



## Obtenção e caracterização de lasiodiplodana fosforilada com trimetafosfato de sódio

Natan da Silva Miranda Sechi<sup>1</sup> Gabrielle Cristina Calegari<sup>2</sup> Michel da Silva Fonseca<sup>3</sup>  
Patricia Teixeira Marques<sup>4</sup> Mário Antônio Alves da Cunha<sup>5</sup>

03 julho 2017

Resumo – As  $\beta$ -Glucanas constituem uma importante classe de compostos bioativos, os quais apresentam diferentes funcionalidades biológicas, incluindo atividade antitumoral, antioxidante e imunomoduladora. Pesquisas têm demonstrado que derivatizações químicas em  $\beta$ -glucanas podem intensificar seu potencial biológico, uma vez que há uma forte correlação entre bioatividade e a estrutura química da macromolécula. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção e a caracterização de uma (1-6)- $\beta$ -D-glucana (lasiodiplodana) derivatizada por fosforilação com trimetafosfato de sódio (TMFS). A lasiodiplodana fosforilada foi caracterizada quanto à solubilidade, grau de substituição (DS), análises por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios-X. Os espectros de FT-IR confirmaram a fosforilação, sendo verificada banda típica do grupamento fosfato na amostra derivatizada. A derivatização promoveu aumento da solubilidade da macromolécula, mesmo sendo obtido um derivado com baixo DS (0,0144). Por outro lado, não promoveu mudanças no padrão cristalográfico da lasiodiplodana, sendo observado difratograma típico de amostra amorfa com regiões com certa cristalinidade em ambas as amostras (*in natura* e derivatizada). A fosforilação pelo método proposto pode ser utilizada para melhorar a solubilidade da lasiodiplodana e possivelmente suas propriedades biológicas, sendo ainda necessários estudos específicos para avaliação das funcionalidades biológicas do derivado.

Palavras-chave: :  $\beta$ -Glucana. *Lasiodiplodia theobromae*. Derivatização. Caracterização.

### 1. INTRODUÇÃO

As  $\beta$ -glucanas são biomacromoléculas de carboidratos, compostas por unidades monoméricas de D-glicose unidas sequencialmente através de

ligações  $\beta$ -glicosídicas (GRAUBAUM, 2012). Estão presentes na parede celular de fungos e bactérias e também são encontradas em cereais como aveia e cevada (DALMO; BØGWALD, 2008; VOLMAN;

<sup>1</sup> [natanmsechi@gmail.com](mailto:natanmsechi@gmail.com), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> [gabrielleccalegari@gmail.com](mailto:gabrielleccalegari@gmail.com), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> [mfonseca@alunos.utfpr.edu.br](mailto:mfonseca@alunos.utfpr.edu.br), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>4</sup> [patriciamarques@utfpr.edu.br](mailto:patriciamarques@utfpr.edu.br), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>5</sup> [mcunha@utfpr.edu.br](mailto:mcunha@utfpr.edu.br), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.



RAMAKERS; PLAT, 2008). Alguns fungos filamentosos, além de apresentarem  $\beta$ -glucanas como constituinte estrutural da parede celular, produzem  $\beta$ -glucanas extracelulares quando cultivados em cultivos submersos (CUNHA et al., 2017, KAGIMURA et al. 2015a, THEIS et al., 2017). O ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI tem sido estudado como produtor da (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana (lasiodiplodana), como metabólito secundário, a partir da fermentação da glicose (KAGIMURA et al., 2015b).

$\beta$ -Glucanas tem sido descritas como macromoléculas que apresentam diferentes propriedades biológicas como atividade imunomoduladora, antioxidante, anticarcinogênica, anticoagulante, antiviral, hipocolesterolêmica, hipoglicêmica, além de algumas como a lasiodiplodana apresentarem efeito protetivo ao DNA contra danos causados por drogas quimioterápicas (MELLO et al., 2017).

