

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

SUIANY VITORINO GERVÁSIO

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ALELOPÁTICA E ANTIGENOTÓXICA
DO EXOPOLISSACARÍDEO CARBOXIMETILADO BOTRIOSFERANA**

**VITÓRIA - ES
2019**

SUIANY VITORINO GERVÁSIO

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ALELOPÁTICA E ANTIGENOTÓXICA
DO EXOPOLISSACARÍDEO CARBOXIMETILADO BOTRIOSFERANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Coorientador(a): Prof.^a. Dr.^a Geralda Gillian Silva Sena

VITÓRIA - ES
2019

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ALELOPÁTICA E ANTIGENOTÓXICA DO EXOPOLISSACARÍDEO CARBOXIMETILADO BOTRIOSFERANA

SUIANY VITORINO GERVÁSIO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES
Orientadora e Presidente da Comissão

Dr^o. Hildegardo Seibert França - UFES
Examinador Interno

Dr^a. Juliana Macedo Delarmelina- IFES
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto...” Isaías 41:20

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo suporte em mais essa etapa da minha vida.

À minha família, meus pais Jozias Gervásio e Izaura Gervásio, irmãos e sobrinhos. Vocês sempre me apóiam em tudo, essa conquista é de todos nós, amo vocês.

Aos meus amigos, aqueles que UFES me trouxe, e os de mais longa data, citar nomes seria injusto, cada um de vocês sabem exatamente o bem que me fazem, amo vocês.

A minha co-orientadora Geralda Gillian Silva Sena, por todo empenho e carinho em me ajudar a vencer essa luta.

A minha orientadora Maria do Carmo Pimentel Batitucci, obrigada por todo tempo dedicado, todas as conversas de ânimo, todo conhecimento transferido, pelo exemplo de profissional a seguir, é um prazer ser orientada por uma profissional tão excelente.

Aos colegas de laboratório, obrigada por toda ajuda e amizade! Em especial Mainã, Jean, Anny, Mirieli, Paula, Judá, Alex e Lana que tanto me auxiliaram durante os experimentos.

A professora Aneli de Melo Barbosa Dekker, da Universidade Estadual de Londrina, por ceder o carboximetilado botriosferana e auxiliar no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Genética Animal (LGA) coordenado pela professora Valéria Fagundes, pelo espaço e ajuda com a análise de fluorescência.

À UFES pela oportunidade e espaço cedido.

Ao PPGBV e professores envolvidos na minha formação.

A CAPES e Cnpq pelo apoio financeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Elementos do metabolismo primário e sua relação com o metabolismo secundário dos vegetais.	17
Figura 2 - Tipos de conformação estrutural comuns aos β -glucanos.....	21
Figura 3 – Estrutura química do Botriosferana β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana.	23
Figura 4 – Reação entre um antioxidante e DPPH. O AH é uma molécula doadora (antioxidante), e o A é o composto final, não radicalar.....	30
Figura 5 – Reação de redução do Fe^{3+} presente no complexo com TPTZ à Fe^{2+}	30
Figura 6 – Reação de redução do MTT à formazan, pela enzima tetrazolium-succinato-desidrogenase (redutase mitocondrial).....	33
Figura 7 – Exemplo ilustrativo da origem do micronúcleo a partir de um evento aneugênico (a) ou de um evento clastogênico (b).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de EC ₅₀ representando a atividade antioxidante do botriosferana carboximetilado para os métodos DPPH e Atividade Quelante do Fe ²⁺	49
Tabela 2 – Índice de germinação (IG) e Índice de alelopatia (IA) de <i>Allium cepa</i> tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo. .	51
Tabela 3 – Índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) de <i>Allium cepa</i> tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo (CN).....	52
Tabela 4 – Crescimento radicular médio (CRM) e Índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) de <i>Allium cepa</i> tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e controle negativo.	53
Tabela 5 – Índice de germinação (IG) e índice de alelopatia (IA) de <i>Lactuca sativa</i> tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo.	54
Tabela 6 – Índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) de <i>Lactuca sativa</i> tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo.	54
Tabela 7 – Crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) de <i>Lactuca sativa</i> tratada com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e controle negativo.	55
Tabela 8 – Percentual de células viáveis de linfócitos humanos sob diferentes tipos de tratamentos com o botriosferana carboximetilado, nas condições de 24 e 48 horas de exposição, pré-tratamento por 24 horas e tratamento simultâneo.....	56
Tabela 9 – Percentual de células de sarcoma 180 sob diferentes tempos de exposição ao botriosferana carboximetilado.	57
Tabela 10 – Índice de seletividade do botriosferana carboximetilado em relação às células de sarcoma 180.	58
Tabela 11 – Frequência de micronúcleos em 1000 eritrócitos normocromáticos (NCE) de camundongos Swiss jovens, tratados com botrisoferana carboximetilado por 30 dias, em três tempos de coleta.	59
Tabela 12 – Frequência de micronúcleos em 1000 eritrócitos policromáticos e razão entre eritrócitos normocromáticos e policromáticos de camundongos jovens, tratados com botriosferana carboximetilado por 30 dias, em protocolo de pré-tratamento.	60
Tabela 13 – Percentual de redução dos danos causados pelo agente mutagênico ciclofosfamida nos grupos de camundongos tratados com botriosferana carboximetilado. ...	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS – 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ABTS^{•+} – ABTS radicalar
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP – Adenosina trifosfato
CRM – Crescimento radicular médio
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazil
DPPH-H – Difenil-picril-hidrazina
EC₅₀ – Concentração efetiva para eliminação de 50% de substrato
EPS – Exopolissacarídeo
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FRAP – Potencial Antioxidante Redutor do Ferro
GSH – Superóxido-dismutase
GSH-Px – Glutathione-peroxidase
GSH-Rd – Glutathione-redutase
IA – Índice de alelopatia
IAS – Sociedade Internacional de Alelopatia (do inglês, International Society of Allelopathy)
IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% do substrato
IG – Índice de germinação
IVCR – Índice de velocidade de crescimento radicular
IVG – Índice de velocidade de germinação
MMS – Metanossulfonato de metila (do inglês, methyl methanesulfonate)
MNCE – Eritrócito normocromático micronucleado (do inglês, micronucleated normochromatic erythrocytes)
MNPCE – Eritrócito policromático micronucleado (do inglês, micronucleated polychromatic erythrocytes)
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCE – Eritrócito normocromático (do inglês, normochromatic erythrocytes)
PCE – Eritrócito policromático (do inglês, polychromatic erythrocytes)
SOD – Superóxido-dismutase
TMG – Tempo médio de germinação
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina
VMG – Velocidade média de germinação

RESUMO

Os metabólitos secundários constituem parte importante das plantas, apresentam função de proteção, auxiliam nas respostas ambientais e adaptação das plantas ao ambiente. A composição química é o que favorece às atividades desempenhadas pelos metabólitos secundários e possibilita suas mais diversas aplicações. Em busca de novas fontes de metabólitos secundários, as algas e fungos se apresentaram como grupos de destaque, sendo utilizados pela facilidade de produção desses metabólitos sem requerer grandes espaços e investimentos. Dentre os fungos, o gênero *Botryosphaeria*, conhecido por causar doenças em plantas, abriga a espécie *Botryosphaeria rhodina*, causadora de cancro em eucalipto, promotora de apodrecimento de frutos e conhecida pela produção do botriosferana, um polissacarídeo produzido no meio extracelular, do tipo β -glucana com ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6) e de baixa solubilidade. O botriosferana apresenta atividade antioxidante, hipocolesterolêmica, antimutagênica, antifúngica e antiviral, visando potencializar essas atividades essa molécula sofreu uma alteração estrutural, carboximetilação, onde o número de ramificações é aumentado e, conseqüentemente, também a sua solubilidade. Para verificar se o aumento da solubilidade alterou sua atividade, foram realizadas análises das atividades antioxidantes pelos métodos do DDPH, ABTS, FRAP e quelante do ferro²⁺, atividade alelopática nos sistemas teste *Allium cepa* e *Lactuca sativa*, viabilidade celular de linfócitos humanos e sarcoma 180 pelo método do MTT, e avaliação mutagênica e antimutagênica em camundongos. O botriosferana carboximetilado apresentou atividade antioxidante somente em dois métodos, DPPH e quelante do ferro²⁺, não apresentou atividade alelopática, aumentou a viabilidade celular de linfócitos, principalmente sob 48h de exposição, e se mostrou seletivo para diminuir a viabilidade celular de sarcoma 180 sob 48h de exposição. Não apresentou atividade mutagênica, mas foi antimutagênico, diminuindo consideravelmente os valores de micronúcleos, em comparação ao controle positivo. Os resultados obtidos indicam que a alteração estrutural manteve as atividades anteriormente descritas e que foram reavaliadas, ao comparar a redução de danos causados pela ciclofosfamida, há um indicativo de que a alteração estrutural potencializou essa atividade do botriosferana carboximetilado. Ao considerar todas as atividades por ele desempenhadas, é possível observar o potencial de aplicação como um coadjuvante

para o tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, como hipercolesterolemia, e também para o tratamento de câncer.

Palavras-chave: Produtos naturais • metabolismo secundário • β -glucana • mutagênese

ABSTRACT

Secondary metabolites constitute an important part of the plants. Present protection function, assist in environmental responses and adaptation of plants to the environment. Its chemical composition is what favors the activities performed by secondary metabolites and enables its most diverse applications, whether for the treatment of diseases with the direct use of plants or production for industry. In search of new sources of secondary metabolites, the algae and fungi presented themselves as prominent groups, being used because of how easy is the production of these metabolites; without requiring large spaces and investments. Among the fungi, the genus *Botryosphaeria*, known to cause diseases in plants, houses the species *Botryosphaeria rhodina*, which causes eucalyptus cancer, a promoter of fruit rot and is known for the production of botriosferana, a polysaccharide produced extracellularly, of type β -glucana with type β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6) links and of low solubility. Botriosferana presents antioxidant activity as well as hypocholesterolemic, antimutagenic, antifungal and antiviral activity. Aiming to potentialize these activities this molecule has undergone a structural alteration, carboxymethylation, where the number of branches is increased and therefore also its solubility. To verify that the increase in solubility has altered its activity, analyses of the antioxidants were performed by methods of DDPH, Abts, Frap and Iron chelating²⁺ as well as the allelopathic activity in the test systems *Allium Strain* and *Lactuca sativa*, the cellular viability of human lymphocytes and sarcoma 180 by the MTT method and the evaluation of mutagenic activity and antimutagenic in mice. The carboxymethylated botriosferana presented antioxidant activity only in two methods, DPPH and iron chelating, not presenting any allelopathic activity. Increased cell viability of lymphocytes, mainly under 48h of exposure, and was selective to decrease the cell viability of 180 sarcoma under 48h of exposure. It did not present mutagenic activity, but was antimutagenic, considerably decreasing the micronuclei values compared to positive control. The results obtained indicate that the structural alteration maintained the activities previously described and which were reassessed by comparing the reduction of damage caused by cyclophosphamide, there is an indication that the structural change potentiated this activity of the carboxymethylated botriosferana. When considering all the activities performed by botriosferana, it is possible to observe its potential application as an adjuvant for the treatment of chronic non-

communicable diseases, such as hypercholesterolemia, and also for the treatment of cancer.

Keywords: Natural Products • Secondary metabolism • β -glucana • mutagênese

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Metabólitos secundários.....	16
2.2 Metabólitos secundários como produtos naturais bioativos	17
2.3 Exopolissacarídeos - Beta-glucanas.....	19
2.3.1 Botriosferana	23
2.4 Atividades biológicas.....	25
2.4.1Atividade antioxidante	25
2.4.2Atividade alelopática	31
2.4.3 Viabilidade celular	32
2.4.5 Mutagênese, citotoxicidade e antimutagenicidade	34
3. OBJETIVO GERAL	38
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Obtenção do Botriosferana Carboximetilado (CM-BOT)	39
5.2 Atividade antioxidante	S40
5.2.1 ABTS	40
5.2.2 DPPH.....	41
5.2.3 FRAP	41
5.2.4 Quelante de Ferro.....	42
5.3 Alelopatia	43
5.4 Avaliação da Viabilidade celular	44
5.4.1 Viabilidade celular em linfócitos humanos.....	44
5.5 Atividades mutagênica, antimutagênica e citotóxica “in vivo”	46
5.6 Análise estatística	48
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Atividade antioxidante	49
6.2 Alelopatia	51
6.2 Viabilidade celular	55
6.4 Atividades mutagênica, antimutagênica e citotóxica in vivo	59
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
9. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo secundário é responsável pela produção de compostos que mesmo não sendo considerados essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos organismos, desempenham papéis importantes na atividade hormonal, função estrutural, de defesa contra patógenos, herbivoria e de sinalização. Dessa forma, suas atividades biológicas aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie e estão diretamente relacionados ao comportamento ecofisiológico dos vegetais considerados intermediários para respostas ambientais (COSTALONGA, 2017; SIMÕES et al., 2000; FUMAGALI et al., 2008).

A atividade dos metabólitos secundários é a eles conferida por características moleculares, como a sua conformação estrutural geral, o tamanho da molécula, suas condições de isomeria e a variação de seus grupos ativos. Estes fatores podem ser influenciados pela interação dos organismos com plantas, patógenos, insetos e pela presença de estresse ambiental. As alterações causadas por estas interações podem culminar em modificações nas propriedades das moléculas como reatividade, solubilidade, polaridade, bem como em suas ramificações. É importante destacar que essas alterações moleculares podem ser realizadas em laboratório após o isolamento do composto. Tais modificações têm o poder de potencializar ou minimizar a bioatividade dos metabólitos, influenciando diretamente na sua aplicabilidade em indústrias de produtos agrícolas, cosméticos e medicamentos (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; MACHADO et al., 2010; VIEGAS et al., 2006).

Assim como os vegetais, os fungos são uma importante fonte de metabólitos secundários, os quais apresentam grande similaridade àqueles produzidos pelas plantas. Dentre as ações biológicas desempenhadas por moléculas extraídas de fungos, podem-se destacar as seguintes: atividade antifúngica, antimicrobiana, antimutagênica e formação de géis em solução (ABREU, ROVIDA e PAMPHILE, 2015; SILVA-SENA et al., 2018)

Alguns gêneros de fungos são amplamente conhecidos por causarem doenças em plantas de importância comercial, como o *Botryosphaeria*, além de ocasionarem prejuízos como a decomposição de frutos pré-colhidos. Dentro desse gênero, foi descrita a espécie *Botryosphaeria rhodina*, causadora de cancro em eucalipto, mas que produz um exopolissacarídeo do tipo β -glucana com ligação nos carbonos

(1→3; 1→6), denominado botriosferana, como um dos compostos do seu metabolismo secundário (BARBOSA et al., 2003; BONGIOVANI, 2009).

As β -glucanas são polissacarídeos sintetizados no meio extracelular de fungos e de algumas plantas e auxiliam na rigidez e integridade da parede celular, tendo sido relacionados com a patogenicidade dos fungos e com a interação planta-microrganismo (BAUERMEISTER et al., 2010).

Pillai et al. (2014) destacam que modificações estruturais têm sido promovidas para melhorar a atividade antitumoral e suas outras características de interesse para aplicação, principalmente a solubilidade dessas moléculas. Esse interesse na potencialização da atividade tem aumentado, pois, os glucanos e proteoglucanos são vistos como os mais promissores na área de imunociência. O presente estudo avaliou o botriosferana submetido à derivatização por carboximetilação, processo que conferiu maior solubilidade à molécula.

Estudos sobre a relação entre botriosferana e vegetais são escassos e, normalmente, descrevem sobre sua patogenicidade. Frente às atividades biológicas previamente conhecidas para as β -glucanas como: atividade antioxidante, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, antimutagênica, anticitotóxica e cicatrizante, é plausível indagar a respeito de sua possível atividade alelopática (CHORVATOCICOVÁ; MACHOVÁ; SANDULA, 1996; SILVA-SENA et al., 2018; GIESE et al., 2015).

