled release systems , mechanical tests .

**Lista de Ilustrações:**

Figura 1: *Lasiodiplodia theobromae*: microscopia óptica

Figura 2: *Lasiodiplodia theobromae* em placa com meio contendo vogel, glicose e ágar, 7 dias de crescimento

Figura 3: Estrutura da  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) produzida por *Lasiodiplodia theobromae*.

Figura 4 : Estrutura da  $\beta$ -glucana(1 $\rightarrow$ 6) produzida por *Lasiodiplodia theobromae* com Mw igual a de  $1,8 \times 10^6$  g/mol e  $7 \times 10^3$  g/mol..

Figura 5 : Viabilidade celular de macrófagos expostos a diferentes concentrações da fração purificada  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 6) em relação ao controle (RPMI) por 24 (laranja) e 48h (amarelo)

Figura 6: Concentração de TNF- $\alpha$  após 24h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 6) . Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula.

Figura 7: Concentração de TNF- $\alpha$  após 48h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 6) . Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula .

Figura 8: Concentração de IL-10 após 24h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 6). Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula

Figura 9: Concentração de IL-10 após 48h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 6). Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula.

Figura 10: Análise de espessura de filmes de EPS Bruto ou EPS  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6). Filmes preparados com concentrações de EPS bruto e  $\beta$ - glucana( 1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) entre 0,5 e 2% e na proporção e 2:1 de EPS/látex e secos por liofilização.

Figura 11: Perda de umidade de filmes de EPS Bruto ou EPS (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6). Os dados apresentados representam a porcentagem de material solúvel a cada 100g de filme. Filmes preparados com concentrações de EPS bruto e  $\beta$ - glucana( 1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) entre 0,5 e 2% e na proporção e 2:1 de EPS/ látex secos por liofilização.

Figura 12: Porcentagem de perda de material solúvel por cada 100g de filme preparados com EPS Bruto ou EPS  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) . Filmes preparados com concentrações de EPS entre 0,5 e 2% e na proporção e 2:1 de EPS/látex e secos por liofilização. Amostras pesadas, colocadas em água por 24h e secas em estufa por 24h, medição feita por gravimetria.

Figura 13: Análise da relação entre força e deformação de filmes preparados com EPS Bruto e látex em comparação com uma membrana de látex apenas. Preparo dos filmes: EPS bruto em concentrações de (%) 0,5 ; 1 ; 1,5 e 2 na proporção de 2:1 de EPS/látex. Os filmes foram comparados a membranas de látex sem EPS.

Figura 14: Análise da relação entre força e deformação de filmes preparados com a fração  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e látex em comparação com uma membrana de látex apenas. Preparo dos filmes: fração purificada em concentrações de (%) 0,5 ; 1 ; 1,5 e 2 na proporção de 2:1 de EPS e látex . Os filmes foram comparados a membranas de látex sem EPS. Análises realizadas na Máquina Universal de Ensaaios.

Figura 15: Curva padrão de cetoprofeno. A função dada pelo *fitting* é  $y = a + b \cdot x$  , na qual  $a = -0,00694$  e  $b = 75,6369$ . Leituras realizadas a 260 nm.

Figura 16: Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de EPS Bruto. Preparo dos filmes: EPS bruto em concentrações de (%) 0,5; 1; 1,5 e 2 e látex na proporção de 2:1 de EPS/látex com adição de 5 mg de cetoprofeno.

Figura 17 : Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de EPS Bruto. Preparo dos filmes: EPS bruto em concentrações de (%) 0,5; 1; 1,5 e 2 e látex na proporção de 2:1 de EPS/látex, com adição de 2 mg de cetoprofeno.

Figura 18: Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)Preparo dos filmes: fração purificada em concentrações de (%) 0,5; 1 ; 1,5 e 2 e látex na proporção de 2:1 de EPS/látex , com adição de 5 mg de cetoprofeno.

Figura 19: Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)Preparo dos filmes: fração purificada em concentrações de (%) 0,5, 1; 1,5; e 2 e látex na proporção de 2:1 de EPS/látex , com adição de 2 mg de cetoprofeno.

### **Lista de Tabelas:**

Tabela1: Exemplos de polissacarídeos tradicionais utilizados na indústria.

Tabela 2 – Exemplos de micro-organismos produtores de polissacarídeos.

Tabela 3: Força Máxima, força de ruptura e deformação máxima das membranas compostas de EPS bruto e fração purificada.

Tabela 4: Valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de EPS Bruto e látex com 5mg de cetoprofeno.

Tabela 5: Valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de EPS Bruto e látex com 2mg de cetoprofeno.

Tabela 6: valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e látex com 5mg de cetoprofeno.

Tabela 7: valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e látex com 2mg de cetoprofeno

## Sumário

<b>1.Introdução</b>	<b>14</b>
<b>2.Revisão Bibliográfica</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Polissacarídeos</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Polissacarídeos Microbianos</b>	<b>20</b>
<b>2.3 O fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMBJ e produção de exopolissacarídeo</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Atividade Biológica de polissacarídeos microbianos</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Aplicações em filmes de polissacarídeos microbianos</b>	<b>30</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>4. Materiais e métodos:</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Meios de cultivos, condições de manutenção do fungo e produção do EPS</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Recuperação , quantificação e preparação do exopolissacarídeo</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Análises da resposta de macrófagos frente a exposição ao polissacarídeo purificado <i>in-vitro</i></b>	<b>35</b>
<b>4.3.1 Cultura de macrófagos de linhagem U937</b>	<b>36</b>
<b>4.3.2 Procedimentos para tratamento e estímulo das células</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3 Ensaio de viabilidade celular</b>	<b>36</b>
<b>4.3.4 Dosagem de citocinas por ELISA</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Preparo do látex natural</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Obtenção de blendas de EPS e látex</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Obtenção de blendas de EPS, látex e cetoprofeno</b>	<b>38</b>
<b>4.7 Análises Físico-Químicas dos filmes de EPS e látex</b>	<b>38</b>
<b>4.7.1 Determinação de espessura</b>	<b>38</b>
<b>4.7.2 Umidade e solubilidade</b>	<b>39</b>
<b>4.7.3 Propriedades mecânicas</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Estudo da Liberação de Fármacos dos Biofilmes</b>	<b>39</b>
<b>5. Resultados e Discussão</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Obtenção do EPS</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Atividade Biológica</b>	<b>41</b>
<b>5.2.1. Viabilidade Celular</b>	<b>41</b>
<b>5.2.2 Citocinas</b>	<b>42</b>

<b>5.2.2.1 Produção de TNF – <math>\alpha</math></b>	<b>42</b>
<b>5.2.2.2 Produção de IL-10</b>	<b>45</b>
<b>5.3. Análises físico-químicas de filmes de EPS e látex</b>	<b>48</b>
<b>5.3.2. Determinação da Perda de Umidade</b>	<b>50</b>
<b>5.3.3. Análise de Solubilidade</b>	<b>52</b>
<b>5.3.4. Propriedades mecânicas</b>	<b>54</b>
<b>5.4 Liberação de Cetoprofeno</b>	<b>56</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>66</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>67</b>

## 1. Introdução:

Polissacarídeos são longas cadeias de açúcares encontrados participando da parede celular de vegetais e algas marinhas e parede celular e meio de cultivo de microorganismos. Polissacarídeos podem ser tanto estruturais quanto de reserva.

Tais polímeros são mais comumente explorados comercialmente para utilização em indústrias de alimentos como espessantes e estabilizantes, na indústria farmacêutica como adjuvantes de medicamentos, shampoos, cremes.

Os polissacarídeos autorizados para uso na indústria em sua maior parte são os provenientes dos vegetais e algas marinhas, sendo muito poucos os produzidos por microorganismos. Atualmente, tem crescido o interesse por polissacarídeos microbianos, devido as recentes descobertas de atividades biológicas desses polímeros, como atividade anti-inflamatória, imunomodoladora, anti-tumoral e anti- carcinogênica.

Além das atividades biológicas dos polímeros microbianos, também formam filmes, o que faz com que aumente ainda mais o interesse em se estudar tais moléculas.

Os polissacarídeos microbianos podem estar presentes tanto em paredes celulares, sendo necessário uso de solventes para sua obtenção, quanto serem excretados no meio de cultivo, sendo chamados exopolissacarídeos (EPS), com a vantagem de serem muito mais fáceis de purificar. Independente de sua localização, os polissacarídeos microbianos apresentam vantagens sobre aqueles obtidos a partir de fontes vegetais ou por algas, uma vez que o cultivo é realizado em biorreatores, em condições controladas, livres de variações ambientais e sazonais, o que garante a qualidade do polímeros formado, evitando perdas de rendimento. O estudo desses polímeros promove novas aplicações para eles, sendo possível criar novos biomateriais. seja de uso médico, os quais são mais biocompatíveis com o organismo humano, seja alimentício, biodegradáveis, provenientes de fontes renováveis, diminuindo-se o impacto ambiental.

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatógeno encontrado em áreas tropicais e sub-tropicais, infectando espécies vegetais e causando prejuízo na agricultura de frutos. Tal fungo se mostrou produtor de três exopolissacarídeos, uma  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3(1 $\rightarrow$ 6)) e duas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana, de tamanhos de cadeia diferentes. Tais polissacarídeos tem sido estudados pelas suas propriedades de formação de filmes, características reológicas e

atividade biológica, e a biomassa do fungo também vem sendo estudada como fonte de nutrientes para utilização nesse bioprocesso.

Esse trabalho apresenta a busca por novas aplicações para os exopolissacarídeos do *Lasiodiplodia theobromae*. Busca essa que passa pela possível aplicação como agente de resposta imunológica, para, no futuro se criar um novo medicamento, até a produção de biofilmes biodegradáveis que possam ser utilizados tanto para se carrear esse novo medicamento ou algum que já exista no mercado, bem como filmes para servir como embalagens e protetores de produtos alimentícios, diminuindo-se o consumo de plastificantes provenientes do petróleo, assim como a necessidade utilização desse recurso finito, passando-se para uso de bens de consumo naturais, o que contribui para a diminuição de danos causados ao ambiente.

## **2. Revisão Bibliográfica:**

### **2.1 Polissacarídeos**

Polissacarídeos são substâncias poliméricas de alta massa molecular distinguidos pelo número e tipo das unidades monossacarídicas que os compõe, pelos tipos de ligação que há entre estas unidades e pela quantidade de ramificações que apresentam. São divididos em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos apresentam um único tipo de unidade monomérica, enquanto os heteropolissacarídeos apresentam um ou mais tipos de unidades (LEHNINGER, 2000).

As unidades monossacarídicas são ligadas umas às outras por ligações glicosídicas. Tais estruturas podem ser lineares ou ramificadas (ZONG; CAO; WANG, 2012). Os polímeros podem ser classificados também com base em sua origem, que pode ser natural ou sintética. Os polissacarídeos naturais podem ser obtidos de vegetais, algas ou microorganismos e os sintéticos são obtidos através de modificações químicas ou enzimáticas de uma macromolécula mãe (CALICETI; SALMASO; BERSANI, 2010), como por exemplo a fabricação de sulfato de condroitina (um glicosaminoglicano), utilizando cartilagem de traquéia de bovinos como ponto de partida (BEDINI; PARRILLI, 2012).

A diversidade estrutural dos polissacarídeos se reflete em ampla variedade de

propriedades físico-químicas, como capacidade de geleificação, solubilidade em água, e capacidade de baixar o efeito osmótico (MEYERS *et al*, 2008).

Consequentemente, essas macromoléculas tornam-se atraentes para diversos segmentos industriais, por exemplo, para aumentar volume de soluções e se tornarem viscosas, produção de laxantes, detergentes, fibras dietéticas, nucleosídeos terapêuticos, inibidores de alfa glicosidases (usado em tratamento de pessoas imunossuprimidas) e em gomas de mascar (BARKER, 1991).

São também utilizados na indústria alimentícia para revestimento de alimentos com a produção de filmes plásticos (CUNHA,2009), na indústria farmacêutica como contrastes para radiologia, produção de cápsulas de medicamentos (GIL,2006).

Além das aplicações relacionadas ao polissacarídeo íntegro, ainda existem inúmeras possibilidades de aplicações de seus produtos de hidrólise, gerando oligossacarídeos ou monossacarídeos que podem ser aproveitados na indústria de alimentos ou mesmo na fermentação alcoólica para produção de etanol combustível (CHEN, SEVIOUR, 2007). Especialmente a inulina, uma frutana, e os oligossacarídeos obtidos a partir de sua hidrólise, têm sido utilizados como prébióticos (CHEN, SEVIOUR, 2007).

A aplicação mais recente e visionária dos polissacarídeos relacionam-se a aplicações médico-farmacêuticas que os polissacarídeos, especialmente as  $\beta$ - glucanas, podem apresentar, como ação anti-inflamatória (CHEN; SEVIOUR, 2007), anti-clastogênica, anti-mutagênica (CUNHA,2009) e potencial imunomodulador (LEE *et al*, 2011). Polímeros naturalmente sulfatados (provenientes de algas marinhas vermelhas, marrons e verdes) ou que foram sulfatados por derivatização química, apresentaram ação anti-coagulante superior a da heparina (MAEDA *et al* 1991); ( VASCONCELOS *et al* 2013). Por outro lado, polissacarídeos carboximetilados tiveram sua solubilidade em água aumentada, aumentando também a bioatividade dos polímeros, diversificando as possibilidades de aplicação (XU *et al* ,2009).

Atualmente, as fontes mais comuns de polissacarídeos utilizados na indústria são as algas marinhas, para obtenção de alginato, ágar, agarose e carragenana ou vegetais, para obtenção de amido, celulose, pectina e goma arábica. A estrutura e origem destes polissacarídeos estão apresentados na Tabela 1. Além destes polissacarídeos considerados tradicionais, dois outros de origem microbiana também são legalmente aceitos e amplamente utilizados, a xantana e a dextrana.

Tabela1: Exemplos de polissacarídeos tradicionais utilizados na indústria.

Polissacarídeo	Origem	Estrutura	referência
Algas marinhas			
alginato	<i>Laminaria sp</i>	$\alpha(1\rightarrow4)$ ácido gulorônico e $\beta$ -ácido manurônico	RENN,1997
Ágar	<i>Gracilaria sp</i>	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galactose e $\alpha(1\rightarrow4)(3\rightarrow6)$ -L-anidro galactose	RENN,1997
carragenana	<i>Eucheuma sp</i> , <i>Kappaphycus sp</i> , <i>Gigartina sp</i>	$\alpha(1\rightarrow3)$ -D-galactose e $\beta(1\rightarrow4)(3\rightarrow6)$ -D-anidro galactose	RENN,1997
Vegetais			
Amido	milho, mandioca, batata, trigo, arroz e sorgo	$\alpha(1\rightarrow4)$ glucana $\alpha(1\rightarrow4; 1\rightarrow6)$ glucana	MISCHNICK; MOMCILOVIC, 2010
Celulose	vegetais	$\beta(1\rightarrow4)$ -glucana	MISCHNICK; MOMCILOVIC, 2010
Pectina	vegetais	moléculas de ácido galacturônico e ramnose como cadeia principal e cadeias laterais de açúcares neutros ligados a ramnose	STOLL; KASTNER; DRUSCH, 2014
Goma arábica	<i>Acacia Senegal</i>	Galactose,	OSMAN <i>et al</i>

		arabinose, ramnose e ácido glucurônico	,1994
--	--	---	-------

A carragenana pertence a uma família de polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular que são obtidos de algumas espécies de algas vermelhas. Tal polissacarídeo é muito utilizado na indústria alimentícia devido as suas características físicas, como capacidade de formação de géis, características espessantes e estabilizantes, sendo utilizado no processamento da carne, produção de salsichas e hambúrgueres ( KAVITHA REDDY *et al*, 2011). É também utilizado na indústria cosmética, em pastas de dentes, cremes e shampoos. Atualmente também começou a ser aplicado na indústria farmacêutica (CAMPO *et al*, 2009).

O amido utilizado industrialmente é formado por duas cadeias de glucose, uma amilose linear  $\alpha$  (1→4) e uma amilopectina ramificada  $\alpha$  (1→4)(1→6) (NAGURESWARAN,2014). A maneira como as duas cadeias de glucose se combinam formam um grânulo insolúvel em água, cujas propriedades em relação a de inchamento e gelatinização variam de acordo com a origem do amido (MUKERJEA; SLOCUM; RODYT ,2007). O amido possui a capacidade de formar uma pasta viscosa quando aquecido em água e seguido por sua capacidade de arrefecimento, tornando-o interessante para a indústria (RICHARDSON; GORTON, 2003). Um dos desafios tecnológicos do amido é o comportamento de retrogradação, que consiste na re-agregação entre as cadeias de amido após a gelatinização e durante o resfriamento da solução, com redução de sua solubilidade. A retrogradação pode ser acompanhada de sinérese, que consiste na liberação de água após o retorno das interações fracas intra e intercadeia do amido. Para melhorar ou transformar o amido em uma molécula específica para determinado uso, usa-se fazer modificações químicas em sua estrutura, para aumento de solubilidade e modificações na retrogradação e sinérese ( LOBO; SILVA, 2003) É o polissacarídeo mais usado na indústria alimentícia graças a seu valor nutricional, capacidade de espessamento e propriedades geleificantes (HUC *et al* ,2014) e para auxiliar na modificação de textura de diversos tipos de produtos alimentares (SIMSEK *et al*, 2014). Por ano, são utilizados mais de 60 milhões de toneladas de amido extraídos das mais diferentes culturas de cereais e de tubérculos (DONOT *et al* ,2012).

O amido é comumente modificado para ter suas propriedades funcionais melhoradas (WURZBURG,1986). As principais maneiras de realizar modificações no amido são:

modificação física, química ou enzimática (HUBER,2009). Após modificações, as propriedades físicas e químicas do amido são alteradas por cisão molecular, rearranjo molecular, oxidação e introdução de radicais na estrutura (WURZBURG,1986).