A solubilidade de uma molécula em água é um parâmetro bastante relevante com relação a bioatividade da mesma, e neste sentido as  $\beta$ -glucanas são relatadas como polissacarídeos de baixa ou praticamente nenhuma solubilidade, como é o caso da lasiodiplodana *in natura*. Para contornar essa característica, algumas pesquisas propõem métodos de derivatização química, tais como carboximetilação, sulfonação e fosforilação, os quais têm apresentado bons resultados no aumento da solubilidade (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Dentre esses métodos, a fosforilação tem se destacado pela simplicidade e baixo custo do processo (SHI; SHI; LI, 2014).  $\beta$ -Glucanas fosforiladas, mesmo com grau de substituição pequeno, têm apresentado aumento na solubilidade e intensificação ou introdução de atividades biológicas interessantes como capacidade imunomoduladora, antioxidante e antitumoral (ANUSUYA; SATHIYABAMA, 2014; SHI; SHI; LI, 2014; YE et al., 2013). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a produção e caracterização de lasiodiplodana fosforilada com trimetafosfato de sódio (TMFS), como proposta para a obtenção de um material com solubilidade

melhorada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da Lasiodiplodana

A lasiodiplodana foi obtida por meio de cultivo submerso do ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Biomassa micelilal foi produzida em meio mínimo de sais de Vogel contendo 5 g L<sup>-1</sup> de glicose (48 h, 150 rpm e 28 °C). Em seguida, a biomassa fúngica foi separada do caldo por centrifugação (1600 x g), ressuspendida em água esterilizada e homogeneizada em mixer para obtenção de inóculo padronizado (KAGIMURA et al., 2015b). O exopolissacarídeo foi então produzido em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio mínimo mineral de Vogel (VOGEL, 1956), 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 10 mL de inóculo padronizado. Os cultivos foram conduzidos em incubadora orbital (Shaker) por 48 h a 28 °C e 150 rpm. O caldo de fermentação contendo a lasiodiplodana foi separado da biomassa fúngica por centrifugação (1600 x g) e a lasiodiplodana foi precipitada com etanol 96% (3:1 v/v) durante 12 h a 4 °C. Após a precipitação, o material foi recuperado por filtração em tecido de organza, ressuspendido em água destilada e intensamente dialisado contra água (5 dias) em tubos de diálise ( $\approx$ 12,000 Da, 1.3 in. width, MWCO 11,331 Sigma-Aldrich) e então seco por liofilização. O conteúdo de exopolissacarídeo foi estimado através da determinação do conteúdo de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

### 2.2 Fosforilação da Lasiodiplodana com Trimetafosfato de Sódio (TMFS)

A derivatização da lasiodiplodana por fosforilação foi realizada seguindo protocolo descrito por Anusuya e Sathiyabama (2014), com pequenas modificações. Uma suspensão de lasiodiplodana 0,1 % (m/v) em 100 mL de solução de NaOH 2% (m/v) foi preparada e submetida a agitação por 2 h a 60 °C. Em seguida, foi adicionado o agente derivatizante TMFS na proporção mássica de 1:1 (lasiodiplodana : agente



derivatizante). A mistura foi mantida sob agitação durante 24 h à temperatura ambiente e então dialisada contra água destilada (5 dias) e liofilizada. A amostra fosforilada foi nomeada como GP-TM e a lasiodiplodana *in natura* liofilizada como GP.

### 2.3 Avaliação da Solubilidade em Água

A solubilidade das amostras GP e GP-TM foi estimada em termos de carboidratos solúveis. Foram suspensos aproximadamente 50 mg de amostra em 10 mL de água destilada e mantidos sob agitação durante 24 h a 25 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e no sobrenadante foi determinado o conteúdo de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A solubilidade em água foi expressa de diferentes maneiras. Primeiro como fração de massa solúvel em mg por 1 g de polissacarídeo (mg/g) e depois como o percentual de massa solúvel (% de polissacarídeo solúvel) em 100 g de polissacarídeo e como percentual de massa solúvel em 100 mL de água.

### 2.4 Análise por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas pelo método de pastilhas de KBr, empregando a proporção mássica de 1:10 (amostra: KBr). As leituras foram realizadas na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 32 acumulações em espectrômetro FT-IR (modelo Frontier, Perkin Elmer, USA).

