

GIOVANA ALQUINI

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO  
CORPO DE FRUTIFICAÇÃO E CULTIVO SUBMERSO DE *Agaricus bisporus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA  
2010

Para minha mãe, minha parceira, amiga, confidente, com a qual eu sempre posso contar em todos os momentos. Sem você não estaria aqui. O caminho que me trouxe até aqui foi proporcionado por você. Ao meu pai, por todos os ensinamentos e por ser um grande pai. Por mais curto que tenha sido nosso tempo juntos, eu carrego muito de você comigo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

À minha mãe, por sempre me apoiar nas minhas escolhas e me proporcionar o estudo necessário para chegar até aqui;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela orientação, pelo incentivo, dedicação, correções, por me dar espaço para que eu pudesse me desenvolver como profissional - aprendi muito sob sua tutela;

Às minhas amigas Ana Helena (desde a Iniciação Científica ao meu lado), Andréa, Dirce, Fernanda Simas, Fhernanda Smiderle por tudo, pelos excelentes momentos que guardarei, pela ajuda (muitas, muitas vezes!), pela amizade;

À Professora Elaine Carbonero pela amizade, por tanto ter me ensinado e ajudado em vários momentos, além de ter cedido o material que deu origem a este trabalho;

Aos Professores Thales, Guilherme, Gorin e ao Lauro por todas as conversas e ajudas neste período;

Aos companheiros de laboratório, os IC's Carol, Daniel, Lorena, Phelipe;

A todos os meus amigos de outros laboratórios, vizinhos ou não, pela amizade, conversas pelos corredores, risadas, alegrias;

A todos da minha turma de mestrado, com os quais dividi momentos difíceis e divertidos;

À pós-doutoranda Yanna, por sua ajuda e suas delicadas observações;

Ao Prof. Adair R. S. dos Santos da UFSC e seus alunos, pelos ensaios biológicos;

À Profa. Dra. Patrícia Stuelp Campelo, a primeira a me ensinar Bioquímica e que sem a qual eu jamais teria chegado a trabalhar com pesquisa no laboratório de Carboidratos;

À Dra. Elaine R. Carbonero, Dr. Guilherme L. Sasaki e Dr. Miguel D. Nosedá, pelas análises de RMN;

À Rosane, Lauro e Elizangela, pelas análises de GC-MS e GPC;

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e funcionários do Departamento;

À todos os Professores do Departamento de Bioquímica que me ensinaram,  
auxiliaram e dividiram o seu conhecimento para aprimorar o meu;

Ao CNPq, Pronex, Fundação Araucária, pelo apoio financeiro;

E a todos que me ajudaram de alguma forma, a chegar ao final desta jornada,  
pronta para a próxima! Obrigada!

É preciso suportar duas ou três  
lagartas se quiser conhecer as  
borboletas

- Antoine de Saint-Exupéry-

## RESUMO

Polissacarídeos de basidiomicetos despertam grande interesse por apresentarem diversas propriedades terapêuticas. A estrutura química destes biopolímeros possui um importante papel na atividade biológica dos polissacarídeos. O presente trabalho teve por objetivo elucidar a estrutura química de alguns polissacarídeos presentes no corpo de frutificação, bem como os obtidos por meio do cultivo submerso *Agaricus bisporus*. Buscou também verificar os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de uma glucana isolada do corpo de frutificação deste organismo. O corpo de frutificação do basidiomiceto seco, moído e deslipidificado foi submetido a extrações aquosas a frio e a quente. O extrato obtido do cultivo submerso foi submetido a um processo de recuperação dos exopolissacarídeos (EPS). Os extratos foram submetidos à precipitação com etanol e posteriormente foram submetidos aos processos de purificação por congelamento e degelo, precipitação com solução de Fehling, extração com DMSO e diálise por membranas de diferentes porosidades, de maneira sequencial. A partir destes processos foram purificadas e caracterizadas diferentes estruturas. A fração SSCW obtida pela extração aquosa a frio apresentou-se homogênea e composta por manose, galactose e glucose. Análises espectroscópicas e de metilação sugerem que essa molécula apresenta cadeia principal constituída de  $\beta$ -D-Glcp ligadas (1 $\rightarrow$ 6), sendo que as unidades podem estar substituídas em O-3 por unidades de Galp O-6-substituídas por unidades de Galp O-6-substituídas por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Glcp ou por unidades de Glcp O-3-substituídas por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Glcp. A fração SDPHW, obtida da extração aquosa a quente, seguida por extração com DMSSO, após análises demonstrou ser uma  $\beta$ -glucana linear, com ligações do (1 $\rightarrow$ 6). Este polissacarídeo apresentou um efeito analgésico e antiinflamatório significativo com baixas doses quando avaliado em teste de contração muscular induzida por ácido acético em camundongos. Os oligossacarídeos produzidos a partir desta molécula também foram testados, porém seu efeito para a mesma atividade testada foi inferior ao da glucana íntegra. O cultivo em meio submerso foi realizado com o meio de cultivo Czapeck, o qual, após testado com outros dois meios, promoveu melhores condições para o desenvolvimento do organismo. A fração SSEPS foi obtida a partir da recuperação dos exopolissacarídeos produzidos durante o cultivo e purificada por uma série seqüencial de diálise em membranas com limite de exclusão por tamanho. Apresentou uma molécula heterogênea, composta de fucose, manose, galactose e glucose. A análise desta molécula, apesar de impura, sugere que esta molécula possa ser uma heterogalactana.

Palavras-chave: *Agaricus bisporus*,  $\beta$ -glucana, exopolissacarídeos (EPS) e atividade antinociceptiva.

## ABSTRACT

The object of this study was to elucidate the chemical structures of some polysaccharides extracted from the fruiting bodies of *Agaricus bisporus*, as well as polysaccharides obtained by submerged culture. The dried, milled and delipidified basidiomycete was submitted to aqueous extraction (cold and hot). The extract obtained from the submerged culture was submitted to a process of recovering exopolysaccharides (EPS). These extracts were then submitted to ethanol precipitation, and the resulting polysaccharide extracts were submitted successively to a freeze-thawing process, precipitation with Fehling solution, DMSO extraction and dialysis with membranes of different  $M_r$  cut-off. Fraction SSCW, obtained from the cold water extraction, was composed of mannose, galactose and glucose. Spectroscopic and methylation analysis suggest that this molecule has a main chain composed of  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6)-linked, substituted at O-3 by O-6-substituted Galp units linked to non-reducing ends of  $\beta$ -D-Glcp. Fraction SDPHW, from the hot water extraction, was followed by a DMSO extraction, which, after analysis, was characterized as a linear  $\beta$ -glucan, (1 $\rightarrow$ 6)-linked. This polysaccharide demonstrated a positive effect as an analgesic and also induced an antiinflammatory response at low dosages, when analyzed by a test of abdominal constriction induced by acetic acid in mice. Oligosaccharides obtained from this molecule were also tested, however proving to have a less significant effect. The submerged culture was accomplished utilizing Czapeck medium, which, after tests with two other mediums, promoted better conditions for the organisms' growth and development. Fraction SSEPS was recovered from the medium extract obtained when the submerged culture was carried out. The exopolysaccharide produced during cultivation was submitted to a purification process by a sequence of dialysis with size exclusion membranes (cut-off). After analysis this fraction remains heterogeneous, however, it suggests the presence of a heterogalactan.

Keywords: *Agaricus bisporus*,  $\beta$ -glucan, exopolysaccharide and antinociceptive effect.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	15
FIGURA 2 -	EXEMPLO DE ESTRUTURA DE UMA $\beta$ -GLUCANA LINEAR COM LIGAÇÕES (1 $\rightarrow$ 3).....	21
FIGURA 3 -	EXEMPLO DE GLUCANA RAMIFICADA EXTRAÍDA DE <i>P. ostreatoroseus</i> , <i>P. eryngii</i> .....	21
FIGURA 4 -	ESQUEMA DE HETEROGALACTANA.....	22
FIGURA 5 -	DESENHO ESQUEMÁTICO DA INOCULAÇÃO E PRÉ-INÓCULO EM MEIO LÍQUIDO BD.....	26
FIGURA 6 -	ESQUEMA DA INOCULAÇÃO DE MEIO BD (A) PARA MEIO CZAPECK (B) E CULTURA SUBMERSA MANTIDA SOB AGITAÇÃO (C).....	27
FIGURA 7 -	COGUMELOS COMO OBTIDOS DO PRODUTOR (A) SUBMETIDOS AO PROCESSO DE DESLIPIDIFICAÇÃO EM CONJUNTO EXTRATOR SOXHLET (B).....	28
FIGURA 8 -	FLUXOGRAMA CORRESPONDENTE À EXTRAÇÃO DO BASIDIOCARPO DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	28
FIGURA 9 -	ESQUEMA GERAL DO EXPERIMENTO CONDUZIDO DESCRITO NO ITEM 4.9.2.2.....	36
FIGURA 10 -	FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO SOLÚVEL DA EXTRAÇÃO AQUOSA FRIA.....	40
FIGURA 11 -	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS OBTIDOS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SFSCW (A); 1R2SSCW (B).....	41
FIGURA 12 -	ESPECTROS $^{13}\text{C}$ -RMN DA FRAÇÃO 1R2SSCW EM $\text{D}_2\text{O}$ A $70^\circ\text{C}$ : (A) $^{13}\text{C}$ -RMN COM POSSÍVEIS ASSINALAMENTOS; (B) SINAIS DE $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT, DEMONSTRANDO A INVERSÃO DOS SINAIS EM (1), (2) E (3) CORRESPONDENTES AOS SINAIS OBTIDOS NO EXPECTRO DE $^{13}\text{C}$ -RMN.....	42
FIGURA 13 -	ESTRUTURA PROPOSTA PARA A FRAÇÃO 1R2SSCW, COM	



	BASE NOS RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	43
FIGURA 14 -	FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DA EXTRAÇÃO AQUOSA QUENTE.....	44
FIGURA 15 -	ESPECTROS DE <sup>13</sup> C-RMN (A) E <sup>13</sup> C-RMN-DEPY (B) DA FRAÇÃO SDPHW EM DMSO A 70°C.....	45
FIGURA 16 -	ESTRUTURA DA β-D-GLUCANA COM LIGAÇÕES (1→6), SDPHW.....	46
FIGURA 17 -	(A) CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO MATERIAL RESULTANTE DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL NOS DIFERENTES TEMPOS (15', 30', 45', 60', 75', 90') E PADRÕES CONHECIDOS DE OLIGOSSACARÍDEOS; (B) SIMULAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HIDRÓLISE PARCIAL DA MOLÉCULA.....	47
FIGURA 18 -	EFEITO DA GLUCANA (SDPHW) (0,01-10 mg/kg, i.p.) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR INJEÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 0,6% EM CAMUNDONGOS (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE DE EVAN'S BLUE (C).....	49
FIGURA 19 -	EFEITO DO POOL DE OLIGOSSACARÍDEOS (0,01-10 mg/kg, i.p.) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR INJEÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 0,6% EM CAMUNDONGOS (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE DE EVAN'S BLUE (C).....	50
FIGURA 20 -	ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS OU QUIMIOCINESE.....	51
FIGURA 21 -	PELLETS FORMADOS DURANTE O CULTIVO DE <i>Agaricus bisporus</i> EM MEIO LÍQUIDO.....	53
FIGURA 22 -	FLUXOGRAMA CORRESPONDENTE À EXTRAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR MEIO DE CULTIVO SUBMERSO DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	54

FIGURA 23 -	PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO POR MEMBRANAS DE LIMITE DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO SSEPS (A); 50 kDa (B); 100 kDa (C).....	56
FIGURA 24 -	ESPECTRO DE <sup>13</sup> C-RMN POSTERIOR A PURIFICAÇÃO POR MEMBRANAS DA FRAÇÃO SSEPS.....	58
FIGURA 25 -	ESPECTROS DE <sup>13</sup> C-RMN DE HETEROGALACTANAS COM PRESENÇA DE Fucp (A) HETEROGALACTANA ENCONTRADA EM <i>Flammulina velutipes</i> ; (B) HETEROGALACTANA DE <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	EXOPOLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS.....	23
TABELA 2	-	MEIO BATATA-DEXTROSE (BD).....	25
TABELA 3	-	MEIOS LÍQUIDOS DE CULTURA TESTADOS.....	26
TABELA 4	-	TEOR DE ÁGUA E COMPOSTOS APOLARES EM <i>Agaricus bisporus</i> .....	38
TABELA 5	-	FRAÇÕES E RENDIMENTOS DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.....	39
TABELA 6	-	ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 1R2SSCW.....	41
TABELA 7	-	POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS TESTADOS PARA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA.....	52

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{13}\text{C}$	- Carbono treze
$\text{Ac}_2\text{O}$	- Anidrido acético
$\text{AcOH}$	- Ácido acético
$\text{CH}_3\text{I}$	- Iodeto de metila
$\text{CHCl}_3$	- Clorofórmio
cm	- Centímetro
$\text{CuSO}_4$	- Sulfato de cobre
$\text{D}_2\text{O}$	- Óxido de deutério
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	- Dimetilsulfato
EPS	- Exopolissacarídeo
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- Glucose
HCl	- Ácido clorídrico
$\text{H}_2\text{SO}_4$	- Ácido sulfúrico
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz
Hz	- Hertz
i.p.	- Intraperitoneal
IR	- Índice de refração
kDa	- Quilodaltons
KOH	- Hidróxido de potássio
M	- Molar
Man	- Manose
Me	- Metil
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	- Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	- Metanol
$\text{NaBH}_4$	- Borohidreto de sódio
$\text{NaB}^2\text{H}_4$	- Borohidreto de sódio deuterado
$\text{NaIO}_4$	- Periodato de sódio
$\text{NaN}_3$	- Azida de sódio
$\text{NaNO}_2$	- Nitrito de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
nm	- Nanômetro
$\rho$	- Piranose
p/v	- Peso/volume
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
r.p.m.	- Rotações por minuto
s.c.	- Sub-cutânea
TFA	- Ácido trifluoracético

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
3.1 <i>Agaricus bisporus</i> (J. E. Lange) Imbach .....	18
3.2 CULTIVO EM CULTURA SUBMERSA .....	19
3.3 POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS EM BASIDIOMICETOS .....	20
3.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS .....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	25
4.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO .....	25
4.3 CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS E BIOMASSA MICELIAL .....	25
4.4 RECUPERAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS .....	27
4.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO .....	27
4.5.1 Extração Aquosa .....	29
4.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS .....	29
4.6.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo .....	29
4.6.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling .....	29
4.6.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas .....	30
4.6.4 Purificação dos Polissacarídeos por Solubilização em DMSO .....	30
4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS .....	30
4.7.1 Composição Monossacarídica .....	31
4.7.2 Metilação dos Polissacarídeos e Hidrólise de Saeman .....	31
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	33
4.8.1 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar .....	33
4.8.2 Determinação da Composição Monossacarídica e dos Acetatos de Alditóis O- metilados .....	33
4.8.3 Ressonância Magnética Nuclear .....	34
4.9 PREPARO DA AMOSTRA PARA ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	34

4.9.1 Hidrólise Parcial e Cromatografia em Camada Delgada (TLC).....	34
4.9.2 Teste da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória .....	34
4.9.2.1 Animais .....	35
4.9.2.2 Constrição Abdominal, Permeabilidade Capilar Peritoneal e Infiltração de Leucócitos.....	35
4.9.2.3 Análises Estatísticas .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1 EXTRATO AQUOSO FRIO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO .....	39
5.2 EXTRATO AQUOSO QUENTE DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.....	44
5.2.1 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória .....	46
5.2.2.1 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória da Glucana .....	48
5.2.2.2 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória do <i>Pool</i> de Oligossacarídeos ....	49
5.3 ISOLAMENTO E CULTIVO SUBMERSO DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	53
5.3.1 Exopolissacarídeos Obtidos por Cultivo Submerso .....	54
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos são organismos pertencentes ao Reino Fungi. Este Reino inclui uma série de organismos, sendo que os mais desenvolvidos estão enquadrados no filo Basidiomycota. Os fungos pertencentes a este filo são comumente denominados de basidiomicetos, constituindo um grupo bastante diverso, sendo os cogumelos e orelhas-de-pau as formas mais conhecidas. Estes apresentam em sua maioria uma frutificação macroscópica (Figura 1), constituída por hifas modificadas que formam pseudotecídios, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (estruturas não visualizadas na Figura 1) (PUTZKE; PUTZKE, 1998).