A celulose é um dos mais abundantes polissacarídeos existentes. Um recurso natural e renovável (ARMAROLI; BALZANI, 2006), que por conta de sua estrutura e propriedades como ser biodegradável, não ser poluente e ter uma boa condição de estabilização térmica, é considerada uma candidata para resolver diversos problemas, principalmente, da crise de petróleo (GOH *et al*, 2010), sendo transformado em biocombustível (FUKUOCA; DHEPE, 2006). Mas devido a complexidade da sua estrutura rígida, por ser quimicamente estável, é ainda um desafio para se produzir combustíveis, sendo necessária uma preparação da biomassa celulósica, com hidrólises ácidas, que, embora eficientes, geram muitos resíduos e custos elevados, o que inviabiliza a produção em larga escala (ZUGENMAIER; TIMELL; WIMMER, 2007). Diversos estudos estão sendo conduzidos para resolver tais problemas, até mesmo com caminhos biotecnológicos, na busca por micro-organismos que consigam degradar a celulose e torna-la viável para a produção de biocombustíveis (FERREIRA *et al* ,2014). É um polímero insolúvel em água, por isso, recebe tratamentos para ser empregada nos diversos setores industriais em que é utilizada, como por exemplo, a formação de ésteres de celulose, no qual a celulose é submetida a tratamento alcalino forte, tornando os açúcares disponíveis (YOKOTA,1985).

A pectina, que é encontrada em paredes celulares e lamelas médias de vegetais superiores, é um heteropolissacarídeo com moléculas de ácido galacturônico e moléculas de ramnose como cadeia principal e cadeias laterais de açúcares neutros ligados a ramnose , utilizada na indústria de alimentos para aumento de viscosidade e por sua capacidade de geleificação (STOLL; KASTNER; DRUSCH, 2014), e agora vem sendo estudado para fabricação de biofilmes comestíveis (ESPITIA *et al*, 2014).

Existem diversos tipos de polissacarídeos que já são usados na indústria. No entanto, sempre necessitam de alguma modificação ou não são apropriados para determinados produtos e usos. Dessa maneira, há uma busca constante por novas fontes de polímeros e aplicações para tais moléculas. A preocupação ambiental é um dos principais motivadores para o uso de polissacarídeos naturais. Os polissacarídeos produzidos por micro-organismos vem cada vez mais ganhando espaço na área da pesquisa, uma vez que pode ser produzido em grande quantidade, e a variabilidade e qualidade não são motivos de

preocupação já que as condições de produção são altamente controladas (SANDERSON,1990).

## 2.2 Polissacarídeos Microbianos:

Polímeros provenientes de micro-organismos, tanto de fungos filamentosos, quanto de leveduras e bactérias são um mercado ainda muito pouco explorado em vista do potencial que apresentam (SOUTHERLAND,2001).

A biossíntese de polissacarídeos geralmente acontece após a fase de crescimento do organismo. Os polissacarídeos produzidos podem ser encontrados em três locais diferentes, o que determina sua classificação: os polissacarídeos citosólicos, que são os fornecedores de energia; os que formam a parede da célula, os peptídeoglicanos e lipopolissacarídeos e os exopolissacarídeos, que são produzidos e liberados ao meio de cultivo (DONOT *et al*, 2012).

Os exopolissacarídeos são mais fáceis de purificar do que os demais, uma vez que já estão fora das células e estas não precisam ser lisadas para se alcançar o polímero. bastando apenas uma etapa de precipitação para separação do EPS do caldo fermentado.

Os EPS de origem microbiana apresentam propriedades iguais ou superiores aos polissacarídeos obtidos de vegetais ou algas marinhas (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2006) e sendo produzidos em fermentadores, são livres de variações ambientais e sazonais (SELBMANN *et al.*, 2004). Por outro lado, a composição do meio de cultura e as condições de cultivo dos micro-organismos interferem diretamente na produção do EPS, afetando a qualidade e até mesmo a estrutura do polímero formado (BARBOSA *et al*, 2004; CORRADI DA SILVA *et al*, 2006).

A ampla possibilidade de aplicações para os polissacarídeos produzidos extracelularmente por micro-organismos aumenta cada vez mais o interesse de diversos tipos de indústrias em tais biopolímeros, como indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosmética e médica(MORRIS,2009).

Embora a diversidade microbiana produtora de polissacarídeos seja elevada, apenas dois são autorizados para uso em indústrias de alimento nos Estados Unidos e Europa, que são a xantana e a gelana (DONOT, 2012).

Um dos polissacarídeos microbianos mais utilizado na indústria atualmente é a

xantana. A xantana é um exopolissacarídeo produzido por uma bactéria denominada *Xantomonas campestris*. São moléculas extremamente grandes e rígidas.

A xantana é uma  $\beta$ - glucana com cadeia principal ligada (1 $\rightarrow$ 4), sendo ramificada a cada duas unidades por trissacarídeos constituídos por ácido glucurônico entre duas unidades de manose.

A xantana tem a capacidade de aumentar a viscosidade de soluções, o que a torna interessante para o uso como agentes de suspensão e como espessantes, é utilizada a mais de 30 anos em indústrias de alimentos e medicamentos, sendo adicionada a molhos, xaropes, coberturas, molhos para saladas, em bebidas para a distribuição uniforme da polpa de frutas, para dar corpo a bebidas lácteas. (MORRIS; HARDING, 2009).

Sua estabilidade em congelar/descongelar também a torna muito usada em alimentos congelados, como o sorvete. É utilizada também em cremes, pasta de dentes, shampoos (MORRIS; HARDING, 2009). A xantana apresenta uma demanda de mais de 30mil toneladas por ano (DONOT, 2012). Para sua produção, o tipo de biorreator, o modo de batelada utilizada, composição do meio (embora todos sejam meios complexos) e condições de cultura (pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido) influenciam o crescimento da bactéria e consequentemente a produção da goma xantana (OCHOA *et al*, 2000). As fontes de carbono utilizadas com maior frequência são glicose e sacarose, numa proporção de 2 a 4%, sendo que a quantidade influencia no rendimento da goma. Concentrações muito elevadas da fonte de carbono também podem ser prejudiciais ao crescimento da bactéria, afetando, consequentemente a produção da xantana (OCHOA *et al*, 2000).

A gelana é um polímero produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*. É um polímero composto de glucose, ácido glucurônico e raminose. É solúvel em água quando aquecido a 90°C e sofre arrefecimento, produzindo gel em condições mais amenas (ALHAIQUE *et al*, 1996). É um polímero muito usado na indústria alimentícia (ZHANG *et al*, 2014).

A pululana também é um polissacarídeo microbiano produzido pela levedura *Aureobasidium pullulans*. É uma  $\alpha$ - glucana linear com ligações (1 $\rightarrow$ 6) (1 $\rightarrow$ 4). É uma molécula solúvel em água e muito flexível. Vem sendo muito utilizada atualmente no Japão, em alimentos com ovas de bacalhau, queijo em pó e em películas de embalagens para presunto (MORRIS; HARDING, 2009) ;(SINGH *et al*, 2008). Por causa de sua estrutura estritamente linear, ela vem sendo muito utilizada como modelo de estudos de

estrutura e reologia, para demais tipos de polissacarídeos (SINGH *et al*, 2008).

A dextrana é um exopolissacarídeo  $\alpha$ - glucana (1 $\rightarrow$ 6)-D sintetizado por diversas espécies de fungos e bactérias, dentre elas os gêneros *Weissella* (SHUKLA *et al*, 2014); *Leuconostoc* (AMAN; SIDDIQUI; QADER, 2012) e *Arthrobacter* (WANG *et al*, 2014). O polímero passa por hidrólise para ser fracionado em cadeias de baixo peso molecular, para então ser utilizado em processos biotecnológicos. Cadeias de diferentes tamanhos são empregadas em diferentes produtos, em formulações de medicamentos, em crioprotetores, vacinas, estabilizantes na indústria de alimentos e cosméticos (KHALIKOVA,2005). Algumas frações de peso específico são utilizadas para restaurar o volume de sangue em pacientes em que houve muita perda do mesmo (MEHVAR, 2000).

Polissacarídeos produzidos por fungos filamentosos, em sua maioria, são beta glucanas. Detalhes estruturais e exemplos de micro-organismos produtores estão apresentados na Tabela 2

Tabela 2 – Exemplos de micro-organismos produtores de polissacarídeos

Fungo	Ligação	Massa Molecular	Grau de ramificação	Solubilidade em água	Referências
<i>Aureobasidium pullulans</i>	$\alpha$ (1→4); $\alpha$ (1→6)	250kDa	Linear, sem ramificação	solúvel	Bender; Lehmann; Wallenfels, 1959
<i>Amanita muscaria</i>	$\alpha$ (1→3)	42x10 <sup>3</sup> Da		Insolúvel	Kiho <i>et al</i> , 1992
<i>Sclerotium glucanicum</i>	$\beta$ (1→3)(1→6)	18x10 <sup>3</sup> Da	Em 1 em cada 5 ou 6 unidades	Solúvel	Schweiger-Hufnagel <i>et al</i> , 2000
<i>Ganoderma japonicum</i>	$\beta$ (1→3)	82x10 <sup>3</sup>	1 em cada 3 unidade	Insolúvel	Ukai <i>et al</i> , 1982
	$\beta$ (1→6)	Da			
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	$\beta$ (1→3)(1→6)	4,3x10 <sup>3</sup> Da	1 em cada 3 unidades	Solúvel em álcali	Chenghua <i>et al</i> , 2000
<i>Microdochium nivale</i>	$\beta$ (1→4)				Schweiger – Hufnagel <i>et al</i> , 2000
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	$\beta$ (1→3)(1→6);		1 em cada 5 unidades	Insolúvel ;	Barbosa <i>et al</i> ,2003
	B(1→6)			solúvel	
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	$\beta$ (1→3)(1→6) ;	1,8x10 <sup>6</sup> Da	2 em cada 5 unidades; linear	Insolúvel;	Oliveira <i>et al</i> ,2014
	B(1→6)	1,8x10 <sup>6</sup>		solúvel	

Os EPS fúngicos diferenciam-se daqueles de outras origens justamente por que suas beta-glucanas tem apresentado potencial para aplicações médico/farmacêuticas e uma melhor biocompatibilidade com tecidos animais, havendo pouca ou nenhuma rejeição quando associados.

Dessa maneira, podem ser usadas no organismo humano sem danos, sendo aplicado como adjuvante em enxertos, em membranas de liberação de medicamentos e encapsulação de fármacos (MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014; GUERRA *et al*, 2009) , justificando o interesse no estudo específico destes polissacarídeos.

### **2.3 O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ e produção de exopolissacarídeo**

O *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo fitopatogênico que pode ser encontrado infectando mais de 280 espécies de plantas nas florestas tropicais e subtropicais em todo o mundo (SUTTON, 1980 *apud* NUNES *et al*, 2008). Tal micro-organismo pode ser encontrado distribuído no mundo todo entre as latitudes 40° Norte e Sul, sendo, portanto encontrado na parte tropical do globo. É um organismo classificado como grupo de risco 1 (na sigla em inglês RG-1), que são organismos que não apresentam risco a saúde em humanos saudáveis e não apresentam nenhum ou baixo risco a populações (SUMMERBELL *et al.*, 2004). O micro -organismo quando crescido em placas de PDA (*potato dextrose agar*, da sigla em inglês) apresentam micélio aéreo abundante de coloração branca nos primeiros dias de crescimento, passando para negro após 7 dias, pois há a produção de melanina.

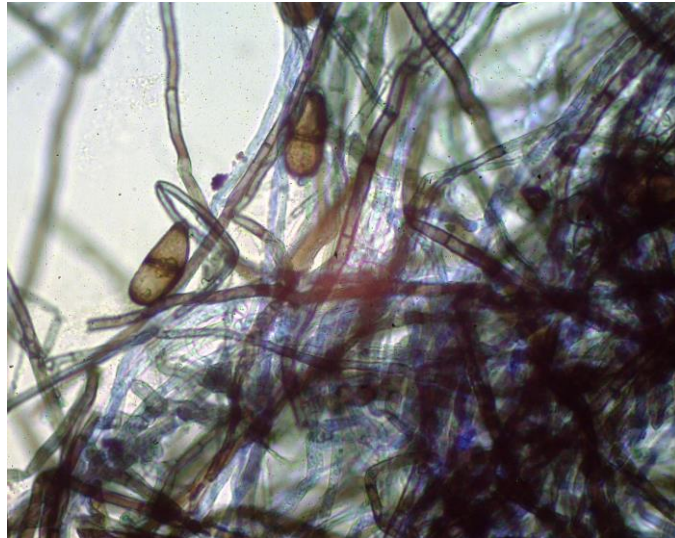


Figura 1: *Lasiodiplodia theobromae*: microscopia óptica

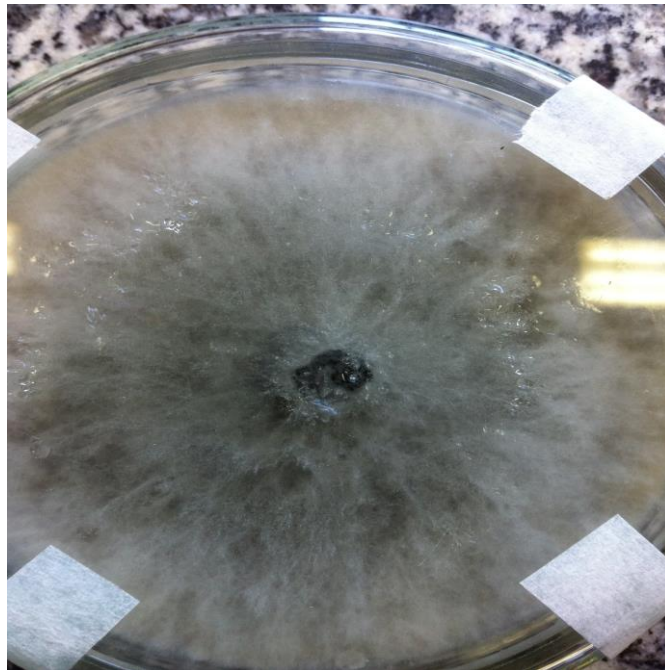


Figura 2: *Lasiodiplodia theobromae* em placa com meio contendo vogel, glicose e ágar, 7 dias de crescimento

Inicialmente o interesse no fungo *L. theobromae* foi baseado na produção de EPS por sua forma teleomórfica *Botryosphaeria rhodina*, cujas condições de cultivo e caracterização química do EPS botriosferana já estavam descritas na literatura.

O botriosferana, é uma  $\beta$ -glucana com ligações  $\beta$ - glucana (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) com

aproximadamente 22% de ramificações constituídas por resíduos glicosídicos e gentibiosídicos, duas glicoses ligadas por 1-6(gentiobiose) ligados a cadeia principal por ligações tipo  $\beta(1\rightarrow6)$  (BARBOSA *et al* ,2003). Tal polissacarídeo ainda está em fase de testes laboratoriais, não sendo usado ainda na indústria. A principal linha de pesquisa com essa  $\beta$ - glucana consiste no potencial de aplicação biológica do polímero, uma vez que apresentou ação imunomoduladora, anti-mutagênica, anti-clastogênica, anti-inflamatória, anti-tumoral e anti- viral (CORADI DA SILVA *et al* ,2005).

A produção de exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia theobromae* foi estudada recentemente no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (UNESP, Campus Assis), tanto em frascos agitados, quanto em biorreator de bancada. Os cultivos em frascos apresentaram um rendimento de até 2,5 g/L de EPS em 72h de cultivo (OLIVEIRA ,2014). Já em biorreator, o rendimento foi de 7,35 g/L em 60 h de cultivo (OLIVEIRA, 2014), utilizando meio de cultivo composto de meio Vogel, sacarose comercial 56,6 g/L e nitrato de amônio 2,03 g/L. Os estudos estruturais do EPS de *L. theobromae* demonstraram a presença de três glucanas, sendo uma  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- insolúvel em água fria e duas  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 6) de tamanhos distintos, sendo uma de 7000 g/mol e outra de 1.800.000 g/mol, solúveis em água (OLIVEIRA ,2014).

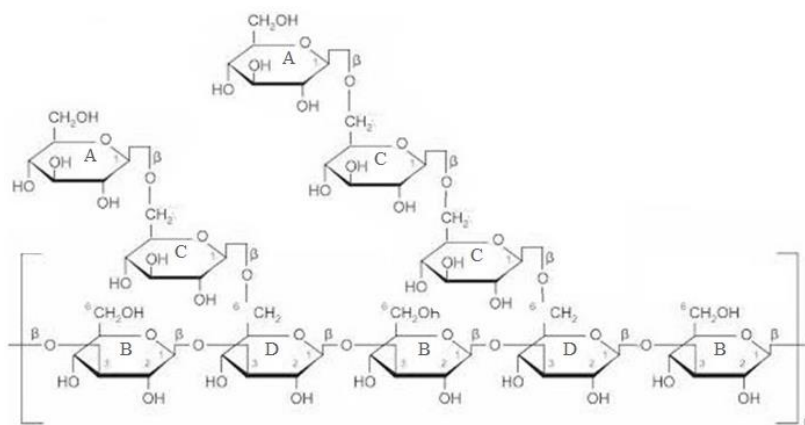


Figura 3: Estrutura da  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- produzida por *Lasiodiplodia theobromae*. Fonte ilustração : Oliveira (2014).

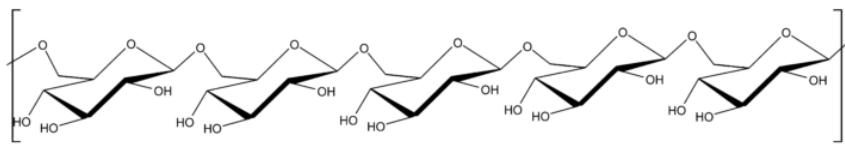


Figura 4 : Estrutura da  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) produzida por *Lasiodiplodia theobromae* para cadeia de  $1,8 \times 10^6$  g/mol e  $7 \times 10^3$  g/mol. Fonte ilustração: Vasconcelos e colaboradores (2008).

Em testes reológicos verificou-se o comportamento de fluido não-newtoniano pseudoplástico entre temperaturas de 30°C a 90°C, perda de viscosidade em pH ácido e em solução de NaOH acima de 0,4 mol/L e viscosidade estável na presença de sais minerais (CAMPIONI, 2010).

As possíveis aplicações industriais para o EPS de *L. theobromae* ainda estão sendo investigadas.

#### 2.4 Atividade Biológica de polissacarídeos microbianos:

Dentre as diversas possibilidades de aplicação dos EPS, as  $\beta$ -glucanas fúngicas tem se destacado por suas atividades biológicas, podendo conferir benefícios a saúde (LOWRY *et al*, 2005; VOLMAN *et al*, 2008).

Recentemente a anti-mutagenicidade, anticlastogenicidade, atividade hipoglicêmica e hipocolesterolêmica do EPS do fungo *B. rhodina* foi mostrada por MIRANDA *et al*, 2007, 2008. Além disso, o botriosferana modificado por sulfatação também apresentou atividade anticoagulante. (MENDES *et al*, 2009).