A identificação de compostos secundários com atividade alelopática é importante e tem sido cada vez mais utilizada visando à produção de herbicidas com as vantagens ecológicas de ser um produto natural. Mas, ao realizar as análises alelopáticas apenas nos eventos germinativos, algumas informações valiosas podem não ser registradas. Assim, torna-se crucial a observação de danos citotóxicos e genotóxicos, pois para existir alterações na germinação das sementes, provavelmente já foram afetados os aspectos moleculares e celulares. Por esse motivo, é interessante avaliar a citotoxicidade, capacidade antioxidante e a viabilidade celular relacionadas ao uso de compostos potencialmente alelopáticos (COSTALONGA, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Metabólitos secundários*

Simões et al. (2017) trata metabolismo primário e secundário, respectivamente como basal e especial. O autor define metabolismo basal como [...] “destinado principalmente à manutenção da vida e à reprodução.” [...] e exemplifica o metabolismo basal de plantas, animais e seres humanos da seguinte forma: código genético universal, armazenamento e transferência de energia pelos grupamentos fosfato, principalmente moléculas de ATP. Monteiro e Brandelli (2017) atribuem mais algumas características a esse grupo, como: produção de macromoléculas (carboidratos, proteínas, lipídeos) com distribuição universal.

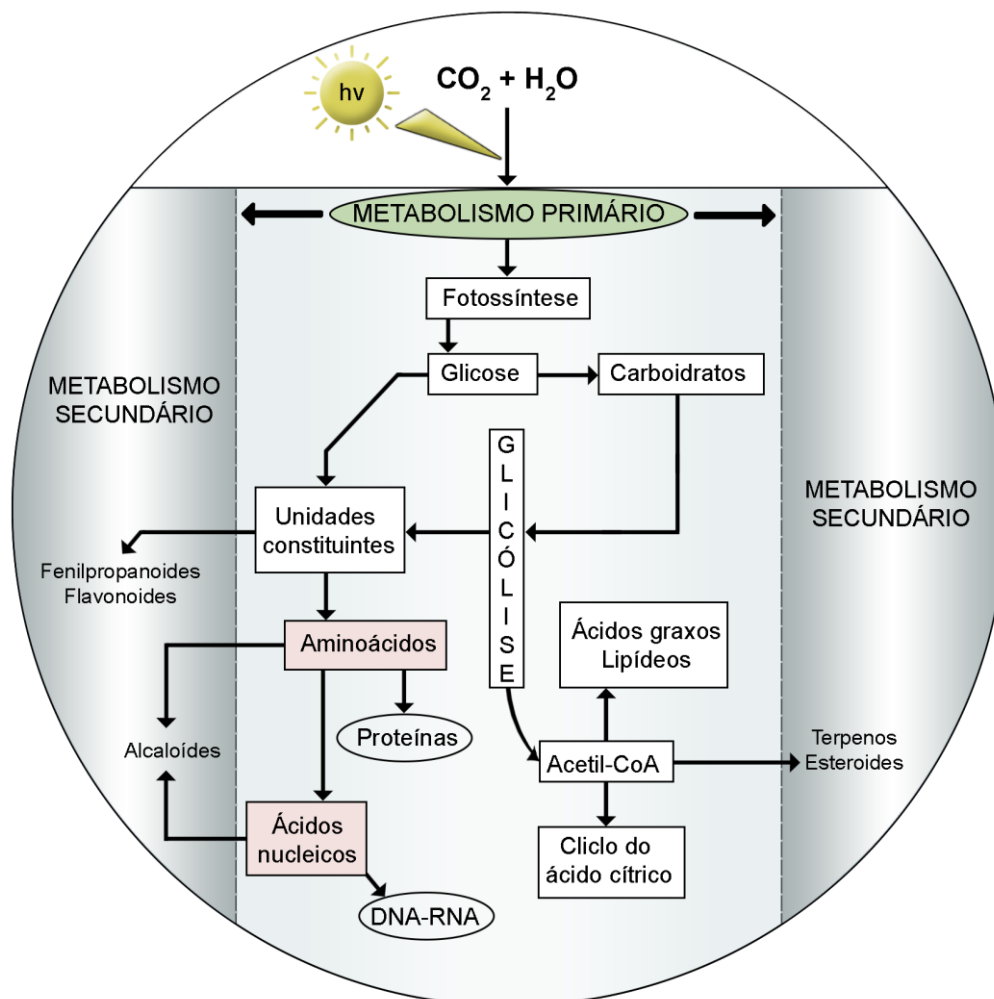
O metabolismo especial ou secundário é caracterizado por Simões et al., (2017) como as [...] “diferenças que podem ser constatadas pelas distintas vias metabólicas dos organismos, o que lhes confere alta variabilidade.” [...] alguns pontos são importantes para definir um produto como do metabolismo secundário, dentre eles o autor destaca: baixo peso molecular, distribuição restrita, grande variabilidade e complexidade química estrutural, síntese em momentos fisiológicos/ fases do desenvolvimento específicas, armazenamento em estruturas específicas.

O metabolismo secundário desempenha um papel de grande importância para os organismos, por auxiliar em aspectos de adaptação e resposta ao ambiente, proteção contra patógenos e herbívoros e na evolução, por estar diretamente relacionado à interação planta-ambiente. “A presença e a quantidade desses compostos são influenciadas pela carga e expressão genética, pelos processos bioquímicos e fisiológicos da planta, além de também sofrerem influência das variáveis ambientais” (GOUVEA, 2010). Entre as variáveis ambientais podem ser citadas: altitude, sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento do organismo, temperatura, disponibilidade hídrica, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, macro e micronutrientes disponíveis, infecção por patógenos e estímulos mecânicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os componentes do metabolismo secundário são derivados de rotas biossintéticas do metabolismo basal destacando-se a glicólise, ciclo de Krebs e ciclo das pentose-fosfato (ciclo de Calvin), que são fontes de ácidos carboxílicos (acetato,

piruvato, 2-oxoglutarato) e vários açúcares (trioses, tetroses) como é demonstrado na Figura 1 (SIMÕES et al., 2017).

Figura 1 – Elementos do metabolismo primário e sua relação com o metabolismo secundário dos vegetais.



Fonte: Adaptado de (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

No metabolismo secundário são reconhecidos três grupos principais de metabólitos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Como base para a síntese desses compostos, há dois intermediários do metabolismo da glicose, o ácido chiquímico e o acetato.

2.2 Metabólitos secundários como produtos naturais bioativos

Substância bioativa é definida por Monteiro e Brandelli (2017) como: “composto que tem atividade biológica, com a capacidade e habilidade de interagir com células ou tecidos vivos, resultando em uma ampla gama de possíveis efeitos, sejam eles favoráveis ou não.”

“Os metabólitos secundários por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente, apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica, quanto nas áreas alimentar, agrônoma e da perfumaria, entre outras. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva principalmente do grande número de substância farmacologicamente importantes.” (SIMÕES et al., 2000).

Compostos oriundos do metabolismo secundário podem ser considerados substâncias bioativas dependendo da rota na qual estão envolvidos e da atividade que exercem, sendo suas fontes as mais variadas possíveis. Uma fonte que recebe destaque são os alimentos, que passam a ser chamados de alimentos ou ingredientes com propriedades funcionais, por trazerem benefícios específicos à saúde ao serem inseridos na dieta, entre eles a prevenção ou tratamento de doenças crônicas não transmissíveis como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, respiratórias e reumatológicas. Tais benefícios são atribuídos às suas substâncias biologicamente ativas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os alimentos não são a única fonte de substâncias bioativas, havendo outras importantes fontes, como por exemplo, as plantas, fungos e os organismos de origem marinha com aplicações na agricultura, indústria de fármacos e cosméticos. Tais atividades são muito variadas, envolvendo desde a conservação dos produtos a serem vendidos, até a composição total desses produtos, como no caso dos fitoterápicos. A bioatividade exibida por esses produtos se deve à composição, estrutura e diversidade química dos metabólitos secundários por eles produzidos.

“A diversidade química proporcionada pelos produtos naturais é ainda a melhor estratégia para alcançar medicamentos de sucesso, seguros e eficazes, em relação à diversidade das coleções de compostos sintéticos. Em consequência dessa nítida vantagem, observou-se um interesse crescente em aproveitar a diversidade química natural para a descoberta de novos fármacos.” (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, pg. 75)

Além dos fármacos que são utilizados para o benefício humano, as moléculas bioativas são aplicadas para outros fins. Um exemplo interessante é a dos aleloquímicos, definidos como biomoléculas do metabolismo secundário que mediam a influência benéfica ou maléfica de uma planta ou microrganismo sobre outro. Os estudos alelopáticos têm se mostrado de grande importância para a descoberta de novas fontes de produtos agrônômicos para o combate de pragas, doenças e herbicidas (SILVA, 2012).

O grupo das plantas foi o primeiro a ser identificado como produtor de substâncias oriundas do metabolismo secundário, principalmente os fitoterápicos. Mas, desde 1994, essa tendência tem se modificado, sendo que dos vinte medicamentos mais vendidos, representando um mercado de 6,7 bilhões de dólares, seis foram obtidos de metabólitos provenientes de fungos (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Para que um metabólito secundário seja indicado como um bioativo com aplicações interessantes algumas características são importantes, dentre elas Boeck, 2005 destaca a importância de seletividade, mecanismo de ação bem definido, disponibilidade em quantidades suficientes para testes e posterior aplicação, constância de estrutura e atividade ao ser submetida à mesma forma de produção e obtenção. No caso de aplicação para fármacos, ainda há necessidade de se possibilitar a síntese e a produção de análogos.

Normalmente, os “produtos de origem vegetal apresentam estruturas moleculares tão complexas, que seriam praticamente impossíveis de serem obtidos por um processo sintético a um custo coerente” (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). Por isso, as indústrias têm buscado por fontes que produzam ou bioprospecitem substâncias com as mesmas atividades desempenhadas pelas plantas, mas que apresentem maior rendimento, mais fáceis de serem obtidas e com estruturas menos complexas. Nesse sentido, uma alternativa interessante são os polissacarídeos produzidos por fungos, entre os mais conhecidos por apresentarem bioatividade está o isolado de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3 Exopolissacarídeos - Beta-glucanas

Polissacarídeos compõem uma das classes de carboidratos, que apresentam uma cadeia longa, linear ou ramificada, formada por unidades de monossacarídeos. A principal função dos polissacarídeos é “como fonte de reserva energética e de carbono para os processos metabólicos, mas muitos também participam da formação de estruturas celulares ou facilitam o contato entre organismos” (VASCONCELOS, 2009).

A classificação dos polissacarídeos é variável de acordo com sua estrutura e com o local no qual são produzidos e/ou secretados. Um dos tipos de polissacarídeos em evidência, no momento, são os exopolissacarídeos (EPS),

produzidos por microorganismos no meio extracelular e apresentam efeitos emulsificantes e geleificantes, mesmo em baixa concentração (VASCONCELOS, 2009).

O grupo dos EPS podem ser aplicados de diversas formas na indústria por serem de fácil obtenção, custo relativamente baixo, não apresentarem toxicidade, controlarem a estabilidade e textura de alguns produtos, tolerarem alterações químicas e bioquímicas, apresentarem capacidade para atuar como bio-floculantes, bio-adsorventes, removerem metais pesados, auxiliarem a liberação controlada de drogas, atuarem como espessantes e gelificantes, e ainda poderem ser isolados de fontes variáveis, renováveis. Por essas razões, eles têm sido cada vez mais indicados como substitutos promissores para os polímeros convencionais, normalmente extraídos de plantas e algas (FONSECA et al., 2011; THEIS et al., 2017).

No grande grupo dos EPS, as glucanas recebem destaque por serem polímeros de glucose com ampla distribuição na natureza. Sua classificação é dada de acordo com a ligação glicosídica da cadeia principal, podendo ser α ou β . No caso dos fungos, a maioria dos EPS produzidos é do tipo β -glucanas, com uma importante função estrutural para esses organismos. Devido às suas propriedades de conformação e interação, e por seu alto peso molecular, as glucanas apresentam alta viscosidade em soluções aquosas (FONSECA et al., 2011).

β -Glucanas são fibras solúveis e podem ser encontradas na parede celular de fungos, de plantas, como aveia e cevada, de líquens, bactérias, leveduras e algas. Elas apresentam diversas funções fisiológicas, e estão inseridas num grupo de moléculas fisiologicamente ativas consideradas como modificadoras de respostas biológicas, em inglês BRM, conhecidas por sua capacidade de trazer benefícios à saúde humana (GIESE et al., 2015; THEIS et al., 2017).

As atividades biológicas identificadas para as β -glucanas indicam seu uso como medicamentos, para prevenir e tratar doenças como o câncer, a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), dislipidemias e diabetes. Elas interferem na absorção de açúcares e nos níveis séricos de lipídeos, têm a capacidade de modular o funcionamento do sistema imunológico, apresentam atividade antimicrobiana, previnem infecções, são quimioprotetores, auxiliam na cicatrização de feridas, melhoram a motilidade intestinal, apresentam efeitos laxativos e protetivos frente à

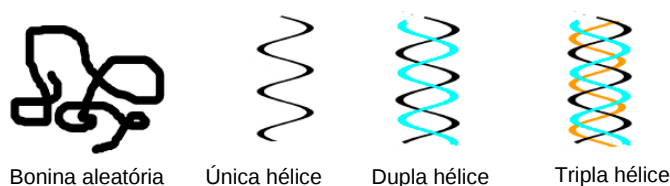
exposição à radiação e a infecções pós cirúrgicas (RAHAR et al., 2011; THEIS et al., 2017).

Algumas características moleculares diferem entre as β -glucanas produzidas por fungos e plantas, sendo uma delas o tipo de ligação. Aquelas produzidas por aveia e cevada apresentam ligações do tipo β - 1 $\rightarrow$ 3 e 1 $\rightarrow$ 4, assim como as produzidas por fungos, que apresentam ligação do tipo β - 1 $\rightarrow$ 3 e ocasionalmente 1,6. Supostamente, aqueles glucanos com ligações do tipo β - 1 $\rightarrow$ 3 e 1 $\rightarrow$ 6 têm maior atividade biológica do que os de ligações β - 1 $\rightarrow$ 3 e 1 $\rightarrow$ 4 (RAHAR et al., 2011).

Apesar dos diferentes tipos de ligação e ramificação, os β -glucanos mesmo sendo obtidos de diferentes fontes apresentam uma estrutura básica muito semelhante, que consiste em uma cadeia principal longa e linear de D-glicose com ramificações laterais com ligações β -1 $\rightarrow$ 3 e β -1 $\rightarrow$ 6 em vários intervalos. Ali e Elvevold, 2009 destacam que “A presença de ramos laterais na camada intermediária da parede celular dá forma e rigidez à célula”, sendo essa sua principal importância para os organismos que os produzem. O grau de polimerização, em inglês DP, representa a quantidade de ramificações presentes nessas moléculas, e isso está diretamente ligado à solubilidade dos β -glucanos, sendo que quando um β -glucano apresenta DP de 100, ele é completamente insolúvel em água (ALI; ELVEVOLD, 2009; GIESE et al., 2008).

Mesmo com uma cadeia principal muito semelhante, os β -glucanos, ainda assim, apresentam diferentes atividades biológicas, sendo o fator conformação estrutural crucial para tais atividades. Três tipos de conformação são comuns para glucanos extraídos de fungos (Figura 2): única hélice, tripla hélice e bobina aleatória. Sendo que a tripla hélice conhecida por influenciar fortemente as atividades biológicas (WANG et al., 2017; GIESE et al., 2008).

Figura 2- Tipos de conformação estrutural comuns aos β -glucanos



Fonte: WANG et al. (2017).

“Sabe-se que as atividades biológicas exercidas pelos EPS estão intimamente relacionadas com as características estrutural do composto

como: arranjo espacial da molécula, massa molecular, tipo de ligação glicosídica e monossacarídeos constituintes de estrutura. Todas essas características estruturais são coordenadas principalmente pela espécie de microrganismo utilizado, assim como pelo seu tipo genético e condições de cultivo, tais como fontes de carbono e nitrogênio, aeração, pH e adição de micronutrientes ao meio” (MIRANDA, 2006).

Visando potencializar a bioatividade de compostos já produzidos naturalmente, muitos estudos foram desenvolvidos acerca de alterações estruturais e hoje se sabe que métodos físicos, químicos e biológicos podem ser aplicados para modificar as conformações de polissacarídeos para se alcançar a atividade desejada (WANG et al., 2017).