FIGURA 1 - ESTRUTURA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *Agaricus bisporus*

Fonte: foto própria

Os basidiomicetos, conhecidos popularmente como cogumelos, são apreciados mundialmente como alimento e consumidos por apresentarem elevados valores nutricionais e baixos teores calóricos. Utilizados amplamente na medicina oriental, pelas propriedades terapêuticas que apresentam, são extensivamente

estudados devido ao interesse medicinal atribuído à presença de componentes que atuam como modificadores de resposta biológica. Parte destas propriedades é atribuída aos polissacarídeos. Deste modo, os estudos atuais dos polissacarídeos presentes nestes organismos buscam elucidar suas propriedades biológicas. Existem estudos acerca das propriedades imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatória, anticoagulante, hipoglicemiante, dentre outras reportadas para estes polímeros.

Sabe-se que estas propriedades têm ligação com as estruturas das biomoléculas e composição dos polissacarídeos. Parte justamente deste pressuposto o interesse em estudar suas atividades potenciais em conjunto com sua estrutura. Sendo assim, a caracterização estrutural dos polissacarídeos é importante para que se compreendam os possíveis mecanismos de ação envolvidos, uma vez que a maioria dos estudos relacionados à atividade biológica utiliza o extrato bruto obtido a partir dos cogumelos, o qual apresenta uma mistura de polissacarídeos compostos por estruturas distintas. A mistura dos polissacarídeos nestas extrações impede que se afirmem quais são as moléculas que apresentam a propriedade biológica. O isolamento e a caracterização destes polímeros são importantes para elucidar esta questão.

A obtenção dos polissacarídeos é fundamental para a realização destes estudos. Estes polímeros podem ser provenientes do corpo de frutificação (também denominado basidioma) ou do cultivo submerso que resulta na formação de uma biomassa, chamada de micélio. Durante a produção do micélio em cultura submersa ocorre a formação dos exopolissacarídeos, os quais estão presentes no meio de cultura final, ou seja, pós-cultivo.

O cultivo submerso dos basidiomicetos surge como uma alternativa biotecnológica vantajosa na obtenção de polissacarídeos. Esta forma de produção de polissacarídeos proporciona maior controle sobre as condições de cultivo, como pH, temperatura e composição do meio de cultivo e período de tempo mais curto quando comparado com o cultivo em substrato, tanto na obtenção dos exopolissacarídeos quanto dos polissacarídeos provenientes do micélio.

*Agaricus bisporus* foi o organismo selecionado por ser o cogumelo mais comercializado e cultivado mundialmente e ter poucos relatos referentes à estrutura de seus polissacarídeos, bem como de suas propriedades terapêuticas.



## 2 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo geral a caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos a partir do corpo de frutificação, do micélio cultivado em meio líquido e dos exopolissacarídeos obtidos de *Agaricus bisporus*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar *Agaricus bisporus* em meio líquido para obter biomassa (micélio) e exopolissacarídeo (EPS).
- Extrair, isolar e purificar os polissacarídeos do corpo de frutificação e exopolissacarídeos do basidiomiceto.
- Determinar a estrutura de polissacarídeos extraídos e dos exopolissacarídeos do meio de cultivo.
- Analisar comparativamente as estruturas obtidas o corpo de frutificação e EPS, comparando-as com a literatura
- Analisar similaridades e/ou diferenças estruturais e de composição com outros polissacarídeos que possuem atividade biológica.
- Testar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* de uma das estruturas obtidas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este trabalho envolve quatro grandes áreas. O estudo e compreensão destas áreas são interligados, no entanto, para efeitos desta revisão serão abordados separadamente. Inicialmente, será abordado o material da pesquisa, objeto de estudo, o basidiomiceto *Agaricus bisporus* e algumas de suas características e componentes previamente estudados; na seqüência o cultivo submerso de cogumelos. No terceiro tema serão discutidos os polissacarídeos obtidos de basidiomicetos e, por fim, serão abordadas as propriedades biológicas atribuídas aos polissacarídeos obtidos de cogumelos.

#### 3.1 *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach

*Agaricus bisporus* é a espécie de cogumelo comestível mais cultivada mundialmente. O cultivo deste cogumelo na Europa iniciou-se há cerca de 200 anos na França. Devido à dificuldade relativa do cultivo desta espécie por sua exigência quanto ao ambiente, a maior parte das linhagens utilizadas para cultivo comercial são idênticas ou derivadas de duas cepas híbridas, as quais foram desenvolvidas por Fritsche em 1983 e demonstraram ser mais resistentes (DE GROOT; VISSER; GRIENSVEN, 1998).

No entanto, este cogumelo é geralmente considerado inferior quanto ao seu valor nutricional e medicinal quando comparado com outras espécies cultivadas na Ásia (BEELMAN; ROYSE; CHIKTHIMMAH, 2003). Com o intuito de esclarecer este dado, Beelman *et al.* publicaram em 2003 um estudo relacionando os compostos bioativos em *Agaricus bisporus*. Constataram neste estudo que em comparação com *Lentinus edodes* e *Pleurotus spp.* os dados de componentes bioativos são similares, porém determinaram *Agaricus bisporus* como nutricionalmente superior.

Bernardo *et al.* (1999) estudou os componentes da parede celular das lamelas de *Agaricus bisporus* e encontrou como material mais abundante os carboidratos (constituído por 85% glucose e pequenas quantidades de manose, galactose, xilose, seguido por açúcares aminados) e proteínas.

O perfil lipídico deste cogumelo foi analisado por análises de Ressonância Magnética Nuclear (BONZOM *et al.*, 1999). No extrato total obtido, os glicerolipídios foram os lipídios mais abundantes, dentre os quais fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. Dos glicerolipídios, o ácido linoléico (18:2) foi o maior componente dos ácidos graxos. Ergosterol e outros esteróis foram detectados em altas quantidades, porém não foram caracterizados.

### 3.2 CULTIVO EM CULTURA SUBMERSA

A produção de polissacarídeos em cultivo submerso de basidiomicetos apresenta grande potencial biotecnológico. Um estudo com 56 espécies de basidiomicetos mostrou que muitos desses cogumelos produzem polissacarídeos extracelulares. Dentre as espécies estudadas, as do gênero *Agaricus sp* apresentaram um dos maiores rendimentos de exopolissacarídeos produzidos por meio de cultivo submerso. Mais estudos detalhados são necessários para cada espécie para aperfeiçoar esta produção (MAZIERO, 1996).

Diversas condições de cultivo de basidiomicetos em cultura submersa vêm sendo exploradas e têm se observado que estes estudos fisiológicos são de grande importância para a produção de micélio e de exopolissacarídeos.

O tempo de cultivo é um dos fatores importantes na obtenção da biomassa micelial, bem como na produção de exopolissacarídeos. A concentração inicial e o tipo de fonte de carbono utilizado também são de fundamental importância para o cultivo submerso. Em *Ganoderma applanatum* a temperatura e a concentração de glucose no meio foram fatores que levaram a uma produção diferenciada de exopolissacarídeo e biomassa micelial (LEE et al., 2007). Já para *Agaricus brasilienses*, a melhor fonte de carbono foi a sacarose, à temperatura de 30 °C e pH de 6,1, o que resultou em um aumento de 78,62% na produção de exopolissacarídeos (FAN, et al., 2007).

Friel e McLaughlin (2000) trabalharam com diferentes condições de cultivo em meio líquido de *Agaricus bisporus* utilizando apenas um meio à base de extrato de malte. Neste trabalho puderam detectar a natureza sensível do cogumelo. Tiveram dificuldade na técnica de homogeneização das culturas, pois não puderam utilizar o método mais drástico comumente empregado, com altas velocidades agitação. A formação de *pellets* ocorreu somente no cultivo sob agitação a 300 rpm. O rendimento da cultura estática (sem agitação) foi superior, justamente por não ocorrer a formação dos *pellets*, os quais prejudicam a transferência de oxigênio e nutrientes do meio para o interior do pellet em formação.

### 3.3 POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS EM BASIDIOMICETOS

Os polissacarídeos de basidiomicetos podem ser encontrados na forma de homopolímeros, heteropolímeros, glicoproteínas, peptideopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (GOW; GADD, 1995) e desempenhar inúmeros papéis, tais como: polímero de reserva, composição da estrutura da parede celular, entre outros. Nestes organismos, os principais polissacarídeos que constituem a parede celular são a quitina e as glucanas com configuração do tipo beta ( $\beta$ ) (BARTINICKI-GARCIA, 1968 *apud* MAZIERO, 1996).

Os polissacarídeos encontrados externamente às hifas de basidiomicetos são conhecidos como exopolissacarídeos (EPS). A síntese desses polímeros ainda não é bem esclarecida, mas alguns autores sugerem seus papéis fisiológicos como polímeros de reserva (PITSON; SEVIU; McDOUGALL, 1993); na prevenção da desidratação por formar géis e proporcionar aderência de uma célula a outra, ou sobre uma superfície (CATLEY, 1992 *apud* MAZIERO, 1996).

Os exopolissacarídeos estariam envolvidos na promoção de condições ótimas para o funcionamento do sistema lignolítico de basidiomicetos. A bainha formada por estes polímeros estaria limitando as reações de repolimerização dos radicais aromáticos liberados durante o ataque do fungo, e também estaria propiciando um microambiente especial, no qual se encontrariam as enzimas lignolíticas e os produtos de degradação (GUTIÉRREZ, 1995).

Em relação aos polissacarídeos de basidiomicetos, 651 espécies de 182 gêneros já foram estudadas (WASSER, 2002), sendo as glucanas e as heterogalactanas as estruturas comumente encontradas (WASSER; WEIS, 1999; MIZUNO, 1999; ZHANG et al., 2007).

As glucanas (Figura 2) são os homopolissacarídeos mais comuns em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas, e apresentarem diferentes configurações e massas molares. Além disso, podem ser solúveis ou insolúveis em água, dependendo da conformação, ligações químicas e massas molares (ZHANG et al., 2007).

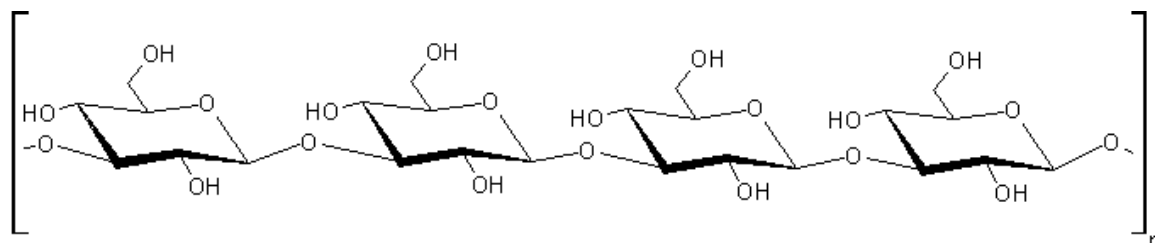


FIGURA 2 – EXEMPLO DE ESTRUTURA DE UMA  $\beta$ -GLUCANA LINEAR COM LIGAÇÕES (1 $\rightarrow$ 3)

Já foram descritas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\alpha/\beta$  glucanas, sendo a  $\beta$ -D-glucana com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3), apresentando substituições em O-6 por uma unidade de  $\beta$ -D-Glcp a estrutura comumente descrita para diversos basidiomicetos, tais como: *Lentinus edodes* (lentinana), a partir do basidioma e do micélio (SASAKI; TAKASURA, 1976; HOBBS, 2000), *Sclerotium glaucanicum* (scleroglucana) (JOHNSON, *et al.*, 1963), *Pleurotus ostreatus* (pleurana) (KARÁCSONYI; KUNIAK, 1994), *P. tuber-regium* (CHENGHUA *et al.*, 2000), e do basidioma de *P. ostreatoroseus*, *P. eryngii* (Figura 3) (CARBONERO *et al.*, 2006).

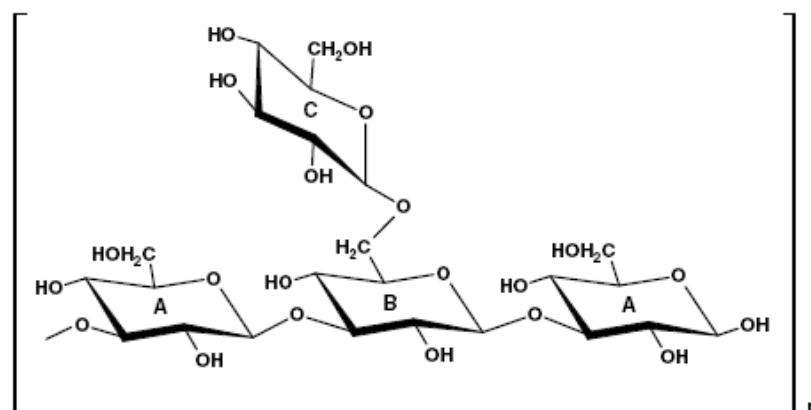


FIGURA 3 – EXEMPLO DE GLUCANA RAMIFICADA EXTRAÍDA DE *P. ostreatoroseus*, *P. eryngii* (CARBONERO *et al.*, 2006)

$\beta$ -Glucanas com diferentes graus de ramificação foram reportadas no basidioma de *Agaricus blazei* que apresentou cadeias laterais constituídas de duas unidades de  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)-ligadas a cada três unidades de glucose (DONG, *et al.*, 2002), e uma  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6) linear também foi isolada deste basidiomiceto (KAWAGASHI *et al.*, 1989). Polímeros com configuração do tipo  $\alpha$  também foram

descritos, como uma  $\alpha$ -D-Glc $p$ -(1→6)-(1→4) para *Agaricus blazei* (MIZUNO, *et al.*, 1990).

Mendoza e Novaes-Ledieu, em 1981, estudaram os componentes da parede celular de *Agaricus bisporus* e sugeriram a presença de uma glucana insolúvel de ligação do tipo  $\alpha$ -(1→3), bem como de uma glucana solúvel com ligações do tipo  $\beta$ -(1→3) e  $\beta$ -(1→6), no entanto, não esclareceram a estrutura fina destes polissacarídeos e nem mesmo há qualquer sugestão relacionado ao envolvimento de manose e galactose em menores quantidades na estrutura do polímero. Este trabalho foi realizado apenas em frações obtidas por extração alcalina e sem qualquer purificação ou isolamento das frações.

Quanto aos heteropolímeros, as heterogalactanas são os polímeros comumente encontrados, sendo em sua maioria, formadas por uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-Galp-(1→6) contendo diferentes substituintes, principalmente fucose e/ou manose (Figura 4) (ROSADO *et al.*, 2003b).

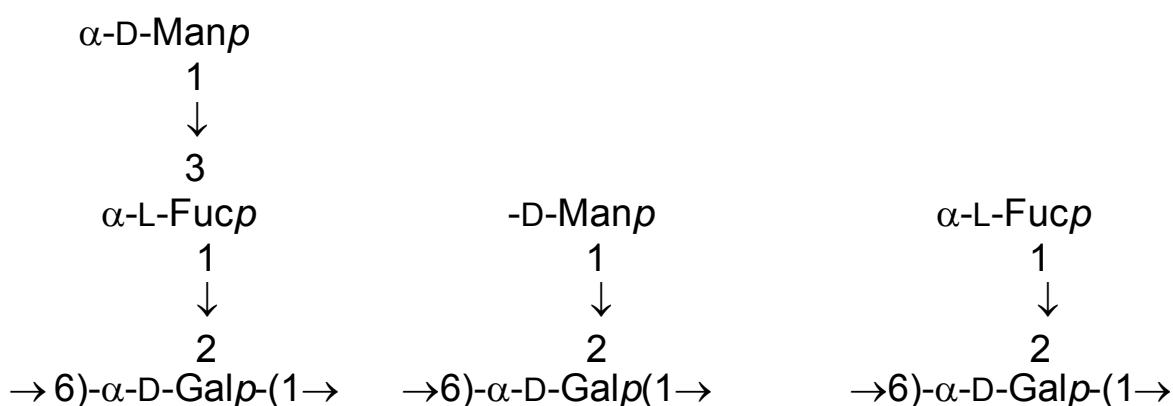


FIGURA 4 – ESQUEMA DE HETEROGALACTANA (ROSADO *et al.*, 2003b)

Em relação aos heteropolissacarídeos de exopolissacarídeos, foi descrita uma galactomanana com cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -D-Man $p$ -(1→3) substituída em O-6 por Gal $p$  de *Collybia maculata* (LIM *et al.*, 2005). Na Tabela 1 encontram-se alguns exopolissacarídeos previamente descritos na literatura.