$\beta$ -glucanas fúngicas tem sido citadas em avaliações imunomoduladoras. Um exemplo são duas glucanas (ZY) de *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3) com a ramificações  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6). ZY são ativadores das células do sistema imune através da capacidade de aumentar a produção de mediadores solúveis da imunidade tais como oxigênio reativo, óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e IL-10 (Goldman *et al*, 1994; Ohno *et al*, 1996; Ljungman *et al*, 1998; Du *et al*, 2006). EPS de *Letinus edodes*, a lentinana, induziu a proliferação de macrófagos da linhagem RAW 264.79, aumentou sua capacidade fagocítica, a liberação de óxido nítrico e a transcrição gênica

das citocinas TNF-alfa IL-12 e IL-23 (LEE *et al.*,2008).

Outro polissacarídeo que vem apresentando atividade biológica é glucana produzida por *Cordyceps militaris*, um fungo utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (WANG,2012). Ele possui estrutura basicamente de  $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-glucopiranosil,  $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-glucopiranosil, e  $\beta(1\rightarrow6)$ -D- glucopiranosil. É um polissacarídeo de baixo peso molecular que apresentou atividade anti-tumoral, anti-oxidante e imunoestimulante (JING *et al* , 2014).

Dois polissacarídeos produzidos por *Pleurotus tuber-regium*, um basidiomiceto comestível encontrado mundialmente, foram avaliados e verificou-se a presença de atividade anti-oxidante em ambos (WU *et al*,2014).

*Grifola frondosa* é um basidiomiceto produtor de polissacarídeos que foram descritos como agentes anti-tumorais , polissacarídeos esses, presentes tanto no corpo de frutificação quanto no micélio. Tais polímeros foram descritos como diversos tipos de  $\beta(1\rightarrow3)$  glucana e  $\beta(1\rightarrow6)$  glucana (LEE *et al*, 2003).

A esquizofilana, uma  $\beta$ - glucana produzida por *Schizophyllum commune* , um fungo filamentosos, vem sendo utilizada como tratamento imunoterápico no Japão desde 1986. Em estudos clínicos foi demonstrado que tal polissacarídeo ativa macrófagos , promovendo a ativação de células T, aumentando assim o mecanismo de defesa do organismo (LEE *et al* ,2003).

Autores sugerem que as características imunomoduladoras das  $\beta$ -glucanas são unicamente dependentes da sua estrutura molecular na ativação dos receptores imunológicos (BROW *et al*, 2003) .As  $\beta$ - glucanas não são sintetizadas pelo organismo humano. Dessa forma, são moléculas estranhas ao nosso sistema imunológico, o que induz nosso organismo a ativar respostas imunológicas tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (CHEN; SEVIOUR , 2007).

Na imunidade inata, que está presente em nosso organismo desde o nascimento, corresponde a uma imunidade não específica, que responde a muitos antígenos e age através dos macrófagos, que produzem citocinas que ativam células T e B . A imunidade adaptativa responde a antígenos estranhos introduzidos e é mediada por células T e B e conseqüente produção de anticorpos (MUNZ *et al*, 2005). Ver uma definição em português.de maneira mais simples e correta.

Certas  $\beta$ -glucanas, como a lentinana, ativam macrófagos, conduzindo assim a expulsão de patógenos por fagocitose e também ativa receptores do sistema

complemento (BROWN *et al*, 2002). O Zimozan, um polissacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, estimula macrófagos a produzir citocinas, imunomoduladores locais, que vão ativar a imunidade adaptativa (YOUNG *et al*, 2004). A adição de zimozan em culturas de macrófagos também apresentou um aumento na produção de citocinas do tipo IL-10 e TNF (SAIJO *et al*, 2007).

De maneira geral as  $\beta$ - glucanas estimulam todo o sistema imunológico e não uma via apenas. Podem ser administrados via oral ou intravenosa, se solúveis, usados em combinações com outros medicamentos, podem gerar um resultado final muito satisfatório (BERNER *et al*, 2005).

Dentre os possíveis mecanismos de ação das glucanas no organismo, destaca-se o de que em organismos multicelulares, há receptores denominados PRRs (receptores de reconhecimento padrão – da sigla em inglês ‘pattern recognition receptors’), estruturas estas que detectam moléculas não inatas do organismo, incluindo os chamados padrões moleculares associados a patógenos (ou PAMPs- da sigla em inglês - pathogen-associated molecular patterns). Assim, as  $\beta$ -glucanas provavelmente agem como PAMPs e são reconhecidos por receptores de células apropriadas, gerando as respostas imunitárias encontradas nos estudos. Em humanos foram identificados uma série de receptores, sendo eles o Dectin-1, CR3 (receptor complementar 3), LacCer (lactolceramina) e o receptor TLR (*toll-like*) (BROWN; GORDON, 2005). Esses estudos podem formar as bases para subseqüentes desenvolvimentos de aplicações médicas para  $\beta$ -glucanas (WENG *et al*, 2011) e suportam a hipótese de que a glucana produzida por *L. theobromae* possa ter ação imunomoduladora.

Quem sabe colocar na metodologia Moléculas como a citocina TNF acarreta a ativação da via clássica dos macrófagos, o que acaba por estimular a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios (CHANG *et al*, 1998; MORRISON *et al*, 2002).

Pesquisadores afirmam que a expressão de L-arginase é induzida em macrófagos por citocinas Th2 e que o equilíbrio entre iNOS e arginase correlaciona-se com o balanço entre as atividades Th1/Th2. Dessa forma, os efeitos pró-inflamatórios e anti-fibróticos das respostas Th1 são marcadamente dependentes de iNOS e as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4/IL-13 apresentam inibição das atividades de arginase e iNOS, respectivamente. Macrófagos estimulados com citocinas Th2 produzem prolina, um importante precursor de colágeno, sobre o estrito controle de arginase (MUNDER *et al*, 1998; MUNDER *et al*, 1999). Outros pesquisadores propuseram que a indução da expressão de arginase em

modelos de ativação de macrófagos induz a formação de granuloma. Além disso, a via metabólica alternativa de L-arginina é consistente com a ativação diferencial de macrófagos, e sugere uma possível explicação para a associação entre inflamação do tipo Th2 com o aumento de fibrose (GORDON,2003).

Em situações onde macrófagos alternativamente ativados limitam o dano tecidual ou promovem o reparo, seria de grande valia intensificar a atividade destas células (RABINOVICH *et al*,2000).

## **2.5 Aplicações em filmes de polissacarídeos microbianos:**

Devido a propriedade de formação de filmes, polissacarídeos em geral têm sido estudados para o desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis, que podem ser aplicados na fabricação de embalagens, de filmes comestíveis e biodegradáveis, havendo inclusive uma diminuição no descarte de resíduos no ambiente (PALMU, 2003), e ainda em formas farmacêuticas de uso tópico, com liberação controlada de medicamentos (MAINARDES *et al*, 2005).

O amido é um ótimo exemplo do estudo para a utilização de polissacarídeos para fabricação de filmes comestíveis com a intenção de aumentar a vida de prateleira dos alimentos (GARCIA *et al*, 1998). Tem sido estudado também a utilização de filmes de amido para a liberação gradual de antimicrobianos em produtos alimentares, com a mesma intenção (FRANSSEN *et al*, 2002).

Os primeiros estudos para a fabricação de filmes que fossem biodegradáveis para uso em alimentos foram feitos substituindo parte do material sintético por amido nas formulações dos filmes, mas foram encontradas dificuldades na fabricação devido a incompatibilidade do amido com materiais sintéticos, bem como a fragilidade do amido, deixando os filmes muito quebradiços (GRIFFIN,1977).

O uso de plastificantes aumentam a maleabilidade dos filmes de amido, uma vez que melhoram as ligações de hidrogênio entre as cadeias dos polímeros. O plastificante mais comum usado em filmes de amido é o glicerol, evitando rachaduras no filme, afetando a transmissão de vapor de água pela embalagem e conseqüentemente as propriedades mecânicas (CUG *et al*, 1993). A quantidade de glicerol utilizado na formação do filme com amido afeta diretamente tais características das películas (MALI

*et al*, 2005).

Devido as limitações dos filmes com amido, torna-se importante o estudo de novas fontes de polissacarídeos, bem como de métodos de produção de filmes biodegradáveis. Polissacarídeos microbianos podem ser possíveis candidatos a formação de biofilmes tanto para uso em alimentos quanto para utilização biomédica, na forma de filmes carreadores de medicamentos ou encapsulação de fármacos.

Propriedades de filmes obtidos com EPS produzidos por *L. theobromae*, (DI BASTIANI, 2011), e *B. rhodina* (ALTARUGIO, 2010) foram estudadas anteriormente. Dentre as diversas formulações avaliadas foram obtidos filmes, por exemplo, com solubilidade entre 6,09 (contendo 0,5% de botriosferana) e 26,51 g (3,0% de botriosferana e 1,0% de goma guar) de material solúvel/ 100 g de filme. Tais resultados foram promissores, já que filmes com alta solubilidade podem ser utilizados em encapsulação de alimentos ou de aditivos, sem impedir a digestão. Em relação a solubilidade dos filmes de EPS de *L. theobromae*, houve variação entre 11g a 90g de material solúvel para 100 g de filme, utilizando formulações de EPS e óleo vegetal ou EPS e xantana, respectivamente.

Os filmes de polissacarídeos também podem ser aplicados como veículo para fármacos. Veículos que permitam liberação controlada de medicamentos são importantes por fornecerem um aumento na duração e nos níveis dos princípios ativos que podem ser degradados e metabolizados mais facilmente, sendo aplicados diretamente onde se faz necessário o uso do fármaco, não espalhando a droga por todo o organismo, diminuindo inclusive, possíveis efeitos colaterais indesejados (VEIGA, 1998).

COVIELLO *et al.* (1999) estudou a preparação de gel usando escleroglucana (EPS produzido por fungos do gênero *Sclerotium*, conjuntamente com outro polímero, a gelana (EPS produzido pelo fungo *Sphingomonas elodea*), a fim de induzir uma melhor estabilidade na matriz. As propriedades dos dois polímeros foram mantidas por uma reação de dupla ligação cruzada. A matriz resultante mostrou um comportamento de liberação do fármaco melhor do que aquele obtido com os polissacarídeos sozinhos.

Alhaique e colaboradores (1990) prepararam fórmulas orais de dosagem de benzamida utilizando escleroglucana e verificaram a possibilidade de modular a taxa de liberação do fármaco pela adição de aditivos apropriados à formulação inicial contendo apenas escleroglucana.

Filmes contendo apenas EPS podem não ter a flexibilidade requerida para determinada aplicação, como por exemplo, para adesivos de uso tópico. Neste caso, a presença de aditivos pode ser necessária. Um potencial aditivo para os filmes de EPS é o látex.

O látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* está sendo utilizado como matriz para um “novo sistema” de liberação controlada (SLC) e tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas, sendo dessa forma um excelente candidato a formar uma blenda (junção de dois materiais diferentes para a formação de um novo material) com EPS de origem fúngica (HERCULANO *et al*, 2009; HERCULANO *et al*, 2010; FRADE *et al*, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2003; THOMAZINI *et al*, 1997). Esse biomaterial forma um sistema coloidal polifásico e polidisperso que depois de centrifugado pode ser representado como sendo formado por três componentes fundamentais: hidrocarboneto isoprênico, soro (partículas de borracha dispersas em uma fase aquosa) e fração de fundo.

Trabalhos recentes (HERCULANO *et al*, 2009; HERCULANO *et al*, 2010) têm mostrado que o látex natural é um material biocompatível com promissoras aplicações biomédicas, uma vez que estimula a angiogênese. Membranas feitas deste material têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido a suas características de biocompatibilidade e estímulo natural a angiogênese (MRUÉ *et al*, 2004). O látex é ainda um material de elevada resistência mecânica e de baixo custo, justificando assim sua escolha como candidato a matriz sólida para SLC.

Filmes podem ser preparados de três maneiras distintas: por extrusão, que consiste na injeção de ar na amostra, por *casting*, que consiste na secagem do material em estufas e por liofilização, no qual a amostra é congelada e levada ao liofilizador para secagem.

Quando se trabalha com filmes é importante a verificação de alguns parâmetros que vão influenciar e direcionar as aplicações do material. Algumas delas são : espessura, transparência, perda de umidade, solubilidade em água, taxa de transmissão de vapor de água e resistência mecânica.

O estudo de resistência mecânica é importante para verificação da deformação do material, quanto mais deformação ele sofre mais resistente ele é. Tais testes podem ser feitos em equipamentos como a Máquina Universal de Ensaio, aparelho no qual são feitas medições de tração e deformação de materiais. Quando uma tensão é exercida em um corpo sólido, este tende a se deformar. A razão entre a tensão aplicada e a deformação ocorrida define, no caso da tração, o módulo de elasticidade do material, que corresponde

a uma característica do material, não importando suas dimensões. Quanto maior for este módulo maior será a resistência do material à deformação. E, obviamente, para uma mesma tensão, quanto menor forem as dimensões do corpo de prova, menor será a força necessária para deformá-lo.

Uma vez que o EPS também pode formar filmes e ser simultaneamente fármaco e veículo, foi avaliada a capacidade desses filmes de serem carreadores de um segundo fármaco.

Diversos medicamentos podem ser usados como modelo de estudo de liberação. Neste estudo, o cetoprofeno foi utilizado como modelo para o estudo da liberação controlada de medicamentos por filmes de EPS e látex. O cetoprofeno é um medicamento anti-inflamatório não esteroide derivado do ácido propiônico, apresentando também ação analgésica e antipirética. A ação deste fármaco está relacionada a inibição da enzima ciclooxigenase diminuindo a formação de prostaglandinas mediadoras da inflamação (MEDLEY®).

### 3. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foi o estudo de propriedades imunomoduladoras *in-vitro* do exopolissacarídeo  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) produzido pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* e ação das blendas dos exopolissacarídeos juntamente com o látex como veículo de fármacos

Para tais estudos os objetivos específicos foram:

- 3.1 Cultivo do fungo *Lasiodiplodia theobromae* para obtenção dos exopolissacarídeos
- 3.2 Extração e purificação do EPS
- 3.3 Avaliação da atividade biológica do EPS purificado  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) isolada, *in vitro*, analisando-se os parâmetros moleculares quanto à ativação clássica e alternativa de macrófagos
- 3.4 Preparação de blendas de EPS e látex
- 3.5 Estudo de propriedades físico- química das blendas tais como espessura, perda de umidade, solubilidade em água, resistência mecânica e deformação
- 3.6 Estudo da liberação do medicamento cetoprofeno em blendas de látex e

exopolissacarídeo bruto e a fração purificada  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6).

#### **4. Materiais e métodos:**

O presente projeto foi realizado sob orientação da Dra. Valéria M. G. do Nascimento, no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO), UNESP – Campus Assis, em colaboração com a Dra. Karina Alves de Toledo, do Laboratório de Biotecnologia de Vacinas e com o Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, do Laboratório de Física, Biofísica e Biomateriais também da UNESP – Campus Assis.

##### **4.1 Meios de cultivos, condições de manutenção do fungo e produção do EPS**

Neste trabalho foi utilizado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* isolado de berinjela e cedido gentilmente ao LBBIO da FCL-Assis, pela Dra Aneli de Melo Barbosa, docente aposentada da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR.

Os meios e as condições de cultivo que foram utilizados neste trabalho foram descritos por BARBOSA *et al.* (2003) para o fungo *Botryosphaeria rhodina*. O fungo foi mantido em meio sólido contendo meio mínimo de VOGEL (1956), glicose (10 g/L) e ágar (20 g/L) - meio VGA - mantidos a 4°C.

Para preparo do inóculo, o micro-organismo foi inoculado em meio VGA e incubado a 28 °C. Após sete dias de incubação, foram retiradas esferas de 0,5 cm de diâmetro, compostas de meio de cultivo e micélio. As esferas foram transferidas para frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio mínimo de VOGEL (1956) e 0,5 g/L de glicose. Os frascos foram mantidos a 28 °C, com agitação de 180 rpm, por 48 h. O conteúdo do frasco foi homogeneizado em Blender por alguns segundos e com uma pipeta estéril foram inoculados 12 mL em Erlenmeyers de 3000 mL contendo 600 mL de meio composto de VOGEL e sacarose 50 g/L. O pH do meio de cultivo foi corrigido para 5,8 com HCl 1 mol/L. A incubação foi realizada a 28°C, 180 rpm por 72 h.

## **4.2 Recuperação , quantificação e preparação do exopolissacarídeo:**

O protocolo adotado neste projeto foi desenvolvido em projetos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (Oliveira, 2014).

Os EPS obtidos do cultivo submerso foram extraídos do caldo fermentado pela adição de 3 volumes de álcool etílico. A solução etanólica permaneceu em repouso por um período de 24h. Após o período de 24h, os EPS foram retirados do álcool com a ajuda de uma peneira. Os EPS foram dialisados (membrana de 12-14 kDa), e congelados. Uma parte das frações obtidas através da extração alcoólica foi utilizada bruta para a confecção de filmes para os estudos de liberação do medicamento e outra parte foi submetida ao processo de purificação por congelamento e degelo para separação das duas glucanas produzidas pelo fungo utilizado. O processo de congelamento e degelo foi repetido de 5 a 7 vezes para separação das glucanas. O precipitado insolúvel em água fria foi separado por filtração simples. A fração solúvel foi submetida à ultrafiltração em membranas de celulose regenerada de 0,22  $\mu\text{m}$ . As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração adequado acoplado a uma bomba de vácuo. O procedimento de purificação resultou em duas frações polissacarídicas que foram utilizadas nos ensaios de imunomodulação e confecção dos biofilmes, uma das frações corresponde a uma  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e a outra fração a uma  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6)

## **4.3 Análises da resposta de macrófagos frente a exposição ao polissacarídeo purificado *in-vitro*:**

Foi avaliada a ação do EPS purificado  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) em culturas de macrófagos e verificada a resposta imunológica dada pelo exopolissacarídeo através de ensaios de sal de MTT, que verifica taxa metabólica celular e dosagem de citocinas no sobrenadante daquelas células após 24 e 48h de cultura. As dosagens de citocinas foram feitas por ELISA, usando-se kits comerciais.