### 2.5 Determinação do Grau de Substituição (DS)

O grau de substituição da amostra GP-TM foi determinado de acordo com o método proposto por Passauer, Bender e Fisher (2010). Primeiramente foram determinados os teores de fósforo nas amostras pelo método espectrofotométrico vanado-molibdato, utilizando como padrão o fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Aproximadamente 70 mg de amostra foram adicionadas a 2 mL de solução de

carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 3% (m/v) em cadinho de porcelana. A mistura foi homogeneizada, aquecida a 100 °C até secagem e posteriormente calcinada a 550 °C por 8 h. Em seguida foram adicionados às cinzas cerca de 4 mL de HCl 1,0 mol  $\text{L}^{-1}$  e 6 mL de água destilada. Essa suspensão foi homogeneizada e filtrada em papel filtro. Uma alíquota de 1 mL do filtrado foi misturada com 5 mL de água destilada e 1 mL de reagente vanado-molibdato em tubo de ensaio. Após repouso por 45 min foram realizadas leituras espectrofotométricas ( $\lambda = 435 \text{ nm}$ ) em espectrofotômetro UV-VIS (modelo Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, USA). A partir dos teores de fósforo obtidos foi estimado o grau de substituição (DS) por meio da Equação 1

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

Onde, 162 refere-se à massa molar de uma unidade de anidroglicose; P% corresponde à porcentagem de fósforo; 3100 corresponde à massa molar do fósforo multiplicada por 100, e 102 refere-se à massa molar do substituinte fosfato ( $-\text{NaHPO}_3$ ) subtraída pela massa molar do átomo de hidrogênio.

### 2.6 Análise por Difractometria de Raios X

Os padrões de difração de raios X das amostras foram obtidos em difratômetro de raios X (modelo MiniFlex 600, Rigaku, Japão), equipado com fonte de radiação de lâmpada de cobre ( $\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$ ), operado com tensão de 40kV, corrente de 15 mA, passo de 0,02 ° 2 $\theta$  e velocidades de 5°  $\text{min}^{-1}$ . As leituras foram realizadas na faixa de 10° a 60° (2 $\theta$ ).

### 2.7 Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica das amostras foi realizada por meio de micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura de bancada (modelo TM3000, Hitachi, Japão). As amostras liofilizadas foram dispostas em fita de carbono e o



equipamento foi operado a 15 kV. As micrografias foram obtidas com aproximações entre 400 e 2000 vezes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado no processo de derivatização um rendimento em massa de 102%. Tal aumento de massa da amostra fosforilada (GP-TM) em relação a amostra nativa (GP) é justificado pela introdução dos grupos fosfato. Comportamento similar foi relatado por Song et al. (2015), os quais obtiveram rendimento de até 104% no processo de fosforilação de polissacarídeos extraídos de abóbora (variedade godiva).

#### 3.1. Solubilidade em Água

A amostra GP-TM apresentou um aumento de 52,4% (m/m) na solubilidade em água em relação à amostra GP (Tabela 1). Tal aumento de solubilidade está associado à introdução dos grupamentos fosfato pela modificação química da macromolécula promovida pelo agente TMFS. Shi, Shi e Li (2014) observaram um aumento de aproximadamente 30% (m/m) na solubilidade em água, em amostra de  $\beta$ -glucana extraída da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* após fosforilação mecanoquímica. Williams et al. (1991) verificaram que a fosforilação de uma  $\beta$ -D-Glucana insolúvel, extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, resultou em um novo material solúvel. De forma semelhante, Suflet et al. (2011) obtiveram curdlana ((1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucana) solúvel após derivatização por fosforilação.

Tabela 1 – Solubilidade das amostras *in natura* e fosforilada.