Entre os métodos físicos podem ser utilizados: ultrassom, radiação nas frequências dos raios-x, microondas e raios gama, além de temperatura; já para os métodos químicos, estuda-se a carboximetilação, sulfatação, fosforilação, alquilação, selenização e como método biológico aplica-se nos ensaios β -glucanases, enzimas que podem modificar as estruturas das β -glucanas, por catalisarem sua digestão (LI et al., 2016; WANG et al., 2017).

“A modificação pode afetar significativamente a estrutura primária e a conformação espacial do β -glucano, e diferentes métodos de modificação mostram efeitos dissimilares nas estruturas de glucana. Por exemplo, modificação física afeta a conformação do polissacarídeo modificado através da mudança de estrutura espacial em vez da estrutura primária; modificação química pode introduzir grupos na cadeia principal ou cadeia lateral, o que leva a mudanças tanto na estrutura primária quanto na espacial estrutura. Portanto, é muito importante estudar os efeitos dos métodos de modificação na estrutura glucana, e para determinar os métodos de modificação ideal para alcançar β -glucanas com bioatividades mais altas” (WANG et al., 2017, tradução nossa).

A transformação conformacional das moléculas em solução afeta a bioatividade e a maioria das aplicações das β -glucanas são verificadas quando essas estão em solução, muito ou pouco viscosas dependendo da concentração (WANG et al., 2017).

Inúmeras são as vantagens dessas alterações, sendo um exemplo já elucidado a sulfatação de β -glucanas que possibilita maior flexibilidade da cadeia principal, facilitando sua ligação com receptores celulares, outro seria a carboximetilação, que aumenta a solubilidade das moléculas e consequentemente aumenta a área de

Quando em solução, a conformação estrutural do botriosferana é de tripla hélice, que é a forma mais comum para β -glucanas. Para apresentar essa estrutura, é necessária a agregação de três cadeias de botriosferana por ligações de hidrogênio nos oxigênios do carbono 2 de cada molécula (FUKUDA, 2007). Vasconcelos et al., 2008) destaca a importância de conformações helicoidais em solução aquosa para supostas atividades e modificação de respostas biológicas.

Para a obtenção do botriosferana, é necessário um método de extração eficiente que evite sua degradação e uma estratégia de purificação que permita extrair somente o polissacarídeo de interesse, seguido de sua purificação. A purificação da amostra é considerada finalizada quando são encontrados os mesmos resultados, utilizando pelo menos dois métodos diferentes de análise da purificação (FUKUDA, 2007).

O rendimento final de extração é um aspecto importante ao se pensar na produção em grande escala e também para a aplicação de moléculas isoladas. Apesar dos custos com extração e purificação serem relativamente altos, sabe-se que a parede celular compreende cerca de 20-30% do peso seco da célula fúngica, e que em algumas espécies de fungos os polissacarídeos representam de 60-90% do peso seco da parede celular, o que repercute um rendimento final promissor quanto aos polissacarídeos extraídos da parede celular de fungos. Além disso, o espaço necessário para produção dos fungos é pequeno (FUKUDA, 2007).

Diversas atividades biológicas já foram descritas para o botriosferana. Além de ser emulsificante e geleificante, características natas de substâncias desse grupo, o botriosferana já apresentou atividade hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, antimutagênica, antioxidante, anticitotóxica e antiproliferativa (GIESE et al., 2015; MALINI et al., 2015; QUEIROZ et al., 2015; SILVA-SENA et al., 2018). Até o momento, não são descritas atividades do botriosferana em organismos vegetais.

“Os polissacarídeos naturais têm mostrado menos efeitos colaterais, mas devido às suas propriedades inerentemente físico-químicas, suas bioatividades eram difíceis de comparar com as de drogas sintéticas. Portanto, pesquisadores modificaram as estruturas e propriedades dos polissacarídeos naturais com base nas relações estrutura-atividade e obtiveram melhores polissacarídeos funcionalmente melhorados” (Li et al., 2016, tradução nossa).

Uma alteração de natureza química que [...] “pode mudar as estruturas dos polissacarídeos através da introdução de grupos substituintes, e assim fortalecer suas bioatividades originais também como gerar novas bioatividades funcionais” (LI et al., 2016).

A bioatividade é diretamente relacionada com a solubilidade das moléculas e o botriosferana apresenta uma baixa solubilidade (BARBOSA et al., 2003), e ainda assim já apresentou várias atividades biológicas, como descrito acima. Visando o aumento da solubilidade e consequente melhora na atividade, o botriosferana pode ser carboximetilado.

“Em geral, o β -glucano carboximetilado tem maior solubilidade em água, e maior atividade antitumoral in vivo e in vitro do que a original β -glucano. [...] É possível que as cadeias flexíveis expandidas destes novos β -glucanos carboximetilados sejam responsáveis por suas atividades antitumorais in vivo e in vitro” (WANG, et al., 2017, tradução nossa)

Novos testes são necessários para avaliar de que forma o botriosferana carboximetilado vai se comportar em relação à sua bioatividade e dos demais β -glucanos que sofreram ou não essa derivatização. Entre os testes iniciais para essa avaliação, são indicados os antioxidantes, anticitotóxicos e antimutagênicos.

Além disso, um teste ainda não realizado com o botriosferana não carboximetilado, mas que pode trazer informações acerca da sua atuação em organismos vegetais, é o teste alelopático.

2.4 Atividades biológicas

2.4.1 Atividade antioxidante

a) Estresse oxidativo

Os antioxidantes juntamente com as reações pró-oxidantes e oxidantes dos sistemas biológicos precisam estar em equilíbrio. Quando há alguma perturbação no balanço desses três fatores temos o estresse oxidativo, que é condicionado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou nitrogênio (ERNs) e a supressão de antioxidantes (VASCONCELOS, et al., 2007).

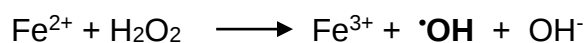
A condição de estresse oxidativo traz consequências ruins para o funcionamento dos sistemas biológicos. Nos humanos está ligado a várias doenças crônicas não-

transmissíveis, e nas plantas é responsável por grandes distúrbios fotossintéticos, apodrecimento de frutos e outros (DELARMELINA, 2017; CANTRELE, 2005).

Os processos fisiológicos e metabólicos das células vivas, seja animal ou vegetal que possuem respiração aeróbica, produzem radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres chamados de não pareados, em sua órbita externa. Esses são quimicamente instáveis e altamente reativos. Entre os radicais livres mais conhecidos estão as EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), que são os intermediários da redução parcial do oxigênio, e representam 2% dos produtos finais da respiração (gás carbônico e água) (FERREIRA, 2009; CANTRELE, 2005).

Os elétrons não pareados presentes nessas moléculas alteram sua reatividade, assim, são mais reativos que aquelas moléculas não-radicalares. Por essa característica eles são instáveis e altamente reativos. Quando um elétron é transferido para o O_2 é produzido o primeiro intermediário reativo, que é o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que por sua vez sofre uma mutação, se transformando em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em seguida uma das moléculas de O_2 é quebrada, assim formando uma hidroxila ($\bullet OH$). Duas reações são bastante conhecidas por atuarem como catalisadoras na formação de espécies radicalares, são: Reação de Fenton (1), que com metais de transição catalisa a quebra de H_2O_2 em $\bullet OH$, e Reação de Haber-Weiss (2) que utiliza um O_2 e H_2O_2 para formar $\bullet OH$ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SAND, 2005; VASCONCELOS, et al., 2007).

Reação 1: Reação de Fenton



Reação 2: Reação de Haber-Weiss



De todos os intermediários produzidos pela formação de EROS, o radical hidroxila é considerado o mais reativo e prejudicial, pois ele é precursor para formação de outras espécies reativas tóxicas e está envolvido na peroxidação de lipídeos, modificação de bases e quebras na fita de DNA, causa danos à proteínas e pode provocar inativação enzimática (CORRADI DA SILVA et al., 2008; SAND, 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

“O termo espécie reativa é utilizado para descrever não somente radicais livres, mas também outras moléculas não-radicalares que, em condições fisiológicas, podem promover reações de oxidação ou de redução (KEHRER, 1993). As espécies reativas biológicas podem ser classificadas em espécies reativas de oxigênio (EROs), como já foi mencionado, e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), de acordo com as moléculas a partir das quais foram originadas” (SAND, 2005).

Além das EROS, as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) são um grupo importante de moléculas que causam o estresse oxidativo. A principal ERN produzida é o óxido nítrico (NO), e a partir dela é que as outras ERN são formadas. Essas são originadas pela formação do aminoácido citrulina a partir de arginina. Os primeiros estudos com o NO não tinham foco nas suas características oxidantes, ele foi inicialmente identificado por ser um fator relaxante de vasos sanguíneos e auxiliar na regulação da pressão arterial. O NO é um potente iniciador da peroxidação lipídica, mas isso só acontece quando ele entra em contato com O₂ (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; SILVA; GUERRA, 2010).

b) Defesas antioxidantes

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células, sendo neutralizadores de radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparados a um substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz. E podem ser classificados primeiramente como enzimáticos ou não enzimáticos, e de acordo com o mecanismo de ação em: primários (doadores de átomos de hidrogênio), biológicos (enzimas) e/ou quelantes de metais (MORAIS et al., 2013).

Os antioxidantes podem ser produzidos endogenamente ou serem adquiridos pela dieta, por isso, a presença de compostos secundários que apresentam atividade antioxidante, temse mostrado uma boa alternativa de proteção para o corpo humano contra radicais livres, atuando na prevenção e no tratamento de enfermidades (MORAIS et al., 2013).

O aparato de defesa antioxidante pode atuar de duas formas, retirando os potenciais agentes oxidantes ou reparando o dano causado. Para cada frente de atuação estão relacionadas algumas enzimas e moléculas já conhecidas, entre as responsáveis por neutralizar os oxidantes antes da lesão temos como exemplo: glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e a Vitamina E. Quando o dano já foi causado, os reparos da lesão podem ser feitos por compostos como, a glutathiona-redutase (GSH-Rd), a glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e o ácido ascórbico. Muitos outros compostos são conhecidos por desempenharem ação antioxidante, podendo ou não atuar por mais de um mecanismo. Mas a busca pelo conhecimento de novas moléculas com essa atividade é ininterrupta, pois, essa ação é diretamente relacionada a várias outras atividades biológicas, possui inúmeras aplicações para a saúde humana, produção e saúde vegetal (MORAIS et al., 2013; GIESE et al., 2015).

c) Ensaios para avaliação de atividade antioxidante

Como os antioxidantes podem atuar por diferentes mecanismos, a avaliação da atividade antioxidante de uma molécula em estudo, também dever ser feita por diferentes metodologias que abranjam mecanismos de atuação diferentes. Dois mecanismos amplamente estudados são os de seqüestro de radicais livres e da capacidade da redução do ferro. Entre os vários testes utilizados para avaliar se uma molécula tem atividade antioxidante por cada um desses mecanismos, podemos citar: ABTS e DPPH para seqüestro de radicais livres, e FRAP e Quelante do Fe^{2+} para a capacidade de redução do ferro (SIRIVIBULKOVIT; NOUANTHAVONG; SAMEENOI, 2018; SOUZA, 2013).

Metodologias que utilizam microplacas de 96 poços têm sido desenvolvidas com o intuito de diminuir a quantidade de reagentes e de amostras necessárias para realização dos testes, mas mantendo a precisão e rapidez em que as respostas são obtidas e pouco volume de resíduo a ser descartado ao fim do experimento (URREA-VICTORIA; PIRES; TORRES, 2016).

“Radicais livres estão envolvidos na propagação da oxidação lipídica, e muitas outras espécies de radicais de diferentes reatividades são formadas. Radicais relativamente estáveis (DPPH, ABTS, etc.) são frequentemente preferidos em ensaios de atividade sequestrante de radicais. Estes radicais têm sido muito utilizados em estudo de compostos simples, extratos de plantas e alimento” (CANTRELE, 2005).

d) ABTS

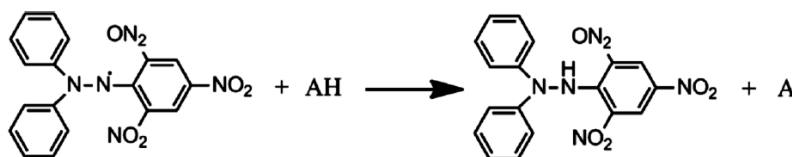
O teste de atividade antioxidante pelo método do ABTS baseia-se na inativação do radical 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-ácidosulfônico (ABTS), que forma $ABTS^{\bullet+}$ quando é capturado, atuando assim pelo mecanismo de seqüestro de radicais livres. O ABTS é um cromóforo químicamente estável, solúvel em água, com um máximo de absorbância a 414nm, medidas secundárias podem ser feitas a: 645, 734 e 815nm. A forma de verificação da atividade é simples, pois há alteração na cor da reação, perdendo a cor de origem (verde escuro) e ficando transparente ao ter todas as moléculas de ABTS transformados em $ABTS^{\bullet+}$ (BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2012).

Este método tem sido amplamente aplicado para análise de compostos simples, extratos de plantas e alimentos. Algumas características do radical e do teste são levadas em consideração para ser tão utilizado, como: a formação de um radical estável ($ABTS^+$), ser capaz de determinar a atividade de moléculas lipofílicas e hidrofílicas em uma mesma amostra, além de ser um teste rápido, preciso e oferecer resultados reprodutíveis (CANTRELE, 2005; SUCUPIRA et al., 2012).

e) DPPH

O método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é capaz de determinar se um composto consegue seqüestrar radicais livres, assim como o ABTS, largamente utilizado por ser considerado um teste rápido, prático e com boa estabilidade. O DPPH apresenta cor violeta, e ao ser neutralizado se transforma em DPPH-H e tem perda de cor, se tornando amarelo, na Figura 3 temos o esquema da reação de redução do DPPH. A faixa de absorbância para análise varia de 515 a 520nm, a mudança da coloração é o que aponta quanto do radical DPPH foi reduzido, sendo assim a maneira de monitorar a atividade de um composto por esse mecanismo (BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 4 – Reação entre um antioxidante e DPPH. O AH representa uma molécula doadora (antioxidante), e o A é o composto final, não radicalar.



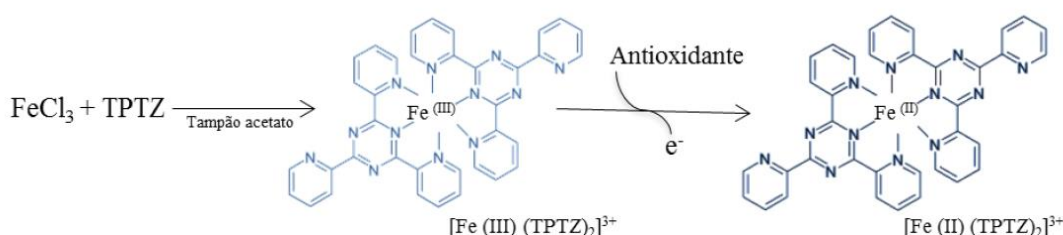
FONTE: (SIRIVIBULKOVIT et al., 2018).

Sucupira et al., (2012) apresentam algumas vantagens do uso do teste do DPPH, como uma análise mais refinada quando os compostos em estudo são mais solúveis em solventes orgânicos, a disponibilidade de comprá-lo já pronto, evitando distintas formas, como pode ocorrer no ABTS.

f) FRAP

Do inglês, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) é um ensaio capaz de determinar o poder de redução do íon ferro. A reação base para o teste é a redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) em íon Fe^{2+} (forma ferrosa). O composto utilizado para o teste é o TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), no qual está presente o íon Fe^{3+} (Figura 4). Quando a redução ocorre há alteração na tonalidade da reação, passando de um roxo claro para roxo mais forte. Essa diferença de tonalidade pode ser detectada por espectrofotômetro, na absorvância de 595nm (URREA-VICTORIA; PIRES; TORRES, 2016).

Figura 5 – Reação de redução do Fe^{3+} presente no complexo com TPTZ à Fe^{2+} .



Fonte: (URREA-VICTORIA; PIRES; TORRES, 2016).

g) Quelante do ferro²⁺

Íons metálicos de transição bivalentes podem ser prejudiciais por catalisar o processo oxidativo, o que leva a formação de radicais hidroxil. Levando em consideração os malefícios tragos por esse processo é importante investigar substâncias que evitem esse processo, isso pode ser avaliado através do

mecanismo de quelação do ferro, onde uma substância ou extrato impediria a reação dos íons metálicos.