#### **4.3.1 Cultura de macrófagos de linhagem U937:**

Monócitos humanos de linhagem U937 obtidas a partir da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC® CC7.1) foram mantidos em cultura celular *in vitro* em estufa umedecida à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e acrescidos de antibióticos e antimicóticos.

#### **4.3.2 Procedimentos para tratamento e estímulo das células:**

Os monócitos foram colocados em placas de cultura de 96 poços e foram estimulados com PMA (Phorbol 12-myristate 13- acetate) que cessa o processo mitótico dos monócitos e estimula a diferenciação em macrófagos. PMA (100ng/mL) foi colocado duas vezes com intervalo de 24h entre as doses. Um dia depois da última dose de PMA, este é removido e a glucana  $\beta$ -glucana(1→6) foi adicionada e homogeneizada em RPMI e colocada sobre as células nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu$ g/mL. Macrófagos cultivados na presença de RPMI livre de estímulos foi utilizado com controle negativo. Ao término das culturas (24 e 48 h) foram avaliadas a viabilidade celular e a secreção de citocinas em seu sobrenadante.

#### **4.3.3 Ensaio de viabilidade celular:**

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico de adição de MTT (3-(4,5- Dimetiltiazol-2-il) 2,5 Difenil Brometo de Tetrazolium) que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Após o período de 24h e 48h macrófagos derivados da linhagem U937 e incubados com diferentes concentrações de EPS receberam solução de MTT (1mg/mL) o qual permaneceu por 4 horas adicionais. A formação de sal de formazana foi avaliada por absorbância em 560nm seguindo a adição de DMSO aos poços. A absorbância obtida foi

diretamente proporcional à viabilidade celular. Células cultivadas apenas na presença de meio de cultivo foram consideradas como 100% viáveis.

#### **4.3.4 Dosagem de citocinas por ELISA**

A quantificação da produção de citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (BD Pharmigen). Amostras de sobrenadante de cultura de células foram submetidos à detecção das seguintes citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ , seguindo recomendações do fabricante. O sobrenadante das culturas de macrófagos foram incubados por 2h à temperatura ambiente em placas de 96 poços previamente sensibilizados com anticorpos anti-citocinas (IL-10 ou TNF- $\alpha$ ), em placas de ELISA. Após lavagens, foi permitida nova incubação de 1h à temperatura ambiente na presença do complexo anticorpo biotilado (1/500) específico para cada citocina avidina conjugada à peroxidase (1/250). Após nova etapa de lavagens, foi adicionada a solução reveladora constituída de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi bloqueada com adição de ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada em 450 nm em leitor de microplacas (Power Wavex – BIO-TEK INSTRUMENTS, Inc, USA). A quantificação de citocinas no sobrenadante foi realizada através de curva padrão iniciada em 1-2 ng/mL de citocinas recombinantes.

#### **4.4 Preparo do látex natural :**

O látex natural utilizado foi extraído em Fazenda Experimental de seringueiras *Hevea brasiliensis*. Depois da extração, amônia foi utilizada para manter o látex líquido, e este material foi centrifugado a 8000 g. A centrifugação é importante, pois reduz algumas proteínas contidas no látex natural que causam reações alérgicas.

#### **4.5 Obtenção de blendas de EPS e látex :**

Foram preparados diferentes tipos de biofilmes de EPS e látex variando-se a concentração de EPS.

Após a precipitação com etanol, a massa total de EPS foi dialisada por 24 h, em água corrente, homogeneizada em blender e aquecida em micro-ondas para degaseificação.

A concentração do EPS foi feita por gravimetria após secagem em estufa a 70°C até peso constante. A relação entre massa úmida e seca foi utilizada para preparar soluções com diferentes porcentagens de EPS . As novas soluções foram novamente trituradas para homogeneização e aquecidas para degaseificação.

Foram feitas soluções de água destilada e EPS nas concentrações 0,5%; 1% ; 1,5% e 2% e misturadas na proporção de 2:1 com látex, sendo duas partes de EPS e uma de látex.

As soluções filmogênicas de EPS e látex foram depositadas em placas e levadas ao freezer -22°C para congelamento. Após congelamento, as placas foram levadas ao liofilizador por 48h.

#### **4.6 Obtenção de blendas de EPS, látex e cetoprofeno**

Para as análises de liberação controlada de fármacos os filmes também foram feitos da maneira descrita no item 4.5 juntamente com cetoprofeno (CT).

A confecção do sistema de liberação controlada SLC utilizando o CT como modelo de droga foi realizado em duas etapas: solubilização do CT em solução de 40% de etanol e 60% de água destilada na concentração de 1 mg/mL de fármaco, e adição de 2mL desta solução nas matrizes EPS/látex.

#### **4.7 Análises Físico-Químicas dos filmes de EPS e látex**

##### **4.7.1 Determinação de espessura:**

Com a utilização de um micrômetro digital foram realizadas medidas em 10 regiões do filme, escolhidas aleatoriamente, sendo a espessura final a média aritmética dentre elas (MALI *et al.*, 2004).

#### **4.7.2 Umidade e solubilidade:**

Para determinação de umidade, uma amostra de filme (0,2 g) foi pesada e seca a 105°C em estufa por 24 h. O conteúdo de umidade foi determinado pela diferença entre a massa inicial e a massa seca e foi expresso em porcentagem.

Para determinação da solubilidade em água, uma amostra de filme foi mantida por 24 h em 25 mL de água destilada contendo azida sódica, a temperatura ambiente. Após o período de imersão a amostra foi filtrada a vácuo e seca a 105°C, para determinação do peso seco do material não dissolvido em água. A diferença entre a massa inicial e a massa seca recuperada após a imersão foi considerada a massa de material dissolvido em água e foi expresso como porcentagem em relação à massa inicial (GOUNGA *et al.*, 2007).

#### **4.7.3 Propriedades mecânicas:**

Testes biomecânicos de tração foram realizados para se determinar o grau de deformação e resistência de cada membrana utilizando-se uma Máquina Universal de Ensaio (EMIC-DL2000). O equipamento é acompanhado por um software que mostra a curva de resposta (força [N] vs deformação [mm]) de cada membrana testada. As amostras de filmes foram confeccionadas em placas apropriadas em formato de halteres para o encaixe na máquina. As bordas foram presas em presilhas que tinham o formato da membrana. Membrana de látex apenas foi utilizada como controle para comparação de efeito de adição no EPS na resistência mecânica e deformação das matrizes.

As membranas possuíam dimensões conhecidas e foram informadas à máquina para a realização do experimento.

#### **4.8 Estudo da Liberação de Fármacos dos Biofilmes:**

As membranas foram colocadas em diferentes béqueres contendo 100 mL de solução aquosa com 0,05% de azida sódica (antifúngica) para liberação do fármaco. Vale ressaltar que a água destilada foi escolhida como meio de liberação uma vez que o trabalho visa, primeiramente, traçar um perfil de liberação do fármaco agregado as

blendas de polissacarídeo e látex para se observar seu comportamento. Alíquotas destas soluções foram coletadas em diferentes intervalos de tempo. Na primeira hora as medidas foram realizadas de 15 em 15 minutos. Após uma hora as medições passaram a apresentar intervalos de 1 em 1 h. Depois de 5 h as medidas passaram a ser a cada 24h. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 260 nm, que é o comprimento de onda onde o cetoprofeno é lido.. Para mensurar a quantidade de medicamento liberado pelas membranas foi necessário construir uma curva de calibração com o cetoprofeno.

## **5. Resultados e discussão:**

### **5.1 Obtenção do EPS:**

Para a realização dos testes com filmes e atividade biológica, o fungo *Lasiodiplodia theobromae* foi cultivado nas condições descritas em Material e Métodos. Após o cultivo, o micélio foi separado por centrifugação e ao sobrenadante foi adicionado etanol para recuperação do EPS. Foram realizados vários cultivos para obtenção de volume de EPS suficiente para os testes deste trabalho. Em média foram obtidos 23,4 g/L de biomassa, 2,6 g/L de EPS e 46,3 g/L de açúcar consumido.

O EPS recuperado e dialisado foi denominado EPS bruto. O EPS bruto foi purificado por congelamento e degelo e ultrafiltração em membrana. A padronização da técnica de purificação e a caracterização estrutural das frações purificadas foram realizadas concomitantemente a realização dessa dissertação, pela aluna de doutorado do Programa de Pós graduação em Microbiologia Aplicada (UNESP, Rio Claro), Kassandra Sussi Mustafé Oliveira. A tese de doutorado da referida aluna foi realizada em colaboração com a Dra. Lucimara M. C. Cordeiro do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná, e já foi enviada para publicação.

Os estudos de caracterização estrutural determinaram que o EPS secretado por *L. theobromae* é composto de dois polissacarídeos distintos, uma fração composta de  $\beta$ -glucana ramificada com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) na cadeia principal e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) nas ramificações e uma fração composta de  $\beta$ - glucana linear de ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). A glucana ramificada é obtida em maior quantidade e é insolúvel em água, enquanto a glucana linear é encontrada em menor quantidade e é solúvel em água. A cada 1,2g de

EPS bruto, 0,8g corresponde a fração de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e 0,3g a fração  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) (OLIVEIRA,2014).

Os filmes foram confeccionados utilizando-se o EPS bruto (todas as frações misturadas) e a  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) por ser mais volumosa. A fração de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) inviabiliza a produção de filmes pois corresponde a uma proporção muito pequena de polissacarídeo.

## 5.2 Atividade Biológica:

Pelos resultados descritos na literatura com  $\beta$ -glucanas que possuíam atividade biológica (MIRANDA *et al*, 2008) , pensou-se em observar o comportamento da fração purificada da  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) frente a exposição a macrófagos humanos derivados da linhagem U937, observando-se qual via de resposta o polímero poderia ativar, a via pró-inflamatória (com secreção de citocinas do tipo TNF- $\alpha$  ) ou a via anti-inflamatória (com secreção de citocinas IL-10).

### 5.2.1. Viabilidade Celular:

Diferentes concentrações do polissacarídeo foram utilizadas na cultura de macrófagos humanos para uma análise prévia da sua toxicidade. Para tanto, optamos por utilizar o método do sal de MTT que avalia a taxa metabólica celular. Assim, células metabolicamente ativas serão consideradas viáveis, enquanto células não viáveis apresentam taxa metabólica reduzida. Por critério de padronização, células cultivadas na ausência de estímulo celular (RPMI) determinam 100% de viabilidade.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5 e demonstram que o EPS  $\beta$ -glucana(1 $\rightarrow$ 6) produzido por *L. theobromae*, , não interferem na viabilidade celular de macrófagos. Estes resultados nos encorajaram a dar continuidade aos experimentos que objetivavam a avaliação de atividade biológica do polímero purificado.

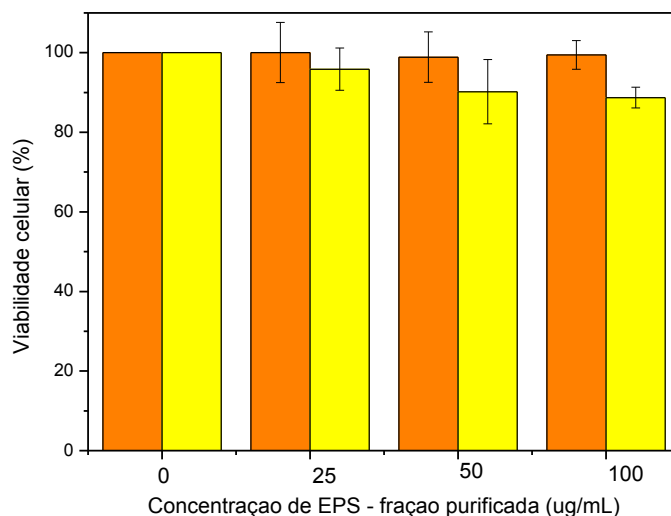


Figura 5: Viabilidade celular de macrófagos expostos a diferentes concentrações da fração purificada  $\beta$ -glucana (1→6) em relação ao controle (RPMI) por 24 (laranja) e 48h (amarelo). Os dados são apresentados como viabilidade celular (%)  $\pm$  S.D. e representam a média de no mínimo três experimentos independentes.

## 5.2.2 Citocinas:

### 5.2.2.1 Produção de TNF – $\alpha$ :

Uma das principais citocinas envolvidas na resposta pró –inflamatória do sistema imune é o fator de necrose tumoral ou TNF- $\alpha$ . Ele é responsável por iniciar e posteriormente regular a liberação de citocinas durante o processo inflamatório (HAJEER; HUNTCHINSON, 2000).

O fator de necrose tumoral estimula outras citocinas também pró- inflamatórias como as interleucinas-1 (IL-1), a IL-6 e IL-8, que estimulam a resposta imunológica ativando linfócitos T e B e também a produção de proteínas auxiliaadoras da inflamação (CHOI; PANAYI,2001).

A partir dos dados apresentados nas Figuras 6 e 7 é possível observar que há aumento e posterior diminuição das quantidades da citocina TNF- $\alpha$  presente no sobrenadante das culturas tratadas por 24h e 48h com diferentes concentrações do polissacarídeo purificado.

Pode-se perceber um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  no período de 24h, seguido por um declínio no período de 48h em relação ao controle, o que pode sugerir que o aumento da resposta ao estímulo com o polissacarídeo se dá no momento da alimentação da cultura e não se configura um aumento constante.

Com base nos dados obtidos, pode-se inferir também, que o estímulo do polissacarídeo para a secreção de TNF-alfa é dose-dependente já que concentrações maiores do estímulo induziram uma maior secreção da citocina.

A produção de determinadas citocinas, sua quantidade e seus efeitos de maneira geral dependem da forma como o polissacarídeo é administrado, bem como da solubilidade, pureza e estrutura do polímero. (JESNAK *et al* ,2012).

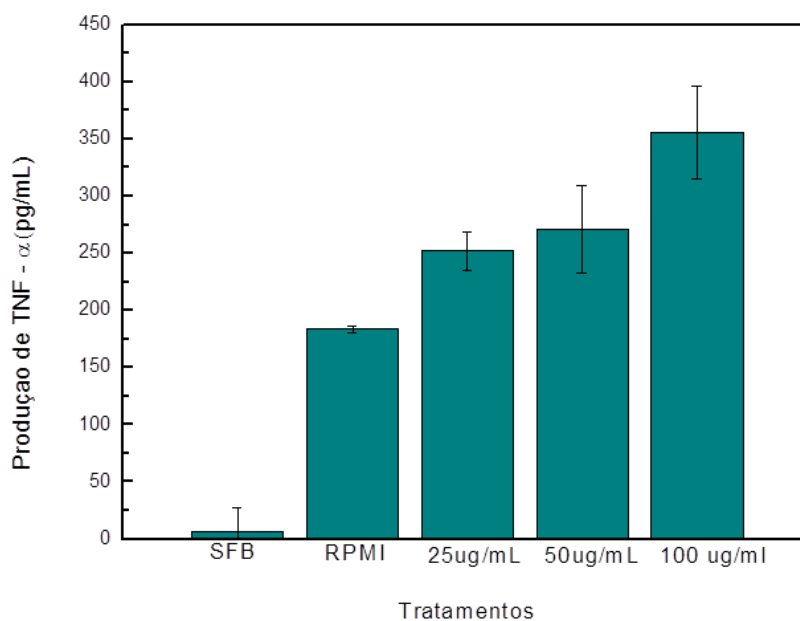


Figura 6: Concentração de TNF- $\alpha$  após 24h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ -glucana (1→6). Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula. Os dados são apresentados como concentração de TNF (pg/mL)  $\pm$  S.D. e representam a média de no mínimo três experimentos independentes.

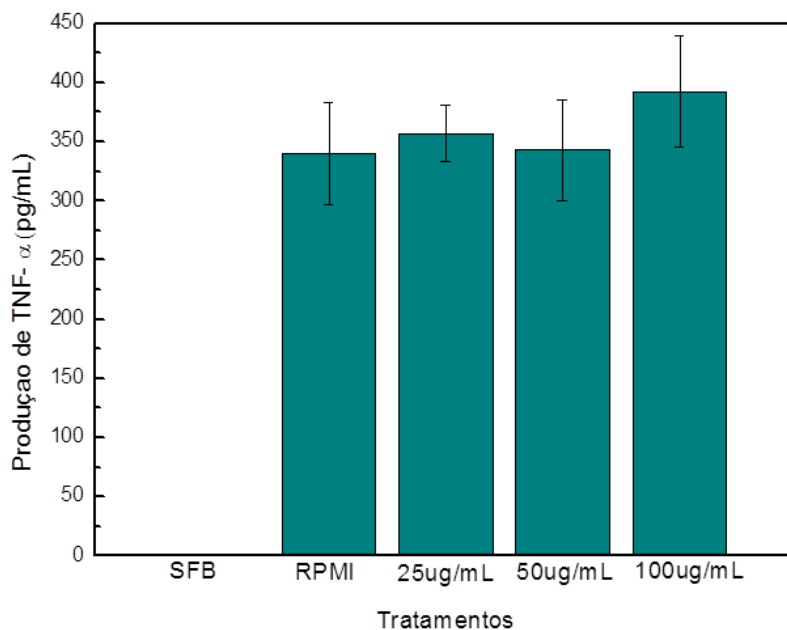


Figura 7: Concentração de TNF- $\alpha$  após 48h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6) . Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula . Os dados são apresentados como concentração de TNF (pg/mL )  $\pm$  S.D. e representam a média de no mínimo três experimentos independentes.

Células do sistema imunológico, como os macrófagos, desenvolveram receptores padrão para reconhecer estruturas conservadas em fungos patogênicos (BROW *et al* ,2001) e a ligação das  $\beta$ -glucanas com tais receptores induzem os macrófagos a produzir citocinas pró-inflamatórias ( ADACHI *et al*, 1994);( GARTNER *et al*, 2003.)

Em trabalhos com injeção intraperitoneal de micropartículas de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3) de *Saccharomyces cerevisiae* em camundongos, Berner (2005) observou aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação ao controle, quando utilizado uma concentração de 100 $\mu$ g/mL das micropartículas. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores ao testar glucanas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) de *Saccharomyces cerevisiae* (HOFFMAN; OLSON; LIMPER, 1993).

Engstad *et al* (2002) em trabalhos com glucanas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), verificou um perfil de produção de TNF- $\alpha$  semelhante ao encontrado nesse trabalho, ou seja, uma grande produção no início (24h) da cultura e um declínio em 48h de incubação.