TABELA 1 – EXOPOLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Espécie	Estrutura		Referência
	Cadeia principal	Outras especificações	
<i>Pleurotus cornucopiae</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>P. floridanus</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> , <i>P. sajor-caju</i>	$\beta$ -D-Glcp-(1→3)	Ramificado em O-6 por uma unidade de $\beta$ -D-Glcp	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 1996
<i>P. ostreatoroseus</i>	$\alpha$ -D-Galp-(1→4) metilada em 3-O	Proporção de 2:1 (Galp: 3-O-Me-Galp)	ROSADO <i>et al.</i> , 2002
	$\alpha$ -D-Manp-(1→6)	Ramificação em O-2 por cadeias laterais de Manp, Manp ligadas em O-2 e O-3	

### 3.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

As propriedades biológicas envolvendo polissacarídeos de basidiomicetos despertaram a necessidade de se conhecer a estrutura fina destes polímeros. Alguns polissacarídeos podem apresentar a mesma composição monossacarídica e, no entanto, provocar respostas diferentes quando testadas quanto às suas propriedades terapêuticas. Desta forma, a estrutura, grau de ramificação, açúcar presente na posição de terminal não-redutor, são características importantes na determinação do potencial biológico.

O basidiomiceto *Agaricus blazei* (“Cogumelo do Sol”, “Himematsutake”) teve seu valor medicinal descoberto a partir de estudos epidemiológicos no interior de São Paulo. Foi observado que a população que se alimentava constantemente deste cogumelo, apresentava índices muito baixos de várias doenças, como o câncer (WASSER, 2002). Posteriormente, estudos verificaram que polissacarídeos provenientes de *A. blazei* apresentavam atividade imunoestimulante (KAWAGISHI *et al.*, 1989; FUJIMIYA *et al.*, 1999).

As propriedades antitumorais de polissacarídeos de vários basidiomicetos é a ação biológica mais estudada. Em revisão realizada por Mizuno (1999), atribui-se tal atividade às glicoproteínas e xiloglucanas extraídas do basidioma de *Pleurotus sajor-*

*caju*, enquanto que em *P. citrinopileatus* uma  $\beta$ -glucana proveniente de um complexo protéico estaria apresentando tal atividade.

Polissacarídeos obtidos do basidioma, do micélio em cultivo submerso e do meio de cultura líquido de *A. blazei*, também apresentaram atividade antitumoral (MIZUNO et al., 1990; FAN et al., 2007).

Diante do exposto, observa-se uma escassez de estudos acerca de *Agaricus bisporus*, apesar deste ser o cogumelo mais consumido no mundo, existindo poucos trabalhos sobre as propriedades biológicas de compostos extraídos desta espécie de basidiomiceto.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O basidioma de *Agaricus bisporus* foi fornecido pela empresa Makoto Yamashita, localizado em São José dos Pinhás, PR.

### 4.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO

O isolamento foi realizado a partir de pequenos fragmentos (em torno de 5 mm) da região interna do píleo do corpo de frutificação, os quais foram depositados em meio de cultivo BDA sólido (Tabela 2) e incubados a 25° C, em ausência de luz (Figura 5).

TABELA 2 - MEIO BATATA-DEXTROSE (BD)\*

140 g	Batatas sem casca
20 g	Glucose
1000 ml	Água destilada

\*Para o meio BDA sólido é adicionado 10 g de ágar ao meio BD  
 Fonte: CAVAZZONI; ADAMI, 1992, *apud* MAZIERO, 1996.

Análises micro e macroscópicas das características morfológicas apresentadas no cultivo foram realizadas periodicamente, a fim de se obter placas com isolamento micelial em condições axênicas.

### 4.3 CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS E BIOMASSA MICELIAL

O micélio de *Agaricus bisporus*, após isolamento em meio de cultivo sólido, foi inoculado para 250 ml de meio líquido BD (Tabela 1), conforme descrito anteriormente (Figura 5, novamente)

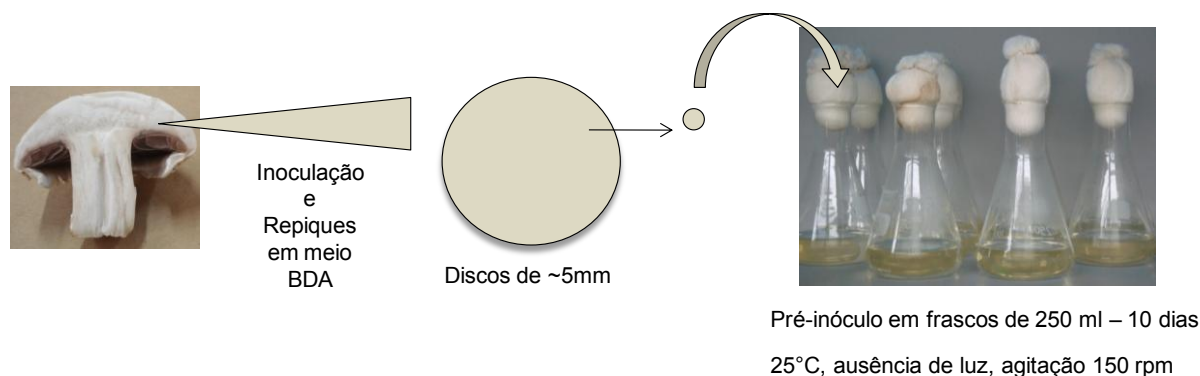


FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA INOCULAÇÃO E PRÉ-INÓCULO EM MEIO LÍQUIDO BD

Este cultivo foi incubado por 10 dias e utilizado como pré-inóculo para o meio líquido Czapeck (Tabela 3). Este meio foi selecionado após a realização de um teste inicial com três meios de cultivo. Por apresentar um crescimento ideal, em forma de *pellets*, ser composto por reagentes de fácil obtenção e baixo custo relativo, este meio de cultura foi o selecionado para a produção da biomassa micelial e dos exopolissacarídeos.

TABELA 3 – MEIOS LÍQUIDOS DE CULTURA TESTADOS\*

MEIO CZAPECK	MEIO C/N 24:1	MEIO MCM
Glucose		Glucose
1 g Extrato Levedura	Glucose	Peptona bacteriológica
NaNO <sub>3</sub>	Extrato Levedura	2g Extrato Levedura
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
MgSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
KCl	1000 ml Água destilada	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
FeSO <sub>4</sub>		1000 ml Água destilada
1000 ml Água destilada		

\*Estas soluções são autoclavadas a 121 °C por 25 min.

O pré-inóculo cultivado em meio BD por 10 dias foi utilizado para inocular o meio Capeck (Figura 6). Os cultivos no meio Czapeck foram realizados em frascos de 2000 ml contendo 1000 ml de meio, sob agitação, a 25 °C, em ausência de luz

por 14 dias. Tais condições foram determinadas por estudos anteriores realizados por Maziero (1996), e Rosado *et al.* (2003a), com outros meios de cultivo, em experimentos com outros cogumelos.

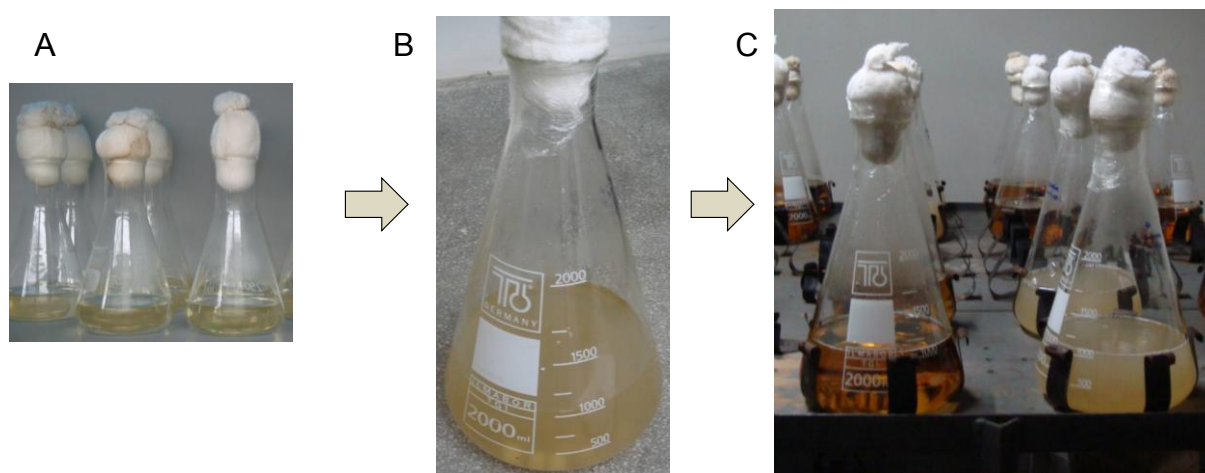


FIGURA 6 – ESQUEMA DA INOCULAÇÃO DE MEIO BD (A) PARA MEIO CZAPECK (B) E CULTURA SUBMERSA MANTIDA SOB AGITAÇÃO (C)

#### 4.4 RECUPERAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Após 14 dias de cultivo, a biomassa micelial foi separada por meio de centrifugação. O meio líquido foi concentrado a um volume reduzido e tratado com etanol (3:1, v/v), com a finalidade de separar os polissacarídeos dos oligossacarídeos. O precipitado foi separado por centrifugação, dialisado, concentrado e liofilizado. Após este processo o material foi submetido a processos de purificação.

A biomassa micelial passou por processos de extração para obtenção dos polissacarídeos.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO

Os cogumelos obtidos foram inicialmente limpos, liofilizados e triturados. O basidiocarpo foi submetido a um processo de deslipidificação (Figura 7) do material para eliminar compostos apolares de baixa massa molecular (ou molar). A extração foi realizada utilizando o solvente orgânico clorofórmio-metanol (2:1 v/v) em conjunto

extrator de Soxhlet em manta aquecida a 60°C até a exaustão, neste caso averiguado pela cor límpida do solvente.



FIGURA 7 – COGUMELOS COMO OBTIDOS DO PRODUTOR (A) SUBMETIDOS AO PROCESSO DE DESLIPIDIFICAÇÃO EM CONJUNTO EXTRATOR SOXHLET (B)

Após este procedimento, o material foi seco por evaporação do solvente e submetido ao processo de extração e purificação. Conforme segue a Figura 8.

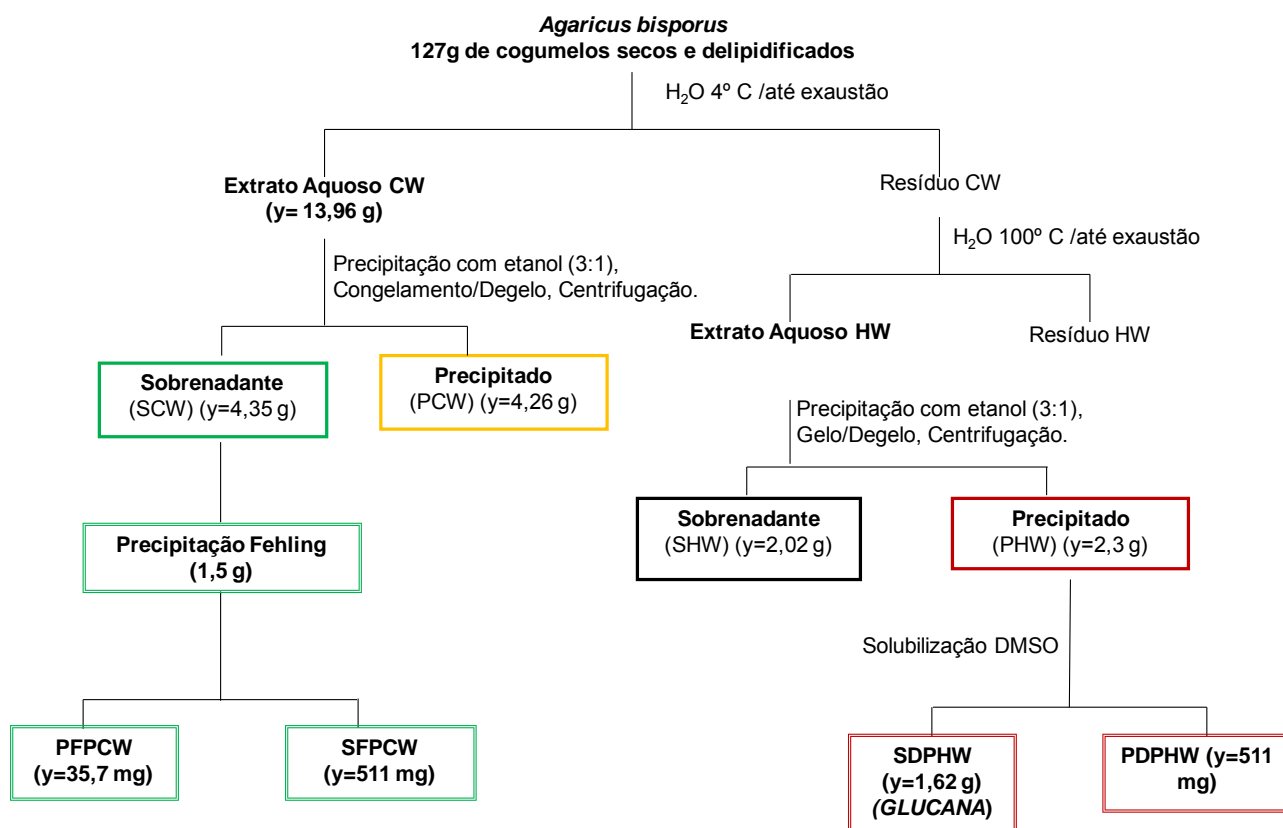


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA CORRESPONDENTE À EXTRAÇÃO DO BASIDIOCARPO DE *Agaricus bisporus*  
y = corresponde ao rendimento em peso da fração liofilizada.

#### 4.5.1 Extração Aquosa

O cogumelo, após deslipidificação e secagem, foi inicialmente submetido à extração com água destilada, a 4° C, sob agitação mecânica. O extrato foi separado do resíduo por centrifugação e submetido à extração aquosa em banho fervente.

Os extratos obtidos por estes processos foram concentrados em rotaevaporador e precipitados com etanol (v/v, 3:1), centrifugados, dialisados com membrana de limite de exclusão entre 12 e 14 kDa e liofilizados.

#### 4.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS

A purificação dos exopolissacarídeos e dos polissacarídeos obtidos das frações aquosas foi realizada por congelamento e descongelamento, precipitação por formação de complexo solúvel e insolúvel em  $\text{Cu}^{2+}$  (Precipitação com solução de Fehling), ultrafiltrações e/ou diálises em membranas, entre outros.

O processo de purificação foi monitorado através do perfil cromatográfico obtido por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS).

##### 4.6.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

A fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada e submetida ao congelamento e posterior descongelamento a temperatura ambiente. Este processo resulta na formação de um precipitado insolúvel em água fria, que foi separado por centrifugação (9000 r.p.m. por 15 min a 25 °C). Este procedimento foi repetido até que a partir do sobrenadante não se formasse mais precipitado e a partir do resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água, fosse obtido um sobrenadante límpido (GORIN; IACOMINI, 1985).

##### 4.6.2 Purificação por Precipitação Com Solução de Fehling

A solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965) é composta pelas soluções A e B. A solução A é composta de 173 g de tartarato de sódio e potássio, 125 g de hidróxido de potássio em volume suficiente de água para 500 ml. A solução B é

composta de 55,74 g de sulfato de cobre pentahidratado em volume de água suficiente para 500 ml.

As frações polissacarídicas submetidas a este processo foram inicialmente solubilizadas na solução A, seguida da adição de mesmo volume da solução B. Após intensa agitação, o material foi mantido sob refrigeração ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) por 12 horas.

O precipitado formado foi separado por centrifugação, sendo as frações resultantes (precipitado e sobrenadante) neutralizadas com ácido acético e dialisadas contra água corrente (aproximadamente 48 horas). Em seguida, estas foram tratadas com resina catiônica fortemente ácida e novamente dialisadas. Estas frações foram, então, concentradas em rotaevaporador, congeladas e liofilizadas.