O método de análise da atividade de quelação de íons ferro utiliza uma reação contendo o reagente ferrozina e o íon Fe^{2+} , quando não há quelação do Fe^{2+} ele forma um complexo de cor rosa junto com a ferrozina, quanto mais íon Fe^{2+} forem quelados, menos complexos cor de rosa serão formados, e a medida de absorbância no espectrofotômetro será menor. Então, quanto maior for a capacidade da amostra analisada de quelar os íons Fe^{2+} , menor será a intensidade da cor e absorbância da amostra. O comprimento de onda necessário para essa análise é 562 nm (HARB, et al., 2016).

2.4.2 Atividade alelopática

Os aleloquímicos normalmente são pertencentes a classes de metabólitos secundários, tanto de espécies aquáticas como terrestres. Esses metabólitos produzidos pelas plantas e mesmo por microrganismos são uma fonte de importantes oportunidades para potenciais substâncias que auxiliem no controle de plantas daninhas, sem trazer prejuízo às culturas e meio ambiente e auxiliar a produção de plantas para indústria de fitoterápicos (GUSMAN; VIEIRA; VESTENA, 2012).

“Para adquirir mais recursos como luz, água e nutrientes, algumas espécies adotam estratégias defensivas que incluem a produção de biomoléculas ativas. Neste sentido, a alelopatia pode ser definida como a ciência que estuda os processos envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que têm influência sobre o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos incluindo efeitos tanto de inibição quanto de estimulação.” (BARATELLI, 2006).

A Sociedade Internacional de Alelopatia (em inglês, IAS) define alelopatia como: “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzido por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e da agricultura” (REIGOSA et al., 2013).

Os produtos do metabolismo secundário que participam do processo de alelopatia são chamados de agentes aleloquímicos, ou somente aleloquímicos. Esses são considerados essenciais para a adaptação de espécies e organização das comunidades por atuarem nas relações inter e intra-específicas (SANTOS, 2007).

Até 1988, já eram conhecidos cerca de dez mil metabólitos secundários com ação alelopática e por serem oriundos do metabolismo secundário, podem ser produzidos em todas as partes da planta. Sua concentração é variável de acordo com a espécie, fase de desenvolvimento e variações ambientais (REIGOSA et al., 2013; SANTOS, 2007).

A maioria das análises de aleloquímicos documentadas é realizada com extrato bruto, principalmente de folhas, e em sequência com frações específicas utilizando solventes mais polares ou apolares com a intenção de iniciar uma seleção de grupos. Mas, poucos estudos chegaram ao nível de avaliação de substâncias isoladas (REIGOSA et al., 2013).

O estudo de substâncias isoladas é dificultado por fatores como os efeitos sinérgicos e aditivos dos aleloquímicos, o que dificulta a identificação de um único composto isolado como sendo responsável por determinada atividade alelopática. Por esse motivo, muitas vezes, substâncias que já foram isoladas por apresentarem outras atividades, são indicadas para testes alelopáticos, inclusive por facilitarem a compreensão de causa e efeito (BARATELLI, 2006; REIGOSA et al., 2013).

“A atividade dos aleloquímicos tem sido aproveitada na agricultura, como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas. Estas substâncias, oriundas do metabolismo secundário vegetal, representam vantagem na evolução das espécies contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes, inibindo o crescimento de outras plantas ou estimulando o crescimento das suas próprias sementes” (BARATELLI, 2006).

Outro fator importante para sua aplicação, frisado por Baratelli (2006), é a estabilidade do composto ativo. “Em muitos casos, o composto natural é altamente ativo para um alvo molecular, mas suas propriedades físico-químicas e sua curta meia-vida no ambiente o impedem de ser um herbicida eficaz”.

Dentre os grupos de metabólitos reconhecidos por apresentarem atividade alelopática, destacam-se: benzoquinonas, terpenoides, alcaloides, derivados do ácido benzóico e arilpropanoides, ácidos hidroxâmicos, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (BARATELLI, 2006; REIGOSA et al., 2013).

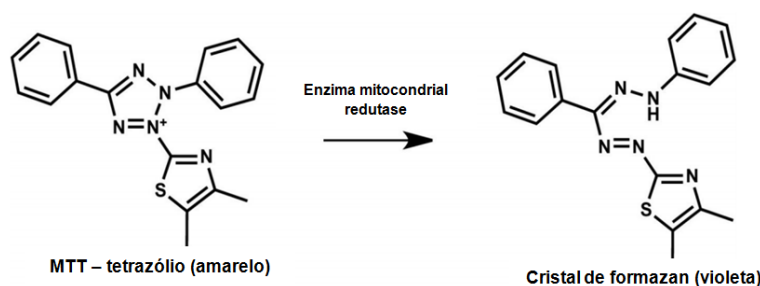
2.4.3 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular é uma forma eficaz e amplamente utilizada para verificar a citotoxicidade de amostras (BEDNARCZUK, et al., 2010). Algumas características desses testes que favorecem seu uso são destacadas por Rogero et

al., (2003), entre elas: acessibilidade de execução por não se tratar de testes caros, rapidez, sensibilidade e sua reprodutibilidade. Além disso, a possibilidade de utilizar diferentes linhagens celulares para essa análise favorece ainda mais sua aceitação como teste de triagem para novas substâncias e avaliação toxicológica preliminar (XAVIER, 2017).

Entre os testes mais utilizados para avaliar a viabilidade celular, está o (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). O princípio desse teste baseia-se na redução do MTT, esse é um sal de coloração amarelada, que é reduzido à formazan, um sal de coloração arroxeada. Essa redução é possibilitada pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase, dessa forma, é possível mensurar a viabilidade celular pela atividade mitocondrial, pois a conversão só ocorre em células viáveis. A intensidade da redução pode ser mensurada através da leitura em espectrofotômetro, essa é uma medida direta da viabilidade celular.

Figura 6 – Reação de redução do MTT à formazan, pela enzima tetrazolium-succinato-desidrogenase (redutase mitocondrial).



Fonte: Adaptado de (BOCHNIE; ARIANE; MACIEL, 2016).

Uma das linhagens celulares mais utilizadas para testes de viabilidade celular são os linfócitos, por serem células de fácil obtenção (punção venosa), isolamento manutenção em cultura, os resultados encontrados são confiáveis e facilmente correlacionados à ensaios toxicológicos (MOURA, 2012; XAVIER, 2017).

A produção dos linfócitos T e B acontece na medula óssea, e então os Linfócitos B ficam na medula até completarem o processo de maturação e em sequência vão para corrente sanguínea. Os linfócitos T vão para o timo, e lá são selecionados e maturados, e só depois são destinados a circulação sanguínea. Os linfócitos têm um papel importante nas respostas imune adaptativas, dentre elas a função de proteger o organismo de invasores, principalmente virais e células neoplásicas, além de

produzir anticorpos contra os antígenos aos quais já estivemos em contato (BALLESTRERI, 2017; JÚNIOR et al., 2010).

Outra linhagem celular importante para análises citotóxicas é a do Sarcoma 180 de camundongos. De acordo com Moura (2012) o sarcoma 180 *“também conhecido como tumor de Croker, foi isolado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo Swiss macho (Mus musculus).”*

Ao utilizar uma linhagem de células tumorais para fazer testes de viabilidade celular e observar o nível de células viáveis, também é possível avaliar a capacidade de substâncias inibirem o crescimento dessas células, no caso, diminuindo a viabilidade das células tumorais, e então pode ser intitulada como uma análise antiproliferativa. Esses resultados podem ser utilizados como preliminares para indicação de compostos promissores para testes antitumorais *in vivo* (BADISA et al., 2006).

2.4.5 Mutagênese, citotoxicidade e antimutagenicidade

Apesar de o DNA ser uma molécula extremamente estável, pode haver alterações. Essas alterações são denominadas mutações, podem ocorrer de maneira natural, serem causadas por erros durante a duplicação do DNA, ou ainda podem ser provocadas por agentes mutagênicos que aceleram ou aumentam o aparecimento das mutações. Quando uma célula acumula muitas mutações, pode perder o controle de sua divisão e assim determinar o aparecimento de câncer (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; KAPPES, 2010).

Estudos que avaliem a capacidade de substâncias causarem mutações são de enorme importância (FENECH, 2000; KAPPES, 2010; BRUNTON; CHABNER; NOLLMANN, 2012). Inclusive, fazem parte de análises exigidas por órgãos reguladores do uso de novas substâncias, como a ANVISA, que em 2013 regulamentou como proceder com os testes de toxicidade e genotoxicidade (ANVISA, 2013). Nesse documento, é destacada a importância de ensaios desse gênero em animais como um primeiro passo para aprovação do uso de novas substâncias.

Esses testes, além de avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias, também auxiliam na busca por substâncias ou alimentos quimioprotetores capazes

de proteger o DNA ou a célula de algum dano (BRUNTON; CHABNER; NOLLMANN, 2012).

Entre os quimioprotetores estão as substâncias antimutagênicas, capazes de reduzir a frequência de mutações, tanto as induzidas como as espontâneas. Os mecanismos de ação das substâncias antimutagênicas podem ser dois: desmutagênese, que é o processo de inativação direta do agente mutagênico ou seus precursores, e bioantimutagênese, que seria a modulação do reparo e replicação do DNA, com sua atuação ao nível celular (SCHNEIDER, 2014).

Quando essas substâncias antimutagênicas são utilizadas para prevenir a formação de tumores e algumas doenças genéticas, seja por meio de medicamentos ou uso de chás e afins, esse processo recebe o nome de quimioprevenção (SCHNEIDER, 2014).

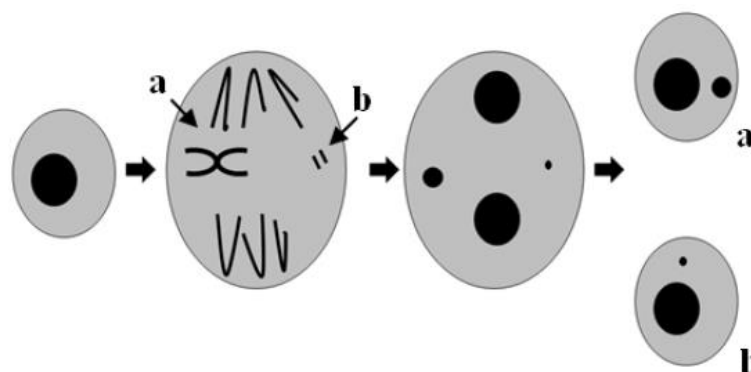
Para avaliar a quimioproteção de uma substância, ela é testada frente à outra que conhecidamente provoca danos ao DNA. Então, é observado se o índice de danos do DNA foi diminuído pela substância em estudo. Caso isso tenha acontecido a substância em questão passa a ser considerada uma substância quimioprotetora ou antimutagênica. Vários testes podem ser utilizados para esse tipo de avaliação, entre eles estão o teste do micronúcleo em medula óssea (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; SCHNEIDER, 2014).

2.4.5.1 Teste do micronúcleo

Esse é um teste bastante eficiente e rigoroso onde é possível avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade de uma amostra, além de ser um teste sugerido por agências de regulamentação, de novas substâncias, nacionais e internacionais (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O micronúcleo é formado por fragmentos cromossômicos ou cromatídeos acêntricos e de cromossomos inteiros. Tais fragmentos não são incluídos ao núcleo principal, nem possuem conexão estrutural com o núcleo, e são morfologicamente iguais ao núcleo principal, mas apresentam tamanho reduzido (Figura 6) (AGOSTINI, 1993; BALLESTRERI, 2017).

Figura 7 – Exemplo ilustrativo da origem do micronúcleo a partir de um evento aneugênico (a) ou de um evento clastogênico (b).



Fonte: (DELARMELINA, 2017 adaptado de FENECH, 2005).

O número e tamanho dos micronúcleos são variáveis, dependendo do grau e tipo de alteração cromossômica responsável pelo seu surgimento. O agente indutor da formação do micronúcleo é o que está relacionado ao tamanho do mesmo, sendo que, micronúcleos formados por cromossomos inteiros normalmente são maiores do que os formados por fragmentos de cromossomos. A frequência de células micronucleadas encontradas durante a análise desse teste é o que indica o nível de dano induzido pelo composto em estudo, esse agente pode gerar quebras e/ou problemas no fuso mitótico e isso será detectado, sendo que tal teste identifica tantoclastogênese como aneugênese, mas não faz distinção entre elas (AGOSTINI, 1993; BALLESTRERI, 2017; DELARMELINA, 2017).

Diferentes tipos celulares podem ser utilizados para execução do teste do micronúcleo, essa escolha varia de acordo com o pesquisador, finalidade do teste, e via de administração do composto, se é por ingestão, pela pele, via venosa (ANVISA, 2013; BALLESTRERI, 2017).

Vários tipos celulares são utilizados para execução do teste do micronúcleo, entre eles: células de sangue periférico e medula óssea, células epiteliais da mucosa oral e vaginal e fibroblastos são os mais citados (AGOSTINI, 1993; KAPPES, 2010).

Ao utilizar roedores, há algumas possibilidades para a análise de micronúcleos, podendo ser realizada uma análise de atividade mutagênica e/ou antimutagênica. Tal escolha é feita ao selecionar o protocolo de tratamento, momentos de análise e tipo celular a ser analisado. Ribeiro, Salvadori e Marques, (2003) apontam características que corroboram os eritrócitos, encontrados na medula óssea, como

um tipo celular que atende todas as premissas para uma análise de micronúcleos segura. Entre elas:

“(1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs); (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem.” (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, p.174, 2003).

A análise de eritrócitos normocromáticos (NCEs) em sangue circulante (periférico) é amplamente utilizada em camundongos para avaliar mutagenicidade. Os NCEs representam o PCE em estágio mais avançado de maturação. Essa análise só pode ser realizada em camundongos, pois, o baço deles não remove do sangue periférico os NCE com micronúcleos. Em ratos e humanos há essa remoção (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidantes, alelopática, genotóxica e citotóxica do metabólito secundário botriosferana carboximetilado.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante do botriosferana carboximetilado por meio de quatro diferentes testes colorimétricos *in vitro*: ABTS, DPPH, FRAP e quelante de ferro;
- Verificar a atividade alelopática do botriosferana carboximetilado por meio de testes em *Allium cepa* e *Lactuca sativa*;
- Analisar, por meio de experimentação *in vitro*, a citotoxicidade e anticitotoxicidade do botriosferana carboximetilado, utilizando células de linfócitos humanos e sarcoma 180;
- Averiguar a mutagenicidade do botriosferana carboximetilado por meio de ensaios com camundongos Swiss jovens, em tratamento subcrônico;
- Explorar a possível atividade atimutagênica e citotóxica do botriosferana carboximetilado por meio de ensaio com camundongos Swiss jovens, com pré-tratamento por 30 dias.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Obotriosferana carboximetilado utilizado para realização do presente trabalho, foi gentilmente cedido pelo grupo de estudos coordenado pela Dra Aneli Barbosa, da Universidade Estadual de Londrina.

5.1 Obtenção do Botriosferana Carboximetilado (CM-BOT)

A colônia de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi mantida a 4°C em ágar dextrose de batata. Após a preparação do inóculo, as culturas fúngicas foram preparadas e cultivadas em meio de cultivo submerso contendo glicose ou frutose (50 g/l) a 28°C, por 72h(STELUTI, 2004). Culturas de fungos foram colhidas e o sobrenadante foi retirado, novamente a cultura foi crescida e recuperada por centrifugação (3000g/15 min à 4°C). Etanol absoluto (4 volumes) foi adicionado, o EPS foi precipitado durante a noite a 4°C e recuperado, após reservado, passou para a carboximetilação.

A carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizada seguindo o processo descrito por Xu et al., 2009 com algumas adaptações. Pesou-se 1,0g do botriosferana e este foi suspenso com 40 mL de isopropanol e mantido sob agitação vigorosa por 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 16,65 mL de NaOH 20%, gota a gota, e a reação foi mantida sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se uma solução previamente preparada, que continha 2,5g de ácido monocloroacético dissolvidos em 3,125 mL de NaOH 20% (m/v) e 10 mL de isopropanol (PA). Esta reação foi mantida por mais 1 hora sob agitação constante, à temperatura ambiente. Outra solução contendo 2,5g de ácido monocloroacético, dissolvida em 10 mL de isopropanol, foi adicionada à reação, esta foi mantida em banho de glicerina à 60°C $\pm$ 2°C por 3 horas. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida transferindo-se o balão de reação para um banho de gelo, até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido acético, utilizando-se fitas de pH MM, até atingir o pH 7,0. A solução resultante foi precipitada com 3 volumes de metanol, e em seguida, lavada consecutivamente com MeOH 80%, etanol PA, etanol 80% e, por último, éter. O precipitado obtido foi solubilizado em água destilada, a solução foi transferida para um saco de diálise e dialisada contra água destilada por 48h.