Células do sistema imune como os monócitos, os macrófagos, eosinófilos neutrófilos possuem receptores denominados Dectina-1, TLR-2,4,6e receptor do complemento 3 (CR3). São nesses receptores que ocorrem a ligação das  $\beta$ - glucanas, acarretando a resposta imunológica havendo a produção de citocinas e demais mecanismos de reações imune (JESENAK *et al*, 2012).

Falch *et al* (2000), em trabalhos com escleroglucana, uma outra glucana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) com, relatou aumento na concentração de TNF-  $\alpha$  conforme houve o aumento na concentração de escleroglucana ministrada nos monócitos. Em trabalhos com a  $\beta$ -glucana produzida por *Sclerotinia sclerotiorumi* também houve resultados positivos quanto a produção de TNF- $\alpha$  , bem como demais citocinas, como IL-2 e IFN- $\gamma$  (DILLON *et al*, 2006).

#### **5.2.2.2 Produção de IL-10 :**

A interleucina -10 (IL-10) é uma citocina de padrão anti-inflamatório, e é responsável por diminuir a atividade imunológica e promover falta de energia em leucócitos livres na circulação (BRANDTZEG *et al*, 1996).

Observando-se os resultados obtidos (Figuras 8 e 9) e tendo como comparação células não estimuladas e cultivadas apenas em meio de cultura RPMI, pode-se depreender que após a administração do polissacarídeo purificado, independente da dose ministrada, não houve produção de IL-10, não apresentando, portanto, uma resposta anti-inflamatória.

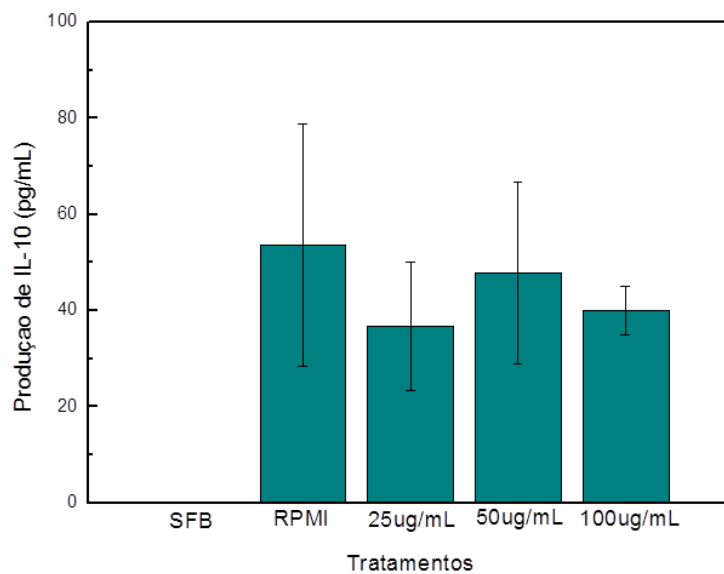


Figura 8: Concentração de IL-10 após 24h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ -glucana (1→6). Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula. Os dados são apresentados como concentração de IL-10 (pg/mL)  $\pm$  S.D. e representam a média de no mínimo três experimentos independentes.

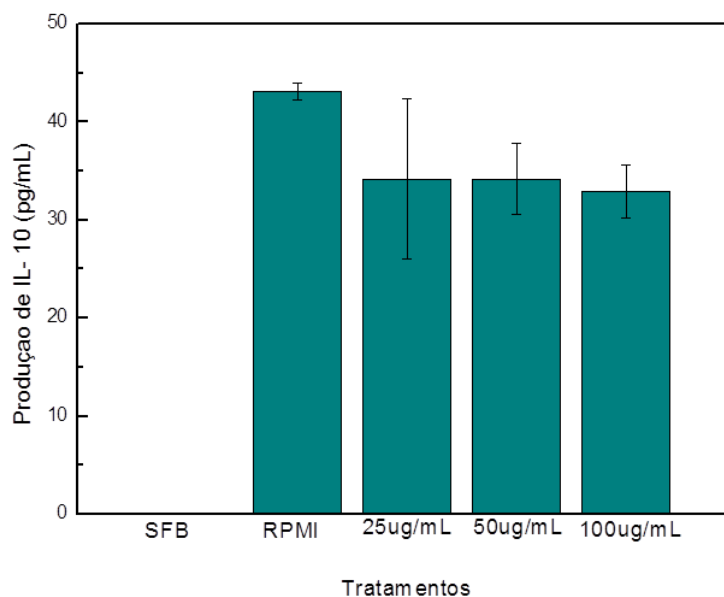


Figura 9: Concentração de IL-10 após 48h de estímulo com diferentes concentrações de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 6). Soro fetal bovino foi utilizado com controle negativo e RPMI apenas para identificar o estado basal da célula. Os dados são apresentados como concentração de IL-10 (pg/mL)  $\pm$  S.D. e representam a média de no mínimo três experimentos independentes.

Em trabalhos com  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3), Engstad *et al* (2002) encontraram resultados diferentes, uma vez que houve produção de IL-10, quando as células foram estimuladas com o polímero, e quanto maior a dose da glucana, maior foi a dose de IL-10 encontrada, mas ainda assim, os níveis de produção foram baixos.

Pacientes asmáticos que receberam injeção subcutânea de soluções de glucanas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) apresentaram um aumento nos níveis de IL-10 bem como a diminuição dos sintomas da asma (SARINHO *et al*, 2009).

Estudos utilizando curdlana como estimuladora, também não verificaram aumento nos níveis de IL-10 quando administrados em injeções intravenosas em camundongos, sendo que a dose não influencia nas baixas concentrações produzidas (MASIHI *et al*, 1997).

Tendo em vista os resultados, juntamente aos dados da literatura, o polissacarídeo purificado utilizado nesse estudo vem apresentando um padrão de resposta pró-inflamatório. Este perfil pró-inflamatório apresentado por macrófagos está intimamente relacionado a um padrão de ativação clássica que é correlacionado com atividades anti-tumorais (HAJEER;HUNTCHINSON, 2000). Outras citocinas devem ser dosadas e ensaios adicionais devem ser realizados para que tal hipótese seja confirmada em células inflamatórias como os neutrófilos ou outros mediadores inflamatórios.

### **5.3. Análises físico-químicas de filmes de EPS e látex:**

Inicialmente, os filmes foram preparados por secagem em estufa a 70°C. Porém, desta forma os filmes obtidos foram pouco maleáveis e quebradiços. Por isso, a secagem em estufa foi substituída por liofilização. Os filmes liofilizados apresentavam aspecto macio, lembrando espuma e foram utilizados nas avaliações físico-químicas.

#### **5.3.1. Análise de espessura:**

A Figura 10 apresenta os dados de espessura para filmes preparados com EPS e látex, tanto EPS bruto quanto a fração  $\beta$ -glucana (1→3)(1→6), em diferentes proporções. De acordo com os resultados obtidos, os filmes que apresentaram menores valores de espessura foram os elaborados com EPS bruto a 0,5% (2mm) e  $\beta$  (1→3)(1→6) glucana a 0,5% (2,3 mm aproximadamente). Os demais apresentaram a mesma média de espessura, em torno de 3,5mm.

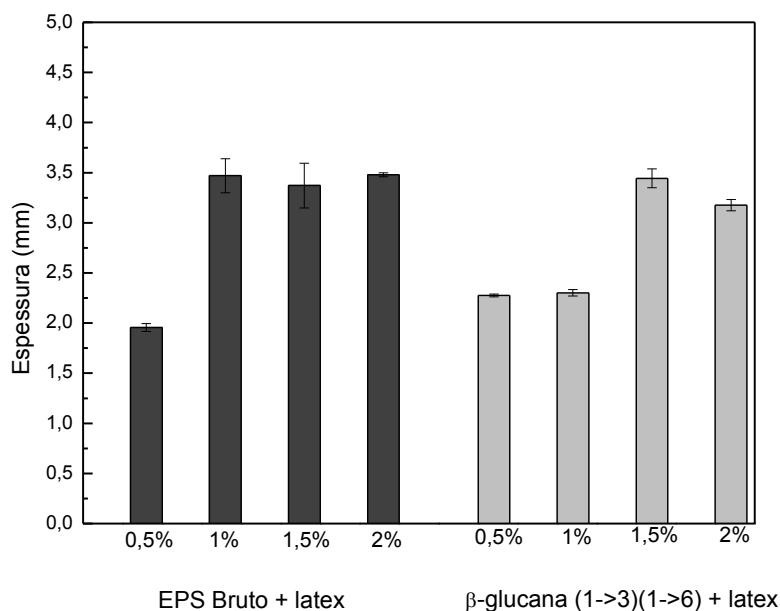


Figura 10: Análise de espessura de filmes de EPS Bruto ou  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6). Filmes preparados com concentrações de EPS entre 0,5 e 2% e na proporção e 2:1 de EPS e látex e secos por liofilização. Medidas de espessura realizadas com micrômetro digital, em 10 pontos distintos/filme. Ensaios realizados em triplicata.

Os filmes liofilizados apresentaram maiores espessuras que filmes encontrados na literatura produzidos por *casting* com pululana, amido e xantana e por extrusão em filmes com amido. Por outro lado, não foram encontrados na literatura filmes preparados por liofilização para comparação dos dados.

Shimazu *et al.* (2007) em trabalhos com filmes secos por *casting* com 3% de amido relatou espessuras de 0,07 mm até 0,10 mm com a adição de plastificantes.

Em filmes com concentração de 2,0% de amido, produzidos por *casting*, Rodrigues *et al.* (2006) obtiveram o valor de 0,05 mm de espessura.

Com filmes produzidos por extrusão (injeção de ar na amostra) Liu *et al.* (2005) encontrou espessuras entre 0,327 mm a 0,422 mm, sendo muito menos espessos que os produzidos nesse trabalho com filmes liofilizados. Costa (2008) conseguiu espessuras de 0,19mm com filmes de amido termoplástico, também por extrusão.

Comparando-se os valores obtidos, pode-se inferir que a metodologia utilizada para a produção do filme interfere diretamente na espessura, bem como a quantidade de material depositada nas formas de confecção, havendo grande variação entre os modelos.

Rodríguez (2006), trabalhando com filmes produzidos com uma combinação de amido, glicerol e adição de tensoativos conseguiu espessuras entre 0,49 e 0,89 mm, o que mostra mais uma vez, que a metodologia empregada interfere nas características dos polímeros formados, uma vez que Rodríguez (2006) utilizou também a técnica de *casting* porém, depositou um maior volume de solução filmogênica na placa de secagem.

Filmes produzidos por Park (1995) utilizando proteínas no lugar de polissacarídeos conseguiu blendas mais finas do que as citadas anteriormente, com valores entre 0,12mm a 0,42mm de espessura.

Para filmes de metilcelulose, as espessuras ficaram perto da faixa de resultados encontrados no presente estudo, com faixas variando de 1,1 a 2,6 mm de espessura, números esses que variaram conforme houve o aumento de metilcelulose na composição da blenda (TURHAN; SAHBAZ, 2004).

Em filmes produzidos com  $\beta$ - glucanas oriundas de aveia, por liofilização ,as espessuras variavam de 0,40 a 0,60 mm (SÁROSSY *et al*, 2011).

### **5.3.2. Determinação da Perda de Umidade:**

A Figura 11 apresenta os dados de perda de umidade para filmes preparados com EPS bruto ou  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6). Os filmes apresentaram pouca perda de umidade posteriormente ao preparo, , por terem sido feitos por liofilização, uma vez que o processo de secagem já retira quase totalmente a quantidade de água presente na solução filmogênica.

A quantidade de água que ainda foi perdida mesmo após a liofilização permite supor que as membranas, ao serem manuseadas, possam ter absorvido água do ambiente, havendo, portanto, a possibilidade de serem hidrofílicas. Membranas hidrofílicas podem ser úteis quando se deseja separar o vapor de água dos demais gases presentes na atmosfera, já que a água é facilmente incorporada à membrana (ZHANG *et al*, 2006).

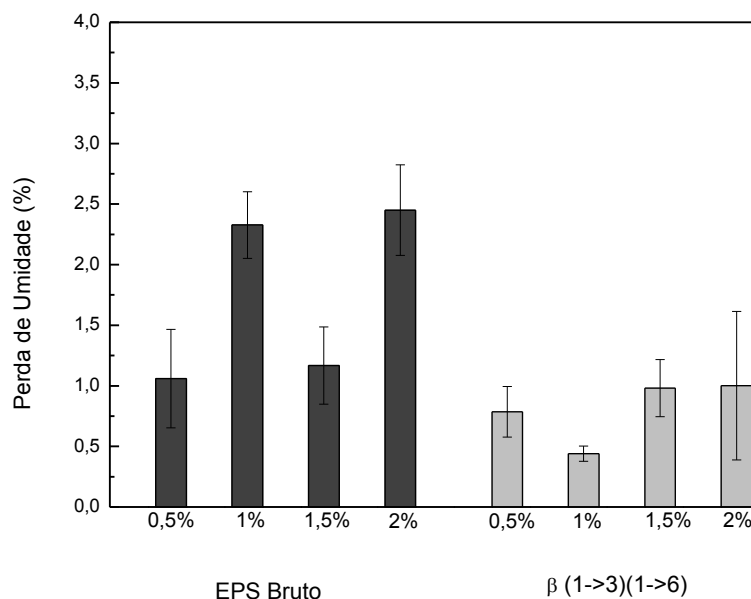


Figura 11: Perda de umidade de filmes de EPS Bruto ou  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6). Os dados apresentados representam a porcentagem de material solúvel a cada 100g de filme. Filmes preparados com concentrações de EPS entre 0,5 e 2% e na proporção e 2:1 de EPS/ látex e secos por liofilização. Perda de umidade calculada por gravimetria.

Os filmes apresentaram uma baixa perda de umidade, sendo os que mais apresentaram perda foram os compostos por 1% e 2% de EPS bruto (entre 2,4 e 2,5% em relação ao peso inicial). Os filmes que apresentaram perdas mais baixas foram os constituídos por 1% da glucana purificada (cerca de 0,5% do peso inicial).

Não foram encontradas na literatura informações que citam experimentos para perda de umidade em filmes de glucanas liofilizados, só sendo possível a comparação com filmes produzidos com substâncias que não sejam glucanas e que não foram feitas por liofilização.

Bergo e colaboradores (2013), estudando filmes feitos por *casting* de gelatina com adição de glicerol, verificou que, conforme aumentava a concentração de glicerol na composição dos filmes, o teor de umidade também aumentava.

Em filmes de amido e glicerol, obtidos também por *casting*, Chen e Lai (2008) obtiveram taxas de perda de umidade entre 11 e 22 g de água a cada 100g de filme.

Um fator muito importante para se aplicar o filme em determinados locais é a sensibilidade às condições ambientais, como a umidade relativa, já que os filmes são muito higroscópicos e suscetíveis, portanto, a incorporação do vapor de água em sua estrutura depois de secos (GENNADIOS;PARK; WELLER, 1993).

A presença de água nos filmes pode constituir um problema já que afeta as propriedades físicas do material, sendo, portanto, importante este tipo de avaliação (BERGO; MORAES; SOBRAL, 2013).

Os filmes preparados no presente estudo, que aparentam ser higroscópicos, já que absorveram água do ambiente após a liofilização, podem ser usados para o cobrimento de feridas (GAIL,2010). Filmes com essa característica são capazes de absorver os exsudatos de feridas, o que é imprescindível para uma boa cicatrização, sem impedir a a evaporação da água, evitando o acúmulo de líquidos (BOATENG *et al*,2010) permitindo a recuperação da lesão (MATTHEWS *et al*, 2005). Associando a característica hidrofílica da membrana e considerando a possibilidade de aplicação dos filmes com EPS de *L. theobromae* como sistema de liberação controlada, pode-se agregar um fármaco à membrana, aumentando a eficiência da cicatrização.

### **5.3.3. Análise de Solubilidade:**

Solubilidade é uma importante característica a ser estudada em filmes, principalmente em se tratando de biopolímeros como as glucanas utilizadas nesse estudo, pois tais substâncias apresentam muita afinidade com a água, o que acaba por interferir diretamente na aplicação e maneira de utilização desse material. Um filme muito solúvel pode ser usado para encapsulação de medicamentos por exemplo, ou para alimentos que podem ser recobertos com filme e ingeridos. Já filmes pouco solúveis ou insolúveis são interessantes para embalagens de produtos pastosos ou líquidos. Observando-se o comportamento desses polímeros em contato com a água, podemos direcioná-los para aplicações que condizem com suas características (MATTA JUNIOR, 2009).

Os filmes estudados apresentaram baixa perda de material solúvel (Figura 12), uma vez que as maiores perdas foram verificadas em filmes compostos de 1% de EPS bruto, sendo essa perda em torno de 6,5g de material solúvel por 100 g de filme.

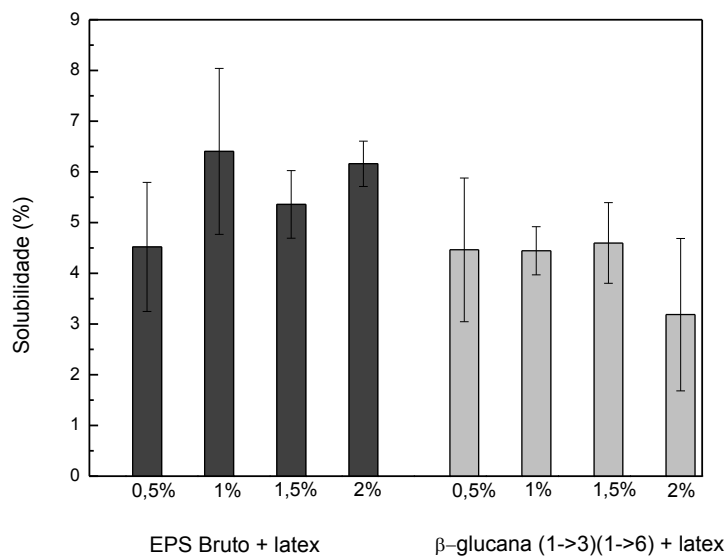


Figura 12: Porcentagem de perda de material solúvel por cada 100g de filme preparados com EPS Bruto ou  $\beta$ -glucana (1→3)(1→6) glucana. Filmes preparados com concentrações de EPS entre 0,5 e 2% e na proporção e 2:1 de EPS e látex de látex e secos por liofilização. Amostras pesadas, colocadas em água por 24h e secas em estufa por 24h, medição feita por gravimetria.