#### 4.6.3 Purificação dos Polissacarídeos Por Diálise em Membranas

As frações que se mostraram heterogêneas foram submetidas ao procedimento de purificação por meio de diálise fechada, contra água destilada, utilizando membrana com diferentes limites de exclusão (de 50 a 1.000.000 de kDa). Durante a diálise, o material foi mantido sob agitação magnética, sendo a água de diálise trocada sucessivas vezes, e o processo interrompido quando a água de diálise apresentou reação negativa para a presença de carboidratos, por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

#### 4.6.4 Purificação dos Polissacarídeos por Solubilização em DMSO

Frações insolúveis em água obtidas de fracionamentos anteriores que permaneceram heterogêneas foram submetidas ao processo de solubilização em DMSO. A amostra foi ressuspensa em volume mínimo de DMSO, aquecida durante 4 h a  $60^{\circ}\text{C}$ , sob agitação em agitador magnético e posteriormente centrifugada, gerando um sobrenadante e um precipitado.

### 4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

A caracterização estrutural dos polissacarídeos foi realizada por meio de metodologias e experimentos que fornecem dados que indicam: composição monossacarídica, homogeneidade, tipo de ligação, massa molar, grau de

ramificação, dentre outros. Desta forma, foi possível determinar a estrutura fina destes polímeros.

Abaixo estão descritas as metodologias utilizadas, as quais são baseadas em métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

#### 4.7.1 Composição Monossacarídica

As frações obtidas foram derivatizadas por hidrólise ácida total, seguida de redução por  $\text{NaBH}_4$  e acetilação com a formação de acetatos de alditóis para a determinação da composição monossacarídica.

A hidrólise ácida total foi realizada com aproximadamente 1 mg de amostra com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, por 8 horas a 100 °C ou em 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 1 M, *overnight* a 100 °C. Após resina fortemente ácida foi adicionada, o material foi filtrado e o ácido bórico resultante removido como borato de trimetila, por repetidas evaporações com metanol.

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio até pH 9-10, mantidos a temperatura ambiente por 15 horas. Após este período, o material foi neutralizado com resina catiônica, filtrado e co-distilado com metanol até total remoção do ácido bórico, na forma de borato de trimetila (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v/v), à temperatura ambiente, *overnight* (em torno de 12 horas). A reação foi interrompida com adição de gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio. A remoção da piridina residual na fase clorofórmica foi feita com solução de sulfato de cobre 5%. Sulfato de sódio anidro foi adicionado à fase clorofórmica, o material foi filtrado com algodão e seco em temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

#### 4.7.2 Metilação dos Polissacarídeos e Hidrólise de Saeman

Para a metilação, alíquotas dos polissacarídeos (5-10 mg) foram solubilizadas em 1 ml de dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ). Após a solubilização foram adicionados 1 ml

de iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) e excesso de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) pulverizado, seguido de agitação vigorosa por 30 minutos e repouso *overnight*. O material foi, então, em banho de gelo, neutralizado com ácido acético, dialisado exaustivamente contra água corrente e liofilizado. Todo este processo foi repetido para garantir a total metilação dos polissacarídeos (CIUCANU; KEREK, 1984).

A hidrólise total dos polissacarídeos metilados foi realizada com 0,5 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 72% (p/v), em banho de gelo por 1 hora. Seguido por diluição com 4 ml de água destilada e aquecido a 100 °C (10-18h) (SAEMAN *et al.*, 1954).

Após a hidrólise, o material foi neutralizado com carbonato de bário, centrifugado e reduzido com borohidreto de sódio deuterado ( $\text{NaB}^2\text{H}_4$ ), e acetilado como citado anteriormente. Os acetatos de alditóis parcialmente O-metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSON, *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).



## 4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.8.1 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar

As análises de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizadas por de cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS).

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ )  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , para uma concentração final de  $1 \text{ mg/ml}$  e filtradas através de membrana de acetato de celulose com porosidade de  $0,22 \mu\text{m}$ .

Após estes procedimentos, as amostras foram analisadas por (HPSEC-MALLS) equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos, modelo DAWN DSP-F, WYATT TECHNOLOGY. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ , respectivamente. O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ )  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  contendo  $\text{NaN}_3$ ,  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , com fluxo de  $0,6 \text{ ml/min}$ , monitorados por uma de bomba peristáltica WATERS 515.

### 4.8.2 Determinação da Composição Monossacarídica e dos Acetatos de Alditóis O-metilados

A determinação da composição monossacarídica e dos derivados per-O-metilados foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso VARIAN, modelo 3.300 acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida ( $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.}$ ) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas com a temperatura inicial de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  (mantida por  $1 \text{ min}$ ), com aumento gradual de  $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  até  $210 \text{ }^\circ\text{C}$  (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou  $220 \text{ }^\circ\text{C}$  (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de  $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ .

#### 4.8.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Foram realizadas análises espectroscópicas de RMN-<sup>13</sup>C, RMN-<sup>13</sup>C-DEPT e <sup>13</sup>C, em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400.

As análises foram feitas a 30 °C, 50 °C ou 70 °C, com solvente D<sub>2</sub>O (óxido de deutério) ou Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (dimetilsulfóxido deuterado), dependendo da solubilidade da amostra. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) das amostras solúveis em D<sub>2</sub>O foram expressos em ppm relativos ao sinal de <sup>13</sup>C da acetona em  $\delta$  30,20 e das amostras solúveis em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> aos sinais do próprio em  $\delta$  39,5 (<sup>13</sup>C).

#### 4.9 PREPARO DA AMOSTRA PARA ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

##### 4.9.1 Hidrólise Ácida Parcial e Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

A amostra de interesse foi submetida a uma hidrólise na qual foram coletadas alíquotas em diferentes tempos, buscando obter um *pool* de oligossacarídeos de diferentes tamanhos. A hidrólise foi realizada com TFA 0,1 M, a 100 °C e as alíquotas foram retiradas nos tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Para separar os oligossacarídeos dos polissacarídeos, foi realizada a precipitação com etanol (3:1, v/v), seguida de uma centrifugação. Sendo assim, a porção etanólica, sobrenadante da centrifugação, contém os oligossacarídeos formados da hidrólise, enquanto que no precipitado permanecem os polissacarídeos que não foram hidrolisados. A confirmação da hidrólise e do tamanho dos oligossacarídeos resultantes foi averiguada por TLC, em cromatoplaça de sílica-gel 60G (Merck) e o solvente utilizado foi propanol, acetato de etila, ácido acético e água (4:2:2:1). Posteriormente, a TLC foi revelada (mistura orcinol :H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

##### 4.9.2 Teste da Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória

Os ensaios biológicos foram realizados pelo Professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e colaboradores, no Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 4.9.2.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos Swiss (25-35 g), os quais foram mantidos em sala climatizada ( $23 \pm 2$  °C), em ciclos de claro-escuro de 12 horas com ração e água ad libitum. Os animais foram mantidos no laboratório para aclimação, por no mínimo, duas horas antes dos testes e utilizados uma única vez para os experimentos. Os ensaios foram realizados de acordo com as normas vigentes de cuidados com animais utilizados em laboratórios e sobre ética em experimentos sobre dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina. O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos dos tratamentos.

#### 4.9.2.2 Constrição Abdominal, Permeabilidade Capilar Peritoneal e Infiltração de Leucócitos

As constrições abdominais foram induzidas de acordo com procedimentos previamente descritos (LUCENA et al., 2007), em que a resposta à injeção intraperitoneal (i.p.) de solução aquosa de ácido acético a 0,6% resulta na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores. Inicialmente, foi administrada nos animais, por via intravenosa, uma solução do corante Evans Blue 2,5% (10 ml/kg), utilizada como marcador da permeabilidade capilar peritoneal. Após uma hora, foi administrado o polissacarídeo (0,01-10 mg/kg, i.p.) ou o pool de oligossacarídeos (0,1-10 mg/kg, i.p.) e nos animais controle negativo, um volume similar de salina (10 ml/kg, i.p.), a qual foi utilizada também para diluir as amostras em estudo.

Os animais foram, então, mantidos individualmente em cilindros de vidro de 20 cm de diâmetro e o número de constrições abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada pela redução do número de contorções abdominais (diferença entre o controle negativo e animais pré-tratados com amostra). Imediatamente após os testes, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi exposta e lavada com 1 ml de salina estéril contendo heparina (25

UI/ml) e o fluido peritoneal coletado com pipetas automáticas. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico, após diluição do fluido peritoneal com solução de Türk (1:20), uma alíquota do material coletado (700 µl) foi centrifugada (1000 rpm por 10 min) e a absorbância do sobrenadante foi lida a 550 nm com analisador de ELISA. A permeabilidade capilar peritoneal induzida por ácido acético foi expressa em relação ao extravasamento do corante Evan's Blue (µg/ml), de acordo com a curva padrão obtida por Lucena e colaboradores (2007) (Figura 9).

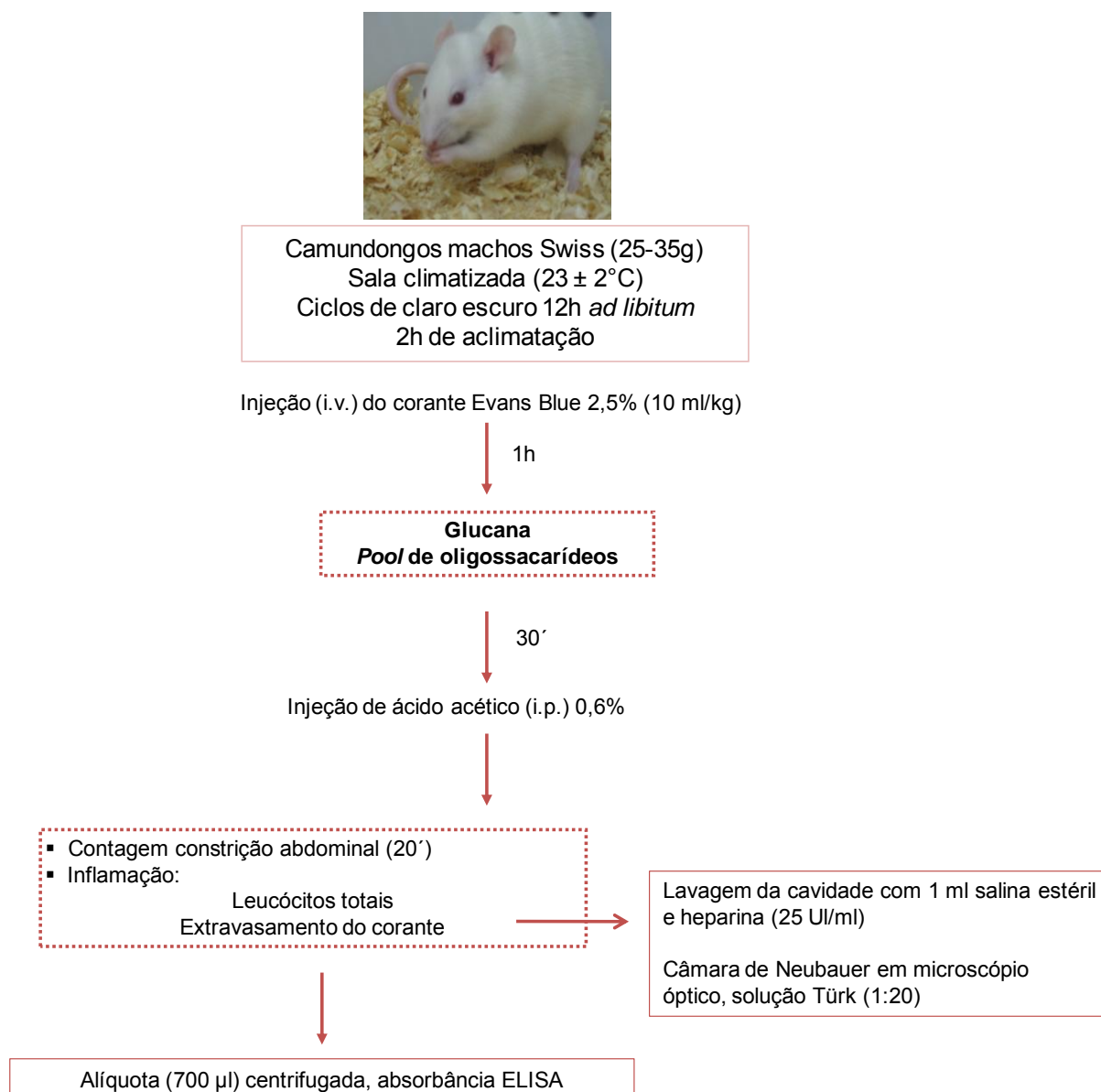


FIGURA 9 – ESQUEMA GERAL DO EXPERIMENTO CONDUZIDO DESCRITO NO ITEM 4.9.2.2

#### 4.9.2.3 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média, exceto os valores de  $DI_{50}$  (dose de amostra que reduziu a contorção abdominal, permeabilidade capilar peritoneal ou a infiltração de leucócitos em 50% em relação grupo controle negativo), que foram apresentados como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos pelo método de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA). As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os com  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cogumelos obtidos foram inicialmente limpos, liofilizados e triturados. De acordo com dados obtidos na literatura, *Agaricus bisporus* foi submetido a um processo de deslipidificação do material para eliminar compostos apolares de baixa massa molecular (ou molar). A extração foi realizada utilizando o solvente orgânico clorofórmio-metanol (2:1 v/v) em conjunto extrator de Soxhlet em manta aquecida a 60°C até a exaustão, neste caso averiguado pela cor límpida do solvente. Os dados relativos ao peso em percentagem removidos após liofilização e deslipidificação encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 – TEOR DE ÁGUA E COMPOSTOS APOLARES EM *Agaricus bisporus*

Teor de água e Compostos apolares	Material <i>in natura</i> sólido 100 %
Teor de água retirado após liofilização	92%
Biomassa após liofilização	8%
Teor de compostos apolares	15%
Biomassa deslipidificada	85%

As extrações referentes ao corpo de frutificação foram realizadas conforme descritas nos itens 4.5. As extrações aquosas foram realizadas até a exaustão, sendo em seguida realizada a centrifugação para retirada de resíduos, precipitação etanólica (3:1 v/v) do extrato, concentração em rota-evaporador para diminuição do volume e liofilização. O extrato obtido da extração aquosa a frio foi denominado CW e o extrato aquoso quente foi denominado HW.

Os extratos foram então submetidos a fracionamento por congelamento e descongelamento originando as frações de sobrenadante e precipitado (SCW/SHW

e PCW/PHW, respectivamente) para cada extrato. Os rendimentos destas frações encontram-se dispostos na Tabela 5.

TABELA 5 – FRAÇÕES E RENDIMENTOS DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO

Material submetido a extração aquosa ~127 g	
Fração/ Extrato	Peso do material (g)
Extrato Aquoso Frio (CW)	13,96
Sobrenadante Congelamento/Degelo (SCW)*	4,35
Precipitado Congelamento/Degelo (PCW)**	4,26
Extrato Aquoso Quente (HW)	4,32
Sobrenadante Congelamento/Degelo (SHW)*	2,02
Precipitado Congelamento/Degelo (PHW)**	2,30

\*Corresponde a frações solúveis em água

\*\*Corresponde a frações insolúveis em água

### 5.1 EXTRATO AQUOSO FRIO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO

A fração obtida a partir da extração aquosa CW, após processo de congelamento e degelo, gerou uma fração solúvel (SCW) e uma fração insolúvel (PCW). A fração SCW após submetida aos procedimentos de hidrólise, acetilação e análise por GC-MS, apresentou em sua composição monossacarídica manose (7%), galactose (9%) e glucose (84%). Esta fração foi submetida ao processo de precipitação por Fehling, dando origem a uma fração solúvel (SFSCW) e outra insolúvel (PFSCW). Um esquema geral da purificação da fração encontra-se descrito na Figura 10.