5.2 Atividade antioxidante

Para a avaliação das atividades antioxidantes foram utilizados 4 testes colorimétricos diferentes ABTS, DPPH, FRAP e quelante de ferro.

5.2.1 ABTS

A metodologia empregada foi a descrita por Rufino et al., (2007) e Re et al., (1999) com modificações.

Para realização deste teste foi preparado o radical ABTS.⁺: 5 ml da solução estoque de ABTS a 7mM + 88µL da solução de persulfato de potássio a 140mM, manter a mistura no escuro, a temperatura ambiente por 16h. No momento do preparo da análise, diluir 1 ml dessa solução em álcool etílico até que se alcance a absorbância de 0,70 nm +- 0,05 nm a 734 nm.

Os padrões utilizados para efeito de comparação foram Trolox e Ácido Ascórbico, as soluções foram preparadas em álcool etílico PA na concentração de 1mg/mL. Foi preparada uma solução do botriosferana em álcool etílico na concentração de 1mg/ml.

A partir da concentração inicial dos padrões e do botriosferana, foram preparadas diluições seriadas, em microtubos de 2mL. No primeiro tubo foi adicionado 2mL de solução na concentração de 1mg.mL⁻¹ e nos tubos seguintes 1mL de álcool etílico. Em seguida, foi retirado 1mL do primeiro tubo e acrescentado ao segundo, que foi homogeneizado. Esse passo foi repetido do segundo tubo pro terceiro e assim, sucessivamente, até alcançarmos a menor concentração utilizada, que foi de 7,81mg.mL⁻¹.

Para montagem da placa e análise dos resultados, foram adicionados 40µL do botriosferana carboximetilado (CM-BOT) da maior para menor concentração longitudinalmente e 200µL da solução do radical ABTS⁺. O mesmo foi feito para os padrões. O branco consistiu em 300µL de álcool etílico e o controle 40µL de etanol e 200µL do radical ABTS⁺. Cada um destes foi feito em triplicata.

A leitura foi feita em aparelho de Elisa a absorbância de 740 nm. Para as análises dos resultados foi feito o cálculo do EC₅₀, que mostra a concentração necessária de amostra para neutralizar 50% do radical, foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$EC_{50} = \left(\frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle}} \right) \times 100$$

5.2.2 DPPH

Esse método avalia a capacidade de uma substância pela sua atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidraliza - DPPH, esse radical é de coloração púrpura que ao ser reduzido forma difenil-picril-hidrazina de coloração amarelada. O comprimento de onda máximo absorvido pela forma não reduzida é 516nm, a atividade pode ser monitorada pela redução da absorbância observada (BORGES et al, 2011).

Para a realização do teste, foram preparadas algumas soluções com álcool etílico: DPPH a 0,3mM; CM-BOT na concentração de 1mg.mL⁻¹ e dos padrões ácido ascórbico e trolox também a 1mg.mL⁻¹. Em sequência, essas soluções foram utilizadas para preparar uma diluição seriada, sendo a primeira de 1mL, onde era retirado 500µL e passado para o tubo seguinte onde era adicionado mais 500µL do solvente esse processo foi repetido 7 vezes. Foram aliquoteados na placa de leitora Elisa, em triplicata, 100µL de cada concentração do botriosferana e dos padrões e adicionados a eles 200µL da solução de DPPH. Como branco foi utilizado 300 µL de álcool etílico e como controle 100 µL de álcool etílico + 200 µL da solução de DPPH. Este protocolo é baseado em Rufino et al., (2007) e Re et al., (1999) com modificações. Os cálculos do EC₅₀ foram feitos de acordo com a seguinte fórmula:

$$EC_{50} = \left(\frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle}} \right) \times 100$$

5.2.3 FRAP

Este é o ensaio do poder de redução do íon ferro (do inglês FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power), análise é feita a partir da redução do íon férrico Fe³⁺ em sua forma ferrosa Fe²⁺ estes presentes no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). A redução é acompanhada pela mudança da coloração, de um roxo claro a um roxo escuro, dessa forma, quanto mais forte a coloração, maior a atividade antioxidante da amostra analisada. A metodologia utilizada neste teste foi a descrita por Moraes et al., (2013) com modificações.

Para realização do teste foram preparadas algumas soluções: ácido clorídrico a 40mM; cloreto férrico a 20mM; tampão acetato 0,3M, pH 3,6; solução do reagente

FRAP, 25mL de tampão Acetato, 2,5mL da solução de TPTZ e 2,5mL da solução aquosa de cloreto férrico. O padrão utilizado foi o Sulfato Ferroso a 2mM. Em tubos de 2mL foram acrescentados 30μL da amostra, 90uL de água destilada e 900uL do reagente FRAP, o mesmo para o padrão. o Branco foi constituído por 30μL do solvente, 90μL de água destilada e 900μL do reagente FRAP. Os tubos foram vortexados novamente e em seguida foram incubados em estufa a temperatura de 37°C por 30 minutos. Após o tempo de reação a placa de análise foi montada seguindo as mesmas premissas descritas anteriormente para os outros testes antioxidantes. A leitura foi feita em espectrofotômetro de Elisa a absorbância de 595 nm. E foi realizado o cálculo do EC₅₀, como descrito anteriormente.

5.2.4 Quelante de Ferro

A metodologia aplicada para este teste foi baseada em Tang et al., (2002), onde é avaliada a capacidade de agentes atuarem como quelantes do Ferro II e essa é expressa em equivalentes de Na₂EDTA (mg Na₂EDTA/g do agente) ou em porcentagem de inibição.

A ferrozina pode formar um complexo com uma cor vermelha formando quelatos com Fe²⁺. Esta reação é restringida a presença de outros agentes quelantes e resulta numa diminuição da cor avermelhados complexos ferrozina-Fe²⁺. A medição da redução da cor determina a atividade quelante para competir com ferrozina para os íons ferrosos (HARB et al., 2016).

Foram preparadas algumas soluções para realização deste teste: FeCl₂ 2mM; Ferrozina 5mM; padrão EDTA na concentração de 1mg/ml.

Como descrito anteriormente, foi preparada a diluição seriada das soluções acima citadas. Ainda no tubo da diluição seriada ocorreu a reação onde foram adicionados 50uL de FeCl₂, 200uL de ferrozina e 1000uL do botriosferana nas concentrações a serem testadas. Branco foi o metanol e o controle metanol + FeCl₂ e ferrozina. Em seguida as placas de leitora Elisa foram montadas com as amostras e a leitura foi feita na absorbância de 562nm.

5.3 Alelopatia

A análise do potencial alelopático foi realizada em dois sistemas-teste: *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. As sementes, provenientes do mesmo lote de produção, foram adquiridas de uma fonte comercial.

Para a realização do ensaio, foi utilizado o controle negativo (água destilada) e quatro concentrações do botriosferana carboximetilado (CM-BOT), sendo elas: 15; 10; 7,5 e 5mg.mL⁻¹, o ensaio foi realizado em triplicatas, 3 placas com 30 sementes em cada totalizando 90 sementes por tratamento.

Foram utilizadas placas de petri forradas com papel filtro e embebidas com 5mL de água (controle negativo) ou a solução de água + botriosferana nas concentrações acima citadas. Após a protrusão das raízes, elas foram medidas diariamente por 4 dias e para mensurar o efeito alelopático foram considerados: índice de germinação (IG), índice de alelopatia (IA), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem do índice de germinação (%IG), crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade do crescimento radicular (IVCR).

Como compilado por Costalonga (2017) temos:

Índice de germinação (IG) - Relação entre o número de sementes submetidas à germinação em tratamento contínuo e o número de sementes que efetivamente apresentaram extensão da radícula. Expresso em %.

Índice de alelopatia (IA) – expresso em % e calculado pela seguinte fórmula:

$$IA = ((Gc - Gt) * 100) / Gc$$

Onde: Gc = germinação do controle; Gt = germinação do tratamento.

Índice de velocidade de germinação (IVG) – dado pela seguinte fórmula:

$$IVG = \sum (ni/ti)$$

Onde: ni = nº de sementes que germinaram no tempo i; ti = tempo após instalação do teste; i = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

Tempo médio de germinação (TMG) – expresso em dias:

$$TMG = (\sum ni * ti) / \sum ni$$

Onde: ni = nº de sementes que germinaram no tempo i; ti = tempo após instalação do teste; i = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

Velocidade média de germinação (VMG) – expresso em dias-1:

$$VMG = 1/t$$

Onde: t = tempo médio de germinação

Crescimento radicular médio (CRM) – expresso em cm:

$$CRM = (\sum Cmi)/t$$

Onde: Cmi = comprimento médio no dia i; t = tempo total do experimento; i = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

Índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR):

$$IVCR = \sum (ci/ti)$$

Onde: ci = tamanho médio das radículas no tempo i; ti = tempo após a instalação do teste; i = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

5.4 Avaliação da Viabilidade celular

5.4.1 Viabilidade celular em linfócitos humanos

Nos testes de viabilidade celular foram utilizadas células de linfócitos humanos doadas por um jovem com idade entre 18 e 30 anos, que não tinha feito uso de bebidas alcoólicas recentemente, não tenha tomado antibióticos ou tinha sido exposto a raios-X nos últimos 6 meses.

Após o isolamento dos linfócitos com Ficoll paque a quantidade de células por mL de solução foi mensurada em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram distribuídas em microplacas de 96 poços. Após seu estabelecimento em cultura o meio utilizado foi RPMI 1640, foram realizados quatro tratamentos diferentes com as células de linfócitos humanos, sendo dois para avaliar a citotoxicidade do botriosferana carboximetilado às células de linfócito humano, e os outros dois, para avaliar a anticitotoxicidade. Os dois testes de citotoxicidade consistiam respectivamente na exposição das células de linfócito ao botriosferana carboximetilado por 24h e por 48h. Para os testes de anticitotoxicidade, foram realizado tratamentos simultâneos, onde o botriosferana carboximetilado e mutágeno cisplatina, foram administrados no mesmo momento e após 24h a análise final foi realizada. E um pré-tratamento, onde as células de linfócitos eram tratadas com o botriosferana nas concentrações teste e 24h depois recebiam o mutágeno cisplatina,

na concentração de $50\mu\text{m}.\mu\text{L}^{-1}$, e após 24 horas a análise era concluída, perfazendo um total de 48h.

Cada um dos tratamentos, acima citados, foi realizado com o botriosferana carboximetilado diluído em água destilada, nas concentrações de 10, 50 e $100\mu\text{m}.\mu\text{L}^{-1}$ e para o controle foram utilizadas células que não foram tratadas. Ao final de cada tratamento, as microplacas foram centrifugadas a 860 rcf durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e 20 μL de MTT a $5\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ foram adicionados a cada poço. Passadas 3 horas, as placas foram centrifugadas a 860 rcf por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 100 μL de DMSO. A absorbância a 630nm foi detectada no leitor de ELISA. O experimento foi realizado em triplicata.

5.4.2 Atividade antiproliferativa

Células de Sarcoma 180 adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro são mantidas congeladas sob condições de cultura suplementada com antibióticos. Foi realizado o protocolo de descongelamento, seguido da inoculação das células em camundongos para que elas se replicassem. Após 4 dias as células foram retiradas do camundongo e passaram a ser cultivadas em microplaca de 96 poços, 100 μL de células com, aproximadamente 2×10^5 células. mL^{-1} em cada poço e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida, na presença de 5% de CO_2 .

Para análise antiproliferativa, o protocolo utilizado foi o de exposição das células de sarcoma 180 ao botrisferana carboximetilado, sendo um de 24h e outro de 48h de exposição.

As células foram tratadas com botriosferana diluído em água destilada nas concentrações de 10, 50 e $100\mu\text{m}.\mu\text{L}$ e as células do controle negativo não foram tratadas. Após o fim de cada tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do brometo de 3-(4,5- dimetil-2- tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazólio (MTT) em formazan, como descrito acima para os linfócitos humanos. Os protocolos citados tiveram prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (Parecer:2.333.879).

Para avaliar se o botrisoferana carboximetilado apresentou seletividade para as células de sarcoma 180 foi utilizado o Índice de Seletividade (IS) descrito por Badisa et al., (2016):

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da célula não neoplásica (linfócitos humanos)}}{IC_{50} \text{ da célula neoplásica (sarcoma 180)}}$$

Valores abaixo de 2,0 não indicam seletividade, acima de 2,0 a substância já é considerada seletiva, e quanto maior o valor mais seletivo é o composto.

5.5 Atividades mutagênica, antimutagênica e citotóxica “*in vivo*”

Os animais utilizados para realização dos testes *in vivo* foram camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com idade de aproximadamente 8 semanas (jovens), obtidos no Biotério Central da Universidade Federal, localizado no Centro de Ciências da Saúde. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFES sob o número de protocolo 77/2017.

Para serem alojados, os animais foram divididos em grupos de 6 animais e colocados em gaiolas de polipropileno padrão, em uma sala com temperatura constante (22-23 ° C), umidade relativa (50 ± 10%) e um ciclo de luz-escuro de 12 h sob uma iluminação fluorescente. Os animais receberam ração de animais comercial padrão (Nuvilab CR1, Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

No total, foram 60 animais, sendo 30 machos com peso variando entre 35,6 – 48,0g e 30 fêmeas com peso entre 28,16 – 37,14 g. Antes do início dos experimentos, os animais foram condicionados por uma semana no local onde ficariam durante o tratamento.

Para avaliar o botriosferana carboximetilizado foi utilizado o protocolo de pré-tratamento em 10 grupos experimentais, 5 grupos de machos e 5 grupos de fêmeas. Cada grupo era composto por 6 animais, sendo 3 grupos de fêmeas e 3 grupos de machos tratados com a botriosferana nas doses de 7,5; 15,0 e 30,0 mg.kg⁻¹ de peso corporal do animal; 4 grupos controle (2 grupos de machos e 2 grupos de fêmeas) foram tratados com solução salina isotônica a 0,9%, e os e grupos pertencentes ao controle positivo ainda receberam ciclofosfamida, no último dia do tratamento, um agente clastogênico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), na concentração de 50mg.kg⁻¹. Os animais receberam a botriosferana e solução salina, por gavagem, uma vez por dia durante 30 dias.

A análise mutagênica *in vivo* foi realizada com sangue periférico dos camundongos em 3 tempos do tratamento, no Tempo 0 (T0), Tempo 15 (T15) e Tempo 30 (T30). No T0, nenhum dos animais havia recebido o botriosferana

carboximetilado, dessa forma todos funcionaram como um controle negativo. O sangue era retirado através de punção da veia caudal, e lâminas foram preparadas pelo método do esfregaço em cada um dos tempos (T0, T15 e T30) e foram coradas com gel red e seguida da análise, que foi realizada em microscópio de fluorescência. A análise da mutagenicidade foi feita pela quantificação de micronúcleos encontrados em células de eritrócitos normocromáticos. No total, foram analisados 1000 eritrócitos normocromáticos por lâmina, sendo 2 lâminas por animal, totalizando 2000 células analisadas por animal.

Para análise antimutagênica e citotóxica *in vivo* foram utilizados os grupos de animais acima descritos, o pré-tratamento foi completado com as doses de Botriosferana carboximetilizado, e ao fim dos 30 dias de tratamento a ciclofosfamida foi administrada na concentração de 50mg.kg^{-1} , p.c., (via intraperitoneal), 24 horas antes da eutanásia, para induzir a formação de micronúcleos. Os grupos de controle negativo foram os únicos que não foram tratados com o agente clastogênico.

Após as 24h de aplicação da ciclofosfamida os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento de coluna cervical, e realizou-se a dissecação dos seus fêmures para a coleta de material a ser utilizado no preparo das lâminas.