Filmes de  $\beta$ -glucanas de *Saccharomyces cerevisiae*, nos quais foi adicionado glicerol como plastificante, apresentaram maior solubilidade, cerca de 26g de material solúvel por 100g de filme (NOVÁK *et al.*, 2012).

Em filmes de amido, Matta Junior (2009) observou que a medida que se aumentava a concentração de amido nos filmes, a solubilidade também aumentava, obtendo no máximo 10g de material solúvel por 100g de filme, em filmes com 5% de amido.

Em filmes de metilcelulose, Turhan e colaboradores (2004) verificaram que os filmes solubilizavam completamente ao término de 90 minutos em contato com água.

#### 5.3.4. Propriedades mecânicas:

Para se verificar as propriedades mecânicas dos filmes produzidos com o EPS bruto e purificado com a adição de látex na composição, foi utilizada uma Máquina Universal de Ensaio – Modelo DL- 2000. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

A máquina mede as alterações dimensionais na amostra, bem como a força necessária para deformá-la, a força máxima, a força de ruptura e a deformação máxima que a membrana suporta antes de romper. Os resultados estão apresentados nas Figuras 13 e 14 e na tabela 3.

Comparando-se os resultados de tração da figura 13, pode-se perceber que dentre os filmes de EPS bruto, conforme se aumenta a concentração de EPS aumenta a força necessária para deformar a membrana. No entanto, com o aumento da concentração de EPS na blenda, há uma diminuição da deformação, sendo portanto, menos flexível. Por outro lado as blendas suportam uma força maior, sendo mais resistentes que o látex sozinho. O mesmo acontece com as membranas de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e látex, exceto pela concentração de 1,5% de EPS (figura 14).

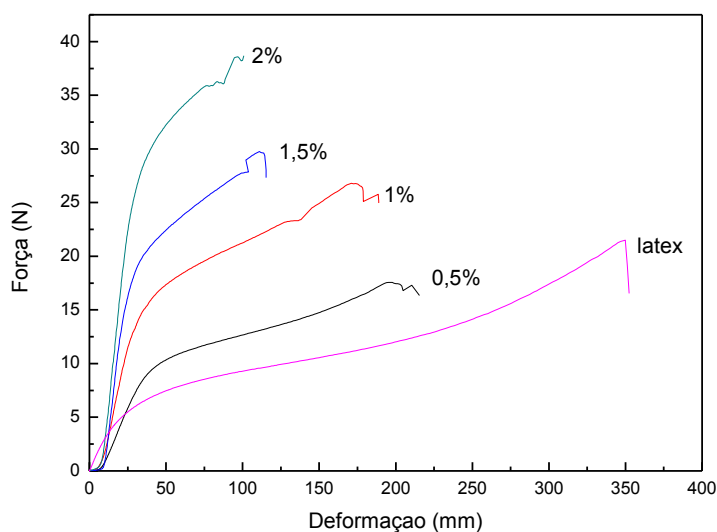


Figura 13: Análise da relação entre força e deformação de filmes preparados com EPS Bruto e látex em comparação com uma membrana de látex apenas. Preparo dos filmes: EPS bruto em concentrações de (%) 0,5 ; 1 ; 1,5 e 2 na proporção de 2:1 de EPS e látex. Os filmes foram comparados a membranas de látex sem EPS. Análises realizadas na Máquina Universal de Ensaio

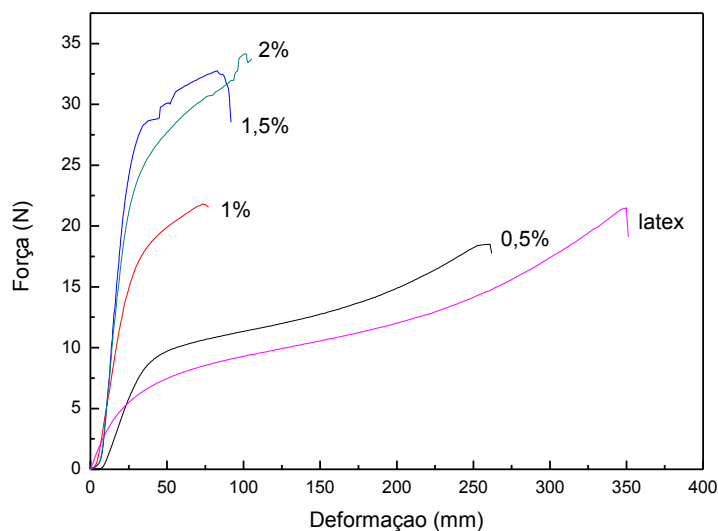


Figura 14: Análise da relação entre força e deformação de filmes preparados com a fração  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e látex em comparação com uma membrana de látex apenas. Preparo dos filmes: fração purificada em concentrações de (%) 0,5 (F1); 1 (F2); 1,5 (F3) e 2 (F4) na proporção de 2:1 de EPS e látex. Os filmes foram comparados a membranas de látex sem EPS. Análises realizadas na Máquina Universal de Ensaio.

Pelos dados da tabela 3, pode-se observar que a medida que aumenta-se a concentração de polissacarídeo na composição do filme, menor é a deformação que a membrana sofre, exceto pela membrana de glucana purificada  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) com 1,5%.

Quanto a força máxima com que a membrana sofreu deformação, esta aumenta a medida que se acrescenta polissacarídeo às membranas, ou seja, elas ficam mais rígidas a medida que aumenta-se a concentração de glucana no filme.

A medida que há o aumento na concentração de glucana nas membranas, há também um aumento na força de ruptura destas, uma vez que elas estão mais rígidas e exigem uma força maior para romperem.

Tabela 3: Força Máxima, força de ruptura e deformação máxima das membranas compostas de EPS bruto e fração purificada

Composição	Concentração de EPS (%)	Força máxima (N)	Força de ruptura (N)	Deformação máxima (mm)
EPS bruto	0,5	18.01±0.45	17.22±0.92	205.8667±9.69
	1,0	25.75±2.85	24.25±2.17	161.66±32.38
	1,5	28.60±2.10	27.71±1.51	113.4333±3.79
	2,0	37.02±3.29	32.45±5.89	96.8943±16.78
β(1→3)(1→6) glucana	0,5	18.96±0.45	17.74±0.12	265.7967±6.74
	1,0	23.71±3.40	21.85±4.77	136.8967±31.13
	1,5	30.64±1.80	26.71±1.69	63.4230±25.81
	2,0	32.00±1.94	31.48±2.24	95.9793±16.99

Em trabalhos com membranas apenas de látex, Herculano e colaboradores (2009) verificou valores superiores aos encontrados nesse trabalho quanto a deformação das membranas (entre 170 e 180 mm ) em relação as blendas de polissacarídeo de glucanas com a adição de látex. No entanto a resistência a deformação foi maior nas blendas de glucanas e látex (17 a 37 N) do que na de látex apenas ( de 12 a 16 N). Por outro lado, Herculano (2009) utilizando membranas de látex puro feitos por *casting* conseguiu deformações inferiores as conseguidas nesse trabalho com o látex liofilizado.

Quanto a força de ruptura, os dados obtidos nesse trabalho também foram superiores aos dados obtidos por Herculano e colaboradores (2009), que foram entre 3,3 e 4,9 N, sendo que nesse trabalho obteve-se de 16 a 34 N, variando conforme variava-se a constituição de polissacarídeo na membrana.

#### 5.4 Liberação de Cetoprofeno:

Para a verificação da liberação de fármacos pelas blendas das β- glucanas do presente estudo juntamente com o látex, foram produzidos filmes com o medicamento anti-inflamatório cetoprofeno (CT).

Os filmes foram deixados em béqueres com 100mL de água destilada e medições foram realizadas na primeira hora, de 15 em 15 min até 2 h. A partir da 2ª hora os intervalos passaram a ser de 1 em 1 h até completar 5 h desde o início da liberação. Posteriormente, a medição foi realizada 24h após o início da liberação.

Para calcular a concentração de cetoprofeno liberada foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas do medicamento (Figura 15). As amostras foram lidas a 260nm, comprimento de onda na qual a absorbância é máxima para o cetoprofeno.

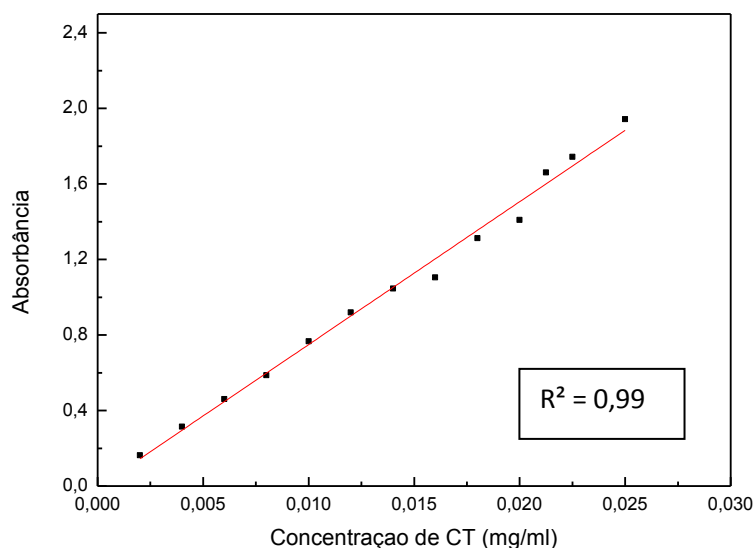


Figura 15: Curva padrão de cetoprofeno. A função dada pelo *fitting* é  $y = a + b \cdot x$ , na qual  $a = -0,00694$  e  $b = 75,6369$ . Leituras realizadas a 260 nm.

A partir da função oferecida pelo software e os valores das constantes pode-se, a partir das absorbâncias encontradas, aplicar os valores na fórmula da curva e obter-se os valores de concentração desejados. A partir desses valores foi construído um *fitting* que modela a liberação do medicamento, oferecendo uma fórmula e valores das constantes (figura 16).

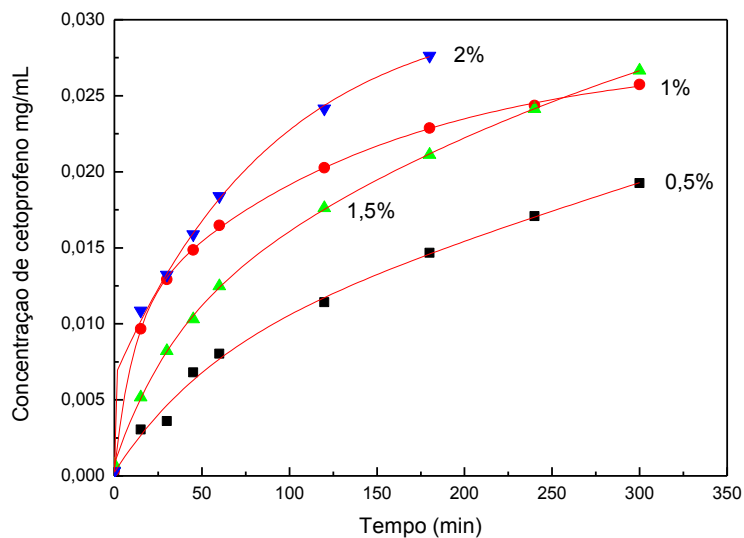


Figura 16: Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de EPS Bruto. Preparo dos filmes: EPS bruto em concentrações de (%) 0,5; 1; 1,5 e 2 e látex na proporção de 2 de EPS para 1 de látex, com adição de 5 mg de cetoprofeno. Medições em espectrofotômetro .

Os dados do experimento que representam a liberação de CT pelas membranas de  $\beta$ - glucanas juntamente com o látex foram ajustados pelo software OriginPro 8. O modelo de curva de ajuste obtido que melhor apresentou ajuste nos dados foi o  $y = A1*\exp(-x/t1) + A2*\exp(-x/t2) + y0$ . Os valores para substituição estão encontrados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de EPS Bruto com látex

Adj. R-Square	0,9989	0,99655	0,99861	0,99899
		Value	Standard Error	
B	y0	0,02858	2,93E-04	
B	A1	-0,01581	4,87E-04	
B	t1	16,22496	1,07156	
B	A2	-0,01265	4,69E-04	
B	t2	317,2011	26,06307	
C	y0	0,03035	7,85E-04	
C	A1	-0,01471	9,09E-04	
C	t1	20,0665	2,51709	
C	A2	-0,01545	7,86E-04	
C	t2	497,8787	94,5875	
D	y0	0,03171	6,28E-04	
D	A1	-0,00876	4,82E-04	
D	t1	15,93654	1,99616	
D	A2	-0,02295	5,00E-04	
D	t2	598,5206	51,49536	
E	y0	0,02886	3,29E-04	
E	A1	-0,01559	7,47E-04	
E	t1	356,2664	37,45733	
E	A2	-0,01356	7,95E-04	
E	t2	28,48512	2,61726	

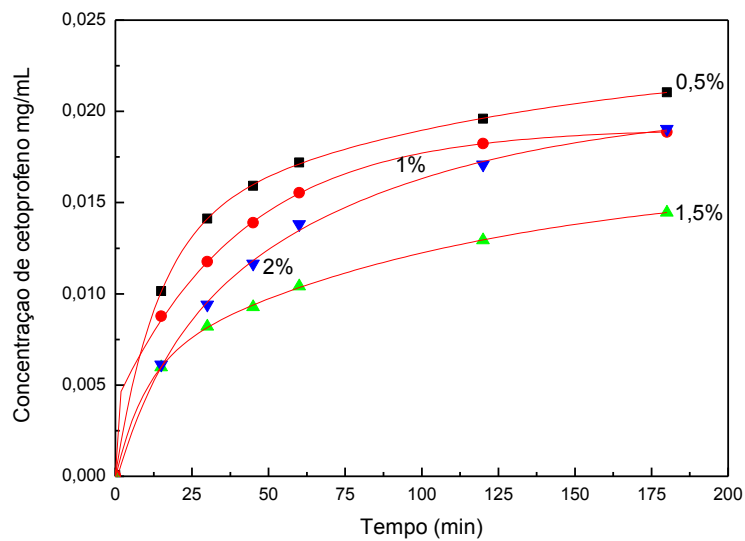


Figura 17 : Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de EPS Bruto. Preparo dos filmes: EPS bruto em concentrações de (%) 0,5); 1); 1,5) e 2 e látex na proporção de 2 de EPS para 1 de látex, com adição de 2 mg de cetoprofeno.

Tabela 5: Valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de EPS Bruto com látex

Equation	$y = A1 \cdot \exp(-x/t1) + A2 \cdot \exp(-x/t2) + y0$			
Adj. R-Square	0,99988	0,99942	0,9995	0,99757
		Value	Standard Error	
B	y0	0,02317	7.41E+01	
B	A1	-0,01329	5.95E+01	
B	t1	1,356,128	0,66556	
B	A2	-0,00981	3.10E+01	
B	t2	11,788,526	2,386,339	
C	y0	0,01908	1.58E+01	
C	A1	-0,00397	4.01E+01	
C	t1	3.21E-02	7.01E+12	
C	A2	-0,01507	3.31E+01	
C	t2	4,169,895	192,993	
D	y0	0,01648	7.26E+01	
D	A1	-0,00588	5.58E+01	
D	t1	941,364	137,231	
D	A2	-0,01067	3.43E+01	
D	t2	10,837,361	200,057	
E	y0	0,02051	0,00166	
E	A1	-0,01466	0,00311	
E	t1	7,981,122	4,009,633	
E	A2	-0,00625	0,00452	
E	t2	1,546,229	920,777	

Pelos dados da curva, pode-se observar que as blendas possuem uma rápida liberação na primeira hora em contato com a água, havendo uma diminuição de velocidade com o passar do tempo, chegando na 6ª hora com início da saturação da solução.

Tal liberação foi extremamente rápida, uma vez que em 48h a solução já estava saturada, ou seja, todo medicamento contido na membrana já havia sido liberado no meio. No entanto, com os resultados obtidos dos estudos, pode-se perceber que é possível modular a liberação do fármaco alterando a concentração da droga na blenda, modulando conseqüentemente seu tempo de liberação, podendo este ser mais rápido ou mais lento, de acordo com a necessidade, já que para concentrações diferentes de EPS nas membranas houve diferença na liberação do medicamento.

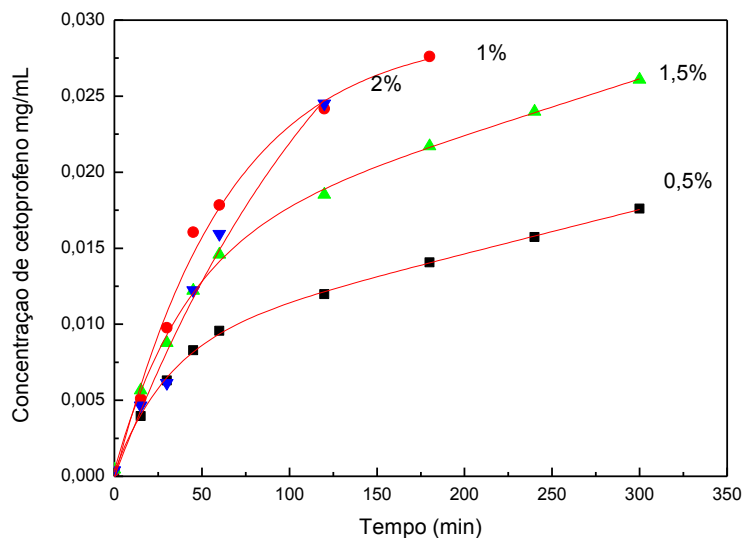


Figura 18: Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) . Preparo dos filmes: fração purificada em concentrações de (%) 0,5); 1 ; 1,5 e 2 e látex na porção de 2 de EPs para 1 de látex, com adição de 5 mg de cetoprofeno.

Os dados do experimento que representam a liberação de CT pelas membranas de polímero purificado juntamente com o látex foram ajustados pelo software OriginPro 8. O modelo de curva de ajuste obtido que melhor apresentou ajuste nos dados foi  $y = A1 \cdot \exp(-x/t1) + A2 \cdot \exp(-x/t2) + y0$ . Os valores para substituição estão encontrados na Tabela3

Pode-se observar que a liberação de cetoprofeno em filmes preparados com  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) foi mais rápida do que filmes com EPS bruto, sendo que em 5 h já não era mais possível realizar leituras, pois já ultrapassava a absorvância máxima permitida.