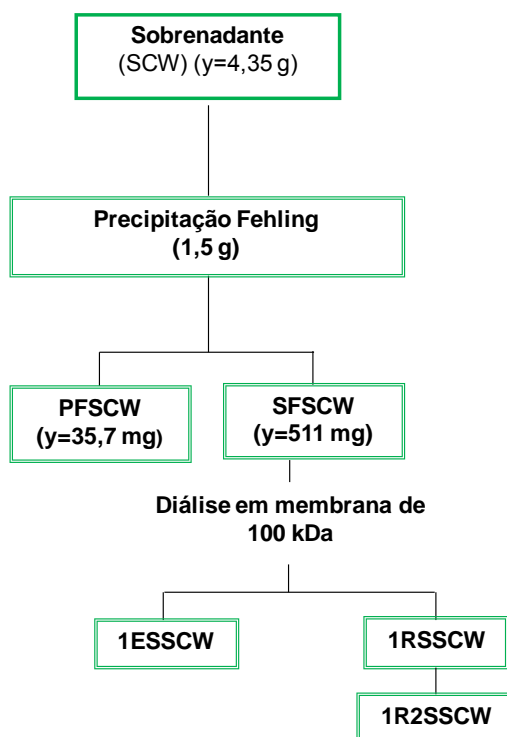


FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO SOLÚVEL DA EXTRAÇÃO AQUOSA FRIA

A fração SFSCW quando analisada por HPSEC-MALLS, apresentava-se heterogênea, como pode ser verificado pelo perfil de eluição presente na Figura 11A. Assim sendo, esta fração foi submetida à purificação por diálise em sistema fechado com água destilada, utilizando uma membrana com limite de exclusão de 100 kDa. Resultaram deste procedimento uma fração eluída (1ESSCW) e uma fração retida (1RSSCW), a qual foi submetida novamente a análise por HPSEC-MALLS, demonstrando um perfil homogêneo (1R2SSCW) (Figura 11B). A seqüência de purificação por membrana em diálise fechada encontra-se na Figura 11, a qual exhibe os perfis de eluição obtidos no experimento de HPSEC-MALLS após cada etapa de purificação.



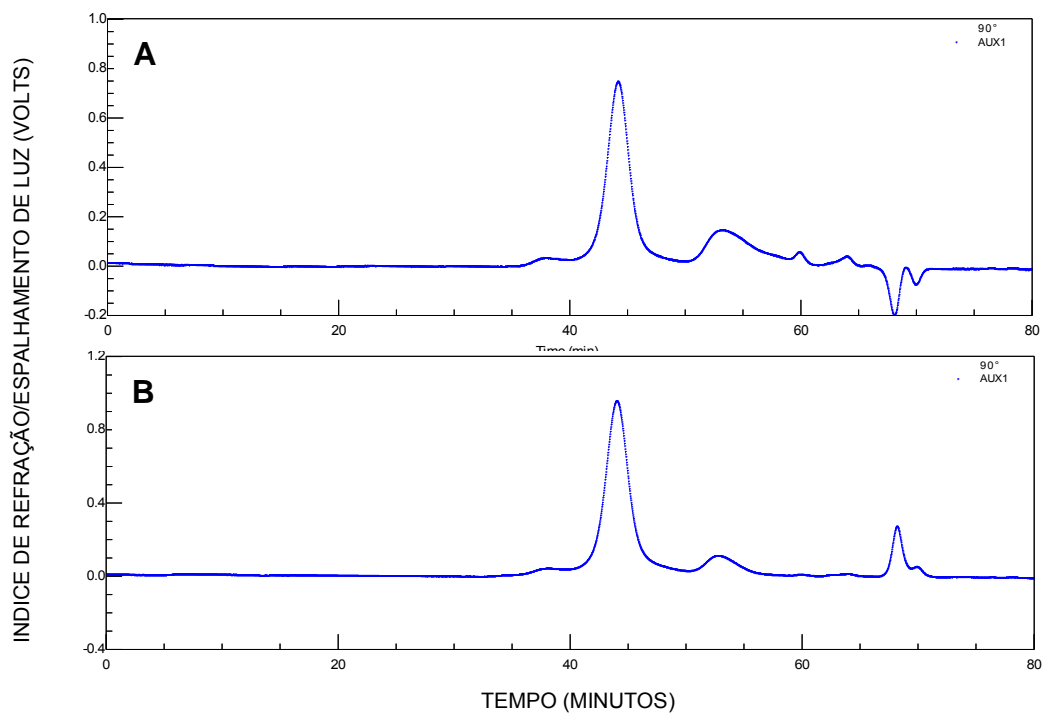


FIGURA 11 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS OBTIDOS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SFSCW (A); 1R2SSCW (B)

Esta fração foi submetida ao processo de metilação, originando seus derivados alditóis acetatos parcialmente *O*-metilados. Estes foram analisados em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução e acetilação. Os resultados deste experimento encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 1R2SSCW

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> metilados <sup>(1)</sup>	Mol%	Tipo de ligação <sup>(2)</sup>
2,3,4,6 – Me <sub>4</sub> – Glcp	9	Glcp(1→
2,4,6 – Me <sub>3</sub> – Glcp	18	3→)-Glcp(1→
2,3,4 – Me <sub>3</sub> – Glcp	50	6→)-Glcp(1→
2,3,4 – Me <sub>3</sub> – Galp	8	6→)-Galp(1→
2,4 – Me <sub>2</sub> – Glcp	15	3,6→)-Glcp(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Os dados de metilação desta fração são coerentes quando analisados comparativamente com o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 12). O sinal em  $\delta$  103,13 corresponde ao C-1 das unidades de  $\beta$ -Glc $\rho$ . O sinal em  $\delta$  68,96 corresponde ao C-6 substituído das unidades de Glc $\rho$ , conforme confirmado pela inversão do sinal obtido no experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT (1). O sinal presente em  $\delta$  66,72 pode corresponder ao C-6 de Gal $\rho$  substituído (CARBONERO *et al.*, 2008), também confirmado por  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT (2). O sinal em  $\delta$  60,82 pode ser atribuído ao C-6 das unidades de Glc $\rho$  substituídos (3). Os sinais detectados de  $\delta$  69,98 a 75,88 podem ser atribuídos aos outros carbonos das unidades de Gal $\rho$ . A presença do sinal em  $\delta$  85,0 indica a substituição de C-3 das unidades de Gal $\rho$ .

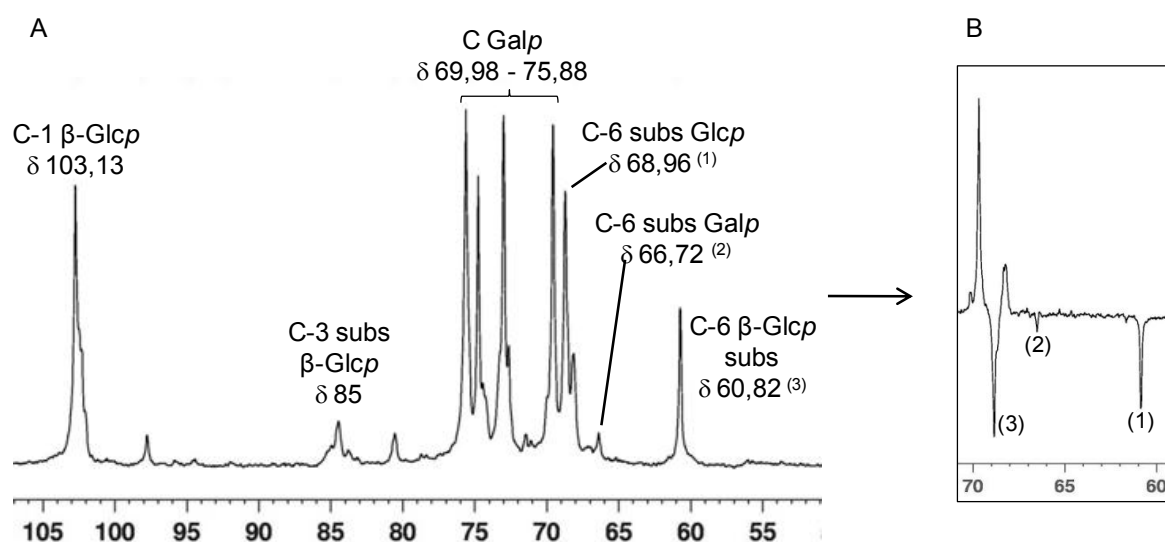


FIGURA 12 – ESPECTROS  $^{13}\text{C}$ -RMN DA FRAÇÃO 1R2SSCW EM  $\text{D}_2\text{O}$  A  $70^\circ\text{C}$ : (A)  $^{13}\text{C}$ -RMN COM POSSÍVEIS ASSINALAMENTOS; (B) SINAIS DE  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT, DEMONSTRANDO A INVERSÃO DOS SINAIS EM (1), (2) E (3) CORRESPONDENTES AOS SINAIS OBTIDOS NO ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$ -RMN

É possível que esta estrutura seja composta por uma cadeia principal constituída unidades de  $\beta$ -D-Glc $\rho$  ligadas (1 $\rightarrow$ 6), sendo que as unidades podem estar substituídas em O-3 por unidades de Gal $\rho$  O-6-substituídas por

terminais não redutores de  $\beta$ -D-Glcp ou apenas por unidades de Glcp O-3-substituídas por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Glcp (Figura 13).

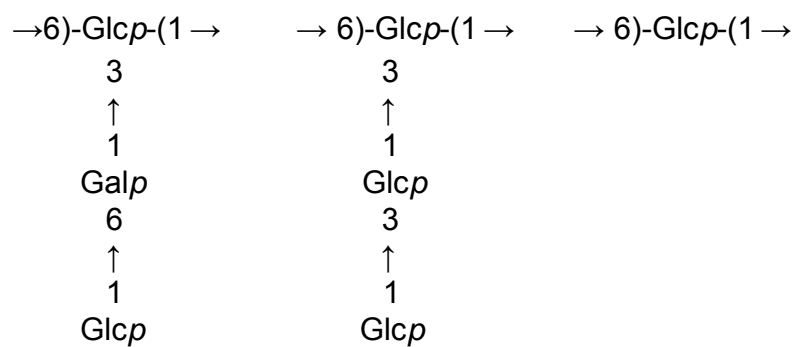


FIGURA 13 – ESTRUTURA PROPOSTA PARA A FRAÇÃO 1R2SSCW, COM BASE NOS RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS REALIZADOS

## 5.2 EXTRATO AQUOSO QUENTE DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO

A fração insolúvel PHW foi submetida a uma extração com DMSO, conforme descrito no item 4.6.4. Este material foi centrifugado originando uma fração solúvel e outra insolúvel, SDPHW e PDPHW, respectivamente (Figura 14). A composição monossacarídica de SDPHW apresentou um alto teor de glucose (98%), sugerindo a presença de uma glucana.

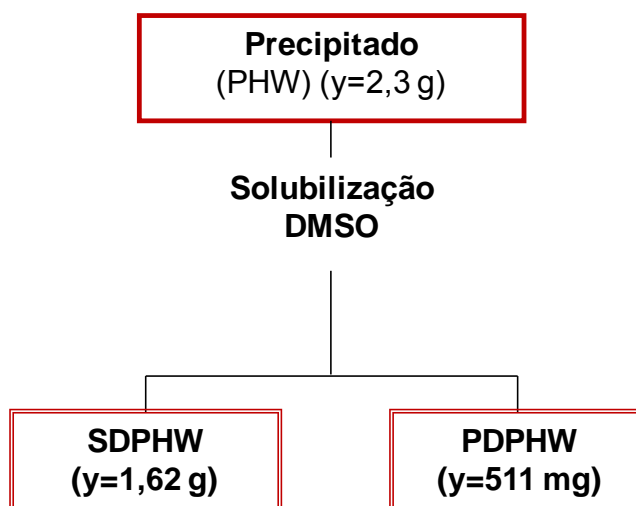


FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DA EXTRAÇÃO AQUOSA QUENTE

Esta fração foi então submetida a análise por RMN-<sup>13</sup>C (Figura 15A). O sinal presente na região anomérica em  $\delta$  102,14 corresponde ao C1 da glucose, sugerindo a configuração  $\beta$ . Os demais sinais correspondem aos seguintes carbonos:  $\delta$  75,50/C3,  $\delta$  74,42/C5,  $\delta$  72,37/C2,  $\delta$  68,99/C4,  $\delta$  67,44/C6, em concordância com o trabalho de Bi e colaboradores (2009), no qual também foi descrito a presença de uma  $\beta$ -glucana, porém presente no ascomiceto *Bulgaria inquinans*.

O experimento de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (Figura 15B) apresentou a inversão do sinal em  $\delta$  68,10, confirmando CH<sub>2</sub>-C6 ligado, indicando, portanto que este carbono encontra-se substituído, participando da ligação da cadeia deste polímero. Com base nos dados apresentados é possível sugerir que a

estrutura presente na fração SDPHW trata-se de uma  $\beta$ -glucana linear com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 6) (Figura 16).

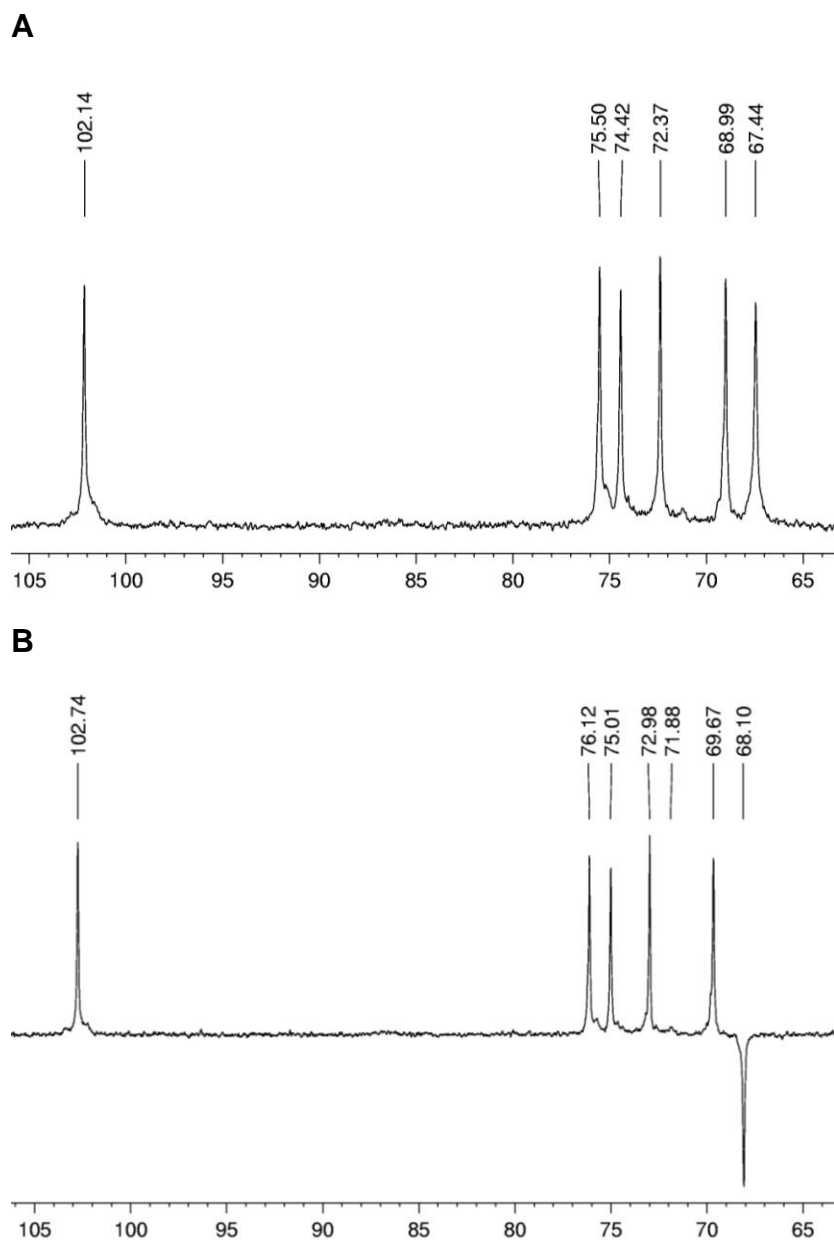


FIGURA 15 – ESPECTROS DE  $^{13}\text{C}$ -RMN (A) E  $^{13}\text{C}$ -RMN – DEPT(B) DA FRAÇÃO SDPHW EM DMSO A 70° C

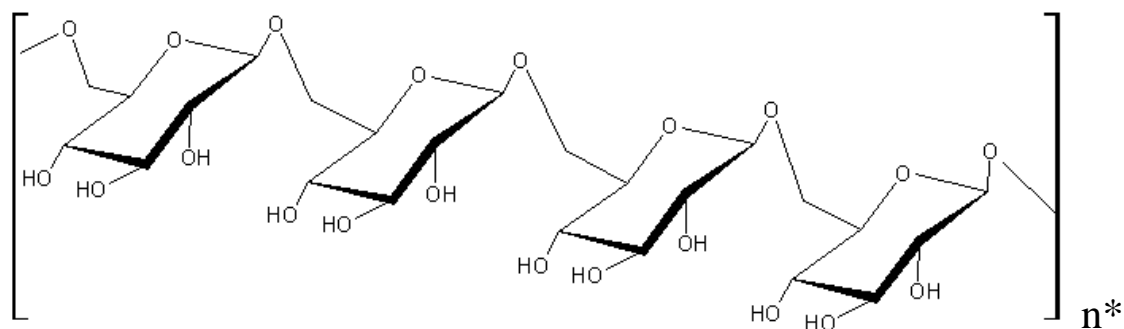


FIGURA 16 – ESTRUTURA DA  $\beta$ -D-GLUCANA COM LIGAÇÕES (1 $\rightarrow$ 6), SDPHW

### 5.2.1 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória

As atividades antinociceptiva e antiinflamatória foram testadas para a glucana linear isolada no presente trabalho. O objetivo desta etapa foi justamente de testar uma disponibilidade de moléculas de diferentes tamanhos, porém oriundas de uma mesma estrutura, a fim de se estabelecer um comparativo entre o tamanho da molécula e sua ação no teste de atividade biológica. Sendo assim, foi realizada uma hidrólise ácida parcial, seguida de precipitação com etanol (3:1, v/v), conforme descrito no item 4.9.1, originando, então, um *pool* de oligossacarídeos da glucana obtida. A hidrólise foi realizada com TFA 0,1M, a 100°C, e alíquotas foram retiradas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Nos diferentes tempos de hidrólise foram obtidos diferentes tamanhos de oligossacarídeos, conforme comprovado pelo por TLC, utilizando como padrões oligossacarídeos de tamanhos conhecidos (Figura 17A). Determinou-se a partir deste experimento que o *pool* de oligossacarídeos utilizado seria o obtido na hidrólise ácida parcial realizada por 90 minutos, com 140 mg da glucana.

