

ROSÁLIA RUBEL

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Ganoderma lucidum*  
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: AVALIAÇÃO DA AÇÃO  
ANTITUMORAL, IMUNOMODULADORA E HIPOLIPIDÊMICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do grau de Doutor em Processos  
Biotecnológicos.

Área de concentração: Saúde Humana e Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA  
2006

Esta tese é dedicada a Marcelino Rubel, *in memoriam*,  
cuja trajetória de vida marcará para sempre a ética de meus passos.

Como pai, foi exemplo de amor e entrega;  
como cidadão, foi exemplo de honradez e caráter.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, que generosamente me acumulou de bênçãos, dando-me força física e moral para a concretização deste trabalho. As bênçãos divinas mais preciosas se personificaram na forma de valorosos companheiros de jornada, aos quais expresso os meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, cujo entusiasmo e dinamismo foram fatores determinantes para o bom termo desta pesquisa. Obrigada por ter me orientado, proporcionando-me a oportunidade de aprender e trabalhar com a sua equipe.

Ao Prof. Dr. Bonald C. Figueiredo, Departamento de Pediatria-UFPR, e ao Prof. Dr. José Hermênio C. Lima Filho, Departamento de Patologia Médica-UFPR, por terem contribuído de forma decisiva na elaboração do projeto inicial de pesquisa, o qual gerou os recursos financeiros necessários para implementação desse trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana P. S. Vandenberghe e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adenise L. Woiciechoski, exemplos de competência e dedicação, pelas muitas e valiosas sugestões ao longo dessa pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Arailde Fontes Urben, Embrapa-DF, que prontamente nos forneceu a cepa de *G. lucidum* para que essa pesquisa pudesse se concretizar.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol, Departamento de Patologia-UFPR, que nos disponibilizou a sua cota de animais de laboratório, meus sinceros agradecimentos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Moreno, Curso de Biologia-PUC, que nos cedeu a linhagem de sarcoma 180 e pacientemente nos ensinou a manipulá-la. À Prof.<sup>a</sup> Márcia Luciane Lange Silveira, Univille-SC, que nos forneceu a segunda linhagem de sarcoma 180, o que permitiu a conclusão do trabalho.

Agradeço em particular à companheira Prof.<sup>a</sup> Herta S. Dalla Santa, com quem compartilhei o processo de produção e pesquisa. Agradeço aos estagiários que contribuíram ao longo do trabalho: Andressa-I, Ane, Gerardo, Francisco, Lidiane, Kamille e Andressa-II. À colega Michele R. Spier, por ter ajudado na formulação da

ração. Aos colegas Dr. Júlio César Carvalliho, Débora Brand e Dr.<sup>a</sup>Adriane B. P. Medeiros, por terem nos ajudado nas análises respirométricas e dosagem de ergosterol.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes e sua equipe, Departamento de Fisiologia-UFPR, que generosamente compartilharam as dependências de seu laboratório e toda a sua experiência profissional em etapas decisivas deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi e sua equipe, Departamento de Ciências Biológicas-UFPR, que muitas vezes nos cederam o seu espaço e nos acolheram cordialmente. Em especial, agradecemos a inestimável colaboração do amigo Raffaello Di Bernardi, que nos ajudou nas análises citométricas.

Ao Prof. Dr. Juarez Gabardo, Departamento de Genética - UFPR, pela disponibilidade irrestrita em nos iniciar nos árduos caminhos das probabilidades estatísticas. Professor, obrigada pela alegria e bom humor com que sempre nos acolheu.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sônia Cachoeira Stertz, Laboratório de Química-UFPR, que nos permitiu o uso da estufa de secagem e nos acompanhou na etapa de análise centesimal do produto fermentado, contribuindo com valiosas sugestões.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Tararthuch, Departamento de Fisiologia-UFPR, pelo empréstimo das gaiolas metabólicas e por sua contribuição na avaliação da função renal dos animais.

Expresso os meus mais sinceros agradecimentos a todos os meus companheiros do laboratório de Bioprocessos pela demonstração de que é possível produzir mais, interagindo fraternalmente. O receio de esquecer nomes me levou a não nomeá-los integralmente. Peço desculpas e compreensão a esses queridos colegas.

Obrigada aos colegas e amigos do Biotério – UFPR, pela presteza e simpatia com que sempre nos receberam: Dr.<sup>a</sup> Izele, Cândido, Luiz, Júlio e Aline.

Agradeço ao Hospital de Clínicas-UFPR por ter me liberado parcialmente de minhas atividades nos dois primeiros anos de pesquisa.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq e a Paraná Tecnologia pelo suporte financeiro e técnico.

De inestimável valor foi o apoio irrestrito que recebi de minha família. Muito obrigada a minha mãe, Tullia Pontarolo Rubel, pelo exemplo de coragem e persistência em suas metas. Aos meus irmãos José, Marciano, Ângela, aos meus sobrinhos e demais familiares, por estarem sempre comigo e me encorajarem.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>4</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
4.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE <i>G. lucidum</i> .....	7
4.2 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.....	8
4.2.1 Caracteres Morfológicos.....	10
4.2.1.1 Macromorfologia.....	10
4.2.1.2 Micromorfologia.....	11
4.2.1.3 Características de cultivo.....	13
4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>G. lucidum</i> .....	16
4.3.1 Controle de Qualidade e Legislação Reguladora de Produtos a Base de Cogumelos.....	18
4.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>G. lucidum</i> .....	20
4.4.1 Fermentação Em Estado Sólido.....	20
4.4.2 Fermentação Líquida ou Submersa.....	21
4.5 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE <i>G. lucidum</i> .....	25
4.6 PRINCIPAIS METABÓLITOS BIOATIVOS DE <i>G. lucidum</i> .....	28
4.6.1 Polissacarídeos .....	28
4.6.2 Compostos Triterpênicos.....	30
4.6.3 Ling-Zhi-8.....	32
4.6.4 Lectinas.....	32
4.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	33
4.7.1 Citocinas.....	35
4.8 GENERALIDADES SOBRE CÂNCER.....	39
4.8.1 Sistema Imunológico e Câncer.....	41
4.8.2 Sarcoma 180.....	42
4.9 METABOLISMO LIPÍDICO.....	42
4.9.1 Fármacos Hipolipidêmicos.....	44
4.10 FARMACOLOGIA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>G. lucidum</i> .....	46

4.10.1	Atividade Antitumoral e Imunomoduladora.....	47
4.10.2	Ação Sobre a Angiogênese.....	53
4.10.3	Efeito Hipoglicêmico.....	54
4.10.4	Efeito Hipotensivo e Hipolipidêmico.....	55
4.10.5	Atividade Antiviral.....	55
4.10.6	Atividade Antioxidante.....	55
4.10.7	Atividade Hepatoprotetora.....	56
4.11	MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE <i>G. lucidum</i> .....	56
4.12	<i>Agaricus brasiliensis</i> ( <i>A. subrufescens</i> ).....	61
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
5.1	MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>G. lucidum</i> .....	63
5.2	CRESCIMENTO RADIAL DE <i>G. lucidum</i> .....	63
5.3	DESENVOLVIMENTO DE <i>G. lucidum</i> EM CULTIVO SUBMERSO.....	64
5.3.1	Meio de Cultura.....	64
5.3.2	Condições de Cultivo e Preparo do Inóculo.....	64
5.4	DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA E POLISSACARÍDEOS.....	65
5.4.1	Extração e Determinação de EPS.....	65
5.4.2	Extração e Determinação de IPS.....	66
5.4.3	Obtenção de Frações de Polissacarídeo Solúveis e Insolúveis em Água.....	66
5.5	DETERMINAÇÃO DE GLICOSE RESIDUAL.....	67
5.6	PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESENVOLVIMENTO EM MEIO LÍQUIDO.....	68
5.7	EFEITO DO USO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DE <i>G. lucidum</i> EM MEIO LÍQUIDO.....	68
5.7.1	Condições de Cultivo.....	68
5.7.2	Influência de Diferentes Fontes de Carbono.....	68
5.7.3	Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio.....	68
5.7.4	Efeito da Interação entre Fontes de Carbono e Nitrogênio.....	69
5.8	EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE O CULTIVO SUBMERSO DE <i>G. lucidum</i> .....	70
5.9	FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	71
5.9.1	Trigo em Grão.....	71
5.9.2	Trigo Moído.....	72
5.10	ANÁLISE RESPIROMÉTRICA.....	72
5.10.1	Respirometria em Biorreator Tipo Coluna com Aeração Forçada.....	72
5.10.2	Taxa de Consumo de Oxigênio e Produção de Gás Carbônico.....	74
5.11	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	76
5.11.1	Extração do Ergosterol.....	77
5.11.2	Análise do Ergosterol.....	77
5.12	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO TRIGO FERMENTADO COM <i>G. lucidum</i> ....	78
5.13	PREPARO DA RAÇÃO SUPLEMENTADA.....	78

5.13.1	Ração Experimento I.....	78
5.13.2	Ração Experimento II.....	81
5.14	PESQUISA DE ATIVIDADE ANTITUMORAL, IMUNOMODULADORA E HIPOLIPIDÊMICA DE <i>G. lucidum</i> e <i>A. brasiliensis</i> .....	81
5.14.1	Experimento I.....	81
5.14.2	Análise de Urina e de Fezes dos Animais.....	82
5.14.3	Manutenção da Linhagem de Sarcoma 180 e Implantação do Tumor.....	83
5.14.4	Sacrifício dos Animais e Coleta de Amostras.....	84
5.14.5	Experimento II.....	84
5.15	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EXAMES REALIZADOS.....	85
5.15.1	Análise do Tumor e Cálculo de Inibição do Desenvolvimento Tumoral.....	85
5.15.2	Dosagem dos Parâmetros Bioquímicos .....	86
5.15.3	Pesquisa de Interleucinas.....	86
5.15.4	Processamento de Tecidos Esplênicos e Linfóides.....	87
5.16	CITOMETRIA DE FLUXO.....	88
5.17	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	92
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
6.1	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DE <i>G. lucidum</i> .....	93
6.2	SELEÇÃO DE CEPA DE <i>G. lucidum</i> .....	94
6.3	ESTUDO CINÉTICO EM CULTIVO SUBMERSO.....	95
6.4	EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SOBRE O METABOLISMO DE <i>G. lucidum</i> .....	96
6.4.1	Efeito de Diferentes Fontes de Carbono.....	96
6.4.2	Efeito de Diferentes Fontes de Nitrogênio.....	97
6.4.3	Efeito da Interação entre Fontes de Carbono e Nitrogênio .....	99
6.4.4	Composição do Meio de Cultura e Síntese de EPS.....	101
6.5	EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE EPS .....	102
6.6	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO TRIGO FERMENTADO.....	105
6.7	DOSAGEM DE ERGOSTEROL.....	106
6.8	ANÁLISE RESPIROMÉTRICA.....	107
6.9	RESPOSTA ORGÂNICA AO CONSUMO CRÔNICO DE RAÇÃO SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 E <i>A. brasiliensis</i> LPB 3.....	110
6.9.1	Peso Corporal dos Camundongos.....	111
6.9.2	Análises Coprológicas.....	111
6.9.3	Função Renal.....	112
6.9.4	Ação sobre as Concentrações Plasmáticas de Glicose.....	116
6.9.5	Ação sobre as Concentrações Plasmáticas de Proteínas.....	117
6.10	EFEITO SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO.....	118
6.11	ATIVIDADE ANTITUMORAL .....	124

6.12	EFEITO DAS RAÇÕES SUPLEMENTADAS SOBRE DIFERENTES POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS.....	126
6.12.1	Camundongos Normais.....	126
6.12.2	Camundongos Inoculados com Sarcoma 180.....	127
6.13	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE INTERLEUCINAS.....	132
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>147</b>
	<b>SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....</b>	<b>149</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>151</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO DE <i>G. lucidum</i> .....	14
TABELA 2 -	DESCRIÇÃO MACROMORFOLÓGICA DE <i>G. lucidum</i> .....	15
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>G. lucidum</i> .....	16
TABELA 4 -	CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS DE <i>G. lucidum</i> .....	17
TABELA 5 -	CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS DE <i>G. lucidum</i> .....	17
TABELA 6 -	CONTEÚDO DE MINERAIS DE <i>G. lucidum</i> .....	18
TABELA 7 -	CULTIVO DE <i>G. lucidum</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS.....	24
TABELA 8 -	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE <i>G. lucidum</i> .....	27
TABELA 9 -	ORIGEM E ESPECTRO DE AÇÃO DE ALGUMAS INTERLEUCINAS...	38
TABELA 10 -	AÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE <i>G. lucidum</i> SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS HUMANAS.....	49
TABELA 11 -	CITOTOXICIDADE DE POLISSACARÍDEOS DE <i>G. lucidum</i> SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS HUMANAS.....	50
TABELA 12 -	MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE <i>G. lucidum</i> .....	59
TABELA 13 -	FONTES DE NITROGÊNIO TESTADAS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>G. lucidum</i> EM CULTIVO SUBMERSO.....	69
TABELA 14 -	FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO TESTADAS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>G. lucidum</i> EM CULTIVO SUBMERSO.....	70
TABELA 15 -	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE TRIGO EM GRÃO <i>IN NATURA</i> E APÓS FERMENTAÇÃO COM <i>G. lucidum</i> .....	78
TABELA 16 -	FÓRMULA DAS RAÇÕES.....	80
TABELA 17 -	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE <i>G. lucidum</i> E DE <i>A. brasiliensis</i> .....	84
TABELA 18 -	CULTIVO SUBMERSO DE <i>G. lucidum</i> CG 144 SOB CONDIÇÕES ESTÁTICAS E SOB AGITAÇÃO.....	103
TABELA 19 -	DOSAGEM DE ERGOSTEROL DE <i>G. lucidum</i> CG 144 DESENVOLVIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E EM ESTADO LÍQUIDO.....	106
TABELA 20 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR <i>G. lucidum</i> CG 144 DESENVOLVIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM TRIGO.....	109

TABELA 21-	EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA URINA DE CAMUNDONGOS .....	114
TABELA 22-	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE, PROTEÍNAS E COMPOSTOS NITROGENADOS EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 CULTIVADO EM TRIGO.....	115
TABELA 23 -	EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 E <i>A. brasiliensis</i> LPB 3 SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS.....	119
TABELA 24-	AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DE SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS.....	125
TABELA 25-	EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 E <i>A. brasiliensis</i> LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS GANGLIONARES E ESPLÊNICOS EM CAMUNDONGOS NORMAIS.....	128
TABELA 26-	EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 E <i>A. brasiliensis</i> LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS GANGLIONARES E ESPLÊNICOS EM CAMUNDONGOS COM SARCOMA 180.....	129
TABELA 27 -	EFEITO DE RAÇÃO CONTENDO <i>G. lucidum</i> CG 144 E <i>A. brasiliensis</i> LPB 3 SOBRE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE INTERLEUCINAS .....	133

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E POLISSACARÍDEO POR DIFERENTES AMOSTRAS DE <i>G. lucidum</i> .....	94
GRÁFICO 2 -	INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEO POR <i>G. lucidum</i> CG 144 EM CULTIVO SUBMERSO.....	97
GRÁFICO 3 -	INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEO POR <i>G. lucidum</i> CG 144 EM CULTIVO SUBMERSO.....	99
GRÁFICO 4 -	INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EPS POR <i>G. lucidum</i> CG 144, EM CULTIVO SUBMERSO.....	100
GRÁFICO 5 -	PERFIL DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO POR <i>G. lucidum</i> CG 144 EM FUNÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO....	101
GRÁFICO 6 -	EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>G. lucidum</i> CG 144 DESENVOLVIDO POR FES EM TRIGO.....	110
GRÁFICO 7-	PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES CONTENDO <i>G. lucidum</i> CG 144 e <i>A. brasiliensis</i> LPB 3.....	111
GRÁFICO 8-	EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E O FLUXO URINÁRIO EM CAMUNDONGOS.....	113
GRÁFICO 9-	GLICEMIA EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES CONTENDO <i>G. lucidum</i> CG 144 e <i>A. brasiliensis</i> LPB 3.....	117
GRÁFICO 10-	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES CONTENDO <i>G. lucidum</i> CG 144 e <i>A. brasiliensis</i> LPB 3.....	118
GRÁFICO 11-	PERCENTUAL DE HDL-COLESTEROL EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES CONTENDO <i>G. lucidum</i> CG 144 e <i>A. brasiliensis</i> LPB 3.....	120
GRÁFICO 12-	EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE COLESTEROL EM CAMUNDONGOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA INDUZIDA...	121

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MACROMORFOLOGIA DE <i>G. Lucidum</i> .....	12
FIGURA 2 -	ESTRUTURA QUÍMICA DE $\beta$ -D- GLUCANAS.....	29
FIGURA 3 -	ESTRUTURA QUÍMICA DE ÁCIDOS GANODÉRMICOS.....	31
FIGURA 4 -	INTERLEUCINAS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL E CELULAR.....	39
FIGURA 5 -	CULTIVO SUBMERSO DE <i>G. lucidum</i> EM AGITADOR ROTATÓRIO DE BANCADA.....	65
FIGURA 6 -	EXTRAÇÃO DE ENDO E EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>G. lucidum</i> PRODUZIDO EM MEIO LÍQUIDO.....	67
FIGURA 7-	SISTEMA DE BIORREATOR TIPO COLUNA COM AERAÇÃO FORÇADA ACOPLADO A CROMATÓGRAFO E COMPUTADOR.....	74
FIGURA 8-	ESTÁGIOS DO PREPARO DA RAÇÃO FERMENTADA.....	80
FIGURA 9 -	CONDIÇÕES DE ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS.....	82
FIGURA 10 -	ANIMAIS MANTIDOS EM GAIOLAS METABÓLICAS PARA COLETA DE URINA.....	83
FIGURA 11 -	CITOGRAMAS ANALISADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS.....	91
FIGURA 12 -	ANÁLISE PERCENTUAL DA QUANTIDADE DE LINFÓCITOS NOS RESPECTIVOS QUADRANTES.....	92
FIGURA 13 -	CRESCIMENTO RADIAL DE <i>G. lucidum</i> .....	93
FIGURA 14	ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO DE <i>G. lucidum</i> CG 144 EM CULTIVO SUBMERSO.....	95
FIGURA 15-	CULTIVO SUBMERSO DE <i>G. lucidum</i> SOB CONDIÇÕES ESTÁTICAS E SOB AGITAÇÃO.....	104
FIGURA 16 -	<i>G. lucidum</i> CG 144 CULTIVADO EM TRIGO.....	105
FIGURA 17-	ESTIMATIVA DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (TCO) E PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO POR <i>G. lucidum</i> CG 144 EM FES.....	108
FIGURA 18-	COEFICIENTE DE RESPIRAÇÃO (QR) DE <i>G. lucidum</i> CG 144 DESENVOLVIDO EM FES.....	109
FIGURA 19-	SARCOMA 180 APÓS 30 DIAS DE INOCULAÇÃO.....	125
FIGURA 20-	MASSA TUMORAL DE SARCOMA 180 RETIRADA DE CAMUNDONGO DO GRUPO CONTROLE.....	126

FIGURA 21-	EFEITO DE RAÇÃO SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 e <i>A. brasiliensis</i> LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS EM CAMUNDONGOS NORMAIS E PORTADORES DE SARCOMA 180.....	130
FIGURA 22-	EFEITO DE RAÇÃO SUPLEMENTADA COM <i>G. lucidum</i> CG 144 e <i>A. brasiliensis</i> LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS DE LINFONODOS EM CAMUNDONGOS NORMAIS E PORTADORES DE SARCOMA 180.....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	- Anticorpo
BDA	- Batata dextrose ágar
C3	- Fração 3 do Sistema Complemento
CD	- Classe de diferenciação
CG	- Cenargen
CM	- Meio de cultivo condicionado
ConA	- Concanavalina A
DEAE	- Dimetilaminoetil
dL	- Decilitro
EL	- Extrato de levedura
Gl	- Glicose
HDL	- High density lipoprotein
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance
IFN	- Interferon
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
i.p.	- Intraperitoneal
KDa	- Kilo Dalton
LPS	- Lipopolissacarídeo
LZ-8	- Ling Zhi-8
MCP-1	- “Monocyte Chemoattractant Protein-1”
MNC	- Células mononucleares humanas
nm	- Nanômetro
NO	- Óxido nítrico
pg	- Picograma
pH	- Potencial hidrogeniônico
PS	- Polissacarídeo
PBS	- Solução isosmótica de cloreto de sódio tamponada com fosfato
rpm	- Rotações por minuto
Tc	- Célula T citotóxica
Th	- Célula T auxiliadora
TNF	- Fator de necrose tumoral

## RESUMO

*Ganoderma lucidum* é um cogumelo medicinal amplamente empregado no Oriente para o tratamento de diversas doenças. Neste trabalho, *G. lucidum* foi desenvolvido por cultivo submerso, testando-se diferentes variáveis físico-químicas, com o objetivo de se obter a produção máxima de polissacarídeos. O micélio obtido por cultivo submerso foi desenvolvido por fermentação em estado sólido, empregando-se trigo em grão como substrato. A partir desse produto, foram preparadas as seguintes rações: G85 e G50, contendo 85% e 50% do fermentado de *G. lucidum*, respectivamente. Também foi testada uma ração contendo 50% de fermentado de *G. lucidum* e 50% de fermentado de *Agaricus brasiliensis* (ração A+G). Durante 14 semanas, foram alimentados 80 camundongos, divididos em quatro grupos de 20 indivíduos, denominados G85, G50, A+G e controle, em função da sua dieta. O grupo controle foi alimentado com ração sem cogumelos. Na décima semana, os animais foram divididos em oito grupos constituídos de dez indivíduos, sendo que quatro grupos foram denominados: G85, G50, A+G e controle, os quais receberam injeção interscapular de solução fisiológica. Os quatro grupos restantes foram denominados G85-S, G50-S, A+G-S e controle-S, nos quais foram implantadas células de sarcoma 180 na região interscapular. Na 14ª semana, foram avaliadas as propriedades imunomoduladora, antitumoral e hipolipidêmica das rações. Foi observada regressão tumoral nos grupos G50-S (89%), A+G (81%) e G85-S (14%) em relação ao controle-S. Em relação ao grupo controle, nos animais injetados com salina foram observadas as seguintes alterações em células esplênicas: G85 apresentou aumento de células CD19+ (56%); G50 apresentou aumento de CD19+ (134%) e diminuição de CD4+ (-15%); enquanto que A+G apresentou elevação de células CD3+ e CD8+ (32,4 % e 34,6%, respectivamente). Em relação ao grupo controle-S, nos animais injetados com sarcoma 180 foram observadas as seguintes alterações em células esplênicas: CD3+ aumentou 49,3%, 86% e 112,4% nos grupos G85-S, G50-S e A+G-S, respectivamente;

CD4<sup>+</sup> aumentou 38%, 56,4% e 68,7% nos grupos G85-S, G50-S e A+G-S, respectivamente; CD8<sup>+</sup> aumentou 30,5%, 41,2% e 49% nos grupos G85-S, G50-S e A+G-S, respectivamente. Nos animais inoculados com salina, apenas o grupo G50 apresentou concentrações detectáveis de IFN- $\gamma$ , além de aumentar em 16% as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , em relação ao controle. Os grupos G85 e A+G não apresentaram alterações significativas nas concentrações de interleucinas, em relação ao grupo controle. Na presença do tumor, os grupos G85-S, A+G-S e controle-S apresentaram elevação nos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto que no grupo G50-S as concentrações dessas interleucinas estavam diminuídas. O consumo da dieta suplementada com *G. lucidum* causou significativas alterações no metabolismo lipídico, particularmente a ração G50, a qual levou a um decréscimo nos níveis plasmáticos de colesterol (-17%) e triacilgliceróis (-42%), além de aumentar 127% a fração HDL-colesterol. Esses resultados sugerem o possível emprego de *G. lucidum* como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos e substâncias nutracêuticas com propriedades imunomoduladora, antitumoral e hipolipidêmica.

Palavras-chave: *Ganoderma lucidum*, fermentação em estado sólido, cogumelos medicinais, sarcoma 180, polissacarídeos, antitumoral, imunomodulador, hipolipidêmico.

## ABSTRACT

*Ganoderma lucidum* is a medicinal mushroom widely used in the Far East for treatment of several diseases. In the present work, *G. lucidum* was grown by submerge cultivation, and different physical-chemical variables were tested in order that the maximal polysaccharides production could be obtained. Mycelia from submerge cultivation was grown by solid-state fermentation, employing wheat grain as substrate. From this product, the following diets were prepared: G85 and G50, containing 85% and 50% of the *G. lucidum* fermented product, respectively. A diet containing 50% of the *G. lucidum* fermented product and 50% of the *Agaricus brasiliensis* fermented product (A+G diet) was also tested. During 14 weeks, 80 mice were fed on it. The animals were divided into four groups of 20 animals each and labeled according to the diet they were taking: G85, G50, A+G and control group. The control group was fed a diet without mushroom. In the 10<sup>th</sup> week, the animals were divided into eight groups consisting of 10 individuals each, and four of these groups were labeled G85, G50, A+G, and control, and these received interscapular injection of a physiological solution. The four remaining groups were labeled G85-S, G50-S, A+G-S, and control-S, and these had sarcoma 180 cells implanted in their interscapular region. In the 14<sup>th</sup> week, the immunomodulatory, antitumoral and hypolipidemic properties of these diets were assessed. Tumoral regression was detected in the G50-S (89%), A+G-S (81%), and G85-S (14%) groups, as compared to the control-S. In relation to the control group, were detected the following alterations in the splenic cells from animals injected with the saline solution: G85 showed an increase of CD19+ cells (56%); G50 showed an increase of CD19+ cells (134%) and a decrease of CD4+ cells (-15%); A+G group showed an increase of CD3+ and CD8+ cells (32.4% and 34.6%, respectively). In relation to the control-S group, were detected the following alterations in the splenic cells from animals injected with sarcoma 180: CD3+ increased

49.3%, 86%, and 112.4% in groups G85-S, G50-S and A+G-S, respectively; CD4+ increased 38%, 56.4%, and 68.7% in groups G85-S, G50-S, and A+G-S, respectively; CD8+ increased 30.5%, 41.2%, and 49% in groups G85-S, G50-S, and A+G-S, respectively. Among the healthy animals, only G50 group showed detectable concentrations of IFN- $\gamma$ , besides a 16% increase of plasmatic concentrations of TNF- $\alpha$ , when compared to the control group. Groups G85 and A+G did not show any significant alterations in the cytokine concentrations. In the presence of the tumor, groups G85-S, A+G-S, and control-S showed an increase in the plasmatic concentrations of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , whereas in the G50-S group the concentration of these cytokines decreased. Diet supplemented with *G. Lucidum* resulted in significant alterations in the lipidic metabolism, specially the G50 diet, which led to a decrease in the plasmatic concentrations of cholesterol (-17%) and triacylglycerols (-42%), besides producing a 127% increase in the HDL-cholesterol. These results point at the possibility of using *G. lucidum* as source for developing new medicinal drugs and nutraceutic substances with immunomodulador, antitumoral, and hypolipidemic properties.

Key words: *Ganoderma lucidum*, solid-state fermentation, medicinal mushrooms, sarcoma 180, polysaccharides, antitumoral, immunomodulator, hypolipidemic.

## 1 INTRODUÇÃO

No Oriente, há milênios os cogumelos vêm sendo empregados não só como alimento, mas também como medicamentos. *Ganoderma lucidum*, um basidiomiceto com propriedades medicinais, ocupa lugar de destaque na tradicional medicina chinesa que o prescreve para uma série de enfermidades como hepatite, hipertensão, diabetes, úlceras e câncer gástrico (KIM et al., 2002). Porém, no Ocidente, o potencial terapêutico dos cogumelos só despertou a atenção nas últimas décadas. Esse recente interesse vem da observação de que os cogumelos têm sido usados há centenas de anos, sem efeitos colaterais aparentes, enquanto que alguns medicamentos modernos, além de oferecerem benefícios duvidosos à saúde, também possuem uma série de contra-indicações (KID, 2000; BORCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

Atualmente, as principais causas de morte nos países desenvolvidos são enfermidades que podem ser correlacionadas com a dieta, como doenças cardiovasculares, diabetes, arteriosclerose, obesidade e alguns tipos de câncer. Evidências científicas suportam a teoria que para reduzir o risco dessas doenças, seria necessário uma mudança de hábitos alimentares, incluindo na dieta substâncias capazes de modular as funções orgânicas de forma a manter o estado de saúde e a homeostase (MUTO et al., 1989). Nesse sentido, tem sido intensa a busca por alimentos funcionais, ou seja, aqueles que, além de suprir o organismo com os nutrientes básicos, também exercem ação terapêutica. Substâncias derivadas de plantas e cogumelos têm sido extensivamente estudadas como fontes naturais de saúde. A maioria dessas pesquisas relata compostos fitoquímicos que, diretamente ou indiretamente, agem no sistema imunológico e sobre vias bioquímicas, alterando a resposta celular ao nível molecular.

Os produtos derivados de cogumelos, geralmente são formulados a partir do corpo de frutificação ou dos esporos, porém o seu desenvolvimento *in natura* é um processo lento, podendo levar até meses (HABIJANIC; BEROVIC, 2000). Os cogumelos são facilmente propagáveis vegetativamente, possibilitando a sua obtenção em curto espaço de tempo e sob condições controladas. O micélio pode ser estocado por um longo tempo mantendo as características genéticas, o que beneficia a

conservação da biodiversidade. Outro importante aspecto ecológico do cultivo artificial de cogumelos é a possibilidade de propagá-los em resíduos provenientes da agroindústria e sem emissão de lixo no final do processo (WASSER, 2005). Todas essas vantagens têm entusiasmado vários pesquisadores e o cultivo micelial de cogumelos, tanto por fermentação submersa, quanto por fermentação em estado sólido, vem sendo cada vez mais estudado (JONG; BIRMINGHAM, 1992).

Pesquisas com substâncias extraídas de cogumelos, em especial polissacarídeos do grupo das  $\beta$ -glucanas, têm mostrado ação biológica sobre uma série de eventos biológicos (WASSER, 2002). O efeito antitumoral desses polissacarídeos, incluindo as  $\beta$ -glucanas, aparentemente não ocorre de forma direta sobre a célula neoplásica, porém a sua ação é atribuída à modulação da resposta imunológica do hospedeiro, envolvendo ativação de várias células imunocompetentes, como macrófagos, células T e células dendríticas (CAO; LIN, 2003; LEE et al., 2003a).

São viáveis comercialmente antitumorais obtidos de cogumelos, como o Lentinan produzido pelo *Lentinula edodes* (CHIARA et al., 1970), o Schizophyllan proveniente de *Schizophyllum commune* (TABATA et al., 1981) e o Krestin extraído de *Trametes (Coriolus) versicolor* (NG, 1998). Trabalhos recentes demonstrando a importância medicinal do popular “Cogumelo do Sol”, *Agaricus brasiliensis*, também vêm despertando o interesse da comunidade científica (LEIFA, et al., 2003).

*G. lucidum* (Fr.) Krast é um basidiomiceto pertencente à família *Ganodermataceae* que goza de grande popularidade nos países asiáticos devido as suas múltiplas atividades biológicas. Entre outras propriedades, *G. lucidum* é empregado principalmente como antitumoral, imunorestaurador, hipotensivo e hipoglicêmico. (MIZUNO, 2004). *G. lucidum* é popularmente denominado de “Reishi” ou “Mannentake” em japonês e “Lingzhi” em chinês, sendo mencionado pela tradicional medicina chinesa desde a dinastia Ming (ZHANG et al., 2002b). O elevado consumo desse cogumelo nos países asiáticos, tem lhe agregado importante valor comercial. Atualmente, *G. lucidum* é comercializado sob diferentes formulações (bebidas, pós, cápsulas) tanto para consumo como suplemento alimentar quanto para fins medicinais (CHIU, et al., 2000).

*G. lucidum* vem sendo alvo de várias pesquisas, principalmente em relação às suas atividades antitumorais e imunomoduladoras. O exopolissacarídeo (EPS), obtido através do seu desenvolvimento por cultivo submerso, quando testado frente a várias linhagens de células cancerosas humanas, exerceu efeito inibidor de até 80%. Células T humanas cultivadas na presença de EPS apresentaram incremento proliferativo e estímulo na secreção de interleucinas (CHUNG et al., 2001; LEE et al., 2003a).

Dietas suplementadas com *G. lucidum* previnem a carcinogênese induzida em camundongos (LU et al., 2003). Outras pesquisas relatam que o *G. lucidum* exerce efeito hipocolesterolêmico (KABIR et al., 1988) e hipoglicêmico (TOMODA et al., 1986). O reconhecimento milenar de *G. lucidum* como agente promotor da saúde, respaldado cientificamente por todos esses resultados, apontam para o seu potencial emprego no desenvolvimento de novos fármacos e produtos nutracêuticos.

## 2 JUSTIFICATIVAS

*G. lucidum* tem sido relatado exercendo importantes atividades farmacológicas, principalmente como agente imunomodulador, antitumoral, hipocolesterolêmico e antioxidante (WACHTEL-GALOR et al., 2004). Os produtos naturais derivados de *G. lucidum* geralmente são extratos aquosos obtidos a partir do corpo de frutificação, sendo compostos de misturas complexas que podem conter toxinas ou metais pesados (CHIU et al., 2000). O desenvolvimento do corpo de frutificação pode demorar até seis meses, de forma que o cultivo micelial de *G. lucidum* se apresenta como uma alternativa viável para a obtenção de seus princípios ativos em curto espaço de tempo e sob condições controladas (YANG; KE; KUO, 2000).

Atualmente, a radioterapia, a quimioterapia e a remoção cirúrgica constituem as formas de tratamento convencionais contra o câncer. Pelo fato desses procedimentos se mostrarem extremamente agressivos para o paciente, a procura por novos agentes antineoplásicos, de preferência com ação imunomoduladora, tem se intensificado nas últimas décadas (WASSER, 2002).

A arteriosclerose representa uma das principais causas de morte no mundo ocidental. A principal estratégia no controle dessa doença, e nos distúrbios cardiovasculares dela decorrentes, é o controle dos níveis plasmáticos de colesterol (LUZ, 1993).

Nesse contexto, este trabalho procurará demonstrar a ação de substâncias bioativas produzidas por *G. lucidum* sobre o sistema imunológico de camundongos e seu efeito específico frente à linhagem tumoral Sarcoma 180. Também será avaliada a sua ação sobre o metabolismo lipídico desses animais.

Em função disso foram formuladas as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: A ingestão crônica de *G. lucidum*, como suplemento alimentar estimula o sistema imunológico.

Os cogumelos medicinais constituem fontes naturais de substâncias modificadoras da resposta biológica, as quais podem atuar em diferentes estágios da resposta imunológica (WASSER, 2002). Ensaios *in vitro* atestam que polissacarídeos extraídos

de *G. lucidum* podem estimular a proliferação de células T e a secreção de citocinas (CHUNG et al., 2001; WANG et al., 1997). Estes resultados sugerem que *G. lucidum* tem uma ação mediada pelo sistema imunológico do hospedeiro.

Hipótese 2: A ingestão crônica de uma dieta suplementada com *G. lucidum* pode inibir o desenvolvimento de Sarcoma 180 em camundongos.

LU et al. (2003) reportam o efeito anticarcinogênico de uma dieta suplementada com *G. lucidum* em camundongos expostos cronicamente a agentes mutagênicos. LIU et al. (2002) demonstraram a inibição de Sarcoma 180 em camundongos tratados com extrato lipídico de esporos de *G. lucidum*. Triterpenos isolados do corpo de frutificação de *G. lucidum* também apresentam ação antitumoral (LIN et al., 2003). Entretanto, não se conhece efeito semelhante quanto à ingestão crônica de *G. lucidum* desenvolvido por fermentação em estado sólido.

Hipótese 3: Dieta suplementada com *G. lucidum* afeta o metabolismo lipídico de camundongos.

Substâncias capazes de inibir a síntese do colesterol foram inicialmente isoladas de fungos, como a lovastatina proveniente de *Aspergillus terreus* (ALBERT et al. 1989) e de *Pleurotus ostreatus* (CIMERMAN; CIMERMAN, 1995). Estudos têm relacionado o efeito hipocolesterolêmico de *G. lucidum* com a inibição da síntese de colesterol e/ou aceleração do seu metabolismo (KABIR; KIMURA; TAMURA, 1988).

Hipótese 4: A associação de *G. lucidum* e *Agaricus brasiliensis* potencializa os efeitos terapêuticos desses cogumelos.

As atividades imunomoduladoras e antitumorais de *A. brasiliensis* e *G. lucidum* são amplamente relatadas na literatura científica (MIZUNO et al., 1999; LEIFA et al., 2003). Também existem relatos de aumento desses efeitos terapêuticos quando esses dois cogumelos são usados em associação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo se propõe a pesquisar a atividade imunomoduladora, antitumoral e hipolipidêmica de ração suplementada com *G. lucidum*, desenvolvido por fermentação em estado sólido, em camundongos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biomassa de *G. lucidum* por cultivo submerso para extração de polissacarídeos.
- Otimizar os diferentes parâmetros químicos, físicos e nutricionais do cultivo submerso, visando potencializar a produção de polissacarídeos.
- Cultivar *G. lucidum* por fermentação em estado sólido, empregando trigo em grão como único substrato.
- Avaliar o potencial imunomodulador, antitumoral e hipolipidêmico da ração suplementada com o produto fermentado obtido, em camundongos saudáveis e em camundongos inoculados com Sarcoma 180.
- Avaliar o potencial imunomodulador, antitumoral e hipolipidêmico de ração suplementada com mistura de fermentado de *G. lucidum* e *A. brasiliensis*, em camundongos saudáveis e em camundongos inoculados com Sarcoma 180.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE *G. lucidum*

Espécies do gênero *Ganoderma* são fungos superiores reconhecidos tradicionalmente como fontes de produtos nutricêuticos e medicinais nos Países Asiáticos, incluindo China, Japão e Coréia (WACHTEL-GALOR et al., 2004). Relatos de cogumelos pertencentes ao complexo *G. lucidum* são encontrados em antigos manuscritos chineses como os escritos por Shen Nong Ben Cao Jing e Hong Ching Tao (456-536 a.C.) (SEO; KIRK, 2000). Como patógenos de plantas, causam prejuízo afetando a produção de borracha, chá, café, cacau, entre outras culturas. Contudo, a capacidade de degradar lignina e celulose também confere a essas espécies uma importante função ecológica como decompositoras de árvores mortas (BUCHANAN, 2001). O termo *Ganoderma* é de origem grega (ganos = ‘brilho’; derma = ‘pele’) e adotado em função das espécies lacadas, típicas desse gênero, apresentarem uma superfície brilhante e com aspecto envernizado. Os isolados costumam ser denominados simplesmente *Ganoderma lucidum*, embora estudos taxonômicos tenham demonstrado a existência de centenas de espécies diferentes dentro da família *Ganodermataceae*. No oriente, cogumelos do gênero *Ganoderma*, popularmente conhecidos como “Lingzhi” na China e “Mannentake” ou “Reishi” no Japão, são considerados “ervas da longevidade e da boa fortuna”. No Brasil é conhecido como “Cogumelo Rei”, “Cogumelo brilhante” ou “Cogumelo do Imperador” (URBEN, 2004). Geralmente, o Lingzhi é consumido na forma de extrato aquoso, sendo indicado para uma série de enfermidades devido às suas múltiplas propriedades medicinais, como ação diurética, hepatoprotetora, cardiotônica, sedativa, analgésica, antiinflamatória, antimicrobiana, anti-hemorrágica, hipotensiva, entre outras (MIZUNO, 2004). Recentes estudos têm demonstrado a ação antitumoral e imunomoduladora de polissacarídeos do tipo  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3) extraídos de *G. lucidum*, além de vários outros princípios ativos, como um grupo de terpenóides genericamente relatados como ácidos ganodéricos (GAS), com marcada atividade

antiviral e inibidora de agregação plaquetária. Esses metabólitos se apresentam como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos produtos na indústria farmacêutica e de alimentos (WASSER, 2005). No Japão, em 1995, a produção de *G. lucidum* foi estimada em 500 toneladas em peso seco, o qual é comercializado, principalmente como suplemento alimentar, movimentando cerca de US\$ 1.628 bilhão. O seu cultivo tem aumentado na China, Taiwan, Coréia, Tailândia e Vietnã, de forma que, em 1997, a produção mundial de *Ganoderma* foi de aproximadamente 4.300 toneladas, sendo que a China contribuiu com 3.000 toneladas. Acompanhando esse próspero negócio, as pesquisas com *G. lucidum* se intensificaram, estabelecendo condições ideais para o seu cultivo tanto *in natura* quanto *in vitro* (JONG; BIRMINGHAM, 1992; WASSER, 2005). Diferentes tipos de “Lingzhi” são genericamente identificados pelas características morfológicas do corpo de frutificação, sendo que antigos textos chineses reportam seis grupos desse cogumelo em função da coloração. Segundo a crença popular, cada cor confere qualidades únicas a cada tipo. O “Lingzhi” vermelho é o mais conhecido, o qual apresenta corpo de frutificação riniforme, formando semicírculos, coloração marrom-avermelhada com aspecto lacado, ou seja, com um lustro semelhante a verniz e haste de sustentação. Outros tipos citados são o branco, violeta, amarelo, verde e preto. O corpo de frutificação preto atualmente é considerado ser das espécies *G. neo-japonicum* ou *G. formosanum* (SEO; KIRK, 2000).

## 4.2 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

*Ganoderma* Karst (*Ganodermataceae*, *Basidiomycota*) é um dos maiores gêneros de fungos poliporos. A sua classificação é confusa, gerando centenas de espécies inadequadamente incluídas nesse taxon (MURRIL, 1902; BUCHANAN, 2001). O crescente interesse em relação ao gênero *Ganoderma*, principalmente devido a suas propriedades terapêuticas, vem exigindo uma identificação mais acurada, principalmente com o propósito de depósito de patentes e para proteção de propriedade intelectual.

O gênero *Ganoderma* foi estabelecido pelo micologista finlandês Peter Adolf Karsten em 1881, no qual ele incluiu apenas uma espécie de fungo lacado, *Polyporus lucidus*, descrito pelo botânico inglês William Curtis no século XVI (KARSTEN, 1881). Seguindo Karsten, dezenas de espécies pertencentes a esse gênero foram reportadas por taxonomistas. A identificação do gênero *Ganoderma*, naquele tempo, era principalmente baseada sobre a especificidade do hospedeiro, distribuição geográfica, feições macromorfológicas do corpo de frutificação, incluindo a cor, o formato das margens do píleo e a presença de haste de sustentação, além de características dos esporos e morfologia das hifas (SEO; KIRK, 2000). A família *Ganodermataceae* foi criada por DONK, em 1933, para incluir fungos poliporos caracterizados por basidiosporos com dupla parede. Mais tarde, JULICH (1981) introduziu o nome ordinal *Ganodermatales*. Grandes variações culturais nessa família resultaram na descrição de cerca de 400 espécies, sendo que aproximadamente dois terços estão classificados no gênero *Ganoderma* Kartz, (SEO; KIRK, 2000). MONCALVO e RYVARDEN (1997) reportam 387 espécies dentro da família *Ganodermataceae*. Atualmente, o complexo *G. lucidum* inclui *G. tsugae* Murr., *G. valesiacum* Boud., *G. oregonense* Murr., *G. resinaceum* Boud., *G. pfeifferi* Bres., *G. oerstedii* (Fr.) Torr., *G. ahmadii* Stey, além de outras *taxa* que são restritas a áreas tropicais (HSEU et al., 1996; HSEU, 1997). Embora as características fenotípicas sejam fundamentais para a triagem inicial dos isolados, uma classificação baseada unicamente em dados morfológicos e fisiológicos pode gerar muitas dúvidas. Segundo RYVARDEN (1991), as características morfológicas variáveis do complexo *G. lucidum* - como tamanho, cor e formato dos corpos de frutificação - podem ser originadas por diferentes condições do meio ambiente. O desenvolvimento de métodos cladísticos, aliados aos dados morfológicos tradicionais e às informações em bases moleculares, tem contribuído para uma classificação filogenética mais acurada de *G. lucidum* (SEO; KIRK, 2000). MONCALVO e WANG (1995) e HSEU et al. (1996), analisando seqüências de nucleotídeos a partir do “internal transcribed spacers” (ITS) do gene ribossomal, descobriram muitas cepas erroneamente classificadas como *G. lucidum*, as quais foram reclassificadas.

Atualmente *G. lucidum* é classificado na seguinte posição taxonômica (SEO; KIRK, 2000):

Reino: *Funghi*

Classe: *Basidiomycetes*

Ordem: *Ganodermatales* (alguns autores continuam a reportar como *Aphylliphorales*)

Família: *Ganodermataceae* (*Polyporaceae*)

Gênero: *Ganoderma*

Espécie: *lucidum*

#### 4.2.1 Caracteres Morfológicos

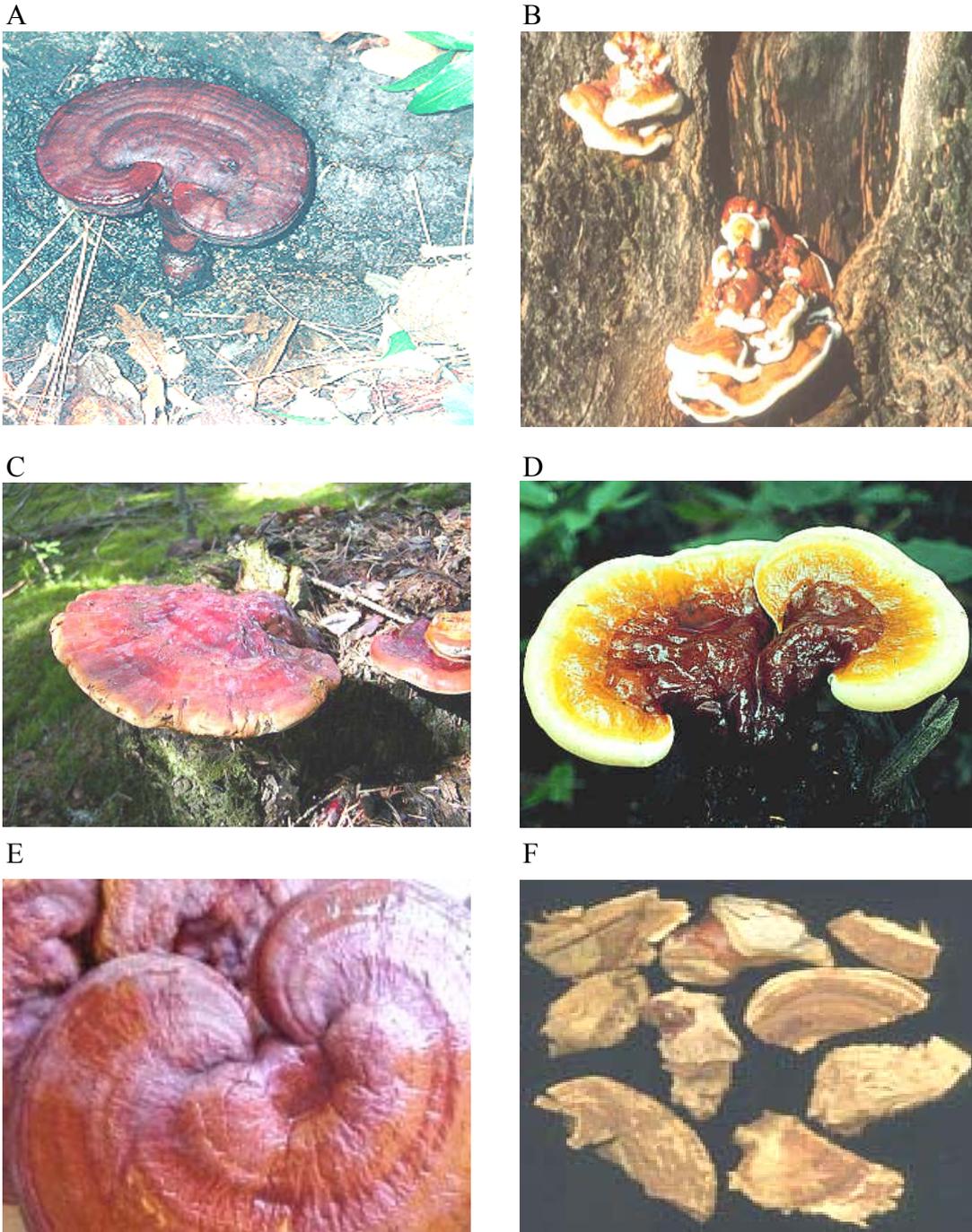
##### 4.2.1.1 Macromorfologia

O desenvolvimento do basidiocarpo (corpo de frutificação) é geralmente anual e pode levar de 3 a 6 meses, dependendo da linhagem, substrato de cultivo e fatores bióticos e abióticos (URBEN, 2004). *In natura*, troncos de árvores constituídas por madeiras duras são as plantas-hóspedes usuais do *G. lucidum*, mas algumas espécies têm sido coletadas de coníferas (SEO; KIRK, 2000). O basidiocarpo pode ser sustentado por uma haste (estipe), ou ser sésil, e se apresentar umbilicado ou não umbilicado (SHIN et al., 1986). As dimensões e a cor do basidiocarpo mostram diferenças significativas entre as espécies, sendo que a maneira do estipe se ligar ao píleo e ao hospedeiro também apresenta variação. O píleo do basidiocarpo normal é ligado lateralmente ao estipe, mas ligações tipo excêntrica, central e sésil também são produzidas. Características do estipe, incluindo tipo de ligação, diâmetro e comprimento, são consideradas ferramentas úteis para diferenciação das espécies (RYVARDEN, 1991). A característica lacada do píleo e estipe tem sido amplamente empregada na taxonomia de *Ganoderma*. De acordo com os conceitos tradicionais, a superfície de *Ganoderma* tem aspecto lacado, sendo o que o diferencia do gênero *Amauroderma*. Entretanto, algumas espécies de *Amauroderma* têm sido reportadas

como lacadas (*A. austrofujianense* e *A. leptopus*), enquanto que algumas espécies de *Ganoderma* se apresentam sem laca (*G. mongolicum*). Contudo, a característica de laca, embora não desempenhe um papel importante na segregação das espécies, permanece como auxílio viável na identificação da família *Ganodermataceae* (SEO; KIRK, 2000). A figura 1 apresenta alguns indivíduos típicos do complexo *G. lucidum*, com diferentes feitios e aspectos morfológicos. A cor da estrutura interna (contexto) varia de branco a marrom escuro, se apresentando mutável, especialmente em isolados secos, dentro de uma mesma espécie. O tamanho e formato dos poros são, também, caracteres úteis na classificação das espécies (CORNER, 1983; ZHAO, 1989).