Amostras	Solubilidade em Água		
	(mg g <sup>-1</sup> )	% (m/m)	% (m/v)
GP*	4,250 ±0,003	0,425 ±0,02	0,002 ±0,00
GP-TM**	528,409 ±0,3	52,841 ±0,2	0,273 ±0,00

\* *Lasiodiplodana in natura*, \*\* *Lasiodiplodana* fosforilada com TMFS  
Os resultados são médias de triplicadas

#### 3.2 Caracterização por FT-IR

Os espectros de FT-IR das amostras GP e GP-TM estão apresentados na Figura 1A e uma ampliação da região entre 1880 e 750 cm<sup>-1</sup> dos espectros é

apresentada na Figura 1B.

As bandas observadas na região acima de 3000 cm<sup>-1</sup> (Figura 1A) em ambas as amostras (GP e GP-TM) são provenientes de estiramento simétrico e assimétrico no grupo O-H e na região de 2926 cm<sup>-1</sup> correspondem à vibração de estiramento assimétrico na ligação C-H, típicos de estruturas de  $\beta$ -Glucanas (NOVÁK et al., 2012; SHI; SHI; LI, 2014; LIMBERGER-BAYER et al., 2014).

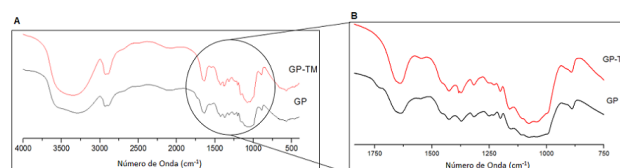


Figura 1 – Espectros de FT-IR das Amostras GP e GP-TM obtidos nas regiões entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup> (A) e 1800 e 750 cm<sup>-1</sup> (B).

Bandas bem definidas na região entre 1600 e 1700 cm<sup>-1</sup> são atribuídas à presença de água, sendo muito comuns em glucanas (SUFLET et al., 2011). Também podem ser observadas bandas características de configuração de ligação do tipo  $\beta$  na região de 891 cm<sup>-1</sup>, tal como previamente descrito por Kagimura et al. (2015a). No espectro ampliado da amostra GP-TM (Figura 1B) é verificada uma banda mais acentuada em 1041 cm<sup>-1</sup> atribuída à presença de ligações P-OH (SUFLET et al., 2011) e um aumento de intensidade em uma segunda banda em 1228 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento assimétrico P=O (YE et al., 2013; SONG et al., 2015), que pode estar relacionada a presença de grupos fosfato oriundos da modificação da macromolécula por fosforilação. É importante destacar, que bandas associadas a fosforilação podem ser difíceis de serem identificadas em polissacarídeos fosforilados com baixos graus de fosforilação como observado em estudos semelhantes, sobretudo, em função da presença de bandas de absorção de estiramento simétrico a assimétrico das ligações C-O-C do anel de anidroglicose na região entre 1047 e 1269 cm<sup>-1</sup> (YE et al., 2013; GAO et al., 2014; KAGIMURA et al., 2015a).

#### 3.3 Grau de Substituição (DS)

A determinação do grau de substituição de amostras



fosforiladas usando o método vanado-molibdato tem sido descrita por diferentes autores, sendo verificados protocolos com e sem o emprego de fixadores de fósforo (PASSAUER; BENDER; FISCHER, 2010). Nesse trabalho utilizou-se o fixador carbonato de sódio, pois testes preliminares (não mostrados aqui) demonstraram sua efetividade no processo de fixação, possibilitando obtenção de melhores resultados. A amostra GP não apresentou nenhum resíduo de fósforo, enquanto a amostra GP-TM apresentou baixo teor de fósforo conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Teor de Fósforo e Grau de Substituição (DS)

Amostra	Teores de Fósforo % (m/m)	DS
GP*	nd	-
GP-TM**	0,273 ±0.002	0,014 ±0.001

nd – Não detectável, \* Lasiodiplodana *in natura*, Lasiodiplodana Fosforilada com TMFS  
Os resultados são médias de triplicadas

O protocolo de derivatização empregado levou a obtenção de um derivado com grau de substituição relativamente baixo (DS 0,014). Deng et al. (2015) relataram um DS de 0,206 em amostra de (1→3)- $\alpha$ -D-glucana extraída de *Dictyophora indusiata* fosforilada com o derivatizante ácido fosfórico. Zhang et al. (2017) obtiveram derivado do polissacarídeo extraído de casca de *Trichosanthes* (*T. kirilowii* Maxin) fosforilado com mistura derivatizante composta por trimetafosfato de sódio e tripolifosfato de sódio, o derivado apresentou DS de 0,43.