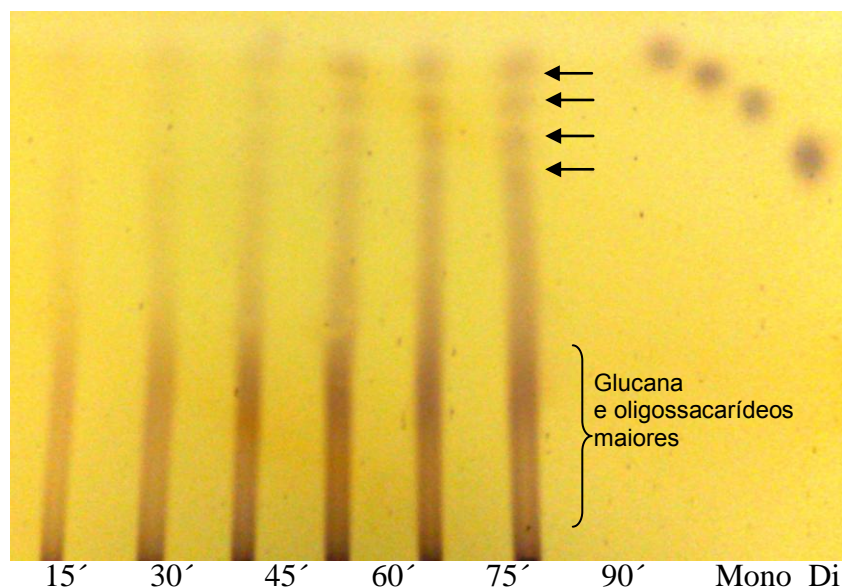
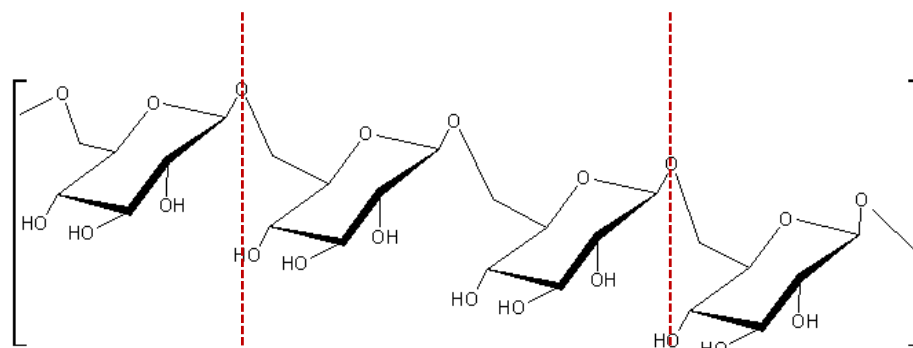
**A****B**

FIGURA 17 – (A) CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO MATERIAL RESULTANTE DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL NOS DIFERENTES TEMPOS (15', 30', 45', 60', 75', 90') E PADRÕES CONHECIDOS DE OLIGOSSACARÍDEOS; (B) SIMULAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HIRDRÓLISE PARCIAL DA MOLÉCULA

← As setas indicam a formação dos oligossacarídeos.

O método utilizado para o presente estudo consiste na administração de ácido acético (0,6% i.p.) aos camundongos, causando lesão aos tecidos e desenvolvimento de uma resposta inflamatória e dolorosa. A sensação dolorosa é observada por meio de contrações abdominais exercidas pelos camundongos logo após a injeção do ácido e o efeito analgésico é mensurado nos animais pela diminuição do número dessas contrações durante um período de 20 min.

A resposta inflamatória é avaliada tanto pelo aumento na permeabilidade capilar peritoneal, quanto pela migração de leucócitos à cavidade peritoneal. Após o experimento, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi exposta a fim de observar o extravasamento do corante e fazer a contagem de leucócitos presentes no tecido.

#### 5.2.1.1 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória da Glucana

A administração intraperitoneal da glucana íntegra (SDPHW), foi testada nas doses de 0,01, 0,1, 1 e 10 mg/kg, ministrada 30 minutos antes a injeção de ácido acético 0,6%, o qual age como agente irritante.

O polissacarídeo causou uma inibição dose-dependente à resposta nociceptiva induzida pelo ácido alcançando uma inibição máxima de  $72 \pm 5\%$  na dose de 1 e 10 mg/kg (Figura 8). A dose necessária calculada da glucana para inibir em 50% as contorções ( $ID_{50}$ ) foi de 0,14 (0,04 – 0,52) mg/kg, equivalente a 9,8 mg em 70 kg, demonstrando, portanto, uma alta potência para nocicepção.

É possível inferir pelo resultado obtido (Figura 18A) que a dose administrada de 0,1 mg/kg, i.p. é dose dependente quando comparados os resultados obtidos para as doses de 1 mg/kg, i.p. e frente ao controle negativo (Figura 18C). O aumento da dose de 1 para 10 mg/kg, i.p., não resultou em um aumento da resposta nociceptiva. Pode-se afirmar, desta forma, que a dose necessária para se atingir o efeito nociceptivo máximo, neste ensaio, é de 1 mg/kg. Em comparação com dados de estudos anteriores obtidos por meio dos mesmos experimentos com outros polissacarídeos, a glucana estudada no presente trabalho possui uma atividade significativa quanto à atividade nociceptiva, demonstrando uma alta potência farmacológica.

A glucana também foi capaz de inibir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (migração de células totais), porém sem provocar a diminuição da permeabilidade capilar (extravasamento do corante Evan's Blue) induzidas pelo ácido acético (Figura 18B e 18C), ou seja, conseguiu promover a atividade de apenas um dos parâmetros mensuráveis para a resposta antiinflamatória. Estes dados indicam, portanto, que ocorre uma resposta acentuada e dose-dependente da resposta nociceptiva induzida pela administração de ácido acético e uma resposta antiinflamatória por uma das vias testadas.



Para a inibição da migração de leucócitos totais, pode-se observar (Figura 18B) que já em uma dose de 0,01 mg/kg, ocorreu uma inibição acentuada, em torno de 50%. Quando ministrada uma dose de 10 mg/kg, para este mesmo experimento, ocorreu um aumento da inibição da migração de leucócitos para cerca de 70%, que comparada a dose de 0,01 mg/kg, é 20% mais potente. O aumento da migração de leucócitos para a cavidade intraperitoneal na dose de 0,1 mg/kg pode ter ocorrido em decorrência da utilização de um número de animais menor para a realização do experimento, comprometendo a análise estatística do resultado obtido.

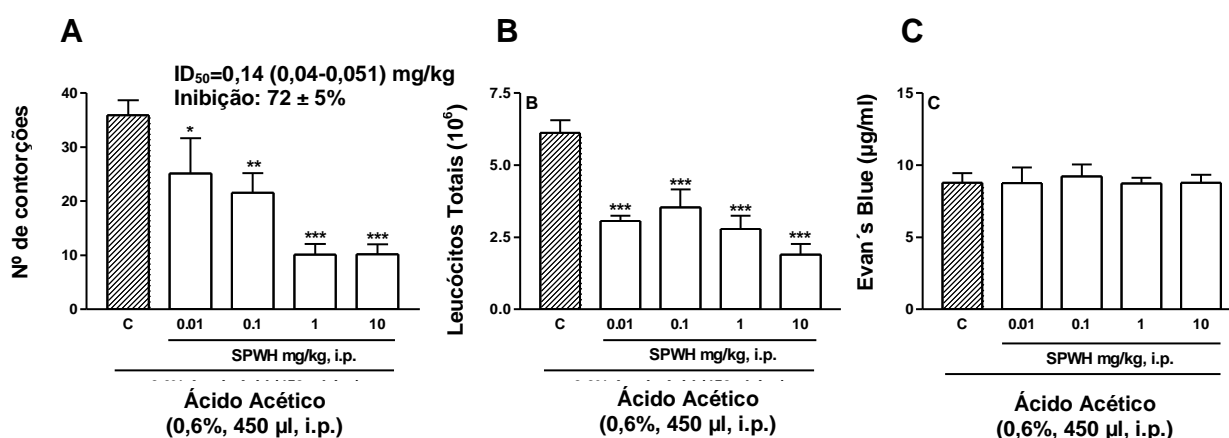


FIGURA 18 – EFEITO DA GLUCANA (SDPHW) (0,01-10 mg/kg, i.p.) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR INJEÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 0,6% EM CAMUNDONGOS (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE DE EVAN'S BLUE (C)

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão;  $n = 4-10$  por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. C (controle), ANOVA seguido de teste de Neuman-Keuls.

### 5.2.1.2 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória do *Pool* de Oligossacarídeos

A administração intraperitoneal do *pool* de oligossacarídeos, foi testada nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, ministrada 30 minutos antes a injeção de ácido acético, o qual age como agente irritante.

O *pool* de oligossacarídeos causou uma inibição dose-dependente da resposta nociceptiva induzida pelo ácido alcançando uma inibição máxima de  $61 \pm 10\%$  na dose de 10 mg/kg (Figura 19). A dose necessária calculada do *pool* de oligossacarídeos necessária para inibir em 50% as contorções ( $ID_{50}$ ) foi de 3,9 (0,1 –

21,2) mg/kg. Isto significa que esta fração é menos potente farmacologicamente quando comparada como a testada anteriormente.

Esta fração também foi capaz de inibir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (migração de células totais), contudo, de uma maneira independente da dose. Novamente, a inibição da migração dos leucócitos ocorreu sem a diminuição da permeabilidade capilar (indicada pelo extravasamento do corante Evan's Blue) induzidas pelo ácido acético (Figura 19A e 19B).

Estes dados indicam, portanto, que o *pool* de oligossacarídeos apresenta efeito antinociceptivo dose dependente e efeito anti-inflamatório, mas este último independe da dose utilizada.

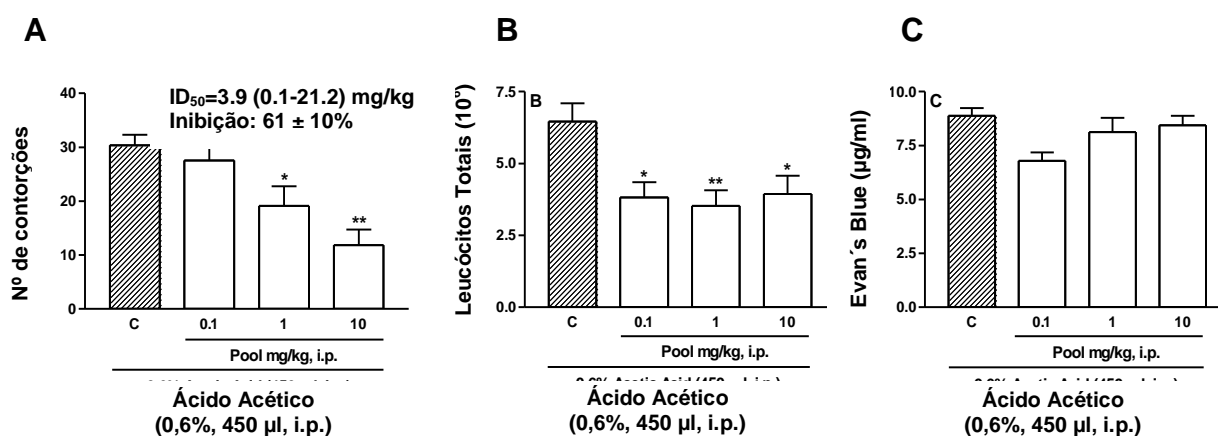
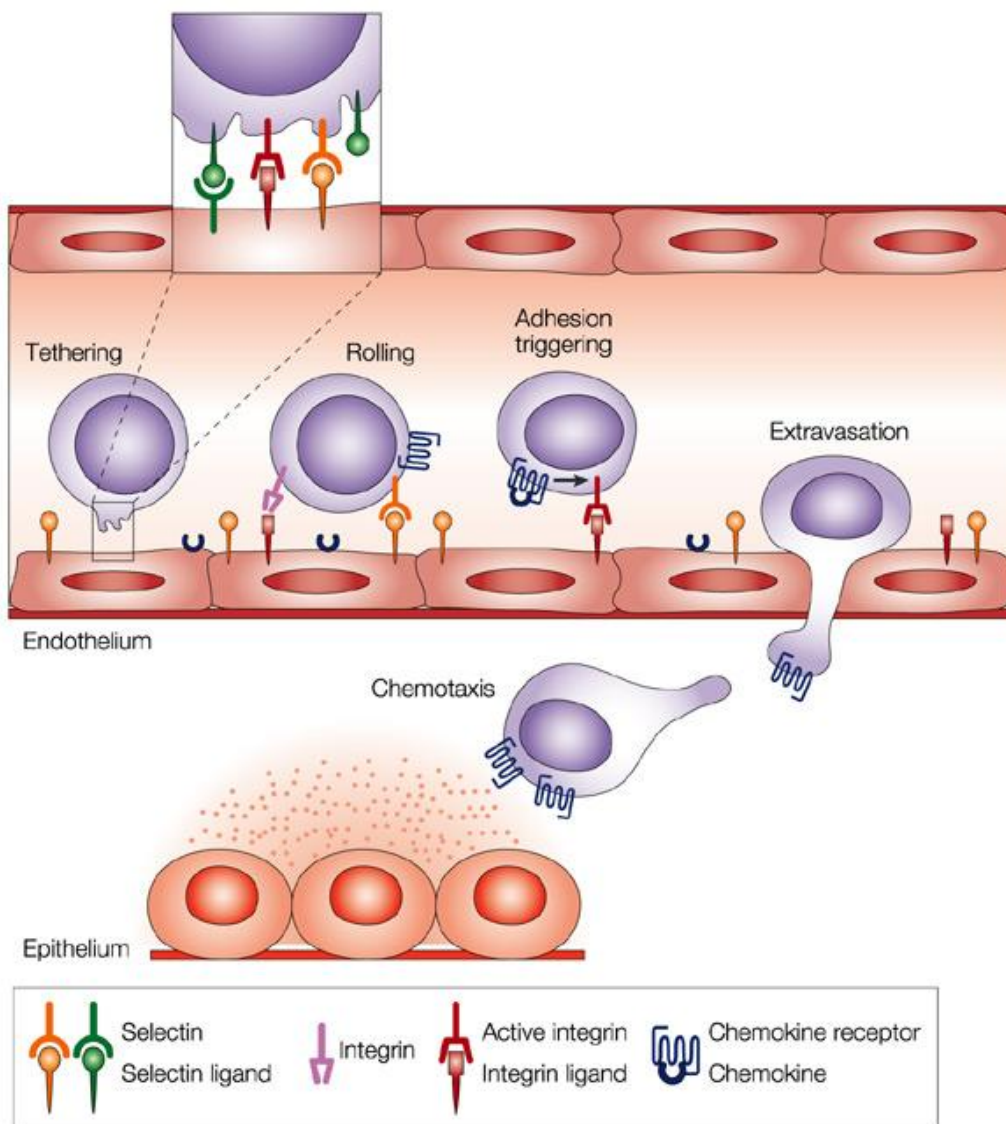


FIGURA 19 – EFEITO DO *POOL* DE OLIGOSSACARÍDEOS (0,01- 10 mg/kg, i.p.) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR INJEÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 0,6% EM CAMUNDONGOS (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE DE EVAN'S BLUE (C)

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 4-10 por grupo. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 vs. Controle (C), ANOVA seguido de teste de Neuman-Keuls.