A medula óssea dos fêmures foi coletada, acondicionada em tubos de centrifugação com soro bovino fetal, centrifugada a 1000rpm, durante 10 minutos e sobrenadante foi descartado, o material foi ressuspensionado em soro bovino fetal e novamente centrifugado, e o material celular foi ressuspensionado pela segunda vez em soro bovino fetal e duas lâminas de cada animal foram preparadas por esfregaço. As células foram coradas com Leishman eosina azul de metileno e analisadas em microscópio de luz, com aumento de 1000X, em teste-cego.

Para a análise da citotoxicidade, 200 células de cada lâmina eram contadas, considerando-se os eritrócitos normocromáticos e policromáticos. Ao final da contagem, era obtida a relação de Eritrócitos Policromáticos presentes no total de células avaliadas (PCE/PCE+NCE).

Para a avaliação da antimutagenicidade, foram contabilizados 1000 eritrócitos policromáticos/lâmina, nos quais era verificada a presença de micronúcleos, totalizando 2000 eritrócitos policromáticos por animal.

Com uma medida indireta da ação antimutagênica do botriosferana carboximetilado, foi feito o percentual de redução de danos (diminuição da

freqüência média de MNPCE), nas diferentes concentrações, foi calculada de acordo com Serpelone et al., (2008), usando a fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \left(\frac{\text{Frequência de MNPCEs em A} - \text{Frequência de MNPCEs em B}}{\text{Frequência de MNPCEs em A} - \text{Frequência de MNPCEs em C}} \right) \times 100$$

Onde, "A" é o grupo de células tratadas com ciclofosfamida; "B" é o grupo de células tratadas com botriosferana e ciclofosfamida, e "C" o grupo controle negativo (NaCl 0,9%).

5.6 Análise estatística

Para análise estatística inicialmente foi feito um teste de normalidade, como todos os dados mostraram ter distribuição normal, optou-se em utilizar o Teste de Tukey para comparar as médias de cada grupo de tratamento.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Atividade antioxidante

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de EC_{50} do CM-BOT e os respectivos padrões dos testes DPPH e atividade quelante do Fe^{2+} , para os quais esse exopolissacarídeo ou EPS mostrou-se efetivo como antioxidante, apesar de sua ação não ser comparável àquelas exibidas pelos padrões utilizados nos testes. Dois outros testes foram realizados, o ABTS e o FRAP, no entanto, nesses testes não foram observadas atividades antioxidantes para o CM-BOT.

Tabela 1 – Valores de EC_{50} representando a atividade antioxidante do botriosferana carboximetilado para os métodos DPPH e Atividade Quelante do Fe^{2+} .

Amostra	DPPH EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Atividade Quelante Fe^{2+} EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Padrão – Ácido Ascórbico	30,25	-
Padrão – Trolox	121,72	-
Padrão – EDTA	-	49,79
CM-BOT	467,34	287,11

No trabalho de Theis et al., (2017), o aumento da solubilidade decorrente da sulfonação lasiodiplodano possibilitou uma maior capacidade de remoção de OH, condição também percebida com a carboximetilação do botriosferana (CM-BOT), em que o aumento da solubilidade foi acompanhado por uma melhor atividade antioxidante pelo método de quelação de ferro. Tal fato, demonstra que mesmo com alterações estruturais distintas pode-se obter resultados similares, quanto às ações biológicas dos polissacarídeos. Portanto, não há como estabelecer que um único tipo de alteração estrutural deva ser utilizada em todos os momentos.

Li; Shah, (2014) consideram que a capacidade de remoção dos radicais hidroxila está relacionada à quelação de íons de metais de transição, como por exemplo o Fe^{2+} e Cu^{2+} , tornando-os inativos.

Em relação ao DPPH, Kagimura et al., (2015) evidenciaram um aumento no efeito antioxidante, decorrente do aumento da solubilidade do lasiodiplodano após sua carboximetilação, quando comparado ao polissacarídeo original, para os testes DPPH, ABTS e FRAP. Esses autores destacam a carboximetilação como um fator

que viabiliza o aumento da atividade biológica de polissacarídeos visando aplicações biomédicas e industriais, para esses polímeros derivatizados.

Entretanto, Wang et al., (2017) não obtiveram a mesma melhora na performance antioxidante após a carboximetilação de três polissacarídeos extraídos de *Cyclocarya paliurus*. Os autores destacam que a alteração estrutural prejudicou a atividade antioxidante desses polissacarídeos em comparação aos compostos originais e consideram que tais resultados podem ser devido às diferentes propriedades físico-químicas de cada tipo de polissacarídeos. Tais resultados sugerem que nem sempre alterações químicas que levam a um aumento da solubilidade determinarão uma melhora da atividade antioxidante, pois as características físico-químicas de cada polissacarídeo poderão responder de forma diferenciada às modificações estruturais.

Giese et al., (2015) ao avaliarem a capacidade antioxidante da botriosferana original e de outras β -D-glucanas verificaram que o botriosferana original apresentou atividade nos testes de eliminação dos radicais $\text{OH}^\cdot$, H_2O_2 e NO , enquanto as outras β -D-glucanas testadas, assim como o CM-BOT também não apresentaram uma ação similar aos padrões, como ocorreu em nosso estudo.

No presente trabalho, o fato de os valores de EC_{50} do CM-BOT não se assemelharem aos padrões sugere que o aumento das ramificações nesse EPS não trouxe efeitos relevantes, quando considerados os testes antioxidantes aqui realizados. Atentando-se ao descrito por Cantrele, (2005), uma das definições de antioxidante é: “*substâncias que, em pequenas concentrações (0,01% ou menos), em presença de substratos oxidáveis, retardam ou previnem a oxidação dos mesmos*” e aos valores de EC_{50} encontrados, não se pode afirmar que o CM-BOT seria um potencial antioxidante, pelos mecanismos envolvidos nos testes aqui realizados. Mas, é importante salientar que uma substância antioxidante nem sempre será eficiente para todos os mecanismos de ação antioxidante (CANTRELE, 2005).

Além disso, Giese et al., (2015) destacaram que grande parte das atividades biológicas desempenhadas por β -D-glucanas estão diretamente ligadas às suas atividades antioxidantes. Assim, análises da atividade do CM-BOT por outros mecanismos de ação antioxidante não avaliados nesse estudo são passos a serem realizados futuramente.

Apesar de em seus estudos Giese et al., (2015) relatarem atividade antioxidante do BOT não carboximetilado pelo teste ABTS, com capacidade máxima de eliminação do radical de 40%, na concentração de 3 g.L⁻¹, no presente estudo, a avaliação da capacidade antioxidante da CM-BOT, pelos testes ABTS e FRAP não indicaram atividade antioxidante. Uma possível explicação seria o fato de que a alteração estrutural sofrida pelo CM-BOT alterou a sua capacidade de neutralizar o radical ABTS, diminuindo-a e, por isso, a mesma não foi detectada neste trabalho.

Uma possível causa para a não eliminação desse radical pelo CM-BOT pode ser espacial: com o aumento de suas ramificações e a conformação em tripla hélice, a molécula pode perder sua capacidade de acessar o radical ABTS, já que a estrutura química e atividade antioxidante estão diretamente ligadas (MAMEDE; PASTORE, 2004).

6.2 Alelopatia

Nos experimentos de alelopatia com o CM-BOT, utilizando-se como organismo teste o *Allium cepa*, os valores do Índice de Germinação (IG) para as concentrações adotadas (5,0; 7,5; 15,0 e 30,0 mg.mL⁻¹) e do controle negativo não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 2). Para o índice de alelopatia (IA), nas mesmas condições citadas acima, os valores indicaram que o CM-BOT não pode ser considerado uma substância alelopática. Nas quatro concentrações do CM-BOT avaliadas houve uma variação considerável nos valores do Índice de Alelopatia, entretanto, não se pode vislumbrar um comportamento dose-dependente do CM-BOT, em *Allium cepa*.

Tabela 2 – Índice de germinação (IG) e Índice de alelopatia (IA) de *Allium cepa* tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo.

Amostras	IG	IA
CN	43,89%	-
CM-BOT 5,0 mg.mL ⁻¹	45,00%	-2,53
CM-BOT 7,5 mg.mL ⁻¹	39,44%	10,13
CM-BOT 15,0 mg.mL ⁻¹	43,33%	1,27
CM-BOT 30,0 mg.mL ⁻¹	40,00%	8,86

CN=Controle Negativo (água destilada); CM-BOT=Botriosferana carboximetilado.

Os dados de IVG, TMG e VMG de sementes de *Allium cepa*, tratadas com quatro concentrações diferentes de CM-BOT, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparados aos do controle negativo (CN), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) de *Allium cepa* tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo (CN).

Amostras	IVG	TMG	VMG
CN	22,75 ± 1,25	1,90 ± 0,02	0,53 ± 0,01
CM-BOT 5,0 mg.mL ⁻¹	25,17 ± 0,67	1,76 ± 0,02	0,57 ± 0,01
CM-BOT 7,5 mg.mL ⁻¹	21,38 ± 3,29	1,85 ± 0,05	0,54 ± 0,02
CM-BOT 15,0 mg.mL ⁻¹	23,13 ± 1,29	1,88 ± 0,06	0,53 ± 0,02
CM-BOT 30,0 mg.mL ⁻¹	22,79 ± 1,63	1,87 ± 0,05	0,53 ± 0,01

Os dados são representados pela média ± erro padrão. Todos os parâmetros foram avaliados pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. CM-BOT=botriosferana carboximetilado. CN=água destilada.

Vários são os mecanismos utilizados pelos aleloquímicos para promover o efeito alelopático. Almeida et al., (2008) afirmam que “um dos diversos efeitos dos aleloquímicos nas plantas é o controle da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que se acumula nas células em respostas ao aleloquímico, sendo desta forma responsáveis por danificar as células causando a sua morte”. Dessa forma, substâncias que inibem a promoção do estresse oxidativo podem proteger as plantas de aleloquímicos e, provavelmente, não apresentarão atividade alelopática, como ocorreu para o CM-BOT.

Em relação às ações alelopáticas de um organismo é importante considerar que as mudanças ocorridas em nível celular e molecular, como as ações sobre o DNA, precedem as alterações morfológicas e fisiológicas (FERREIRA; AQUILA, 2000). Tais mudanças também estão relacionadas ao estresse oxidativo e, portanto, ações quimioprotetivas podem colaborar para a não manifestação de uma ação alelopática. Moraes; Alves; Oliveira, (2009) indicaram que uma beta-glucana é capaz de ações quimioprotetivas e antimutagênicas, em *Allium cepa*, reforçando com isso a ausência de condições de estresse oxidativo que antecederiam a atividade alelopática.

Além do estresse oxidativo, a germinação das sementes pode ser influenciada pela atuação de diferentes enzimas, dentre elas as β -1,3-glucanases, que são amplamente distribuídas no reino vegetal. Bertoldo; Mazaro, (2018), em uma revisão sobre a atuação dessas enzimas na defesa vegetal, destacam sua função em

hidrolisar moléculas de β -1,3-glucanas com o intuito de desestabilizar a parede celular de fungos e evitar, assim, a patogenicidade desses organismos. Neste contexto, pode-se inferir, de acordo com os resultados dos índices de germinação e alelopatia do presente estudo, que essas enzimas possam ter sido responsáveis pela hidrólise do CM-BOT, impedindo que ele exercesse alguma ação alelopática.

Em relação aos dados de crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) para *Allium cepa*, houve diferença ($p < 0,05$) entre as concentrações de 15,0 e 30,0 mg.mL⁻¹ e o controle negativo para ambos parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4 – Crescimento radicular médio (CRM) e Índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) de *Allium cepa* tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e controle negativo.

Amostras	CRM	IVCR
CN	1,10 ± 0,10 ^a	1,50 ± 0,09 ^a
CM-BOT 5,0 mg.mL ⁻¹	1,01 ± 0,02 ^a	1,42 ± 0,01 ^a
CM-BOT 7,5 mg.mL ⁻¹	0,98 ± 0,03 ^{ab}	1,41 ± 0,07 ^a
CM-BOT 15,0 mg.mL ⁻¹	0,62 ± 0,01 ^c	0,97 ± 0,01 ^b
CM-BOT 30,0 mg.mL ⁻¹	0,73 ± 0,01 ^{bc}	1,09 ± 0,02 ^b

Os dados acima representam a média ± erro padrão. As análises foram feitas dentro de cada coluna, as letras representam a diferença estatística entre as concentrações e o controle para cada parâmetro avaliado pelo teste de Tukey à 5% de significância. CN=Controle Negativo (água destilada); CM-BOT=Botriosferana carboximetilado.

Nesse estudo, além do *Allium cepa*, foi utilizado o organismo teste *Lactuca sativa*, sendo que os mesmos parâmetros foram avaliados para as duas espécies testadas, ou seja, as mesmas concentrações e condições experimentais foram mantidas.

Os índices de germinação e de alelopatia para *Lactuca sativa* tratada com CM-BOT mostraram que nas concentrações utilizadas essa substância não apresentou atividade alelopática, sendo a concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ a única que se aproximou do valor limiar para o índice alelopático. As demais concentrações (7,5, 15,0 e 30,0 mg.mL⁻¹) ficaram distantes desse limiar (Tabela 5).

Tabela 5 – Índice de germinação (IG) e índice de alelopatia (IA) de *Lactuca sativa* tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo.

Amostras	IG	IA
CN	45,56%	-
CM-BOT 5,0 mg.mL ⁻¹	23,89%	47,56
CM-BOT 7,5 mg.mL ⁻¹	42,22%	7,32
CM-BOT 15,0 mg.mL ⁻¹	43,33%	4,88
CM-BOT 30,0 mg.mL ⁻¹	40,00%	12,20

CN=Controle Negativo (água destilada); CM-BOT=Botriosferana carboximetilado.

Na Tabela 6, estão apresentados os dados de IVG, TMG e VMG para *Lactuca sativa*. Considerando os três parâmetros, apenas o IVG mostrou diferença estatística na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ tanto do controle negativo, quanto das demais concentrações.

Tabela 6 – Índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) de *Lactuca sativa* tratado com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e do controle negativo.

Amostras	IVG	TMG	VMG
CN	36,63 ± 1,63 ^a	1,23 ± 0,02	0,81 ± 0,01
CM-BOT 5,0 mg.mL ⁻¹	20,58 ± 0,42 ^b	1,02 ± 0,07	0,98 ± 0,07
CM-BOT 7,5 mg.mL ⁻¹	31,63 ± 3,13 ^a	1,39 ± 0,02	0,72 ± 0,01
CM-BOT 15,0 mg.mL ⁻¹	32,75 ± 0,25 ^a	1,32 ± 0,01	0,76 ± 0,01
CM-BOT 30,0 mg.mL ⁻¹	31,63 ± 31,63 ^a	1,26 ± 0,12	0,80 ± 0,07

Os dados acima representam a média ± erro padrão. As análises foram feitas dentro de cada coluna, as letras representam a diferença estatística entre as concentrações e o controle para cada parâmetro avaliado, pelo teste de Tukey à 5% de significância. Onde não há letras, não houve diferença significativa. CM-BOT=Botriosferana carboximetilado; CN=Controle Negativo (água destilada).

Para os parâmetros de crescimento radicular médio e índice de velocidade de crescimento radicular com *Lactuca sativa*, foram observadas diferenças significativas para todas as concentrações em relação ao controle negativo, como é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) de *Lactuca sativa* tratada com quatro concentrações diferentes de botriosferana carboximetilado e controle negativo.

Amostras	CRM	IVCR
CN	1,53 ± 0,10 ^a	2,04 ± 0,12 ^a
CM-BOT 5,0 mg.mL ⁻¹	1,00 ± 0,07 ^b	1,38 ± 0,06 ^b
CM-BOT 7,5 mg.mL ⁻¹	0,77 ± 0,03 ^b	1,08 ± 0,03 ^{bc}
CM-BOT 15,0 mg.mL ⁻¹	0,60 ± 0,11 ^b	0,86 ± 0,14 ^c
CM-BOT 30,0 mg.mL ⁻¹	0,43 ± 0,02 ^c	0,66 ± 0,03 ^c

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. As análises foram realizadas dentro de cada coluna, as letras representam a diferença estatística entre as concentrações e o controle para cada parâmetro avaliado. CN = Controle Negativo (água destilada); CM-BOT=Botriosferana carboximetilado.