Embora no presente estudo tenha sido obtido um derivado com baixo grau de fosforilação, a fosforilação promoveu grande aumento na solubilidade da macromolécula em relação a amostra nativa, conforme demonstrado na Tabela 1. Há relatos na literatura científica que demonstram que, mesmo com valores baixos de DS, a solubilidade dos polissacarídeos pode sofrer grandes modificações em relação as amostras originais não derivatizadas. Shi, Shi e Li (2014) observaram aumento de solubilidade de aproximadamente 30% em glucana fosforilada (DS: 0,77) com hexametafosfato de sódio. Suflet et al. (2011) obtiveram curdlana fosforilada totalmente solúvel, mesmo com DS inferiores a 1,0. O aumento

na solubilidade de glucanas fosforiladas pode ser atribuído ao caráter hidrofílico dos grupamentos fosfato introduzidos, que ampliam a interação com a água e diminuem a quantidade de interações de hidrogênio entre as cadeias, que por sua vez, melhoram a permeação de água nos grânulos ou partículas (SHI; SHI; LI, 2014).

### 3.4 Difractometria de Raios X

A Figura 2 mostra o perfil de difração de raios X das amostras GP e GP-TM. Segundo Veverka et al. (2014) e Kagimura et al. (2015a), de maneira geral são verificados picos largos nos difratogramas de  $\beta$ -glucanas. De fato, os perfis difratográficos verificados nas amostras de lasiodiplodana nativa e fosforilada são típicos de matrizes amorfas. Entretanto, são verificados três picos de alta intensidade em  $2\theta$  com valores próximos a  $21^\circ$ ,  $24^\circ$  e  $39^\circ$ , indicando que tanto a lasiodiplodana nativa, como a fosforilada apresentam regiões cristalinas em uma matriz amorfa.

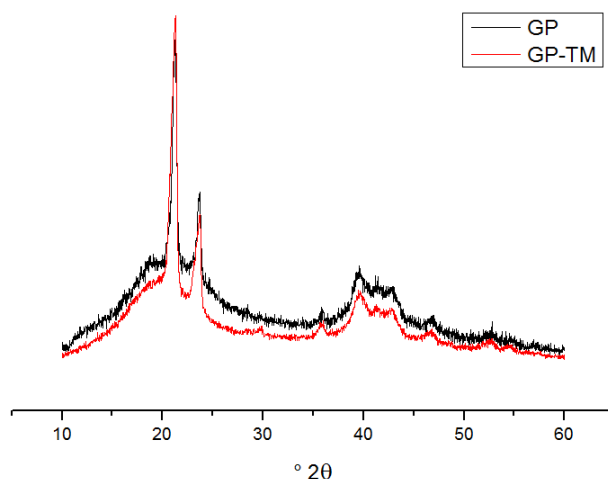


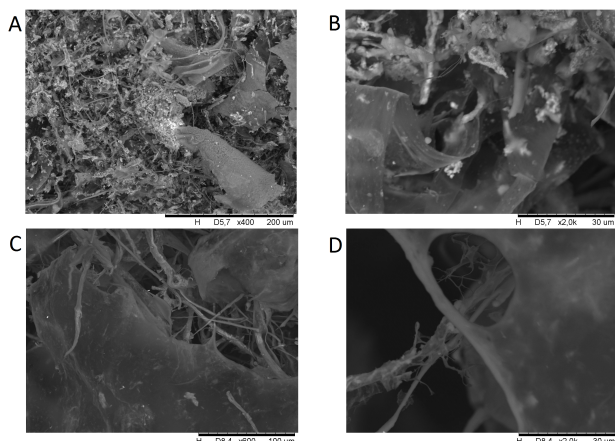
Figura 2 – Difratogramas de raios X das amostras GP e GP-TM.