#### 4.2.1.2 Micromorfologia

O estudo da estrutura da crosta pileal e do córtex são úteis na determinação taxonômica de membros da família *Ganodermataceae*. O sistema de hifas é geralmente trimítico (dividido em três séries), ocasionalmente dimítico. Em geral, as hifas são hialinas de paredes finas, ramificadas, septadas ou não, formando alças entrelaçadas. Hifas esqueléticas se apresentam sempre pigmentadas, pouco ramificadas, com paredes grossas, sendo influenciadas por fatores ambientais (SEO; KIRK, 2000). O basídio apresenta dimensões relativamente grandes e formato em forma de clava à piriforme, com quatro esterigmas, um apêndice hilar e um a dois vacúolos. Os basidiósporos são de parede dupla, ovóides-elipsóides, ocasionalmente ovóides-cilíndricos, sempre truncados no ápice, de coloração acastanhada, apresentando vacúolos. A parede não apresenta uniformidade de espessura, sendo a região do ápice sempre mais espessa que a base. A dupla parede é muito distinta, com a parte externa hialina e mais fina e a interna usualmente avermelhada e grossa. Os basidiosporos têm um apêndice “hilar” excêntrico sobre uma base circular, a superfície é lisa ou enrugada, sendo que na grande maioria ocorrem pequenas depressões superficiais. As dimensões dos basidiósporos, de espécimes crescidas naturalmente no Japão e Coréia, são de 8,5-11 x 6,5 x 8,5  $\mu\text{m}$  (média 10,1 x 7,5  $\mu\text{m}$ ) e 8,5-13 x 5,5-7  $\mu\text{m}$  (media de 10,4 x 6,6  $\mu\text{m}$ ), respectivamente (SEO; KIRK, 2000).

FIGURA 1- MACROMORFOLOGIA DE *G. lucidum*

FONTES: A: <http://planth.osu.edu/faculty/ellett/images/ganoderma>  
 B: <http://www.granitehydra.com/shrooms/reishi.gif>  
 C: <http://netti.nic.fi/~tsieni/kuvia/lakkakaapa>  
 D: <http://uoguelph.ca/~gbarron/bracket/ganode8>  
 E: <http://www.fruiting-bodies.co.uk/images/fb-reishi-dried3-m;>  
 F: <http://www.medherbs.de/info/ling-zhi-web>

NOTAS: A, B, C, D, F: *in natura*; F: secos.

#### 4.2.1.3 Características do cultivo

As características de crescimento de espécies do complexo *G. lucidum*, fornecem dados importantes que auxiliam a diferenciação desse grupo. *In vitro*, a morfogênese e os aspectos culturais de basidiomicetos são afetados por vários fatores ambientais, como luminosidade, aeração, temperatura, umidade e condições nutricionais. Entre esses fatores, a luz é essencial para diferenciação do píleo e do corpo de frutificação (STAMETS, 1993). A formação do primórdio, a diferenciação do píleo e o crescimento trópico do estipe de *G. lucidum* são afetados positivamente pela luz. Ao contrário, o crescimento do micélio é suprimido pela luz (SHIN; SEO, 1988a; SEO et al., 1995a, 1995b). Espécimes de *Ganoderma* semeadas em meio BDA, à temperatura ótima, desenvolvem colônias brancas ou amarelo-pálidas, tornando-se mais amarelas em exposição à luz, com aspecto floculoso. As culturas *in vitro* produzem diferentes estruturas de hifas, como geração de conexões entrelaçadas, hifas com aspecto de fibra, hifas esqueléticas e hifas em roseta (ADASKAVEG; GILBERTSON, 1989). Diferentes taxas de crescimento têm sido descritas entre as várias espécies de *G. lucidum*. O crescimento micelial sobre BDA é, em média, de 2 a 4 mm/dia, porém cepas que formam clamidosporos crescem mais rapidamente. *In vitro*, as colônias mostram vários feitos, como setorização, pigmentação, formação de primórdio do corpo de frutificação (PCF) e estruturas frutificantes atípicas (EFA), originando basidiosporos, porém sem desenvolvimento de basidiocarpo. Foi observada a formação do PCF e de EFA sobre ágar, principalmente em indivíduos do complexo *G. lucidum*, porém sem evoluir para corpo de frutificação em 30 dias (SHIN; SEO, 1988a, 1988b; SHIN; SEO, 1989). Em cultivo micelial, o desenvolvimento de EFA é induzido pela luz e ventilação adequada, enquanto que o PCF pode ser formado com baixas taxas de ventilação. A Tabela 1 apresenta as principais características do crescimento *in vitro* do complexo *G. lucidum*, em BDA. A extrema variabilidade nas características microscópicas e macroscópicas de *G. lucidum* tem resultado em um grande número de sinônimos para uma mesma espécie, tornando a sua taxonomia confusa. RYVARDEN (1991)

posiciona o gênero *Ganoderma* dentro de um “caos taxonômico” com centenas de nomes, inadequadamente circunscritos, na mesma *taxa*. Segundo o autor, seria desaconselhável a descrição de novas espécies de *Ganoderma* até que se chegasse a um consenso entre os pesquisadores. A Tabela 2 mostra a extrema variabilidade morfológica do complexo *G. lucidum*.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO DE *G. lucidum*

ESPÉCIE	Referência	Cor	Temperatura (° C)		Crescimento (mm/dia)	Esporos
			Ótima	Máxima		
<i>G. lucidum</i>	(1)	Branca	30-34	37	7 – 8	...
	(2)	Branca amarelo-pálida	25-30	33-35	2 – 7	+/-
<i>G. tsugae</i>	(1)	Branca amarelo-pálida	25-25	30	2 – 3	...
	(2)	Branca amarelo-pálida	25-30	33	1 – 2	...
<i>G. oregonense</i>	(1)	Branca amarelo-pálida	20-25	30	2 – 4	...
	(2)	Branca	25-30	...	2 – 3	...
<i>G. resinaceum</i>	(2)	Branca	...	...	3 – 4	...
<i>G. valesiacum</i>	(2)	Cinza	...	...	1 – 2	...

FONTE: Adaptado de SEO e KIRK (2000).

NOTAS: (1): ADASKAVEG e GILBERTSON (1989); (2): SEO (1995); ... : dados não mostrados.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO MACROMORFOLÓGICA DE *G. lucidum*

Autores	Steyaert (1972)	Pegler; Young (1973)	Bazzalo; Wright (1982)	Mello (1986)	Ryvarden (1991)
<b>Caracteres</b>					
<b>Tamanho</b>					
- Píleo	>20 cm	(1)...	2-8x2-4 cm	> 15 cm	2-16 cm
- Estipe <sup>(2)</sup>	>20 cm	...	4x10 cm	>12,5 cm	1-3 cm
- Estipe <sup>(3)</sup>	...	...	0,5x2 cm	...	1-3,5 cm
- Poro (/mm)	...	...	4-7	4-6	4-6
<b>Cor</b>					
- Poros	...	...	Branco- amarelado, azincetado	Branco - creme	Creme- esbranquiçado, marrom
- Estipe	Marrom-escuro	Brilhante, vermelho amarelado- preto- avermelhado	Preto avermelhado, preto	Púrpura, marrom- avermelhado, preto- avermelhado	Castanho profundo- totalmente preto
- Píleo	Marrom- avermelhado	Brilhante, vermelho amarelado, preto- avermelhado	Claro, marrom- avermelhado, escuro	Vermelho- púrpura, preto- avermelhado	Branco, creme- avermelhado, preto- avermelhado
- Contexto	Esbranquiçado	Madeira amarelada	Marrom-ocre, marrom-escuro	Cor madeira, marrom-escuro	Cor madeira a marrom
<b>Ligação estipe- píleo</b>					
- Lateral	...	Usual	Frequente	Frequente	46 espécies
- Excêntrico	...	...	...	...	1 espécime
- Central	...	...	...	...	3 espécimes
- Umbilicado	...	...	...	...	1 espécime
- Séssil	...	...	...	...	...
<b>Hifas</b>					
	...	...	Trimítica	Trimítica	Trimítica
<b>Hospedeiro</b>					
- Madeira dura	...	Comum	Comum	...	23 espécimes
- Coníferas	...	Ocasional	Raro	Não	22 espécimes

FONTE: Adaptado de SEO e KIRK (2000).

NOTAS: (1): dados não mostrados, (2): comprimento, (3): diâmetro.

### 4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *G. lucidum*

A composição química de *G. lucidum* varia em função da linhagem, das condições de cultivo e de fatores ambientais. Entre os diversos metabólitos de *G. lucidum*, os polissacarídeos e os triterpenos merecem lugar de destaque devido às importantes atividades farmacológicas que apresentam. Mais de 100 tipos de polissacarídeos e mais de 100 tipos de triterpenos já foram isolados de *G. lucidum*. Porém, existem várias outras substâncias de baixo peso molecular presentes no corpo de frutificação e no micélio, como proteínas, monossacarídeos livres, oligossacarídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, esteróides, lipídeos, cumarina e substâncias tânicas (Tabelas 3 e 4) (MIZUNO, 2004).

Os carboidratos de *G. lucidum* são constituídos principalmente por glicose e manose, juntamente com pequenas quantidades de outros açúcares, incluindo a fucose, N-acetilglucosamina, xilose e ramnose (Tabela 5). *G. lucidum* cultivado *in vitro* pode conter até 6,5% de lipídeos, valor mais elevado em relação ao crescimento *in natura* (2,5 – 3,5%). Os lipídeos incluem principalmente ácidos graxos insaturados (> 80%) e em menor quantidade ácidos graxos saturados, os quais estão localizados na membrana celular (GAO et al., 2000).

Os cogumelos apresentam alto conteúdo de fibras dietéticas, compostas principalmente por heteropolissacarídeos, em geral hemicelulose, pectinas e quitina. Acredita-se que o alto conteúdo de fibras dietéticas presentes em *G. lucidum* também contribui para a sua atividade carcinostática, diminuindo a absorção de substâncias tóxicas (MIZUNO, 2004).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *G. lucidum*

SUBSTÂNCIA	(%) por matéria seca	SUBSTÂNCIA	(%) por matéria seca
Cinzas	1 – 5	Fibras	50 – 65
Gorduras	2 – 6	Carboidratos	20 – 30
Proteínas	6 – 12	Ergosterol	0,3 – 0,4
Calorias/100g	122 - 222		

FONTE: MIZUNO (2004).

TABELA 4 - CONTEÚDO DE AMINOACIDOS DE *G. lucidum*

AMINOÁCIDOS	μmol/g	AMINOÁCIDOS	μmol/g
Asp	1,6	CySH	0,2
Thr	2,5	Ileu	1
Ser	2,7	Leu	1,1
Asn	1,3	Tyr	1,1
Glu	1,2	Phe	1,5
Gln	2,3	Lys	0,2
Pro	1,4	His	0,5
Gly	1,5	Arg	0,2
Ala	4	r-ABA	2,1
Val	2,3		
		Total	28,8

FONTE: MIZUNO (2004).

TABELA 5 – CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS DE *G. lucidum*

AÇÚCARES	PORCENTAGEM
D-glicose	58,0
D-manose	15,5
L-fucose	9,7
D-galactose	9,3
D-xilose	5,4
D-glcNac	1,0
L-ramnose	0,5

FONTE: WANG et al. (2002).

Os metais pesados encontrados em cogumelos normalmente são oriundos da água de irrigação. CHIU et al. (2000), ao analisarem o corpo de frutificação de *Ganoderma*, encontraram um conteúdo protéico de 68,9%, uma quantidade de glicose de 11,1% e metais pesados em torno de 10,2% (101,948 μg/g) (Tabela 6).

TABELA 6 - CONTEÚDO DE MINERAIS DE *G. lucidum*

MINERAIS	µg/g	MINERAIS	µg/g
K	84.650	Ni	133
Ca	9.449	Pb	86
Mg	4.480	Cr	69
Na	1.612	Bi	71
Ge	489	Cu	47
Zn	257	Co	31
Ga	246	Sr	28
Mn	179	Be	4
Fe	115	Ba	2

FONTE: CHIU et al., (2000).

NOTAS: Resultados de extrato em pó de *Ganoderma*; os íons foram determinados por espectrometria de absorção atômica; Cd, Hg, Se, Ti e Li não foram detectados.

#### 4.3.1 Controle de Qualidade e Legislação Reguladora de Produtos à Base de Cogumelos

Geralmente, os produtos contendo cogumelos são produzidos a partir do corpo de frutificação, o que implica em grande variabilidade, em relação ao feitio e a composição química, originando sérios problemas para o estabelecimento de padrões de qualidade. As formas de apresentação mais comuns desses produtos são:

1. Corpos de frutificação secos ou pulverizados, na forma de cápsulas ou tabletes;
2. Extratos aquosos e/ou alcoólicos de corpo de frutificação e de esporos;
3. Biomassa ou extratos de micélio ou de caldo de cultura de fermentação submersa.

Existem poucos estudos relativos ao controle de qualidade de formulações a base de *Ganoderma*. Segundo CHEUNG, NG e HOOD (2001), muitas das formulações comerciais com *Ganoderma* contêm misturas complexas de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleosídeos, triterpenóides, esteróides, ácidos graxos, vitaminas e traços de outros elementos. Os autores relatam uma técnica de determinação de nucleosídeos (adenosina, uridina) por cromatografia que permite avaliar a quantidade de *Ganoderma* nesses produtos. WOO et al. (1999) reportam uma técnica de identificação de plantas medicinais, incluindo espécies de *Ganoderma*, na

qual a origem geográfica do isolado pode ser determinada por espectroscopia infravermelha.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou, em 1991, o documento “Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines”, o qual indica como critério de avaliação desses produtos (incluindo cogumelos) o histórico de seu emprego, testemunhado através de monografias e farmacopéias. É recomendado que o produto contenha informações sobre a quantidade de princípios ativos, dosagem, forma de administração, duração do tratamento, efeitos adversos e contra-indicações.

Para a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) as formas dessecadas inteiras ou fragmentadas de cogumelos são consideradas alimentos, às quais não se pode atribuir propriedades medicinais em rótulos ou em qualquer outro tipo de material publicitário (Resolução CNNPA 12/78 e Resolução CNNPA 13/77). Produtos obtidos por outras formas de processamento, tais como pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e líquidos, não são considerados alimentos, devendo comprovar segurança de uso e ausência de risco à saúde (Resolução ANVS/MS nº 17/99). Nos Estados Unidos também não se admite uma classe específica para alimentos com propriedades nutricêuticas, sendo que qualquer produto com ação terapêutica, independente da forma como é consumido, é classificado como medicamento e deve comprovar a sua eficácia (McGUFFIN; YOUNG, 2005).

No Japão, onde existe grande demanda no consumo de alimentos funcionais, esses produtos são oficialmente aceitos e designados para serem consumidos como parte de uma dieta diária regular, visando promover e manter a saúde. Para se obter a licença, recomenda-se a apresentação do produto na forma de alimento a ser ingerido regularmente. Seus efeitos terapêuticos e segurança devem ser claramente testados em bases médicas, além do que o fabricante deve definir os níveis apropriados de consumo, relatar as propriedades físico-químicas e composição nutricional (EHRNREICH, 2000).

O desenvolvimento *in vitro* de cogumelos, em meios líquidos ou sólidos, resulta em um produto com composição mais constante e previsível que os espécimes crescidos *in natura*. Através de processos biotecnológicos adequados pode-se

monitorar a produção de cogumelos em três níveis: controle da cepa, controle do processo de manufatura e controle do produto final. Nesse contexto, o cultivo micelial de cogumelos representa uma alternativa viável para o estabelecimento de padrões de qualidade que garantam a uniformidade das formulações farmacêuticas e nutricionais (WASSER, 2002).

#### 4.4 CULTIVO *IN VITRO* DE *G. lucidum*

*G. lucidum* é muito raro na natureza, de forma que sua quantidade não é suficiente para exploração comercial (BEROVIC et al., 2003). O desenvolvimento do corpo de frutificação de vários cogumelos, incluindo *G. lucidum*, tem sido produzido em culturas sólidas, usando como substrato gramíneas, grãos de cereais, serragem ou madeira, porém o seu crescimento pode demorar vários meses (técnica Jun-Cao) (URBEN, 2004). Os polissacarídeos e outros princípios ativos podem ser isolados não somente do corpo de frutificação do cogumelo, mas também do micélio em cultura pura. Desse modo, o cultivo *in vitro* é visto como uma alternativa promissora para obtenção desses princípios ativos em curto espaço de tempo e sob condições controladas (WASSER, 2005). O cultivo micelial de cogumelos pode ser feito por fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação líquida ou submersa.

##### 4.4.1 Fermentação em Estado Sólido

A FES consiste no crescimento do microrganismo sobre um substrato sólido e úmido, com fluxo de ar contínuo e sem a presença de líquido livre entre as partículas de substrato. Esse ambiente se assemelha ao habitat natural do microrganismo, permitindo sua proliferação e esporulação sob condições controladas (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). A FES é empregada industrialmente para obtenção de uma série de produtos, como enzimas, molhos, ácidos orgânicos e bebidas alcoólicas (RAIMBAULT, 1998). Três fases compõem a FES:

- a) Fase sólida: o mais comum é o emprego de materiais sólidos naturais, como grãos de cereais ou resíduos da agroindústria, os quais atuam como suporte físico e fonte de nutrientes. A fase sólida também pode ser composta por partículas inertes, suplementadas com nutrientes, que apenas servem de suporte físico para o microrganismo;
- b) Fase líquida: fica em contacto permanente com a fase sólida, permitindo a interação entre as duas fases;
- c) Fase gasosa: permeia o sistema, controlando a temperatura e oxigenando a mistura (LI; SHEN, 2003).

Uma das principais vantagens da FES é a obtenção do produto desejado a partir de um substrato barato, como resíduos provenientes da agroindústria (BEAUX, et al., 1997). Porém, como na FES o microrganismo cresce intimamente aderido à fase sólida, a quantificação da biomassa ao final do processo constitui um sério problema. Outras desvantagens da FES residem na dificuldade de um eficiente controle de pH, temperatura e concentração do substrato (LI; SHEN, 2003).

#### 4.4.2 Fermentação Líquida ou Submersa

A fermentação submersa é um processo que ocupa espaços reduzidos, o que a torna vantajosa no sentido de barateamento de custos e diminuição das chances de contaminação. O cultivo micelial de *G. lucidum* por fermentação submersa, permite a recuperação do endopolissacarídeo (polissacarídeo intracelular - IPS) a partir da biomassa, enquanto que do caldo de cultivo se recupera o exopolissacarídeo (polissacarídeo extracelular - EPS), além de outras substâncias bioativas, como os ácidos ganodéricos. A produção do EPS é um processo mais simples em relação à do IPS, já que a sua recuperação é relativamente fácil e não requer múltiplas etapas de extração, além de gerar menos produtos finais de degradação, sendo mais atrativa para produção em escala industrial (LEE; LEE; LEE, 1999).

O cultivo submerso de *G. lucidum* está sujeito a uma variedade de condições físico-químicas, como temperatura, densidade e morfologia do inóculo, pH, pressão

osmótica, taxa de agitação e de aeração (FANG; TANG; ZHONG, 2002). A composição do meio de cultura e as concentrações iniciais dos açúcares também atuam de forma decisiva sobre o processo fermentativo. As condições ótimas de fermentação podem ser estabelecidas em função do produto final desejado, quer seja biomassa, EPS, IPS ou ácidos ganodéricos.

Embora várias pesquisas relatem a otimização das condições de cultivo submerso de *G. lucidum*, os requerimentos nutricionais ainda não foram claramente estabelecidos (KIM et al., 2002).

YANG e LIAU (1998) reportam a formação de polissacarídeo por *G. lucidum*, em cultura submersa, a uma temperatura ótima entre 30 à 35° C e pH ideal de 4 a 4,5. Segundo os autores, a agitação e aeração do caldo de cultivo influenciaram de forma benéfica a secreção do polissacarídeo.

LEE, LEE e LEE (1999) relatam aumento na produção de EPS através de uma técnica de controle de pH em dois estágios. O cultivo foi iniciado em pH 3 até atingir a fase exponencial de crescimento e, a seguir, foi mantido em pH 6 até o final do processo. Além disso, o controle de pH favoreceu a manutenção da morfologia micelial e diminuiu a viscosidade no sistema.

YANG, KE e KUO (2000) estudaram o efeito da adição de ácidos graxos ao caldo de cultivo de *G. lucidum*. O ácido oléico, na concentração de 0,15 g/100 mL, propiciou um aumento de biomassa de 0,20 para 0,46 g/100 mL, enquanto que o ácido palmítico aumentou a produção do polissacarídeo em 40%.

Assim como na FES, na fermentação líquida também é possível o emprego de resíduos provenientes da agroindústria, o que permite o desenvolvimento de um processo ecologicamente correto e atrativo do ponto de vista do custo-benefício.

LEE, SONG, HWANG (2003) relatam a bioconversão de um subproduto gerado na fabricação de queijo, o qual serviu como fonte de nutrientes para o desenvolvimento micelial de *G. lucidum*. Com o emprego desse substrato alternativo, que tradicionalmente é desprezado como resíduo e gera considerável poluição ao meio ambiente, os autores desenvolveram um processo otimizado e sem emissão de lixo,

constituindo uma solução viável para o problema ambiental existente (LEE et al., 2003a).

As fontes de nitrogênio e de carbono são os principais constituintes de um meio de cultivo. FANG e ZHONG (2002a) estudaram os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e concentrações iniciais de glicose sobre o crescimento celular e a produção de metabólitos bioativos por *G. lucidum*, em cultivo submerso. Em altas concentrações iniciais de glicose houve um incremento na concentração de EPS e baixa produção de biomassa. Segundo os autores, a alta osmolaridade do meio é um fator de estresse para as células, levando à inibição do crescimento celular e a aumento na produção de polissacarídeo, como forma de defesa.

TANG e ZHONG (2002) relatam um processo de fermentação submersa em batelada, conduzido em frascos de 250 mL, objetivando a produção simultânea de ácido S ganodérico (GAS) e polissacarídeos por *G. lucidum*. Nesse estudo, os autores pesquisaram o efeito de diferentes fontes de carbono (sacarose, maltose, lactose e glicose) e da concentração inicial de açúcar sobre a produção dos metabólitos bioativos. A sacarose aumentou a produção do EPS, embora tenha prejudicado o crescimento celular e a produção de IPS e de GAS. A substituição da sacarose pela lactose propiciou aumento de produção de biomassa, GAS e de endopolissacarídeo. O aumento na concentração inicial de lactose diminuiu o acúmulo de GAS, sendo que a sua produção foi marcadamente estimulada através da adição contínua de pequenas quantidades desse substrato ao caldo de cultura (*pulse feeding*). Esse bioprocessos pode ser eficientemente reproduzido em biorreator, controlando a concentração de oxigênio dissolvido entre 20 a 35% do ar saturado.

A Tabela 7 apresenta diversas formulações, propostas por vários autores, com o intuito de se obter o máximo de rendimento dos metabólitos bioativos gerados através do cultivo submerso de *G. lucidum*.

TABELA 7 - CULTIVO DE *G. lucidum* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS

Referência	Meio de cultura (g/L) e condições de cultivo (agitação, temperatura, tempo)	Biomassa (g/L)	EPS <sup>(1)</sup> (g/L)	IPS <sup>(1)</sup> (g/L)	GAS (g/L)
Yang e Liao (1998)	Gl-50; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -0,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -0,5; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O - 0,5; EL-1; NH <sub>4</sub> Cl-4; pH 4-4,5; 150 rpm; 30-35° C; 7-14 dias.	...	1,6	...	...
Lee, Lee, Lee (1999)	Gl-60; EL-6; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -0,5; pH inicial 3 e depois pH 6; 150 rpm; 25° C; 8 dias.	8,2	<sup>(2)</sup> 20,1	...	...
Yang, Ke, Kuo (2000)	Gl-50; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -0,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -0,5; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-0,5; EL-1; NH <sub>4</sub> Cl- 4; ácido palmítico-2,5; pH 4, 100 rpm; 30° C; 7 dias.	6,1	0,32	...	...
Fang e Zhong (2002a)	a) Gl-35; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -1; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-0,5; EL-10; Peptona-5; Biotina-0,05; pH 5,5.	15,8	0,62	0,86	150
	b) Gl-35; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O-1; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-0,5; EL-5; Peptona-5; Biotina-0,05; pH 5,5.	15,4	0,81	0,81	171
	c) Gl-50, mesma formulação de b.	16,7	0,85	1,19	212
	d) Gl-65, mesma formulação de b; 120 rpm; 30° C; 7-14 dias.	12,6	1,08	0,95	159
Tang e Zhong (2002)	a) Sacarose-35; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O- 1.; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-0,5; EL-5; Peptona-5; Biotina - 0,05; pH 5,5.	3,55	0,63	0,25	35
	b) Maltose-35, mesma formulação do anterior;	12,22	0,57	1,16	119
	c) Lactose-35, mesma formulação do anterior,	12,32	0,53	1,43	180
	d) Gl-35, mesma formulação do anterior. 120 rpm, 30 ° C, até 14 dias	10,08	0,47	0,95	143
Kim et al. (2002)	a) Caldo dextrose batata-24; Extrato de malte-10; Peptona-1;	7,0	1,16	...	...
	b) Gl-20; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -0,46; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -1; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-0,5; Peptona-2; Extrato de levedura-2, pH 5.	5,7	0,66	...	...
	c) Glicose-10; Extrato de malte-3; Peptona-5; El-3, pH 5; 150 rpm, 25° C, 15 dias.	16,3	5	...	...

NOTAS: Gl = Glicose, EL= Extrato de levedura, EPS = polissacarídeo extracelular, IPS = polissacarídeo intracelular, GAS = ácido ganodérico, (1): analisado pelo Método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, et al. , 1956), (2): medido por gravimetria, ... dados não disponíveis.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE *G. lucidum*

*G. lucidum* contém uma mistura heterogênea de polissacarídeos, incluindo glucanas, heteropolissacarídeos e proteoglicanas. Essas moléculas são extraídas de esporos e de corpos de frutificação de espécimes desenvolvidos na natureza. O desenvolvimento de *G. lucidum* por fermentação submersa permite a extração de polissacarídeos a partir do micélio (IPS) e do caldo de cultivo (EPS).

Alguns polissacarídeos são ligados a peptídeos por aminoácidos como serina ou treonina, ou também se complexam a lipídeos. Os polissacarídeos divergem entre si quanto à solubilidade em água, a qual está na dependência do peso molecular de forma inversa (TABATA et al., 1981). Existem polissacarídeos que são solúveis somente em solventes orgânicos ou soluções alcalinas ou ácidas. Todos esses fatores influenciam a recuperação dos polissacarídeos, de forma que é essencial o emprego de um processo de extração adequado, visando à preservação das suas atividades biológicas (GAO et al., 2000).

Normalmente se emprega a seguinte metodologia para extração de polissacarídeos a partir do corpo de frutificação:

- 1) secagem e trituração do corpo de frutificação;
- 2) remoção de lipídeos;
- 3) extração com água;
- 4) remoção de proteínas e impurezas;
- 5) precipitação com metanol ou etanol;
- 6) centrifugação e/ou filtração;
- 7) purificação do sedimento.

Frações polissacarídicas solúveis em água são usualmente extraídas a 100° C, por 16 horas, aproximadamente (GAO et al., 2000). As frações insolúveis podem ser extraídas com álcalis (soluções de hidróxido de sódio, oxalato de amônio ou dimetil sulfóxido – DMSO) (MIZUNO, 2004).

A remoção dos lipídeos pode ser feita com a adição de etanol ou éter etílico. As proteínas podem ser removidas com ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético ou

solvente de Sevag. A degradação enzimática de proteínas é inapropriada, desde que as proteoglicanas também serão degradadas. A diálise é empregada para remover moléculas de baixo peso molecular.

Para a quantificação dos polissacarídeos, o método mais empregado é o fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), porém essa técnica só é apropriada para polissacarídeos compostos por aldohexose, aldopentose, metilaldose e ácido urônico, não sendo válido para polissacarídeos contendo glicosaminoglicanas (GAO et al., 2000). Outro método de quantificação de polissacarídeos muito citado é da Antrona, no qual ocorre uma reação semelhante a da técnica com fenol-sulfúrico (YEMM; WILLIS, 1954). A purificação pode ser feita através do fracionamento do composto por sucessivas passagens por colunas cromatográficas (MIZUNO, 2004).

Para a obtenção de polissacarídeos a partir de *G. lucidum* desenvolvido em cultivo submerso, primeiro separa-se o micélio do caldo de cultivo por centrifugação e /ou filtração. É recomendável que, para obtenção do EPS, o caldo de cultivo seja previamente reduzido a  $\frac{1}{4}$  de seu volume em rotoevaporador. A seguir, o caldo de cultivo reduzido é adicionado de álcool etílico ou acetona (1:4), sendo que o EPS precipitado é separado por centrifugação. Para extração do endopolissacarídeo, o micélio é primeiramente tratado com etanol para remoção dos lipídeos, a seguir é adicionado de água, triturado e fervido por aproximadamente 2 h. A mistura micelial é filtrada e o sobrenadante é precipitado com álcool etílico ou acetona (1:4). O EPS é separado por centrifugação. Baixas temperaturas favorecem a precipitação dos polissacarídeos, de forma que, após adição de éter ou acetona, é aconselhável deixá-los por 12 h à temperatura de refrigeração (4°-8° C). Após a recuperação, o precipitado é tratado com solventes orgânicos (éter, acetona), através de sucessivas etapas de centrifugação, e secado em estufa a 50°C.

Os demais passos de purificação e quantificação são iguais aos empregados para a obtenção de polissacarídeos a partir do corpo de frutificação. Várias pesquisas têm reportado diferentes metodologias para extração e purificação de polissacarídeos de *G. lucidum* (Tabela 8).

TABELA 8 – EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE *G. lucidum*

Referência	Material	Substância	Metodologia de Extração e Purificação	Análise
WANG et al. (1997)	Carpóforo	PS solúvel em água	Fervura (8-12 h), filtração, precipitação do filtrado com etanol, purificação (gel-filtração- Sephadex G50), cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose).	...
YANG; LIAU (1998)	Caldo de cultivo	EPS total	Centrifugação do caldo de cultivo, precipitação do sobrenadante com etanol 95%, centrifugação e secagem (60°C, 10 min.).	<sup>(1)</sup> Fenol-sulfúrico
LEE et al. (1999)	Caldo de cultivo	EPS total	Centrifugação do caldo de cultivo, precipitação do sobrenadante com acetona, coleta do EPS através de agitação vigorosa com bastão de vidro e secagem (105° C, 5 h).	Gravimetria
CHEUNG et al. (2000)	Micélio de cultivo submerso	IPS solúvel em água	Separação do micélio (filtração), lavagem do micélio com água deionizada, obtenção do extrato aquoso por autoclavação (20 min).	Fenol-sulfúrico
CHIU et al. (2000)	Carpóforos	Extrato total	Liofilização dos carpóforos, trituração, autoclavação (20 min, 121° C).	Hexoquinase/G-6-P desidrogenase
YANG et al. (2000)	Caldo de cultivo	EPS total	Filtração do caldo, precipitação do sobrenadante com etanol 95%, centrifugação, secagem (60° C).	Fenol-sulfúrico
FANG; ZHONG, (2002a)	Caldo de cultivo	EPS, IPS	EPS: filtração do cultivo, diálise do sobrenadante, precipitação com etanol 95%, centrifugação, dissolução em NaOH 1 M (60° C, 1h). IPS: extração do micélio seco com NaOH 1 M (60° C, 1 h).	Fenol-sulfúrico
KIM et al. (2002)	Caldo de cultivo	EPS	Centrifugação do caldo de cultivo, filtração do sobrenadante (0,45µm), precipitação com etanol (4° C), centrifugação, liofilização do precipitado.	Gravimetria
LU et al. (2002)	Micélio de FES	Extrato total	Extração com água quente, filtração e secagem em “spray-dried”	...

NOTAS: PS: polissacarídeo, ... : dados não disponíveis, EPS: polissacarídeo extracelular, IPS: polissacarídeo intracelular, DEAE: 2-dietilaminoetil, (1): DUBOIS et al. (1956).

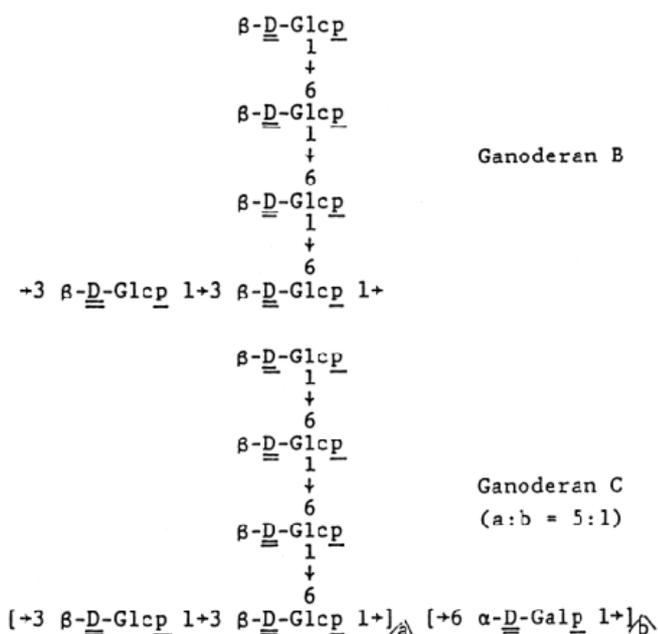
## 4.6 PRINCIPAIS METABÓLITOS BIOATIVOS DE *G. lucidum*

### 4.6.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos pertencem a uma classe estruturalmente diversa de macromoléculas, formando polímeros de resíduos de monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas. O que os diferencia de outros biopolímeros, como proteínas e ácidos nucleicos, é a capacidade elevada de carrear informações biológicas, em função do grande potencial de variabilidade estrutural (SHARON; LIS, 1993). Esta característica confere-lhes a flexibilidade necessária para participarem de interações celulares em organismos superiores (WASSER, 2002). Polissacarídeos com atividade biológica são amplamente encontrados entre fungos superiores, sendo que a maioria deles pode compartilhar uma única estrutura em espécies diversas, porém com propriedades distintas. Nos cogumelos, os polissacarídeos se apresentam principalmente como glucanas com diferentes tipos de ligações glicosídicas, como as  $\beta$ - glucanas (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) e as  $\alpha$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3) (MIZUNO, 1996, 1999; BAO et al., 2002). Esses polissacarídeos possuem moléculas lineares e ramificadas, formadas a partir de uma estrutura central composta por unidades de glicose e ligadas a diferentes cadeias laterais. A cadeia lateral das heteroglucanas é composta por ácido glucorônico, xilose, galactose, manose, arabinose ou ribose, sendo que essas moléculas podem se apresentar como o principal componente ou formando combinações entre si. Glucanas, em geral, são polissacarídeos contendo unidades de glicose em seu esqueleto central (WASSER, 2002). Geralmente, polissacarídeos com ação antitumoral apresentam ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) na cadeia principal e pontos de ramificação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), porém um grande número de glucanas estruturalmente diferentes e também biologicamente ativas têm sido descritas. Alto peso molecular também torna a molécula de polissacarídeo mais eficiente. Uma conformação em tríplice hélice terciária em glucanas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) é importante para promover a atividade imunomoduladora do polissacarídeo (WASSER, 2002).

TOMODA et al. (1986) isolaram dois peptidoglicanas com propriedades hipoglicêmicas de *G. lucidum*, os quais foram identificados como ganoderans B e C. A estrutura central e as cadeias laterais do ganoderam B apresentam ligações D-glucopiranosil  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), sendo composto por uma glucana (55,1%) e um peptídeo (44,4%), e os seguintes aminoácidos (mol %): glicina (13,6), ácido aspártico (12,3), alanina (10,9), ácido glutâmico (10,3), treonina (9,4), serina (9,1), valina (6,6), tirosina (5,5), leucina (4,1) e outros tipos em quantidades menores. O ganoderam C apresenta ligações D-glucopiranosil  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e uma ligação D-galactopiranosil  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), sendo composto por um polissacarídeo (72,5%) contendo 69,6% de D-glicose e 2,9% de D-galactose; e um peptídeo (25,5%), contendo os seguintes aminoácidos (mol %): glicina (12,7), alanina (12,6), serina (11,5), treonina (11,1), ácido aspártico (9,2), ácido glutâmico (7,6), valina (6,6), tirosina (5,5), prolina (5,2), leucina (4,0), além de outros aminoácidos em quantidades menores. A Figura 2 apresenta a provável estrutura dos ganoderans B e C.

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DE  $\beta$ -D-GLUCANAS



FONTE: TOMODA et al. (1986).

#### 4.6.2 Compostos Triterpênicos

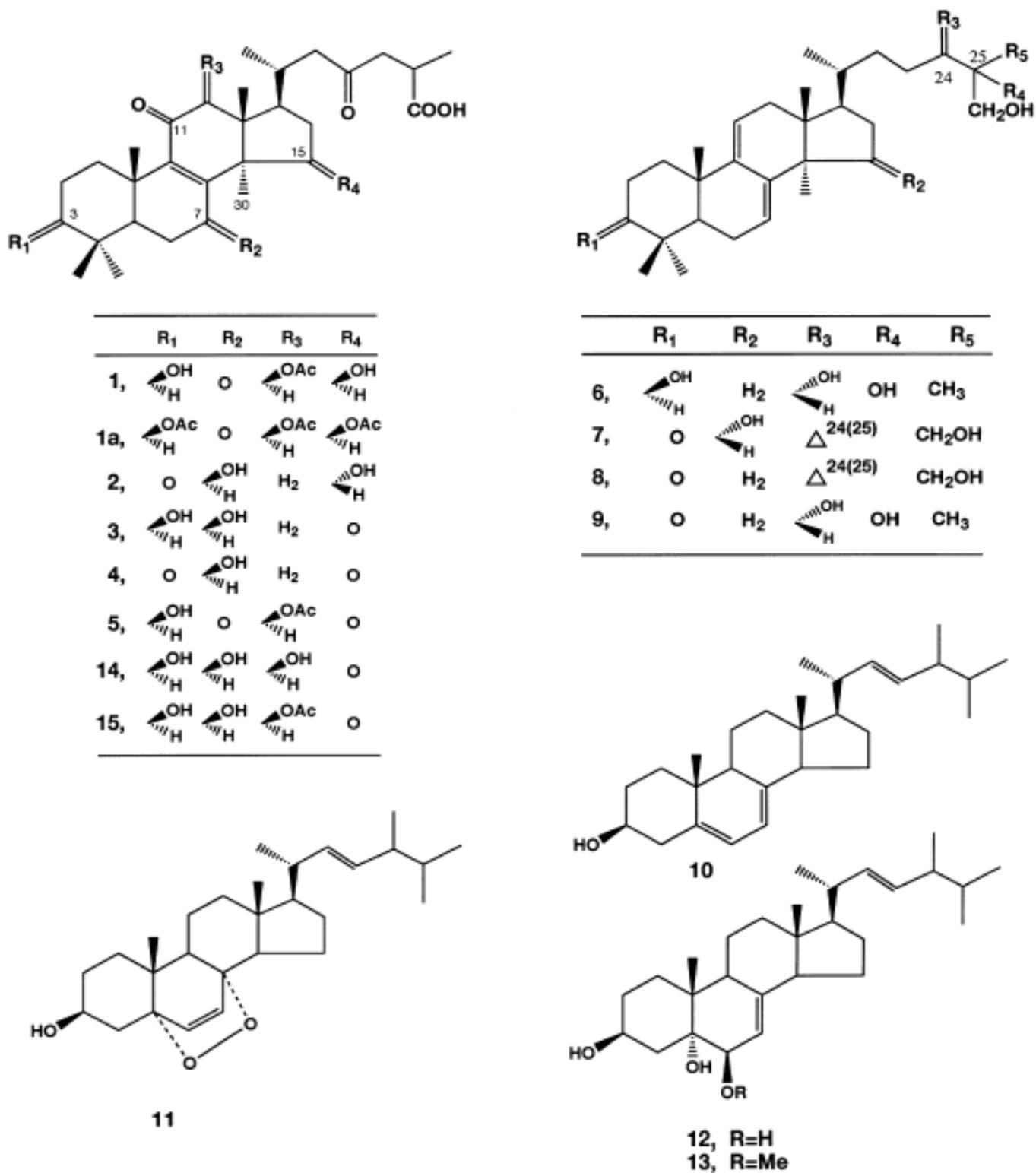
A literatura relata o isolamento de 45 compostos triterpênicos, tipo lanostane, a partir de extratos etílicos de *G. lucidum*. Esses compostos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, como ação antialérgica, antiandrogênica, anti-hipertensiva, antiviral e antitumoral (GAO et al., 2002a; MIZUNO, 2004).

Através de fracionamento com metanol MEKKAWY et al. (1998) isolaram vários triterpenos do corpo de frutificação de *G. lucidum*. A purificação final desses compostos bioativos, através de repetidas passagens em HPLC, originou 13 substâncias, sendo que a estrutura foi identificada em função de suas propriedades espectroscópicas (Figura 3). Segundo os autores, os triterpenos inibiram o efeito citopático do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em cultivos celulares e também a atividade enzimática de proteases, porém nenhum deles demonstrou atividade inibitória sobre a transcriptase reversa. Em especial, um triterpeno altamente oxigenado, denominado ácido ganodérico- $\alpha$ , se apresentou eficaz contra o HIV-1, com atividades antiprotease e antiproliferativa.

MIZUSHINA et al. (1999) isolaram do corpo de frutificação de *G. lucidum* três compostos terpênicos: ácido lucidênico O; lactona lucidênica e um esteróide identificado como cerevisterol, os quais inibiram seletivamente a ADN-polimerase de células eucarióticas de mamíferos. O ácido lucidênico e a lactona lucidênica também foram capazes de inibir a transcriptase reversa do HIV-1.

Várias outras pesquisas têm comprovado efeitos farmacológicos diversos dos triterpenos de *G. lucidum*, como inibição da agregação plaquetária (SU; SHIAO; WANG, 1999; SU; SHIAO; WANG, 2000) e atividade antitumoral (LEE et al., 1998, LIN et al., 2003).

FIGURA 3- ESTRUTURA QUÍMICA DE ÁCIDOS GANODÉRMICOS



FONTE: MEKKAWY et al. (1998).

#### 4.6.3 Ling Zhi-8

Ling Zhi-8 (LZ-8) é uma proteína purificada a partir do micélio de *G. lucidum*, a qual possui efeito mitogênico e imunossupressor. Trata-se de um homodímero com dois polipeptídeos de 110 aminoácidos, peso molecular de 13 a 17 kDa, contendo menos que 2% de carboidrato e apresentando estruturas primária e secundária similares às encontradas nas cadeias pesadas de imunoglobulinas. Esse fato levanta a hipótese de que LZ-8 possa ser um ancestral protéico das imunoglobulinas (HEM et al., 1995). Em ratos, a LZ-8 inibiu a produção de imunoglobulinas contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (KINO et al., 1991). FRENDSCHO et al. (1993) reportam efeito mitogênico de LZ-8 sobre linfócitos periféricos humanos e aumento na expressão de moléculas de adesão intracelular (ICAM-1). HEM et al. (1995) relatam a atividade mitogênica de LZ-8 sobre células mononucleares humanas (MNC) e também o seu efeito imunossupressor *in vivo* em ratos transplantados.

#### 4.6.4 Lectinas

Lectinas são proteínas amplamente distribuídas no reino animal e vegetal, incluindo bactérias, vírus e fungos. A maioria das lectinas vegetais é um material de reserva com potencial função de defesa contra insetos e fungos. Lectinas contendo manose e N-acetilglucosamina agem nos estágios primários da fagocitose, ligando microrganismos a macrófagos e outros fagócitos. As lectinas também estão envolvidas na migração de linfócitos da circulação para os órgãos linfóides. Alguns cogumelos sintetizam lectinas com atividades imunomoduladoras, antitumorais e citotóxicas (NGAI; NG, 2004). KAWAGISHI et al. (1997) descreveram uma lectina de 18 kDa extraída de micélio de *G. lucidum* e outra do corpo de frutificação. As duas lectinas diferiram da proteína LZ-8, apresentando peso molecular distinto e diferentes atividades de ligação a açúcares.

NGAI e NG (2004) relatam uma lectina termoresistente (testada até 100° C) de *Ganoderma capense*, com atividade mitogênica sobre esplenócitos de rato, superior ao

mitógeno conA. Essa lectina também apresentou atividade antiproliferativa sobre células leucêmicas e células de hepatoma, mas não foi antifúngica e não inibiu a transcriptase reversa do HIV-1.