A diminuição da migração de leucócitos seria comparável com a ação da dexametasona, substância que inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem atrair leucócitos para os tecidos que requerem uma resposta, fenômeno denominado quimiotaxia (Figura 20). Por sua vez, não ocorreu uma diminuição da permeabilidade capilar, comparável com a ação da indometacina, a qual inibe a produção de prostaglandinas, diminuindo a permeabilidade capilar (VINEGAR *et al.*, 1979).



Nature Reviews | Immunology

Fonte: Nature Reviews Immunology 3, 822-829 (October 2003)

## FIGURA 20 – ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS OU QUIMIOCISE

As amostras testadas demonstraram uma ação similar, mas a resposta mais potente contra a dor (antinociceptiva) foi a da glucana íntegra. Neste caso em específico, o comparativo evidenciou uma pequena diferença da atividade testada, porém uma diferença significativa na dose necessária para se atingir um resultado semelhante.

As atividades testadas no presente trabalho vêm sendo estudadas recentemente para polissacarídeos isolados de basidiomicetos. Carbonero e

colaboradores (2008) demonstraram a inibição total da nocicepção com um dose de 100 mg/kg, inviável em seres humanos, de uma fucomanogalactana isolada de *Lentinus edodes*. Este polímero foi, também, capaz de diminuir a permeabilidade capilar peritoneal em 76% e inibiu completamente a infiltração leucocitária, ou seja, apresentou atividade antiinflamatória, nesta mesma dose.

Uma manogalactana com cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Galp (1,6) e 3-O-Me-  $\alpha$ -D-Galp, sendo parcialmente substituída em O-2 apenas por terminais não redutores de Manp, isolada do basidioma de *Pleurotus pulmonarius* também foi testada para estas atividades. Esta molécula inibiu em 93% a nocicepção induzida por ácido acético com a dose de 30 mg/kg ( $DI_{50}$  = 16,2 mg/kg) e não apresentou atividade anti-inflamatória (SMIDERLE *et al.*, 2008a). Outra glucana do basidiomiceto anterior, uma  $\beta$ -glucana com cadeia principal  $\beta$ -Glc(1,3), substituída em O-6 a cada três unidades da cadeia principal por terminais não redutores de  $\beta$ -Glc também foi testada. Este polímero inibiu em 85% a nocicepção induzida por ácido acético com a dose de 3 mg/kg ( $DI_{50}$ = 1,26 mg/kg). Promoveu, também, a redução da infiltração de leucócitos (migração de célula total) induzida por ácido acético. A  $DI_{50}$  foi de 1,19 mg/kg, a inibição foi de 82% com uma dose de 3 mg/Kg. Porém, a administração desta molécula foi capaz de reduzir em apenas 37% (3 mg/kg) a permeabilidade capilar abdominal (extravasamento do corante Evans Blue) (SMIDERLE *et al.*, 2008b). Há poucos relatos sobre polissacarídeos com atividade antiinflamatória e analgésica, entretanto, deve-se considerar a diversidade de estruturas polissacarídicas existentes em basidiomicetos e, que muitas delas apresentam efeitos biológicos diversos (ZHANG *et al.*, 2007). A Tabela 7 demonstra alguns destes resultados.

TABELA 7 – POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS TESTADOS PARA ATIVIDADE ANTI-INFLAMTÓRIA E ANALGÉSICA

Cogumelo	Polissacarídeo	Anti-inflamatória	Analgésico	Dose (mg/kg)
<i>A. brasiliensis</i>	Fucogalactana	-	39 ± 8%	>100
<i>P. pulmonarius</i>	Manogalactana*	Não	93 ± 3%	30
<i>P. pulmonarius</i>	Glucana	82±6%	85 ± 5%	3
<i>Lentinus edodes</i>	Fucomanogalactana	100%	97%	100

\*Molécula naturalmente metilada

### 5.3 ISOLAMENTO E CULTIVO SUBMERSO DE *Agaricus bisporus*

O cultivo e isolamento de *Agaricus bisporus* foi realizado como descrito anteriormente e resultou em culturas axênicas deste organismo, possibilitando, subseqüentemente, o cultivo em meio submerso.

Inicialmente foi realizado um estudo para selecionar um meio ao qual o organismo se adaptasse melhor, tornando, assim, o cultivo mais eficaz. Três meios foram testados (Tabela 3), sendo que o meio selecionado foi o meio Czapeck. Os outros dois meios não foram capazes de permitir a formação de *pellets*, possivelmente por não ter quantidade suficiente de nutrientes necessários para este tipo de crescimento. Houve a preocupação de realizar este estudo inicial justamente por relatos da dificuldade do cultivo submerso de *Agaricus bisporus*.

O trabalho de Friel e McLaughlin (2000) demonstrou a natureza sensível deste cogumelo. Apesar de trabalharem com diferentes condições de cultivo em meio líquido, tiveram dificuldade na técnica de homogeneização das culturas, pois tiveram que adaptar o método comumente empregado. A formação dos *pellets* neste estudo ocorreu somente no cultivo sob agitação a 300 rpm, enquanto que a maior parte dos organismos por eles estudados eram cultivados em condições mais drásticas. A agitação utilizada para o cultivo submerso no presente trabalho foi de 150 rpm, fato que provavelmente proporcionou um melhor desenvolvimento dos *pellets*, sendo estes mais uniformes, com forma esférica e pequenas granulações na superfície (Figura 21).

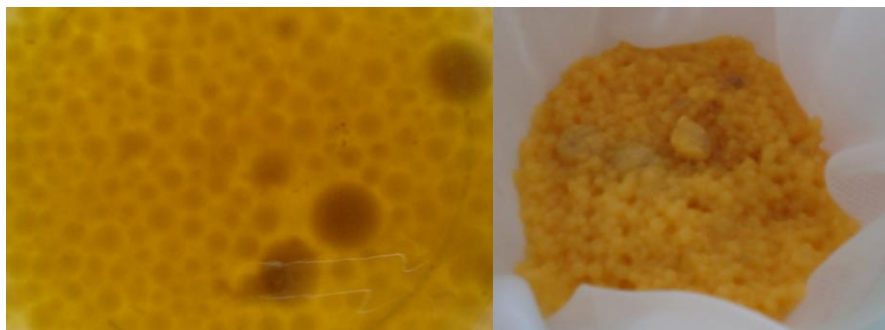


FIGURA 21 – PELLETS FORMADOS DURANTE O CULTIVO DE *Agaricus bisporus* EM MEIO LÍQUIDO

### 5.3.1 Exopolissacarídeos Obtidos por Cultivo Submerso

A obtenção dos exopolissacarídeos oriundos do cultivo submerso foi realizada conforme o descrito no item 4.3 e representado na Figura 22.

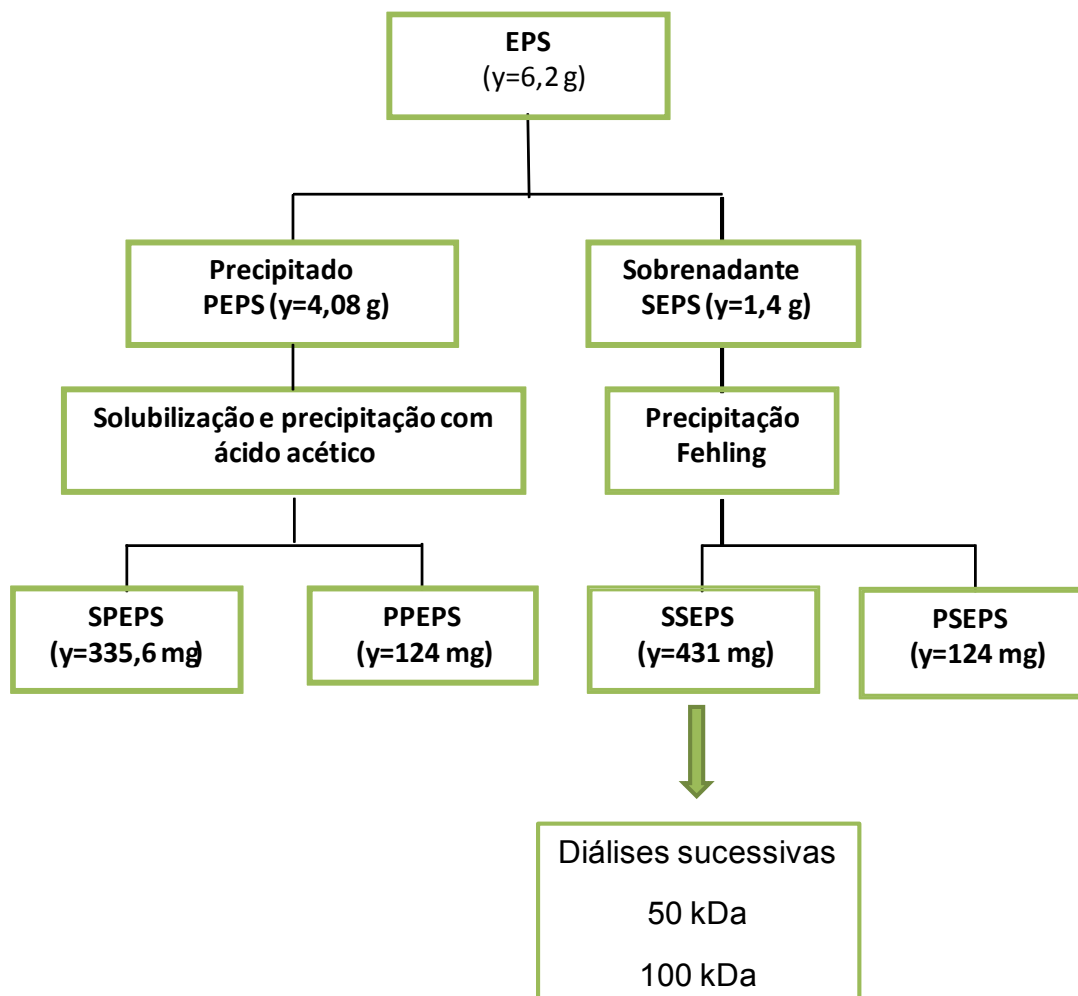


FIGURA 22 – FLUXOGRAMA CORRESPONDENTE À EXTRAÇÃO DO DO EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDO POR MEIO DE CULTIVO SUBMERSO DE *Agaricus bisporus* (y = corresponde ao rendimento em peso da fração liofilizada)

O micélio obtido por cultivo submerso foi separado por centrifugação e o meio líquido foi concentrado em rota-evaporador, seguido por precipitação etanólica (3:1 v/v), centrifugação e liofilização. O rendimento obtido do cultivo foi de 52,28 g de micélio e 6,2 g de EPS.

O EPS foi submetido a etapas de fracionamento/ purificação (Figura 22). Procedeu-se ao fracionamento por congelamento e degelo, originando duas frações, uma solúvel (SEPS) e outra insolúvel (PEPS). A fração solúvel foi submetida à precipitação por Fehling, que após a centrifugação também resultou em uma fração solúvel (SSEPS) e outra insolúvel (PSEPS).

A fração SSEPS apresentou fucose (41%), manose (36%), galactose (16%) e glucose (7%). A fração SSEPS quando analisada por HPSEC-MALLS, apresentava-se heterogênea, como pode ser verificado pelo perfil de eluição presente na Figura 23A. Assim sendo, esta fração foi submetida à purificação por diálise em sistema fechado com água destilada, utilizando uma membrana com limite de exclusão de 50 kDa. Resultaram deste procedimento uma fração eluída (5ESSEPS) e uma fração retida (5RSSEPS), a qual foi submetida novamente a análise por HPSEC-MALLS, buscando averiguar se ocorreu a purificação desta fração (Figura 23B). O perfil de eluição da fração 5RSSEPS demonstrou ainda heterogeneidade, com alguns resíduos de contaminantes, sendo, então, submetida a nova diálise em sistema fechado com água destilada, utilizando uma membrana com limite de exclusão de 100 kDa. Ao final deste procedimento, a fração retida da amostra, 1R5RSSEPS foi submetida à nova análise por HPSEC-MALLS, demonstrando um perfil homogêneo (Figura 23C). A seqüência de purificações por membranas em diálise fechada encontra-se na Figura 23, a qual exhibe os perfis de eluição obtidos no experimento de HPSEC-MALLS após cada etapa de purificação.

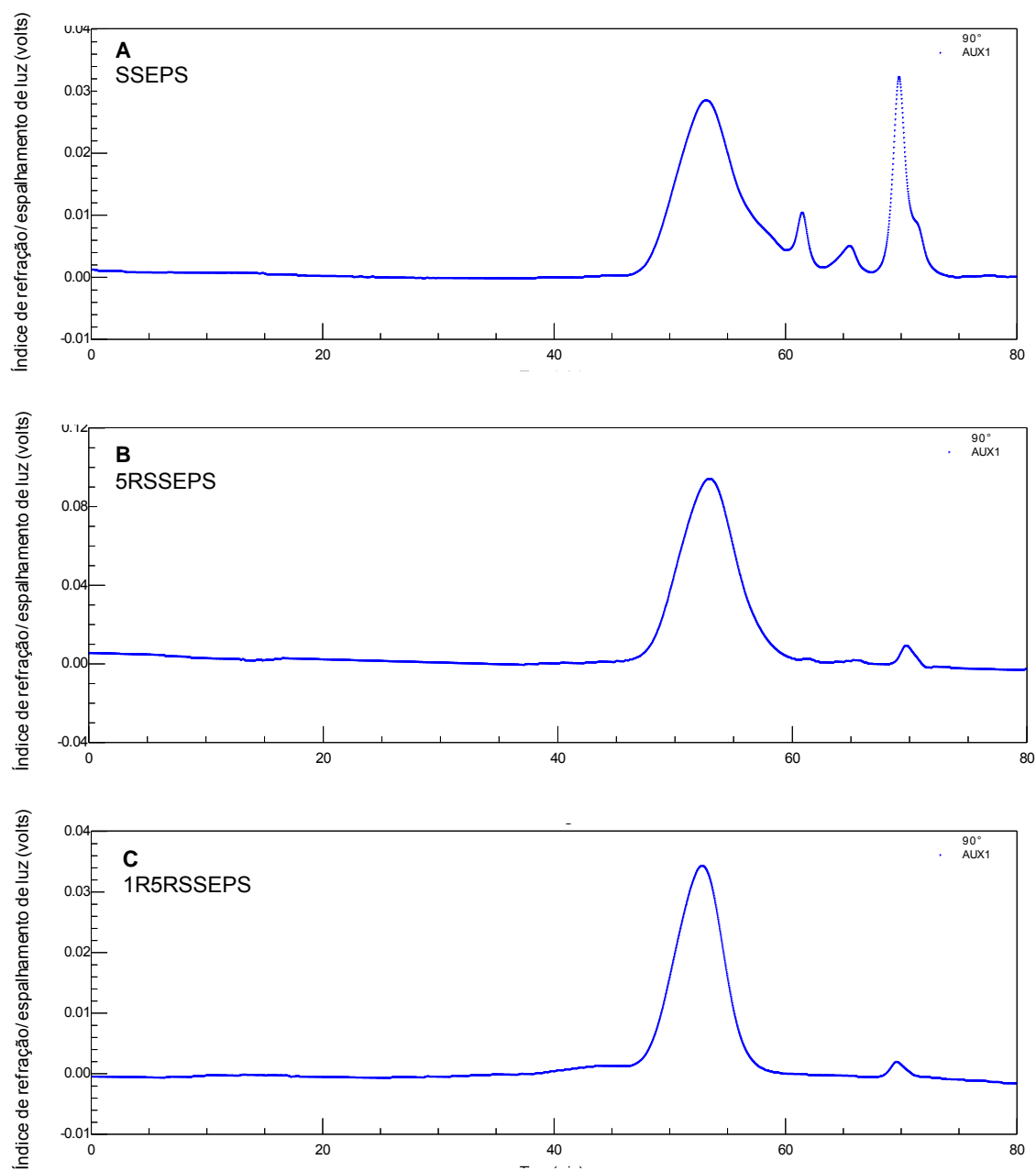


FIGURA 23 – PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO POR MEMBRANAS DE LIMITE DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO SSEPS (A); 50 kDa (B); 100 kDa (C)

\*Obtidos por HPSEC-MALLS.



A composição monossacarídica da fração 1R5RSSEPS foi de fucose (22%), manose (49%), galactose (4%) e glucose (25%). Para elucidar a estrutura da molécula presente nesta fração, foi realizado o experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 24), o qual demonstrou uma complexidade de sinais. Apesar do perfil de eluição ser coerente com uma molécula homogênea, é possível que ainda exista algum contaminante nesta fração. No entanto, alguns sinais conhecidos, previamente descritos para heterogalactanas de basidiomicetos são possíveis de serem distinguidos. O sinal em  $\delta$  15,48 pode corresponder ao  $-\text{CH}_2\text{-C6}$  de  $\text{Fuc}_p$ , correspondente a inversão deste mesmo sinal obtido no experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT (dado não mostrado). Em  $\delta$  77,19 podem estar presentes unidades substituídas de  $\text{Fuc}_p$  enquanto que o sinal em  $\delta$  100,51 pode corresponder ao C-1 das unidades de  $\text{Fuc}_p$  (ALQUINI *et al.*, 2003). Os sinais de  $\delta$  67,08 a 70,79 podem corresponder a unidades de  $\text{Gal}_p$  substituídas, bem como os sinais de  $\delta$  72,23 a 79,05 podem corresponder aos sinais de outros carbonos das unidades de  $\text{Gal}_p$  (CARBONERO *et al.*, 2008). O sinal em  $\delta$  61,30 pode ser atribuído a terminais não redutores de  $\text{Man}_p$ . O sinal em  $\delta$  102,78 pode corresponder ao sinal de C-1 de unidades de  $\text{Man}_p$ . No entanto mais experimentos e possivelmente etapas de purificação são necessários para elucidar a estrutura presente nesta fração.

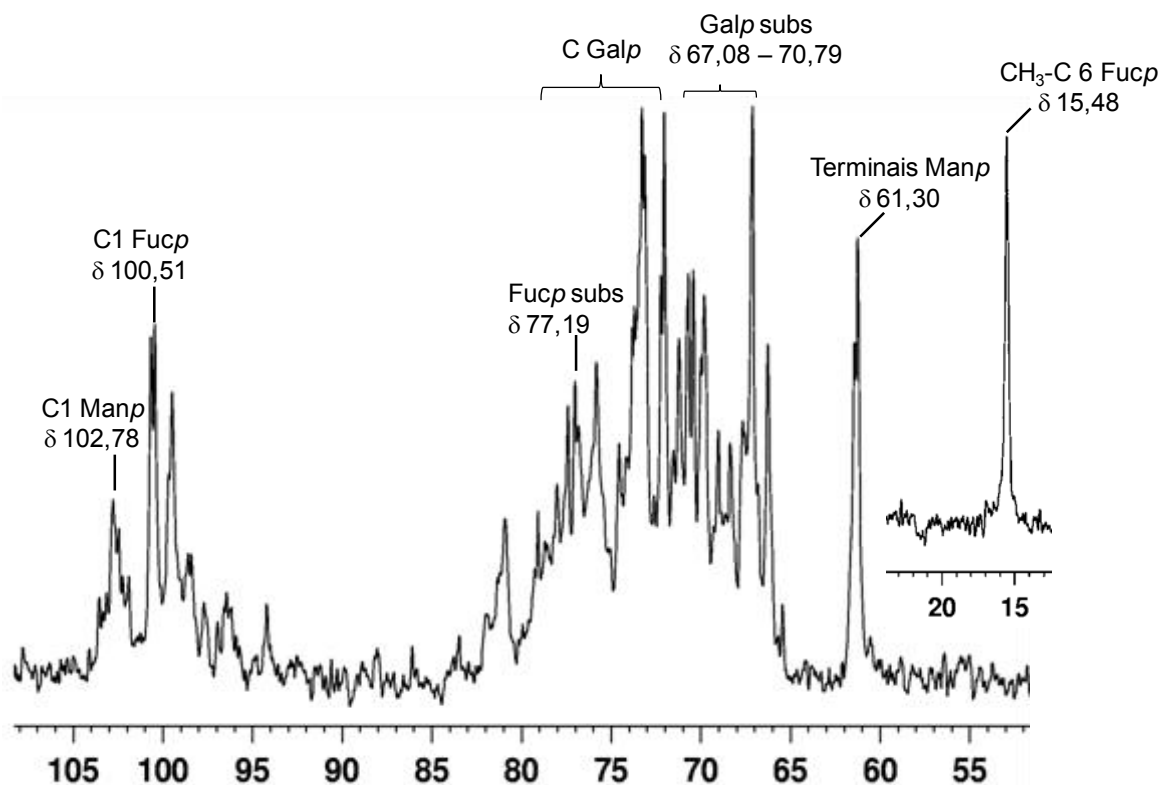


FIGURA 24 - ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$ -RMN POSTERIOR A PURIFICAÇÃO POR MEMBRANAS DA FRAÇÃO SSEPS

A estrutura encontrada por Smiderle e colaboradores (2008a) é uma manofucogalactana cuja cadeia principal é composta de unidades de Galp com ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow6)$ , O-2-substituída por unidades de Manp, Fucp e Fucp O-3-substituídas por uma unidade de Manp. Outra estrutura similar foi obtida por Alquini *et al.*, (2004); uma fucomanogalactana formada por uma cadeia principal de Galp (1 $\rightarrow$ 6), O-2-substituída por unidades de Manp e Fucp e por Fucp O-3-substituída por unidades de Manp. Os espectros para o experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN destas duas moléculas estão na Figura 25.

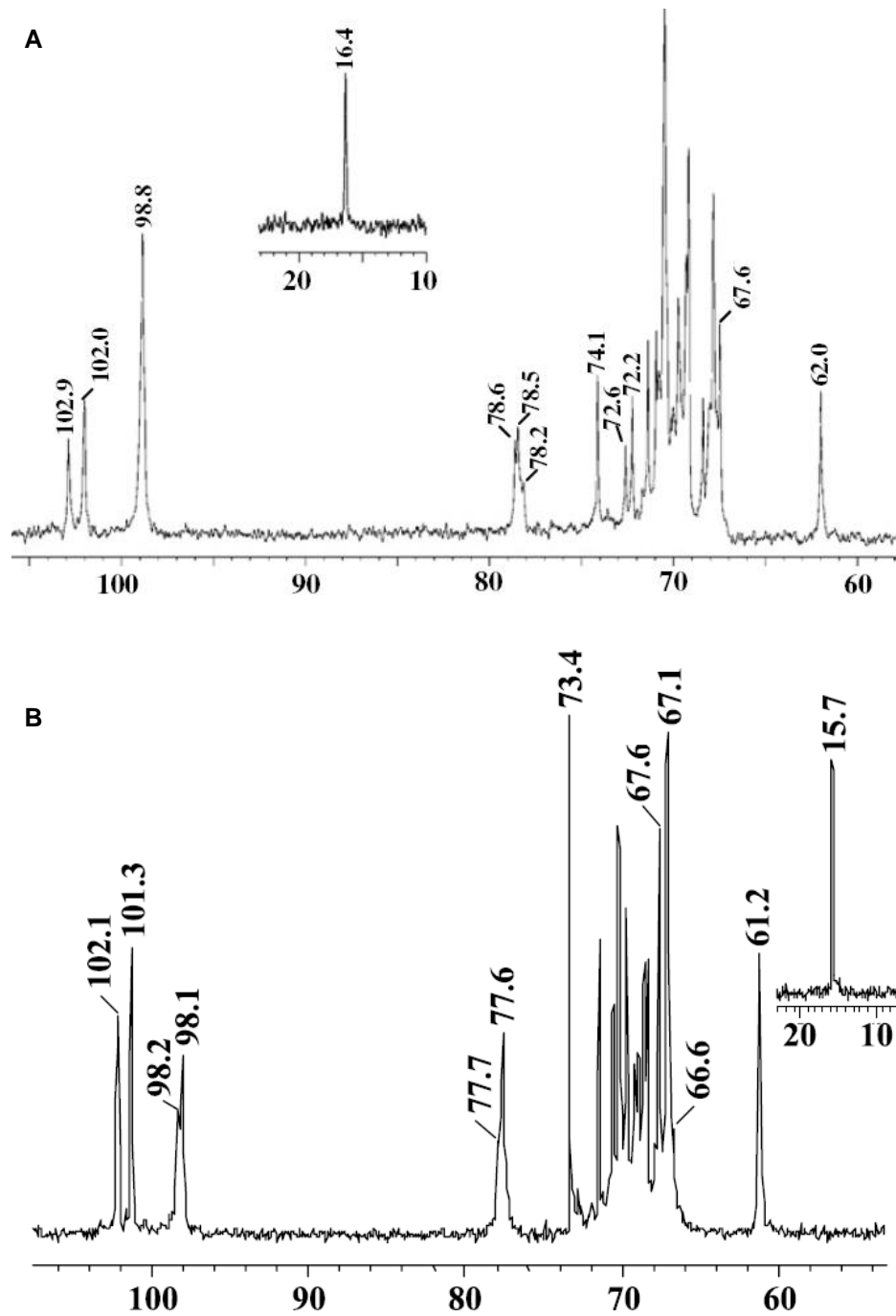


FIGURA 25 – ESPECTROS DE  $^{13}\text{C}$ -RMN DE HETEROGALACTANAS COM PRESENÇA DE Fucp  
 (A) HETEROGALACTANA ENCONTRADA EM *Flammulina velutipes* (SMIDERLE, et al., 2008)  
 (B) HETEROGALACTANA DE *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI, et al., 2004)

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho realizado a partir do corpo de frutificação e extratos obtidos de cultivo submerso de *Agaricus bisporus* permitem concluir que:

- a) O extrato aquoso frio do corpo de frutificação possivelmente contém uma glucana com ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow6)$ , substituída em O-3 por unidades de Galp O-6-substituídas por unidades de Glcp ou então a ramificação ser constituída por unidades de Glcp a qual apresenta substituição O-3 por resíduos de terminais não redutores.
- b) O extrato aquoso quente do corpo de frutificação apresenta um uma  $\beta$ -glucana linear com ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow6)$ , a qual apresenta significativa atividade antinociceptiva e antiinflamatória com baixas doses.
- c) Os oligossacarídeos obtidos a partir da  $\beta$ -glucana por hidrólise ácida parcial resultaram em uma atividade antinociceptiva e antiinflamatória inferior quando comparado aos resultados obtidos para a molécula íntegra.
- d) O cultivo submerso realizado foi viável com a utilização do meio de cultivo Czapeck, sob agitação a 150 rpm, com a formação de *pellets*.
- e) O cultivo submerso originou um exopolissacarídeo que possivelmente seja uma heterogalactana, a qual necessita de posteriores estudos químicos para determinar a estrutura fina.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 74, p. 4970-4971, 1952.

ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiol. Let.**, v.230, 47-52, 2004.

BARROS, L.; FALCÃO, S.; BAPTISTA, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chem.**, v.111, p. 61-66, 2008.

BEELMAN, R. B.; ROYSE, D.; CHIKTHIMMAH, N. Bioactive Components in *Agaricus bisporus* (J. LGE) Imbach of Nutritional, Medicinal, or Biological Importance. **Inter. J. Med. Mush.**, v. 5, p. 1-23, 2003.

BERNARDO, D.; MENDOZA, C. G.; CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M. Chemical Analysis of the Lamella Walls of *Agaricus bisporus* Fruit Bodies. **Current Microbiol.**, v. 38, p. 364-367, 1999

BI, H.; NI, X.; LIU, X.; ITEKU, J.; TAI, G.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. A novel water-soluble  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Bulgaria inquinans* (Fries). **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 1254-1258, 2009.

BONZOM, P. M. A.; NICOLAOU, A.; SLOH, M.; BALDEO, W. NMR lipid profile of *Agaricus bisporus*. **Phytochemistry.**, v. 50, p. 1311-1321, 1999.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydr. Res.**, v. 66, p. 252-257, 2006.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCOS, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chem.**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. **Italian J. of Food Science**, v.1, p. 9-15, 1992.

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

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

DE GROOT, P. W. J.; VISSER, J.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Biochemical and molecular aspects of growth and fruiting of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. **Mycol. Res.**, v. 11, p. 1297-1308, 1998.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.; FANG, J. Structural characterization of a water-soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 1417-1421, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28: p. 350-356, 1956

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Meth. Biochem. Anal.**, v. 3, p. 112-149, 1956.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT**, v. 40, p. 30-35, 2007.

FRIEL, M. T.; McLOUGHLIN, A. J. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 351-354, 2000.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R.; EBINA, T. Tumor-specific and immunopotentiating effect of relatively low molecular weight products derived from the Basidiomycete, *Agaricus blazei* Murril. **Anticancer Res.**, v. 186, p. 267-273, 1999.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydr. Res.**, v. 142, p. 253-267, 1985.

GOW, N. A. K.; GADD, G. M. **The growing fungus**. London: Chapman & Hall, 1995.

GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, M. J.; ALMENDROS, G.; GONZÁLES-VILA, F. J.; MARTÍNEZ, A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **Sci. Total Environ.**, v. 167 p. 315-328, 1995.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 357-360, 1965.

HOBBS, C. R. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A literature review. **Intern. J. of Med. Mush.**, v. 2, p. 287-302, 2000.

JOHNSON J. R.; KIRKWOOD, S.; MISAKI, A.; NELSON, T. E.; SCALETTI, J. V.; SMITH, F. The structure of a new glucan. **Chem. Indust.**, p. 820-822, 1963.

JONES, J.K.N.; STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, 36-38, 1965.

KARÁCSONYI, S.; KUNIAK, L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble  $\beta$ -D-glucan. **Carbohydr. Polym.**, v. 24, p. 107-111, 1994.

KAWAGASHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydr. Res.**, v. 186, p. 267-273, 1989.

LEE, W. Y.; PARK, Y.; AHNA, J. K., KAB, K. H.; PARK; S. Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. **Enzy. Microb. Tech.**, v. 40, p. 249-254, 2007.

LIM, M. J.; JOO, J. H.; KIM, H. O.; KIM, H. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. .J.; YUN, J. W. Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata* TG-1. **Carbohydr. Polym.**, v. 61, p. 296-303, 2005.

LUCENA, G. M. R. S.; GADOTTI, V. M.; MAFFI, L. C.; SILVA, G. S.; AZEVEDO, M.S.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cypura paludosa* Aubl. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 112, 19-25, 2007.

MAZIERO, R. **Produção de Exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: “screening”, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr.:Fr.)Fr.** 181 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). **Intern. J. of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKRA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, p. 2889-2896, 1990.

NOVAES-LEDIEU, M.; MENDOZA, C. G. The cell walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris* fruiting body hyphae. **Can J Microbiol**, v. 27, p. 779-787, 1981.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulations. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 15, n. 3, p. 178-192, 1993.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.

ROSADO, F.R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E.R.; COSTA, S.M.G.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* “florida” (Jack.: Fr.) Kummer. **J. Basic Microbiol.**, v. 43, p. 230-237, 2003a.

ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; CLAUDINO, R.F.; TISCHER, C.A.; KEMMELMEIER, C.; IACOMINI, M. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* “florida” Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 230- 124, 2003b.

SAEMAN, J.F.; MOORE, W.E.; MITHELL, R.L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pal. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.



SASAKI, Y; TAKASURA, N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. **Carbohydr. Res.**, v. 47, p. 99-104, 1976.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Food Chem.**, v. 108, 1, 329-333, 2008a.

SMIDERLE, F. S.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3), (1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European J. of Pharmacol.**, 597, p. 86-91, 2008b.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R. Antagonism of pain and hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S.H. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin: Springer Verlag, 50, 2, 208–222, 1979.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 60, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Immunology** (Critical Reviews), v. 19, p. 65-96, 1999.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.** New York: Academic Press, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.** New York: Academic Press, v. 2, p. 211- 215, 1963b.

WU, J. Z.; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. **Food Chem.**, v. 81, 389-393, 2003.

WU, J. Z.; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chem.**, v. 85, 101-105, 2004.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharide from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Food Sci. and Technol.**, v. 18, p. 4-19, 2007.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, 109-110, 1983.