Na região de  $29^\circ$  a  $2\theta$  pode ser observado no difratograma da amostra GP-TM o surgimento de um pequeno pico. Tal pico, possivelmente está associado à formação de novas ligações químicas (fosforilação) na estrutura da macromolécula. O pico em  $29^\circ$  a  $2\theta$  tem baixa intensidade em função do baixo grau de fosforilação obtido após derivatização da amostra. Possivelmente tal pico seria mais pronunciado em amostra com elevado grau de fosforilação.



### 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias das amostras de lasiodiplodana nativa (GP) e fosforilada (GP-TM) estão demonstradas na Figura 3.



**Figura 3** – Micrografias das amostras de lasiodiplodana nativa (GP) e fosforilada (GP-TM). GP: amplitudes de 400x (A) e 2000x (B); GP-TM: amplitudes 600x (C) e 2000x (D).

A amostra de lasiodiplodana nativa (GP) demonstrou ter uma estrutura superficial bastante heterogênea, apresentando em algumas regiões (Figura 3B) estruturas na forma de filmes finos e contorcidos. Também pode ser observada pequena quantidade de estruturas fibrilares (Figuras 3A e 3C) em ambas as amostras.

A estrutura morfológica com aspecto de filmes pode estar relacionada à forte presença de interações de hidrogênio entre cadeias adjacentes da glucana. Devido à linearidade da estrutura da lasiodiplodana, pode haver tendência de orientação paralela das cadeias, o que facilita interações intramoleculares, que podem ainda, resultar na diminuição da afinidade do polissacarídeo pela água (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; WURZBURG, 1986). A fosforilação da amostra parece ter contribuído para

obtenção de um material com superfície menos heterogênea e menos irregular, sendo observadas regiões com estruturas similares a um filme, contendo microfibras entre estas. O incremento de fibrilas mais regulares na amostra GP-TM pode estar relacionado à diminuição das interações de hidrogênio entre as cadeias do polissacarídeo em função da substituição de hidrogênios de algumas hidroxilas por grupamento fosfato, o que pode ter influência na maior solubilidade desse material (WANG et al., 2005).

### 4. CONCLUSÕES

A fosforilação da lasiodiplodana usando o trimetafosfato de sódio como agente derivatizante possibilitou a obtenção de um derivado com baixo grau de substituição (DS: 0,014). A fosforilação do biopolímero contribuiu para o aumento de sua solubilidade em água, sendo observado uma solubilidade 52,4% superior após derivatização. Ambas as amostras (nativa e fosforilada) apresentaram perfis difratográficos característicos de matrizes amorfas, mas contendo regiões com certa cristalinidade. As análises por MEV revelaram que as amostras nativa e derivatizada possuem estrutura superficial heterogênea, contendo estruturas na forma de filmes finos e presença de microfibrilas. A fosforilação parece ter contribuído para certa modificação na estrutura superficial do polímero, sendo obtido um material com superfície menos heterogênea e menos irregular após derivatização.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

ANUSUYA, Sathiyarayanan; SATHIYABAMA, Muthukrishnan. Preparation of  $\beta$ -D-glucan nanoparticles and its antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 70, p. 440–443, 2014.

CUNHA, M. A. A.; ALBORNOZ, S. L.; SANTOS, V. A. Q.; SÁNCHEZ, W. N.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H. *Studies in natural products chemistry: Structure and biological functions of D-glucans and their applications*. Elsevier, v. 53, cap. 9, p. 309–337, 2017.