Tabela 6: valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) e látex:

Adj. R-Square	0,99895	0,97761	0,99775	0,92187
		Value	Standard Error	
B	y0	554,66217	5030,60864	
B	A1	-0,00876	3,66E-04	
B	t1	30,63892	2,43206	
B	A2	-554,65311	5030,60864	
B	t2	1,85E+07	1,68E+08	
C	y0	0,03006	0,00795	
C	A1	-0,01513	68575,88367	
C	t1	64,37842	1,46E+07	
C	A2	-0,01513	68575,8835	
C	t2	64,37867	1,46E+07	
D	y0	200,91148	--	
D	A1	-0,01532	0,00104	
D	t1	40,29455	4,63799	
D	A2	-200,89574	--	
D	t2	5,42E+06	--	
E	y0	0,04555	0,92501	
E	A1	-0,02278	--	
E	t1	146,62444	2,12E+09	
E	A2	-0,02278	--	
E	t2	146,62413	2,12E+09	

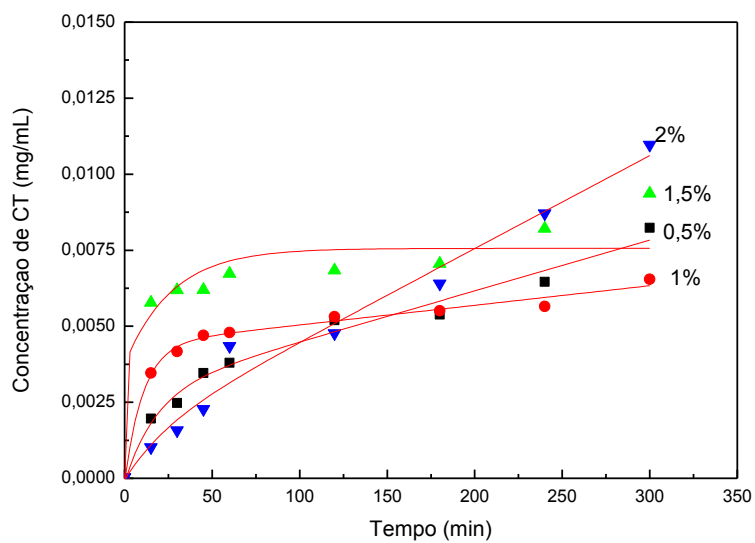


Figura 19: Liberação de cetoprofeno inserido em filmes de de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) . Preparo dos filmes: fração purificada em concentrações de (%) 0,5, 1; 1,5; e 2 e látex na proporção de 2:1 de EPS/látex, com adição de 2 mg de cetoprofeno.

Tabela 7: valores das constantes da equação do *fitting* da liberação de cetoprofeno para membranas de  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$  e látex:

Equation	$y = A1*\exp(-x/t1) + A2*\exp(-x/t2) + y0$			
Adj. R-Sqr	0,97006	0,98699	0,81465	0,95941
		Value	Standard Error	
B	y0	46,599,426	957,023,637	
B	A1	-46,599,144	957,023,637	
B	t1	2.78E+12	5.72E+13	
B	A2	-0,00295	6.40E+01	
B	t2	1,767,005	893,952	
C	y0	15,056,143	--	
C	A1	-0,0045	2.83E+01	
C	t1	106,018	187,972	
C	A2	-15,055,703	--	
C	t2	2.33E+11	--	
D	y0	0,00756	6.11E+01	
D	A1	-0,00382	0,01163	
D	t1	0,16237	2.54E+42	
D	A2	-0,0038	0,0114	
D	t2	2,704,061	6,420,723	
E	y0	123,858	26,051,787	
E	A1	-0,00146	0,00309	
E	t1	2,374,579	7,216,041	
E	A2	-123,718	26,051,493	
E	t2	4,015,430,459	8.50E+11	

Pode-se observar que a liberação da blenda contendo o  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) foi ainda mais rápida do que aquelas contendo EPS bruto, sendo que em 5 horas de liberação das blendas com 5mg de fármaco a solução já estava saturada. Já nas blendas que continham 2mg de medicamento, a liberação foi mais lenta, sendo que havia ainda fármaco para ser liberado depois de 5h de medição. Os dados mais uma vez mostraram que é possível modular a taxa de liberação do fármaco alterando a composição das blendas, bem como a concentração de fármaco nas mesmas, pois mais uma vez verificou-se que conforme muda a concentração de EPS nas membranas a velocidade e a quantidade de medicamento liberada também muda.

Para os filmes de EPS purificado, o que apresenta 2% de EPS é o que se mostrou mais rápido para liberar a droga e também que a liberou em maior quantidade.

Dessa maneira, para a confecção de blendas de liberação, não é necessário a purificação do polissacarídeo, pois no estado bruto apresenta melhores resultados que o purificado, havendo um ganho de tempo na produção.

A velocidade de liberação das membranas nesse trabalho foi mais rápida do que as encontradas na literatura.

Em filmes liofilizados de carboximetilcelulose, Ng e Jumaat (2013), conseguiram uma liberação mais lenta do que a encontrada nesse trabalho, pelo mesmo período de 5h, porém em concentrações mais elevadas. Isso pode ocorrer pelas possíveis diferenças no tamanho dos poros das membranas.

Em estudos com quitosana como sistemas de liberação controlada, Tacharodi e Panduranga (1995) conseguiram taxas de liberação de até 15 mg de fármaco em 24h, sendo que nas primeiras 6 horas a liberação é lenta, aumentando a partir das 8h de liberação.

Membranas de látex produzidas para servirem de sistemas de liberação foram produzidas por Herculano (2011), por *casting*, as quais apresentaram uma alta taxa de liberação nas primeiras 25 h de experimento, no entanto, após 50 h ainda era possível a verificação de liberação, atingindo a saturação perto das 75 h de liberação.

## 6. Conclusões:

Em relação as propriedades imunomoduladoras, os resultados foram promissores, apresentando, aparentemente, uma resposta de padrão pró – inflamatório, pela secreção de TNF- $\alpha$ , sendo essa uma possível resposta anti-tumoral, que será explorada em estudos futuros.

O exopolissacarídeo de *Lasiodiplodia theobromae* em blendas com látex, tanto purificado como no seu estado bruto se mostrou com boas propriedades físico-químicas, bem como resistentes a deformação, aparentemente trata-se de filmes higroscópicos o que o torna ainda mais apelativo para um sistema de liberação controlada. Quanto a liberação do medicamento, percebeu-se que é possível modelar a taxa de liberação modificando-se a composição das blendas e a quantidade de fármaco inserida nas mesmas.

## 7. Referências Bibliográficas:

ADACHI, Y. ; OKAZAKI, M.; OHNO,N.; YADOMAE,, T. **Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1,3)- $\beta$ -D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*** Biol Pharm Bull, vol.12 , p. 1554–1560, 1994

ALHAIQUE, F.; BELTRAMI, E.; RICCIERI, F. M.; SANTUCCI, E. **Scleroglucan sustained release oral preparations. Part II. Effects of additives.** *Drug Des. Deliv.* , 5, 249.1990

ALHAIQUE,F.; SANTUCCI,E.; CARAFA, M.; COVIELLO, T.; MURTAS,E.; RICCIERI,F.M., **Gellan in sustained release formulation: preparation of gel capsules and release studies**,Biomaterials, vol. 17, p1981-1986, 1996.

ALTARUGIO,F.B **Estudo de propriedades plásticas do exopolissacarídeo produzido por *Botryosphaeria rodhina*** , Trabalho de Conclusão de Curso, (Graduação em Engenharia Biotecnológica) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista, Assis,2010.

AMAM,A.; SIDDIQUI, N.N.; QADER;S.A.U., **Characterization and potential application oh high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1**, Carbohydrate Polymers, vol.87, p.910-915, 2012.

ARMAROLI,N.; BALZANI,V., **The future of energy supply: Challenges and opportunities**, Angewandte Chemie International Edition, vol.46, p.52-66, 2006.

BARBOSA AM; STELUTI, RM; DEKKER, RFH; CARDOSO, MS; CORRADI DA SILVA, ML, **Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.** Carbohydr. Res., v. 338, p.1691-1698, 2003.

BARBOSA, AM; CUNHA, PDT; PIGATTO, MM; CORRADI DA SILVA, ML, **Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos** , Ciências Exatas e Tecnológicas, vol. 25, p.29- 42, 2004

BARKER, S.A. **Carbohydrates and the chemical industry: achievements and prospects**.Endeavour,New Series.v.15.n 4. 1991

BEDINLE.; PARRILLI,M., **Synthetic and semi-synthetic chondroitin sulfate oligosaccharides, polysaccharides, and glycomimetics** , Carbohydrate Research, vol.356,p75-85, 2012.

BENDER,H.; LEHMANN,J.; WALLENFELS,K., **Pullulan: ein extracellulares glucan von *Pullularia pullulans***, Biochimica et Biophysica ACTA, vol.36, p 309-316, 1959.

BERGO, P.; MORAES, I.C.F.; SOBRAL, P.J.A. **Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films**, Food Hydrocolloids, vol.32, p.412-415, 2013.

BERNER, M.D.; SURA, M.E.; ALVES, B.N.; HUNTER, K.W., **IFN-gamma primes macrophages for enhanced TNF- $\alpha$  expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate  $\beta$ -glucan**, Immunology Letters, vol.98, p.115-122, 2005.

BOATENG, J.S.; AUFFRET, A.D.; MATTHEWS, K.H.; HUMPHREY, M.J.; STEVENS, H.N.E.; ECCLESTON, G.M., **Characterisation of freeze-dried wafers and solvent evaporated films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces**, Int. J. Pharm., vol 389, p. 24–31, 2010.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à química dos alimentos**, São Paulo, Varela, 2003.

BRANDTZAEG, P.; OSNES, L.; ØVSTEBØ, R., JOO, G.B.; WESTVIK, A.B.; KIERUL, P., **Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes**, J. Exp. Med., vol. 184, p. 51–60, 1996

BROW, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.J.; GORDON, S., **Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -glucans**. J. Exp. Med. 197, 1119–1124.2003

BROW, G.D.; GORDON, S.; **Immune recognition. A new receptor for  $\beta$ -glucans** Nature, vol. 413 , p. 36–37, 2001.

BROWN, G.D.; GORDON, S., **Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans**, Cellular Microbiology, vol.7, p471-479, 2005.

BROW, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; POMARES, L.M.; WONG, S.Y.; GORDON, S., **Dectin-1 is a major  $\beta$ -glucan receptor on macrophages**, Journal of Experimental medicine, vol. 196, p. 407-412, 2002.

CAMPIONI, TS, **Estudo de características bioquímicas e físico-químicas do exopolissacarídeo e da biomassa de Lasiodiplodia theobromae** , Trabalho de Conclusão de Curso, (Graduação em Engenharia Biotecnológica) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2010.

CAMPO, V.L.; KAWANO, D.F.; SILVA, D.B.; CARVALHO, D.I., **Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review**, Carbohydrate Polymers, vol.77, p 167-180, 2009

CALICETI, P.; SALMASO, S.; BERSANI, S., **Polysaccharide-based anticancer prodrugs**, In L.H.Reddy, P. Couvreur( Eds) Macromolecular anticancer therapeutics, Humana Presse Inc, New York, p 163-219 , 2010.

CHANG,C.I.; LIAO,J.C. KUO,L. **Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages.** Am J Physiol 274 .H342-8.1998.

CHOI, E.H.S.; PANAYI, M.D. **Cytokine pathways and joint inflammation in Rheumatoid Arthritis,** N Engl J Med,vol. 344 , p. 907–916, 2001.

CHEN, J.; SEVIOUR, R., **Medicinal importance of fungal  $\beta$ (1/3), (1/6)-glucans,** Mycological Research,vol.3, p.635-652, 2007,

CORRADI DA SILVA, M.L.; CARDOSO, M.S.; BARBOSA,A.M.; DEKKER,R.F.H.; SILVA, G.V.J., **Purification and structural characterisation of (1→3)(1→6)- $\beta$ -d-glucan (botryosphaerans) from Botryosphaeria rhodina grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study,** Carbohydrate Polymers, vol. 61, p.10-17, 2005.

CORRADI DA SILVA, ML; MARTINEZ, PF; IZELI, NL; SILVA, IR; VASCONCELOS, AFD; CARDOSO, MS; STELUTTI, RM; GIESE, EC; BARBOSA, AM **Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas.** Química Nova, v. 29, p. 85-92, 2006.

CHEN, J. SEVIOUR,R. **Medicinal importance of fungal  $\beta$ (1→3), (1→6)-glucans.** Mycological Research v.111.p. 6 3 5 – 6 5 2.2007.

CHEN, C.-H., & LAI, L.-S., **Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in the presence of plasticizer.** Food Hydrocolloids, vol.22 (8),p. 1584-1595, 2008.

CHENGHUA,D.; XIANGLIANG,Y.; XIAOMAN, G.; YAN,W.; JINGYAN,Z.; HUIBI,X., **A  $\beta$ -d-glucan from the sclerotia of Pleurotus tuber-regium (Fr.)Sing,** Carbohydrate Research, vol. 328, p.629-633, 2000.

CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G. MODOLELL, M.. **Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod.** J Immunol Methods 174. 231-5.1994.

CORREA,S.G.;SOTOMAYOR,C.E.; AOKI, M.P.; MALDONADO,C.A.; RABINOVICH,G.A. **Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages.** Glycobiology ,vol. 13, p119-128 ,2003.

COVIELLO, T.; GRASSI, M.; RAMBONE, G.; SANTUCCI, E.; CARAFA, M.; MURTAS, E.; RICCIERI, F. M.; ALHAIQUE, F. **Novel hydrogel system from scleroglucan: synthesis and characterization.** J. Controlled Rel. 1999, 60, 367.1999.

CUNHA, PLR, **Polissacarídeos da Biodiversidade Brasileira: Uma Oportunidade de Transformar Conhecimento em Valor Econômico** . Química Nova ,Vol.32, p 649 - 660, 2009.

DI BASTIANI, M.S., **Estudo de Propriedades Físicas e Químicas de Biofilmes Elaborados com Exopolissacarídeo de Lasiodiplodia theobromae**, Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas, Assis, 2011.

DILLON, S.; AGRAWAL, S.; BANERJEE, I, K.; LETTERIO, J.; DENNING, T.L. OSWALD-RICHTER, K., **Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces antigen presenting cells and immunological tolerance**, J Clin Invest, vol. 116 ,p. 916–928, 2006.

DONOT, F., FONTANA, A., BACCOU, J. C., & GALINDO-SCHORR, S., **Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction**, *Carbohydrate Polymers* (2010), doi:10.1016/j.carbpol.08.083.2012.

DU, Z.; KELLY, E.; MECKLENBRAUKER, I.; AGLE, L.; HERRERO, C.; PAIK, P. ; IVASHIKIV,L.B. **Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan**. *J. Immunol.*176, 4785–4792.2006.

ENGSTAD,C.S.; ENGSTAD, R.E.; OLSEN, J.O.; OSTERUD, B., **The effect of soluble  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood**. *International Immunopharmacology*, v.2, p.1587-1597, 2002.

ESPITIA,P.J.P.; DU,W.X.; BUSTILLOS,R.J.A.; SOARES, N.F.F.; McHUGH, T.H., **Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties- A review**, *Food Hydrocolloids*, vol.35,p.287-296, 2014.

FALCH B.H; ESPEVIK, T. ; RYAN, L.; STOKKE, B.T. **The cytokine stimulating activity of  $(1\rightarrow3)$ - $\beta$ -D-glucans is dependent of the triple helix conformation**.*Carbohydrate Research*,v.329, p.587-596, 2000.

FERREIRA, N.L.; MARGEOT,A.; BLANQUET, S.; BERRIN,J.G., **Use of cellulases from *Trichoderma reesei* in the twenty-first century –part I: current industrial uses and future applications in the production of second ethanol generation**.*Biotechnology and Biology of Trichoderma* ,p245-261,2014.

FRADE MAC, BRUM-CURSI I, FORTES-ANDRADE F, COUTINHO-NETTO J, BARBETTA FM, FOSS NT. **Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane**. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*. 32(4) p. 157-162.2004.

FUKUOKA,A.; DHEPE, P.L., **Catalytic conversion of cellulose into sugar alcohols**, *Angewandte Chemie International Edition*, vol.45, p.5161-5163, 2006.

GENNADIOS, A., Park, H. J., & WELLER, C. L. ,**Relative humidity and temperature effects on tensile strength of edible protein and cellulose ether films**, *Transactions of the ASAE*, vol.36, p.1867. 1993

GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M., **Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2** ,*J Exp Med*, vol.197, p. 1107–1117, 2003

GARCIA,M.; MARTINO,M.; ZARITZKY,N., **Starch-based coatings: Effect on refrigerated strawberry quality**, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 76, p. 411-420, 1998.

GOH,C.S.; TAN,K.T.; LEE, K.T.; BHATIA,S., **Bio-ethanol from lignocellulose: status, perspectives and challenges in Malaysia**, *Bioresource Technology*, vol.101,p.4834-4831, 2010

GOLDMAN,R.;FERBER,E.;MELLER,R.;ZOR,U. **A role for reactive oxygen species in zymosan and b-glucan induced protein tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation in murine macrophages**. *Biochem. Biophys. Acta* 1222, 265–276.1994

GORDON, S. **Alternative activation of macrophages**. *Nat Rev Immunol* 3 23-35.2003.

GOUNGA, ME; SHIN, SY; WANG, Z, **Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition**. *J. Food Eng.*, v. 83, p. 521–530, 2007.

GUERRA,L.; DELLAMBRA, E.; PANACCHIA,L.; PAIONNI,E., **Tissue Engineering for Damaged Surface and Lining Epithelia: Stem Cells, Current Clinical Applications and Available Engineered Tissues**, *Tissue Engineering Part B*, vol. 15, p.91-112, 2009.

HAJEER, A.H.; HUTCHINSON,I.V.; **TNF- $\alpha$  gene polymorphism clinical and biological implications**, *Microsc Res Tech*, 50 , pp. 216–228, 2000

HERCULANO, R.D.; QUEIROZ, A.A.A.; KINOSHITA, A.; OLIVEIRA, O.N.; GRAEFF, C.F.O., **On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes**, *Materials Science and Engineering* ,vol.C 31, p. 272–275,2011.

HERCULANO RD, GUIMARÃES SAC; ORCINI W, MORAIS RCN, DUARTE MAH; KINHOSHITA A; GRAEFF, CFO. **Metronidazole release using natural rubber latex as matrix**. *Materials Research*. 13(1) pp. 13(1) 57-61.2010.

HERCULANO RD, SILVA CP, ERENO C, CATANZARO-GUIMARÃES AS, KINHOSHITA A, GRAEFF CFO. **Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR)**. Materials Research. 12(2). pp.253-256.2009.

HOFFMAN,O.A.; OLSON, E.J.; LIMPER, A.H., **Fungal  $\beta$ -glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to bacterial lipopolysaccharide**, Immunol Lett,vol. 37,p. 19–25, 1993.

HUC,D.; MATIGNON,A.; BAREY,P. DESPRAIRIES,M.; MAUDUIT,S.; SIEFFERMANN,J.M.; MICHON,C. , **Interaction between modified starch and carrageenan during pasting**, Food Hydrocolloids, vol.36, p.355-361, 2014.

JESENAK, M.; BANOVCIN, P.; RENNEROVA, Z.; MAJTAN, J., **Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases**, Allergologia et immunopathologia,vol. 455, 2012.

JING,Y.; CUI, X.; CHEN, Z.; HUANG,L.; SONG, L.; LIU,T.; LV,W.; YU,R., **Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultures *Cordyceps militaris***, Carbohydrate Polymers, vol.102, p.288-296, 2014.

KHALIKOVA,E.; SUSI,P.; KORPELA,T., **Microbial dextran-hidrolizing enzymes: Fundamentals and applications**, Microbiology and Molecular Biology reviews, vol. 69(2), p.306-325, 2005.

KAVITHA REDDY,G.K.M.; SATLA,S.;GAIKWAD,S., **Natural polysaccharides: Versatile excipients for controlled drug delivery systems**. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol.6,p.275-286, 2011.

KIHO,T.; KATSURAGAWA,M.; NAGAI,K.; UKA,S.; HAGA,M., **Structure and antitumor activity of a branched (1→3)- $\beta$ -d-glucan from the alkaline extract of *Amanita muscaria***, Carbohydrate Research, vol.224, p. 237-243, 1992.

FRANSEN,L.R.; RUMSEY,T.R.; KROCHTA, J.M., **Modeling of natamycin and potassium sorbate diffusion in whey protein isolate films for application to cheddar cheese**. Poster 28-5, Institute of food technologists annual meeting, 2002.

LAGANA, G.E.H.A., **Moisture dressings: the new standard in wound care** ,J. Nurse Pract.,vol. 6, p. 366–370, 2010.

LEE,B.C.; BAE, J.T.; PYO,H.B.; CHOER,T.B.; KIM,S.W.;HWANG,H.J.; YUN,J.W., **Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa***, Enzyme and microbial technology, vol.32, p.574-581, 2003.

LEE, J.Y.; KIM, J.Y.; LEE, Y.G.; RHEE, M.H.; HONG, E.K.; CHO, J.Y. **Molecular mechanism of macrophage activation by exopolysaccharides from liquid culture of *Lentinus edodes***. J. Microbiol. Biotechnol. 18, 355–364.2008

LEE, J.S.; KOHSUKE, O. WATANABE, O.; HARA, H.; ISHIZUKA, S. **Immunomodulatory effect of mushrooms on cytotoxic activity and cytokine production of intestinal lamina propria leukocytes does not necessarily depend on  $\beta$ -glucan content.** Food Chemistry. V.126 .p.1521–1526.2011

LEHNINGER, AL; NELSON, DL; COX, MM, **Princípios de Bioquímica**, In Carboidratos, 2ª Edição, Ed. Sarvier, , São Paulo- SP, Ano 2000.

LJUNGMAN, A. G.; LEANDERSON, P.; TAGESSON, C. **(1-3)- $\beta$ -D-Glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages.** Environ. Toxicol. Pharmacol. 5, 273–281.1998.

LOBO, A.R.; SILVA, G.M.L., **Resistant starch and its physicochemical properties**, Revista de Nutrição, vol.16, 2003.

LOWRY, V.K.; FARNELL, M.B.; FERRO, P.J.; SWAGGERTY, C.L.; BAHL, A.; KOGUT, M.H., **Purified  $\beta$ glucan as a abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**, International Journal of food microbiology, vol.98, p.309-318, 2005.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. **Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery.** Curr. Drug Targets, v. 6, n. 2, p. 363-371, 2005.

MALI, S; GROSSMANN, MVE; GARCÍA, MA; MARTINO, MN; ZARITZKY, NE **Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films.** Carbohydrate Polymers. 56, p.129–135, 2004.

MALI, S.; SAKANAKA, F.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M.V.E., **Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect**, Carbohydrate Polymers, vol. 60, p. 283-289, 2005.

MAEDA, M.; UEHARA, T.; HARADA, N.; SEKIGUCHI, M.; HIRAOKA, A., **Heparinoid-active sulphates polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the chlorophyta**, Phytochemistry, vol.30, p 3611-3614, 1991.

MASIHI, K.N.; MADAJ, K.; HINTELMANN, H. GAST, G.; KANEKO, Y., **Down-regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  moderate reduction of interleukin -1 $\beta$ , but not interleukin-6 or interleukin -10, by glucan immunomodulators curdlan sulfate and lentinan**, Int. J. Immunopharmac., vol. 19, No. 9/10, p. 463-468, 1997

MATTA JUNIOR., M. D., **Caracterização de biofilmes obtidos a partir do amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol.** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brasil, pp. 113. 2009

MATTHEWS, K.H.; STEVENS, H.N.E.; AUFFRET, A.D.; HUMPHREY, M.J.; ECCLESTON, G.M., **Lyophilised wafers as a drug delivery system for wound**

**healing containing methylcellulose as a viscosity modifier**, *Int. J. Pharm.*, vol.m289,p. 51–62, 2005.

Medley **Indústria Farmacêutica Ltda.**- Campinas - SP- Indústria Brasileira

MEHVAR,R., **Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents**, *Journal of Controlles Release*, vol. 69(1), p.1-25, 2000.

MENDES, S.F., SANTOS Jr., O.D., BARBOSA, A.M., VASCONCELOS, A.F.D., ARANDA-SELVERIO, G.;MONTEIRO N.K., DEKKER, R.F.H., PEREIRA, M.S., TOVAR, A.M.F., MOURÃO, P.A.D.S.,CORRADI DA SILVA, M.D.L.. **Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from Botryosphaeria rhodina MAMB-05 grown on fructose**. *Int.J. Biol. Macromol.* 45, 305–309.2009

MEYERS, M.A.; CHEN, P.Y.; LIN, A.Y; SEKI,Y., **Materiais biológicos: Estrutura e Propriedades Mecânicas**, *Progresso em Ciência dos Materiais*, vol,53, p1-206 , 2008

MISCHNICK,P.; MOMCILOVIC, D., **Chemical structural analysis of starch and cellulose derivatives**, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, vol.64, 2010.

MIRANDA, C. C. B. O.DEKKER, R. F. H., CÓLUS, I. M. S.,ZAIA, C. T., CASTRO, I., & BARBOSA, A. M. . **Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic, hypoglycaemic and hypocholesterolaemic activities in mice and rats**. *Journal of Biotechnology*, 131 (2), S58, 2007.

MIRANDA, C. C. B. O., DEKKER, R. F. H., SERPELONI, J. M, FONSECA, E. A. I., CÓLUS, I. M. S., & BARBOSA, A. M. . **Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by Botryosphaeria rhodina MAMB-05**. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42 (2), 172-177,2008

MORRIS,G.; HARDING,S., **Microbial Polysaccharides**, *Applied microbiology: industrial*, p 482-494, 2009.

MORRISON,A.C.;CORRELL,P.H., **Activation of the stem cell-derived tyrosine kinase/ROn receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein results in the induction of arginase activity in murine peritoneal macrophages**. *J Immunol* 168 (2002) 853-60.

MOGOSANU, G.D.; GRUMEZESCU, A.M., **Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing**, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 463, p.127-136, 2014.

MUNDER,M.;EICHMANN,K.;MODELELL.M., **Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype**. *J Immunol* 160. 5347-54.1998

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J.M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. **Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells.** J Immunol 163.3771-7.1999

MUKERJEA,R.; SLOCUM, G.; RODYT,J.F., **Determination of the maximum water solubility of eight native starches and the solubility of their acidic-methanol and ethanol modified analogues,** Carbohydrate Research, vol.342, p.103-110, 2007.

MÜNZ,C.; STEINMAN R.M.; FUJII, S., **Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity,** Journal of Experimental Medicine, vol 202, p.203–207, 2005

MRUÉ F, COUTINHO-NETTO J, CENEVIVA R, LACHAT JJ, THOMAZINI JA AND TAMBELINI H. **Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane.** Materials Research. 7(2) (2004) pp. 277-283

NAGULESWARAN,S.; VASANTHAN,T.; HOOVER,R.; BRESSLER,D., **Amylolysis of amylopectin and amylose isolated from wheat, triticale, corn and barley starches,**Food Hydrocolloids, vol.35, p. 686-693, 2014.

NG, S.F.; JUMAAT, N., **Carboxymethyl cellulose wafers containing antimicrobials: A modern drug delivery system for wound infections.**European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.51, p.173-179, 2014

NOVAK, M.; SYNYSYA, A.; GEDEON, O.; SLEPICKA, P.; PROCHAZKA, V.; SYNYSYA, A.; BLAHOVEC, J.; HEJLOVA, A.; COPIKOVA, J., **Yeast  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ -D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties.** Carbohydrate Polymers, v.87, p.2496-2504, 2012.

NUNES,FM ; OLIVEIRA, MCF; ARRIAGA, AMC ; MATTOS, MC ; MAFEZOLI, J ; VIANA, FMP ; FERREIRA, VM FILHO, ER ; FERREIRA, AG, **A New Eremophilane-type Sesquiterpene From the Phytopatogen Fungus *Lasiodiplodia theobromae* (Sphaeropsidaceae),** vol.19 , São Paulo , 2008

OCHOA,F.G.; SANTOS,V.E.; CASAS,J.A.; GOÂMEZ,E., **Xanthan gum: production, recovery and properties,** Biotechnology Advanced, vol.18, p.549-579, 2000.

OHNO,N.;EGAWA,Y.;HASHIMOTO,T.;ADACHI,Y.;YADOMAE,T. **Effect of betaglucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice.** Biol.Pharm. 19, 608–612.1996

OLIVEIRA, J.A.A, HYPPOLITO MA, COUTINHO-NETTO J, MRUÉ F. **Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético.** Revista Brasileira Otorrinolaringologia. 69(5) (2003) pp. 649-655.

OLIVEIRA, K.S.M., **Otimização em frascos agitados e estudo de aeração em fermentador no cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para caracterização física do**

**caldo fermentado e caracterização química de suas glucanas**, Tese de Doutorado, Unesp-IB Rio Claro, 2014

OSMAN, M.E. MENZIES, A.R.; WILLIAMS, P.A.; PHILLIPS, G.O., **Fractionation and characterization of gum arabic samples of various origin**, Food Hydrocolloids, vol. 3/4., p 233-242, 1994

PALMU, P. S. T., **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, p. 244, 2003.

RABINOVICH, G.A.; ARIEL, A.; HERSHKOVIZ, R.; HIRABAYASHI, K.I.; LIDER, O. **Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1**. Immunology 97 .100-6.1999.

RENN, D.; **Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry status, need and prospects**; Tibtech, vol.15, 1997

RENOU, F.; PETIBON, O.; MALHIAC, C.; GRISEL, M., **Effect of xantan structure on its interaction with locust bean gum: Toward prediction of rheological properties**, Food Hydrocolloids, vol.32, p.331-340, 2013.

RICHARDSON, S.; GORTON, L., **Caracterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivatives**, Analytica chimica acta, vol.497, p.27-65, 2003.

SANDERSON, G.R.; **The gellan gum**, P. Harries. Food gels, Elsevier Science, p.201-232, 1990.

SAIJO, S.; FUJIKADO, N.; FURUTA, T.; CHUNG, S.H.; KOTAKI, H.; SEKI, K.; SUDO, K.; AKIRA, S.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; KINJO, T.; NAKAMURA, K.; KAWAKAMI, K.; IWAKURA, Y., **Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans***, Nature Immunology, vol. 8, p.39-46, 2007.

SARINHO, E.; MEDEIROS, D.; SCHOR, D.; SILVA, A.R.; SALES, V.; MOTTA, M.E.; COSTA A.; AZOUBE, A. ; RIZZO, J.A., **Production of interleukin-10 in asthmatic children after Beta-1-3-glucan**, vol.37, p.188-192, 2009.

SÁROSSY, Z.; TENKANEN, M.; PITKANEN, L.; BJERRE, A.B.; PLACKETT, D., **Extraction and chemical characterization of rye arabinoxylan and the effect of b-glucan on the mechanical and barrier properties of cast arabinoxylan films**, Food Hydrocolloids, vol.30, p. 206-216, 2013.

SELBMANN, L., CROGNALE, S., PETRUCCIOLI, M. **Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* in different bench-top bioreactors.** Journal of Applied Microbiology, v. 96, p.1074–1081, 2004.

SELJELID,R. ESKELAND,T. ,**The biology of macrophages: I. General principles and properties.** Eur J Haematol 51 . 267-75.1993.

SIMSEK,S.; TULBEK,M.C.; YAO,Y.; SCHATZ,B., **Starch characteristics of dry peas (*Pisum sativum* L.) grow in the USA,** Food Chemistry,vol.115,p.832-838, 2009.

SINGH,R.S.; GAGANPREET,K.SAINI. NENNEDY,J.F., **Pullulan: Microbial sources, production and applications,** Carbohydrate Polymers, vol.73, p.515-531, 2008.

SHUKLA,S.; SHI,Q.; MAINA, N.H.; JUVONEN,M.; TENKANEN,M.; GOYAL,A.; ***Weissella confuse* Cab3 dextranucrase: properties and in vitro synthesis of dextran and glucooligosaccharides,** Carbohydrate polymers, vol.101, p554-564, 2014.

SON,H.J.; HAN, D.W.; BAEK, H.S.; LIM, H.R.; LEE, M.H.; WOO, Y.I.; PARK, J.C. **Stimulated TNF- $\alpha$  release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by  $\beta$ -glucan,** Current Applied Physics , vol. 7S1, p.33–36, 2007

STOLL,U.E.; KASTNER,S.;DRUSCH,S.; **Thermally induced degradation of citrus pectins durin storage – Alteration in molecular structure, colour and thermal analysis,** Food Hydrocolloids, vol.35, p 565-575, 2014

SUMMERBELL, R. C. et al. **Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically.** Medical Mycology, vol. 42, n. 6, p. 543–547, 2004

THACHARODI, D.; PANDURANGA, K.R., **Development and in Vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride ,** Biomaterials, vol. 16 145-148,1995

THOMAZINI JA, MRUÉ F, COUTINHO-NETTO J, LACHAT JJ, CENEVIVA R, ZBOROWSKI AC. **Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization.** Acta Microscópica. 6 (1997) pp. 798-799.

TURHAN, K.N.; SAHBAZ,F., **Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films,** Journal of Food Engineering,vol.6,p, 459–466.2004.

UKAIS.; YOKOYAMA,S.; HARA,C.; KMO,T., **Structure of na álcali- soluble polysaccharide from the frutit body of *Ganoderma japonicum* LLOYD,** Carbohydrate Research, vol.105, p.237-245, 1982.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. **Three exopolysaccharides of the beta-(1-->6)-D-glucan type and a beta-(1-->3;1-->6)-D-glucan produced by strains of**

***Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit.** Carbohydrate Research, v. 343, n. 14, p. 2481–5, 22 set. 2008.

VASCONCELOS, A.F.D.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; CARBONERO, E.R.; SILVEIRA, J.L.M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M.S.; CORRADI DA SILVA, M.L., **Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular  $\beta(1\rightarrow6)$ -d-glucana (lasiodiplodan),** Carbohydrate Polymeres, vol.92, p.1908-1914, 2013.

VEIGA, F. J. B. Medicamentos orais de liberação controlada – comprimidos matriciais hidrófilos. **Boletim da Faculdade de Farmacia**, Coimbra.v.12,n.2, p17-87, jul/dez.1998.

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

VOLMAN, J.J.; RAMAKERS, J.D.; PLAT, J., **Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucanas,** Physiology & Behavior, vol. 94, p. 276-284, 2008.

WANG, D.; LU, M.; WANG, X.; JIA, Y.; FANG, Y.; LIU, Z.; WANG, S., **Improving stability of a novel dextran-degrading enzyme from marine *Arthrobacter oxydans* KQ11,** Carbohydrate Polymers, vol.103, p.294-299, 2014.

WENG, B.B.C.; LIN, Y.C.; HU, C.W.; KAO, M.Y.; WANG, S.H.; LO, D.Y.; LAI, T.Y.; KAN, L.S.; CHIOU, R.Y.Y. **Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran( $\beta$ -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101.** Food and Chemical Toxicology.v.49.p.910-916.2011

WURZBURG, O.B., **Modified starches: properties and uses,** CRC Press, Boca Raton, FL, 1986.

WU, G.H.; HU, T.; LI, Z.Y.; HUANG, Z.L.; JIANG, J.G., **In vitro antioxidant activities of the polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing,** Food Chemistry, vol. 148, p.351-356, 2014.

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

YAMAMOTO, BB, **Produção de Exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia Theobromae* Em Diferentes Fontes de Nitrogênio** (monografia), Universidade Estadual Paulista, 2009

YOUNG, R.E.; THOMPSON, R.D.; LARBI, K.Y.; LA, M.; ROBERTS C.E.; SHAPIRO, S.D.; PERRETTI, M.; NOURSHARGH, S., **Neutrophil elastase(NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators and phagocytosis in response to zymosan particles in vivo,** Journal of Immunology, vol.172, p.4493-4502, 2004.

YOO, J.W.; DHARMALA, K.; LEE, C., **The physicochemical properties of mucoadhesive polymeric films developed as female controlled drug delivery system,** International journal of pharmaceutics, vol.309, p.139-145, 2006.

ZANG, L.Z., **Investigation of moisture transfer effectiveness through a hydrophilic polymer membrane with a field and laboratory emission cell**, International Journal of Heat and Mass Transfer ,vol.49 ,p.1176–1184, 2006

ZHANG, Y.; XU, J.; QU, Y.; XI, X.; YANG, J., **Gel casting of alumina suspension using gellan gum as gelling agent**, Ceramics International, vol.40, p.5715-5721, 2014.

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

ZUGENMAIER, P.; TIMELL, T.E.; WIMMER, R., **Crystalline cellulose and derivatives: characterization and structures**, Spring series in wood science, p.101-174, 2007.