Ao observarmos os índices de crescimento radicular médio e o de velocidade do crescimento radicular foram os únicos que apresentaram diferença estatística significativa se comparado ao controle e, principalmente, nas concentrações mais altas. Souza Filho e Duarte (2007) identificaram que a capacidade de formar géis em solução, foi determinante para que o filtrado da cultura produzida por *Fusarium solanti* prejudicasse o desenvolvimento radicular de duas espécies de plantas daninhas.

Bauermeister et al., (2010) destaca a baixa solubilidade e alta viscosidade como uma das principais características de β -glucanas e um fator limitante para suas aplicações. O CM-BOT após a carboximetilação se tornou mais solúvel, mas manteve sua capacidade de formar géis viscosos em solução aquosa. Souza Filho e Duarte (2007) não confirmam o mecanismo de ação que viabilizou o efeito prejudicial para o desenvolvimento radicular, mas sugerem que seja pela diminuição de água disponível, pois a água fica retida na solução viscosa densa formada pelo filtrado fúngico. O mesmo pode ter ocorrido com os tratamentos de mais altas concentrações do CM-BOT, pois os mesmos apresentaram alta viscosidade favorecendo com isso a sua interferência sobre o crescimento radicular.

6.2 Viabilidade celular

Os dados de viabilidade celular dos linfócitos humanos estão apresentados na Tabela 8. É possível observar que nas primeiras horas de exposição ao CM-BOT há uma tendência à citotoxicidade. Todavia, com o aumento do tempo de exposição ao CM-BOT, a citotoxicidade é diminuída.

Tabela 8 – Percentual de células viáveis de linfócitos humanos sob diferentes tipos de tratamentos com o botriosferana carboximetilado, nas condições de 24 e 48 horas de exposição, pré-tratamento por 24 horas e tratamento simultâneo.

Tratamentos	Linfócitos			
	Citotóxico		Anticitotóxico	
CM-BOT	24h	48h	Simultâneo	Pré-tratamento
10 $\mu\text{m}.\mu\text{l}^{-1}$	59,91 % $\pm$ 6,15	76,45 % $\pm$ 4,78	44,94 % $\pm$ 0,63	85,77 % $\pm$ 6,01
50 $\mu\text{m}.\mu\text{l}^{-1}$	54,56 % $\pm$ 1,46	77,37 % $\pm$ 5,31	46,37 % $\pm$ 1,04	92,66 % $\pm$ 6,66
100 $\mu\text{m}.\mu\text{l}^{-1}$	61,24 % $\pm$ 3,12	85,32 % $\pm$ 7,81	45,41 % $\pm$ 1,45	89,90 % $\pm$ 1,65

Os dados acima são apresentados como porcentagem de viabilidade celular $\pm$ erro padrão. CM-BOT=Botriosferana carboximetilado; h = horas.

O pré-tratamento foi o mais promissor, pois apresentou os valores mais altos de porcentagem de sobrevivência celular mesmo após a aplicação da cisplatina, um agente alquilante altamente citotóxico. O tratamento simultâneo, com o CM-BOT e a cisplatina, foi o que apresentou as menores porcentagens de viabilidade celular. Um fato importante relacionado a esses tratamentos que merece ser destacado foi a necessidade de um período de tempo para o metabolismo celular do CM-BOT e a observação de seus efeitos positivos.

Sugere-se que no tratamento simultâneo, em que não há um intervalo tempo maior entre a exposição ao CM-BOT e a aplicação da cisplatina, esse EPS tenha sido ineficiente em proteger as células dos danos causados. Já no pré-tratamento, em que o CM-BOT foi aplicado vinte e quatro horas antes da administração da cisplatina, a substância em estudo foi eficiente em proteger as células dos danos do agente mutagênico. A necessidade de absorção e metabolização deste EPS foi observada também no estudo de Silva-Sena et al., (2018), em que a atividade hipocolesterolêmica do botriosferana não carboximetilado em camundongos, foi encontrada. No trabalho realizado por Malini et al., (2016) também com o botriosferana original, em linfócitos humanos, nenhuma relação entre tempo de exposição e eficácia foi apontada pelos autores.

A exposição somente ao CM-BOT não se mostrou citotóxica, mas notou-se uma menor porcentagem de células viáveis em 24h do que em 48h, o que sugere que o tempo de exposição ao CM-BOT favorece a viabilidade celular. Em relação às concentrações de CM-BOT, utilizadas nesse estudo, para as células de linfócitos, observou-se que a concentração de 100 $\mu\text{m}.\mu\text{l}^{-1}$ mantém um maior nível de

viabilidade celular, mas para o tratamento simultâneo essa afirmação não se tornou válida.

Malini et al., (2016) não observaram genotoxicidade em linfócitos humanos normais e em linfócitos leucêmicos tratados com o botriosferana original, nas concentrações de 7,5, 30,0 e 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultados que corroboram os do presente estudo. Esses dados podem indicar que a carboximetilação da molécula não alterou o comportamento do botriosferana quanto às ações citotóxicas. Naquele estudo, no protocolo de pós-tratamento, o botriosferana original ainda protegeu o DNA dos linfócitos, contra danos causados pelo metanossulfonato de metila (em inglês, MMS), enquanto que no protocolo simultâneo, esse EPS não se mostrou eficiente, como no presente estudo, assinalando que a alteração estrutural também não modificou sua atividade de proteção à célula e ao DNA.

Na Tabela 9 estão apresentadas as porcentagens de células viáveis de sarcoma 180 após a exposição ao CM-BOT (24 e 48 horas). A viabilidade celular das células de sarcoma 180 expostas ao CM-BOT foi similar àquela observada em linfócitos humanos, ou seja, nas primeiras 24 horas houve uma tendência à citotoxicidade, que foi perdida com o decorrer do tempo de exposição ao CM-BOT (48h).

Tabela 9 – Percentual de células viáveis de sarcoma 180 sob diferentes tempos de exposição ao botriosferana carboximetilado.

Tratamentos		Sarcoma	
		Citotóxico	
CM-BOT	24h	48h	
10 $\mu\text{m.}\mu\text{l}^{-1}$	58,61 % $\pm$ 4,61	72,75 % $\pm$ 0,55	
50 $\mu\text{m.}\mu\text{l}^{-1}$	54,62 % $\pm$ 5,25	74,58 % $\pm$ 1,01	
100 $\mu\text{m.}\mu\text{l}^{-1}$	51,54 % $\pm$ 5,08	75,47 % $\pm$ 1,72	

Os dados acima são apresentados como porcentagem de viabilidade celular $\pm$ erro padrão. CM-BOT=Botriosferana carboximetilado; h = horas.

Queiroz et al., (2015), em avaliação do botriosferana original produzido em meios de cultivo suplementados com duas diferentes fontes de carbono e do lasiodiplodano, observaram a presença de atividade antiproliferativa, isto é, diminuição da viabilidade de células tumorais. Esses autores frizam que o estresse oxidativo é um importante mecanismo de ação para o efeito antiproliferativo encontrado e descrevem que tal atividade é dependente do aumento do tempo de exposição e do aumento das concentrações dos três exopolissacarídeos utilizados.

Assim como no trabalho de Queiroz et al., (2015), no presente estudo, o aumento do tempo de exposição e das concentrações foram essenciais para o aumento da viabilidade celular de sarcoma 180 e de linfócitos.

O aumento da viabilidade das células de sarcoma 180, após o maior tempo de exposição ao CM-BOT, poderia sugerir que o mesmo não apresenta atividade antiproliferativa como havia sido descrita para o botriosferana original (QUEIROZ et al., 2015). Entretanto, a partir do cálculo do índice de seletividade, descrito por Badisa et al., (2006), o qual indica o quanto uma molécula pode ou não ser seletiva às células neoplásicas, é possível observar uma tendência seletiva de ação da CM-BOT sobre as células do sarcoma 180 (Tabela 9). De acordo com este índice, valores acima de 2,0 indicam que a substância é seletiva, e quanto mais altos seus valores, mais seletiva a substância é.

Tabela 10 – Índice de seletividade do botriosferana carboximetilado em relação às células de sarcoma 180.

Índice de seletividade do CM-BOT	
Exposição 24h	1,06
Exposição 48h	2,05

CM-BOT=botriosferana carboximetilado; h = horas.

O botriosferana original, produzido sob diferentes fontes de carbono avaliado por Queiroz et al., (2015), apresentou diferentes percentuais de ramificações, sendo o botriosferana original com maior percentual de ramificação aquele que apresentou os melhores resultados para atividade antiproliferativa. Os autores consideraram que o maior número de ramificações tenha propiciado tal desempenho. Ao avaliar a tendência de seletividade apresentada pelo CM-BOT, pode-se inferir que tal efeito esteja relacionado à sua estrutura química, pois este composto apresenta um maior percentual de ramificações devido à carboximetilação.

Além do percentual de ramificações, como citado anteriormente, o tempo de exposição é crucial para a seletividade do CM-BOT, sendo que somente com quarenta e oito horas de exposição o CM-BOT foi seletivo. Como já discutido anteriormente, Queiroz et al., (2015) e Silva-Sena et al., (2018) corroboram tais resultados. Ao refletir acerca de novas perspectivas de estudos com o CM-BOT a realização de novos testes com maior tempo de exposição ao CM-BOT, e

concentrações mais altas se mostram como alternativas coerentes para reafirmar a atividade de seletividade desse composto.

Vários estudos envolvem a aplicação de β -D-glucanas como coadjuvantes no tratamento de câncer, por suas características de seletividade, e dentre eles se destaca uma β -D-glucana extraída de um fungo do gênero *Lentinusedodes*, que já é utilizada com sucesso para o tratamento de tumores sólidos como sarcoma 180 (CHEN E SEVIOUR, 2007). As características de bioatividade apresentadas pelo CM-BOT indicam esse β -D-glucana como um potencial agente anticarcinogênico.

6.4 Atividades mutagênica, antimutagênica e citotóxica in vivo

A análise da frequência de micronúcleos do sangue periférico de camundongos tratados com o CM-BOT não indicou atividade mutagênica desse EPS, para nenhum dos grupos avaliados, independentemente das concentrações (7,5; 15,0 e 30,0 mg.kg⁻¹), tempos de exposição (T15 e T30) e sexo dos animais (Tabela 11). Assim como nos testes de viabilidade celular, nos quais o tempo contribuiu para o aumento do número de células viáveis, a progressão do tempo de exposição dos camundongos ao CM-BOT determinou uma diminuição do número de micronúcleos, o que pode sugerir uma tendência à antimutagenicidade.

Tabela 11 – Frequência de micronúcleos em 1000 eritrócitos normocromáticos (NCE) de camundongos *Swiss* jovens, tratados com botriosferana carboximetilado por 30 dias, em três tempos de coleta.

Tempos		T0			T15			T30		
Tratamentos	Macho	Fêmea	Grupo	Macho	Fêmea	Grupo	Macho	Fêmea	Grupo	
Controle Negativo	7,17 ± 0,84	2,67 ± 0,45	4,92 ± 0,66	3,33 ± 0,63	1,42 ± 0,36	2,38 ± 0,41	2,0 ± 0,43	1,83 ± 0,37	1,92 ± 0,28	
CM-BOT 7,5mg.kg ⁻¹	-	-	-	3,42 ± 0,87	1,83 ± 0,47	2,63 ± 0,51	0,92 ± 0,31	0,83 ± 0,27	0,88 ± 0,20	
CM-BOT 15,0mg.kg ⁻¹	-	-	-	3,83 ± 0,87	1,17 ± 0,37	2,50 ± 0,54	1,08 ± 0,29	0,83 ± 0,24	0,96 ± 0,19	
CM-BOT 30,0mg.kg ⁻¹	-	-	-	5,08 ± 3,53	2,0 ± 0,35	3,54 ± 0,61	1,0 ± 0,87	1,25 ± 0,28	1,13 ± 0,17	

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de significância. Abreviaturas: T0 = tempo zero; T15 = tempo quinze; T30 = tempo trinta; CM-BOT=Botriosferana carboximetilado; CN=Controle Negativo (solução salina 0,9%).

Weng et al., (2011) realizaram um teste de citotoxicidade com o botriosferana original em camundongos, por 28 dias, e não observaram nenhum efeito citotóxico,

mesmo na maior concentração utilizada (125,0mg.kg⁻¹), resultados que corroboram o fato de o CM-BOT não apresentar atividade mutagênica, visto que danos genotóxicos estão estreitamente relacionados a citotoxicidade.

No trabalho realizado por Silva-Sena et al., (2018), em sangue periférico de camundongos tratados com o botriosferana original (30 dias), com as mesmas concentrações do presente estudo, foram encontrados resultados semelhantes quanto à ausência de atividade mutagênica. Entretanto, os autores não detectaram diminuição do número de micronúcleos em relação aos tempos de análise (T15, T30), condição essa constatada no presente estudo, com o CM-BOT.

Quanto à avaliação de antimutagenicidade e citotoxicidade do CM-BOT, em medula óssea de roedores, esse EPS demonstrou ser uma molécula com atividade antimutagênica e não citotóxica, no pré-tratamento (Tabela 12). Todas as concentrações apresentaram diferenças significativas, em relação ao controle positivo e foram semelhantes ao controle negativo, tanto para o número de eritrócitos policromáticos micronucleados quanto para a relação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos.

Tabela 12 – Frequência de micronúcleos em 1000 eritrócitos policromáticos e razão entre eritrócitos normocromáticos e policromáticos de camundongos jovens, tratados com botriosferana carboximetilado por 30 dias, em protocolo de pré-tratamento.

Tratamentos	PCEMN em 1000 PCE			Razão PCE:(PCE + NCE)		
	Macho	Fêmea	Grupo	Macho	Fêmea	Grupo
Controle Negativo	6,58 ± 0,68 ^{bc}	4,83 ± 0,97 ^b	2,97 ± 0,61 ^b	0,58 ± 0,02 ^{ac}	0,62 ± 0,01 ^{ac}	0,60 ± 0,01 ^a
Controle Positivo	27,0 ± 2,48 ^a	24,83 ± 1,91 ^a	25,92 ± 1,55 ^a	0,43 ± 0,01 ^b	0,41 ± 0,01 ^b	0,42 ± 0,01 ^b
CM-BOT 7,5mg.kg ⁻¹	8,25 ± 1,04 ^c	3,92 ± 0,57 ^b	6,08 ± 0,73 ^b	0,59 ± 0,01 ^c	0,64 ± 0,01 ^c	0,62 ± 0,01 ^a
CM-BOT 15,0mg.kg ⁻¹	4,08 ± 0,69 ^b	2,58 ± 0,48 ^b	3,33 ± 0,44 ^c	0,56 ± 0,01 ^a	0,60 ± 0,01 ^{ac}	0,58 ± 0,01 ^a
CM-BOT 30,0mg.kg ⁻¹	3,08 ± 0,74 ^b	2,50 ± 0,70 ^b	2,79 ± 0,50 ^c	0,61 ± 0,01 ^{ac}	0,59 ± 0,01 ^a	0,60 ± 0,01 ^a

Os dados acima representam a média ± erro padrão. As análises foram realizadas em colunas, utilizando-se teste de Tukey com significância de 5%. As letras representam a diferença estatística entre as concentrações e o controle para cada parâmetro avaliado. Abreviaturas: PCEMN = micronúcleos em eritrócitos policromáticos; NCE = eritrócitos normocromáticos; PCE = eritrócitos policromáticos; CM-BOT=Botriosferana carboximetilado.

A concentração de 7,5mg.kg⁻¹ do CM-BOT se diferenciou das demais em praticamente todos os parâmetros, mas ainda foi semelhante ao controle negativo. Contudo, as concentrações de 15,0 e 30,0mg.kg⁻¹ não diferiram entre si com tanta frequência e apresentaram valores numericamente menores de eritrócitos micronucleados do que os valores obtidos no controle negativo. Esses resultados indicam uma atividade antimutagênica e não citotóxica do CM-BOT, em todas as concentrações testadas, independentemente do sexo do animal.

Silva-Sena et al., (2018), quando do pré-tratamento com as mesmas concentrações, utilizando o botriosferana original observaram o mesmo comportamento para a concentração de 7,5mg.kg⁻¹. Entretanto não observaram a mesma tendência de diminuição de valores de eritrócitos micronucleados, para as concentrações de 15,0 e 30,0mg.kg⁻¹. Tal comparação sugere que a carboximetilação manteve a eficiência do botriosferana em proteger o DNA dos danos causados pela ciclofosfamida, como pode ser observado ao analisar o percentual de redução dos danos causados por este mutágeno (Tabela 13).

Tabela 13 – Percentual de redução dos danos causados pelo agente mutagênico ciclofosfamida nos grupos de camundongos tratados com botriosferana carboximetilado.

Tratamentos	Macho	Fêmea	Grupo
CM-BOT 7,5 mg.kg⁻¹	91,82 %	104,55 %	86,45 %
CM-BOT 15,0 mg.kg⁻¹	112,24 %	111,25 %	98,43 %
CM-BOT 30,0 mg.kg⁻¹	117,14 %	111,65 %	100,78 %

Abreviatura: CM-BOT=Botriosferana carboximetilado.

Ao comparar os valores máximos alcançados para o percentual de redução de danos aqui apresentados (117,14%), com os de outros autores que trataram os animais com o botriosferana original, como os de Miranda (2006), com exposição de 15 dias e de Silva-Sena (2018), por 30 dias, que obtiveram, respectivamente, os percentuais de redução de 78% e 102,22%, é possível inferir que a carboximetilação foi efetiva em potencializar o efeito protetivo do CM-BOT.

Estudos envolvendo outros polissacarídeos extraídos de fungos têm apontado para uma possível utilização do botriosferana e de outros b-glucanas na prevenção de danos ao DNA, como é o caso de Magnani,(2010) que aponta o polissacarídeo extraído de *Saccharomyces cerevisiae* e Vasconcelos, (2009) que demonstra tal atividade em polissacarídeos extraídos de diversas espécies do gênero *Botryosphaeria*, reforçando assim a importância de pesquisas que explorem os efeitos desses compostos em sua forma original ou com alterações estruturais que têm se mostrado mais efetivas, como citado por Queiroz et al., (2015).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O botriosferana carboximetilado demonstrou atividade antioxidante nos ensaios DPPH e FRAP; não exibiu atividade alelopática; não foi citotóxico para linfócitos humanos e, ainda aumentou a viabilidade celular dessas células, com um maior tempo de exposição; além disso, exibiu seletividade para as células de sarcoma 180; não foi citotóxico nem mutagênico para camundongos em pré-tratamento subcrônico, mas foi antimutagênico, e apresentou um expressivo percentual de redução de danos frente às ações da ciclofosfamida, sendo assim considerado antimutagênico.

Tendo em vista, todos esses resultados positivos, pode-se sugerir que o botriosferana carboximetilado é um metabólito modificado promissor para o uso como aditivo alimentar, como agente quimioprotetivo e antitumoral, ou mesmo como coadjuvante de quimioterapia, sendo ainda necessários estudos mais aprofundados acerca de tais atividades sobre a seletividade do mesmo.

9. REFERÊNCIAS

ABREU, J.A.S.; ROVIDA, A.F.S.; PAMPHILE, J.A. FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS. **Revista UNINGÁ Review**. Vol. 21, nº 1, p. 55-59, Mar., 2015.

AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**. Santa Catarina (Florianópolis), vol. 6, nº 2, pg. 1-19, 1993. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/22698>>.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, Jan. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents>>, Acesso em: 01 jan. 2019.

ALI, S.H. The World of β -Glucans—A Review of Biological Roles, Applications and Potential Areas of Research. University Hospital of North Norway, Tromsø. 2010.

ABREU, J.A.S.; ROVIDA, A.F.S.; PAMPHILE, J.A. Fungos De Interesse: Aplicações Biotecnológicas Fungi of Interest: Biotechnological Applications. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55–59, 2015.

ALMEIDA, G.D.; ZUCOLOTO, M.Z.; COELHO, M.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse Oxidativo Em Células Vegetais Mediante Aleloquímicos Oxidative Stress in Vegetable Cells Mediated By Allelochemicals. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**, v. 61, n. 1, p. 4237–4247, 2008.

BADISA, R. B.; AYUK-TAKEM, L.T.; IKEDIOBI, C.O.; WALKER, E.H. Selective anticancer activity of pure licamichauxiolic-B acid in cultured cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 2, p. 141–145, 2006.

BALLESTRERI, E. Teste de Micronúcleos como Ferramenta para Avaliação da Exposição Ocupacional a Pesticidas: Revisão. **Revinter**, v. 10, n. 1, p. 19–28, 2017.

BARATELLI, G. **ESTUDO DAS PROPRIEDADES ALELOPÁTICAS VEGETAIS: INVESTIGAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ALELOQUÍMICAS EM Terminalia catappa L. (COMBRETACEAE)**. p. 206. Dissertação de mestrado (Química de produtos naturais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BARBOSA, A. M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; SILVA, M.L.C. Structural characterization of Botryosphaeran: A (1→3;1→6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, 2003.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M.I.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A. M. Fungal beta-1, 3-Glucanases: production and biotechnological applications. **Semina: Ciências exatas e Tecnológicas**. Londrina, vol. 31, nº 2, p. 75-86, fev., 2010.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.S.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **VISÃO ACADÊMICA**. Curitiba, v. 11, n. 2, p. 43–50, 2010.

BERTOLDO, E. .; MAZARO, S. M. B -1, 3 Glucanases: Uma Revisão Sob a Ótica Da Defesa Vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L. M. G. Free Radicals And The Main Dietary Antioxidants.

REVISTA DE NUTRIÇÃO. Campinas, v. 35, n. 1, p. 123–130, 1999.

BOCHNIE, K. A. .; ARIANE, R. .; MACIEL, P. CELL VIABILITY ANALYSIS BY MTT IN CELLS TREATED WITH UREMIC TOXINS – REVIEW. **Cad. da Esc. de Saúde**, p. 42–51, 2016.

BOECK, P. **OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS.** p. 253. Tese de doutorado (Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BONGIOVANI, R. A. M. Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 01, p. 53–59, 2009.

BORGES, L.L.; LUCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E. F. UMA ABORDAGEM SOBRE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM PRODUTOS NATURAIS. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 7, n. 12, p. 1–20, 2011.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12.** AMGH Editora, 2012.

CANTRELE, L. P. **Erva-Mate E Atividade Antioxidante.** Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de alimentos), p. 0–99 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 371, n. 1-2, p. 115-120, 1996.

CORRADI DA SILVA, M. DE L.; FUKUDA, E.K.; VASCONCELOS, A.F.D.; DEKKER, R.F.H.; MATIAS, A.C.; MONTEIRO, N.K.; CARDOSO, M.S.; BARBOSA, A.M.; SILVEIRA, J.L.M.; SASSAKI, G.L.; CARBONERO, E.R. Structural characterization of the cell wall d-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 4, p. 793–798, 2008.

COSTALONGA, S. A. P. **Avaliação Alelopática, Mutagênica E Fitoquímica De Extratos Vegetais De Três Espécies Exóticas Invasoras.** Tese de doutorado (Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

DELARMELINA, J. M. *Bidens pilosa* L. **Análises da composição química e atividades biológicas de diferentes populações e condições de cultivo Bidens pilosa L. : análises da composição química e atividades biológicas de diferentes populações e condições de cultivo.** Tese de doutorado (Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 20, p. 7767–7768, 2003.

FENECH, M. In Vitro Micronucleus Technique to Predict Chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 111, n. 2, p. 81–95, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos E Mecanismo De

Lesão. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–69, 1997.

FERREIRA, G. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE Pterocaulon (ASTERACEAE)**. p. 73. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FERREIRA, A.G; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n.12, 2000.

Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans. **Mycol Res**. 2007;111(pt 6):635–52

FONSECA, P.R.M.S.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; SILVEIRA, J.L.M.; VASCONCELOS, A.F.D.; MONTEIRO, N.K.; ARANDA-SELVERIO, G.; SILVA, M.L.C. Thermal and rheological properties of a family of botryosphaerans produced by botryosphaeria rhodina MAMB-05. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7488–7501, 2011.

FUKUDA, E. K. **EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA DO FUNGO ASCOMICETO Botryosphaeria rhodina MAMB-05**. p. 126. Dissertação de mestrado (Biotecnologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Revisão tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros Tabernaemontana e. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. August, p. 627–641, 2008.

GIESE, E. C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; SILVA, R. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3;1→6)- β -d-glucan produced by Botryosphaeria rhodina MAMB-05. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 953–956, 2008.

GIESE, E. C.; SUMIYA, A.F.G.; BORSATO, D.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 125–130, 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOUVEA, D. R. Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão (Lychnophora salicifolia Mart., Vernonieae, Asteraceae). **Dissertação de mestrado**, p. 44, 2010.

GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 37–48, 2012.

HARB, T. B.; TORRES, P.B.; PIRES, J.S.; SANTOS, D.Y.A.C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 2–6, 2016.

JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.S.; CRUVINEL, W.M.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, v. 5, n. 3, p. 367–370, 2010.

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M.A.A.; THEIS, T.V.; Malfatti, C.R.M.; DEKKER, R.F.H.;

BARBOSA, A.M.; TEIXEIRA, S.D.; SALOMÉ, K. Carboxymethylation of (1 → 6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015.

KAPPES, T. **RELAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE QUALIDADE DE ÁGUA E INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES NO RIO DO PEIXE – JOAÇABA - SC**. p. 47. Trabalho De Conclusão De Curso (Biotecnologia), Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, 2010.

LI, S.; SHAH, N. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food Chemistry**, v. 165, p. 262–270, 2014.

LI, S.; XIONG, Q.; LAI, X.; LI, X.; WAN, M.; ZHANG, J.; YAN, Y.; CAO, M.; LU, L.; GUAN, J.; ZHANG, D.; LIN, Y. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 237–250, 2016.

MACHADO, F. L. D. S.; KAISER, C.R.; COSTA, S.S.; GESTINARI, L.M.; SOARES, A.R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 441–452, 2010.

MAGNANI, M. **METODOLOGIA OTIMIZADA PARA EXTRAÇÃO DA β -GLUCANA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR E ANTIGENOTÓXICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA AVANÇADO**. p. 103. Tese de doutorado (Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631–650, 2008.

MALINI, M.; CAMARGO, M.S.; HERNANDES, L.C.; VARGAS-RECHIA, C.G.; VARANDA, E.A.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; MATSUMOTO, S.T.; ANTUNES, L.M.G.; CÓLUS, I.M.S. Chemopreventive effect and lack of genotoxicity and mutagenicity of the exopolysaccharide botryosphaeran on human lymphocytes. **Toxicology in Vitro**. Londrina, vol. 36, p. 18-25, Jul., 2016.

MALINI, M.; SOUZA, M.F.; OLIVEIRA, M.T.; ANTUNES, L.M.G.; FIGUEIREDO, S.G.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; CÓLUS, I.M.S. Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1→3)(1→6)- β -D-glucan in human lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 214–221, 2015.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B.CEPPA**. Curitiba. vol. 22, nº 2, p. 233-252, dez., 2004.

MIRANDA, C. C. B. O. **PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA, ANTIMUTAGÊNICA, HIPOGLICEMIANTE E HIPOCOLESTEROLÊMICA**. p. 167. Dissertação de mestrado (Biotecnologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

MONTEIRO, S.C.; BRANDELLI, C.L.C. **Farmacobotânica Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

MORAES, D.; ALVES, M.R.; OLIVEIRA, R. J. AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE, ANTIMUTAGENICIDADE E DO MODO DE AÇÃO ANTIMUTAGÊNICO DO POLISSACARÍDEO BETA-GLUCANA EM ENSAIO DE ALLIUM CEPA. p. 1–3, 2009.

MORAIS, M. L.; SILVA, A.C.R.; ARAÚJO, C.R.R.; ESTEVES, E.A.; DESSIMONI-PINTO, N.A.V. Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do Cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355–360, 2013.

MOURA, A. G. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**. p. 119. Dissertação de mestrado (Produtos Naturais e Sintéticos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 146–152, 2012.

PILLAI, T. G.; MAURYA, D.K.; SALVI, V.P.; JANARDHANAN, K.K.; NAIR, C.K.K. Fungal beta glucan protects radiation induced DNA damage in human lymphocytes. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, p. 13–5839.2014.02.02, 2014.

QUEIROZ, E. A. I. F.; FORTES, Z.B.; CUNHA, M.A.A.; BARBOSA, A.M.; KHAPER, N.; DEKKER, R.F.H. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 67, p. 14–24, 2015.

RAHAR, S.; SWAMI, G.; NAGPAL, N.; NAGPAL, M.A.; SINGH, G.S. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 94, 2011.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629–646, 2013.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. e MARQUES, E.K., orgns. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, Q.I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de Citotoxicidade : Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials research**. São Paulo, vol. 6. nº3. p. 317-320, jul., 2003.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. **EMBRAPA**, Fortaleza-CE, 2007.

SAND, S. V. **INFLUENCIA DA L-GLUTAMINA EXÓGENA NAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E NA CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE, EM MODELO ANIMAL**. p. 140. Dissertação de mestrado (Fármacos e Medicamentos), - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Cartarina, 2005.

SANTOS, D. Q. **Potencial herbicida e caracterização química do extrato metanólico da raiz e caule do *Cenchrus echinatus* (Timbete)**. p. 70. Dissertação de mestrado (Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

SCHNEIDER, B.U.C. **Cardanol: avaliação toxicogenética e seus efeitos antigenotóxico, antimutagênico e antiapoptótico quando associado a ciclofosfamida**. 2014. 61 f. Dissertação de mestrado (Saúde e desenvolvimento) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2014.

SILVA-SENA, G. G.; MALINI, M.; DELARMELINA, J.M.; DUTRA, J.V.D.; GERVÁSIO, S.V.; LEAL, M.A.S.; PEREIRA, T.M.C.; BARBOSA-DEKKER, A.M.; DEKKER, R.F.H.; PAULA, F.; BATITUCCI, M.C.P. vivo antimutagenic and antiatherogenic effects of the (1 → 3)(1 → 6)-β-D- glucan botryosphaeran. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 826, p. 6-14, Fev., 2018.

SILVA, E, C, B.; GUERRA, M, M, P. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. **Ciênc. vet. tróp.**, Recife-PE, v. 13, n. 1/2/3, p. 9–16, 2010.

SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 65–74, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: 148 Artmed, 2017.

SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 795–800, 2018.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, Viçosa, p. 25, p. 227–230, 2007.

SOUZA, W. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS VEGETAIS**. p. 37. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (Tecnologia em alimentos) - Universidade Tecnológica do Paraná, Campo Mourão, 2013.

STELUTI, R. M. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EXOPOLISSACARÍDEO SECRETADO PELO ASCOMICETO BOTRYOSPHERA SP.** p. 123. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–270, 2012.

TANG, S.Z.; KERRY, J.P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D.J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v.76, p.45-51, 2002.

THEIS, T. V.; CALEGARI, G.C.; SANTOS, V.A.Q.; JUNIOR, H.E.Z.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; CUNHA, M.A.A. Exocellular (1→6)-β-D-glucan (lasiodiplodan): Carboxymethylation, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19–33, 2017.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, p. 1–6, 2016.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas De Oxigênio E De Nitrogênio, Antioxidantes E Marcadores De Dano Oxidativo Em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos Para Sua Determinação. **Química nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N.K.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; CARBONERO, E.R.; SILVEIRA, J.L.M.; SASSAKI, G.L.; SILVA, R.; SILVA, M.L.C Three Exopolysaccharides Of The B-(1→6)-D-Glucan Type And A B-(1→3;1→6)-D-Glucan Produced By Strains Of Botryosphaeria Rhodina Isolated From Rotting Tropical Fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 14, p. 2481–2485, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D. **Glucanas De Isolados Fúngicos Do Gênero Botryosphaeria: Produção, Caracterização Química E Atividade Anticoagulante**. p. 128. Tese de doutorado (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2009.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WANG, Q.; SHENG, X.; SHI, A.; HU, H.; YANG, Y.; LIU, L.; FEI, L.; LIU, H. β-Glucans: Relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–12, 2017.

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 (β-glucan) produced by Botryosphaeria rhodina RCYU 30101. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 910–916, 2011.

XAVIER, M. B. **COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DE DUAS CULTIVARES DO CAFÉ ARÁBICA (Coffea arabica L.)** p. 100. Dissertação de Mestrado (Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation Of A Polysaccharide Extracted From *Ganoderma Lucidum* Enhances Its Antioxidant Activities *In Vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 227-234, 2009.