- DALMO, Roy A.; BØGWALD, Jarl. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384–396, out. 2008.
- DENG, Chao; FU, Haitian; XU, Jingjing; SHANG, Jingying; CHENG, Yongmei. Physicochemical and biological properties of phosphorylated polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 894–899, 2015.
- DUBOIS, Michel; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- GAO, Fei; LI, Dong; BI, Chong-hao; MAO, Zhi-huai; ADHIKARI, Benu. Preparation and characterization of starch crosslinked with sodium trimetaphosphate and hydrolyzed by enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 310–318, 2014.
- GRAUBAUM, Hans-Joachim; BUSCH, Regina; STIER, Heike; GRUENWALD, Joerg. A double-blind, randomized, placebo-controlled nutritional study using an insoluble yeast beta-glucan to improve the immune defense system. **Food and Nutrition Sciences**, v. 03, n. 06, p. 738–746, 2012.
- KAGIMURA, Francine Y.; DA CUNHA, Mário A. A.; THEIS, Thais V.; MALFATTI, Carlos R. M.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M.; TEIXEIRA, Sirlei D.; SALOMÉ, Kahlil. Carboxymethylation of (1→6)- $\beta$ -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015a.
- KAGIMURA, Francine Y.; CUNHA, Mário A. A.; BARBOSA, Aneli M.; DEKKER, Robert F. H.; MALFATTI, Carlos R. M. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2015b.
- LIMBERGER-BAYER, Valéria M.; FRANCISCO, Alicia; CHAN, Aline; ORO, Tatiana; OGLIARI, Paulo J.; BARRETO, Pedro L. M. Barley  $\beta$ -glucans extraction and partial characterization. **Food Chemistry**, v. 154, p. 84–89, 2014.
- MALI, Suzana; GROSSMANN, Mária Victória Eiras; YAMASHITA, Fábio. Filmes de amido : produção , propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010.
- MELLO, M. B.; MACHADO, S. C.; RIBEIRO, D. L.; AISSA, A. F.; BURIM, R. V.; CUNHA, M. A. A.; BARCELOS, G. R. M.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: cytogenetic and gene expression assays. **Toxicology**, v. 376, p. 66–74, 2017.
- NOVÁK, Miroslav; SYNYTSYA, Andriy; GEDEON, Ondrej; SLEPIČKA, Petr; PROCHÁZKA, Václav; SYNYTSYA, Alla; BLAHOVEC, Jiří; HEJLOVÁ, Anna; ČOPÍKOVÁ, Jana. Yeast  $\beta$ (1-3),(1-6)-D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2496–2504, 2012.
- PASSAUER, Lars; BENDER, Hans; FISCHER, Steffen. Synthesis and characterisation of starch phosphates. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 809–814, 2010.
- SHI, Feng; SHI, Jikui; LI, Yongfu. Mechanochemical phosphorylation and solubilisation of  $\beta$ -D-glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its biological activities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, jul. 2014.
- SONG, Yi; NI, Yuanying; HU, Xiaosong; LI, Quanhong. Effect of phosphorylation on antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady godiva) polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 41–8, 2015.
- SUFLET, Dana M.; NICOLESCU, Alina; POPESCU, Irina; CHITANU, Gabrielle C. Phosphorylated polysaccharides. 3. Synthesis of phosphorylated curdlan and its polyelectrolyte behaviour compared with other phosphorylated polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1176–1181, 2011.
- SYNYTSYA, Andriy; NOVÁK, Miroslav. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 2013.
- THEIS, Tais V.; CALEGARI, Gabrielle C.; SANTOS, Vidiany A. Q.; JUNIOR, Henrique E. Z.; BARBOSA, Aneli M.; DEKKER, Robert F. H.; CUNHA, Mário A. A. Exocellular (1→6)- $\beta$ -D-Glucan (lasiodiplodan): Carboxymethylation, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19–33, 2017.
- VEVERKA, Miroslav; DUBAJ, Tibor; GALLOVIČ, Ján; JORÍK, Vladimír; VEVERKOVÁ, Eva; MIČUŠÍK, Matej; ŠIMON, Peter. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: Synthesis, characterization, and stability. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 309–318, 2014.
- VOLMAN, Julia J.; RAMAKERS, Julian D.; PLAT, Jogchum. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276–284, 2008.
- WANG, Ya-Jun; YAO, Shan-Jing; GUAN, Yi-Xin; WU, Tian-Xing; KENNEDY, J. F. A novel process for preparation of (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 1, p. 93–99, 2005.
- WILLIAMS, David L.; MCNAMEE, Rose B.; JONES, Ernest L.; PRETUS, Henry A.; ENSLEY, Harry E.; BROWDER, I. William; DI LUZIO, Nicholas R. A method for the solubilization of a (1→3)- $\beta$ -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 203–213, out. 1991.