#### 4.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Os principais componentes do sistema imunológico são os leucócitos que podem ser classificados em dois grupos funcionais: os fagócitos (mastócitos, monócitos/ macrófagos, neutrófilos e basófilos) e os linfócitos (células T e B). Outro componente celular fundamental para o sistema imunológico é a célula “natural killer” (NK) (STITES; TERR; PARSLOW, 1997). Cada classe específica de células pode ser diferenciada através de antígenos de superfície denominados CD (diferenciação de classe).

Os macrófagos se originam na medula óssea, atingem a circulação como monócitos e finalmente se tornam macrófagos maduros, virtualmente espalhados por todos os tecidos e coletivamente inseridos no “sistema fagocítico mononuclear”. Funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC), além de controlarem a proliferação e diferenciação de linfócitos através da síntese de mediadores químicos. Alguns macrófagos têm receptores manose-específicos, denominados CD14, que reconhecem carboidratos e lipídeos bacterianos ou de fungos (ERWIG et al., 1998).

As células NK derivam da medula óssea e formam uma linhagem linfóide distinta, cuja atividade contra células tumorais ou infectadas por vírus é espontânea, ou seja, não necessita de contato prévio com o antígeno. Além de outras proteínas, as células NK secretam perforinas, que são enzimas capazes de lesar a membrana celular das células-alvo (KODAMA et al., 1999).

O sistema imunológico é dividido em inespecífico (inato ou natural) e específico (adquirido) (McNEELA; MILLS, 2001).

As defesas inespecíficas atuam como uma primeira linha de ataque e compreendem as reações de febre e inflamação, o mecanismo de fagocitose, a ação de anticorpos circulantes e as defesas moleculares. As defesas moleculares envolvem a

ação de mediadores químicos produzidos pelas células, como o interferon (IFN) e o sistema complemento (C) (STITES; TERR; PARSLOW, 1997).

A imunidade específica é controlada por células B e T, após exposição a antígenos. Os linfócitos B participam da resposta humoral e, quando ativados, se diferenciam em plasmócitos, células capazes de secretar imunoglobulinas (Igs), que atuam como anticorpos (McNEELA; MILLS, 2001). Os linfócitos B se proliferam *in vitro* com adição de mitógenos como lipopolissacarídeos de parede bacteriana (LPS) (COLIGAN et al., 1992).

Os linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular, atuam modulando a resposta imunológica através da produção de mediadores químicos e ativando outras células do sistema imunológico. As células T (CD3+) somente reconhecem antígenos apresentados na superfície celular de células apresentadoras de antígenos (APC), sendo que essas células processam o antígeno e o apresentam ligado em sua superfície a proteínas pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (McNEELA; MILLS, 2001). A proliferação *in vitro* dos linfócitos T ocorre com o emprego de mitógenos como a concanavalina A (Con-A) (COLIGAN et al., 1992). As células T são divididas em duas classes distintas: células T auxiliares CD4+ (Th) restritas ao MHC-II, que medeiam seus efeitos pela secreção de citocinas; e células T citotóxicas CD8+ (Tc) restritas ao MHC-I, que também secretam citocinas, mas atuam principalmente pela lise direta das células tumorais (ROSEMBERG, 1993; MCNEELA; MILLS, 2001). Os linfócitos Th são os principais coordenadores da resposta imunológica, os quais se diferenciam em subgrupo Th1 e Th2, por ação de diferentes citocinas. As células Th1 atuam na ativação de macrófagos, células Tc, reações de hipersensibilidade e reações inflamatórias. As células Th2 atuam na estimulação de linfócitos B, nas respostas alérgicas e anti-helmínticas. Cada grupo de citocinas produzida por um desses tipos celulares inibe a produção de citocinas pelo outro tipo, de forma que Th1 e Th2 se autoregulam (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

A Figura 4 apresenta, de forma resumida, as principais interações entre a resposta imunológica humoral e a celular.

#### 4.7.1 Citocinas

As citocinas são moléculas protéicas solúveis que apresentam um amplo espectro de ação, como efeito sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função celular. Interleucinas (IL) correspondem às diferentes citocinas que medeiam a comunicação entre leucócitos, sendo reconhecidas através de uma seqüência numérica. Também classificados como citocinas têm-se os interferons (IFN), o fator de necrose tumoral (TNF), o fator estimulante de colônias (CSF) e a “monocyte chemoattractant protein” (MCP-1) (STITES; TERR; PARSLOW, 1997, O’SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

Diferentes tipos de células secretam citocinas, como macrófagos, linfócitos, mastócitos, células NK e também, células tumorais. O subgrupo de células Th1 secreta principalmente IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , moléculas que determinam funções associadas à ativação de macrófagos, ativação de células Tc, e reações inflamatórias e de hipersensibilidade. As células Th2 produzem principalmente IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que atuam na estimulação de linfócitos B nas respostas alérgicas e anti-helmínticas (O’SHEA; MA; LIPSKY, 2002). As citocinas são compostos extremamente potentes que agem em concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-15}$  gramas, desencadeando reações em cascata. Uma citocina pode induzir a secreção de outras citocinas, produzindo efeitos autócrinos sobre a própria célula que a liberou, e ação parácrina sobre as células vizinhas (STITES; TERR; PARSLOW, 1997). As citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aumentam as propriedades inflamatórias, enquanto que a IL-4, IL-3 e TNF- $\beta$  diminuem essas propriedades (ERWIG et al., 1998).

O TNF existe em duas formas distintas denominadas de TNF- $\alpha$ , também conhecido como caquexina; e o TNF- $\beta$ , também denominado de linfotoxina. Essas duas formas protéicas apresentam, aproximadamente, 34% de homologia na seqüência de aminoácidos, se ligam aos mesmos receptores celulares e desempenham várias funções em comum. O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos ativado e, em menor quantidade, por outros tipos de células, como células B e T, células NK, células endoteliais, células do músculo liso e algumas células tumorais (RUDDLE,

1992). Os TNFs atuam na resistência do hospedeiro a infecções e a tumores, porém seu excesso pode desencadear desordens autoimunológicas, febre, anorexia, caquexia e choque (AGGARWAL e NATARAJAN, 1996; ALBRECHT, 1996). O TNF induz à caquexia, diminuindo a atividade da acetil-CoA carboxilase (enzima lipogênica) e o transporte de glicose em adipócitos, inviabilizando a lipogênese (TISDALE, 1997). Porém, pode ocorrer desenvolvimento de caquexia em pacientes portadores de tumor na ausência de TNF, ou o oposto, níveis elevados de TNF sem quadro caquético (BALKWILL et al., 1987), sugerindo que o TNF não é o único mediador da caquexia em humanos. O TNF- $\alpha$  induz a expressão de moléculas MHC-I, propiciando um melhor reconhecimento de células com antígenos estranhos pelas células Tc. ZGANIACZ et al. (2004) relatam que camundongos com deficiência de TNF- $\alpha$  sucumbem mais facilmente a infecções pulmonares por micobactérias. A administração crônica de TNF pode suprimir a divisão de células indiferenciadas da medula óssea, levando a um quadro de linfopenia e imunodeficiência (ABBAS, 1999).

Os interferons (IFNs) foram descobertos em 1957, quando foi constatado que células expostas a partículas virais produziam um fator solúvel capaz de “interferir” na replicação viral. Os IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  fazem parte de uma grande família de proteínas secretórias que, além de inibirem a replicação viral, também exercem um papel fundamental na resistência do hospedeiro a tumores, através da modulação do sistema imunológico, regulando a expressão gênica de receptores celulares e atuando no controle da proliferação e diferenciação celulares (O’SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

IFNs- $\alpha$  e  $\beta$  compartilham receptores comuns e são conhecidos como interferons “tipo I”, enquanto que o IFN- $\gamma$  (interferon II) possui um receptor celular específico (BALLOU; NELSON, 1997). Os IFNs estão envolvidos em vários eventos imunorregulatórios, incluindo ativação de monócitos e macrófagos, expressão de proteínas do MHC, aumento de células NK, entre outros.

O IFN- $\gamma$  é secretado pela maioria das células Tc CD8+, por algumas células Th CD4+ e por células NK, especialmente em resposta a IL-2 e IL-12. Sua produção é inibida principalmente por IL-4, IL-10, glucocorticóides e ciclosporina (STITES; TERR; PARSLOW, 1997). IFN- $\gamma$  ativa neutrófilos e células NK, além de atuar na

regulação da expressão de MHC I e II, na expressão de receptores celulares para a fração Fc de anticorpos e de moléculas de adesão de leucócitos (FARRAR; SCHREIBER, 1993).

A IL-1 é secretada no início da resposta imunológica por macrófagos/monócitos e outras células apresentadoras de antígenos, as quais vão ativar as células T (LIU; OOI; FUNG, 1999). A IL-6 é secretada principalmente por macrófagos e por células Th, a qual possui ação marcante na diferenciação de células B (McNEELA; MILLS, 2001). A IL-10 é uma citocina multifuncional produzida por células T, células B, macrófagos e células tumorais, atua como imunossupressora ao inibir as células Th1, APC e NK, mas exerce efeito proliferativo sobre células B (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

A IL-12 é produzida principalmente por células B, macrófagos, células dendríticas e outras APCs. Sua ação consiste em ativar células Th1, inibir células Th2, além de estimular células Tc e NK. A IL-12 tem demonstrado potente atividade antitumoral em murinos, sendo ativa principalmente contra o estabelecimento de metástases. Estudos sugerem que a ação antitumoral da IL-12 pode estar implicada com células NK (KODAMA et al., 1999; SMYTH; TANIGUCHI, STREET, 2000). CAO e LIN (2002) demonstraram, *in vitro*, a capacidade de polissacarídeos de *G. lucidum* de atuarem sobre a resposta imunológica inicial, estimulando células dendríticas a expressar a IL-12p40.

MCP-I (monocyte chemoattractant protein), como o próprio nome diz, tem por função atrair monócitos/macrófagos para o sítio de infecção (COLIGAN et al., 1992).

A Tabela 9 resume a origem e o espectro de ação de algumas citocinas.

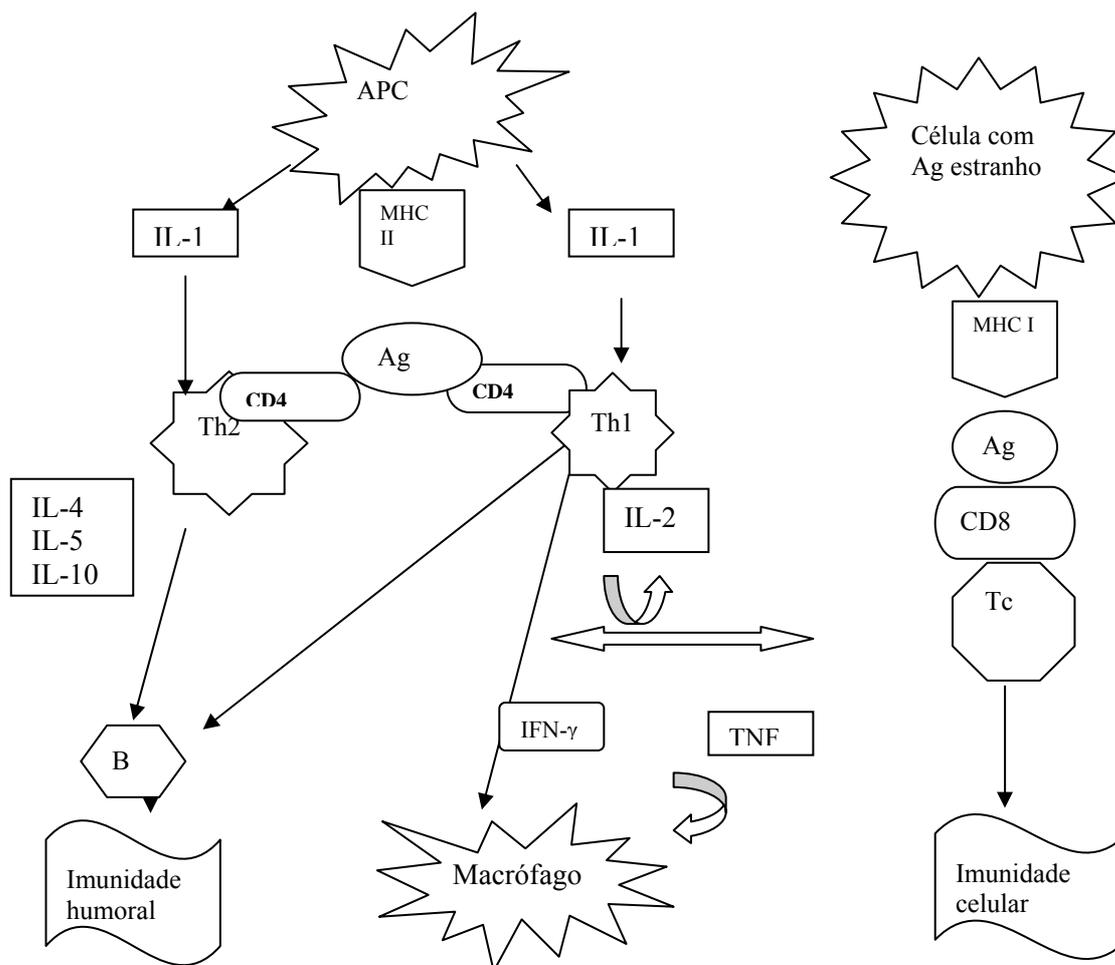
TABELA 9 - ORIGEM E ESPECTRO DE AÇÃO DE ALGUMAS INTERLEUCINAS

IL	Célula de origem	Principais atividades
IL-1	APC	Ativação células APC, Th e B
IL-2	Células Th, Tc, NK	Atividade inflamatória, proliferação e ativação das células T, funcionalidade das células NK e Tc, proliferação de célula B
IL-4	Células Th-2, mastócitos	Atividade antiinflamatória, proliferação de células B, Th-2, Tc, funcionalidade de eosinófilos. Estimula expressão de IgE
IL-5	Células Th-2, mastócitos	Diferenciação de eosinófilos, crescimento de células B
IL-6	Células Th, APC	Atividade inflamatória, efeito sinérgico com IL-1 e TNF, diferenciação de células B
IL-7	Timo, medula óssea	Proliferação de células T e B
IL-8	Células T, macrófagos	Ativa neutrófilos, função angiogênica
IL-10	Células T, B, macrófagos, células tumorais	Inibe produção de citocinas por células Th-1, APC e NK, suprime a imunidade celular, promove proliferação de células B
IL-12	Células B, macrófagos, APC	Proliferação e funcionalidade de células Tc e NK, induz produção de IFN- $\gamma$ , ativa células Th-1 e suprime funções de Th-2
IL-13	Células Th-2	Mimetiza os efeitos de IL-4.
IL-14	Células T, B, células tumorais	Proliferação e ativação de células B.
IFN- $\gamma$	Células T, NK	Atividade inflamatória, induz expressão de MHC, ativa macrófagos, atividade antiviral, inibe crescimento tumoral, ativa célula B
TNF- $\alpha$	Macrófagos	Atividade inflamatória e antitumoral

FONTES: MIMS et al. (1993); STITES; TERR; PARSLOW (1997); ALBERTS et al. (1997); BANCHEREAU; STEINMAN (1998).

NOTAS: IL: interleucina; APC: célula apresentadora de antígenos; NK; "Natural Killer"; IFN: interferon; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; TNF: fator de necrose tumoral.

FIGURA 4 – INTERLEUCINAS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL E CELULAR



FONTE: MIMS et al. (1993); STITES; TERR;PARSLOW (1997).

NOTAS: APC: célula apresentadora de antígeno; Ag: antígeno; MHC: complexo de histocompatibilidade; IL: interleucina; CD: classe de diferenciação; Th: linfócito T helper; Tc: linfócito T citotóxico; IFN: interferon; TNF: Fator de necrose tumoral; B: linfócito B.

#### 4.8 GENERALIDADES SOBRE O CÂNCER

Em tecido normal, a velocidade de formação de novas células é contrabalançada por mecanismos fisiológicos que levam a sua destruição, mantendo o equilíbrio da

massa tecidual. A ruptura desse equilíbrio, no sentido de produção excessiva de células anormais, pode levar ao desenvolvimento de massas celulares de estrutura atípica, denominadas neoplasias (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 1994). Segundo WILLIS (1952), neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento desordenado ultrapassa os limites e persiste da mesma maneira excessiva, mesmo após a cessação do estímulo que evocou essas mudanças. As neoplasias são separadas em benignas e malignas. As neoplasias benignas são de crescimento lento, apresentando limites bem definidos com o tecido adjacente, na maioria das vezes são facilmente ressecadas e não produzem metástases. As neoplasias malignas, denominadas “câncer”, apresentam crescimento rápido e infiltrativo, possuem, em geral, contornos mal definidos e podem produzir metástases (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 1994). Outra característica, no que se refere à diferença entre tumores malignos e benignos, está no grau de diferenciação celular. Os tumores malignos são pouco diferenciados, enquanto que os tumores benignos são bem diferenciados, sendo constituídos por células semelhantes às células do tecido de origem (ALBERTS et al., 1997).

Quanto à histogênese, as neoplasias são classificadas segundo sua derivação dos diversos tecidos matrizes. A regra geral consiste em nomear o tecido de origem seguido do sufixo *-oma*. A base histogenética é presumida de semelhança histológica, ou seja, o tecido de origem é deduzido pela semelhança do parênquima neoplásico com o tecido normal. Desta forma, genericamente, os carcinomas designam tumores derivados do epitélio, enquanto que sarcomas os de origem conjuntiva (ALBERTS et al., 1997).

O tratamento das neoplasias envolve procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Atualmente, existe uma grande variedade de agentes citotóxicos, sendo que os mais potentes atuam em fases específicas do ciclo celular e, por esta razão, apenas exercem sua atividade contra células em divisão. Entre os fármacos utilizados estão os agentes alquilantes (mostarda nitrogenada, sulfonatos alquílicos, nitrosuréias e triazenos), antimetabólicos (análogos do ácido fólico, pirimidinas e purinas), alcalóides vegetais (alcalóides da Vinca) e antibióticos como a bleomicina, mitomicina entre outros (CALABRESI; CHABNER, 1998). Para a maioria desses

fármacos, a margem entre a dose efetiva e a tóxica é estreita, o que leva ao desencadeamento de vários efeitos colaterais indesejáveis. Os mecanismos bioquímicos de resistência das células tumorais aos quimioterápicos parecem ser o maior obstáculo ao sucesso do tratamento (MALORNI et al, 1996). Como terapias alternativas para certos tipos de neoplasias, podem ser empregadas substâncias modificadoras da resposta biológica (MDR) e IFN- $\alpha$  que, associados à quimioterapia, resultam em aumento do tempo de sobrevivência dos pacientes (CALABRESI; CHABNER, 1998).

#### 4.8.1 Sistema Imunológico e Câncer

O sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel fundamental na destruição precoce da célula tumoral ou mesmo na regressão de tumores já estabelecidos. A resistência às células tumorais depende de mecanismos humorais e celulares. As células tumorais podem ser fagocitadas por macrófagos ou lisadas por linfócitos Tc (CD8+). De grande importância também são as células NK, as quais utilizam mecanismos de lise celular semelhantes aos gerados pelas células CD8+, porém não necessitam da intervenção de APCs (SELIGER; MAUERER; FERRONE, 2001). No primeiro estágio do mecanismo de defesa do hospedeiro, a célula tumoral, recoberta por anticorpos, se liga à fração C3 do complemento, induzindo sua clivagem, este por sua vez se liga a receptores em fagócitos, desencadeando o processo de “citotoxicidade mediada por célula-dependente de anticorpo” (ADCC) (CHEUNG et al., 2002). Porém, o mecanismo de defesa mais eficaz contra células transformadas depende do repertório de células T. Os linfócitos Th (CD4+), ao reconhecerem antígenos tumorais apresentados por APCs via MHC-II, secretam citocinas que vão ativar e regular a atividade de todas as células efetoras. Diferentes citocinas vão modular a expressão de Th-1 ou Th-2 (O’SHEA; MA; LIPSKI, 2002). As células Th-1 produzem IFN- $\gamma$  e IL-2, que ativam células Tc a exercerem a atividade citolítica, via MHC-I, contra a célula tumoral. As células Th-2 auxiliam produzindo IL-4, IL-5, IL-10, as quais vão estimular linfócitos B a produzirem anticorpos antitumorais. Os

linfócitos B, com imunoglobulinas contra antígenos tumorais, podem também desempenhar importante papel na apresentação de antígenos tumorais às células Th (ROSEMBERG, 1993).

#### 4.8.2 Sarcoma 180

O sarcoma 180 (S-180), ou tumor de Crocker, é um tumor indiferenciado que foi descrito pela primeira vez em ratos albinos machos em 1914. Este tumor foi encontrado na região axilar direita e diagnosticado na época como carcinoma, mas o tecido de origem não foi especificado, de forma que não se sabe se era uma neoplasia cutânea ou mamária. Estudos posteriores demonstraram que suas células não produzem laminina, o que não permite sua caracterização como de origem epitelial. O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos (STEWART et al., 1959). Apesar de seu comportamento agressivo local, esse tumor não produz metástases (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982). O S-180 pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, havendo uma taxa de regressão natural de 8 a 10%. Próximo ao 28º dia após a inoculação subcutânea, alguns animais desenvolvem ulceração. O tempo de sobrevivência, em geral, é de 28 a 30 dias (ZUCKERBERG, 1973).

### 4.9 METABOLISMO LIPÍDICO

Os lipídeos encontrados no organismo são classificados basicamente como triacilgliceróis, fosfolipídeos e colesterol. Os componentes básicos dos triacilgliceróis e dos fosfolipídeos são os ácidos graxos e, embora o colesterol estruturalmente não contenha ácido graxo, este se apresenta em parte esterificado com esses ácidos. O metabolismo lipídico ocorre principalmente no fígado e em menor quantidade no tecido adiposo e em outras células do organismo. Os lipídeos sintetizados são armazenados no tecido adiposo e no tecido hepático (GUYTON; HALL, 2002). Os lipídeos plasmáticos são transportados na forma de lipoproteínas, as quais são

constituídas por triacilglicerol, colesterol, fosfolípido e apoproteínas (apo). Essas lipoproteínas se diferenciam em seis classes, em função da densidade: quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). A fração VLDL é constituída principalmente pelas apoB-100, apoC e apoE, sendo responsável pelo transporte de triacilgliceróis endógenos, juntamente com menores quantidades de colesterol e fosfolídeos. Por ação de lipoproteínas-lípase, ocorre hidrólise da porção triacilglicéridica do VLDL, sua densidade aumenta, de modo que passam a ser denominadas de IDL. A fração IDL é removida da circulação por endocitose através de receptores da apoB existentes nas células hepáticas, originando a fração LDL. A fração LDL, formada por colesterol e apoB-100, representa o principal reservatório de colesterol no plasma humano, sendo responsável por 60 a 70% do total (SILVA, 1999). Por pinocitose, a fração LDL é internalizada pelas células onde libera seus constituintes lipoprotéicos que serão utilizados para finalidades estruturais. Em geral, níveis aumentados de triacilglicerol e colesterol indicam que o indivíduo apresenta elevação das frações VLDL e LDL. Quando a concentração de colesterol intracelular aumenta, ocorre diminuição na expressão de receptores de membrana para LDL. Este fenômeno de regulação por retroalimentação pode ser explorado na formulação de fármacos que reduzem as concentrações plasmáticas de LDL ao estimular a produção desses receptores (SILVA, 1999). As lipoproteínas de alta densidade (“High density lipoprotein - HDL”) possuem cerca de 50% de apoproteínas A-I e A-II e concentrações reduzidas de colesterol e fosfolípidios. A fração HDL, que normalmente é responsável por 20 a 30% do colesterol plasmático total, transfere o colesterol extra-hepático para as frações de baixa densidade que o transportam ao fígado, sendo esse processo conhecido como transporte reverso do colesterol (MAHLEY, 1988; SILVA, 1999). A maior parte do colesterol presente no organismo é de origem endógena, enquanto que o colesterol exógeno, absorvido ao nível intestinal, constitui uma pequena fração. A maioria dos tecidos é capaz de produzir colesterol, mas é no fígado e na porção distal do intestino delgado que ocorre grande parte da sua formação (SILVA, 1999). A síntese hepática

do colesterol ocorre em microssomos, envolvendo uma série de etapas metabólicas. A reação inicial de síntese do colesterol endógeno envolve a formação da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a partir de moléculas de acetil-CoA. A seguir, a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA-redutase) catalisa a conversão deste composto em ácido mevalônico, sendo esta a fase específica na qual os fatores que influenciam a síntese de colesterol podem exercer sua ação. O mevalonato reage com o esqualeno (precursor dos esteróis), o qual é transformado em lanosterol que, por sua vez, é convertido em colesterol. Esta última etapa é catalisada pela enzima lanosterol 14 $\alpha$ -metil demetilase: citocromo P-450 demetilase (P-45014DM), que, juntamente com a HMG-CoA-redutase, constituem os dois passos limitantes da síntese do colesterol endógeno (SMITH et al., 1983; SILVA, 1999; NESS; GERTZ; HOLLAND, 2001; BERGER, 2004). Níveis sanguíneos elevados de colesterol total e de lipoproteínas de baixa densidade são identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de doença da artéria coronária, especialmente a arteriosclerose, enfermidade relatada como uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (LAW, WALD, THOMPSON, 1994). Os triacilgliceróis circulam na forma de quilomícrons, sendo que, nos tecidos adiposo e hepático, são hidrolisados, por ação de lipases, em ácidos graxos e glicerol e novamente ressintetizados e armazenados. O excesso de carboidrato da dieta também é convertido em triacilgliceróis e armazenado no tecido adiposo. Durante a inanição, o diabete mellitus, ou em qualquer condição em que as gorduras estão sendo utilizadas como fonte energética, os depósitos de triacilgliceróis do tecido adiposo são mobilizados para o fígado. Assim, em condições normais, a quantidade de triacilgliceróis no fígado é controlada, em parte, pela velocidade global de utilização dos lipídeos como fonte de energia (SILVA, 1999; BAKKER et al., 2000).

#### 4.9.1 Fármacos Hipolipidêmicos

A terapia das hiperlipoproteinemias envolve a administração de fármacos que reduzem as concentrações plasmáticas de lipoproteínas, diminuindo a sua produção ou aumentando a sua remoção do plasma (McEVOY, 2002; SWEETMAN, 2004).

Os inibidores da HMG-CoA-redutase correspondem às estatinas e fármacos correlatos, que atuam como potentes inibidores competitivos dessa enzima, impedindo a síntese do colesterol. A lovastatina (menoviolina) foi inicialmente isolada a partir do fungo *Aspergillus terreus* (ALBERT et al. 1989), sendo que no gênero *Pleurotus* existem várias espécies que também produzem esse composto, entre eles o *P. ostreatus* (CIMERMAN; CIMERMAN, 1995).

Os ácidos fibrícos, como o genfibrozil e o fenofibrato, elevam a atividade da lipoproteína-lipase, promovendo o catabolismo das lipoproteínas VLDL e IDL reduzindo, conseqüentemente, as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis. Esses fármacos também podem diminuir a síntese e a secreção hepática de VLDL (THORP; WARING, 1962).

Resinas seqüestradoras, como a colestiramina e o colestipol, ligam-se aos ácidos biliares no intestino, aumentando a sua excreção fecal. As hidroxilases são enzimas que transformam o colesterol em ácidos biliares, sendo controladas pelo produto final da reação, de modo que, quando aumenta a concentração de ácidos biliares, pára a degradação do colesterol. As resinas, ao retirarem os ácidos biliares do meio, anulam o mecanismo de “feed-back” das hidroxilases, e a degradação do colesterol é contínua. Além disso, como os ácidos biliares também são necessários para a reabsorção intestinal do colesterol, ocorre perda fecal de esterois neutros. Esse efeito resulta em duas alterações compensadoras no metabolismo hepático: aumento no número de receptores de LDL, retirando LDL-colesterol da circulação, e maior atividade da HMG-CoA-redutase, no sentido de suprir as necessidades celulares de colesterol (HASHIM; van ITALLIE, 1965).

O probucol consiste em um antioxidante lipofílico sintético, o qual reduz em 10 a 15% as concentrações plasmáticas de colesterol total (BARNHART et al., 1970). A fração LDL, quando oxidada, é reconhecida por receptores de superfície de macrófagos, e sua conseqüente captação origina as células espumosas. É provável que essa oxidação ocorra quando o LDL penetra nas paredes arteriais, originando as placas arterioscleróticas (STEINBERG et al., 1989).

A administração de doses farmacológicas de ácido nicotínico (niacina) reduz rapidamente as concentrações de triacilgliceróis, mas o seu uso é restrito devido à freqüente ocorrência de efeitos colaterais. O ácido nicotínico não produz alteração na síntese do colesterol total e não altera a excreção de ácidos biliares. O mecanismo de ação desse fármaco permanece incerto, porém, provavelmente, está relacionado a vários efeitos como esterificação diminuída de triacilgliceróis no fígado e inibição da lipoproteína-lipase (ALTSCHUL, 1955).

Outros fármacos também têm sido propostos para controlar os níveis plasmáticos de lipídeos. O composto  $\beta$ -sitosterol, um esteroide vegetal com estrutura semelhante à do colesterol, diminui as concentrações plasmáticas de LDL, mas não apresenta nenhum efeito sobre as VLDL. Desconhece-se o seu mecanismo de ação, embora possa estar relacionado à inibição da absorção do colesterol dietético (SWEETMAN, 2004).

#### 4.10 FARMACOLOGIA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *G. lucidum*

Tradicionalmente, se atribui ao *G. lucidum* múltiplos efeitos medicinais: diurético, hepatoprotetor, cardiotônico, normalizador da pressão sanguínea, hipoglicêmico, anticoagulante, hipocolesterolêmico, antimicrobiano, antiinflamatório, antialérgico, antitumoral, antiviral, analgésico, etc. (MIZUNO, 2004). Esse amplo espectro de ação de *G. lucidum* resulta da interação entre seus vários princípios ativos, como triterpenóides, polissacarídeos, proteínas, lectinas, aminoácidos, nucleotídeos, alcalóides, esteróides, lactonas, ácidos graxos e enzimas (BEROVIC et al., 2003). Estudos têm comprovado muitas dessas atividades biológicas, sendo que a atividade antitumoral e imunomoduladora, geralmente está relacionada com polissacarídeos, mas também pode ser exercida por proteínas e triterpenos (FRENDSCHO et al., 1993; WANG et al., 1997; LEE et al., 1998, MIN et al., 2000). Os polissacarídeos agem sobre o sistema imunológico do hospedeiro induzindo a maturação, diferenciação e proliferação de células imunocompetentes, através do incremento na produção de citocinas (WASSER, 2002). Experimentos evidenciam a perda do efeito antitumoral

de polissacarídeos administrados em camundongos timectomizados ou após a administração de soro antilinfócito, sugerindo um mecanismo de ação timo-dependente (OOI, LIU, 1999). Além da ação via sistema imunológico, estudos com linhagens de células tumorais, relatam outro mecanismo de ação de *G. lucidum*, no qual princípios ativos, como os triterpenos, agem diretamente sobre a sinalização celular, interrompendo o ciclo celular, promovendo a diferenciação ou desencadeando a apoptose (LEE et al., 1998; CHEUNG et al., 2000).

#### 4.10.1 Atividade Antitumoral e Imunomoduladora

Uma grande variedade de proteoglicanas e glucanas, desde homopolímeros até heteropolímeros altamente complexos, exibe ação antitumoral e imunomoduladora. Diferenças de atividade podem estar relacionadas com características físico-químicas distintas, como configuração molecular, composição química, solubilidade em água, tamanho da molécula e grau de ramificação (WASSER, 2002). Os polissacarídeos presentes em alguns cogumelos medicinais podem ser denominados de substâncias modificadoras da resposta biológica (MRB). As MRB auxiliam o organismo a se adaptar a situações de estresse, exercendo atividade inespecífica sobre os diversos sistemas corporais e promovendo a homeostase (WASSER, 2002)

FRENDSCHO et al. (1993) relatam potente efeito mitogênico de LZ-8 sobre linfócitos periféricos humanos. A incubação dos linfócitos com LZ-8 foi seguida pelos seguintes eventos: 1) produção de moléculas associadas com ativação e proliferação de linfócitos, como IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a expressão do receptor de IL-2; 2) formação de agregados celulares e aumento na expressão de moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) sobre células T; 3) proliferação de células T. Segundo os autores, LZ-8 é um potente ativador de células T, apresentando um grande potencial terapêutico para ser empregado *in vivo* como imunomodulador.

HEM et al. (1995) relatam a atividade mitogênica de LZ-8 sobre células mononucleares humanas (MNC) e também o seu efeito imunossupressor *in vitro* e *in vivo*. Em dois diferentes modelos de transplante de tecidos alogênicos, LZ-8 provou ter

uma significativa ação sobre a imunidade celular. A administração intraperitoneal de LZ-8 (7,5 mg/Kg), em um modelo de transplante alogênico de pele em rato, aumentou o tempo de sobrevivência. Em outro modelo de transplante alogênico de pâncreas em rato, LZ-8 (5 mg/Kg) foi efetiva em retardar o processo de rejeição. Não foram detectados efeitos colaterais sérios de LZ-8 nesses experimentos, a não ser uma pequena perda de peso nos primeiros dias pós-transplante. Nos experimentos com MNC humanas foi observada forte atividade mitogênica, porém LZ-8 não apresentou efeito estimulador notável sobre linfócitos T purificados, indicando que LZ-8 requer monócitos como células acessórias. Segundo os autores, LZ-8 poderá se tornar um novo agente imunossupressivo, requerendo para isso estudos futuros a respeito do seu modo de ação, dosagem e toxicidade.

WANG et al. (1997) cultivaram MNC humanas com diferentes concentrações de polissacarídeos (PS) de *G. lucidum* (3,13 – 400  $\mu\text{l/mL}$ ). A seguir, o sobrenadante do cultivo celular condicionado (MC) foi coletado, filtrado e estocado até o momento de uso. A análise do sobrenadante do MC mostrou que os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e de IL-6 foram mais elevados em relação ao controle não tratado. A produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T também foi promovida na presença de polissacarídeo. O sobrenadante do MC foi incubado com MNC, na presença de polissacarídeo (PS-MNC-MC) (100 $\mu\text{l/mL}$ ) e na ausência de polissacarídeo (MNC-MC). Células humanas leucêmicas foram cultivadas tanto na presença, quanto na ausência de PS-MNC-MC e de MNC-MC. Para fins de controle, células leucêmicas foram cultivadas com PS puro. O preparado PS-MNC-MC suprimiu a proliferação de linhagens celulares leucêmicas, por indução de apoptose e inibição de clonogenicidade. Entretanto, o polissacarídeo sozinho não apresentou efeitos, mesmo em altas doses (400  $\mu\text{l/mL}$ ). O preparado MNC-MC produziu pouca, ou nenhuma, citocina e não suprimiu o crescimento de células leucêmicas. Os autores sugerem que a atividade antitumoral de *G. lucidum* ocorre via sistema imunológico, através da ativação de células efetoras. A Tabela 10 apresenta a ação do polissacarídeo de *G. lucidum* sobre linhagens de células leucêmicas humanas.

TABELA 10 – AÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE *G. lucidum* SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS

Tratamentos	HL-60 <sup>(1)</sup>			U937 <sup>(1)</sup>		
	Número de células (10 <sup>5</sup> /mL) e %	Antígeno <sup>(2)</sup>		Número de células (10 <sup>5</sup> /mL) e %	Antígeno <sup>(2)</sup>	
CD14		CD68	CD14		CD68	
Controle	36,6 (100 %)	0	0	27,8 (100%)	0	0
PS (400 µg/mL)	34,8 (95,1 %)	0	0	25,6 (92,1 %)	0	0
MNC-MC	33,4 (91,3 %)	2	1	24,2 (87,1 %)	3	2
PS-MNC-MC	10,5 (28,7 %)	40,9	39,2	7,0 (25,2 %)	44,6	46,2

FONTE: adaptado de WANG et al. (1997).

NOTAS: PS: polissacarídeo; MNC-MC: meio condicionado com células mononucleares; PS-MNC-MC: meio condicionado com células mononucleares mais PS.

(1): linhagens de células leucêmicas humanas.

(2): porcentagem de células expressando o antígeno de superfície.

CHUNG et al. (2001) relatam a extração e caracterização de duas frações polissacarídicas do caldo de cultura de *G. lucidum*, sendo uma fração solúvel em água (A) e outra insolúvel em água (C). A amostra A apresentou a taxa molar de 3,6:1,5:0,5:2,1 (glicose:galactose:xilose:manose) e peso molecular de 1,2x10<sup>6</sup> Dalton. A amostra C apresentou taxa molecular de 1,7:1,9:1,0:0,2 (glicose:galactose:xilose:manose:frutose) e peso molecular de 1,0x10<sup>6</sup> Dalton. As duas frações A e C foram testadas frente a várias linhagens celulares, como hepatocarcinoma humano (Hep3B), carcinoma humano de pulmão (A549), células humanas de câncer de estômago (AGS), células de leucemia humana (HL-60), células humanas normais de pulmão (WRL68), células T humanas (H9) e células CHO (Chinese Ovary Hamster Cell). Ambas as amostras apresentaram atividade antitumoral e antimutagênica, porém a amostra C foi mais eficaz (Tabela 11).

Ambas as amostras promoveram a proliferação das células T humanas, sendo que a amostra C também elevou os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ . A amostra C promoveu um aumento de 58% na taxa de diferenciação de células HL-60, contra 18% do controle.

TABELA 11 - CITOTOXICIDADE DE POLISSACARÍDEOS DE *G. lucidum* SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS HUMANAS

Polissacarídeos (mg/mL)		0,2		0,8		1,0	
Células	EPS	Inibição (%)	Seletividade	Inibição (%)	Seletividade	Inibição (%)	Seletividade
AGS	A	24	0,41	48	1,10	68	1,11
	C	24	1,11	71	1,10	85	1,32
A549	A	21	0,76	62	0,84	24	1,10
	C	28	0,58	78	1,14	24	1,58

FONTE: adaptado de CHUNG et al., 2001.

NOTAS: AGS: linhagem cancerosa de estômago; A549: linhagem cancerosa de pulmão.

A: fração solúvel em água.

C: fração insolúvel em água

BAO et al. (2001a, 2001b) descrevem o isolamento de diferentes glucanas a partir de esporos de *G. lucidum*, das quais foram obtidos vários derivados funcionais. A atividade imunológica dessas glucanas e seus produtos de degradação, ou de substituição, foram investigados em camundongos (50 mg/Kg, via intraperitoneal, por quatro dias). A produção de anticorpos foi pesquisada em camundongos imunizados, com eritrócitos de carneiro a 5%, antes de iniciar o tratamento com os polissacarídeos. Após o tratamento foram pesquisados os níveis séricos de IgG e complemento (C3) e a capacidade proliferativa das glucanas foi testada em cultivo de células esplênicas provenientes dos camundongos. A atividade proliferativa da glucana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) nativa foi menor, porém resultou na elevação dos níveis séricos de C3. A glucana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) degradada apresentou melhor atividade proliferativa, além de aumentar a produção de IgG, entretanto não teve efeito notável sobre os níveis séricos de C3. Os resultados sugerem que tanto o comprimento quanto o grau de substituição na cadeia principal interferem na atividade biológica das glucanas. Segundo os autores, a atividade biológica das glucanas pode estar relacionada com alto grau de ramificação, tamanho das cadeias laterais e configuração em solução aquosa.

CAO e LIN (2002, 2003) estudaram o efeito regulatório de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre a maturação de células dentríticas e seu efeito ativador sobre

linfócitos Tc. As células dendríticas são apresentadoras de antígenos, funcionando como iniciadoras da resposta imunológica primária. Os autores relatam a capacidade do polissacarídeo de promover não somente a maturação dessas células, mas também induzir a sua resposta imunológica inicial. Nesse estudo, as células Tc aumentaram a produção de IFN- $\gamma$  na presença de células dendríticas previamente tratadas com o polissacarídeo.

BEROVIC et al. (2003) testaram a atividade imunomoduladora de  $\beta$ -D glucanas extraídas de *G. lucidum* desenvolvido por fermentação submersa. Os polissacarídeos foram adicionados a cultivos de células mononucleares humanas, nas concentrações de 3,25 a 400  $\mu\text{g/mL}$ . Os autores relatam uma indução na produção de TNF- $\alpha$  comparável à ação de “romurtide”, um fármaco que já vem sendo usado como terapia de suporte no tratamento de pacientes com câncer.

LEE et al. (2003a) obtiveram polissacarídeos de micélio de *G. lucidum* os quais foram testados na sua totalidade e separados da fração protéica. A fração unicamente polissacarídica foi adicionada a cultivos mistos de células leucêmicas e MNC, induzindo apoptose e diferenciação nas células neoplásicas. Também foi observado estímulo sobre as MNC, as quais aumentaram a secreção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ . Quando injetado intraperitonealmente, o polissacarídeo aumentou a sobrevivência de camundongos implantados com carcinoma de pulmão, sozinho ou em associação com carcinostáticos. Na ausência de MNC, o polissacarídeo sozinho não exerceu atividade citotóxica sobre células neoplásicas e a sua ação antitumoral foi abolida por pré-tratamento dos camundongos com ciclosporina. A partir desse estudo, os autores concluíram que a fração polissacarídica foi a responsável pelos efeitos imunomoduladores observados.

As oncoproteínas Ras atuam transmitindo sinais dos receptores tirosinoquinases, presentes na membrana plasmática, para o núcleo, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Se uma forma hiperativa de Ras é sintetizada pela célula, ocorre indução ao câncer através da ruptura dos mecanismos celulares de controle da proliferação e diferenciação celular. Essas oncoproteínas tornam-se ativas após sofrerem uma modificação pós transcricional por ação da farnesil proteína

transferase (FPT), que possibilita a sua associação aos receptores de membrana. Em cerca de 30% dos casos de câncer em humanos é possível detectar essa mutação no gene *ras*. A inibição da ação da FPT sobre a Ras constitui uma importante estratégia terapêutica contra o câncer (ALBERT et al., 1997).

LEE et al. (1998) demonstraram a ação antiproliferativa dos ácidos ganodéricos sobre células cancerosas, via inibição da FPT, interferindo diretamente no fenômeno de transformação celular.

CHEUNG et al. (2000) relatam a atividade antiproliferativa de extrato aquoso de micélio de *G. lucidum* sobre células de feocromocitoma (PC12) de rato. As células PC-12 foram induzidas a apoptose por privação do fator de crescimento neuronal (NGF) e, a seguir, tratadas com o extrato aquoso, o qual reduziu em 15% as células apoptóticas. Não houve efeito citotóxico. Foi constatado também que o extrato induziu a expressão de marcadores de diferenciação celular próprios dos neurofilamentos, que são as principais proteínas do citoesqueleto neuronal. O extrato interferiu na via de sinalização liderada pelas oncoproteínas Ras e sobre as proteínas ligadoras do elemento de restrição do AMP cíclico (CREB), as quais atuam sobre as vias de sinalização dos processos de aprendizagem e memorização. Segundo os autores, *G. lucidum* apresenta potencial para ser empregado como fármaco antiapoptótico coadjuvante no tratamento de doenças neurodegenerativas. Recentemente, CHUNG et al. (2005) depositaram a patente de um produto à base de esporos germinados de *G. lucidum* para promoção da proliferação e diferenciação de células tronco neuronais, objetivando o tratamento de injúrias da medula espinhal.

SLIVA et al. (2002) testaram suplementos dietéticos, feitos a partir de esporos purificados e do corpo de frutificação de *G. lucidum*, contra formas altamente invasivas de câncer de seio e de próstata. Os ensaios foram feitos incubando linhagens de células cancerosas de seio (MDA-MB-231) e de próstata (PC-3) com suspensões do suplemento dietético. Houve inibição constitutiva da transcrição de fatores que conferem alto poder invasivo para essas células neoplásicas, culminando na supressão da migração celular. O produto à base de *G. lucidum* inibiu a expressão do ativador de uroquinase tipo-plasminogênio (uPA), o qual é uma protease que regula a motilidade

das células de câncer mamário. A uPA cliva a matriz extracelular e também está envolvida no processo de adesão celular e migração, desempenhando importante função nos processos de metástases.

LIN et al. (2003) demonstraram a ação antitumoral seletiva de triterpenos de *G. lucidum* sobre uma linhagem celular de hepatoma humano Huh-7. O triterpeno causou um rápido decréscimo na atividade da proteína quinase C (PKC), que regula o crescimento celular, resultando em uma parada do ciclo celular na fase G2. Segundo os autores, a atividade dos triterpenóides foi similar ao do fármaco anticâncer “Taxol”, o qual atua suspendendo o ciclo celular na fase G2.

SIRIVICHAYAKUL (2004) relata a ação de extratos de *G. lucidum* e *Lentinula edodes* sobre células mononucleares humanas (MNC), provenientes de indivíduos normais e com HIV-1. As células mononucleares periféricas foram cultivadas com diferentes concentrações dos extratos. *G. lucidum* foi mais eficaz do que *L. edodes*, promovendo mitogênese e induzindo a expressão de células Th CD4 +, porém as células Tc CD8+ não foram afetadas. O extrato de *G. lucidum* foi mais atuante sobre células provenientes de indivíduos com imunodeficiência leve à moderada (HIV-1 assintomáticos), quando comparados com indivíduos normais ou pacientes com imunodeficiência severa (HIV-1 sintomáticos). Segundo o autor, esses resultados evidenciam o efeito imunorestaurador de *G. lucidum* nos estágios iniciais da doença.

KOJI, HIROSHI e KAZUHISA (2005) patentearam um produto à base de extrato de *Ganoderma*, o qual inibe a ação de metaloproteinases, enzimas que degradam a matriz extracelular e estão implicadas em uma série de eventos biológicos, como periodontite, ulcerações, artrite reumatóide, osteoporose, envelhecimento da pele e metástases de células neoplásicas.

#### 4.10.2 Ação Sobre a Angiogênese

A terapia antiangiogênica é vista como um importante aliado nos regimes de tratamento contra o câncer, impedindo a vascularização do tumor e, conseqüentemente, a sua alimentação com nutrientes provenientes do sangue. Vários

inibidores endógenos da angiogênese, incluindo a angiostatina (GATELY et al., 1997) e a endostatina (SASAKI et al., 1998) têm sido relatados.

Na literatura existem poucos e conflitantes relatos sobre a interferência de metabólitos de *Ganoderma* sobre os mecanismos que regem a angiogênese.

SU et al. (1997) descreveram um polissacarídeo, extraído de corpo de frutificação de *G. tsugae*, com potencial aplicação como substituto de pele. As lesões produzidas em pele de ratos foram quase que totalmente cicatrizadas, quando recobertas com o biomaterial formulado à base do polissacarídeo. Os autores sugerem que o efeito cicatrizante foi resultado da ativação de macrófagos residentes na pele (células de Langerhans), os quais produzem mediadores químicos, como o fator de crescimento epidermal e o fator angiogênico, que aceleram o processo de cicatrização.

SONG et al. (2004) demonstraram efeito antiangiogênico de extrato alcoólico, obtido do corpo de frutificação de *G. lucidum*, sobre membrana corioalantóide de embrião de galinha. Esse extrato também inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongo. Os autores relatam experimentos que comprovam a indução de angiogênese, em células endoteliais, pelo fator de crescimento endotelial vascular associado ao NO (VEGF)-NO. Concluem que a ação inibitória do extrato de *G. lucidum* sobre a produção de NO em macrófagos pode estar relacionada com a sua ação antiangiogênica.

#### 4.10.3 Efeito Hipoglicêmico

TOMODA et al. (1986) relatam atividade hipoglicêmica de dois polissacarídeos, ganoderans B e C, extraídos do corpo de frutificação de *G. lucidum* em camundongos normais. Após 24 horas da administração via intraperitoneal dos polissacarídeos, foi observada uma redução de 83% nos níveis plasmáticos de glicose. GAO et al. (2004) demonstraram a atividade hipoglicêmica de polissacarídeos de *G. lucidum* em 71 pacientes portadores de diabetes mellitus tipo II.

#### 4.10.4 Efeito hipotensivo e hipolipidêmico

O emprego popular de Lingzhi como agente hipocolesterolêmico e hipotensivo tem despertado o interesse da comunidade científica sobre essas importantes propriedades. KABIR, KIMURA e TAMURA (1988) relataram o efeito hipotensor e hipocolesterolêmico de caldo de cultura de *G. lucidum* em ratos hipertensos. O efeito hipotensor pode ser atribuído à ação inibitória dos ácidos ganodéricos sobre a enzima angiotensina-I que é relacionada com hipertensão (MIZUNO, 2004).

#### 4.10.5 Atividade Antiviral

EO et al. (1999) demonstraram a atividade anti-herpética, *in vitro*, de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação de *G. lucidum* contra o vírus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2).

KIM et al. (2000) relatam proteínas ácidas ligadas a polissacarídeos, extraídas de corpo de frutificação de *G. lucidum*, exercendo atividade anti-herpética em combinação com os agentes antivirais IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Os resultados demonstraram um sinergismo entre as substâncias, sugerindo a possibilidade do desenvolvimento de um novo agente antiviral.

MIN et al. (1998) relataram dois triterpenos tipo-lanostase, lucidumol A e ácido ganodérico- $\beta$ , isolados de esporos de *G. lucidum*, com significativa ação inibidora sobre a atividade da protease do HIV-1.

#### 4.10.6 Atividade Antioxidante

Espécies reativas de oxigênio produzidas pela luz solar, luz ultravioleta, radiação ionizante, reações químicas e processos metabólicos apresentam uma grande variedade de efeitos patológicos, causando danos à molécula de ácido desoxirribonucléico (ADN) e levando à degeneração celular. Polissacarídeos de *G. lucidum* podem reduzir a quebra da fita de ADN causada por luz ultravioleta e atenuar

a formação de ânions super óxido em células leucêmicas humanas (LEE et al., 2001). Pesquisas têm demonstrado a ação protetora de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre macrófagos submetidos à agressão com diferentes espécies reativas de oxigênio (SHI et al., 2002; YOU; LIN, 2002).

Segundo LIU, OOI e CHANG (1997), a atividade neutralizante de radicais livres, encontrada em extratos de vários tipos de cogumelos, pode ser dependente da relação polissacarídeos/proteínas. Pesquisando oito diferentes cogumelos, os autores relatam que o lentinan (polissacarídeo com ação antitumoral extraído de *Lentinula edodes*), que contém apenas traços de proteínas, não demonstrou ação antioxidante. Em contraste, polissacarídeos de *Coriolus versicolor* e *G. lucidum*, nos quais o conteúdo protéico é mais elevado, tiveram forte atividade antioxidante.

#### 4.10.7 Atividade Hepatoprotetora

A  $\beta$ -glucuronidase é uma enzima relacionada a danos hepáticos e sua inibição resulta em efeito hepatoprotetor. KIM et al. (1999) relatam o ácido ganoderênico A de *G. lucidum* exercendo efeito inibidor sobre os níveis séricos dessa enzima em ratos Wistar, após indução de dano hepático com tetracloreto de carbono.

ZHANG et al. (2002b) demonstraram o efeito protetor de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre células hepáticas de camundongos infectadas com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Os danos hepáticos foram avaliados pelos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e de NO. Também foram analisados cortes histológicos do fígado e alterações de peso nesse órgão. A administração do polissacarídeo mitigou significativamente a tumefação hepática, diminuiu os níveis de ALT e a produção de NO.

#### 4.11 MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE *G. lucidum*

Os mecanismos moleculares envolvidos nas atividades biológicas de *G. lucidum* ainda não foram totalmente desvendados.

Múltiplas formas de ação têm sido descritas:

- 1) inibição pós-transcricional de oncoproteínas (LEE et al., 1998);
- 2) inibição da ADN polimerase (MIZUSHINA et al.; 1999);
- 3) indução de apoptose (IWARI et al., 1999; CHUNG et al., 2001; HSU et al., 2002);
- 4) inibição de apoptose em neutrófilos humanos (HSU et al., 2002);
- 5) ação via sistema imunológico (WANG et al., 1997; CHUNG et al., 2001);
- 6) inibição constitutiva de proteínas que promovem a migração de células neoplásicas (SLIVA et al., 2002);
- 7) suspensão do ciclo celular na fase G2 em células de hepatoma (LIN et al., 2003);
- 8) atividade antimutagênica (LU et al., 2002);
- 9) inibição da angiogênese (SONG et al., 2004);
- 10) inibição de metaloproteases (KOJI; HIROSHI; KAZUHISA, 2005).

Como os princípios ativos de *G. lucidum* são absorvidos pelo organismo e qual rota metabólica eles seguem são questões que ainda não estão esclarecidas.

Segundo HONG et al. (2004),  $\beta$ -glucanas, administradas via oral, são captadas por macrófagos e transportadas para o baço, linfonodos e medula óssea. Dentro da medula óssea, os macrófagos degradam essas moléculas em pequenas frações solúveis que se ligam a receptores CR3 de granulócitos.

Outros pesquisadores relatam que polissacarídeos de *G. lucidum* se ligam a receptores TLR4 (Tool Like Receptor) na superfície de macrófagos, induzindo a expressão de citocinas (SHAO et al., 2004; CHEN et al., 2004; HSU et al., 2004).

Entretanto, várias dessas pesquisas são realizadas com extratos aquosos de *G. lucidum* ou misturas de polissacarídeos. A interação sinérgica entre vários princípios ativos poderia ser responsável pelos efeitos terapêuticos relatados.

O fracionamento desses complexos resulta em substâncias com atividades farmacológicas individualizadas, diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial.

Na grande dificuldade de se estudar as interações sinérgicas na sua totalidade, reside o fato desse fenômeno ser tão mal compreendido (PEZZUTO, 1997).

Na Tabela 12, observa-se uma grande variedade de efeitos atribuídos a diferentes componentes de *G. lucidum*, os quais podem atuar de forma independente ou em conjunto, de modo que não pode ser negligenciada a sua atuação como um todo.

TABELA 12 - MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE *G. lucidum*

(continua)

Referência	Princípio ativo	Modelo experimental	Ações identificadas
Frendscho et al. (1993)	Ling Zhi-8	MNC humanas	Mitogênica para linfócitos T, indutor de IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ , promoção de agregação celular e expressão de ICAM-1.
Wang et al. (1997)	PL do carpóforo	Células leucêmicas e MNC humanas	Produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ . Supressão de proliferação de células leucêmicas (via MNC), diferenciação celular.
Lee et al. (1998)	Ácido ganodérico	Células transformadas	Inibição pós-transcricional das oncoproteínas Ras.
Mizushina et al. (1999)	Terpenóides	Ação sobre ADN polimerases de células eucarióticas	Inibição da $\alpha$ -ADN-polimerase bovina e $\beta$ -ADN polimerase de rato.
Cheung et al. (2000)	PL do micélio	Células de feocromocitoma de rato	Redução de proliferação; indução de diferenciação neuronal.
Chung et al. (2001)	PL de caldo de cultura	Células humanas cancerosas, células T	Antimutagênico, antiproliferativo, indutor de apoptose e diferenciação, mitogênico para linfócitos T, produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ .
Lee et al. (2003b)	PL de micélio	PL via i.p., i.v. e p.o. camundongos com sarcoma 180, fibrosarcoma, carcinoma pulmonar Cultivo das células cancerosas com PL	Aumento no tempo de vida, produção de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ , indução de apoptose, ação antiproliferativa e diferenciadora.
Liu et al. (2002)	Extrato lipídico de esporos germinados	Tratamento p.o. de camundongos com sarcoma 180, hepatoma e sarcoma reticulócito L-II	Inibição dos três tipos de tumores.
Sliva et al. (2002)	Esporos e carpóforo	Células humanas de câncer de seio e próstata	Inibição constitutiva de fatores de transcrição que regulam a motilidade celular; supressão da migração das células cancerosas.

TABELA 12 - MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE *G. lucidum*

(continuação)

Referência	Princípio ativo	Modelo experimental	Ações identificadas
Cao et al. (2002)	PL de extrato aquoso	Cultivo misto de células dendríticas, MNC e Tc	Maturação das células dendríticas aumento de MHC-II e IL-12, proliferação e ativação de células Tc, aumento de IFN- $\gamma$ .
Gao et al. (2002b)	PL do carpóforo	Tratamento de úlcera gástrica de ratos com PL (via intragástrica)	Decréscimo no número de lesões e nos níveis de TNF- $\alpha$ , indução de proliferação do epitélio gástrico.
Zhang et al. (2002a)	PL do carpóforo	Células esplênicas de camundongos	Proliferação de linfócitos B, indução na produção de imunoglobulinas e de IL-2.
Berovic et al. (2003)	PL do caldo de cultivo	MNC humanas	Indução moderada na produção de TNF- $\alpha$ .
Lu et al. (2002, 2003)	Extrato aquoso do micélio	Camundongos alimentados com o extrato (5%) e submetidos à ação de carcinogênicos	Inibição de câncer de intestino.
Lin et al. (2003)	Triterpenos do micélio	Células de hepatoma humano	Supressão do ciclo celular na fase G2, ação antiproliferativa sobre o hepatoma, mas não sobre as células normais.
Gao et al. (2003)	PL (Ganopoly®)	Estudo randomizado duplo-cego, controlado por placebo, com 68 pacientes com câncer de pulmão, tratados por 12 semanas, via oral.	Estabilização da doença em 35% dos pacientes, contra 22,6% do grupo controle, incremento na qualidade de vida. Mitogênico para CD3, CD4, porém redução de CD8. Ativação de células NK.
Song et al. (2004)	Extrato de carpóforo (PL)	Membrana corioalantóide de ovos embrionados e cultura de macrófagos	Ação antiangiogênica na membrana corioalantóide; inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos.

NOTA: PL: polissacarídeos; ICAM: moléculas de adesão intracelular, CD: classe de diferenciação; NK: células “Natural Killer”; MNC: células mononucleares; TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; v.o.: via oral; i.p.: via intraperitoneal.

#### 4.12 *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*, *A. sylvaticus*, *A. subrufescens*)

Entre os basidiomicetos, o *A. brasiliensis*, uma linhagem nativa do Brasil, tem recebido especial atenção na medicina popular devido às suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras.

*A. blazei* foi descrito como nova espécie por W. A. Murril, em 1945, a partir de uma amostra coletada por R. W. Blaze na Flórida-EUA, em 1944. Este cogumelo foi encontrado em 1965 por Takatoshi Furumoto, em São Paulo-BR, que enviou os esporos ao Japão (Iwade Research Institute of Micology), onde Inosuke Iwade logo iniciou estudos para o seu cultivo artificial, obtendo sucesso em 1975 (MIZUNO, 1989, LEIFA et al., 2003). A cepa brasileira foi denominada de *A. brasiliensis*, sendo conhecido popularmente por “Cogumelo de Deus” ou “Cogumelo do Sol®”; e “Himematsutake” no Japão e China. Estudos taxonômicos mais recentes renomearam esta espécie como *A. subrufescens* (URBEN et al., 2005).

“O cogumelo do Sol” tem sido consumido mundialmente em função de suas importantes propriedades terapêuticas. MIZUNO et al. (1987) descreveram características estruturais de algumas glucanas obtidas deste cogumelo e suas atividades antitumorais. Seus polissacarídeos foram testados em doenças humanas como leucemia não linfocítica, hepatite B crônica e câncer gastrointestinal (TIAN et al., 1994; WANG et al., 1994a; WANG et al., 1994b; MIZUNO, 1995). Os resultados animadores dessas pesquisas propiciaram boa repercussão do “Cogumelo do Sol” no mercado internacional, especialmente no Japão após os anos 90. Em 1999, o extrato deste cogumelo entrou no mercado dos EUA como novo ingrediente dietético sob resolução do *Food and Drug Administration* (FDA). O Brasil foi o primeiro país a cultivar o Cogumelo de Deus, sendo atualmente o seu principal exportador para o mundo.

Devido às condições climáticas favoráveis, na qual o Cogumelo de Deus se adapta naturalmente em quase todo o território, o Brasil registra uma produção de três mil toneladas anuais, sendo que a região de Mogi das Cruzes, no estado de São Paulo, é responsável por 70% da produção nacional. Nessa região cerca de 150 famílias de

origem oriental, provenientes de Taiwan, China, Coréia e Japão produzem o Cogumelo de Deus, o Shiitake e o Shiimeji. Praticamente toda a produção do Cogumelo de Deus é exportada para os EUA, Japão, Canadá e outros países asiáticos. Em função dessa demanda, o seu custo ainda é elevado, sendo comercializado por aproximadamente US\$ 300/Kg (cogumelo seco).

LEIFA et al., (2003) relatam a produção de exopolissacarídeo a partir de uma cepa de *A. brasiliensis* coletada no estado do Paraná e desenvolvida por cultivo submerso, sob condições otimizadas. Segundo o autor, a produção máxima de EPS foi alcançada com a utilização de meio de cultura contendo (g/dL): glicose – 10, peptona – 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,6 e MgSO<sub>4</sub> – 0,3. A análise da fração solúvel em água do EPS, apresentou uma molécula com peso molecular de  $2,09 \times 10^6$  daltons, contendo 5,14% de proteínas, mais arabinose, frutose e uma pequena quantidade de manose. A atividade antitumoral da fração de EPS solúvel em água foi testada em camundongos inoculados com sarcoma 180. Doses diárias de EPS, na proporção de 10 mg/Kg/dia, foram administradas aos camundongos, por via intraperitoneal, durante 10 dias. Em relação ao controle, o grupo tratado apresentou 72,19% de inibição da massa tumoral.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *G. lucidum*

Foram pesquisadas oito amostras de *G. lucidum*: *G. lucidum* LB (Laboratório de Biotecnologia), proveniente do Laboratório de Biotecnologia do México; três cepas de *G. lucidum* (CG-22, CG-112 e CG-144) fornecidas pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisas em Agropecuária, Banco de Germoplasma de Cogumelos para Uso Humano – Brasília – DF) e quatro amostras selvagens, sendo três provenientes da China, cidade de Fuzhou, e uma cepa da Coreia, designadas pela letra inicial correspondente à cor do corpo de frutificação: *G. lucidum* -V 1 (vermelho); *G. lucidum* - V 2 (vermelho) proveniente da Coreia; *G. lucidum* – R (roxo); *G. lucidum* - P (preto).

As cepas foram semeadas em tubos de ensaio contendo BDA e incubadas entre 28° a 30°C até o crescimento micelial recobrir a superfície do ágar, aproximadamente de sete a dez dias. A seguir, as cepas foram mantidas entre 4 a 6°C, sendo repicadas trimestralmente.

### 5.2 CRESCIMENTO RADIAL DE *G. lucidum*

Foram inoculados blocos de micélio crescido em BDA, de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo BDA. A velocidade de crescimento foi estimada nas seguintes temperaturas: 28, 30, 32 e 36°C. Diariamente, o diâmetro do crescimento foi medido com o auxílio de régua milimétrica. Cada cepa foi inoculada em duplicata.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO *G. lucidum* EM CULTIVO SUBMERSO

#### 5.3.1 Meio de Cultura

Foi empregado o seguinte meio de cultivo (TANG; ZHONG, 2002):

Glicose .....	35g
Peptona.....	5g
Extrato de levedura.....	2,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,883g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5g
Água deionizada.....	100mL

O pH foi ajustado em 5,5 em potenciômetro. O meio foi esterilizado por autoclavação a 120° C, 15 minutos, 1 atmosfera, sendo que a glicose foi esterilizada separadamente.

#### 5.3.2 Condições de Cultivo e Preparo do Inóculo

O fungo foi desenvolvido em BDA a 30°C, por 10 dias, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. A seguir, toda a superfície de crescimento da placa de BDA foi raspada e transferida para frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de caldo de cultivo. O frasco foi incubado a 30° C, por 10 dias, em agitador rotatório de bancada a 120 rpm.

Após este período, a biomassa foi separada por centrifugação (3.500 rpm por 10 minutos) e/ou filtração em tela (malha de 0,5 mm<sup>2</sup>); lavada com água deionizada, triturada e diluída em 50 mL de água deionizada estéril, originando o inóculo. Este inóculo continha, aproximadamente, 1,60 mg de micélio seco/mL.

O inóculo foi semeado na proporção de 2 mL para cada 50 mL de caldo de cultivo em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram então incubados por 10 dias, a 30°C, em agitador rotatório de bancada (120 rpm) (Figura 5).

FIGURA 5 – CULTIVO SUBMERSO DE *G. lucidum* EM AGITADOR ROTATÓRIO DE BANCADA



#### 5.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA E POLISSACARIDEOS

Após 10 dias de cultivo submerso, a biomassa foi separada do caldo através de centrifugação e/ou filtração, secada a 80° C por 24 horas e pesada.

##### 5.4.1 Extração e Determinação de EPS

Após 10 dias de cultivo submerso, o caldo foi separado da biomassa e reduzido a 1/5 do volume em evaporador rotatório, a 50° C, sob pressão reduzida (BEROVIC et

al., 2003). O EPS foi precipitado com quatro volumes de álcool etílico a 96° GL, a frio (-18° C), por 24 horas e coletado por centrifugação a 7000 rpm, por 20 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em água deionizada e submetido a mais uma precipitação alcoólica. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com álcool etílico absoluto e submetido a tratamento com os solventes: clorofórmio, éter etílico e acetona. O excesso de acetona foi evaporado em estufa a 30°C, por 24 horas, e o pó resultante foi pesado em balança analítica. Para análise de açúcares totais o EPS foi emulsionado em 25 mL de água deionizada e analisado pelo Método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954).

#### 5.4.2 Extração e Determinação de IPS

A biomassa foi separada do caldo de cultivo, tratada com álcool etílico por 3 minutos para remoção de lipídeos e congelada a - 20° C por 12 horas. Após seu descongelamento foram adicionados 5 volumes de água destilada, o micélio foi triturado com triturador elétrico (Mallory – Robot – 250) e fervido por 4 horas com agitação ocasional. O material foi filtrado e a precipitação do endopolissacarídeo foi feita de acordo com a técnica descrita no item 5.4.1 (Figura 6).

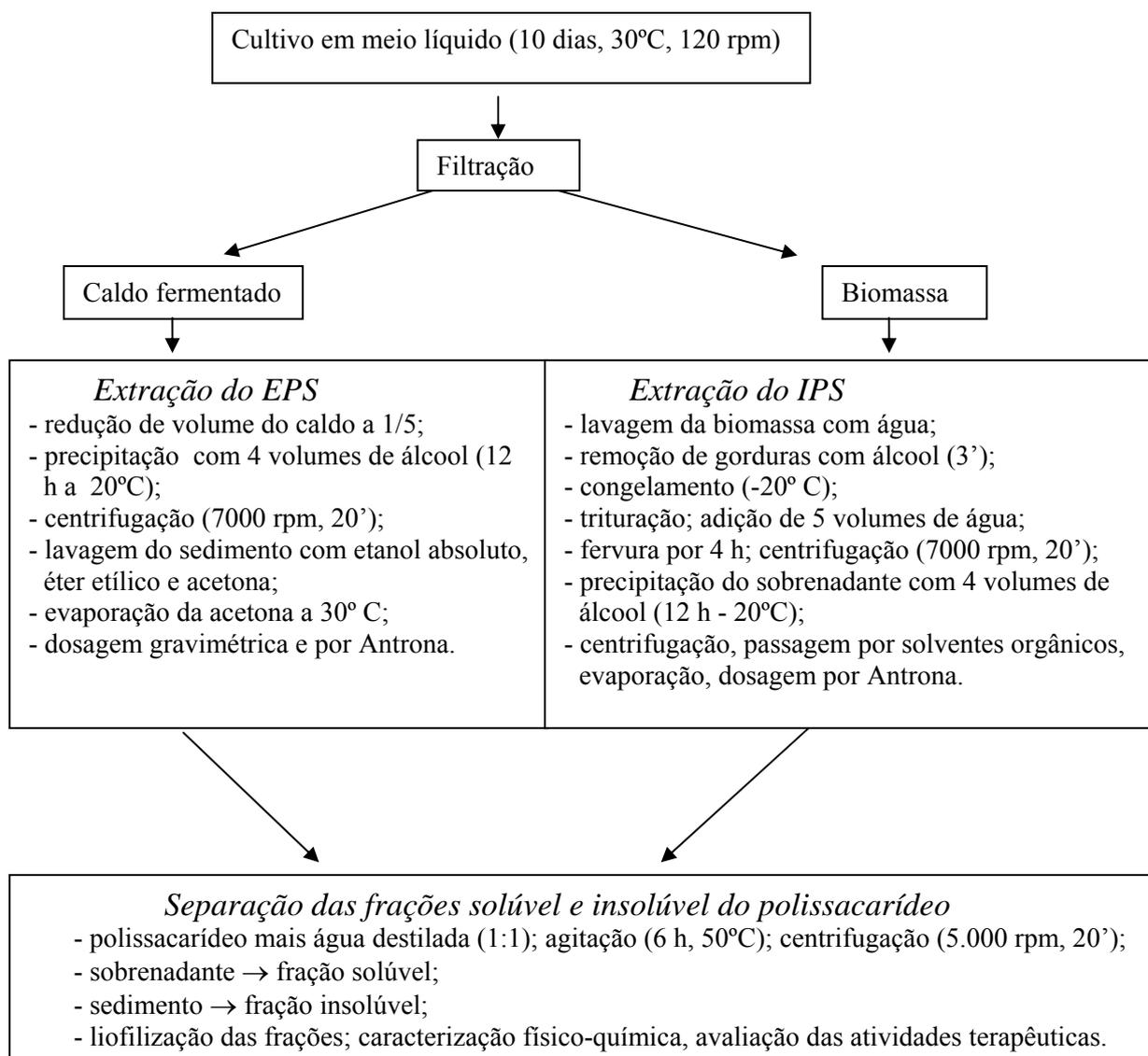
#### 5.4.3 Obtenção das Frações de Polissacarídeo Solúveis e Insolúveis em Água

O polissacarídeo total foi emulsionado em água destilada (volume/volume) em agitador magnético por 6 horas a 50°C. A seguir, foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos. A fração insolúvel contida no precipitado foi tratada com solventes orgânicos (clorofórmio, éter etílico e acetona) e secada em estufa a 50° C. A fração do polissacarídeo solúvel em água, contida no sobrenadante, foi precipitada com etanol e tratada da mesma forma que a fração insolúvel (Figura 6).

## 5.5 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE RESIDUAL

O consumo de glicose foi medido no caldo de cultura pelo ensaio enzimático “Glucose Hexoquinase II” - ADVIA 1650 - Bayer®. Neste método, a glicose é fosforilada por adenosina trifosfato (ATP) na presença de hexoquinase. A glicose-6-fosfato que se forma é oxidada na presença de glicose-6-fosfatodesidrogenase, levando a redução da nicotina adenina dinucleotídeo (NAD) a NADH. A absorbância do NADH é mensurada como ponto final de reação a 340 nm.

FIGURA 6 – EXTRAÇÃO DE ENDO E EXOPOLISSACARÍDEOS DE *G. lucidum* PRODUZIDO EM MEIO LÍQUIDO



## 5.6 PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura foram semeados com 2 mL de inóculo líquido (item 5.3.2) e incubados a 30°C, por 14 dias, 120 rpm. Os experimentos foram feitos em duplicata. A quantificação da biomassa e de EPS foi realizada conforme descrito no item 5.4. As dosagens de açúcares totais foram feitas em triplicata pelo Método da Antrona. O pH foi verificado em potenciômetro digital.

## 5.7 EFEITO DO USO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DE *G. lucidum* EM MEIO LÍQUIDO

### 5.7.1 Condições de Cultivo

Foi empregado o meio de cultura descrito no item 5.3.1, o qual foi dispensado em alíquotas de 50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Foram semeados 2 mL de inóculo líquido (item 5.3.2) por frasco. A incubação foi a 30° C, por 10 dias, a 120 rpm (TANG, ZHONG, 2202). Os experimentos foram feitos em duplicata. A quantificação da biomassa e de EPS foi realizada conforme consta no item 5.4. As dosagens de açúcares totais foram feitas em triplicata pelo Método da Antrona.

### 5.7.2 Efeito de Diferentes Fontes de Carbono

Foram testadas cinco diferentes fontes de carbono: glicose, maltose, sacarose, lactose e frutose, na proporção de 35 g/L. Um frasco de caldo de cultivo sem fonte de carbono foi inoculado como controle.

### 5.7.3 Efeito de Diferentes Fontes de Nitrogênio

Foram pesquisadas nove fontes de nitrogênio, de forma isolada ou em associações, conforme mostra a Tabela 13.

TABELA 13 – FONTES DE NITROGÊNIO TESTADAS NO DESENVOLVIMENTO DE *G. lucidum* EM CULTIVO SUBMERSO

ENSAIO	FONTE DE NITROGÊNIO-I (g/L)	FONTE DE NITROGÊNIO-II (g/L)
1	Extrato de levedura (7,5)	...
2	Extrato de levedura (2,5)	Peptona (5,0)
3	Extrato de levedura (2,5)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5,0)
4	Extrato de levedura (2,5)	Uréia (5,0)
5	Extrato de levedura (2,5)	KNO <sub>3</sub> (5,0)
6	Peptona (7,5)	...
7	Extrato de malte (7,5)	...
8	Uréia (7,5)	...
9	Uréia (2,5)	Peptona (5,0)

#### 5.7.4 Efeito da Interação entre Fontes de Carbono e Nitrogênio

Com base nos resultados obtidos nos experimentos já relatados, 12 combinações entre fontes de carbono e nitrogênio foram testadas em duplicata (Tabela 14).

TABELA 14 - FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO TESTADAS NO DESENVOLVIMENTO DE *G. lucidum* EM CULTIVO SUBMERSO

ENSAIO	CARBONO (35g/L)	NITROGÊNIO - I (g/L)	NITROGÊNIO - II (g/L)	NITROGÊNIO - III (g/L)
1	Glicose	Extrato de levedura (7,5)	...	...
2	Glicose	Extrato de levedura (2,5)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5,0)	...
3	Glicose	Extrato de levedura (5,0)	Peptona (3,0)	Extrato de malte (3,0)
4	Maltose	Extrato de levedura (7,5)	...	...
5	Maltose	Extrato de levedura (2,5)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5,0)	...
6	Maltose	Extrato de levedura (5,0)	Peptona (3,0)	Extrato de malte (3,0)
7	Lactose	Extrato de levedura (7,5)	...	...
8	Lactose	Extrato de levedura (2,5)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5,0)	...
9	Lactose	Extrato de levedura (5,0)	Peptona (3,0)	Extrato de malte (3,0)
10	Sacarose	Extrato de levedura (7,5)	...	...
11	Sacarose	Extrato de levedura (2,5)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5,0)	...
12	Sacarose	Extrato de levedura (5,0)	Peptona (3,0)	Extrato de malte (3,0)

### 5.8 EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE CULTIVO SUBMERSO DE *G. lucidum*

Para se determinar o tempo ideal de agitação dos frascos de cultura, visando obter o máximo de produção de exopolissacarídeo, foram testados sete períodos de tempo nos quais associaram-se fases de agitação (120 rpm) e fases de cultura estática, da seguinte forma: um dia agitando e nove dias parado, dois dias agitando e oito dias parado, seis dias agitando e quatro dias parado, oito dias agitando e dois dias parado, nove dias agitando e um dia parado. Em paralelo, foram feitos dois controles, sendo que um ficou agitando durante dez dias e outro permaneceu estático durante todo o período. Frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, foram semeados com 2 mL de inóculo líquido (item 5.3.2) e incubados a 30° C, por 10 dias. Os experimentos foram feitos em duplicata. A quantificação da biomassa e de EPS foi realizada conforme item 5.4. As dosagens de açúcares totais foram feitas em triplicata pelo Método da Antrona.

## 5.9 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

### 5.9.1 Trigo em Grão

Trigo em grão (*Triticum aestivum* L.) foi lavado e deixado de molho em água por 24 horas. A seguir, foi acondicionado em alíquotas de 250 g em frascos com capacidade para 300 g, com umidade inicial de 35%. Também foram preparadas bandejas de alumínio, ou de polipropileno, contendo o trigo e cobertas com papel filtro e papel Kraft. Os frascos e as bandejas foram autoclavados a 120° C, 1 atmosfera, por 50 minutos. Inicialmente, *G. lucidum* foi desenvolvido em placas de Petri de 90 mm contendo BDA (30°C, 10 dias). A superfície de crescimento foi raspada e semeada em frascos Erlenmeyer de 500 ml, contendo 250 mL de meio líquido, os quais foram incubados por 10 -14 dias a 30° C, sob agitação (120 rpm) (TANG; ZHONG, 2002). Após esse período, houve desenvolvimento de aproximadamente 2,0 g de micélio/250 mL de caldo de cultivo (peso seco). O micélio foi separado do caldo de cultivo por filtração e suspenso em 100 mL de água destilada estéril. Foram semeados 40 mL deste inóculo (aproximadamente 200 mg de biomassa) para cada 100 g de trigo autoclavado, de forma a se obter uma umidade final em torno de 40 a 50%. Os frascos e bandejas foram incubados em câmara de fermentação, na ausência da luz, com um aquecedor e umidificador (Climatorm), que mantinha a temperatura a 30°C e umidade em torno de 95 – 98% (higrômetro Labcraft), durante 30 dias (BEAUX et al., 1997). Após este período, o trigo fermentado com *G. lucidum* foi seco em estufa com circulação de ar a 50° C, por cerca de 18 horas. A seguir, foi passado por moinho de faca (DeLeo), peneirado em agitador de peneiras (Bertel), originando uma farinha grossa, com grãos de aproximadamente 0,4 a 1,7 mm.

### 5.9.2 Trigo Moído

Em um segundo experimento, trigo moído - com granulometria de 0,8 a 2,0 mm - foi empregado como substrato o qual foi preparado, inoculado com micélio de *G. lucidum* e incubado conforme técnica descrita no item anterior.

## 5.10 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA

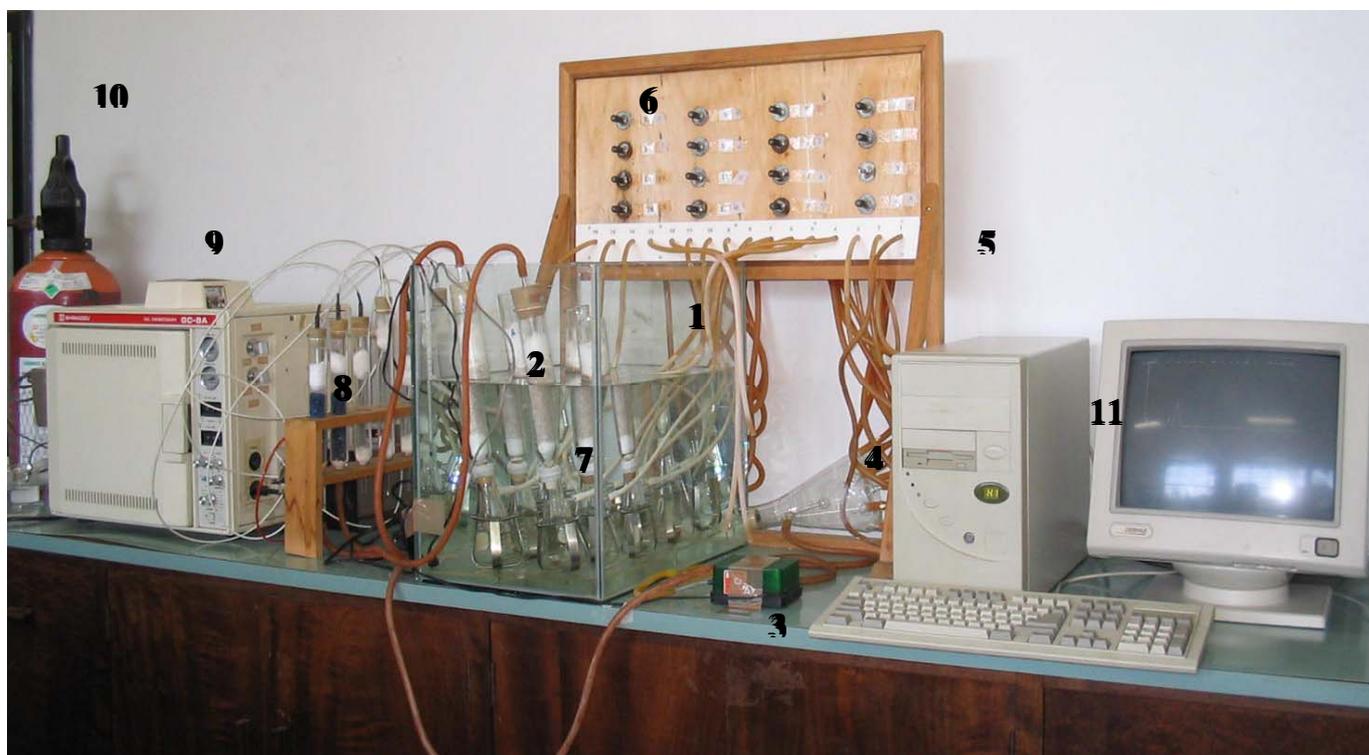
### 5.10.1 Respirometria em Biorreator Tipo Coluna com Aeração Forçada

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos de crescimento de *G. lucidum* em FES, foi empregado um sistema de fermentação semelhante ao desenvolvido por Raimbault e Alazard (PANDEY et al., 2001). Esse sistema é composto por reatores de vidro com capacidade para 250 cm<sup>3</sup>, com 4 cm diâmetro e 20 cm de comprimento, os quais ficam imersos em água dentro de uma cuba de vidro com controle de temperatura a 30°C. O substrato foi constituído de trigo em grão (partículas de 0,8 a 2,0 mm), o qual foi autoclavado a 120° C, 1 atmosfera, por 50 minutos, com umidade inicial de 35%. O inóculo foi preparado a partir da biomassa de *G. lucidum* desenvolvido em 250 mL de meio líquido (TANG; ZHONG, 2002) por 10 dias a 30°C, sob agitação (120 rpm), originando, aproximadamente, 2,0 g de micélio/250 mL (peso seco). O micélio foi separado do caldo de cultivo por filtração e suspenso em 100 mL de água destilada estéril. Foram semeados 10 mL deste inóculo (aproximadamente 200 mg de biomassa) para cada 100 g de substrato, de forma a se obter uma umidade final em torno de 40 a 50% (BEAUX et al., 1997).

O substrato inoculado foi distribuído em porções de 60 g em dez reatores de vidro, previamente esterilizados, os quais foram fechados, em ambas as extremidades, com filtros de algodão. Os reatores foram acoplados a umidificadores de ar com capacidade de 250 mL, contendo aproximadamente 150 mL de água destilada, cuja função era saturar o ar antes de sua passagem pelo biorreator. O fluxo de ar, aproximadamente, 10 mL/min para cada coluna, foi ajustado por um sistema de

válvulas e controlado diariamente por um rotâmetro (OMEL) na saída de cada reator. A análise respirométrica foi realizada mensurando os gases expelidos dos reatores, os quais foram desumidificados através da passagem por colunas de sílica-gel montadas em série, e analisados por um sistema de cromatografia gasosa (Shimadzu GC-8A, Shimadzu Co., Japão), interfaceado a um computador (Compaq-XT386) (Figura 7). O cromatógrafo empregou um detector de condutividade térmica, um injetor automático e uma coluna Alltech CTR1. Esta é uma coluna concêntrica dupla, com uma parte externa formada de um filtro molecular de 5A<sup>o</sup> e a parte interna de uma mistura de polímeros porosos (Poropack), a qual permite a separação de oxigênio, nitrogênio, ar, metano, dióxido e monóxido de carbono em diferentes tempos de retenção. O cromatógrafo gasoso operou com temperatura de 60°C tanto para o detector como para a coluna. A fase gasosa utilizada foi o gás hélio com fluxo de 30 mL/min, pressão de 1 bar, corrente do catarômetro de 120 mA e o volume de injeção de 300 µL. O gás para calibração utilizado foi de (%): Ar - CO<sub>2</sub>(0,0)/O<sub>2</sub>(21,0)/N<sub>2</sub>(79,0); a mistura 1 era constituída de CO<sub>2</sub>(5,0):O<sub>2</sub>(5,0):N<sub>2</sub>(90,0) e a mistura 2 de CO<sub>2</sub>(10,0):O<sub>2</sub>(15,0):N<sub>2</sub>(75,0). Nestas condições o tempo de retenção (min) de cada componente foi expresso como 0,62 para o ar, 0,95 para o CO<sub>2</sub>, 5,72 para o O<sub>2</sub> e 8,02 para o N<sub>2</sub>. Os sinais analógicos detectados pelo cromatógrafo foram convertidos em sinais numéricos por um programa integrador de cromatogramas (Chroma). O experimento foi conduzido por 14 dias e as colunas foram gradativamente sendo retiradas para análise em diferentes estágios. Dessa forma, o crescimento do cogumelo foi continuamente monitorado em função do O<sub>2</sub> consumido e do CO<sub>2</sub> produzido. A taxa de consumo de oxigênio (TCO), CO<sub>2</sub> produzido e o quociente de respiração (QR) foram determinados segundo modelo matemático desenvolvido por Rodriguez-León et al. (PANDEY et al., 2001).

FIGURA 7 - SISTEMA DE BIORREATOR TIPO COLUNA COM AERAÇÃO FORÇADA ACOPLADO A CROMATÓGRAFO E COMPUTADOR



Notas: 1: cuba de vidro; 2: reatores; 3: bomba de ar; 4: distribuidor de ar; 5: entrada de ar; 6: válvulas de controle de aeração; 7: umidificadores de ar; 8: colunas de sílica-gel; 9: cromatógrafo; 10: gases; 11: computador.

### 5.10.2 Taxa de Consumo de Oxigênio e Produção de Gás Carbônico

Com a finalidade de estimar o Índice de Captação de Oxigênio (ICO ou Oxygen Uptake Rate - OUR) e a evolução da produção de CO<sub>2</sub> em termos de fluxo volumétrico (L h<sup>-1</sup>), foi realizado um balanço de massa, desprezando-se a contribuição do vapor d'água. Este balanço foi estimado considerando-se o peso inicial de matéria seca (MS), o fluxo de ar de entrada (F<sub>E</sub>) e a composição centesimal de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> do fluxo de ar na saída do fermentador (F<sub>S</sub>), que foi de 0,6 L h<sup>-1</sup> g MS. As seguintes equações foram consideradas:

$$V_{O_2S} = (\% O_{2s} \cdot 100^{-1}) \cdot F_s$$

$$V_{CO_2S} = (\% CO_{2s} \cdot 100^{-1}) \cdot F_s$$

$$V_{N2S} = (\% N_{2s} \cdot 100^{-1}) \cdot F_s$$

$$F_s = V_{O_2} + V_{CO_2} + V_{N2S}$$

O balanço de massa para o oxigênio é dado em função da avaliação do fluxo volumétrico do  $O_2$  consumido:

$$V_{O_{2cons}} = (20,9 \cdot 100^{-1}) F_E - (\% O_{2s} \cdot 100^{-1}) \cdot F_s$$

Sabendo-se que :

$$V_{N2E} = (79,1 \cdot F_E) 100^{-1}$$

$$V_{N2E} = V_{N2S}$$

Relacionando-se as equações acima, se obtém a seguinte relação para o fluxo de entrada e de saída:

$$F_E = [(100 - \%O_2 - \%CO_2) \cdot F_s] 79^{-1}$$

Para obtenção da estimativa da evolução da TCO e da produção de  $CO_2$  em  $mmol h^{-1}$  foi considerado o ar como um gás ideal, e os fluxos volumétricos,  $V_{O_2}$  consumidos e  $V_{CO_2}$  de saída foram corrigidos em função da temperatura de  $30^\circ C$  utilizada.

A partir dos valores calculados para a TCO e produção de  $CO_2$ , foram realizados os cálculos para estimativa de parâmetros biotecnológicos, segundo a equação de SATO et al. (1983) (PANDEY et al., 2001), que estima os valores de rendimento de biomassa com base no consumo de  $O_2$  e o coeficiente de manutenção (m).

$$X_n = \frac{Y_{x/o} \Delta t \left( \frac{1}{2} \left( \left( \frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left( \frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right) + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left( \frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} + \left( 1 - \frac{a}{2} \right) X_0 \right) - a \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i}{\left( 1 + \frac{a}{2} \right)}$$

Onde:

$X_n$  = conteúdo de biomassa em determinado tempo (t);

$a$  =  $m_x \cdot (Y_{x/o}) \Delta t$ ;

$m$  = coeficiente de manutenção da biomassa;

$Y_{x/o}$  = consumo de oxigênio.

O procedimento para os cálculos de biomassa ( $X_n$ ) em um dado tempo ( $t$ ) consistiu em estimar os valores de rendimento de biomassa baseado no consumo de oxigênio ( $Y_{x/O_2}$ ) pelo programa Fersol, que emprega a equação desenvolvida por Rodriguez-León et al. (PANDEY et al., 2001):

$$dO_2/dt = 1/ Y_{x/o} dx/dt + mx$$

Onde:

$dO_2/dt$  é a taxa de consumo de oxigênio, em g/h;

$Y_{x/o}$  é a relação entre biomassa formada e oxigênio consumido (biomassa/ $O_2$ );

$dx/dt$  é a taxa de produção de biomassa, em g/h;

$m$  é um coeficiente de manutenção, refletindo a quantidade de  $O_2$  usada para outras funções que não a produção de biomassa, em  $h^{-1}$ ;

$x$  é a quantidade de biomassa no sistema, em g.

Os cálculos foram realizados para a fermentação até a fase exponencial, com valores de biomassa determinados analiticamente em 0, 06, 18, 30, 54 e 78 h de fermentação.

## 5.11 MÉTODOS ANALÍTICOS

Ao final da análise respirométrica, foram realizadas as seguintes determinações: pH, umidade e dosagem de ergosterol.

A determinação da umidade foi realizada segundo metodologia prescrita pela AOAC (2000). Foram pesadas alíquotas de 2g do fermentado em papel filtro, previamente seco e pesado. As alíquotas foram secas em estufa a  $100^\circ C$ , por 18 horas. A umidade foi calculada através da seguinte fórmula: Umidade (%) =  $A.100/P$ ; onde: A representa a perda de peso da amostra, e P representa o peso da amostra úmida.

Para determinação do pH, alíquotas de 5g do fermentado foram transferidas para frascos e diluídas em 25 mL de água destilada. Os frascos foram agitados durante 30 min, 120 rpm, e a seguir procedeu-se à leitura do pH em potenciômetro.

### 5.11.1 Extração do Ergosterol

Para extração do ergosterol foi empregado um método adaptado de SEITZ (1979): 1,0 g de fermentado, previamente macerado, foi colocado em frasco de vidro, ao qual foram adicionados 4 mL de etanol P.A. e 2 mL de NAOH-2M, a seguir essa mistura foi liquidificada. O frasco foi fechado e incubado a 70°C, por 1 hora, com agitação periódica. Após incubação, foram adicionados 4 mL de HCL-1M e 2 mL de KHCO<sub>3</sub>-1M, o frasco foi agitado e a seguir foi adicionado 4 mL de n-hexano. A mistura foi agitada e transferida para tubo de ensaio e centrifugada (10 min, 3.500 rpm) para separar a fase leve. A fase leve, n-hexano, foi recolhida, e procedeu-se a uma nova extração com mais 4 mL de n-hexano, e uma última extração com 2 mL de n-hexano. O extrato na fase orgânica foi evaporado a vácuo (200 mmHg) a 35°C, ressuspendido em 200 mL de n-hexano e filtrado em membrana de 0,22 µm.

### 5.11.2 Análise do Ergosterol

A análise dos extratos foi feita em HPLC Varian ProStar, com coluna C18 e detector PDA (matriz de fotodiodos) regulado a 282 nm. As condições de eluição do analito foram desenvolvidas a partir de MONTGOMERY et. al. (2000); GONG, GUAN e WITTER (2001) e LINDBLOM, WACHENFELDT, TRANVIK (2004), as quais foram ajustadas para o equipamento empregado. Para análise foram utilizados 10 µL da amostra. Como fase móvel foi empregado metanol puro (até 3 min), acetonitrila pura de 3 a 10 min. e metanol puro de 10 a 15 minutos com vazão de 2 mL/min para eluir outros componentes presentes na amostra. O tempo de retenção obtido foi de 3,35 min. Como amostra padrão foi utilizada uma solução de ergosterol PA a 1000 µg/mL, com diluições de 5000 a 1000 µg/mL (CARVALHO, 2004). A amostra para a linha base foi constituída por 10 mL de n-hexano puro.

## 5.12 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO TRIGO FERMENTADO COM *G. lucidum*

Amostras de trigo *in natura* e de trigo fermentado foram analisadas quanto à composição centesimal em relação ao teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos, segundo metodologia prescrita pela AOAC (2000).

Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados comparados com a composição de ração comercial utilizada no Biotério da UFPR (Nuvilab) (Tabela 15).

TABELA 15 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE TRIGO EM GRÃO *IN NATURA* E APÓS FERMENTAÇÃO COM *G. lucidum*

COMPOSIÇÃO (g/100g)	Ração comercial*	Trigo em grão	Trigo em grão fermentado com <i>G. lucidum</i>
Umidade	12,5	6	8
Cinzas	...	1,7	2
Proteínas	22	14,6	15
Extrato etéreo	4	2	1,7
Matéria fibrosa	8		
Carboidratos	...	75,7	73,3

Fonte: \*www.nuvital.com.br

## 5.13 PREPARO DA RAÇÃO SUPLEMENTADA

### 5.13.1 Ração Experimento I

A formulação da ração fermentada foi elaborada de modo a se adequar às exigências nutricionais dos camundongos, considerando que estes ingerem em torno de 5g de ração por dia, a qual deve conter aproximadamente 22% de proteínas e 4% de lipídeos (REEVES, 1997). As formulações foram elaboradas considerando: a composição da ração comercial (Nuvilab), a composição do trigo e a composição centesimal do trigo fermentado (Tabela 15). Inicialmente, foi preparada uma ração

básica com trigo moído, a qual foi suplementada com proteína de clara de ovo em pó (Mizumoto®), e lipídeo de óleo de soja, a fim de se obter uma dieta equilibrada, de composição centesimal semelhante à ração comercial. Foram preparadas três formulações: G85 contendo a dose máxima diária de ração fermentada; G50 contendo a metade da dose de ração fermentada e ração controle que foi preparada da mesma forma que as demais rações, porém com trigo sem cogumelo. Para efeito de cálculo, assumiu-se uma quantidade de 12% de proteínas e 2% de lipídeos, tanto no trigo fermentado, quanto no trigo puro (USDA Nutrient Database for Standard Reference, 2001). As quantidades de ingredientes necessários para 1 Kg de ração fermentada foram calculadas, empregando-se a seguinte fórmula:

$$T \times 0,12 \text{ g} + C \times 0,80 \text{ g} = M \times 0,22 \text{ g}$$

Onde: T: quantidade de trigo em função da composição protéica (12g %)

C: clara de ovo desidratada contendo 80g % de proteínas

M = T + C (1Kg de ração final contendo 22% de proteínas)

Também foi preparada uma ração contendo partes iguais da ração G85 e da ração A85, a qual foi preparada da mesma forma descrita anteriormente, porém tendo como princípio ativo *Agaricus brasiliensis* desenvolvido por FES em trigo.

A Figura 8 apresenta os diferentes estágios de produção da ração fermentada, e a Tabela 16 mostra a formulação final das diferentes rações.

FIGURA 8 – ESTÁGIOS DO PREPARO DA RAÇÃO FERMENTADA



Notas: A: trigo em grão autoclavado; B: trigo fermentado com *G. lucidum*; C: trigo fermentado e seco; D: farinha de trigo fermentado; E: ração balanceada.

TABELA 16 – FÓRMULA DAS RAÇÕES

Ingredientes	G85	G50	A+G*	Controle
Trigo <i>in natura</i> (g)	...	426,5	...	853
Trigo fermentado (g)	853	426,5	...	...
Clara desidratada (g)	147	147	...	147
Óleo de soja (mL)	20	20	...	20
Água (mL)	200	200	...	200
Ração G85 (g)	...	...	500	...
Ração A85 (g)	...	...	500	...

Notas: \*: ração A85 formulada como a G85, porém à base de *A. brasiliensis* fermentado em trigo.

### 5.13.2 Ração Experimento II

Trigo moído (partículas de 0,8 a 2,0 mm) foi fermentado com *G. lucidum*, conforme condições anteriormente descritas. O trigo fermentado foi seco a 50°C e adicionado à ração comercial (Nuvilab®), previamente moída, na proporção de 10%, originando a ração G10. Com o intuito de se pesquisar a ação hipolipidêmica da ração fermentada, parte da ração foi suplementada com gordura de porco, na proporção de 5% (p/p), originando a ração G10-II (BOBEK, OZDIN e KUNIAK, 1997).

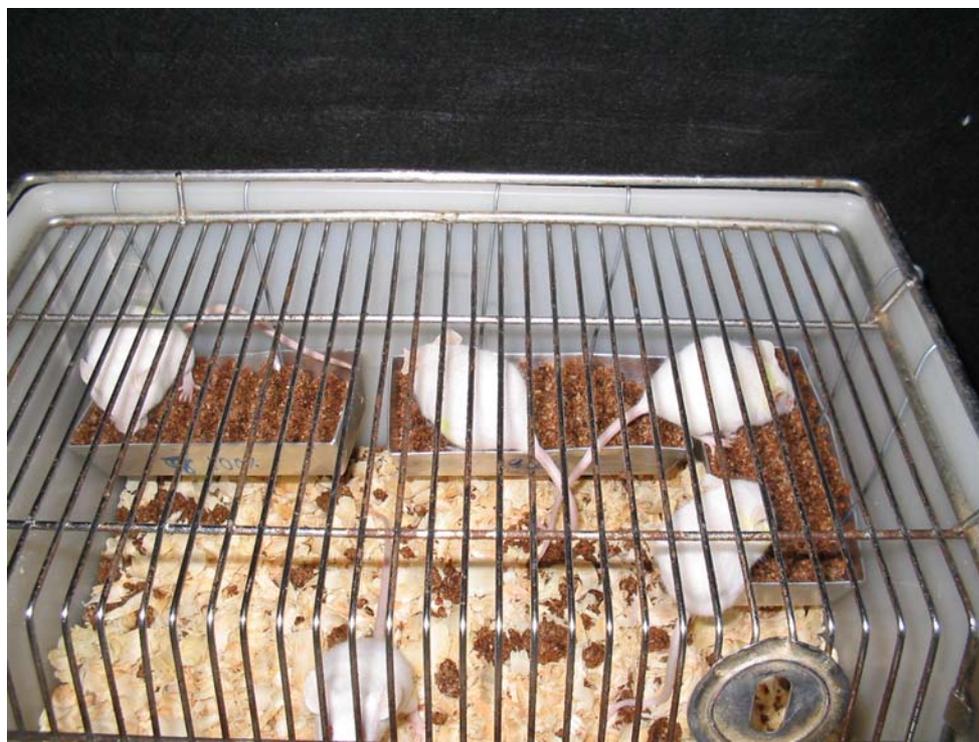
## 5.14 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTITUMORAL, IMUNOMODULADORA E HIPOLIPIDÊMICA DE *G. lucidum* e *A. brasiliensis*

### 5.14.1 Experimento I

Foram empregados 80 camundongos suíços, fêmeas, de 35 dias divididos em 8 grupos de 10 indivíduos, denominados G85, G50, A+G e controle, em função da ração que ingeriram. Os grupos destinados a receber o sarcoma 180 foram denominados: G85-S; G50-S; A+G-S, controle-S. Adicionalmente, foi incluído um grupo controle constituído por 10 animais, com as mesmas características já descritas, sendo que esse grupo foi alimentado com ração comercial (Nuvilab®). O peso inicial dos animais era de 21,06 g ( $\pm 1,25$ g).

Os animais foram mantidos em grupos de 10 dentro de gaiolas no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob condições aclimatizadas e ciclo claro/escuro de 12 horas. As diferentes rações foram dispensadas em forminhas de alumínio, com a capacidade de aproximadamente 60 g, as quais eram presas às paredes das gaiolas (Figura 9). Durante 14 semanas os camundongos foram alimentados com ração e água à vontade. Nas primeiras três semanas, foi adicionado à água dos grupos alimentados com ração à base de trigo um suplemento comercial contendo vitaminas A, C, D e E, na proporção de 20 gotas por 500 ml de água. Semanalmente, os animais foram pesados. Todo o procedimento foi submetido ao Comitê de Ética Em Pesquisa com Animais (CEEAA) da UFPR.

FIGURA 9 – CONDIÇÕES DE ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS



#### 5.14.2 Análise de Urina e de Fezes dos Animais

Grupos de 10 animais foram mantidos por 18 horas em jejum dentro de gaiolas metabólicas, com água *ad libitum* (Figura 10). Ao final deste período, a urina foi colhida e foram analisados os seguintes parâmetros: volume excretado, cor, aspecto, pH, densidade, proteínas, glicose, bilirrubinas, urobilinogênio, corpos cetônicos, nitritos e o valor estimado de leucócitos e eritrócitos. A seguir, a urina foi centrifugada (3.500 rpm por 10 minutos) e procedeu-se à análise microscópica do sedimento urinário.

As fezes foram colhidas de cada grupo de dez animais e analisadas quanto à presença de sangue oculto e de gordura fecal.

FIGURA 10 – ANIMAIS MANTIDOS EM GAIOLAS METABÓLICAS PARA COLETA DE URINA



#### 5.14.3 Manutenção da Linhagem de Sarcoma 180 e Implantação do Tumor

A linhagem de células de sarcoma 180 (ATCC-TIB-66) foi mantida através de passagens intraperitoneais semanais em camundongos. Primeiramente, inoculou-se 5 mL de tampão fosfato salina (PBS) - pH 7,3 - na cavidade peritoneal do camundongo portador do tumor e obteve-se o lavado peritoneal. A seguir, procedeu-se a contagem de células viáveis, em câmara de Neubauer, com corante azul de Trypan (10g/L em solução salina 0,9%) e foi preparada uma suspensão celular de  $10^6$  células viáveis/mL. Essa suspensão celular foi inoculada (1 mL) na região intraperitoneal de outro animal.

Na 10ª semana após início do experimento (75 dias) foi inoculado 0,2 mL de uma suspensão de  $2,7 \times 10^7$  células tumorais/mL, via subcutânea, na região interescapular dos animais dos grupos G85-S, G50-S, A+G-S e controle-S. Os animais dos grupos G85, G50, A+G e controle foram inoculados com salina. A Tabela 17

mostra como foram divididos os oito grupos de camundongos para realização do experimento-I.

TABELA 17 – ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE *G.lucidum* CG-144 e *A. brasiliensis* LPB-3

GRUPOS	NÚMERO DE ANIMAIS	INOCULAÇÃO DE SALINA	INOCULAÇÃO DE SARCOMA 180
G85	10	0,2 mL	...
G50	10	0,2 mL	...
A+G	10	0,2 mL	...
Controle	10	0,2 mL	...
G85-S	10	...	0,2 mL
G50-S	10	...	0,2 mL
A+G-S	10	...	0,2 mL
Controle-S	10	...	0,2 mL
Total de animais	80	40	40

Nota: ... Animais não inoculados.

#### 5.14.4 Sacrifício dos Animais e Coleta de Amostras

Os animais foram acompanhados diariamente quanto às condições físicas e desenvolvimento do tumor. Na 14ª semana (105 dias), os animais foram anestesiados por inalação etérea e foi coletada uma amostra de sangue por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa umedecida em heparina. A seguir, os animais foram sacrificados por inalação etérea e procedeu-se à retirada de linfonodos axilares, baço e, nos animais comprometidos, foi retirada a massa tumoral.

#### 5.14.5 Experimento II

Para pesquisa da ação da ração suplementada com 10% de trigo fermentado sobre o metabolismo lipídico foram analisados 21 camundongos, fêmeas, suíços, de 35

dias, divididos em três grupos de sete animais: G10-I (ração suplementada com 10% de trigo fermentado); G10-II (ração suplementada com 10% de trigo fermentado e 5% de gordura); e grupo controle o qual foi alimentado apenas com ração comercial moída.

Para pesquisa da ação imunomoduladora da ração suplementada com 10% de trigo fermentado foram analisados 14 camundongos, fêmeas, suíços, de 35 dias, divididos em dois grupos de sete animais: G10-I (ração suplementada com 10% de trigo fermentado); e grupo controle o qual foi alimentado apenas com ração comercial moída.

Esses grupos foram alimentados durante 30 dias, com água e ração *ad libitum*. Após esse período, os animais dos grupos relacionados a metabolismo lipídico foram anestesiados por inalação etérea, e o sangue foi colhido por punção cardíaca para análise de lipídeos totais, colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis. Dos animais destinados ao estudo das propriedades imunomoduladoras de *G. lucidum*, primeiramente foi coletado sangue para pesquisa dos níveis plasmáticos de citocinas e a seguir os baços foram retirados para pesquisa de células T (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/CD32, CD25/CD4 e CD25/CD8).

## 5.15 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EXAMES REALIZADOS

### 5.15.1 Análise do Tumor e Cálculo de Inibição do Desenvolvimento Tumoral

Foi feita avaliação macroscópica do tumor, quanto à profundidade de invasão e a sua extensão a tecidos vizinhos. A massa tumoral foi pesada em balança analítica e medida. A seguir, os tumores foram acondicionados em frascos contendo formol tamponado a 10% (solução tampão de aldeído fórmico neutro). O volume do tumor foi calculado pela fórmula:

$$VT = 4/3 \pi (a^2b)/2$$

Onde: VT é o volume do tumor, a é o diâmetro menor e b é o diâmetro maior (MIZUNO et al., 1999).

A inibição do tumor foi calculada pela seguinte fórmula:

$$I\% = (1-T/C) \times 100$$

Onde T representa o volume do tumor no grupo teste e C é o volume do tumor do grupo controle (MIZUNO et al., 1999).

### 5.15.2 Dosagem dos Parâmetros Bioquímicos

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos e analisado em aparelho automatizado ADVIA 1650 - Bayer® para os seguintes parâmetros: glicose, lipídeos totais, colesterol, colesterol-HDL (lipoproteína de alta densidade) e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), triacilgliceróis, proteínas totais e frações (albumina e globulinas), ácido úrico, uréia e creatinina. Todas as análises foram feitas em quadruplicata. A fração de colesterol-HDL (High Density Lipoprotein) foi analisada por teste colorimétrico (Labtest®) conforme orientação do fabricante. Devido ao volume reduzido de sangue que foi colhido de cada animal (em torno de 0,5-1,0 mL), houve a necessidade de se reunir plasma de dois ou até de três camundongos para se alcançar o volume suficiente para todas as dosagens. Dessa forma, cada grupo de dez camundongos originou quatro amostras de plasma. Após essas determinações, o restante do plasma foi congelado a -80°C para análises posteriores.

### 5.15.3 Pesquisa de Interleucinas

Foram pesquisadas no plasma dos camundongos as interleucinas (IL): IL-1b, IL-6, IL-10, Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), Interferon (IFN- $\gamma$ ), IL-12p70 e MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). As análises foram feitas por citometria de

fluxo, empregando-se o conjunto de reagentes CBA (Cytometric Bead Array-BD Biosciences - Pharmigen), o qual consiste em uma mistura de seis populações de partículas de látex conjugadas com R-Ficoeritrina (PE), exibindo diferentes intensidades de fluorescência, e recobertas com anticorpos específicos para cada uma das IL. As análises foram processadas segundo orientação do fabricante.

#### 5.15.4 Processamento de Tecidos Esplênicos e Linfóides

Logo após a extração dos baços, cerca de 1/3 de seu volume foi cortado e mantido em solução tamponada de formol a 10%, para estudos posteriores. A massa esplênica restante foi macerada e preparada para pesquisa de diferentes classes de linfócitos por citometria de fluxo. Foram extraídos os gânglios axilares e subaxilares dos camundongos, os quais também foram macerados e analisados por citometria de fluxo.

Os baços foram processados individualmente, de forma a se obter uma suspensão de células esplênicas para cada animal. Porém, devido ao tamanho reduzido dos linfonodos, estes tiveram que ser processados juntando-se linfonodos de dois animais na mesma suspensão. Todas as etapas de lavagem foram realizadas por centrifugação a 1.200 rpm por 5 minutos. Baço e linfonodos foram macerados, em placas de Petri distintas, com auxílio de um êmbolo de seringa e 4 mL de PBS. A seguir, os tecidos macerados foram filtrados em entretela para tubo Falcon de 15 mL. O volume foi completado para 15 mL com PBS e a suspensão foi centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado em vórtex. Aos tubos contendo baço macerado foram adicionados 5 ml de solução hemolítica (BD Biosciences Pharmigen) e estes foram deixados em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, os tubos foram completados até 15 mL com PBS, homogeneizados, centrifugados, e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento adicionou-se 15 mL de PBS contendo azida sódica (0,05g%) e soro fetal bovino (SFB - 1mL%) (pH 7,3). A suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e as células esplênicas foram ressuspensas em 2 mL de

tampão azida SFB. Os tubos Falcon contendo a suspensão de linfonodos macerados foram completados com 15 mL de PBS, homogeneizados e centrifugados. O sobrenadante foi desprezado, e a suspensão celular foi ressuspendida em 2 mL de tampão azida SFB.

As células do baço e dos linfonodos foram contadas em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan. Foram preparadas suspensões das células viáveis de baço e de linfonodo a uma concentração de  $6 \times 10^7$  células/mL (COLIGAN et al., 1992).

As suspensões celulares foram transferidas para tubos específicos para leitura em citômetro de fluxo e coradas com os anticorpos marcados com substâncias fluorescentes. A seguir, foram incubadas no escuro, a 4°C, por 20 min. Então as suspensões celulares foram lavadas com tampão azida, e o sedimento foi diluído em volumes iguais de tampão azida e paraformaldeído a 2%. As células marcadas permaneceram no escuro, a 4°C, até a hora da leitura no citômetro de fluxo, dentro de um período inferior a 96h.

## 5.16 CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de tecido foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), que é basicamente composto por um sistema fluídico, responsável pelo transporte da amostra e um sistema ótico-eletrônico, o qual permite uma análise simultânea das características físicas de partículas, usualmente células, à medida que essas fluem e atravessam um feixe de luz. O sistema ótico-eletrônico é equipado com laser e detectores de dispersão por tamanho (FSC, forward scatter), detectores de complexidade ou granulosidade interna (SSC, side scatter) e detectores de emissão de fluorescência, que correspondem aos canais FL1 para as cores do espectro verde (515-525 nm), FL2 (564-606 nm) e FL3 (610-670 nm) para as cores do espectro vermelho. Desse modo, as características celulares são identificadas, analisando o modo como as células ou partículas dispersam a luz de laser incidente e emitem fluorescência (COLIGAN et al., 1992).

As seguintes populações linfocitárias foram pesquisadas: células T: CD3, CD4, CD8, CD25/CD4 e CD25/CD8; células B CD19+; e células CD16/CD32. Foram usados reagentes contendo anticorpos monoclonais direcionados contra esses complexos moleculares que são expressos na superfície dos linfócitos (BD Biosciences Pharmingen). Os reagentes anticamundongo CD3 e CD25 são conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual é detectado pelo canal FL1 do citômetro de fluxo. Os reagentes anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 e anti-CD16/CD32 são conjugados com ficoeritrina (PE), os quais são detectados pelo canal FL2. Complexos moleculares CD16 e/ou CD32 são expressos por células “Natural Killer” (NK), monócitos, macrófagos, células dentríticas, células de Kupffer, granulócitos, mastócitos, linfócitos B, timócitos imaturos e alguns linfócitos T maduros e ativados. CD25 são receptores para IL-2 expressos na superfície de linfócitos T e B.

A aquisição e análise desses dois parâmetros, FL1 e FL2, nas células marcadas pela fluorescência foi realizada usando o programa “CellQuest”, que opera em computador Macintosh e acompanha o FACSCalibur.

Foi estabelecida uma aquisição de 10.000 eventos para cada amostra, sendo que os dados foram adquiridos na forma linear para o parâmetro dispersão e os de fluorescência na forma logarítmica. Primeiramente, foi adquirido o controle negativo para ajustar a auto-fluorescência da amostra. A separação dos linfócitos das demais populações celulares foi feita delimitando-se um “gate”, compreendido na região entre 200 a 400  $\mu$ . A seguir, foram passadas amostras marcadas com os diferentes fluorocromos para compensação do aparelho. O valor de FSC foi adequado para excluir células mortas e debris celulares, usando como guia um citograma “Density plot”, onde a ordenada correspondia a SSC (granulosidade) e a abscissa a FSC (dimensões). Em outros três citogramas (FL1/FL2, FL1/FL3 e FL2/FL3), através do ajuste da voltagem, a maioria das células não coradas ficou restrita entre 1 a 10 U (unidades de fluorescência) e aquelas coradas foram separadas em quadrantes conforme a emissão de fluorescência. O quadrante inferior direito representou as populações celulares marcadas com FITC e lidas em FL1, enquanto que as populações dispostas na parte superior esquerda corresponderam às células coradas com PE e

detectadas através de FL2. Dessa forma, células CD3<sup>+</sup> se posicionaram no quadrante inferior direito (Low Right – LR), enquanto que CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> foram visualizados no quadrante superior esquerdo (Up Left – UL) (Figura 11).

Após a compensação do aparelho foram adquiridas as demais amostras de tecidos esplênicos e ganglionares, sendo avaliadas em quadruplicata. A identificação e a quantificação das células foi realizada em citograma tipo “Contour plot” com determinação percentual dos valores nos diferentes quadrantes (Figura 12).

FIGURA 11 - CITOGRAMAS ANALISADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS

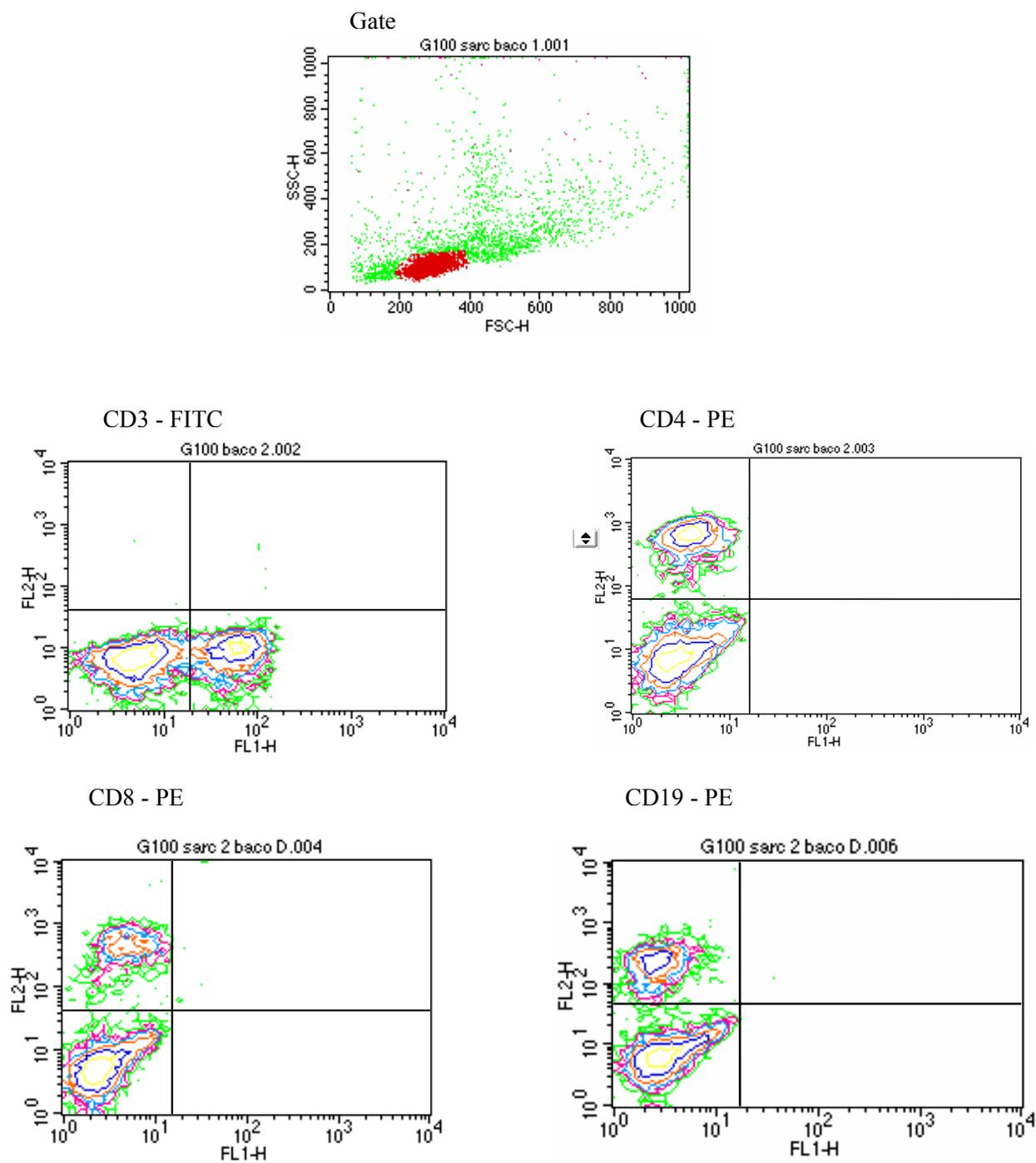


FIGURA 12 - ANÁLISE PERCENTUAL DA QUANTIDADE DE LINFÓCITOS NOS RESPECTIVOS QUADRANTES

CD3 - FITC

Quadrant Statistics

File: G100 baco 2 duplicata.002	Log Data Units: Linear Values
Sample ID:	Patient ID:
Tube:	Panel:
Acquisition Date: 27-Aug-04	Gate: G1
Gated Events: 4506	Total Events: 10000
X Parameter: FL1-H (Log)	Y Parameter: FL2-H (Log)
Quad Location: 16, 47	

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1	0.02	0.01	11.34	11.34	339.82	339.82
UR	25	0.55	0.25	56.82	49.60	397.68	283.67
LL	2404	53.35	24.04	6.31	5.46	7.00	6.18
LR	2076	46.07	20.76	61.52	55.40	9.45	8.39

NOTAS: UL: esquerda e acima; UR: direita e acima; LL: esquerda e abaixo; LR: direita e abaixo.

### 5.17 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram tabelados e submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o delineamento inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 3x2. Foi realizado o teste de Tukey quando se verificou significância na interação entre os dois fatores (ração e tumor). Os resultados foram reportados na forma de média e desvio padrão, considerando um nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DE *G. lucidum*

As amostras de *G. lucidum* desenvolveram colônias branco-amareladas, com aspecto cotonoso, em BDA, apresentando diferentes velocidades de crescimento (Figura 13). A amostra CG-144 foi a que cresceu mais rapidamente, alcançando 12,5 mm/dia, resultado superior ao reportado na literatura, que é de 2-8 mm/dia (SEO; KIRK, 2000). Nenhuma das cepas testadas cresceu entre 36–37°C. Quatro amostras cresceram bem a 28°C: V1, V2, CG-22 e P com 12; 10,8; 11,9 e 4,6 mm/dia, respectivamente. Três amostras apresentaram bom crescimento a 32°C: CG-114 (12,5 mm), LB (3,6 mm) e R (7,3 mm). Somente a amostra CG-112 cresceu melhor a 30°C (11,4 mm/dia).

FIGURA 13 - CRESCIMENTO RADIAL DE *G. lucidum*

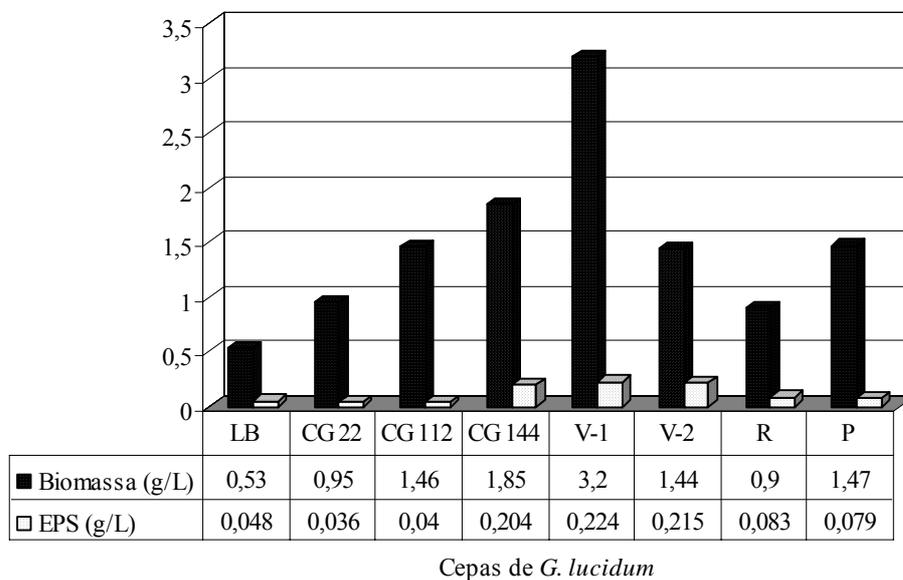


## 6.2 SELEÇÃO DE CEPA DE *G. lucidum*

As três cepas com crescimento rápido, V1, V2 e CG-144, foram as melhores produtoras de EPS. As cepas P e CG-112 apresentaram um crescimento micelial moderado em caldo (1,47 g/L e 1,46 g/L, respectivamente) e baixa produção de EPS (0,08 g/L e 0,04 g/L, respectivamente). As cepas R, CG-22 e LB apresentaram pouco crescimento micelial (0,90; 0,95; 0,53 g/L, respectivamente) e baixa produção de EPS (0,0834; 0,0364; 0,0482 g/L, respectivamente) (Gráfico 1).

Para continuação dos ensaios de otimização foi escolhida a cepa CG-144 pelos seguintes motivos: 1- cepa previamente identificada e catalogada, 2- boa produção de EPS e de biomassa, 3- crescimento rápido.

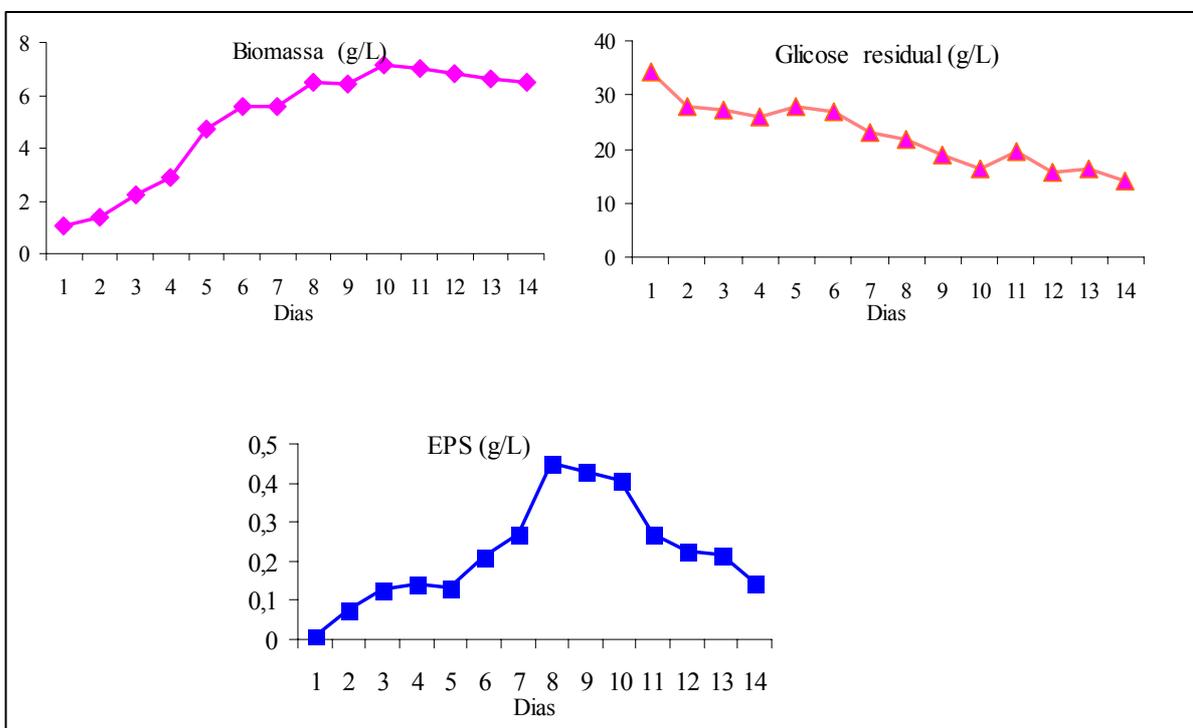
GRÁFICO 1 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEO POR DIFERENTES AMOSTRAS DE *G. lucidum*



### 6.3 ESTUDO CINÉTICO EM CULTIVO SUBMERSO

A produção de biomassa atingiu o valor máximo no nono e décimo dias (6,40 e 7,22 g/L, respectivamente). A partir do 11º dia começou a declinar, permanecendo em níveis estáveis até o final da fermentação. A produção de EPS atingiu o seu máximo no oitavo dia (0,452 g/L), permaneceu praticamente estável até o décimo dia, quando começou a declinar lentamente. O pH inicial de 5,5 foi para 4,07 ao final do processo fermentativo. A quantidade inicial de glicose fornecida pelo meio de cultura (3,50 g/L) declinou a partir do primeiro dia e permaneceu estável até o oitavo dia, quando, novamente, os níveis começaram a cair e permaneceram em queda até o final da fermentação (Figura 14).

FIGURA 14 - ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO *G. lucidum* CG 144 EM CULTIVO SUBMERSO



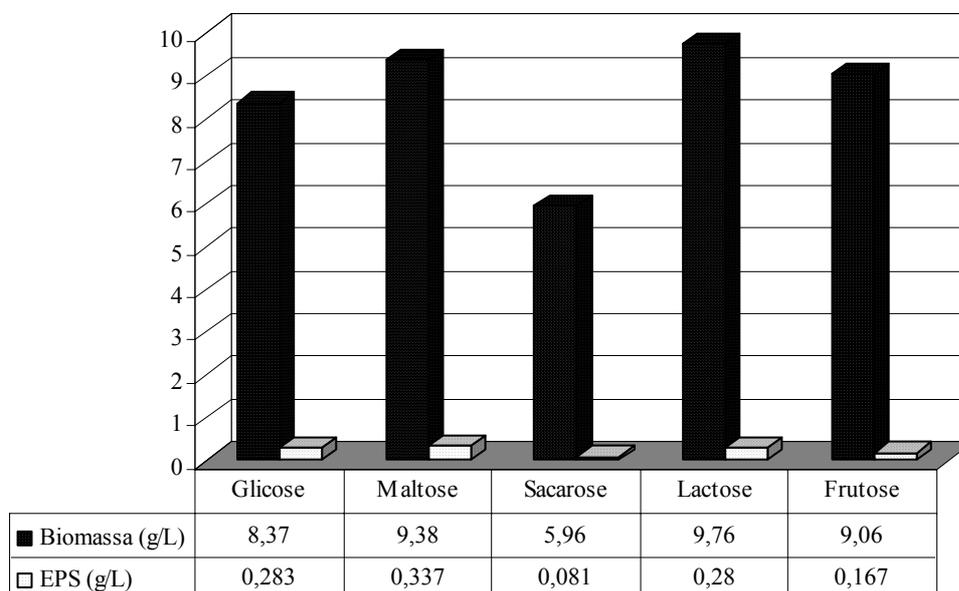
## 6.4 EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SOBRE O METABOLISMO DE *G. lucidum*

Através do emprego de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na formulação do caldo de cultura, foi possível observar alterações significativas no metabolismo de *G. lucidum*.

### 6.4.1 Efeito de Diferentes Fontes de Carbono

Os carboidratos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de fungos superiores, proporcionando energia às células. Neste trabalho foram testados os monossacarídeos glicose e frutose; e os dissacarídeos maltose, sacarose e lactose, tendo como fonte de nitrogênio extrato de levedura e peptona. A produção de biomassa apresentou os seguintes resultados: 9,76; 9,38; 9,06; 8,37; 5,97 g/L para lactose, maltose, frutose, glicose e sacarose, respectivamente. Em relação à produção de EPS, a maltose se mostrou mais eficiente (0,337 g/L), seguida por glicose (0,283 g/L), lactose (0,280 g/L), frutose (0,167 g/L) e sacarose (0,080 g/L). TANG e ZHONG (2002) relatam a lactose como a melhor fonte de carbono para o crescimento de *G. lucidum*, enquanto que a sacarose foi melhor para a produção de EPS, porém inibiu o crescimento celular. Neste trabalho, a sacarose demonstrou ser a fonte de carbono menos apropriada, tanto para a produção de biomassa quanto de polissacarídeo. Esse resultado pode estar relacionado às características específicas da cepa *G. lucidum* CG 144 (Gráfico 2).

GRÁFICO 2 – INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEO POR *G. lucidum* CG 144 EM CULTIVO SUBMERSO

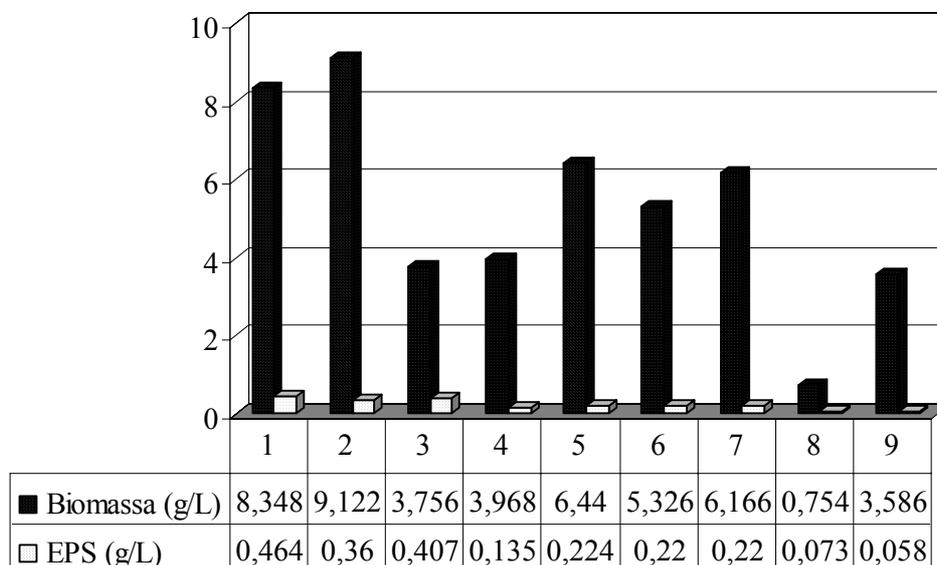


#### 6.4.2 Efeito de Diferentes Fontes de Nitrogênio

Outro fator essencial para o cultivo de microrganismos e obtenção de metabólitos, é a utilização de uma fonte adequada de nitrogênio. Algumas pesquisas relatam o emprego de combinações de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, visando otimizar a produção de polissacarídeos por *G. lucidum*. Esses estudos comparam formulações à base de fontes complexas de carbono e nitrogênio, como extrato de levedura, peptona e extrato de malte, com meios definidos contendo apenas uma fonte de nitrogênio, uma de carbono e sais minerais (YANG; LIAU, 1998; KIM et al., 2002). Neste trabalho foram testadas nove diferentes fontes de nitrogênio, empregando em meio de cultura proposto por TANG e ZHONG (2002), contendo glicose como fonte de carbono. O melhor crescimento micelial ocorreu com o emprego da fonte de nitrogênio composta por extrato de levedura e peptona (9,12 g/L). O emprego isolado de extrato de levedura rendeu 8,35 g/L de biomassa. O emprego exclusivo da peptona, como única fonte de nitrogênio, não apresentou efeitos positivos

sobre a produção de biomassa (5,33 g/L), sendo que FANG e ZHONG (2002a) relatam efeito inibidor da peptona sobre o crescimento celular em concentrações acima de 10 g/L. As demais fontes de nitrogênio testadas apresentaram um efeito modesto sobre o crescimento celular: extrato de levedura com  $\text{KNO}_3$  (6,44 g/L), extrato de levedura com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3,75 g/L), extrato de malte (6,16 g/L), uréia em associação com extrato de levedura (3,97 g/L), uréia com peptona (3,58 g/L de biomassa). A uréia como fonte única de nitrogênio registrou a mais baixa produção de biomassa (0,754 g/L). As melhores fontes de nitrogênio para produção de EPS foram o extrato de levedura, isoladamente e em associação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,46 e 0,40 g/L, respectivamente). As demais fontes de nitrogênio testadas apresentaram resultados inferiores de produção de EPS: extrato de levedura com a peptona (0,36 g/L), peptona e extrato de malte (0,22 g/L), extrato de levedura com  $\text{KNO}_3$  (0,22 g/L) e extrato de levedura com uréia (0,13 g/L). A combinação entre uréia e peptona resultou na mais baixa produção de EPS (0,058 g/L) (Gráfico 3). O emprego de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, embora tenha apresentado melhor eficiência na produção de polissacarídeo, conferiu ao sobrenadante uma coloração amarelada. RAO; KIM e RHEE (2000) também reportam que altas concentrações de extrato de levedura (4% ou mais) escurecem o sobrenadante do caldo de cultura.

GRÁFICO 3 – INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEO POR *G. lucidum* CG 144 EM CULTIVO SUBMERSO



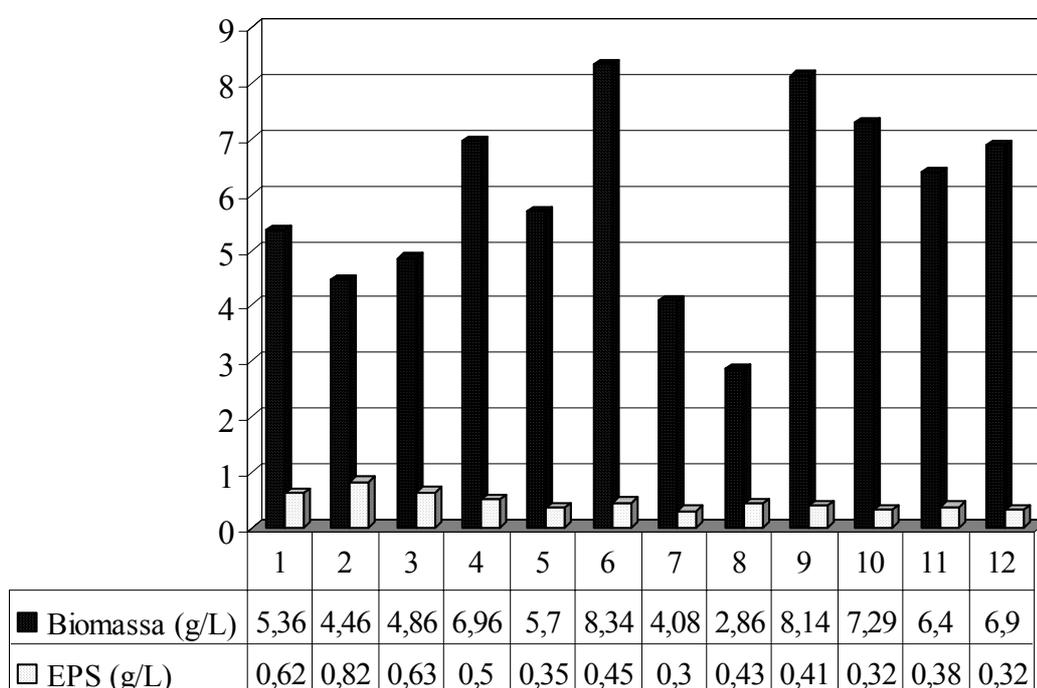
NOTAS: 1:extrato de levedura (EL); 2: EL + peptona; 3: EL + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4: EL + uréia; 5: EL + KNO<sub>3</sub>; 6: peptona; 7: extrato de malte; 8: uréia; 9: uréia + peptona.

#### 6.4.3 Efeito da Interação entre Fontes de Carbono e Nitrogênio

Foram testadas 12 diferentes associações entre fontes de carbono e nitrogênio, sendo que as fontes de carbono foram: a glicose, devido ao seu usual emprego em meios de cultura e facilidade de obtenção; a maltose e a lactose, por terem apresentado bons resultados nos ensaios anteriores; e, embora não demonstrando boa performance neste trabalho, a sacarose, por sugestão da literatura (TANG e ZHONG, 2002). Foram testadas as fontes de nitrogênio que apresentaram os melhores resultados nos ensaios anteriores, ou seja, o extrato de levedura, isoladamente e em associação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Também foi testada uma associação relatada por KIM et al. (2002) composta por extrato de levedura, peptona e extrato de malte, sendo que essa resultou na melhor produção de biomassa, quando associada com maltose (8,34 g/L) ou com sacarose (8,14 g/L), porém com baixa produção de EPS (0,45 g/L e 0,40 g/L,

respectivamente). A associação que resultou na melhor produção de EPS foi a combinação entre glicose, extrato de levedura e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,82 g/L), porém com pouco crescimento celular (4,46 g/L). Os resultados obtidos com as demais associações estão expressos no Gráfico 4.

GRÁFICO 4- INTERAÇÃO ENTRE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EPS POR *G. lucidum* CG 144, EM CULTIVO SUBMERSO

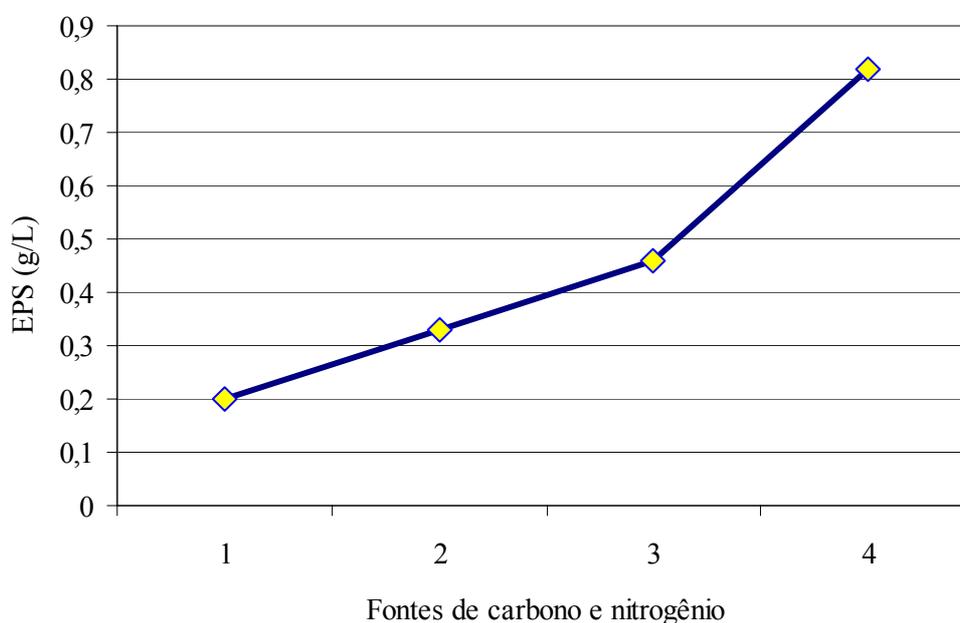


NOTAS: 1: glicose e extrato de levedura (EL); 2: glicose, EL e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3: glicose, peptona e extrato de malte (EM); 4: maltose e EL; 5: maltose, EL e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 6: maltose, EL; peptona e EM; 7: sacarose, EL; 8: sacarose, EL e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 9: sacarose, EL, peptona e EM; 10: lactose, EL; 11: lactose, EL e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 12: lactose, EL, peptona e EM.

#### 6.4.4 Composição do Meio de Cultura e Síntese de EPS

Tanto o crescimento celular quanto a síntese de metabólitos foram influenciados por diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Inicialmente, com meio de cultura contendo glicose, peptona e extrato de levedura, foi obtido 0,20 g/L de EPS. Alterando a fonte de carbono para maltose, a produção de EPS foi para 0,33 g/L. Empregando-se glicose e exclusivamente extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a produção de EPS se elevou para 0,46 g/L. Finalmente, a melhor associação - contendo glicose, extrato de levedura e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - induziu a produção de 0,82 g/L de EPS. O Gráfico 5 ilustra a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de EPS.

GRÁFICO 5 – PERFIL DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO POR *G. lucidum* CG 144 EM FUNÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO



NOTAS: 1: glicose, peptona e extrato de levedura; 2: maltose, peptona e extrato de levedura; 3: glicose e extrato de levedura; 4: glicose, extrato de levedura e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

## 6.5 EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE EPS

A fermentação submersa de fungos superiores é caracterizada por um incremento na viscosidade do caldo de cultura com o decorrer do tempo. A viscosidade pode ser devida ao aumento na densidade celular, mudanças na morfologia microbiana ou por acúmulo de produtos extracelulares, fatores esses que alteram as características reológicas do caldo de cultivo e, por conseguinte, a sua homogeneidade (TANG; ZHONG, 2003). Neste trabalho, foram conduzidos sete experimentos em duplicata, nos quais alternaram-se condições estáticas e sob agitação, a 120 rpm, durante dez dias. Foi escolhido esse tempo em função do estudo cinético ter demonstrado que, a partir do décimo dia, a produção de EPS tende a baixar (p. 95). Nas culturas mantidas sob agitação, o crescimento celular foi limitado e de aspecto particulado, provavelmente devido à ruptura do micélio causada pelo estresse da agitação. Porém, a agitação do caldo de cultura incrementou a produção de EPS, aumentando a viscosidade do meio. CERNING (1990) associa o incremento na produção de EPS à resposta do microrganismo ao estresse causado pela agitação.

Segundo YANG e LIAU (1998), a agitação do meio de cultivo promove a liberação do EPS recém-sintetizado e que permanece aderido à parede celular, obstruindo a liberação de novas moléculas.

Nos cultivos realizados em condições estáticas, houve maior produção de biomassa, com formação de uma grossa camada de micélio fibroso, que se acumulou na superfície do meio. Porém a síntese de EPS foi escassa. FANG e ZHONG (2002b) sugerem que a eficiente oxigenação da camada externa desse micélio fibroso pode contribuir para o seu crescimento exponencial, originando uma capa micelial que dificulta a difusão do oxigênio para o interior do meio de cultivo, prejudicando, conseqüentemente, a produção de EPS.

Nesse experimento, a produção de EPS foi diretamente proporcional ao tempo de agitação do meio de cultivo, enquanto que o crescimento micelial foi favorecido por condições estáticas. Em dez dias de fermentação sob condições estáticas se obteve

uma produção de EPS de 0,20 g/L, enquanto que, sob agitação, ao final do décimo dia, a produção de EPS foi de 0,74 g/L.

A produção máxima de biomassa foi alcançada com um dia de agitação e nove dias parados (8,11 g/L), e o mínimo de produção de biomassa ocorreu após cultivo sob agitação por dez dias (4,31 g/L).

A influência da agitação sobre o metabolismo de *G. lucidum* pôde ser observado de forma seqüencial nos experimentos intermediários conforme demonstrado na Tabela 18.

TABELA 18 – CULTIVO SUBMERSO DE *G. lucidum* CG 144 SOB CONDIÇÕES ESTÁTICAS E SOB AGITAÇÃO

Ensaio	<sup>(1)</sup> Sob agitação (dias)	Estático (dias)	Biomassa (g/L)	EPS (g/L)	<sup>(2)</sup> Glicose residual (g/L)
1	0	10	6,09	0,204	33,5
2	1	9	8,11	0,230	31,6
3	2	8	5,71	0,314	31,0
4	6	4	6,36	0,458	29,8
5	8	2	4,20	0,590	26,4
6	9	1	4,34	0,652	25,5
7	10	0	4,31	0,744	26,0

NOTAS: (1): 120 rpm; (2): glicose inicial de 35,0 g/L

Sob condições estáticas, houve menor consumo de glicose (0,20 g/L), enquanto que, na fermentação conduzida sob agitação, foi observado maior consumo de glicose (0,90 g/L). Esses resultados sugerem que, nas culturas estáticas, o açúcar foi usado de forma mais eficiente para a produção de biomassa, enquanto que, nas culturas sob agitação, o consumo de açúcar foi direcionado para a produção de EPS.

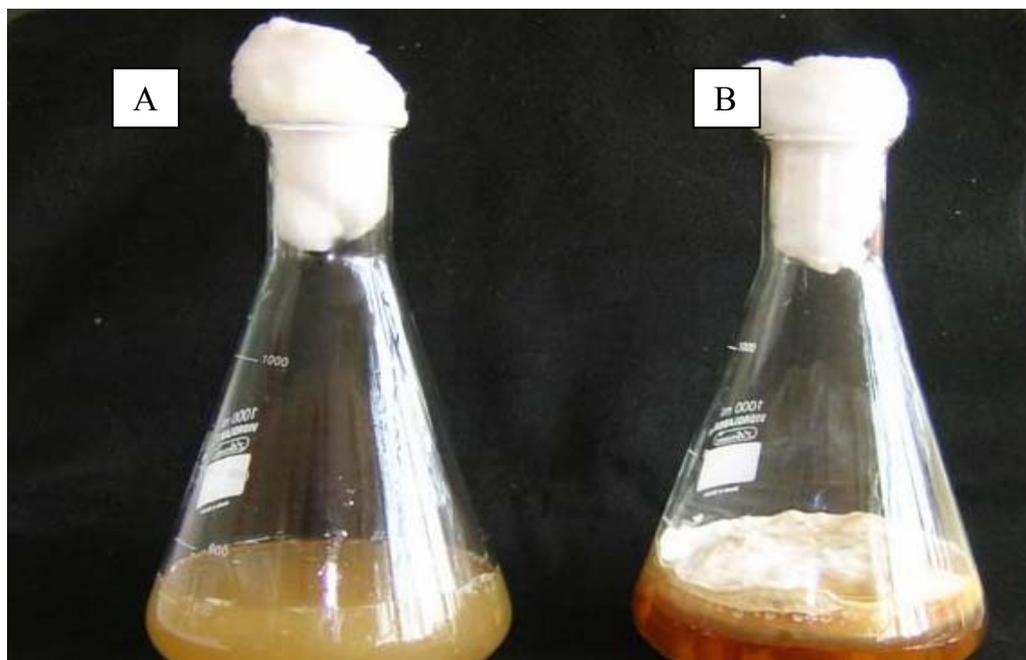
FANG e ZHONG (2002b), conduzindo um experimento para produção de ácido ganodérico, no qual se alternavam períodos estáticos e sob agitação, também relatam

baixo consumo de glicose e formação de uma grossa camada micelial nos frascos mantidos parados.

YANG e LIAU (1998), analisando diferentes velocidades de rotação, relatam um grau de agitação ótimo a 150 rpm, no qual alcançaram a produção máxima de polissacarídeo por *G. lucidum*, em cultivo submerso. Para os autores, um incremento na agitação pode ter efeito deletério sobre o crescimento celular, mas promove condições ambientais favoráveis que protegem o polissacarídeo de decomposição por acúmulo de produtos indesejáveis no meio.

No presente trabalho, a agitação do caldo de cultura afetou o crescimento de *G. lucidum* CG 144 e a biossíntese de polissacarídeos, de modo que, através do controle desse parâmetro, foi possível direcionar o metabolismo do cogumelo, em função do produto desejado. A Figura 15 mostra o crescimento micelial de *G. lucidum* CG 144 em cultivo submerso, após 10 dias de incubação a 30° C, em condições estáticas e sob agitação constante (120 rpm).

FIGURA 15 – CULTIVO SUBMERSO DE *G. lucidum* CG 144 SOB CONDIÇÕES ESTÁTICAS E SOB AGITAÇÃO



NOTAS: (A): incubação por 10 dias a 120 rpm; (b): incubação por 10 dias sob condições estáticas.

## 6.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO TRIGO FERMENTADO

Após 15 a 30 dias de incubação, *G. lucidum* CG 144 apresentou crescimento micelial abundante, cobrindo o trigo com uma grossa camada micelial de coloração branco-amarelada (Figura 16). A composição centesimal da farinha obtida a partir desse fermentado foi: umidade 8 g%, cinzas 2 g%, proteínas 15 g%, lipídeos 1,7 g% e carboidratos 73,3 g%. Esses dados encontram-se expressos na Tabela 15 do capítulo referente a Material e Métodos. Existem poucos relatos sobre a composição química de *G. lucidum*. A análise do corpo de frutificação demonstra os carboidratos como seu principal componente e conteúdo protéico em torno de 6 a 12% (MIZUNO, 2004).

FIGURA 16 – *Ganoderma lucidum* CG 144 CULTIVADO EM TRIGO



## 6.7 DOSAGEM DE ERGOSTEROL

Na Tabela 19 estão compilados os resultados da dosagem de ergosterol em diferentes etapas do desenvolvimento de *G. lucidum* por fermentação em estado sólido e em estado líquido.

TABELA 19 - DOSAGEM DE ERGOSTEROL EM *G. lucidum* CG 144 DESENVOLVIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E EM ESTADO LÍQUIDO

Tempo (h)	FES (mg/g de fermentado seco)	Fermentação submersa (mg/g micélio seco)
0	0,00027	...
6	0,00226	...
18	0,0033	...
30	0,00491	...
54	0,00494	...
78	0,02405	...
120	...	0,1874
144	0,2074	...
160	0,4862	0,8606
240	0,5567	...
288	0,5485	...
332	0,6287	1,1901

Nota: FES: fermentação em estado sólido; ...: não dosado.

A quantificação de biomassa em FES é um procedimento difícil, já que o microrganismo se desenvolve intimamente aderido ao substrato sólido, o que impede a sua separação. Um cálculo estimado de biomassa produzida pode ser feito através do balanço do consumo de O<sub>2</sub> e da liberação de CO<sub>2</sub> (PANDEY et al., 2001). Métodos indiretos que analisam componentes celulares, como proteínas, glicosaminas, ácidos nucleicos e ergosterol, também permitem avaliar o crescimento microbiano em FES (CARVALHO, 2004). O ergosterol é um componente da membrana celular de fungos [(3 β 22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol], cuja determinação quantitativa representa mais

um parâmetro útil na averiguação do crescimento fúngico (GONG, GUAN, WITTER, 2001).

A comprovação de importantes efeitos farmacológicos do ergosterol fúngico sobre o sistema imunológico, função renal e sistema cardiovascular tem incentivado pesquisadores a desenvolverem metodologias adequadas para sua extração e análise (LI; SHEN, 2003).

No presente trabalho, a extração do ergosterol do micélio desenvolvido em meio líquido não apresentou problemas, mostrando ser um método prático e fácil. Porém, em FES em grão de trigo, *G. lucidum* formou uma dura capa micelial, exigindo procedimentos mais agressivos de extração, como rompimento do micélio com auxílio de triturador elétrico e vigorosa agitação da amostra macerada e eluentes em vórtex.

Após 14 dias de fermentação ( $\pm 332$  h), obteve-se um teor de ergosterol estimado em 0,628 mg/g de fermentado seco, um resultado superior ao relatado por LI e SHEN (2003), que foi de 0,561 a 0,532 mg/g, para diferentes espécies de *G. lucidum* desenvolvidas em FES.

A dosagem de ergosterol por HPLC apresentou-se como um método viável para o acompanhamento do crescimento de *G. lucidum* em FES, sendo que valores obtidos foram usados para cálculo estimativo dos parâmetros cinéticos de crescimento.

## 6.8 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA

Nos primeiros três dias do processo fermentativo, o microrganismo passou por uma fase adaptativa, na qual houve necessidade de se aparelhar bioquimicamente para a utilização de um substrato sólido. Nas horas seguintes, o início do desenvolvimento micelial foi caracterizado pelo aparecimento de esparsos pontos brancos sobre o substrato e incremento no consumo de  $O_2$ .

Entre o 4º e 5º dia de incubação (110 h a 121 h) ocorreu liberação máxima de  $CO_2$  (0,85 mmol h<sup>-1</sup>), aumento no consumo de  $O_2$  (1,031 mmol h<sup>-1</sup>) e o QR atingiu o pico máximo de 0,82. Nas próximas horas, o metabolismo respiratório do fungo sofreu pequenas oscilações e um micélio branco, de aspecto algodinoso, cobriu o substrato.

A seguir, esses parâmetros começaram a declinar, evidenciando desaceleração do crescimento.

Entre o período de 285 h a 307 h, o consumo de  $O_2$  voltou a subir, atingindo patamares acima de  $2\text{mmol h}^{-1}$ , enquanto que a liberação de  $CO_2$  apresentou um ligeiro incremento, e o QR declinou. Nesta fase, foi observado o desenvolvimento de uma grossa capa micelial de consistência dura e cor amarelada, sugerindo a produção de outros metabólitos secundários. Este padrão respiratório foi mantido até o final dos 14 dias de experimento (Figura 17).

Durante a fase de adaptação do fungo, o QR foi aumentando gradativamente até atingir seu pico em 117 h de fermentação (0,82). A partir desse estágio, foi diminuindo e permaneceu em baixos patamares até o final do processo. Durante todo o processo fermentativo foi registrado um QR médio de 0,56 (Figura 18).

FIGURA 17 - ESTIMATIVA DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (TCO) E PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO POR *G. lucidum* CG 144 CULTIVADO POR FES

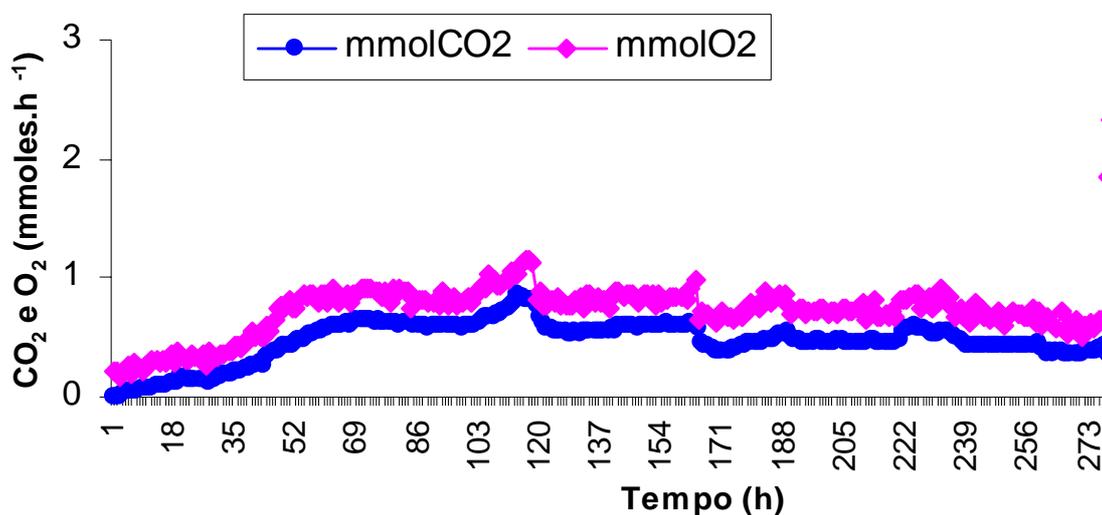
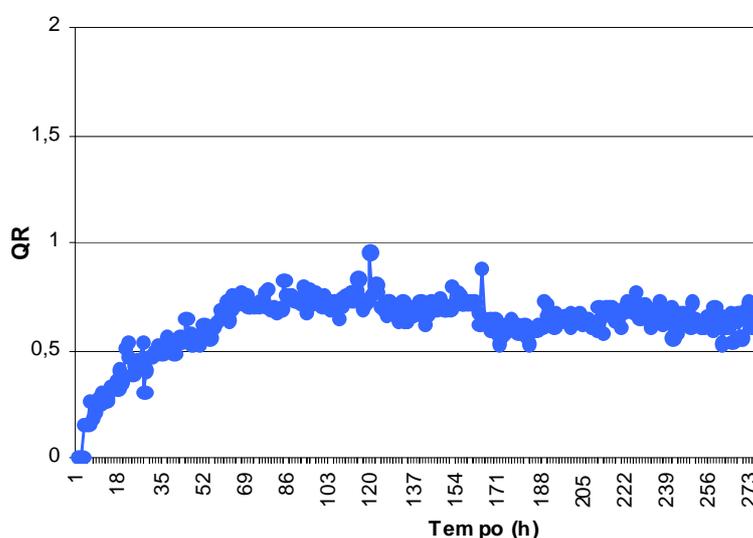


FIGURA 18 - COEFICIENTE DE RESPIRAÇÃO (QR) DE *G. lucidum* CG 144 CULTIVADO POR FES



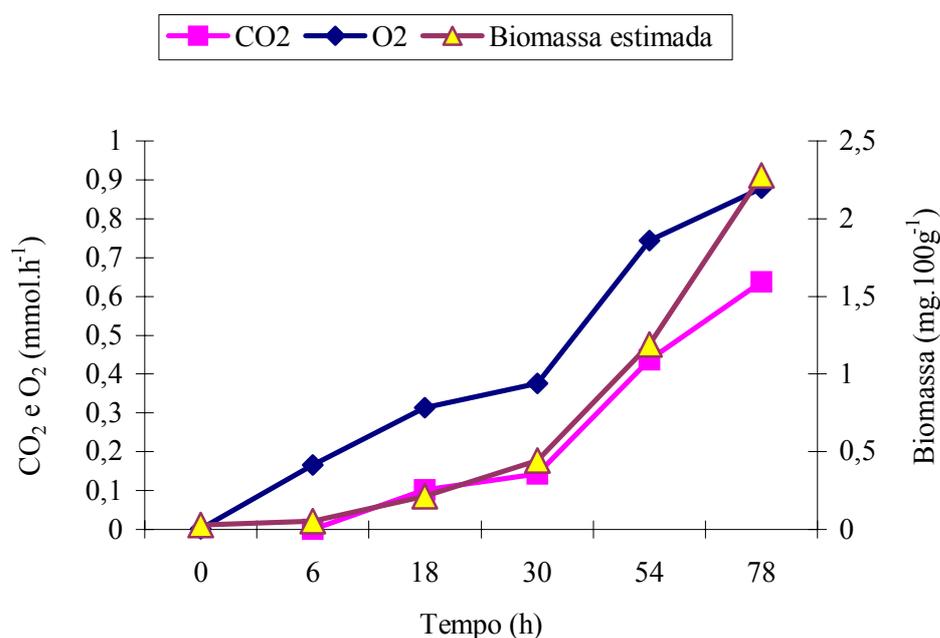
O cálculo dos parâmetros cinéticos realizado pelo programa Fersol correlaciona tempo, biomassa determinada analiticamente e consumo de O<sub>2</sub>. Empregando esse programa, os seguintes resultados foram verificados:  $Y_{x/O_2} = 1,740$ g de biomassa/mol O<sub>2</sub> consumido (rendimento) e valores de coeficiente de manutenção ( $m_x$ ) não detectáveis. Durante a fase exponencial de crescimento, a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi de  $0,049h^{-1}$  e a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}xima}$ ) foi de  $0,06h^{-1}$ , em 12 horas de incubação. O coeficiente de regressão ( $R^2$ ) = 0,972 sugere uma proporcionalidade muito boa entre esses fatores. Na Tabela 20 observa-se a correlação entre os valores de biomassa obtidos analiticamente e pelo programa Fersol.

TABELA 20 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR *G. lucidum* CG 144 DESENVOLVIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM TRIGO

Tempo (h)	Biomassa medida (Ergosterol) (mg 100g <sup>-1</sup> )	Biomassa estimada (Fersol) (mg 100g <sup>-1</sup> )
0	0,027	0,027
6	0,0026	0,054
18	0,330	0,0214
30	0,491	0,444
54	0,494	1,19
78	2,4	2,27

Na fase exponencial de crescimento, a liberação de CO<sub>2</sub> e o consumo de O<sub>2</sub> acompanharam a produção de biomassa (Gráfico 6).

GRÁFICO 6 - EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *G. lucidum* CG 144 CULTIVADO POR FES EM TRIGO



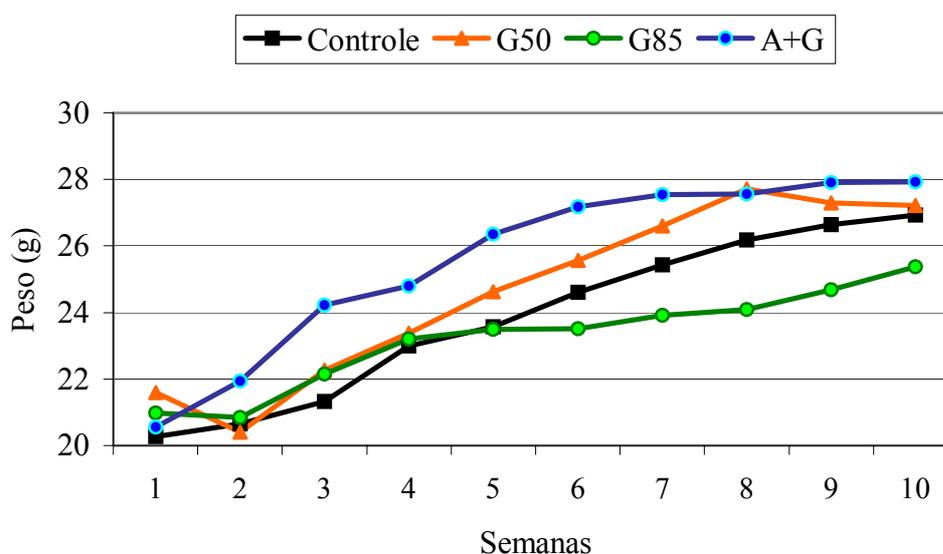
#### 6.9 RESPOSTA ORGÂNICA AO CONSUMO CRÔNICO DE RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3

Os resultados apresentados pelos animais alimentados com as rações compostas só por *G. lucidum* serão apresentados e discutidos amplamente. Em relação ao emprego da ração contendo *G. lucidum* e *A. brasiliensis* (A+G), serão relatados apenas os resultados relativos ao aspecto antitumoral, imunomodulador e hipolipidêmico, já que esse assunto é matéria de outro trabalho.

### 6.9.1 Peso Corporal e Ingestão de Ração

Ao final do experimento, o peso corporal dos camundongos foi de 27,6 g, ( $\pm 1,56$ ) sem diferença significativa entre os grupos, porém no grupo G85 foi constatada uma tendência para valores mais baixos (Gráfico 7). O consumo diário de ração foi de aproximadamente 5 g/camundongo, o que correspondeu à ingestão de 4,25g, 2,5g e 0,5g de produto fermentado/dia nos grupos G85, G50 e G10, respectivamente.

GRÁFICO 7 – PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES CONTENDO *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3



Nota: n = 80.

### 6.9.2 Análises Coprológicas

Não foi detectada a presença de sangue oculto nas fezes dos animais sob experimentação. Essa análise teve por objetivo averiguar possíveis efeitos colaterais de *G. lucidum* sobre o trato gastrointestinal e coagulação sanguínea, já que existem relatos da sua ação inibidora da agregação plaquetária (SU; SHIAO; WANG, 2000).

Com o intuito de se analisar aspectos da atividade hipolipidêmica de *G. lucidum*, foi pesquisada a presença de gorduras nas fezes dos camundongos, cujo resultado foi negativo. Em condições normais, os lipídeos podem aparecer nas fezes, oriundos da excreção biliar ou devido a insuficiente absorção quantitativa de uma dieta rica em gorduras.

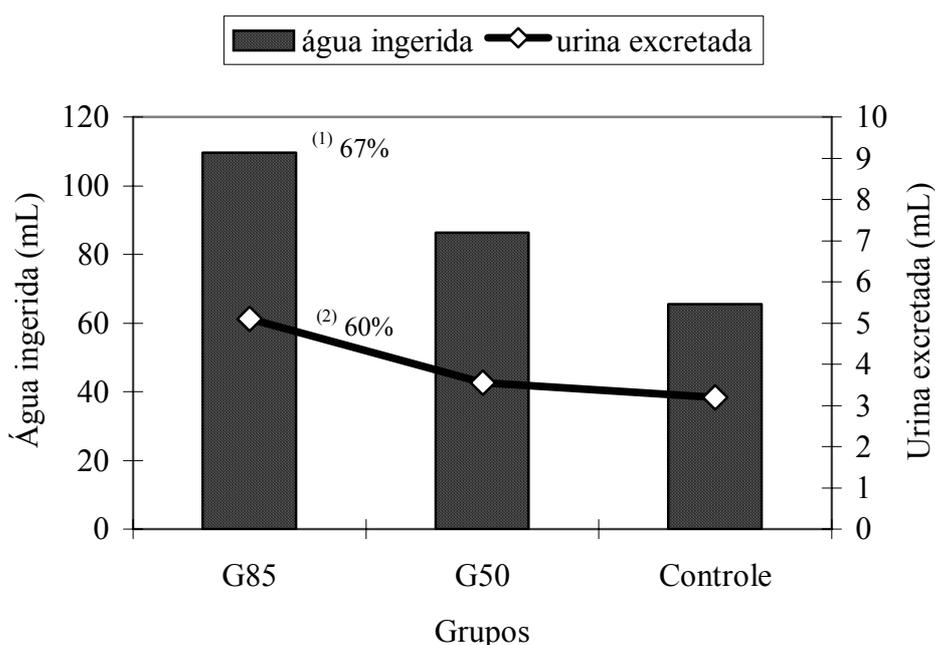
Alimentos com alto conteúdo em fibras interferem na absorção de gorduras e também podem desencadear a sua eliminação nas fezes (GADES e STERN, 2003). Já a esteatorréia é consequência da excreção excessiva de lipídeos nas fezes, a qual pode ocorrer por falha na absorção intestinal, deficiência de suco pancreático ou insuficiência biliar. *G. lucidum* possui em sua composição 10 a 50% de fibras dietéticas compostas por  $\beta$ -glucanas, substâncias quitinosas, heteropolissacarídeos, pectinas, hemicelulase, entre outras (MIZUNO, 2004). Espera-se que essa grande quantidade de fibras interfira na absorção intestinal acelerando a excreção de componentes da dieta e, principalmente, de gorduras.

### 6.9.3 Função Renal

O consumo da ração suplementada com *G. lucidum* desencadeou aumento na ingestão e excreção de líquidos nos camundongos. O grupo de animais alimentados com G85 apresentou um aumento de 67% no volume de água ingerida e excretou 60% a mais de urina em relação ao grupo controle. A ingestão da ração G50 levou a um aumento de 32% na ingestão de água, mas não influenciou a excreção urinária (Gráfico 8). Porém, a ração A+G não produziu alterações. O volume de urina excretada varia em função da dieta e especialmente com a quantidade de líquido ingerido, sendo que patologias como diabetes mellitus ou diabetes insipidus podem aumentar a eliminação de urina (poliúria). Os rins são capazes de diluir ou concentrar a urina, dependendo da ingestão de líquidos, sendo que a densidade varia de 1.001 a 1.030. Porém, em estados patológicos, a densidade tende a permanecer invariável em 1.010 (isostenúria), independente da quantidade de líquido ingerido (STRASINGER, 2000).

A análise parcial das características físico-químicas da urina dos camundongos não revelou alterações significativas. Durante o período de amostragem, os animais foram mantidos em jejum, ingerindo apenas água, fato que levou ao aparecimento de corpos cetônicos na urina, devido à completa oxidação das gorduras (BURTIS; ASHWOOD, 1998). Sob condições normais, o processo de filtração glomerular e reabsorção tubular não permitem a liberação de proteínas e glicose para a urina, exceto em quantidades insignificantes (BRENNER; LEVINE, 2004). Bilirrubinas e urobilinogênio são provenientes do metabolismo hepático da hemoglobina, sendo eliminados pela urina quando há hemólise ou em hepatopatias (STRASINGER, 2000).

GRÁFICO 8 - EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. Lucidum* CG 144 SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E O FLUXO URINÁRIO EM CAMUNDONGOS



NOTAS: (1) e (2) diferença de volume da água ingerida e fluxo urinário, respectivamente, em comparação com o grupo controle; n=60.

A urina normal pode conter pequenas quantidades de células epiteliais, raros leucócitos e eritrócitos. Altas contagens celulares são encontradas em danos renais e cistites (STRASINGER, 2000). Cilindros urinários geralmente são estruturas de natureza protéica produzidos nos túbulos renais e, dependendo da sua constituição e

calibre, revelam a condição anatômica e função do nefro (BIRCH et al., 2001). As amostras de urina analisadas continham poucas células e escassos cilindros hialinos, os quais, em pequenas quantidades, não estão relacionados a nenhuma patologia. O longo período de coleta de amostra levou à precipitação de cristais de fosfato, provenientes da dieta, mas sem significado clínico (Tabela 21).

TABELA 21 – EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA URINA DE CAMUNDONGOS

	GRUPOS		
	G85	G50	Controle
Cor	Amarelo-citrino	Amarelo-citrino	Amarelo-citrino
Aspecto	Límpida	Límpida	Límpida
Volume (mL)	5,1	2,55	3,2
Densidade	1.015	1.025	1.020
pH	6,5	6	6
Glicose (mg/dL)	Ausente	Ausente	Ausente
Proteína (mg/dL)	Traços	Ausente	Ausente
Urobilinogênio	Ausente	Ausente	Ausente
Pigmentos biliares	Ausente	Ausente	Ausente
Bilirrubina (mg/dL)	Ausente	Ausente	Ausente
Corpos cetônicos (mg/dL)	50	150	15
Eritrócitos (/mL)	3000	<1000	<1000
Leucócitos (/mL)	<1000	<1000	1000
Cilindros	Hialinos (escassos)	Ausente	Ausente
Cristais	Fosfato triplo Fosfato amorfo	Fosfato triplo	Fosfato triplo Fosfato amorfo

NOTA: n = 60.

As concentrações plasmáticas de ácido úrico, uréia e creatinina, não apresentaram diferenças significantes entre os camundongos (Tabela 22). A uréia é um dos principais produtos do metabolismo protéico, enquanto que a creatinina é derivada da fosfocreatina muscular, sendo a excreção desses metabólitos um processo vital para manutenção da homeostase (BURTIS; ASHWOOD, 1998). A creatinina é uma substância filtrada pelo glomérulo, mas que não é reabsorvida pelos túbulos renais. O processo de secreção tubular da creatinina é insignificante, de modo que a quantidade excretada de creatinina representa sua quantidade real filtrada. Dessa forma, a capacidade renal de filtrar esse metabólito representa um importante parâmetro para avaliação da função glomerular. Aumento nos níveis séricos de creatinina pode indicar

dano glomerular (BRENNER; LEVINE, 2004). Considerando todos esses aspectos, o consumo crônico de *G. lucidum* CG 144 não causou dano renal aparente. SHEENA, AJITH e JANARDHANAN (2003) relatam que camundongos submetidos à quimioterapia por cisplatina e tratados com extratos metanólicos de *G. lucidum* apresentaram menos nefrotoxicidade em relação ao grupo controle, devido à capacidade desse extrato em restaurar as defesas antioxidantes ao nível renal.

TABELA 22 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE, PROTEÍNAS E COMPOSTOS NITROGENADOS EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* GG 144 CULTIVADO EM TRIGO

Parâmetros (mg/dL)	Grupo G85	Grupo G50	Controle
Glicose	218,5 (± 9,19)	229,0 (± 21,21)	238,0 (± 1,41)
Proteínas totais	5,45 (± 0,35)	5,75 (± 0,21)	5,5 (± 0,36)
Albumina	2,5 (± 0,42)	2,6 (± 0,0)	2,3 (± 0,36)
Globulina	2,95 (± 0,07)	3,15 (± 0,021)	3,2 (± 0,21)
Creatinina	0,45 (± 0,07)	0,4 (± 0,0)	0,47 (± 0,95)
Uréia	30,5 (± 0,71)	40 (± 1,41)	38,5 (± 11,62)
Ácido úrico	2,35 (± 0,07)	2,3 (± 1,13)	2,75 (± 0,38)

NOTA: os valores representam a média e ± SD; n = 8.

O sistema de controle da pressão sanguínea, através da interação entre “rins e líquidos corpóreos”, consiste em um mecanismo extremamente sensível, sendo que a mínima variação na pressão de um indivíduo desencadeia o processo regulatório, levando a um incremento na excreção urinária de sais e água. Além de sua capacidade de alterar o volume de líquido excretado, os rins também têm outro importante mecanismo de controle representado pelo sistema renina-angiotensina (LAMEIRE et al., 2005). *G. lucidum* tem demonstrado possuir tanto componentes hipotensivos quanto hipertensivos, de forma que pode promover o equilíbrio da pressão sanguínea. Tem sido relatado em *G. lucidum* um peptidioglicana com moderado efeito hipotensivo sobre ratos Wistar. Estudos clínicos comprovam a diminuição da pressão sanguínea em 50% de pacientes portadores de hipertensão essencial tratados com extrato de *G. lucidum*. Os ácidos ganodéricos são capazes de inibir a ativação da

angiotensina-I em angiotensina-II, a qual está relacionada com a hipertensão (MIZUNO, 2004). No presente trabalho, o aumento no fluxo urinário observado no grupo G85 sugere um possível efeito diurético, o qual pode estar relacionado com o efeito hipotensor de *G. lucidum*. Porém, estudos futuros serão necessários para esclarecer esses resultados.

#### 6.9.4 Ação sobre as Concentrações Plasmáticas de Glicose

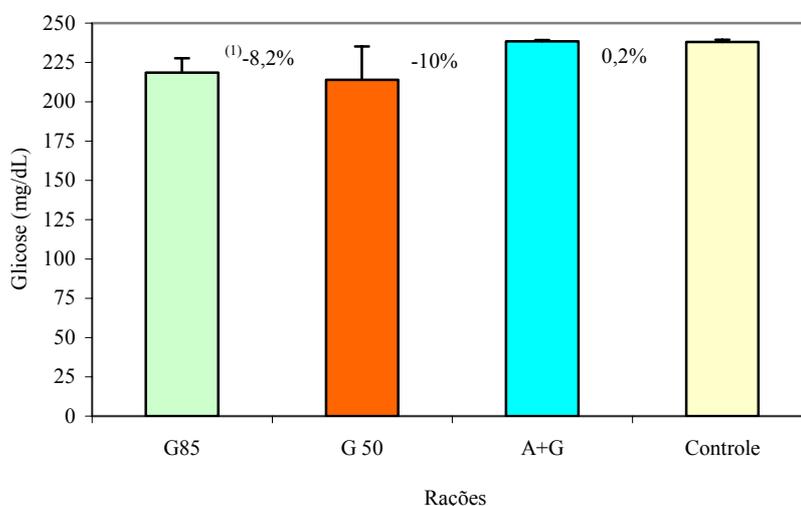
Houve redução nas concentrações plasmáticas de glicose nos grupos G85 e G50, porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 22, Gráfico 9). A ração G10-I não provocou nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de glicose. TOMODA et al. (1986) relatam atividade hipoglicêmica de peptidioglicanas e ganoderans B e C de *G. lucidum* em camundongos normais e com hiperglicemia induzida.

GAO et al. (2004) constataram atividade hipoglicêmica do produto Ganopoly® (fração polissacarídica extraída de *G. lucidum* por técnica patenteada) em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo II.

ZHANG e LIN (2004) reportam polissacarídeos de *G. lucidum* exercendo efeito hipoglicemiante em camundongos normais, através de um mecanismo que estimula a liberação de insulina, incrementando o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  nas células  $\beta$  pancreáticas.

Para se avaliar a real capacidade hipoglicêmica da ração fermentada com *G. lucidum* serão necessários estudos mais aprofundados, através de modelos animais com hiperglicemia induzida.

GRÁFICO 9 – GLICEMIA EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3

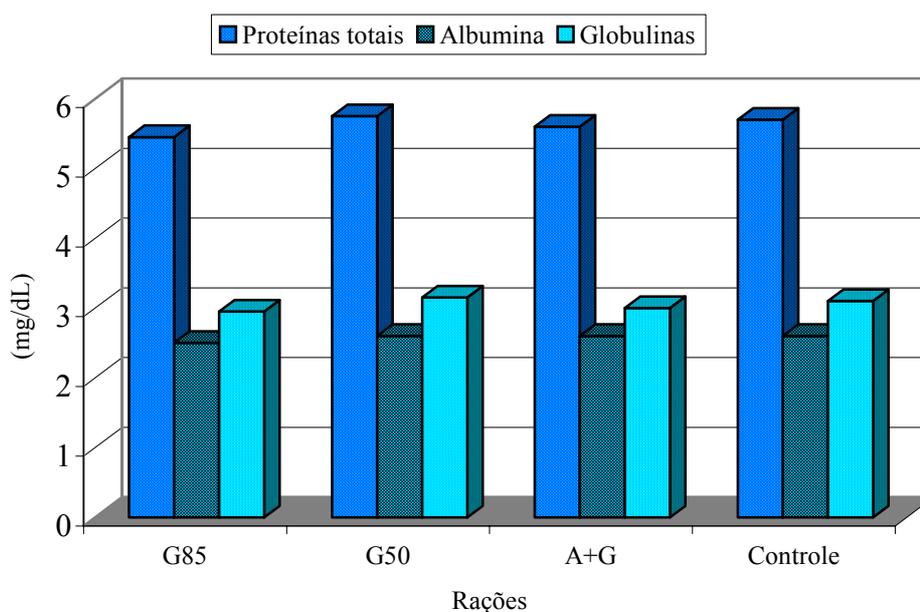


NOTAS: (1): Diferença percentual em relação ao controle, n = 8.

#### 6.9.5 Ação sobre as Concentrações Plasmáticas de Proteínas

A ração formulada à base de trigo fermentado com cogumelos *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 não alterou as concentrações plasmáticas de proteínas totais e frações em relação ao grupo controle (Tabela 22, Gráfico 10). Esse resultado indica que a dieta proposta não levou a nenhuma carência protéica que pudesse comprometer a higidez orgânica dos animais.

GRÁFICO 10 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES CONTENDO *G. lucidum* CG144 e *A. brasiliensis* LPB 3



NOTA: n = 8.

## 6.10 EFEITO SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO

O consumo prolongado da ração fermentada com *G. lucidum* CG 144 afetou de forma marcante o metabolismo lipídico dos animais (Tabela 23). O grupo alimentado com ração A+G foi analisado somente em função das concentrações de colesterol total e frações.

TABELA 23 – EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS

(mg/dL)	TIPOS DE RAÇÕES			
	G85	G50	A+G	Controle
Lipídeos totais	434,25 (± 4,2)**	413,25 (± 26,5)**	...	480,00 (± 30,2)
Colesterol	60,5 (± 8,2)	52,25 (± 7,3)*	64,75 (± 2,0)	63,00 (± 2,4)
HDL-colesterol	41,37 (± 15,2)**	52,13 (± 6,8)**	52,51 (± 2,2)**	22,94 (± 3,25)
Triacilgliceróis	89,75 (± 11,4)**	77,00 (± 19,2)**	...	133 (± 28,5)
VLDL	18 (± 2,83)*	16,5 (± 4,94)*	...	26,5 (± 6,36)

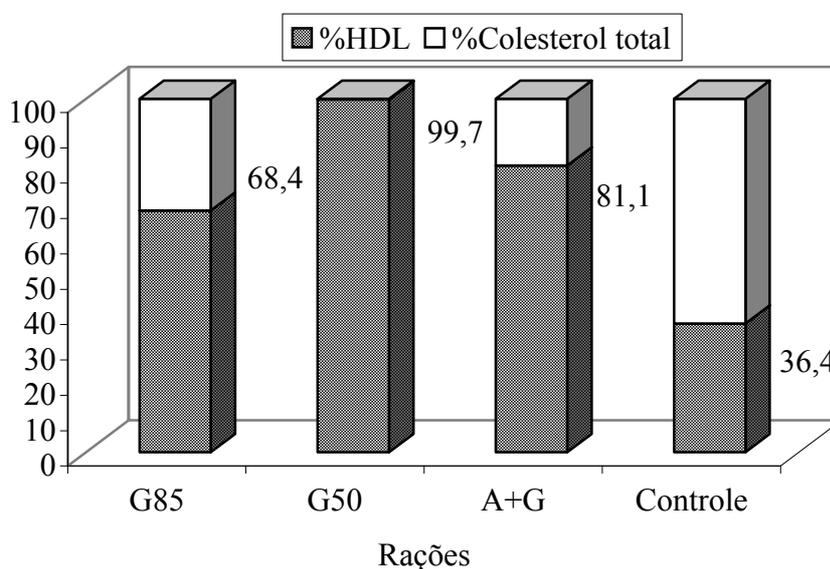
NOTAS: HDL: lipoproteína de alta densidade; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$  (diferença estatística em relação ao controle); os valores representam a média e  $\pm$  SD,  $n = 8$ .

Os grupos G85 e G50 apresentaram queda de 9,5% e 14%, respectivamente, nas concentrações de lipídeos totais, em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,01$ ). Os grupos G85 e G50 apresentaram queda de 9,5% e 14%, respectivamente, nas concentrações de lipídeos totais, em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,01$ ). As concentrações plasmáticas de colesterol decresceram apenas 4% no grupo G85 ( $p > 0,05$ ), enquanto que no grupo G50 foi constatada uma redução significativa de 17% ( $p \leq 0,05$ ). A ração A+G não apresentou efeito hipocolesterolêmico, porém aumentou a concentração da fração HDL em 128,8%.

A fração VLDL é a principal transportadora de triacilgliceróis endógenos. As concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e de VLDL diminuíram 32% no grupo G85.

No grupo G50, os triacilgliceróis diminuíram 42% e a fração VLDL 37,7% ( $p \leq 0,01$ ), enquanto que a fração LDL não apresentou concentrações detectáveis pela metodologia empregada. A fração HDL-colesterol aumentou 80,3% no grupo G85 e 127,2% no grupo G50, constituindo a maior parte do colesterol circulante (Gráfico 11).

GRÁFICO 11 – PERCENTUAL DE HDL-COLESTEROL EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES CONTENDO *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3



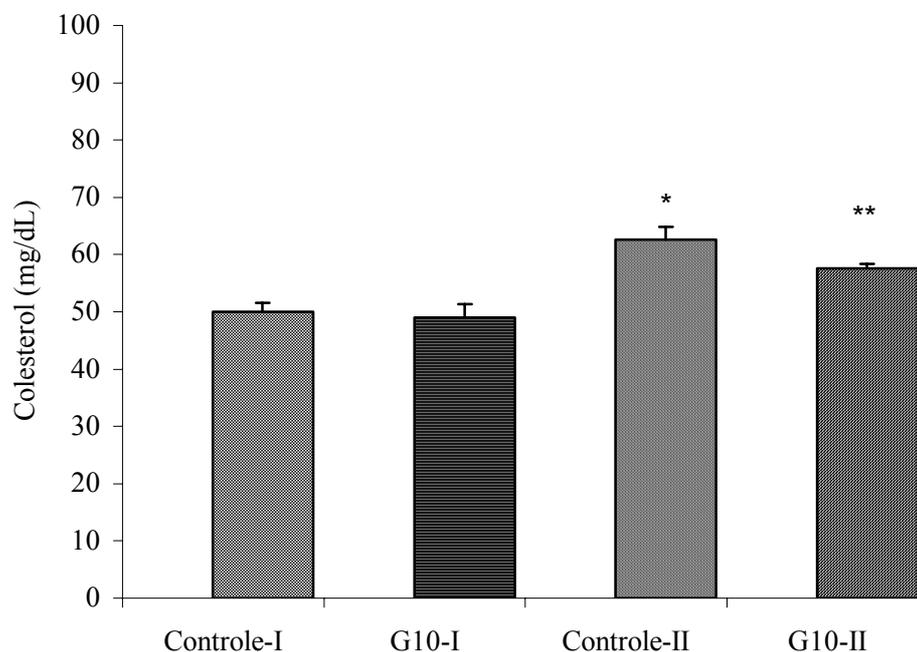
NOTAS: HDL: lipoproteína de alta densidade; os valores representam o percentual em relação aos valores de colesterol total, n = 8.

A ração G10 não provocou nenhuma alteração nas concentrações de lipídeos nos camundongos normais. Porém, no grupo de animais hipercolesterolêmicos (G10-II), ocorreu significativa diminuição de 8% nas concentrações de colesterol em relação ao controle hipercolesterolêmico ( $p \leq 0,01$ ) (Gráfico 12).

Embora na medicina popular seja bem conhecida a ação hipocolesterolêmica de *G. lucidum*, a maioria das pesquisas se ocupa em comprovar a sua eficácia antitumoral.

Até o momento são poucos os relatos sobre a ação hipolipidêmica desse cogumelo, o que dificulta a confrontação de diferentes resultados, visando uma melhor compreensão do fenômeno.

GRÁFICO 12- EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE COLESTEROL EM CAMUNDONGOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA INDUZIDA



Notas: Controle-I: ração sem cogumelo e sem gordura; controle-II: ração com gordura (5%) e sem cogumelo; G10: ração com cogumelo; G10-II: ração com cogumelo e com gordura (5%). \* $p \leq 0,05$  vs. Controle-I, \*\* $p \leq 0,01$  vs Controle-II ( $n = 6$ ).

Enfermidades da artéria coronária constituem uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos, as quais geralmente estão relacionadas a síndromes metabólicas, como hipercolesterolemia, dislipoproteinemia, hipertensão, diabetes e distúrbios circulatórios (GOLDSTEIN; KITA; BROWN, 1983). Os valores de colesterol total e do colesterol contido nas LDL representam um forte valor prognóstico na doença arteriosclerótica, (SILVA, 1999).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma redução de cerca de 10% nos níveis plasmáticos de colesterol, em homens de até 40 anos, está associada com um decréscimo de 54% na incidência de doença cardíaca (LAW, WALD, THOMPSON, 1994).

O passo inicial para abaixar os níveis plasmáticos de lipídeos depende de uma dieta pobre em gorduras - especialmente as saturadas - e rica em fibras. Porém, hiperlipidemias refratárias a um controle dietético, ou oriundas de carga genética, necessitam de uma intervenção terapêutica.

Especial atenção merecem as hiperlipidemias típicas de pacientes diabéticos, nos quais a deficiência de insulina acelera a lipólise, resultando em grave hipertriacilgliceridemia e anormalidades no metabolismo das lipoproteínas (O'BRIEN et al., 1996; BARKIA et al., 1996; DUVILLARD et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001). Apesar da possibilidade de efeitos colaterais, a associação de estatinas e fibratos tem se mostrado útil no controle de dislipidêmias em diabéticos (McEVOY, 2002). O tratamento com estatina corrige os níveis de LDL-colesterol, mas pode também diminuir os níveis de HDL-colesterol. Por outro lado, o tratamento com o fibrato corrige os níveis de HDL-colesterol e triacilgliceróis, mas pode ser ineficaz para abaixar os níveis de LDL-colesterol. Portanto, muitas vezes é inevitável a prescrição concomitante das duas drogas (BARTER, 2001).

O papel da hipertriacilgliceridemia como fator de risco independente para a arteriosclerose coronariana não foi ainda estabelecido, embora vários estudos epidemiológicos tenham revelado alguma correlação (CARLSON; BOTTIGER, 1981). Esses dados sugerem que a exclusão de VLDL das paredes arteriais pode resultar em proteção contra arteriosclerose (MINNICH; ZILVERSMIT, 1989).

Alguns Basidiomicetos são indicados pela medicina oriental no tratamento de hiperlipidemias, entre eles destacam-se: *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* (KABIR; YAMAGUCHI; KIMURA, 1987), *G. lucidum* (KABIR; KIMURA; TAMURA, 1988; BERGER et al., 2004), *Pleurotus ostreatus* (CIMERMAN e CIMERMAN, 1995), *Auricularia auricula*, *Tremella fuciformis* (CHEUNG, 1996a) e *Volvariella volvacea* (CHEUNG, 1996b).

Os resultados obtidos neste experimento indicam o potencial emprego de *G. lucidum* como agente preventivo de hiperlipidemia de origem dietética. Ambas as rações, G85 e G50, resultaram em decréscimo nos níveis plasmáticos de lipídeos, sendo que G50, a menor dosagem, foi mais eficaz.

Os componentes de *G. lucidum* que diminuem os níveis de colesterol não são totalmente conhecidos, mas credita-se esse efeito à presença de glucanas tipo ganoderans (BAO, 2001a; MIZUNO, 2004), hetero- $\beta$ -glucanas, complexos glucana-proteínas (xiloglucana, ácido urônico- $\beta$ -glucanas), outras fibras, lectinas, lactonas

(WASSER; WEIS, 1999), ergosterol (MIZUSHINA et al., 1998), triterpenos tipo lanostenóides como o ácido ganodérico e triterpenos altamente oxigenados (MIN et al., 1998; KIM et al., 1999; PATOCKA, 1999; HA et al., 2000; GINER-LARZA et al., 2000; GAO, 2002a; LUO; ZHAO; LI, 2002).

Estudos prévios têm relacionado o efeito hipocolesterolêmico de *G. lucidum* com a inibição da síntese do colesterol e/ou aceleração do seu metabolismo. KABIR, KIMURA e TAMURA (1988) demonstraram ação hipocolesterolêmica, porém sem afetar as taxas de triacilgliceróis, de caldo de cultivo micelial de *G. lucidum* em ratos hipertensivos. É possível que a síntese do colesterol possa ser afetada por *G. lucidum* através do mecanismo de inibição da HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão do HMG-CoA em mevalonato, ou impedindo a ação da P-450 demetilase (P-45014DM), que atua na conversão do lanosterol a colesterol (SILVA, 1999; NESS; GERTZ; HOLLAND, 2001).

No gênero *Pleurotus*, CIMERMAN e CIMERMAN (1995) demonstraram a existência de lovastatina, o medicamento aprovado em 1987 pelo FDA (Food and Drug Administration - USA) como inibidora da HMG-CoA redutase. Coincidentemente, a literatura tem relatado efeito hipocolesterolêmico de *G. lucidum* similar ao de alguns fármacos hipolipidêmicos convencionais, como as estatinas e as resinas seqüestradoras de ácidos biliares (KABIR; KIMURA; TAMURA, 1988).

BERGER et al. (2004) reportam uma pesquisa na qual hamsters alimentados com ração suplementada com lanosteróides, extraídos de *G. lucidum*, apresentaram diminuição nos níveis de colesterol, triacilgliceróis e nas frações VLDL e HDL. Os autores sugerem que o mecanismo possa ter sido desencadeado via inibição da P-45014DM. Porém, analisando extratos alcoólicos do corpo de frutificação de *G. lucidum*, não encontraram estatinas.

O elevado conteúdo de fibras não digeríveis, como as  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3), é outro fator a ser considerado para entender o efeito hipolipidêmico de alguns cogumelos (CHEUNG, 1996a; CHEUNG, 1996b). As fibras dietéticas podem atuar seqüestrando os ácidos biliares, acelerando a degradação do colesterol e reduzindo a sua reabsorção, via circulação entero-hepática (BOBEK; OZDIN; KUNIAK, 1997).

A atividade antioxidante de *G. lucidum* também pode contribuir para seu efeito antiaterogênico neutralizando os radicais livres provenientes da peroxidação lipídica, conforme já foi relatado para *P. ostreatus* (BOBEK; OZDIN; GALBAY, 1998).

O mecanismo exato da ação hipolipidêmica de *G. lucidum* ainda permanece obscuro, mas é provável que isso resulte de um efeito sinérgico entre os seus múltiplos componentes, os quais podem atuar sobre diversas fases do metabolismo lipídico. Neste estudo, o consumo regular de *G. lucidum*, como suplemento alimentar, promoveu uma redistribuição dos lipídeos plasmáticos dentro de um padrão desejável para a prevenção de doença arteriosclerótica.

A tendência observada no sentido de diminuir os níveis de glicemia aponta para a necessidade de futuras pesquisas visando o potencial emprego de *G. lucidum* na prevenção e tratamento de hiperlipidemias em pacientes diabéticos.

#### 6.11 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Após 30 dias do implante do sarcoma 180, foi constatado o desenvolvimento de tumor de cor esbranquiçada na região axilar dos camundongos (Figura 19). As rações G85, G50 e A+G conseguiram inibir o crescimento da massa tumoral em 14%, 89% e 81%, respectivamente (Tabela 24). O desenvolvimento máximo de massa tumoral foi observado no grupo controle (alimentado com ração comum), com um volume médio de 4,662 cm<sup>3</sup> (Figura 20).

TABELA 24 - AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DE SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS

GRUPOS	VOLUME MÉDIO DO TUMOR (cm <sup>3</sup> )	INIBIÇÃO (%)
G85-S	4,011	14
G50-S	0,507	89
A+G-S	0,888	81
Controle-S	4,662	

Nota: n = 26

FIGURA 19 – SARCOMA 180 APÓS 30 DIAS DE INOCULAÇÃO

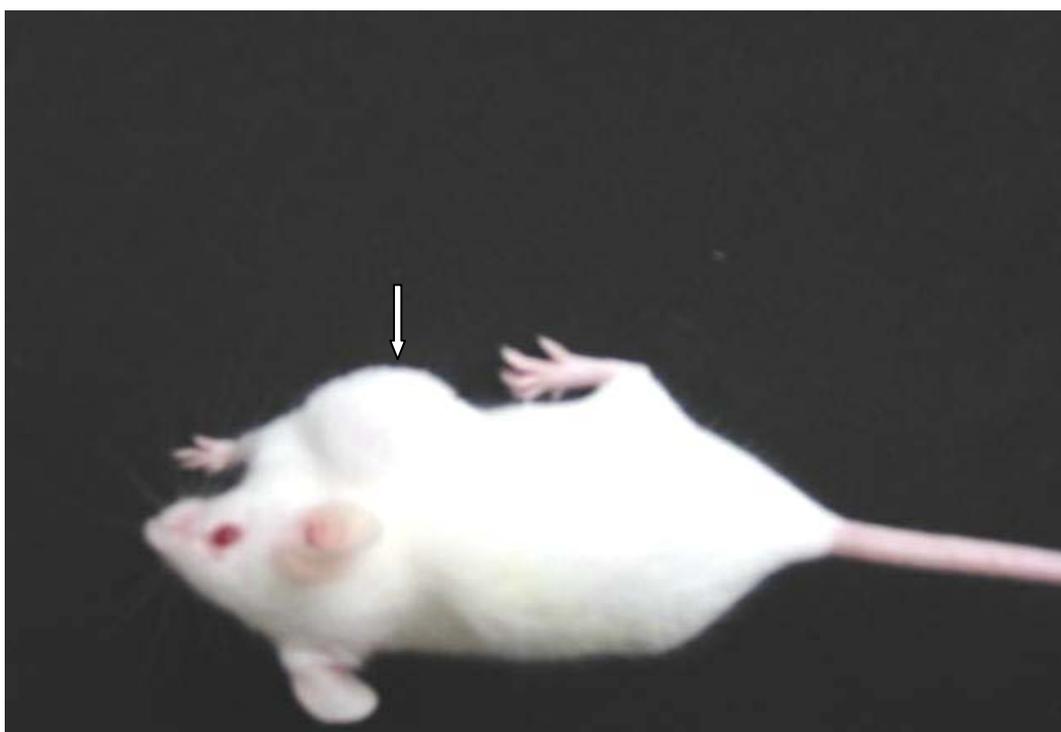


FIGURA 20 – MASSA TUMORAL DE SARCOMA 180 RETIRADA DE CAMUNDONGO DO GRUPO CONTROLE



## 6.12 EFEITO DAS RAÇÕES SUPLEMENTADAS SOBRE DIFERENTES POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS

### 6.12.1 Camundongos Normais

- a) baço: no grupo G50 houve as seguintes alterações: aumento de CD19+ (134%) e de CD16/CD32+ (24,30%); diminuição de CD4+ (15%). No grupo G85 também foi verificado aumento de CD19+ (56%). No grupo A+G houve aumento de CD3+ (32,4%) e de CD8+ (34,6%) (Tabela 25, Figuras 21e 22).
- b) linfonodos: a única alteração verificada foi a diminuição de CD4+ no grupo G50 (Tabela 25, Figuras 21 e 22).

### 6.12.2 Camundongos Inoculados com Sarcoma 180

a) baço: comparando com o controle-S, houve aumento nos níveis de CD3+, CD4+ e CD8+ com as rações A+G-S (112,4%, 68,7% e 49%, respectivamente); G50-S (86%, 56,4% e 41,2%, respectivamente) e G85-S (49,3%, 38%, e 30,5%, respectivamente). Nos grupos G50-S e A+G-S foram detectadas concentrações significativas de células CD25/CD4+ e CD25/CD8+ ( $p \leq 0,05$ ).

Comparando os grupos G50 e G50-S, observa-se que, na presença do tumor, houve um aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) de células esplênicas CD3+ (58,8%), CD4+ (40,4%) e CD8+ (56,7%), com diminuição de células CD19+ (-44,6%). O grupo A+G-S (com sarcoma) apresentou elevação significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas nos valores de CD3+ (22,7%) em relação ao grupo A+G. Ao contrário, o grupo controle-S (com sarcoma 180) apresentou diminuição das células T esplênicas e aumento nas células CD19+ (32,6%) em relação ao controle sem sarcoma (Tabela 26, Figuras 21 e 22).

b) linfonodos: no grupo G50-S houve aumento nos níveis de CD3+ (19,3%), CD4+ (46,7%) e CD8+ (48%). No grupo A+G-S houve aumento de CD3+ (20,6%) e CD4+ (50,6%). No grupo G85-S houve aumento apenas de CD4+ (20%).

Nos linfonodos, a presença do tumor também culminou com aumento de células T. Comparando com G50, o grupo G50-S apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de CD4+ (20%) e concomitante diminuição das concentrações de CD19+ (-73,3%) ( $p \leq 0,01$ ). Os animais do grupo A+G-S apresentaram a mesma tendência, porém de forma menos acentuada. Em relação ao grupo controle sem sarcoma, no grupo controle-S observou-se significativa diminuição ( $p \leq 0,01$ ) de CD3+ (-15,7%) e CD4+ (-29,5%), enquanto que CD19+ aumentou 122,3% (Tabela 26, Figuras 21 e 22).

TABELA 25 – EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS E GÂNGLIONARES EM CAMUNDONGOS NORMAIS

Células Células(%)	Baço			
	Controle	G85	G50	A+G
CD3+	41 (±4,17)	41,9 (±3,74)	36,7 (±2,0)	54,30 (±2,88)* (↑32,4%)
CD4+	32 (±1,45)	34,2 (±3,4)	27,3 (0,76) (↓15%)	34,60 (±2,74)
CD8+	14,1 (±0,34)	14,2 (±0,97)	11,8 (±2,2)	18,90 (±1,05)** (↑34,6%)
CD4/CD8	2,26	2,40	2,31	1,83
CD19+	19,6 (±1,45)	30,56 (±4,3)** (↑56%)	46,0 (±2,0)** (↑134%)	21,40 (±3,19)
CD16/CD32+	46,35 (±1,54)	47,2 (±1,45)	57,6(± 3,8)** (↑24,3%)	37,03 (±2,16)
CD25/CD4+	1,15 (±0,13)	1,32 (±0,06)	1,33 (±0,16)	0,92 (±0,25)
CD25/CD8+	0,34 (±0,12)	0,35 (±0,05)	0,36 (±0,03)	0,41 (±0,22)
Células	Linfonodos axilares			
CD3+	96,2 (±0,12)	90,13 (±1,43)	90,8 (±0,4)	95,44 (±0,14)
CD4+	54,16(±1,06)	52,43 (±0,1)	46,7 (±0,23)* (↓13,7%)	53,52 (±0,13)
CD8+	33,7 (±0,56)	31,1 (±0,15)	35,5 (±0,06)	34,6 (±0,5)
CD4/CD8	1,60	1,67	1,31	1,54
CD19+	7,0(±1,22)	11,0 (±0,76)	8,2 (±0,4)	5,92 (±1,31)
CD16/CD32+	7,5 (±0,84)	13,6 (±0,06)	11,8 (±0,47)	8,51 (±0,45)
CD25/CD4+	1,64 (±0,08)	1,74 (±0,06)	1,58 (±0,13)	0,61 (±0,31)
CD25/CD8+	0,55 (±0,01)	0,5 (±0,05)	0,38 (±0,01)	0,35 (0,01)

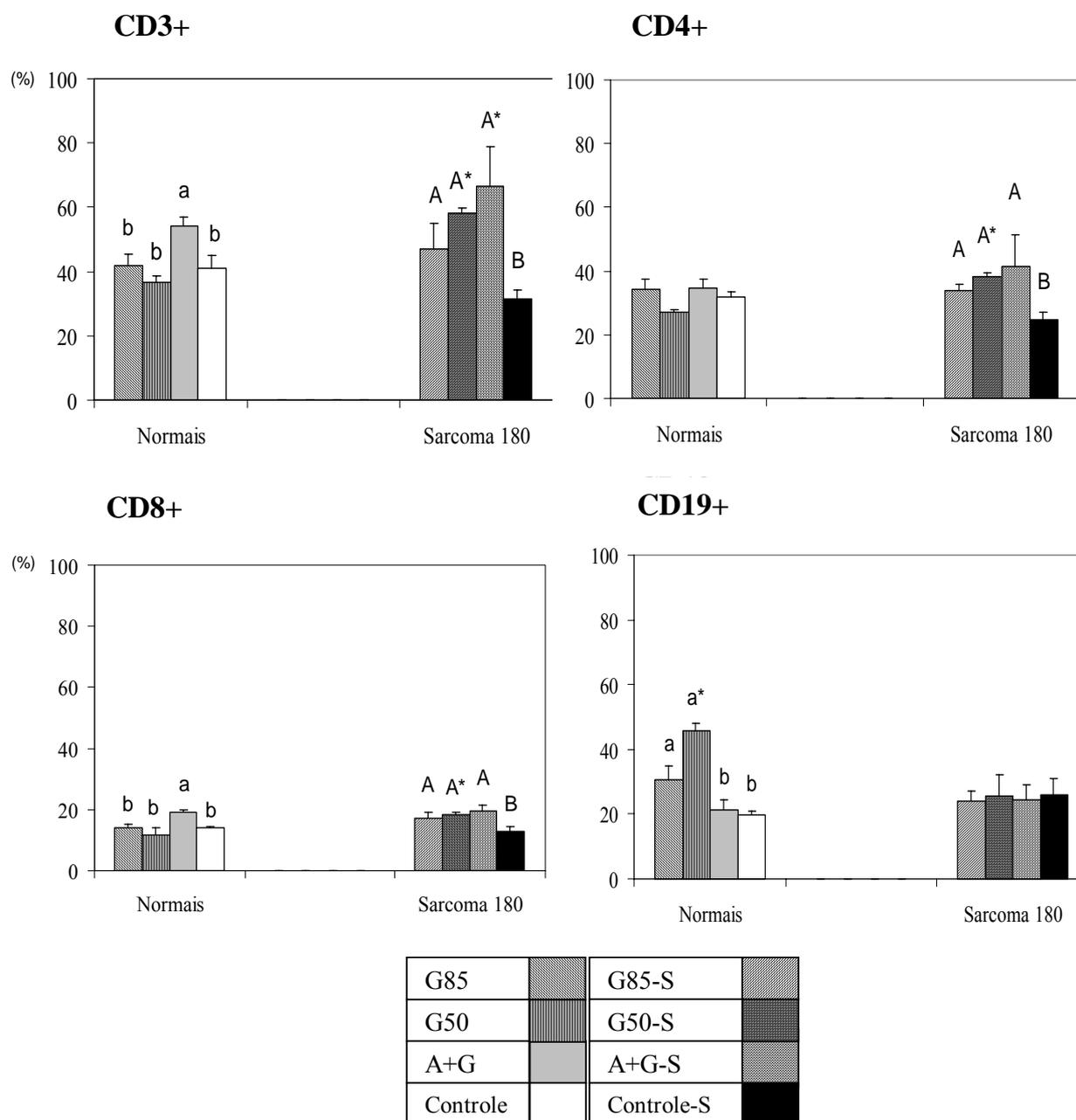
NOTAS: ±: desvio padrão; (\*\*) (\*): diferença significativa quando comparados ao controle ( $p \leq 0,01$ ) e ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente; (↑%): diferença percentual em relação ao controle; (n = 8).

TABELA 26 – EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS GÂNGLIONARES E ESPLÊNICOS EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE SARCOMA 180

Células Células(%)	Baço			
	Controle-S	G85-S	G50-S	A+G-S
CD3+	31,3 (±3,0)	46,8 (±8,1)** (↑49,3%)	58,3 (±1,5)** (↑86%)	66,60 (±12,2)** (↑112,4%)
CD4+	24,5(±2,7)	33,85(±1,8)* (↑38%)	38,34 (±0,9)* (↑56,4%)	41,40 (±10,2)* (↑68,7%)
CD8+	13,0(±1,2)	17,10(±1,9)** (↑30,5%)	18,4 (±0,67)** (↑41,2%)	19,50 (±2,18)** (↑49%)
CD4/CD8	1,9	2,0	2,0	2,12
CD19+	26,0(±4,8)	23,8(±3,45)	25,45 (±6,6)	24,60 (±4,65)
CD16/CD32+	54,0 (±3,1)	37,12 (±2,0)	37,6 (±1,7)	34,4 (±6,23)
CD25/CD4+	1,07(±0,08)	0,98 (±0,18)	1,21 (±0,15)*	1,88 (±0,16)**
CD25/CD8+	0,26(±0,09)	0,15(±0,06)	0,5 (±0,1)**	0,44 (±0,07)**
Células	Linfonodos axilares			
CD3+	81,0 (±1,6)	86,8 (±10,8)	96,72 (±1,3)** (↑19,3%)	97,80 (±0,58)** (↑20,6%)
CD4+	38,2 (±2,42)	45,82 (±5,56)* (↑20%)	56,0 (±2,98)** (↑46,7%)	57,50 (±2,77)** (↑50,6%)
CD8+	28,3 (±2,8)	33,5 (± 7,18)	42,0 (±9,27)* (↑48%)	35,4 (±3,75)
CD4/CD8	1,34	1,36	1,33	1,62
CD19+	15,43 (±0,5)	13,0 (±0,85)	2,2 (±0,2)**	2,03 (±1,16)**
CD16/CD32+	27,0 (±1,93)	15,32 (±1,02)	3,4 (±0,82)	2,17 (±1,23)
CD25/CD4+	1,67 (± 0,16)	1,15 (±0,32)	1,35 (±0,4)	1,54 (±0,07)
CD25/CD8+	0,48 (± 0,06)	0,25 (±0,07)	0,56 (±0,04)	0,48 (0,12)

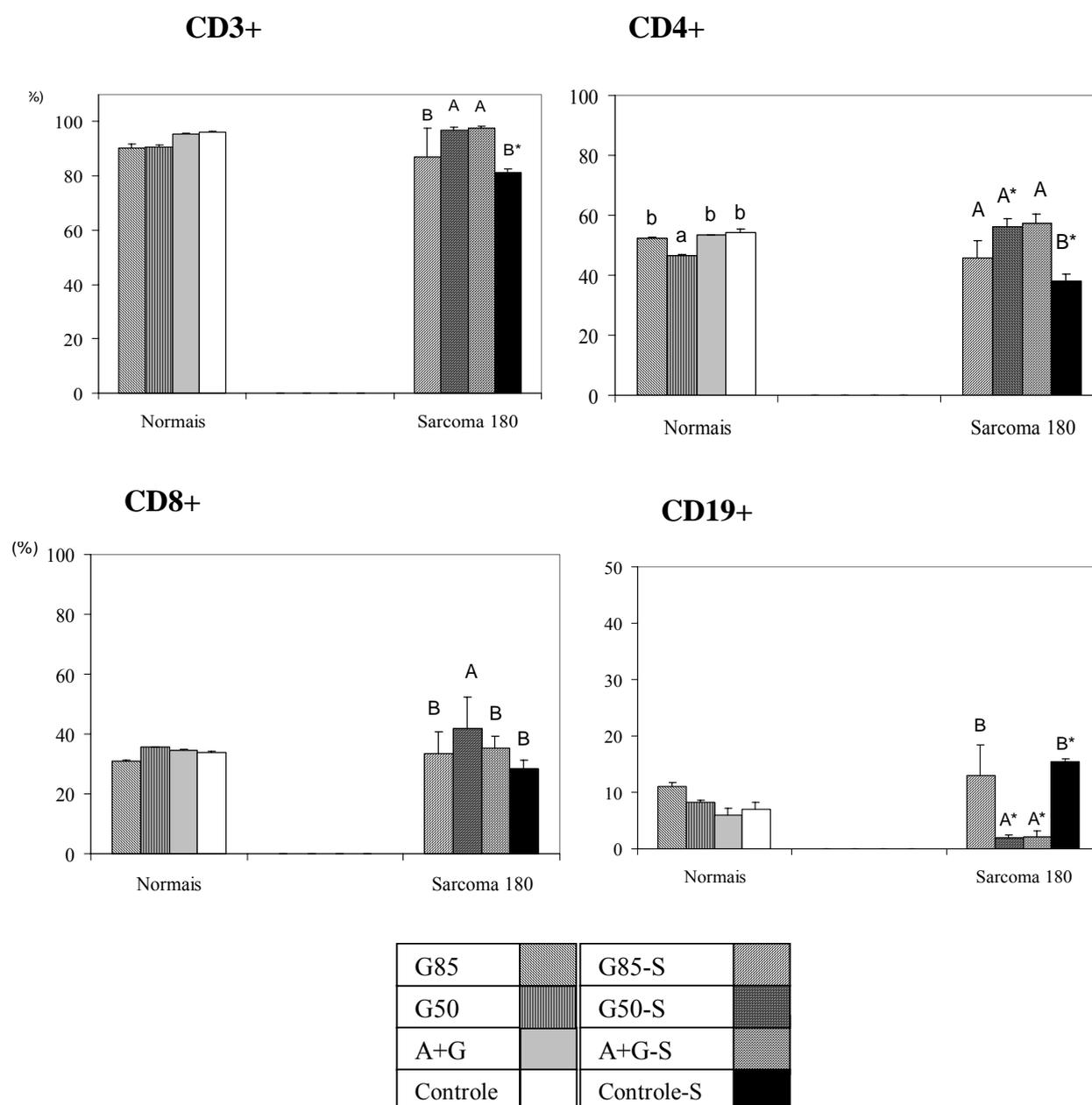
NOTAS: ±: desvio padrão; (\*\*) (\*): diferença significativa quando comparados ao controle ( $p \leq 0,01$ ) e ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente; (↑%): diferença percentual em relação ao controle; (n = 8).

FIGURA 21 - EFEITO DE RAÇÃO SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS EM CAMUNDONGOS NORMAIS E PORTADORES DE SARCOMA 180



NOTAS: -letras minúsculas: animais normais vs. controle normal;  
 -letras maiúsculas: animais com sarcoma 180 vs. controle com sarcoma;  
 -\*: animais normais vs. animais com sarcoma (alimentados com o mesmo tipo de ração);  
 -n = 8.

FIGURA 22 - EFEITO DE RAÇÃO SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 SOBRE LINFÓCITOS DE LINFONODOS EM CAMUNDONGOS NORMAIS E PORTADORES DE SARCOMA 180



NOTAS: -letras minúsculas: animais normais vs. controle normal;  
 -letras maiúsculas: animais com sarcoma 180 vs. controle com sarcoma;  
 -\*: animais normais vs. animais com sarcoma (alimentados com o mesmo tipo de ração);  
 -n = 8.

## 6.12 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE INTERLEUCINAS

Não foram detectadas concentrações plasmáticas de IL-1b, MCP-1, IL-10, IL-6 IL-12p70 nos grupos A+G, G85 e G50. Em relação aos níveis de TNF- $\infty$  e IFN- $\gamma$ , foram observadas alterações significativas no grupo G50 ( $p \leq 0,05$ ).

- a) Camundongos normais: as concentrações plasmáticas de TNF- $\infty$  foram mais elevadas nos camundongos normais do grupo G50 (11,75 pg/mL) em relação aos grupos G85 (7,7 pg/mL), A+G (4,95 pg/mL) e controle (8,7 pg/mL). Apenas os camundongos normais do grupo G50 apresentaram concentrações detectáveis de IFN- $\gamma$  (2,2 pg/mL) (Tabela 27).
- b) Camundongos com Sarcoma 180: foram detectados os seguintes valores de TNF- $\infty$  entre os grupos inoculados com sarcoma 180: G85 (16,6 pg/mL), G50 (2,35 pg/mL), A+G (13,7 pg/mL) e controle (9,1 pg/mL). Em relação ao IFN- $\gamma$ , os grupos G85, A+G e controle apresentaram os seguintes valores: 2,45 pg/mL, 1,0 pg/mL e 1,85 pg/mL, respectivamente, enquanto que no grupo G50 não foram detectadas concentrações plasmáticas dessa interleucina.

TABELA 27 – EFEITO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 SOBRE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE INTERLEUCINAS

	NORMAIS				SARCOMA 180			
	G85	G50	A+G	Contr	G85-S	G50-S	A+G-S	Contr-S
TNF- $\alpha$	7,7	11,75 ( $\uparrow$ 35%)	4,95	8,7	16,6 ( $\uparrow$ 21%)	2,35* ( $\downarrow$ 83%)	9,1	13,7
IFN- $\gamma$	...	2,2	...	...	2,45 ( $\uparrow$ 32%)	...	1,0	1,85
IL-1b	...	...	...	...	...	...	...	...
MCP-1	...	...	...	...	...	...	...	...
IL-10	...	...	...	...	...	...	...	...
IL-6	...	...	...	...	...	...	...	...
IL-12p70	...	...	...	...	...	...	...	...

NOTAS: TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; MCP: “monocyte chemoattractant protein”; IL: interleucina; \*: diferença estatística significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ); ( $\uparrow\%$ ;  $\downarrow\%$ ): diferença percentual em relação ao controle; ...: níveis não detectáveis; n = 8.

Dados da Organização Mundial da Saúde relatam que, a cada ano, 10 milhões de pessoas no mundo apresentam diagnóstico positivo de câncer, resultando em 12% de mortalidade (JEMAL et al., 2005). As terapias convencionais de combate ao câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, podem desencadear graves efeitos colaterais, principalmente debilitando o sistema imunológico do hospedeiro e tornando-o suscetível a infecções oportunistas. Nesta batalha, a imunoterapia desempenha um papel fundamental, quer seja na forma de substâncias imunomoduladoras ou, mais recentemente, na construção de substâncias antineoplásicas acopladas a anticorpos dirigidos seletivamente contra as células cancerosas (WASSER; WEIS, 1999; AKEWANLOP, et al., 2001; HONG et al., 2004). Os modificadores da resposta biológica (MRB), também denominados biomoduladores, encontram ampla aceitação nesse contexto, habilitando o sistema imunológico do indivíduo a reconhecer e combater precocemente antígenos estranhos (WASSER, 2002). Polissacarídeos, especificamente  $\beta$ -glucanas extraídos de certos cogumelos medicinais apresentam efeito imunoestimulador, que se assemelha ao modo de ação de substâncias MRB.

Em número considerável, compostos derivados de cogumelos, quer sejam componentes celulares ou metabólitos secundários, têm sido descritos exercendo ação imunomoduladora e antitumoral. CHIHARA et al. (1970) isolaram de *L. edodes* um polissacarídeo, denominado “lentinan”, o qual apresenta marcante atividade antitumoral. Do cogumelo *C. versicolor* foi extraído o Krestin e o PSK, substâncias imunomoduladoras e anticancerígenas (Ng,1998). LEIFA et al. (2003) demonstraram inibição do crescimento de Sarcoma 180 em camundongos tratados com polissacarídeos extraídos do cogumelo *A. brasiliensis*.

Entre os cogumelos medicinais, *G. lucidum* ocupa um lugar de destaque, sendo objeto de vários estudos que, em sua maioria, são realizados *in vitro* e investigam separadamente a ação de seus princípios ativos, como polissacarídeos ( $\beta$ -glucanas), glicoproteínas (Ling-Zhi) e triterpenos (WASSER 2005).

Porém, considerando que essas substâncias podem produzir efeitos distintos e até mesmo completamente opostos, pouco se conhece sobre os efeitos desse cogumelo no organismo em sua totalidade.

Neste trabalho, investigou-se a hipótese de que a alimentação crônica de camundongos, com ração suplementada com *G. lucidum*, poderia desencadear uma resistência do animal frente ao desenvolvimento tumoral, além de alterações bioquímicas ao nível de metabolismo lipídico e glicídico. Em paralelo, foi investigado se a associação de *G. lucidum* com *A. brasiliensis* resultaria em um efeito sinérgico. As alterações linfocitárias foram pesquisadas em baço e linfonodos axilares, de modo a se conhecer a amplitude da resposta imunológica desencadeada pelas rações suplementadas. Os linfonodos geralmente respondem a antígenos próximos que os alcançam através de tecidos vizinhos, enquanto que a resposta esplênica está relacionada a antígenos provenientes da circulação sanguínea (MINS et al., 1993).

Os resultados do presente estudo demonstram inibição do desenvolvimento tumoral nos animais alimentados com a ração suplementada com *G. lucidum*, sugerindo uma provável ação, via sistema imunológico, de reconhecimento das células tumorais implantadas e subsequente detenção do seu crescimento. Embora os três tipos de rações, G85, G50 e A+G, tenham apresentado efeito imunomodulador, a menor dosagem de *G. lucidum*, ou seja G50, foi que apresentou maior ação antitumoral (89%). O efeito antitumoral desencadeado pela ração A+G (81%) não apresentou diferença estatística em relação ao emprego isolado de ração G50. Estudos futuros serão necessários para se estabelecer qual a dose terapêutica mais eficiente desses suplementos alimentares, visando obter o efeito imunomodulador e antitumoral desejado.

Organismos comprometidos por neoplasias freqüentemente apresentam resposta imunológica reduzida, o que contribui para as altas taxas de morbidade e mortalidade nesses indivíduos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). TSUKAGOSHI et al., (1984), relatam que extratos de *C. versicolor* restauram o sistema imunológico de camundongos portadores de tumor, porém sem afetar a resposta imunológica de animais saudáveis.

No presente trabalho, ao contrário, a ação imunomoduladora de *G. lucidum* pôde ser observada tanto nos animais saudáveis quanto naqueles inoculados com Sarcoma 180. Nos animais saudáveis, a suplementação alimentar à base de *G. lucidum*

elevou os valores de linfócitos esplênicos B (CD19+), os quais atuam, principalmente, na linha de defesa primária do organismo, através da produção de anticorpos (SATO et al., 1997). Especificamente no grupo G50, concomitante ao incremento de linfócitos B, houve aumento de células esplênicas expressando CD16/CD32+, que correspondem a receptores das frações FC $\gamma$ III e FC $\gamma$ II de imunoglobulinas (Tabela 25). CD16 e/ou CD32 são expressos na superfície de células NK, monócitos/macrófagos, células dendríticas, granulócitos, mastócitos, linfócitos B e T (LEWIS et al., 1986; PERUSSIA et al., 1989).

A primeira linha de defesa do organismo contra patógenos é a “citotoxicidade dependente de complemento” (CDC), a qual é induzida por polissacarídeos presentes na parede celular dos microrganismos, sendo inativa contra células cancerosas (HONG et al., 2003).

Em outro mecanismo de defesa, mais elaborado, a célula infectada com microrganismos invasores é inicialmente recoberta com anticorpos e induz à clivagem da fração C3 do sistema complemento, a qual ativa receptores na superfície de células de defesa, desencadeando o processo de “citotoxicidade mediada por célula-dependente de anticorpo” (“antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” - ADCC) (CHEUNG et al., 2002). Polissacarídeos, como  $\beta$ -glucanas, presentes na parede celular de microrganismos invasores, amplificam a resposta imunológica, induzindo a expressão de receptores C3b na superfície de fagócitos. Antígenos tumorais também induzem a produção de anticorpos, porém, devido à falta de  $\beta$ -glucanas, a célula cancerosa opsonizada (recoberta com anticorpos) não é capaz de ativar fagócitos, limitando a eficácia desse mecanismo de defesa (HONG et al., 2003). Para contornar essa limitação, regimes terapêuticos à base de anticorpos monoclonais específicos contra células cancerosas utilizam  $\beta$ -glucanas como adjuvantes no tratamento, as quais ativam a ADCC mediada por monócitos e granulócitos (HONG et al., 2004).

As células B também podem atuar na captação, processamento e apresentação de antígenos tumorais às células T auxiliaadoras ou, ainda, induzindo a resposta das células T citotóxicas contra o tumor, através da secreção de IL-1 e IL-2 (ROSEMBERG, 1993). No presente estudo, o aumento nos níveis de CD19+ e de

CD16/CD32+ no grupo G50 pôde ser relacionado à maior resistência ao Sarcoma 180, sugerindo ação antitumoral preventiva, através de mecanismos de opsonização e subsequente destruição das células transformadas via ADCC. Possivelmente,  $\beta$ -glucanas provenientes do metabolismo de *G. lucidum* também podem ter contribuído para a efetividade desse processo.

No grupo G50, de animais normais, em paralelo ao incremento no percentual de linfócitos B e células CD16/CD32+, também foi constatada uma diminuição de células CD4+, tanto ao nível de baço, quanto de linfonodos. As células Th CD4+ coordenam a resposta imunológica se diferenciando em Th1, que atua em processos inflamatórios e hipersensibilidade; e Th2, que estimula linfócitos B e promove respostas alérgicas e anti-helmínticas. O controle na expressão Th1 e Th2 é regulado por diferentes citocinas, sendo que um desequilíbrio nessas populações celulares pode resultar na patogênese de doenças autoimunes (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

O único relato prévio de estimulação de células B por componentes de *G. lucidum* corresponde a um estudo *in vitro*, no qual uma proteoglicana (GLIS) induziu a proliferação e ativação de linfócitos B esplênicos de camundongos e a secreção de IL-2, enquanto que diminuiu as concentrações de CD3+ e CD4+. Segundo os autores, linfócitos B isolados também foram estimulados pela proteoglicana, sugerindo uma rota de ativação direta, semelhante ao do LPS e independente de células T (ZHANG et al., 2002a).

No entanto, no presente estudo, além de proteoglicanas semelhantes a GLIS e  $\beta$ -glucanas, vários outros componentes de *G. lucidum* podem ter desencadeado as alterações imunológicas observadas nos camundongos normais, como a proteína imunossupressora Ling Zhi-8 (LZ-8). LZ-8 tem sido relatada prevenindo a incidência de diabetes auto-imune em camundongos (KINO et al., 1989) e retardando a rejeição de tecidos transplantados (HEM et al., 1995).

No grupo A+G, foi observado incremento significativo de células esplênicas CD3+ e CD8+ entre os animais saudáveis ( $p \leq 0,05$ ). Este foi o único resultado no qual a associação entre *G. lucidum* e *A. brasiliensis* mostrou efeito imunomodulatório

peculiar, em relação aos demais tratamentos. A resposta imunológica de célula T é inquestionavelmente a mais importante na contenção do crescimento tumoral.

Na presença do Sarcoma 180, os animais alimentados com os três tipos de rações suplementadas (G85, G50 e A+G) apresentaram significativo aumento ( $p \leq 0,05$ ) nos percentuais de células esplênicas CD3+, CD4+ e CD8+. Nos grupos G50-S e A+G-S foram detectadas células esplênicas CD4/CD25+ e CD8/CD25+. O complexo molecular CD25 funciona como receptor de IL-2, sendo expresso na superfície de linfócitos B e T ativados. A IL-2 estimula a proliferação de células T e aumenta a atividade citotóxica contra células tumorais (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

Nos linfonodos, a presença do sarcoma levou a um significativo aumento de células CD3+ e CD4+ ( $p \leq 0,01$ ) nos grupos G50-S e A+G-S, enquanto que no grupo G85-S apenas CD4+ aumentou ( $p \leq 0,05$ ). Coincidentemente, o grupo G50-S, o qual obteve mais sucesso na inibição tumoral, foi o único que apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de células CD8+ em linfonodos axilares (Tabela 26). A atividade citolítica direta de células CD8+ contra células neoplásicas constitui uma etapa fundamental na conclusão da resposta imunológica do hospedeiro no combate ao desenvolvimento de tumores (MCNEELA; MILLS, 2001). CAO e LIN (2003) demonstraram, *in vitro*, que polissacarídeos de *G. lucidum* atuam como promotores da citotoxicidade específica de células Tc induzida por células dendríticas, sugerindo um possível mecanismo mediado por IFN- $\gamma$ .

O efeito proliferativo sobre células T, registrado nos animais alimentados com ração suplementada com *G. lucidum*, corrobora resultados reportados por vários estudos *in vitro*, nos quais frações protéicas e polissacarídicas têm sido descritas estimulando a proliferação e ativação de células T (HEM et al., 1995; WANG et al., 2002).

Os baixos valores de células CD3+, CD4+ e CD8+ registrados nos camundongos com Sarcoma 180, que não receberam ração suplementada com cogumelos, evidencia a agressão ao sistema imunológico desencadeada pelo estabelecimento do câncer (Tabela 26). Ao contrário, embora no grupo G85-S também não tenha ocorrido inibição significativa do crescimento tumoral, as concentrações de

células T elevaram-se. Estes resultados refletem o efeito restaurador de *G. lucidum*, capaz de manter o sistema imunológico em alerta, mesmo na presença do tumor. Outros estudos têm demonstrado esse importante efeito restaurador de *G. lucidum* em organismos debilitados. LEE et al. (2003a) relatam que o emprego de polissacarídeos de *G. lucidum* em camundongos com câncer resultou em aumento nas concentrações de células NK. GAO et al., (2003), ao administrarem polissacarídeos extraídos de *G. lucidum* (Ganopoly®) a pacientes com câncer de pulmão e submetidos à quimioterapia, constataram melhora nas condições clínicas e aumento de células CD3+, CD4+ e NK, porém um marginal declínio na concentração de CD8+.

Através de uma complexa rede de interações químicas, as citocinas regem o desenvolvimento, diferenciação e regulação das células do sistema imunológico. A mesma citocina pode apresentar tanto atividade imunoestimuladora quanto imunossupressiva, dependendo de fatores ainda não esclarecidos, de forma que nem sempre se evidencia a responsividade esperada (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002). As IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais aumentam as propriedades inflamatórias, são fatores humorais sugeridos como mediadores dos desarranjos metabólicos, que levam ao desenvolvimento da caquexia em indivíduos portadores de câncer (AGGARWAL; NATARAJAN, 1996).

Apesar da alta toxicidade, a IL-2 e o IFN- $\alpha$  são prescritos muitas vezes, em associação com outros medicamentos, no tratamento de cânceres ou em infecções virais, como hepatites, herpes, condilomas, AIDS e outras (ROSENBERG et al., 1985; DORR, 1993; GIANNÍ, et al. 1996). Os efeitos colaterais dessas citocinas podem ser atenuados com o emprego concomitante de substâncias modificadoras da resposta biológica (WASSER, 2002). Pesquisas com *G. lucidum* sugerem essa possibilidade. KIM et al. (2000) reportam que a combinação de IFN- $\gamma$  com uma glicoproteína isolada do corpo de frutificação de *G. lucidum* mostrou potente atividade anti-herpética *in vitro*.

No presente trabalho, entre os animais normais, somente os alimentados com ração G50 apresentaram concentrações plasmáticas detectáveis de IFN- $\gamma$ . Ao contrário, entre os animais inoculados com sarcoma 180, apenas no grupo G50-S não foi

detectado IFN- $\gamma$  (Tabela 27). Coincidentemente, no grupo G50-S foi observado um maior índice de inibição da massa tumoral (89%). A fonte primária dos interferons é principalmente as células T. Como a maioria das citocinas, o efeito imunomodulador do IFN- $\gamma$  inclui propriedades imunoestimulantes e algumas imunossupressivas. Essa molécula apresenta uma função fundamental no desencadeamento da resposta imunológica celular, ativando macrófagos, células Tc e induzindo a expressão de moléculas MHC-I e MHC-II (DORR, 1993). O efeito imunossupressivo mais relatado do IFN- $\gamma$  é a sua capacidade de inibir a resposta imunológica mediada por anticorpos contra células tumorais. Estudos *in vitro* demonstram que macrófagos expostos ao IFN- $\gamma$  apresentam inibição na função de fagocitose de células tumorais mediadas por anticorpo (BACKMAN; GUYRE, 1994; AKEWANLOP, et. al., 2001). Porém, ainda não foi comprovado se essa ação inibitória do IFN- $\gamma$  sobre a fagocitose, via anticorpos, também pode ocorrer *in vivo*.

O fato de não terem sido detectadas concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  nos animais do grupo G50-S revela a necessidade de estudos futuros para esclarecimento desse fenômeno. Por outro lado, o aumento nas concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  registradas no grupo G50 sugere que *G. lucidum* pode atuar no organismo hígido capacitando-o imunologicamente para uma maior resistência ao desenvolvimento de células tumorais, sendo que o incremento na secreção de IFN- $\gamma$  possivelmente é uma das estratégias.

No presente trabalho, as concentrações plasmáticas do TNF- $\alpha$  acompanharam a tendência do IFN- $\gamma$ , ou seja, entre os animais normais, o grupo G50 apresentou elevação do TNF- $\alpha$  em relação aos demais grupos, enquanto que, entre os animais inoculados com sarcoma 180, apenas no grupo G50 ocorreu queda significativa nas concentrações de TNF- $\alpha$  (Tabela 27).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que produz efeitos biológicos diversos como promoção ou inibição do crescimento celular, apoptose, angiogênese e citotoxicidade. A fonte primária dos TNFs é constituída por macrófagos, mas essas moléculas também são produzidas por outros tipos celulares, inclusive células

tumorais (RUDDLE, 1992). Um importante mecanismo de ação mediado por TNF- $\alpha$  é a indução na expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, a qual permite a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (CHEN, et al., 2001). O potencial apoptótico do TNF- $\alpha$  é um evento que permite a eliminação de células neoplásicas ou infectadas e também controla o crescimento tecidual (MALORNI, et al., 1996). Porém, como medicamento, a sua administração é limitada pelo fato de resultar em uma série de efeitos colaterais, incluindo hipotensão e falência de órgãos (DAVIES et al., 2005). Justamente o poder apoptótico do TNF- $\alpha$ , quando dirigido desordenadamente contra células musculares, é responsável pelo estabelecimento de quadros de caquexia, constituindo um mau prognóstico em pacientes com câncer (TOLOSA et al., 2005). Além da caquexia, a produção excessiva dos TNFs pode causar outros efeitos adversos severos sobre o organismo, como desordens auto-imunes, úlceras, choque séptico e, eventualmente, levar à morte. (AGGARWAL; NATARAJAN, 1996). GAO et al. (2002b) demonstraram o efeito benéfico produzido por polissacarídeos de *G. lucidum* em ratos com úlcera gástrica, através da supressão na expressão do gene TNF- $\alpha$ .

Entre as várias atividades desempenhadas pelo TNF- $\alpha$ , destaca-se o estímulo na expressão de metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Tumores primários e metástases para se expandirem precisam destruir e remodelar o estroma à sua volta e, para isso, dependem da liberação de metaloproteinases pelos macrófagos e pelas próprias células tumorais (BIRKEDAL-HANSEN et al. 1993). Desse modo, após o estabelecimento do tumor primário, concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  podem favorecer a expansão tumoral, quer seja pelo desenvolvimento de quadro caquético no hospedeiro ou por estimular a produção de metaloproteinases. HATTORRI, MIZUTANI e OSUMI (2005) registraram a patente de um produto, à base de extrato aquoso de *Ganoderma* capaz de inibir metaloproteinases, sendo recomendado para o tratamento de doenças nas quais a supressão dessas enzimas é efetiva, como metástases de tumores, úlceras, artrite reumatóide, periodontite, entre outras. Ensaios em camundongos demonstraram a capacidade desse extrato em conter o processo de metastização de melanoma.

Visto a ampla gama de efeitos desencadeados pelo TNF- $\alpha$ , um equilíbrio na sua produção é fundamental para manutenção da higidez orgânica. Nesse contexto, os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que o consumo crônico de *G. lucidum*, no grupo G50, levou a uma regulação satisfatória na expressão de TNF- $\alpha$ . Possivelmente, nos organismos saudáveis, o estímulo na produção de TNF- $\alpha$  contribuiu para um recrudescimento do sistema imunológico, enquanto que, nos animais inoculados com Sarcoma 180, a inibição na expressão do TNF- $\alpha$  levou à contenção do crescimento tumoral e manutenção da homeostase.

Não foram detectados níveis plasmáticos de IL-1b, IL-6, IL-10, IL12p70 e MCP-1 em nenhum dos grupos pesquisados. Há que se considerar que as citocinas são secretadas em quantidades ínfimas ao nível de receptores celulares, o que dificulta a sua detecção (COLIGAN et al., 1992).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o efeito antitumoral de polissacarídeos de *G. lucidum* é mediado pela liberação de citocinas por células efetoras ativadas. WANG et al. (1997) relatam que a adição de polissacarídeos de *G. lucidum* a culturas de células mononucleares humanas induziu a produção de interleucinas por macrófagos (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e por células T (IFN- $\gamma$ ). O sobrenadante desse cultivo celular suprimiu a clonogenicidade e a proliferação de células leucêmicas, além de induzir a diferenciação e apoptose. Entretanto, o polissacarídeo sozinho, adicionado às células leucêmicas, não foi capaz de exercer esses efeitos. Os autores sugerem que o polissacarídeo de *G. lucidum* estimulou as células efetoras a liberarem citocinas, resultando em um efeito antitumoral desencadeado pelo efeito sinérgico entre essas moléculas.

Freqüentemente, efeitos paradoxais ocorrem quando citocinas são administradas durante o curso de uma doença. Aparentemente, essas moléculas podem modular as suas atividades, atuando de forma surpreendente. Muito há para ser desvendado sobre esse complexo mecanismo de ação, incluindo os efeitos das citocinas secretadas pelo hospedeiro e daquelas liberadas pelas células tumorais (O'SHEA, MA, LIPSKY, 2002). Tem sido relatado que anticorpos neutralizadores para certas citocinas melhoram o estado geral dos pacientes e atenuam o crescimento tumoral

(STRASSMANN et al., 1992). Segundo CAHLIN et al. (2000), as citocinas do hospedeiro são menos importantes quantitativamente do que as citocinas derivadas do próprio tumor no desenvolvimento das neoplasias. Considerando esse aspecto, a queda nos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , observada no grupo G50-S, também pode ter sido consequência de menos células tumorais secretando essas interleucinas.

CHUNG et al. (2001) demonstraram que polissacarídeos, extraídos do caldo de cultivo micelial de *G. lucidum*, adicionados a cultivo de células mononucleares humanas, estimularam a secreção de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Esses polissacarídeos também conseguiram inibir o desenvolvimento de várias linhagens tumorais *in vitro*, mesmo na ausência de células mononucleares. Segundo os autores, o alto peso molecular dessas moléculas (aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  dalton) impede sua penetração nas células, sugerindo uma atuação via ligação a receptores de membrana e, indiretamente, interferindo nos sinais de transdução.

Segundo LEE et al. (2003a), o extrato aquoso de *G. lucidum*, administrado intraperitonealmente ou oralmente, resultou em significativo incremento na sobrevivência de camundongos implantados com diferentes tumores, como sarcoma 180, fibrosarcoma e carcinoma pulmonar de Lewis. O polissacarídeo purificado a partir do extrato aquoso, quando adicionado a cultivo de células mononucleares, estimulou a produção de TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$ . O sobrenadante desse cultivo celular exerceu atividade antiproliferativa e diferenciadora sobre células leucêmicas. Porém, o extrato aquoso não foi citotóxico na ausência de células mononucleares e a atividade antitumoral foi abolida em camundongos tratados com ciclosporina. Esses resultados sugerem que a atividade antitumoral de *G. lucidum* ocorre indiretamente, via sistema imunológico. Vários outros pesquisadores têm relatado o poderoso efeito de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre a expressão de citocinas por células mononucleares, especialmente o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  (WANG et al., 2002; BEROVIC et al., 2003; LEE et al., 2003a; CHEN et al. 2004; HSU et al., 2004). A maioria dessas pesquisas é realizada *in vitro* e com a porção hidrossolúvel dos polissacarídeos. Porém, há que se considerar os polissacarídeos insolúveis em água, além de outros componentes de *G. lucidum* que também são imunomoduladores, como a proteína

Ling Zhi-8, que é um potente ativador de células T humanas, mediando seus efeitos através do incremento na produção de IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (FRENDSCHO et al., 1993). *G. lucidum* pode exercer sua atividade antitumoral de forma preventiva em organismos saudáveis, recrudescendo suas defesas imunológicas (LU et al., 2002) ou ajudando a combater tumores em organismos já comprometidos (LEE et al., 2003a). A atividade antitumoral de *G. lucidum* pode se expressar de forma indireta, via sistema imunológico (WANG, et al., 1997) ou de forma direta, atuando sobre as células cancerosas através de seus de polissacarídeos (CHUNG et al., 2001) e triterpenos (LIN et al., 2003). Outras propriedades biológicas, como ação antioxidante (LIU; OOI; CHANG, 1997; LEE et al., 2001) atividade antiangiogênica (SONG et al., 2004), antimutagênica (CHUNG et al., 2001) e inibidora de metaloproteases (HATTORI; MIZUTANI; OSUMI, 2005), também devem ser consideradas como potencializadoras de sua atividade antitumoral.

Vários autores têm demonstrado a lovastatina e análogos, drogas comumente usadas no tratamento de hipercolesterolemia, potencializando a atividade antitumoral quando combinadas com antineoplásicos (JAKÓBISIAK et al., 1991; PADAYATTY et al., 1997). Adicionalmente, a lovastatina pode atuar minimizando a toxicidade e reduzindo a dose terapêutica do antineoplásico. FELESZKO et al.(1999) relatam o efeito antitumoral da combinação entre lovastatina e TNF- $\alpha$  em camundongos, via inibição da angiogênese. HOLSTEIN e HOHL (2001) demonstraram a interação sinérgica entre a lovastatina e o taxol, medicamento antineoplásico que atua parando o ciclo celular na fase G2. Todos esses resultados sugerem o potencial uso da lovastatina como terapia de suporte em pacientes submetidos à quimioterapia.

No presente trabalho a suplementação com *G. lucidum* CG 144 resultou em ambos os efeitos, hipolipidêmico e antitumoral. Embora ainda não se conheça qual o componente de *G. lucidum* responsável pela sua ação hipolipidêmica, é possível que também possa ocorrer um efeito sinérgico entre essa molécula e as demais substâncias imunomoduladoras presentes nesse cogumelo.

A incidência de câncer aumenta gradualmente a partir dos 30 anos, sendo que condições pré-neoplásicas frequentemente se estabelecem muito cedo na vida de um

indivíduo. Conseqüentemente, uma forma de se prevenir o desenvolvimento de certos tipos de cânceres seria a inibição da primeira expansão clonal, retardando o aparecimento do tumor (JEMAL et al., 2005). Assim, a habilidade do sistema imunológico de detectar precocemente células transformadas constitui um processo vital para a manutenção da higidez orgânica.

Outra importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente nos centros urbanos dos países ocidentais, é a arteriosclerose e suas nefastas conseqüências, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (LUZ, 1993).

Atualmente é bem conhecida a importância da alimentação sobre o estado geral do organismo, de modo que os hábitos alimentares estão estreitamente relacionados ao surgimento de várias doenças. Estudos epidemiológicos comprovam que fatores dietéticos podem reduzir a incidência de alguns cânceres, possivelmente, por mecanismo quimiopreventivo (BOONE, KELLOFF, MALONE, 1990). Por outro lado, o consumo excessivo de gorduras, em especial das saturadas, além de desencadear doenças cardiovasculares, também é responsável pelo aparecimento de certos tipos de cânceres (McENTEE, et al., 2002). Portanto, uma das estratégias para prevenir o aparecimento dessas enfermidades, e de outras correlacionadas, seria o consumo de uma dieta capaz de suprir as necessidades alimentares do indivíduo e, ao mesmo tempo, exercer uma ação benéfica sobre o organismo, mantendo-o saudável.

O estado de saúde é caracterizado pelo funcionamento equilibrado de todas as funções orgânicas. Nesse contexto, as substâncias naturais capazes de modificar a resposta biológica de um organismo, harmonizando suas funções, ocupam um lugar de destaque. Pesquisas com cogumelos comestíveis comprovam o seu potencial emprego como fonte de substâncias modificadoras da resposta biológica, com a vantagem adicional de poderem ser incluídos à dieta normal do indivíduo (WASSER, 2005). Em especial, *G. lucidum* se apresenta como uma fonte promissora de substâncias com ação imunomoduladora, antitumoral, hipoglicêmica, hipolipidêmica e antioxidante.

No presente trabalho, a suplementação alimentar com de *G. lucidum* desencadeou importante efeito hipolipidêmico, imunomodulador e antitumoral, especialmente na dosagem G50. Sugere-se que as alterações imunológicas detectadas

possam ter contribuído para a maior resistência ao tumor e manutenção da higidez orgânica. Porém, como *G. lucidum* foi cultivado diretamente no suplemento alimentar, é possível que outros metabólitos possam ter exercido efeito farmacológico inibindo o crescimento do tumor.

Os resultados apresentados neste trabalho, além dos vários experimentos referenciados, atestam o potencial valor de *G. lucidum* e justificam investimentos em novas frentes de pesquisa, visando o desenvolvimento de fármacos e suplementos alimentares à base desse cogumelo.

## 7 CONCLUSÕES

7.1 A produção de biomassa de *G. lucidum* em meio líquido atingiu o valor máximo entre o nono e décimo dia de cultivo, sendo favorecida por condições estáticas, enquanto que a produção de EPS foi favorecida de forma direta em função do tempo de agitação do caldo de cultivo.

7.2 A produção máxima de EPS foi alcançada no oitavo dia de cultura, sendo que a sua síntese não foi um fenômeno estritamente acoplado ao crescimento celular, ocorrendo dissociação em função das condições ambientais. A interação entre as fontes de carbono e nitrogênio compostas por glicose, extrato de levedura e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  resultou na melhor produção de EPS.

7.3 O cultivo de *G. lucidum* em estado sólido, empregando trigo em grão como substrato, atingiu seu valor máximo no 14<sup>a</sup> dia de cultura. Através da dosagem de ergosterol e análise respirométrica, pôde-se evidenciar um desenvolvimento micelial superior ao relatado pela literatura.

7.4 A dieta suplementada com *G. lucidum* CG 144 alterou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o metabolismo lipídico, diminuindo as concentrações plasmáticas de colesterol e triacilgliceróis e aumentando a fração HDL-colesterol. Os animais normais, alimentados com *G. lucidum*, apresentaram alteração em seu perfil imunológico, em relação aos animais do grupo controle. Os grupos G85 e G50 apresentaram incremento nas concentrações de células esplênicas CD19+. No grupo G50 também foi observado significativo decréscimo de células esplênicas CD4+, em relação ao controle. No grupo G50 foi constatado aumento nas concentrações plasmáticas TNF- $\alpha$ , em relação ao controle, sendo o único grupo de animais saudáveis que apresentou níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ . Na presença do Sarcoma 180, os animais alimentados com ração suplementada

com *G. lucidum* apresentaram um significativo incremento na resposta imunológica celular, com aumento de células T esplênicas e de linfonodos axilares, em relação ao controle-S. Na presença do sarcoma 180, o grupo G50-S apresentou queda significativa nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , sendo o único grupo de animais com tumor que não apresentou níveis plasmáticos detectáveis de IFN- $\gamma$ . Nos grupos G85-S e G50-S houve 14% e 89% inibição do crescimento tumoral, respectivamente.

7.5 A mistura de rações fermentadas com *G. lucidum* CG 144 e *A. brasiliensis* LPB 3 não alterou as concentrações de colesterol e triacilgliceróis, mas aumentou a fração HDL-colesterol. Nos animais normais do grupo A+G ocorreu aumento significativo de linfócitos esplênicos CD3+ e CD8+ em relação ao controle. Na presença do Sarcoma 180 os animais do grupo A+G-S apresentaram um significativo incremento na resposta imunológica celular, com aumento de células T esplênicas e de linfonodos axilares, em relação ao controle-S. O grupo A+G-S apresentou 81% de inibição do crescimento tumoral, em relação ao controle-S. O aumento significativo de células esplênicas CD3+ e CD8+, registrado unicamente nos camundongos normais alimentados com a ração A+G, sugere um possível efeito imunomodulador adicional de *A. brasiliensis* LPB 3.

## SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste trabalho apontam *G. lucidum* como importante fonte de princípios ativos e indicam a necessidade de estudos mais aprofundados, no sentido de se avaliar o seu verdadeiro potencial terapêutico. Seguem algumas sugestões para trabalhos futuros:

- a) Analisar as características físico-químicas de metabólitos de *G. lucidum* desenvolvido por FES ou cultivo submerso. Estudar principalmente os polissacarídeos, ácidos ganodéricos e Ling Zhi-8, os quais são responsáveis por uma ampla gama de atividades terapêuticas;
- b) Investigar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de produtos a base de *G. lucidum*, no sentido de se estabelecer critérios de dosagem e segurança;
- c) Investigar o potencial imunossupressor de metabólitos de *G. lucidum*, *in vivo*, através de diferentes modelos de transplantes alogênicos; e *in vitro* em cultivos celulares mistos;
- d) Pesquisar os efeitos de uma dieta suplementada com *G. lucidum* sobre o metabolismo gluco-lipídico em animais com diabetes induzida;
- e) Analisar o efeito de uma dieta suplementada com *G. lucidum* em animais hipertensos; em relação ao seu potencial como agente diurético e anti-hipertensivo;
- f) Pesquisar a atividade antitumoral, *in vivo* e *in vitro*, de *G. lucidum* frente a outras linhagens de células cancerosas, como melanomas, tumor de Walker, leucemias, entre outras;
- g) CHUNG e TONG (2005) reportam o efeito proliferativo e diferenciador de esporos de *G. lucidum* sobre células tronco neurais, em animais com dano

medular. Investigar o efeito de metabólitos purificados de *G. lucidum* sobre a diferenciação de outras linhagens de células tronco;

- h) Pesquisar a atividade inibidora de metabólitos de *G. lucidum* sobre diferentes classes de metaloproteases;
- i) YANAI et al. (1995) reportam atividade antimicrobiana de um organismo resultante da fusão de células de *Grifolla umbellata* e *G. lucidum*. Este resultado indica a possibilidade de se obter organismos híbridos através de cultivos mistos de *G. lucidum* com outros basidiomicetos.

**REFERÊNCIAS**

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.
- AGGARWAL, B. B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Cytokin Netw.**, v. 7, n. 93, 1996.
- ADASKAVEG, J. E.; GILBERTSON, R. L. Cultural studies of four North American species in the *Ganoderma lucidum* complex with comparisons to *G. lucidum* and *G. tsugae*. **Mycol. Res.**, v. 92, p. 182-191, 1989.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informe técnico 6**. Brasília, 2003. Disponível: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/06\\_310103.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/06_310103.htm) Acessado em 20 set. 2005.
- ALBERT, A. W.; MacDONALD, J. S.; TILL, A. E.; TOBERT, J. A. Lovastatin. **Cardiol. Drug Rev.**, v. 7, p. 89-109, 1989.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. p. 1195-1254.
- ALBRECHT, J. T. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematol. Oncol. Clin. Noth. Am.** v. 10, n. 4, p. 791-800, 1996.
- ALTSCHUL, R.; HOFFER, A.; STEPHEN, J. D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 54, p. 558-559, 1955.
- AKEWANLOP, C.; WATANABE, M.; SINGH, B.; WALKER, M.; KUFE, D. W.; HAYES, D. F. Phagocytosis of breast cancer cells mediated by anti-*MUC-1* monoclonal antibody, DF3, and its bispecific antibody. **Cancer Res.**, v. 61, p. 4061-4065, 2001.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup>. ed., v. 1 and 2, Gaithersburg, 2000.
- BACKMAN, K. A.; GUYRE, P. M. Gamma-interferon inhibits Fc receptor II-mediated phagocytosis of tumor cells by human macrophages. **Cancer Res.**, v. 54, n. 9, p. 2456-2461, 1994.

- BAKKER, S. J. L.; IJZERMAN, R. G.; TEERLINK, T.; WESTERHOFF, H. V.; GANS, R. O. B.; HEINE, R. J. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and  $\beta$ -cell failure? **Atherosclerosis**, v. 148, p. 17-21, 2000.
- BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology – immunomodulation and immunotherapy. **JAMA**, v. 278, n. 22, p. 2008-2017, 1997.
- BALKWILL, F.; BURKS, F.; TALBOT, D. Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. **Lancet**, v. 11, p. 3229, 1987.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, 1998.
- BAO, X.; DUAN, J.; FANG, X.; FANG, J. Chemical modifications of the (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. **Carbohyd. Res.**, v. 336, p. 127-140, 2001a.
- BAO, X.; LIU, C.; FANG, J.; LI, X. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohyd. Res.**, v. 332, p. 67-74, 2001b.
- BAO, X. F.; WANG, X. S.; DONG, Q.; FANG, J. N.; LI, X. Y. Structural features of immunological active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 175-181, 2002.
- BARNHART, J. W.; SEFRANKA, J. A.; McINTOSH, D. D. Hypocholesterolemic effect of 4,4'-(isopropylidenedithio)-bis(2,6-di-t-butylphenol) (probucol). **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 23, p. 1229-1233, 1970.
- BARKIA, A.; ZOUARI, N.; KHROUF, W.; ELLOUZ, F.; ZOUAGHI, H. Reduction of lipoproteins with apoAI (LpAI) in non-insulin-dependent diabetic patients. **Ann. Biol. Clin.** V. 54, n. 2, p. 83-86, 1996.
- BARTER, P. Anti-atherogenic effects of fibrates in type 2 diabetes. **Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine**, v. 2, n. 5, 2001. Disponível em: <http://cvm.controlled-trials.com/content/2/5/218>.
- BAZALO, M.E.; WRIGHT, J.E. Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. **Mycotaxon**, v. 16, p. 293-325, 1982.
- BEAUX, M. R.; SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; TONIAL, T. M.; ROUSSOS, S. Cultivation of *Lentinus edodes* on mixture of cassava and sugarcane bagasse. In: **Advances in solid state fermentation**, London: Kluwer Academic, 1997, p. 501-513.

BERGER, A.; REIN, D.; KRATKY, E. Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* *in vitro*, *ex vivo*, and in hamsters and minipigs. **Lipids Health and Dis.**, v. 3, 2004. Disponível em: <http://www.lipidworld.com/content/3/1/2>. Acesso em: abril 2005.

BEROVIC, M.; HABIJANIC, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODZAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **J. Biotechnol.**, v. 103, p. 77-86, 2003.

BIRCH, D.J.; FARLEY, K. F.; BECKER, G. J. et al. **Microscopia urinária – texto e atlas**. Brasil: Premiere, 2001.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G. I.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix Metalloproteinases: A review. **Oral Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BOBEK, P.; OZDIN, L.; GALBAVY, S. Dose-and time –dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. **Nutrition**, v. 14, n. 3, 1998.

BOBEK, P.; OZDIN, L.; KUNIAK, L. Effect of oyster mushroom and isolated  $\beta$ -glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet. **Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 469-471, 1997.

BOONE, C. W.; KELLOFF, G. J.; MALONE, W. E. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animals models and human clinical trials. A review. **Cancer Res.**, v. 50, p. 2-9, 1990.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, E. Mushrooms, tumos, and immunity: an update. **Exp. Biol. Med.**, v. 229, p. 393-406, 2004.

BRENNER, B. M.; LEVINE, S. A. **Brenner & Rector – The Kidney**. 7. ed. Philadelphia: Sunders Company, 2004.

BUCHANAN, P. K. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with special reference to species of medicinal and nutraceutical importance. **Proc. Int. Symposium Ganoderma Sci**, Auchland, 27-29 April, 2001. Disponível em: <http://www.ganopoly.com>.> Acesso em 05 fev. 2004.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz – Fundamentos de química clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

CAHLIN, C.; KÖRNER, A.; AXELSSON, H.; WANG, W.; LUNDHOLM, K.; SVANBERG, E. Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, Interferon- $\gamma$ , and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 B1 background and eicosanoid-dependent cachexia. **Cancer Res.**, v. 60, p. 5488-5493, 2000.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GODMAN; GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S. **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 96-124.

CAO, L. Z.; LIN, Z.B. Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Immunol. Lett.**, v. 83, p. 163-169, 2002.

CAO, L. Z.; LIN, Z. B. Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells *in vitro*. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24, n. 4, p. 321-326, 2003.

CARLSON, L. A.; BOTTIGER, L. E. Serum triglycerides, to be or not to be a risk factor for ischaemic heart disease? **Atherosclerosis**, v. 39, p. 287-291, 1981.

CARVALHO, J. C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná.

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol.**, v. 87, p.113-130, 1990.

CHEN, C. C.; CHOU, C. Y.; SUN, Y. T.; HUANG, W. C. Tumor necrosis  $\alpha$ -induced activation of downstream NF- $\kappa$ B site of the promoter mediates epithelial ICAM-I expression and monocyte adhesion: involvement of PKC $\alpha$ , tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. **Cell. Signal.**, v. 13, p. 543-553, 2001.

CHEN, H. S.; TSAI, Y. F.; LIN, S.; LIN, C. C.; KHOO, K. H.; LIN, C. H.; WONG, C. H. Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. **Biorgan. Med. Chem.**, v. 12, p. 5595-5601, 2004.

CHEUNG, N. K.; MODAK, S.; VICKERS, A.; KNUCKLES, B. Orally administered  $\beta$ -glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 51, p. 557-564, 2002.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. **Nutr. Res.**, v. 16, n. 10, p. 1721-1725, 1996a.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutr. Res.**, v. 16, n. 11/12, p. 1953-1957, 1996b.

CHEUNG, H.Y.; NG, C.W.; HOOD, D.J. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and *Ganoderma* capsules by micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatography A**, v. 911, p. 119-126, 2001.

CHEUNG, W. M. W.; HUI, W. S.; CHU, P.W. K.; CHIU, S. W.; IP, N. Y. *Ganoderma* extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. **Febs Letters**, v. 486, p. 291-296, 2000.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA. Fractionation and purification of polysaccharides with market antitumor activity, specially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). **Cancer Res.**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CHIU, S.W.; WANG, Z.M.; LEUNG, T.M.; MOORE, D. Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p.173-178, 2000.

CHUNG, C. K.; TONG, S. K. **Effects of sporoderm-broken germination activated *Ganoderma* spores on promotion of proliferation and/or differentiation of neural stem cells in injured spinal cord.** Int. A61K 035/84. U.S. 424/195.15. 8 January 2004, 3 February 2005.

CHUNG, W.T.; LEE, S.H.; KIM, J.D.; PARK, Y.S.; HWANG, B.; LEE, S.Y.; LEE, H.Y. Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 92, n. 6, p.550-555, 2001.

CIMERMAN, N. G.; CIMERMAN, A. *Pleurotus* fruiting bodies contain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. **Experimental Mycology**, v. 19, p. 1-6, 1995.

COLIGAN, J. E.; KRUISBECK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVCH E. M.; STROBER W. **Current protocols in immunology**. New York: National Institutes of Health, 1992.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994, p. 240-303.

CORNER, E.J.H. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, v. 75, p. 1-182, 1983.

DAVIES, C. C.; BEM, D.; YOUNG, L. S.; ELIOPOULOS, A. G. NF- $\kappa$ B overrides the apoptotic of TNF receptor 1 but not CD40 in carcinoma cells. **Cell. Signal.**, v. 17, p. 729-738, 2005.

DORR, R. T. Interferon- $\alpha$  in malignant and viral diseases. **Drugs**, v. 45, p. 177-211, 1993.

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, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUVILLARD, L.; PONT, F.; FLORENTIN, E.; GAMBERT, P.; VERGES, B. Significant improvement of apolipoprotein B-containing lipoprotein metabolism by insulin treatment in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 43, n. 1, p. 27-35, 2000.

EHRNREICH, H. Foods as medicine. **The World of Food Ingredients**, p. 18-28, 2000.

EO, S. K.; KIM, Y. S.; LEE, C. K.; HAN, S. S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 175-181, 1999.

ERWIG, L. P.; KLUTH, D. C.; WALSH, G. M.; REES, A. J. Initial cytokines exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J. Immunol.** v. 161, n. 4, p. 1983-1988, 1998.

FANG, Q. H.; TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochem.**, v. 37, p. 1375-1379, 2002.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. **Biochem. Eng. J.**, v. 10, p. 61-65, 2002a.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 51-54, 2002b.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 571-611, 1993.

FELESZKO, W.; BALKOWIEC, E. Z.; SIEBERTH, E.; MARCZAK, M.; DABROWSKA, A.; GIEMASZ, A. Lovastatin and tumor necrosis factor- $\alpha$  exhibit potentiated antitumor effects against Ha-*ras*-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 81, p. 560-567, 1999.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v. 199, p. 197-227, 2001.

FRENDSCHO, M. H.; KINO, K.; SONE, T.; JARDIEU, P. Ling Zhi-8: A novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. **Cell. Immunol.**, v. 150, p. 101-113, 1993.

GADES, M. D.; STERN, J. S. Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men. **Obesity Research**, v. 11, n. 5, p. 683-687, 2003.

GAO, J. J.; MIN, B. S.; AHN, E. M.; et al. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n. 6, p. 837-840, 2002a.

GAO, Y.; DAI, X.; CHEN, G.; YE, J.; ZHOU, S. A randomized, placebo-controlled, multicenter study of *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllorphoromycetidae) polysaccharides (Ganopoly®) in patients with advanced lung cancer. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 5, n.5, 2003.

GAO, Y.; LAN, J.; DAI, X.; YE, J. ZHOU, S. A phase I/II study of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr) Lloyd (Aphyllorphoromycetidae) Extract in patients with type II diabetes mellitus. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 6, n. 1, 2004.

GAO, Y.; LAN, J.; GAO, H.; LIU, Z. Extraction and determination of *Ganoderma* polysaccharides. **Int. J. Med. Complement Med**, v. 1, n. 1, 2000.

GAO, Y.; ZHOU, S.; WEN, J.; HUANG, M.; XU, A. Mechanism of the antiulcerogenic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on indomethacin-induced lesions in the rat. **Life Sci.**, v. 72, p. 731-745, 2002b.

GATELY, S.; TWARDOWSKI, P.; STACK, M.S.; CUNDIFF, D.L.; GRELLA, D.; CESTELLINO, F.S.; ENGHILD, J.; KWAAN, H.C.; LEE, F.; KRAMER, R.A.; VOLPERT, O.; BOUC, N.; SOFF, G. A. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 10868-10872, 1997.

GIANNI, M.; ZANOTTA, S.; TERAPO, M.; RAMBALDI, A.; GARATTINI, E. Interferons induce normal and aberrant retinoic-acid receptors type  $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia cells: potentiation of the induction of retinoid-dependent differentiation markers. **Int. J. Cancer**, v. 68, p. 75-83, 1996.

GINER-LARZA, E. M.; MÁÑEZ, S.; GINER-PONS, R.; RECIO, M. C.; RÍOS, J. L. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A<sub>2</sub> activity of extracts from lanostane-rich species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 61-69, 2000.

GOLDSTEIN, J. L.; KITA, T.; BROWN, M. S. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. **N. Engl. Med.**, v. 309, p. 288-295, 1983.

GONG, P.; GUAN, X.; WITTER, E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. **Applied Soil Ecology**, v.17, p. 285-289, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HA, T. B.; GERHÄUSER, C.; ZHANG, W. D.; et al. New lanostanoids from *Ganoderma lucidum* that induce NAD(P)H:quinone oxidoreductase in cultured hepatic murine hepatoma cells. **Planta Med.** v. 66, n. 6, p. 681-684, 2000.

HABIJANIC, J.; BEROVIC, M. The relevance of solid-state substrate moistening on *Ganoderma lucidum* biomass cultivation. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 38, n.3, p. 225-228, 2000.

HASHIM, S. A.; van ITALLIE, T. B. Cholestyramine resin therapy for hypercholesterolemia: clinical and metabolic studies. **J.A.M.A.**, v. 192, p. 289-293, 1965.

HATTORI, K.; HIROSHI, M.; KAZUHISA, O. **Matrix metalloprotease inhibitor**. A61K035/72, U. S. 20050037024, fev., 2005.

HEM, L. G. van der; VLIET, J. A. Vander; BOCKEN, F. M.; KINO, K.; HOITSMA, A. J.; TAX, W. J. M. Ling zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. **Transplantation**, v.60, n. 5, p. 438-443, 1995.

HOLSTEIN, S. A.; HOHL, R. J. Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in human. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 141-149, 2001.

HONG, F.; HANSEN, R. D.; YAN, J.; ALLENDORF, D. J.; BARAN, J. T.; OSTROFF, G. R.; ROSS, G. R.  $\beta$ -glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. **Cancer Res.**, v. 63, p.9023-9031, 2003.

HONG, F.; YAN, J.; BARAN, J. T.; ALLENDORF, D. J.; HANSEN, R. D.; OSTROFF, G. R.; XING, P. X.; CHEUNG, N. K. V.; ROSS, G. D. Mechanism by which orally administered  $\beta$ -1,3-Glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **J. Immunol.**, v. 173, p. 797-806, 2004.

HSEU, R.S. Recent advances in molecular systematic of the *Ganoderma lucidum* complex, 1997. Disponível em: < <http://www.canited.com/reishi97d-8htm>.> Acesso em 22 dez. – 2003.

HSEU, R. S.; WANG, H. H.; WANG, H. F.; MONCALVO, J. M. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 1354-1363, 1996.

HSU, H. Y.; HUA, K. F.; LIN, C. C.; LIN, C. H.; HSU, J.; WONG, C. H. Extract of Reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways, **J. Immunol.**, v. 173, p. 5989-5999, 2004.

HSU, M. J.; LEE, S. S.; LIN, W.W. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/AKT signaling pathway. **J. Leuk. Biology**, v. 72, n.1, p. 207-216, 2002.

IWARI, R. K. T.; GELIEBTER, J.; GARIKAPATY, V.P.S.; YEDAVELLI, S. P. K.; MITTELMAN, S. C. Pc spes 3: induction of apoptosis. **Int. J. Oncol.**, v. 14, p. 713-719, 1999.

JAKÓBISIAK, M.; BRUNO, S.; SKIERSKI, J. S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 3628-3632, 1991.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R. C.; GHAFOR, A.; FEUER, E. J.; THUN, M. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 10-30, 2005.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 101-134, 1992.

JULICH, W. Higher taxa of basidiomycetes. **J. Cramer**. 485 p., 1981.

KABIR, Y.; KIMURA, S.; TAMURA, T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, 34, p. 433-438, 1988.

KABIR, Y.; YAMAGUCHI, M.; KIMURA, S. Effect of Shiitake (*Lentinus edodes*) and (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 33, p. 341-346, 1987.

KARSTEN, P. Enumeratio boletinearum et Polyporearum Fennicarum, systemate novo dispositarum. **Revue Mycologie** (Toulouse), v. 3, p. 1-19, 1881.

KAWAGISHI, T.; MITSUNAGA, S. I.; YAMAWAKI, M.; IDO, M.; SHIMADA, A.; KINOSHITA, T.; MURATA, T.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 7-10, 1997.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 1, p.4-27, 2000.

KIM, Y. S.; EO, S. K.; OH, K. W.; LEE, C. K.; HAN, S. S. Antiherpetic activities of acid protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 451-458, 2000.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; PARK, J.P.; CHO, Y.J.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. Blackwell Synergy. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.34, n. 1, p. 56, 2002.

KIM, D.H.; SHIM, S.B.; KIM, N.J.; JANG, I.S. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, n. 2, p. 162-164, 1999.

KINO, K.; YAMASHITA, A.; YAMAOKA, K. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. **J. Biol. Chem.**, p. 264-472, 1989.

KINO, K.; SONE, T.; WATANABE, J.; YAMASHITA, A.; TSUBOI, H.; MIYAJIMA, H.; TSUNOO, H. Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 13, n. 8, p. 1109-1115, 1991.

KODAMA, T., TAKEDA, K., SHIMOZATO, O., HAYAKAWA, Y., ATSUTA, M., KOBAYASHI, K., ITO, M., YAGITA, H., OKUMURA, K. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1390, 1999.

KOJI, H.; HIROSHI, M.; KAZUHISA, O. **Matrix metalloprotease inhibitor**. Int. A61K 035/72. U.S. n. 424/195.16. 27 September 2002, 4 October 2005.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v. 73, p. 85-90, 1982.

LAMEIRE, N.; van BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. **Lancet**, v. 365, p. 417-427, 2005. Disponível em: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com).

LAW, M. R.; WALD, N. J.; THOMPSON, S. G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease?. **BMJ.com.**, v. 308, p. 367-372, 1994.

LEE, J.M.; KWON, H.; JEONG, H.; LEE, J.W.; LEE, S.Y.; BAEK, S.J.; SURH, Y. J. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. **Phytother. Res.**, v. 15, n.3, p. 245-249, 2001.

LEE, M.K.; LEE, S.Y.; LEE, H.Y. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 88, n. 6, p. 646-650, 1999.

LEE, H.; SONG, M.; HWANG, S. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochem.**, v. 00, p. 1-9, 2003.

LEE, H.; SONG, M.; YU, Y.; HWANG, S. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. **Biochem. Eng. J.**, v. 3697, p. 1-7, 2003a.

LEE, S.; PARK, S.; OH, J. W.; YANG, C. H. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. **Planta Med.**, v. 64, p. 303-308, 1998.

LEE, S.S.; LEE, P.L.; CHEN, C.F.; WANG, S.Y.; CHEN, K.Y. Antitumor effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllphoromycetideae). **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 5, n.1, 2003b.

LEIFA, F. Production of extra-cellular polysaccharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state culture and its antitumor effect. Curitiba, 2003, 111 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná.

LEIFA, F.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A. L.; SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. LPB 03 (*Agaricomycetideae*) in submerged fermentation and its antitumor effect. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 5, p. 17-23, 2003.

LEWIS, V. A.; KOCH, T.; PLUTNER, H.; MELLMAN, I. A complementary DNA clone for a macrophage-lymphocyte Fc receptor. **Nature**, v. 324, p. 372-375, 1986.

LIN, S.B.; LI, C.H.; LEE, S.S.; KAN, L.S. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. **Life Sci.**, v. 72, p. 2381-2390, 2003.

LINDBLUM, C. M.; WACHENFELDT, E.; TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **J. Microbiol. Methods**, v. 59, p. 253-262, 2004.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH . The pharmacological potential of mushrooms. **eCAM**, v.2, n. 3, p. 285-299, 2005.

LIU, F.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. **Life Sci.**, v. 60, n. 10, p. 763-771, 1997.

LIU, X. L.; YUAN, J. P.; CHUNG, C.K.; CHEN, X. J. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. **Cancer Lett.**, v. 182, p. 155-161, 2002.

LU, H.; KYO, E.; UESAKA, T.; KATOH, O.; WATANABE, H. Prevention of development of N,N'-dimethylhydrazine-induced colon tumors by a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in male ICR mice. **Int. J. Mol. Medicine**, v. 9, p. 113-117, 2002.

LU, H.; KYO, E.; UESAKA, T.; KATOH, O.; WATANABE, H. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxy-methane-induction of colon cancers in male F344 rats. **Oncol. Rep.**, v.10, p. 375-379, 2003.

LUO, J.; ZHAO, Y. Y.; LI, Z. B. A new lanostane-type triterpene from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 4, n. 2, p. 129-134, 2002.

LUZ, P. L. Atherosclerose: aspectos atuais. **Atheros**, v. 4, n. 1, p. 14-17, 1993.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, p. 622-630, 1988.

MALORNI, W.; RAINALDI, G.; TRITARELLI, E.; RIVABENE, R.; CIANFRIGLIA, M.; LEHNERT, M.; DONELLI, G.; PESCHELE, C.; TESTA U. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is a powerful apoptotic inducer in lymphoid leukemic cells expressing the p-170 glycoprotein. **Int. J. Cancer**, v. 67, p. 238-247, 1996.

McENTEE, M. F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p. 380-387, 2002.

McEVOY, G. K. **AHFS Drug information**. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2002.

McGUFFIN, M.; YONG, A. L. Premarket notifications of new dietary ingredients – a ten-year review. Food and Drug Administration. Disponível em : <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/04n0454/04n-0454-bkg0001.pdf>. Acessado em 20 set. 2005.

McNEELA, E. A; MILLS, K. H. G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 51, p. 43-54, 2001.

MELLO, I. Studies on the Aphyllophorales of Portugal: the genus *Ganoderma*. **Int. J. Mycology and Lichenology**, v. 2, p. 183-204, 1986.

MEKKAWY, S. E.; MESELHY, M. R.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1 protease substances from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1651-1657, 1998.

MIN, B.S.; GAO, J.J.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 48, n. 7, p. 1023-1033, 2000.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. HL.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R.; ANDERSON, R.M. **Medical Microbiology**. Hong Kong: Mosby-Year Book Europe. 1993. p. 12.1-14.6.

MIN, B.S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; BAE, K.W.; HATTORI, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 46, n. 10, p. 1607-1612, 1998.

MINNICH, A.; ZILVERSMIT, D. B. Impaired triacylglycerol catabolism in hypertriglyceridemia of the diabetic, cholesterol-fed rabbit: a possible mechanism for protection from atherosclerosis. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1002, n. 3, p. 324-332, 1989.

MIZUNO, T. Farmacological effect and nutritional aliment of mushrooms. **Chemical Times**, v. 131, p.12-21, 1989.

MIZUNO, T. Bioactive substances and medicinal effects of the Reishi. Disponível em : <<http://www.toi-reishi.com>. > Acesso em 05 fev. 2004.

MIZUNO, T; KAWAGISHI, H; ITO, H; SHIMURA, K. Antitumoral activity and structural features of some glucans obtained from fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill **Proceeding of the 10<sup>th</sup> Symposium of the Sugar**, Japan, 1987.

MIZUNO, T. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. **Foods Food Ingrid. J. Jpn.** V. 167, p. 69-85, 1996.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. **Food Rev. Int.**, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 47, n. 4, p. 707-714, 1999.

MIZUSHINA, Y.; TAKAHASHI, N.; HANASHIMA, L.; KOSHINO, H. Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. **Bioorg. Med. Chem.** V. 7, p. 2047-2052, 1999.

MIZUSHINA, Y.; WATANABE, I.; TOGASHI, H. et al. An ergosterol peroxide, a natural product selectively enhances the inhibitory effect of linoleic acid on DNA polymerase beta. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 5, p. 444-448, 1998.

MONCALVO, J. M.; RYVARDEN, L. A nomenclatural study of the *Ganodermataceae* Donk. **Synopsis Fungorum**, v. 11, p. 1-114, 1997.

MONCALVO, J.M.; WANG, F.H. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences: comparison with traditional taxonomic characters. **Mycol. Res.**, v. 99, n. 12, p. 1489-1499, 1995.

MONTGOMERY, H. J.; MONREAL, C. M.; YOUNG, J. C.; SEIFERTD, K. A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1207-1217, 2000.

MURRIL, W.A. The polyporaceae of North America . I. The genus *Ganoderma*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 29, p. 599-608, 1902.

MUTO, Y.; NINOMIYA, M.; FUJIKI, H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 219-224, 1989.

NESS, G. C.; GERTZ, K. R.; HOLLAND, R. C. Regulation of hepatic lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase gene expression by dietary cholesterol and cholesterol-lowering agents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 395, n.2, p. 233-238, 2001.

NG, T. B. A review of research on the protein-bound polysaccharide (Polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (*Basidiomycetes: Polyporaceae*). **Gen. Pharmacol.**, v. 30, p. 1-4, 1998.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 314, p. 988-993, 2004.

O'BRIEN, T.; NGUYEN, T. T.; HALLAWAY, B. J.; HODGE, D.; BAISLEY, K.; KOTTKE, B. A. HDL subparticles and coronary artery disease in NIDDM. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 2, p. 285-291, 1996.

OOI, V.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. **Int. J. Med. Mushrooms**, v.1, p. 195-206, 1999.

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. **Nature Rev. Immunol.**, v. 2, p. 37-45, 2002.

PADAYATTY, S. J.; MARCELLI, M.; SHAO, T. C.; CUNNINGHAM, G. R. Lovastatin-induced apoptosis in prostate stromal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 5, p. 1434-1439, 1997.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUES-LEÓN, J. A., NIGAM, P. Solid-state fermentation in biotechnology – Fundamentals & Applications. New Delhi: Asiatech, 2001.

PATOCKA, J. Anti-inflammatory triterpenoids from mysterious mushroom *Ganoderma lucidum* and their potential possibility in modern medicine. **Acta Medica**, v. 42, n. 4, p. 123-125, 1999.

PEGLER, D.N.; YOUNG, T.W.K. Basidiospore form in the British species of *Ganoderma* Karst. **Kew Bulletin**, v. 28, p. 351-364, 1973.

PERUSSIA, B.; TUTT, M. M.; QIU, W. Q.; KUZIEL, W. A.; TUCKER, P. W.; TRINCHIERI, G.; BENNETT, M.; RAVETCH, J. V.; KUMAR, V. Murine natural killer cells express functional Fc $\gamma$  receptor II encoded by the Fc $\gamma$ R $\alpha$  gene. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 73-86, 1989.

PEZZUTO, J. H. Plant-derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 121-133, 1997.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n. 3, 1998. Disponível: <http://www.ejbitechnology.info>

RAO, K. J.O.; KIM, C. H.O.; RHEE, S. K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. **Process Biochem.**, v. 35, p. 639-647, 2000.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J. Nutr.**, v. 127, p. 838s-841s, 1997.

ROSENBERG, S. A. Principles and applications of biologic therapy. In: DE VITA, V. T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S. A. (eds.). **Cancer: principles & practice of oncology**. 4. ed., Philadelphia: J. B. Lipincott, 1993, p. 276-292.

ROSENBERG, S.; LOTZE, M.; MUUL, L. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 313, p. 1485-1492, 1985.

RUDDLE, N. H. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 327-332, 1992.

RYVARDEN, L. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. **Synopsis fungorum**, v. 5, p. 1-363, 1991.

SASAKI, T.; FUKAI, N.; MANN, K.; GOHRING, W.; OLSEN, B.R.; TIMPL, R. Structure function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVII containing the inhibitor endostatin. **EMBO Journal**, v. 17, p. 4249-4256, 1998.

SATO, S.; MILLER, A. S.; HOWARD, M. C.; TEDDER, T. F. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. **J. Immunol.**, v. 159, p. 3278-3287, 1997.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E.; HUBBARD, I. D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p. 1202-1203, 1979.

SELIGER, B.; MAUERER, M. J.; FERRONE, S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. **Immunology Today**, v. 21, p. 455-464, 2001.

SEO, G.S. *In vitro* photomorphogenesis and genetic diversity in the basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. Tottori, 1995. Tese (Doutorado) - Tottori University, Japan.

SEO, G. S.; KIRK, P. M. *Ganoderma*: nomenclature and classification. In: **Ganoderma diseases of perennial crops**. FLOOD, J.; HOLDERNESS, M. UK, Royal Garden Academy: CABI Bioscience, 2000. Disponível em: <<http://www.cabipublishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851993885/3885ch1>>. Acesso: 05 fev. 2004.

SEO, G.S.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. Effect of light on the formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum*. **Mycoscience**, v. 36, p. 227-233, 1995b.

SEO, G.S.; SHIN, L.G.C.; OTANI, H.; KOMADA, M.; KOHMOTO, K. Formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum* isolates on a nutrition agar media. **Mycoscience**, v. 36, p. 1-7, 1995a.

SHAO, B. M.; DAI, H.; XU, W.; LIN, Z. B.; GAO, X. M. Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 323, p. 133-141, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, p. 74-81, 1993.

SHEENA, N.; AJITH, T.A.; JANARDHANAN, K. K. Prevention of nephrotoxicity by the anticancer drug cisplatin, using *Ganoderma lucidum*, a medical mushroom in South India. **Current Sci.**, v. 85, n. 4, p. 478-482, 2003.

SHI, Y.L.; JAMES, A.E.; BENZIE, I.F.F.; BUSWELL, J.A. Mushroom-derived preparations in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to cellular DNA. **Teratogen. Carcin Mut.** V. 22, n. 2, p. 103-111, 2002.

SHIN, G.C.; PARK, Y.H.; SEO, G.S.; CHA, D.Y. Morphological characters of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karsten grown naturally in Korea. **Research Reports of Institute of Agricultural Science and Technology**, v. 13, p. 44-51, 1986.

SHIN, G.C.; SEO, G.S. Formation of the nonbasidiocarpous basidiospore of *Ganoderma lucidum*. **Korean Journal of Mycology**, v. 16, p. 230-234, 1988a.

SHIN, G.C.; SEO, G.S. Classification of strains of *Ganoderma lucidum*. **Korean Journal Mycology**, v. d16, p. 235-241, 1988b.

SHIN, G.C.; SEO, G.S. Effect of temperature and aeration on the formation of non-basidicarpus basidiospores of *Ganoderma lucidum*. **Korean Journal Mycology**, v. 17, p. 194-196, 1989.

SILVA, P. M. Estatinas: ações farmacológicas e características farmaco-cinéticas. **Revista da FML**, v.4, n. 5, p. 3344, 1999.

SIRIVICHAYAKUL, S. *In vitro* immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* extracts. Disponível em: <http://www.kyotan.com/lectures/Lecture14.html>. Acesso em 08 jan. 2004.

SLIVA, D.; LABARRERE, C.; SLINOVA, V.; SEDLAK, M.; LLOYD Jr., F. P.; HO, N. W. Y. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 298, p. 603-612, 2002.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Principles of Biochemistry**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1983.

SMYTH, M. J.; TANIGUCHI, M.; STREET, S. E. A. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2665-2670, 2000.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SONG, Y. S.; KIM, S. H.; SA, J. H.; JIN, C.; LIM, C. J.; PARK, E. H. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 17-20, 2004.

STAMETS, P. Evaluating a mushroom strain: photosensitivity. In: Growing gourmet and medical mushrooms. California: Ten Speed, p. 117-126, 1993a.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. The role of post-secretory structural modification of low density lipoprotein in atherogenesis. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, p. 915-924, 1989.

STEWARTT, H. L.; SNELL, K. C.; DUNHAN, L. S.; SCHYLEN, S. M. Transplantable and transmissible tumors of animals. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, 1959.

STEYAERT, R.L. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Lieden herbaria. **Persooni**, v. 7, p. 55-118, 1972.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. 9. ed. Stamford: Appleton & Lange. 1997. 900 p.

STRASINGER, S. K. **Uroanálise & Fluídos biológicos**. 3. ed., Brasil: Premier, 2000.

STASSMANN, G.; FONG, M.; KENNEY, J. S.; JACOB, C. O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **J. Clin. Invest.**, 89: 1681-1684, 1992.

SU, C.Y.; SHIAO, M.S.; WANG, C.T. Differential effects of Ganodermic Acid S on the thromboxane A2-signaling pathways in human platelets. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 587-595, 1999.

SU, C.Y.; SHIAO, M.S.; WANG, C.T. Potentiation of ganodermic acid S on prostaglandin E1-induced cyclic AMP elevation in human platelets. **Thromb. Res.**, v. 99, p. 135-145, 2000.

SU, C.H.; SUN, C.S.; JUAN, S.W.; HU, C.H.; KE, W.T.; SHEU, M.T. Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. **Biomaterials**, v. 18, n. 17, p. 1169-1174, 1997.

SWEETMAN, S. **Martindale: The complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press. Eletronic version, v. 20, Micromedex, Colorado, 2004.

TABATA, K.; ITOH, W.; KOJIMA, T.; KAWABATE, S.; MISAKI, K. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum communes* FRIES. **Carbohydr. Res.**, v. 89, p. 121-135, 1981.

TANG, Y.J.; ZHONG, J.J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganodermic acid. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 31, p. 20-28, 2002.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 32, p. 478-484, 2003.

TIAN, X.; LUN, Z.; WANG, J.; ITO, H.; SHIMURA, K. Clinical observation on treatment of acute non lymphocytic leukemia with *A blazei* **Journal of Lanzhou Medical College**, v. 20, n. 3, p. 169-171, 1994.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1997.

TOLOSA, L.; MORLÁ, M.; IGLESIAS, A.; BUSQUETS, X.; LLADÓ, J.; OLMOS, G. IFN- $\gamma$  prevents TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in C2C12 myotubes through down-regulation of TNF-R2 and increased NF- $\kappa$ B activity. **Cell. Signal.**, v.17, n.11, p.1333-1342, 2005.

TOMODA, M.; GONDA, R.; KASAHARA, Y.; HIKINO, H. Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Phytochemistry**, v. 25, n. 12, p. 2817-2820, 1986.

THORP, J. M.; WARING, W. S. Modification and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. **Nature**, v. 194, p. 948-949, 1962.

TSUKAGOSHI, S.; HASHIMOTO, Y.; FUJII, G.; KOBAYASHI, H.; NOMOTO, K.; ORITA, K. Krestin (PSK). **Cancer Treat. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 131-155, 1984.

UNIVERSITY OF MINESOTA. Cancer Center. **Flow Core User Handbook - FACSCalibur** . Disponível em: <http://www.cancer.umn.edu/page/cores/flowcyte.html>. Acesso em: 08 jul. 2004.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2004.

USDA Nutrient Database for Standard Reference, (2001). Disponível em: <http://www.unifesp.br/dis/serviços/nutri/nutri.phb>. Acesso em 09 fev. 2004.

USLU, R.; BONAVIDA, B. Involvement of the mitochondrion respiratory chain in the synergy achieved by treatment of human ovarian carcinoma cells line with tumor necrosis factor-alpha and cis-diammine dichloroplatinum (II). **Cancer**, v. 77, p. 725-732, 1996.

WACHTEL-GALOR, S.; SZETO, Y. T.; TOMLINSON, B.; BENZIE, I. F. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. **Int. J. Food Sci. Nutr.** v. 55, n. 1, p. 75-83, 2004.

WANG, L.; FENG, Q.; XU, X.; MA, H.; WANG, J.; ITO, H.; SHIMURA, K. Observation on the treatment effect of *A blazei* to the liver function of chronic hepatitis patients **Journal of Lanzhou Medical College**, v. 20, n.1, p. 24-26, 1994a.

WANG, S. Y.; HSU, M. L.; HSU, H. C.; TZENG, C. H.; LEE, S. S.; SHIAO, M. S.; HO, C. K. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. **Int. J. Cancer**, v. 70, p. 699-705, 1997.

WANG, Y.Y.; KHOO, K.H.; CHEN, S.T.; LIN, C.C.; WONG, C.H.; LIN, C.H. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. **Biorgan. Med. Chem.**, v. 10, p. 1057-1062, 2002.

WANG, J.; MAO, X.; CHENG, R.; WANG, J.Z.; ITO, H.; SHIMURA, K. Observation on treatment effect of *A blazei* against alimentary tract tumor. **Gansu Medical J.** V. 13, n. 1, p. 5-7, 1994b .

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. Review of medicinal mushrooms advances: good news from old allies. Disponível em: <http://abm.objectis.net/conceptos>. Acesso em: 05 maio 2005.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 65-96, 1999.

WILLIS, R. A. The spread of tumors in the human body. In: **Pathology of tumors**. 2. ed. London: Butterworth, 1952.

WOO, Y.A.; KIM, H.J.; CHO, J.H.; CHUNG, H. Discrimination of herbal medicines according to geographical origin with near infrared reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 21, p. 407-413, 1999.

YAMAMOTO, K.; ASAKAWA, H.; TOKUNAGA, K.; WATANABE, H.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; YAGI, N. Long-term ingestion of dietary diacylglycerol lowers serum triacylglycerol in type II diabetic. **Human Nutrition and Metabolism Research Communication**, v. 131, n. 12, p. 3204-3207, 2001.

YANAI, K.; YANAI, T.; YANAI, I. **Fungus obtained by the fusion of *Grifola umbellata* and *Ganoderma lucidum***. Int. A61K 037/00 U.S. 5,455,171. 15 November 1993, 3 October 1995.

YANG, F.C.; KE, Y.F.; KUO, S.S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme Microb. Tech.** v. 27, p. 295-301, 2000.

YANG, F. C.; LIAU, C. B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochem.**, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, v. 57, p.508-514, 1954.

YOU, Y.H.; LIN, Z.B. Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 23, n. 9, p. 787-791, 2002.

ZGANIACZ, A.; SANTOSUOSSO; WANG, J.; YANG, T.; CHEN, L.; ANZULOVIC, M.; ALEXANDER, S.; GICQUEL, B.; WAN, Y.; BRAMSON, J.; INMAN, M.; XING, Z. TNF- $\alpha$  is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n. 3, p. 401-413,2004.

ZHAO, J. D. The *Ganodermataceae* in China. **Bibliotheca Mycologica**, v. 132, p. 1-176, 1989.

ZHANG, G. L.; WANG, Y.H.; NI, W.; TENG, H.L.; LIN, Z.B. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 23, n. 9, p. 787-791, 2002b.

ZHANG, H.; LIN, Z. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 25, n. 2, 191-195, 2004.

ZHANG, J.; TANG, Q.; ZIMMERMAN-KORDMAN, M.; REUTTER, W.; FAN, H. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. **Life Sci.**, v. 71, p. 623-638, 2002a.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. **Cancer Res.**, v. 33, p. 2278-2282, 1973.