WURZBURG, Otto B. Cross – linking starches. In: WURZBURG, Otto B. **Modified starches: properties and uses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 41–53.

YE, Ming; YUAN, Ru-Yue; HE, Yun-Long; DU, Zhan-Zhan; MA, Xiao-Jing. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Lachnum* YM120. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 690–694, 2013.

ZHANG Min; SU, Nana; HUANG, Qianli; ZHANG, Qiang; WANG, Yufen; LI, Jinglei; YE, Ming. Phosphorylation and antiaging activity of polysaccharide from *Trichosanthes* peel. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2017.





## Preparation and characterization of lasiodiplodan phosphorylated with sodium trimetaphosphate

Natan da Silva Miranda Sechi<sup>6</sup> Gabrielle Cristina Calegari<sup>7</sup> Michel da Silva Fonseca<sup>8</sup>  
Patricia Teixeira Marques<sup>9</sup> Mário Antônio Alves da Cunha<sup>10</sup>

03 julho 2017

Abstract –  $\beta$ -Glucans constitute an important class of bioactive compounds, which have different biological functionalities, including antitumor, antioxidant and immunomodulatory activity. Research has shown that chemical derivatizations in  $\beta$ -glucans may intensify their biological potential, since there is a strong correlation between bioactivity and the chemical structure of the macromolecule. In this context, the present work had the objective of obtaining and characterizing a (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glucan (lasiodiplodan) derivatized by phosphorylation with sodium trimetaphosphate (STMP). The Phosphorylated lasiodiplodan was characterized in terms of solubility, degree of substitution (DS), analysis by infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction. The FT-IR spectra confirmed the phosphorylation, and a typical band of the phosphate group was verified in the derivatized sample. Derivatization promoted increased solubility of the macromolecule, even though a derivative with low DS (0.0144) was obtained. On the other hand, it did not promote changes in the crystallographic pattern of lasiodiplodan, as a diffractogram typical of an amorphous sample was observed; with regions with certain crystallinity in both samples (*in natura* and derivatized). Phosphorylation by the proposed method can be used to improve the solubility of lasiodiplodane and possibly its biological properties, and specific studies are still needed to evaluate the biological functionalities of the derivative.

Keywords:  $\beta$ -Glucan. *Lasiodiplodia theobromae*. Derivatization. Characterization.

### Correspondência:

Natan da Silva Miranda Sechi

Via do conhecimento, Km 1, s/n, Fraron, Pato Branco, Paraná, Brasil.

Recebido: 30/10/2016

Aprovado: 03/07/2017

### Como citar:

(NBR 6023)

Sechi, Natan da Silva Miranda; et al. Obtenção e caracterização de lasiodiplodana fosforilada com trimetáfosfato de sódio. *Syn. scy. UTFPR*, Pato Branco, v. 12, n. 1, p. 132–140. 2017. ISSN 2316-4689 (Eletrônico). Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/synscy>>. Acesso em: DD mmm. AAAA.

DOI: "registro apenas quando a revista for depositada no portal do PERI"



Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença **Creative Commons** Atribuição 4.0 Internacional.

<sup>6</sup> [natanmsechi@gmail.com](mailto:natanmsechi@gmail.com), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>7</sup> [gabrielleccalegari@gmail.com](mailto:gabrielleccalegari@gmail.com), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>8</sup> [mfonseca@alunos.utfpr.edu.br](mailto:mfonseca@alunos.utfpr.edu.br), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>9</sup> [patriciamarques@utfpr.edu.br](mailto:patriciamarques@utfpr.edu.br), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.

<sup>10</sup> [mcunha@utfpr.edu.br](mailto:mcunha@utfpr.edu.br), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil.