

VANESSA SOVRANI

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DO COGUMELO
Pholiota nameko



CURITIBA

2016

VANESSA SOVRANI

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DO COGUMELO

Pholiota nameko

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-Orientadora: Dra. Fhernanda Ribeiro Smiderle

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Sovrani, Vanessa

Caracterização estrutural de polissacarídeos do cogumelo *Pholiota nameko*. / Vanessa Sovrani. – Curitiba, 2016.
58f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcello Iacomini

Co-orientadora: Fhernanda Ribeiro Smiderle

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Cogumelos. 2. Glucanas. 3. Polissacarídeos. I. Título II. Iacomini, Marcello. III. Smiderle, Fhernanda Ribeiro. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

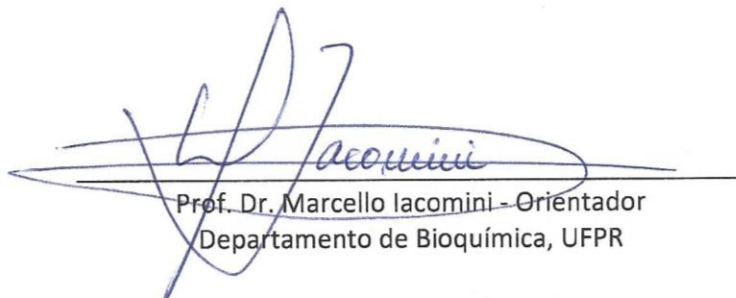
CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

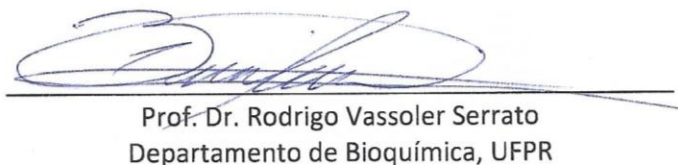
VANESSA SOVRANI

Caracterização Estrutural de Polissacarídeos do Cogumelo *Pholiota nameko*

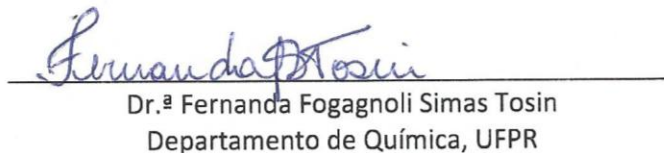
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Marcello Iacomini - Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato
Departamento de Bioquímica, UFPR



Dr.ª Fernanda Fogagnoli Simas Tosin
Departamento de Química, UFPR

Curitiba, 22 de março de 2016.

Dedico este trabalho às queridas pessoas
que estiveram comigo nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, por ter aceitado a orientação neste mestrado, por todos os ensinamentos e principalmente pela paciência e perseverança no decorrer do trabalho! Muito obrigada, professor! É um orgulho dizer que um dia fui sua orientada!

À minha co-orientadora, Dr.^a Fernanda Ribeiro Smiderle, por todo o auxílio, paciência e dedicação em todos os momentos, sempre apresentando soluções para vários problemas no laboratório. Obrigada por toda a paciência e incentivo durante este período!

À Dr.^a Fernanda Fogagnoli Simas Tosin, pelas correções do projeto e relatórios, além de todos os conselhos e dicas durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e do grupo de Carboidratos, dos laboratórios 252, 250, 247 e E1, mas sem esquecer também das minhas incríveis amigas dos laboratórios 248 e E3. Pessoal, sem vocês nem metade disto teria acontecido! Gratidão imensa a vocês!

Aos professores e alunos do grupo de pesquisa de Química de Carboidratos, pelo auxílio em inúmeros experimentos, pelo companheirismo e amizade do dia-a-dia e principalmente pela disposição em ajudar em todos os momentos. Vocês são incríveis!

À Empresa Nayumi Cogumelos, por gentilmente ceder o material de estudo.

Ao Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki e ao Dr. Arquimedes P. de Santana-Filho, pela disponibilidade para a realização das análises de RMN e auxílio em vários momentos para a compreensão dos resultados.

À Elisângela e Rosane pela realização das análises de HPSEC-MALLS e de GC-MS.

À minha mãe, Cândida, por sempre me apoiar em todas as escolhas e partilhar de todos os momentos. Obrigada mãe!

Ao meu querido e amado namorado, Vitor, pelo incansável apoio, paciência, carinho e amor durante esta jornada. Foi difícil, mas nós conseguimos!

À minha segunda mãe, Herta, por me apresentar aos encantos do mundo dos cogumelos e pelo apoio e amor, incondicionais e sempre presentes! Obrigada pelos ensinamentos e por todo o carinho distribuído a todos que precisam! Gratidão!

À minha irmã, Vânia, pelo incentivo e apoio em incontáveis momentos!

Às minhas lindas colegas de apartamento, principalmente a Jéssica, a segunda irmã que Curitiba me trouxe! Obrigada por ser essa pessoa encantadora e positiva, sempre oferecendo apoio, carinho e amizade para acalmar o dia!

Às minhas queridas amigas, Giselle, Jéssica e Simone, pelo carinho e apoio!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) por permitir e auxiliar na realização de tantos sonhos e trabalhos. Meu agradecimento a todos que pertencem ou em algum momento participaram deste Programa!

Ao CNPq e PRONEX-Carboidratos, pelo auxílio financeiro.

A todos que fizeram parte e colaboraram para a conclusão desta etapa!
Obrigada!

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

- Antoine de Saint-Exupéry-

RESUMO

Polissacarídeos fúngicos são polímeros estruturalmente variáveis, presentes na parede celular do basidioma ou como polissacarídeos excretados para o meio extracelular. Apresentam grande diversidade em relação ao número de unidades constituintes, configuração anomérica, posição e sequência de ligações glicosídicas ao longo da cadeia, grau de ramificação e conformação da cadeia. Para analisar os polissacarídeos presentes no basidioma de *Pholiota nameko* foram realizadas extrações sucessivas, sendo uma extração aquosa a temperatura ambiente, uma extração aquosa a quente e uma extração alcalina com KOH a 5%. O extrato aquoso a temperatura ambiente foi purificado através de congelamento/degelo e submetido à Precipitação com Solução de Fehling, originando duas frações (SCW-PF e SCW-SF), a partir das quais foram extraídos dois polissacarídeos, uma manogalactana e uma glucana. A manogalactana isolada, a partir da fração SCW-PF-P, apresenta unidades naturalmente metiladas, sendo constituída por unidades de 3-O-Me- α -Galp e α -Galp ligadas (1 \rightarrow 6), com unidades de α -Galp 2-O-substituídas por terminais não redutores de β -Manp. Além disso, foi isolada da fração SCW-SF-P uma glucana com cadeia principal ligada β -(1 \rightarrow 3), com substituições em O-6 por unidades de β -Glc p 6-O-substituídas e por terminais não redutores de Glc p. Os demais extratos, aquoso a quente e alcalino, não foram submetidos à purificação, porém apresentam em sua composição monossacarídica unidades de Man, Gal e Glc, e em seus espectros de ^{13}C -RMN semelhança estrutural às frações já isoladas.

Palavras-chave: Caracterização Estrutural, *Pholiota nameko*, Manogalactana, Glucana.

ABSTRACT

Fungal polysaccharides are structurally variable polymers found in the basidioma cell wall or secreted into the extracellular medium. They present a large diversity in the number of constituent units, anomeric configuration, position and sequence of glycoside bonds along the chain, degree of branching and conformation of the chain. To analyze the polysaccharides present in the basidioma of *Pholiota nameko*, successive extractions were made with one sample being in aqueous extraction at ambient temperature, another with aqueous extract and lastly in hot alkaline extraction with 5% KOH. The aqueous extract temperature was purified by freezing/thawing and subjected to precipitation with Fehling solution, yielding two fractions (SCW-PF and SCW-SF), from which were extracted two polysaccharides, a mannogalactan and a glucan. The mannogalactan isolated from the SCW-PF-P fraction has naturally methylated units being constituted of 3-O- α -Me-Galp and α -Galp linked (1 \rightarrow 6) with α -Galp 2-O substituted by the terminal non-reducing of β -Manp. Also it was isolated the fraction SCW-SF-P glucan with one main chain linked β -(1 \rightarrow 3), with substitutions at the O-6 by units of β -Glc_p 6-O-substituted and non-reducing terminals of Glc_p. The other extracts, aqueous hot and alkaline, were not submitted to purification, however show in their monosaccharide composition units of Man, Gal and Glc, and its ¹³C-NMR spectra structural similarity to the already isolated fractions.

Key-words: Structural characterization, *Pholiota nameko*, Mannogalactan, Glucan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Esquema da morfologia de membros do filo Basidiomycota.....	18
Figura 2	-	Esquema representativo do ciclo de vida de um cogumelo basidiomiceto.....	19
Figura 3	-	Basidiomas de <i>Pholiota nameko</i>	21
Figura 4	-	Esquema da estrutura de um homopolissacarídeo.....	24
Figura 5	-	Estrutura esquemática de um heteropolissacarídeo.....	26
Figura 6	-	Esquema geral das extrações do basidioma liofilizado de <i>Pholiota nameko</i>	33
Figura 7	-	¹³ C-RMN da fração bruta CW em Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	34
Figura 8	-	¹³ C-RMN das frações PCW (A) e SCW (B) em Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆ a 70°C, obtidas após fracionamento do extrato CW, obtido de <i>Pholiota nameko</i> , por congelamento e degelo.....	35
Figura 9	-	Esquema geral das etapas de purificação do extrato aquoso de <i>Pholiota nameko</i> obtido a temperatura ambiente (CW).....	36
Figura 10	-	¹³ C-RMN da fração SCW-PF (A) e SCW-SF (B) em Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆ a 70°C, obtidas através de Precipitação com Fehling.....	37
Figura 11	-	Fluxograma do processo de purificação da manogalactana extraída do cogumelo <i>Pholiota nameko</i>	38
Figura 12	-	¹³ C-RMN da fração SCW-PF-P em Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	39
Figura 13	-	Espectro de DEPT135-RMN da Manogalactana obtida de <i>Pholiota nameko</i>	40
Figura 14	-	Espectro de HSQC da manogalactana (SCW-PF-P) em DMSO deuterado a 70°C.....	41
Figura 15	-	Fluxograma do processo de purificação da glucana extraída do basidioma de <i>Pholiota nameko</i>	42
Figura 16	-	¹³ C-RMN da fração β-Glucana-(1,3)-(1,6) em Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	43
Figura 17	-	¹³ C-RMN da fração SCW-SF-P resistente à degradação controlada de Smith em Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	45

Figura 18 -	Espectro de HSQC da β -Glucana-(1,3)-(1,6) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C	46
Figura 19 -	Oligossacarídeo repetitivo da glucana obtida do basidioma de <i>Pholiota nameko</i>	46
Figura 20 -	^{13}C -RMN da fração HW bruta em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C	48
Figura 21 -	^{13}C -RMN da fração AK bruta em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição monossacarídica das frações SCW-PF e SCW-SF, obtidas após tratamento de Fehling da fração SCW.....	38
Tabela 2 -	Análise dos derivados metilados da fração SCW-PF-P obtida do basidioma de <i>Pholiota nameko</i>	40
Tabela 3 -	Análise dos derivados metilados da fração SCW-SF-P obtida do basidioma de <i>Pholiota nameko</i>	44
Tabela 4 -	Composição monossacarídica da fração HW.....	48
Tabela 5 -	Composição monossacarídica da fração AK.....	49

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E TERMOS

AK	Extrato alcalino a 5%
CW	Extrato aquoso obtido a temperatura ambiente
DMSO	Dimetilsulfóxido
Fucp	Fucose piranosídica
Galp	Galactose piranosídica
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
Glc p	Glucose piranosídica
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation</i>
HW	Extrato aquoso a quente
kDa	Quilodalton
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
Manp	Manose piranosídica
Me ₂ -SO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	Metanol
NaBD ₄	Borohidreto de sódio deuterado
PCW	Precipitado de gelo/degelo do extrato aquoso a temperatura ambiente
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
SCW	Sobrenadante de gelo/degelo do extrato aquoso a temperatura ambiente
SCW-PF	Precipitado de Fehling da fração SCW
SCW-PF-P	Manogalactana extraída de <i>Pholiota nameko</i>
SCW-SF	Sobrenadante de Fehling da fração SCW
SCW-SF-P	β -Glucana-(1,3)(1,6)
TFA	Ácido trifluoroacético
Xylp	Xilose piranosídica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	REINO FUNGI	17
2.2	COGUMELOS BASIDIOMICETOS	17
2.2.1	<i>Pholiota nameko</i>	20
2.3	POLISSACARÍDEOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS	22
2.3.1	Homopolissacarídeos	23
2.3.2	Heteropolissacarídeos	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	BASIDIOMAS	28
4.1.1	Obtenção dos Basidiomas	28
4.2	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	28
4.2.1	Deslipidificação com Clorofórmio-Metanol	28
4.2.2	Extração Aquosa à Temperatura Ambiente	28
4.2.3	Extração Aquosa a Quente	29
4.2.4	Extração Alcalina	29
4.3	PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	29
4.3.1	Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo	29
4.3.2	Purificação por Precipitação com Solução de Fehling	30
4.4	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	30
4.4.1	Hidrólise Ácida Total	30
4.4.2	Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise	30
4.4.3	Metilação dos Polissacarídeos	31
4.4.4	Degradação Controlada de Smith	31
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	32
4.5.1	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	32
4.5.2	Ressonância Magnética Nuclear	32

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	EXTRATO AQUOSO A TEMPERATURA AMBIENTE	33
5.1.1	Isolamento e caracterização estrutural da Manogalactana (fração SCW-PF-P)	38
5.1.2	Isolamento e caracterização da β -Glucana-(1,3)(1,6) (fração SCW-SF-P).....	42
5.2	EXTRATO AQUOSO A QUENTE	48
5.3	EXTRATO ALCALINO.....	49
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Cogumelos comestíveis são conhecidos há muito anos como um suplemento alimentar, devido a suas altas taxas de proteínas, carboidratos e fibras alimentares (CARBONERO et al., 2006; ZHAO; WANG; LU, 2009). Estes cogumelos tem causado um grande interesse na área biomédica, principalmente devido ao seu elevado teor de substâncias bioativas, especialmente polissacarídeos (ZHAO; WANG; LU, 2009). Os polissacarídeos fúngicos compreendem um grande grupo de biopolímeros com função estrutural na parede celular do basidioma ou exopolissacarídeos encontrados ligados à superfície das células e excretados para o meio extracelular (CAMELINI et al., 2005; GIAVASIS, 2014).

Polissacarídeos fúngicos são polímeros variáveis que, embora possam ser constituídos por apenas uma ou mais unidades monossacarídicas, apresentam grande diversidade em relação ao número de unidades constituintes, configuração anomérica, posição e sequência de ligações glicosídicas ao longo da cadeia, grau de ramificação e conformação da cadeia (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). A atividade biológica de diversos polissacarídeos pode ser influenciada principalmente por estas variações na estrutura química (BOT et al., 2001; XIAO et al., 2007) e em suas conformações tridimensionais (TAO et al., 2007). Além disso, a atividade biológica está diretamente associada ao peso molecular, composição química, estrutura do polímero e grau de ramificação da molécula (JIN et al., 2003; CUI et al., 2007).

Polissacarídeos dos basidiomas são principalmente glucanas e heteropolissacarídeos, constituídos por galactose, glucose, manose e fucose (SMIDERLE, 2012), enquanto polissacarídeos provenientes do micélio fúngico são principalmente glucanas, na forma de proteoglucanas ou heteroglucanas (ZAIMAN et al., 2005).

Para determinar a estrutura química exata destes polímeros vários métodos analíticos vêm sendo empregados, tais como análises de metilação, métodos de oxidação parcial e análise por ressonância magnética nuclear, sendo esta a mais eficaz atualmente, uma vez que proporciona a análise dos desvios e acoplamentos químicos, identificando unidades e suas formas anoméricas, além da posição de ligações glicosídicas ou substituintes (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

Para os basidiomicetos do gênero *Pholiota* são geralmente encontrados dados sobre atividades biológicas de extratos brutos de moléculas bioativas, tais como polissacarídeos. No entanto, o isolamento, purificação e proposição da estrutura química destas moléculas ainda não foram relatados. Os dados da literatura apresentam a composição monossacarídica, assim como análises espectrométricas destes polímeros (LI et al., 2007; LI et al., 2014). Grande parte da atividade biológica dos polissacarídeos está diretamente relacionada ao grau de ramificação, peso molecular e estrutura química da molécula. A extração, purificação e elucidação da estrutura química dos polissacarídeos isolados de *P. nameko* irá permitir a identificação destas moléculas presentes nos diferentes extratos obtidos desta espécie fúngica, além de contribuir para a investigação dos efeitos farmacológicos e mecanismos de ação destas moléculas em diversos processos biológicos avaliados em diferentes áreas de estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 REINO FUNGI

Os fungos representam um conjunto heterogêneo de organismos eucarióticos, unicelulares e pluricelulares, encontrados em ambientes distintos e conhecidos devidos à sua importância biológica, industrial e farmacológica (MORETTI; SARROCCO, 2016). Pertencem a este grupo organismos com estruturas microscópicas e macroscópicas, sendo seus principais representantes as leveduras, bolores e cogumelos.

Desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica, auxiliando na troca e reciclagem de nutrientes. Podem formar associações simbióticas ou de parasitismo com plantas, animais e outros fungos. São utilizados como fonte direta de alimentação, no caso de cogumelos e trufas, e na fermentação de vários produtos alimentícios, tais como pães, vinhos e cerveja, além de possuírem compostos bioativos, tais como ergosterol e polissacarídeos, que podem ser utilizados de forma nutracêutica ou na formulação de alimentos, medicamentos e compostos de interesse industrial.

Dentre os representantes deste grupo, são denominados cogumelos as frutificações macroscópicas de alguns fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo os basidiomicetos constituintes da grande maioria de biomassa viva do solo, constituindo também um dos filos mais abundantes do Reino Fungi.

2.2 COGUMELOS BASIDIOMICETOS

Membros do filo Basidiomycota são comumente referidos como basidiomicetos. Estes constituem um amplo e diverso grupo de organismos, que incluem formas conhecidas como cogumelos comestíveis e venenosos, gasteromicetos, orelhas-de-pau, bem como dois grupos fitopatogênicos, as ferrugens e os carvões (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; ALEXOPOULUS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Assim como os demais pertencentes do Reino Fungi são organismos denominados saprófitas, porque decompõem substratos orgânicos. Apresentam, em sua maioria, uma frutificação macroscópica, denominada basidiocarpo ou basidioma, constituída por um píleo ou chapéu, apoiado sobre um estipe (Figura 1). No início do seu desenvolvimento o cogumelo pode apresentar um

envoltório membranoso, que se rompe com o seu crescimento, porém permanece em algumas espécies como uma bainha protetora na região superior do píleo, formando o anel, ou na base do estipe, formando a volva. Em algumas espécies a face inferior do píleo apresenta estruturas radiadas chamadas de lamelas, responsáveis pela dispersão dos basidiósporos (PUTZKE; PUTZKE, 1998; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

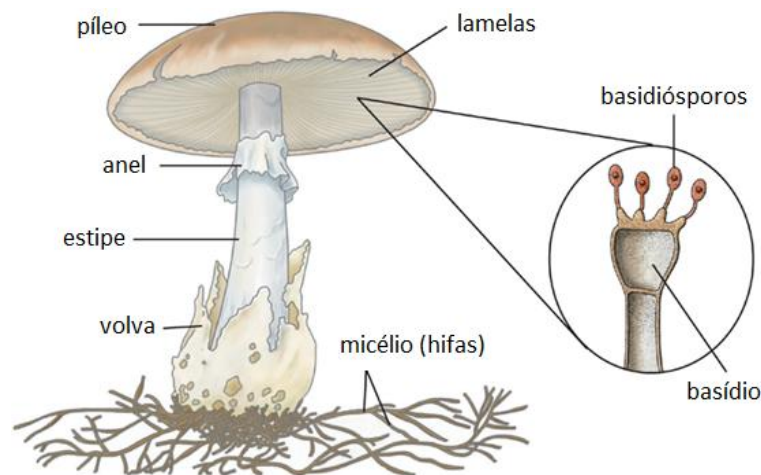


Figura 1. Esquema da morfologia de membros do filo Basidiomycota.

Fonte: Adaptado de: <http://cienciaybiologia.com>, acesso em 18/12/2015.

Basidiomicetos são caracterizados primariamente pela produção de esporos sexuais, denominados basidiósporos, que são produzidos pelo basídio (Figura 2). Quando o basidiósporo germina, dá origem ao micélio, que pode ser inicialmente multinucleado, sendo sempre septado e com septos perfurados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Na maioria dos Basidiomycota, o micélio passa por duas fases distintas, monocariótica e dicariótica. Após a germinação do basidiósporo, os septos são formados e o micélio é dividido em células monocarióticas, sendo então chamado de micélio primário. O micélio secundário é originado da fusão das hifas monocarióticas de diferentes linhagens, ainda sem a ocorrência de cariogamia, originando um micélio secundário dicariótico. A formação do basidioma ocorre com o micélio terciário, que posteriormente irá sofrer cariogamia e meiose de cada núcleo diplóide, originando quatro núcleos haploides. Cada um desses quatro núcleos migra para a extremidade, alargando-se e formando um basidiósporo uninucleado e haploide (Figura 2) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

O grupo dos basidiomicetos inclui aproximadamente 22 000 espécies documentadas (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001), sendo a taxa reprodutiva destas espécies bastante elevada, devido à dispersão de basidiósporos pelo vento. Cada espécie ocupa um nicho bastante específico, sendo crucial a ampla dispersão de estruturas reprodutivas, visando à amplitude da possibilidade do encontro do substrato e das condições ideais para o crescimento fúngico (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

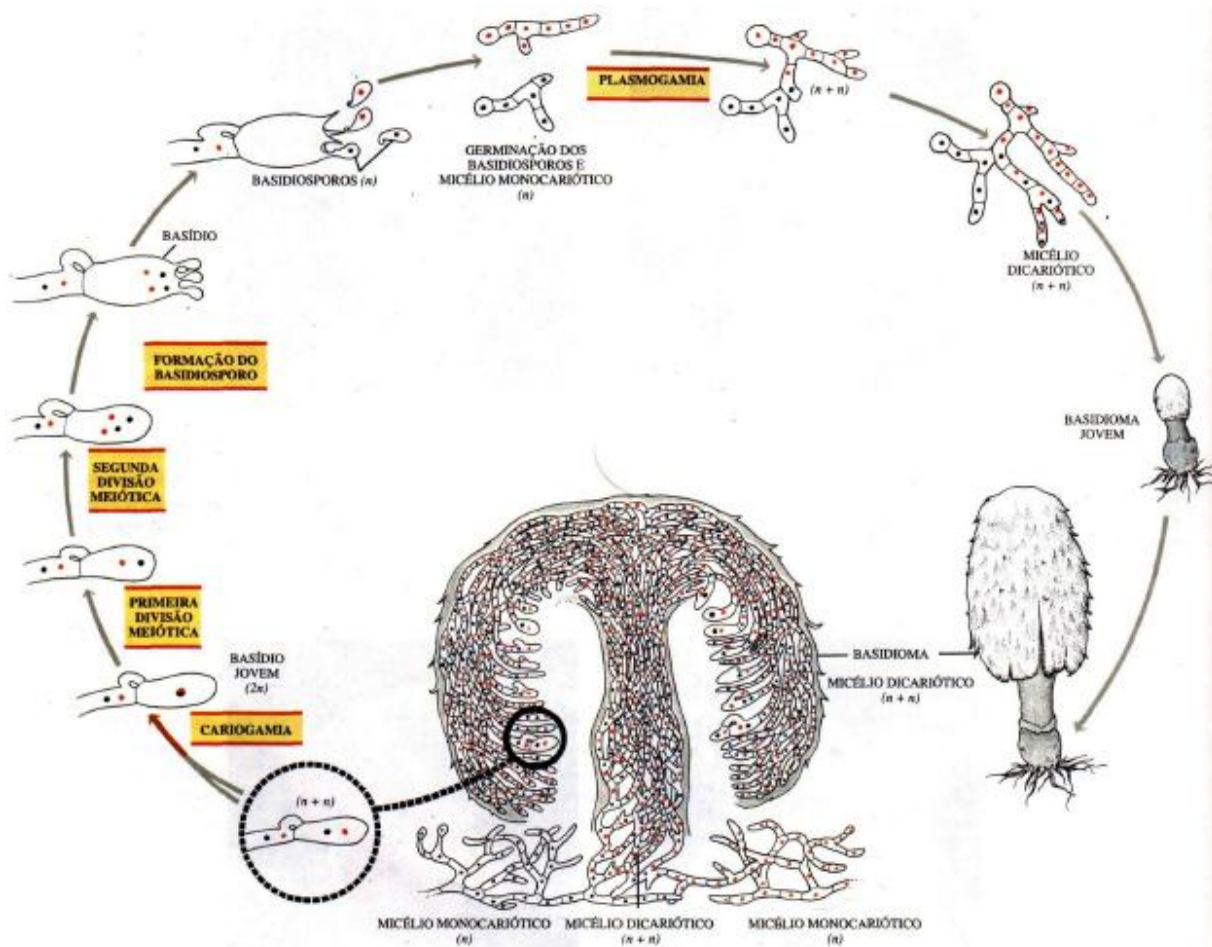


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida de um cogumelo basidiomiceto.

Fonte: Raven; Evert; Eichhorn (2007).

Os cogumelos possuem características de interesse para diferentes áreas de aplicação e estudo. Diferentes espécies são conhecidas por provocarem danos em materiais lignocelulósicos utilizados em diversas áreas econômicas, além de possuírem a capacidade de parasitismo em espécies animais, vegetais e até mesmo em outras espécies fúngicas. No entanto, diversos basidiomicetos possuem importância simbiótica em ecossistemas, devido a sua capacidade de decomposição

e à presença de micorrizas, que colaboram com a manutenção do equilíbrio do ambiente (ALEXOPOULUS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Dentre as diversas formas de aplicação destes cogumelos, muitas espécies deste grupo são cultivadas comercialmente para alimentação ou formulação de produtos secundários a partir de compostos extraídos dos mesmos. Espécies como *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus* spp. são cultivadas em grande escala em quase todo o mundo para consumo humano e animal do produto *in natura*, desidratado ou incluso em diferentes formulações. Além disso, numerosas espécies são fontes de moléculas bioativas, responsáveis por diversas propriedades farmacêuticas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e imunomoduladora (ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013; SMIDERLE et al., 2013; GIAVASIS, 2014; SMIDERLE et al., 2014).

Um grande número de compostos bioativos vem sendo extraído de cogumelos, incluindo polissacarídeos, glicoconjugados, proteínas e ergosterol (ZHANG et al., 2014). Estes dados apontam para o potencial alimentício, industrial e biotecnológico destes cogumelos, ampliando o campo de investigação para novas espécies, além de diferentes aplicações para espécies já documentadas.

2.2.1 *Pholiota nameko*

A espécie *Pholiota nameko* (Figura 3) pertence à Ordem Agaricales, integrante da complexa divisão dos basidiomicetos.

Pholiota nameko, popularmente conhecido como Nameko, é um cogumelo pequeno e marrom com um revestimento levemente gelatinoso em seu píleo. É um cogumelo amplamente cultivado na China e no Japão. Apresenta elevado valor proteico, além da presença de vitaminas, aminoácidos, lipídios e polissacarídeos, sendo alguns destes compostos relacionados a diferentes atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e hipolipidêmica (CUI; LI, 2004; ZHANG et al., 2007; LI et al., 2008; LI; ZHANG; MA, 2010; GAN et al., 2011).



Figura 3. Basidiomas de *Pholiota nameko*. Fonte: <http://mycomed.eu>, acesso em 12/01/2016.

Dentre os estudos deste cogumelo a avaliação anti-inflamatória de uma fração de polissacarídeos, obtida a partir de extração aquosa de *P. nameko*, foi demonstrada em diferentes modelos de inflamação, associada à ausência da atividade ulcerogênica, inibição da ciclo-oxigenase e produção de prostaglandinas, sendo estas condições relacionadas a alguns processos inflamatórios (LI et al., 2008). A fração aquosa avaliada foi submetida posteriormente a análises de atividade hipolipidêmica, onde pode ser verificada a redução dos níveis de lipídios totais e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), seguido de aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e na atividade das enzimas do estresse oxidativo, relacionadas à prevenção do dano oxidativo e à inibição da peroxidação lipídica (LI; ZHANG; MA, 2010). Além disso, a fração apresentou atividade imunomoduladora, sobre a imunidade inata e adaptativa, em voluntários saudáveis, nos quais foi observada a estimulação célula-célula com síntese de citocinas, além da estimulação da imunidade humoral, através da sensibilização de células efetoras (LI et al., 2012). Foram observados também efeitos positivos na maturação de células dendríticas em ratos, através de alterações morfológicas, expressão do fenótipo e secreção de citocinas, relacionados à modulação positiva do sistema imunológico (LI et al., 2014).

A fração de polissacarídeos de *P. nameko* que apresentou as atividades acima descritas é composta por arabinose (50,34%), galactose (23,13%), glucose (14,29%), xilose (10,54%) e manose (1,7%) (LI et al., 2007). Análises espectrométricas de infravermelho sugerem a presença de unidades furanosídicas e

piranosídicas, sendo observada em algumas destas unidades a presença de ácido urônico (LI et al., 2012).

2.3 POLISSACARÍDEOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra. A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de médio a alto peso molecular. Eles possuem grande variedade de funções, que incluem o fornecimento significativo de energia na dieta da maioria dos organismos e a atuação como forma de armazenamento de energia no corpo e como componentes da membrana celular, mediando algumas formas de comunicação intercelular (HARVEY; FERRIER, 2012). Polímeros de carboidratos agem como elementos estruturais e protetores em paredes celulares bacterianas, fúngicas e vegetais e também nos tecidos conjuntivos animais (NELSON; COX, 2011).

Os polissacarídeos fúngicos compreendem um grande grupo de biopolímeros com função estrutural na parede celular do basidioma ou exopolissacarídeos encontrados ligados à superfície das células e excretados para o meio extracelular (CAMELINI et al., 2005; GIAVASIS, 2014). Polissacarídeos dos basidiomas são principalmente glucanas e heteropolissacarídeos, constituídos por galactose, glucose, manose e fucose (SMIDERLE, 2012), enquanto polissacarídeos provenientes do micélio fúngico são principalmente glucanas, gliconjugados na forma de proteoglicanas ou heteroglicanas (ZAIDMAN et al., 2005).

Polissacarídeos bioativos são frequentemente descritos como modificadores da resposta biológica, uma vez que são capazes de desencadear uma reação não específica do sistema imunológico auxiliando na ação contra células tumorais, infecções virais e bacterianas e inflamações (LEIFA et al., 2007; GIAVASIS, 2014). Além disso, podem atuar também no sistema imunológico específico, estimulando o aumento de células efetoras e a síntese de citocinas, alterando os padrões proliferativos das células invasoras (FEARON et al., 2011). Apesar das propriedades medicinais popularmente já conhecidas durante séculos, a investigação das propriedades farmacológicas correlacionada com os seus mecanismos de ação iniciou-se mais intensivamente somente nas últimas décadas, revelando a importância de vários polissacarídeos em terapias antitumorais, imunomoduladoras, antimicrobianas, hipocolesterolêmicas e na prevenção da hiperglicemia, assim como

complementação em procedimentos radio e quimioterápicos (WASSER, 2002; GIAVASIS; BILIADERIS, 2006; MIZUNO; NISHITANI, 2013).

A atividade biológica verificada em diversos polissacarídeos pode ser influenciada por variações na estrutura química destas moléculas (BOT et al., 2001; XIAO et al., 2007) e em suas conformações tridimensionais (TAO et al., 2007). Além disso, a atividade biológica está diretamente associada ao peso molecular, composição química, estrutura do polímero e grau de ramificação da molécula (JIN et al., 2003; CUI et al., 2007). Assim, uma compreensão da relação entre estrutura do polissacarídeo e sua função biológica é fundamental para a elucidação dos seus mecanismos de ação e vias de ativação, assim como proposição de novos fármacos (LI et al., 2014). Informações sobre isolamento, estrutura química e propriedades físico-químicas de polissacarídeos são essenciais para novos estudos e aplicações destes polissacarídeos (GRACHER, 2005).

2.3.1 Homopolissacarídeos

Polímeros constituídos apenas por um tipo de unidade monomérica são denominados homopolissacarídeos (Figura 4). Dentre os principais homopolissacarídeos isolados de basidiomicetos se encontram as glucanas, moléculas cujas cadeias principais são formadas por unidades de α - e/ou β - glucose, sendo elas lineares ou ramificadas (GRACHER, 2005). As glucanas fúngicas representam vários polímeros de glucose estruturalmente diferentes, com uma grande diversidade de massa molecular, ligações glicosídicas e grau de substituição (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). A maioria destas moléculas desempenha um papel importante na constituição da parede celular e como fonte de energia para o metabolismo destes organismos.

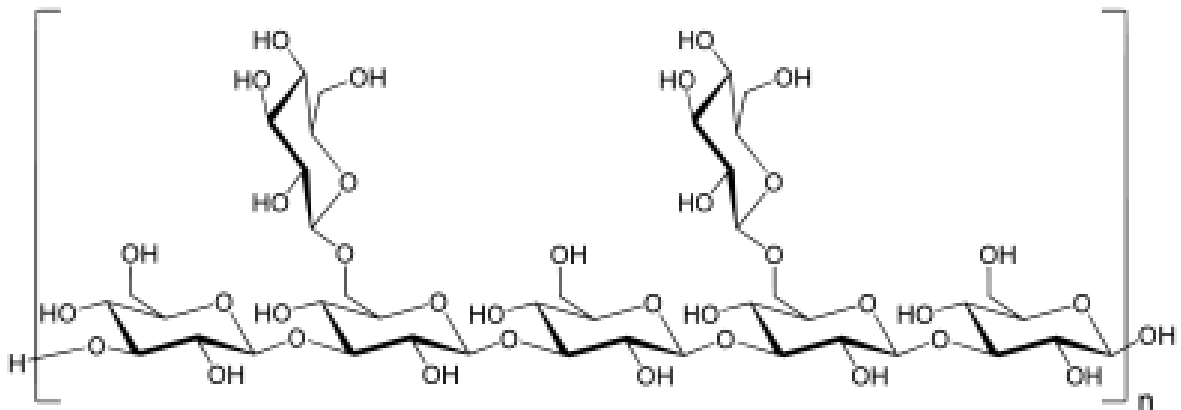


Figura 4. Esquema da estrutura de um homopolissacarídeo. Fonte: <http://commons.org>, acesso em 02/02/2016.

Existem três principais tipos estruturais destes polissacarídeos: α -glucanas, β -glucanas e α,β -glucanas (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Glucanas lineares formadas por unidades de α -Glc_p possuem menor ocorrência em cogumelos, no entanto se apresentam como constituinte da parede celular em algumas espécies fúngicas, tais como *Agrocybe cylindracea* e *Piptoporus betulinus* (KIHO et al., 1989; JAMES; CHERNIAK, 1990). Além disso, glucanas com cadeias principais de α -Glc_p e substituições em diferentes carbonos também foram descritas para diferentes espécies fúngicas. Glucanas ramificadas do tipo α -(1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 6) são descritas, possuindo relatos para espécies como *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes* e *Cordyceps sinensis* (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

Dentre as glucanas mais frequentemente descritas para basidiomicetos estão as β -glucanas, prioritariamente aquelas com cadeia (1 \rightarrow 3) sendo substituídas em O-6 (GRACHER, 2005; SMIDERLE, 2012). Cadeias lineares de β -Glc_p (1 \rightarrow 3) também podem ser observadas em extrações alcalinas do basidioma de *Termitomyces eurhizus* e *Ganoderma lucidum* (GRACHER, 2005; CHAKRABORTY et al., 2006; WANG; ZHANG, 2009).

β -D-Glucanas ramificadas são as principais constituintes das paredes celulares fúngicas e, portanto, existem vários relatos sobre o isolamento, estrutura e atividades biológicas associadas a estas moléculas (WASSER, 2002). A maioria destas glucanas apresenta uma cadeia principal com ligações β -(1 \rightarrow 3) e, com cadeias laterais de β -(1 \rightarrow 6)-Glc_p (CHEN; SEVIOUR, 2007), enquanto outras moléculas apresentam a estrutura inversa, com cadeia principal ligada β -(1 \rightarrow 6) e ramificações em β -(1 \rightarrow 3)-Glc_p (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Mizuno e

colaboradores (1995) isolaram um polímero com cadeia principal formada por unidades ligadas β -D-Glc ρ -(1 \rightarrow 6), com ramificações em C-3, proveniente do basidioma de *Tricholoma giganteum*.

Além disso, há ocorrência de polímeros cuja estrutura apresenta configurações do tipo α - e β - em uma mesma cadeia de monossacarídeos, tais como em polissacarídeos isolados de *Termitomyces microcarpus* e *Piptoporus betulinus*, sendo essas variações estruturais observadas na cadeia principal ou lateral do polímero (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

O grau de substituição e os grupos substituintes variam de acordo com a espécie de origem, o modo de isolamento e de purificação, sendo que as estruturas provenientes das extrações aquosas tendem a apresentar um maior grau de substituição em relação às obtidas por extrações alcalinas (GRACHER, 2005).

2.3.2 Heteropolissacarídeos

Os heteropolissacarídeos (Figura 5) apresentam variabilidade em sua composição monossacarídica, além de algumas destas moléculas apresentarem monossacarídeos metilados naturalmente, sendo consideradas moléculas de interesse para aplicações medicinais e industriais (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016). Entre os heteropolissacarídeos comumente isolados de basidiomicetos se destacam as heterogalactanas, como fucogalactanas e manogalactanas, as heteroglucanas, tais como galactomanoglucanas e xiloglucanas, e as heteromananas, como galactoglucomananas, xilomananas e galactomananas (GRACHER, 2005; SMIDERLE, 2012).

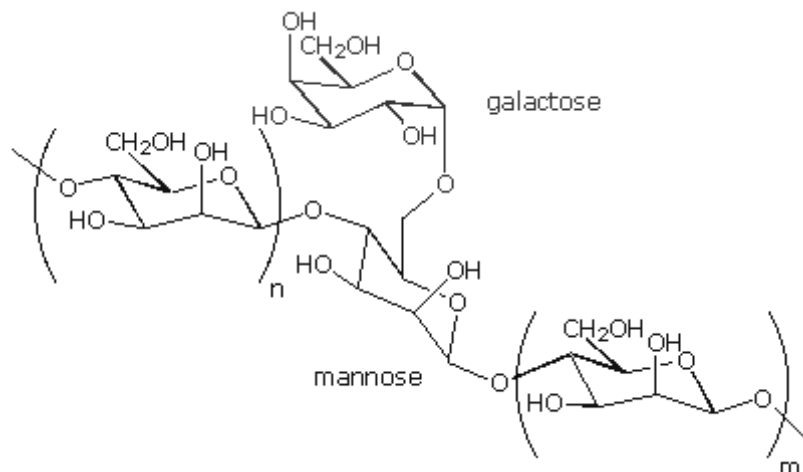


Figura 5. Estrutura esquemática de um heteropolissacarídeo. Fonte: <http://chemistry.msu.edu>, acesso em 02/02/2016.

Dentre as heterogalactanas, os polímeros isolados apresentam, geralmente, uma estrutura de cadeia principal α -(1 \rightarrow 6)-D-Galp, com substituições em C-2 por diferentes monossacarídeos, tais como Fucp e Manp (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016). Além disso, heterogalactanas podem apresentar naturalmente unidades de 3-O-Me- α -D-Galp (SILVEIRA et al., 2015; RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016). As heteroglucanas, embora não tão comuns como as glucanas, podem ser observadas em algumas espécies, onde a cadeia principal é constituída por unidades de β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 4) ou (1 \rightarrow 3), com substituições geralmente em O-3 e O-6 por unidades de α -D-Galp, α -D-Fucp e α -D-Glcp (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016). As heteromananas, por sua vez, são comumente encontradas na parede celular fúngica. Apresentam cadeia principal composta principalmente por α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 2) ou (1 \rightarrow 6), com substituições em C-4 por monossacarídeos como Galp e Xylp (SMIDERLE et al., 2006).

Devido à variedade de espécies fúngicas, os heteropolissacarídeos extraídos destas fontes podem ser utilizados em uma ampla gama de aplicações ecológicas, medicinais e industriais, da mesma forma que as glucanas, que constituíam a grande parcela de material de interesse dos polissacarídeos extraídos de cogumelos (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, purificar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos do basidioma de *Pholiota nameko*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento deste objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- ✓ Extrair os polissacarídeos do basidioma através de extrações aquosas e alcalina;
- ✓ Purificar as frações de polissacarídeos obtidas, através de congelamento/degelo e Precipitação por Solução de Fehling;
- ✓ Caracterizar estruturalmente as frações obtidas, utilizando métodos químicos e técnicas analíticas de RMN e GC-MS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BASIDIOMAS

4.1.1 Obtenção dos Basidiomas

Os basidiomas foram gentilmente cedidos pela Empresa Nayumi Cogumelos, localizada na cidade de Mogi das Cruzes, São Paulo (Latitude 23° 31' 29" Sul; Longitude 46° 11' 14" Oeste).

4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.2.1 Deslipidificação com Clorofórmio-Metanol

Os basidiomas (2,5 kg) foram liofilizados e triturados em liquidificador. Posteriormente foram submetidos à deslipidificação com uma solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v), a 60°C com três extrações sucessivas (5h/cada), como desenvolvido por Smiderle (2012). Este procedimento forneceu o extrato de compostos apolares e o resíduo I, que após secura foi submetido a processos sequenciais de extração.

4.2.2 Extração Aquosa à Temperatura Ambiente

O resíduo I, proveniente da deslipidificação, foi submetido a extrações aquosas à temperatura ambiente (CW), sob agitação mecânica, durante 6 horas. Após cada etapa, o material foi centrifugado (8000 rpm, 15 min, 25°C) para separação do extrato aquoso (extrato aquoso I) e do material residual (resíduo II). Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida e precipitados com etanol (3:1, v/v). O material foi submetido à centrifugação (8500 rpm, 20 min, 10°C), e o precipitado etanólico foi dialisado (12-14 kDa) contra água corrente por 24 horas e liofilizado.

4.2.3 Extração Aquosa a Quente

O resíduo II foi submetido a extrações aquosas sob refluxo, aproximadamente 100°C, durante 6 horas. O material obtido foi centrifugado (8000 rpm, 15 min, 25°C), gerando um extrato aquoso II (HW) e um resíduo III, que foi submetido a demais extrações. O extrato II foi concentrado sob pressão reduzida e precipitado com etanol (3:1, v/v). A fração polissacarídica foi coletada através de centrifugação (8000 rpm, 20 min, 10°C), dialisada (12-14 kDa) contra água corrente por 24 horas e liofilizada.

4.2.4 Extração Alcalina

O resíduo III foi tratado com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 5%, sob refluxo em banho com água fervente, na presença de borohidreto de sódio (NaBH₄), para evitar degradação das cadeias polissacarídicas. O extrato alcalino (AK) obtido foi neutralizado com ácido acético (AcOH), dialisado (12-14 kDa) contra água corrente, durante 48 horas, e liofilizado.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

Os extratos aquosos (CW e HW) e alcalino (AK) foram, separadamente, solubilizados em água destilada e submetidos ao processo de congelamento, seguido por descongelamento à temperatura ambiente. Neste procedimento as frações solúveis em água fria foram separadas das frações insolúveis, através de centrifugação (8500 rpm, 20 min, 4°C), repetidas vezes, até que o sobrenadante aquoso não apresentasse nenhum precipitado por congelamento e degelo, segundo procedimento de Gorin e Iacomini (1984).

4.3.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling

A fração aquosa a temperatura ambiente (CW) foi submetida à precipitação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste em duas soluções (A e B), sendo a solução A composta por tartarato de sódio e potássio e KOH (346,0 g/L + 250,0 g/L), enquanto a solução B consiste de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (111,4 g/L).

As frações submetidas a este procedimento foram solubilizadas primeiramente na solução A (30 mL), seguida da adição de igual volume da solução B. Após intensa agitação, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas. O precipitado formado foi separado por centrifugação (8500 rpm, 15 min, 25°C). As frações obtidas foram neutralizadas com AcOH concentrado, dialisadas (12-14 kDa) contra água corrente por 48 horas e deionizadas por resina Dowex na forma catiônica. Posteriormente, as frações foram dialisadas (12-14 kDa) e liofilizadas (SMIDERLE, 2012).

4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

4.4.1 Hidrólise Ácida Total

Alíquotas de cada fração polissacarídica (1,0 mg) foram hidrolisadas com 0,2 mL de TFA (ácido trifluoracético) 2 M, durante 8 horas, a 100°C (CORRADI DA SILVA et al., 1993). Transcorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras por evaporação à secura. Os produtos hidrolisados foram reduzidos e acetilados como descrito a seguir.

4.4.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH_4) (1,0 mg), à temperatura ambiente, pH 9-10, por 15 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Após esse período, as amostras reduzidas foram neutralizadas com AcOH e levadas à secura sob pressão reduzida. O resíduo formado desta reação foi

eliminado por co-evaporação com metanol. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac_2O)/piridina (1:1, v/v, 0,2 mL), a 100°C , por 30 min (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis formados foram extraídos com clorofórmio e a piridina residual foi removida através de sucessivas adições de solução de sulfato de cobre 5% (m/v). Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após secura, os acetatos de alditóis isolados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

4.4.3 Metilação dos Polissacarídeos

As frações polissacarídicas purificadas foram metiladas segundo a metodologia descrita por Ciucanu e Kerek (1984). Uma alíquota da amostra (10 mg) foi solubilizada em 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) seco e triturado (4:1 de carboidrato) e 1,0 mL de iodeto de metila (CH_3I). A amostra foi mantida em agitação por 30 min e em seguida mantida em repouso. Transcorridas 24 horas, o material foi solubilizado em água destilada, neutralizado com AcOH concentrado em banho de gelo, dialisado (2 kDa) contra água corrente, por 48 horas e liofilizado.

Os polissacarídeos per-O-metilados obtidos foram submetidos à metanólise, seguida de hidrólise com H_2SO_4 1 M (JANNSON et al., 1976). Foi adicionado a amostra MeOH-HCl 3% (1 mL), permanecendo por 2 horas, a 80°C . Após evaporação da solução de MeOH-HCl, sob pressão, foi adicionado H_2SO_4 1 M (1,0 mL) e a reação prosseguindo por 16 horas, a 100°C . O ácido foi neutralizado com BaCO_3 e centrifugado. Em seguida, os monossacarídeos per-O-metilados formados, reduzidos e acetilados, foram submetidos à análise por GC-MS.

4.4.4 Degradação Controlada de Smith

Uma amostra do polissacarídeo a ser analisado foi pesada (50 mg), solubilizada em 10 mL de água destilada, oxidada com 10 mL de solução de periodato de sódio (NaIO_4) a 0,1 M, à temperatura ambiente, na ausência de luz, em agitação constante por 72 horas. Em seguida o material foi dialisado em membranas

com limite de exclusão de 2 kDa por 24 horas contra água corrente. Posteriormente o material foi reduzido com NaBH_4 , mantido à temperatura ambiente por 12 horas, neutralizado com ácido acético e dialisado em membrana com limite de exclusão de 2 kDa contra água corrente, por 24 horas. Após diálise, o material foi submetido à hidrólise parcial com solução de TFA pH 2,0 por 30 minutos, a 100°C. Posteriormente o material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 2 kDa e liofilizado. O liofilizado, resistente à degradação controlada de Smith foi analisado por espectroscopia de RMN.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises de GC-MS foram realizadas em cromatógrafo a gás Varian Saturn 2000R - 3800, acoplado a um espectrômetro de massa da marca Varian Ion-Trap 2000R, equipados com colunas capilares de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i.) revestidas DB 225. As injeções nas colunas foram realizadas em 50°C (mantida por 1,0 min), sendo seguido de um aumento gradual de 40°C/min até 215°C (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou 220°C (acetatos de alditóis). Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1,0 mL/min.

4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear

Foram realizados espectros de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC e DEPT135 em espectrômetro BRUKER, modelo Avance III, 400 MHz. As análises foram realizadas a 70°C com as amostras polissacarídicas (50 mg) solubilizadas em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ (dimetilsulfóxido deuterado). Os deslocamentos químicos em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ foram expressos em ppm (δ) relativos aos sinais de ^{13}C e ^1H em δ 39,40 (^{13}C) e 2,40 (^1H), para amostras solúveis neste composto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os basidiomas de *Pholiota nameko* (2,5 Kg) liofilizados e triturados (226,0 g) foram submetidos à deslipidificação, visando à remoção dos compostos apolares, utilizando a solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v), obtendo um rendimento lipídico aproximado de 20% (45 g). Posteriormente o material deslipidificado foi submetido às extrações: aquosa a temperatura ambiente (CW), com rendimento de 16,5% (37,4 g); extração aquosa a quente (HW), com rendimento de 6,9% (15,6 g) e extração alcalina (AK), com rendimento de 11,5% (26,0 g) (Figura 6).

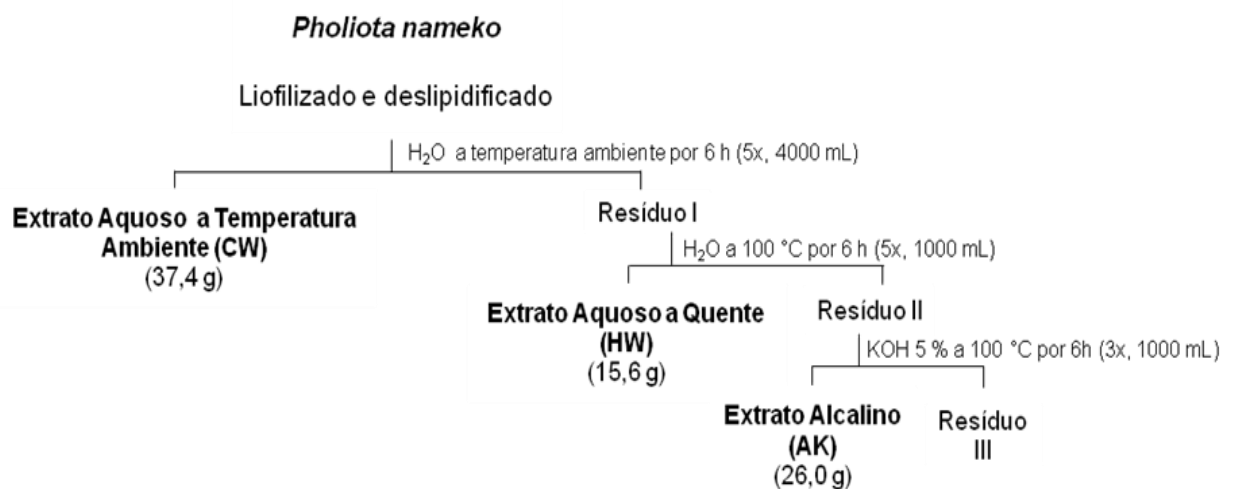


Figura 6. Esquema geral das extrações do basidioma liofilizado de *Pholiota nameko*.

5.1 EXTRATO AQUOSO A TEMPERATURA AMBIENTE

A fração aquosa bruta obtida à temperatura ambiente (CW) apresentou, após derivatização, os monossacarídeos glucose (79,6%), manose (14,1%) e galactose (6,3%).

A análise de CW por ^{13}C -RMN (Figura 7) apresentou sinais δ 102,7; 101,0 e 98,6 correspondendo aos C-1 de β -Glc, β -Man e α -Gal, respectivamente (SMIDERLE et al., 2013). Sinais na região de δ 85,7; 86,0 e 86,4 indicam a presença de polímero com unidades 3-O-substituídas e para C-6 não substituídos na região de δ 60,7 e 60,8.

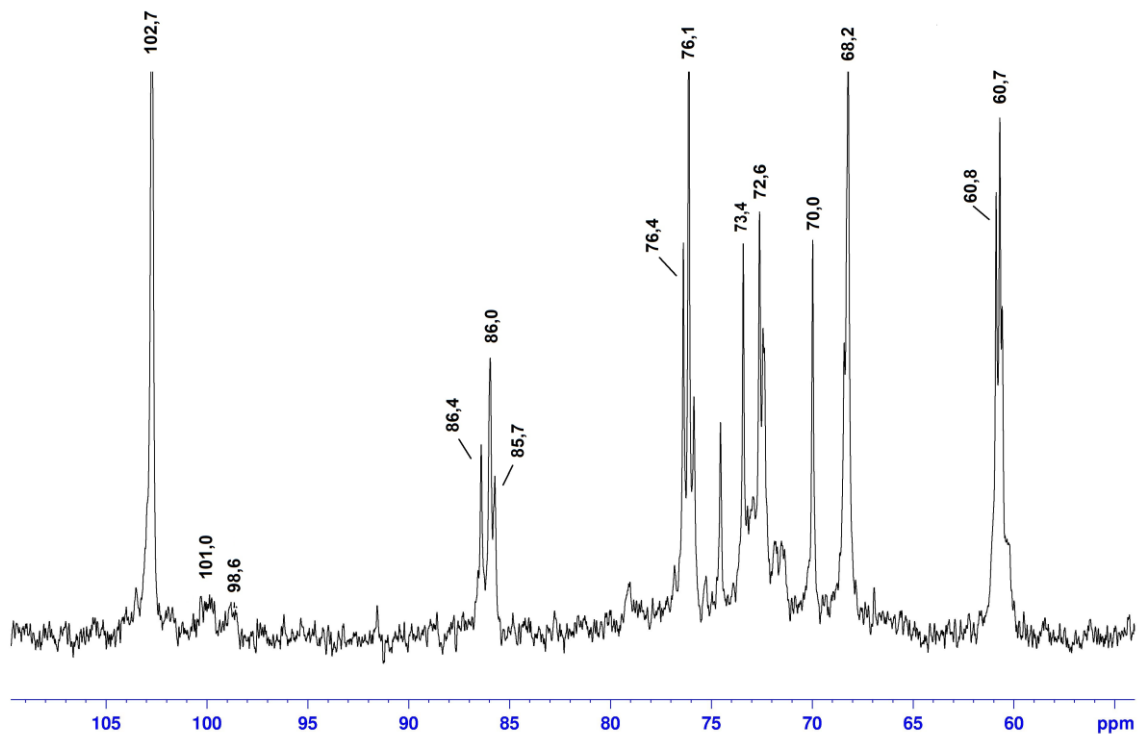


Figura 7. ¹³C-RMN da fração bruta CW em Me₂SO-*d*₆ a 70°C.

Visando a purificação deste material foram empregados métodos baseados na solubilidade e na composição química das moléculas presentes no extrato. Foi realizado, inicialmente, um congelamento da amostra, seguido de descongelamento, originando duas frações: fração insolúvel (PCW) e solúvel (SCW). Ambas as frações apresentaram os sinais predominantes do extrato bruto (Figura 8), demonstrando a necessidade de etapas adicionais de purificação, para a completa elucidação da estrutura da molécula.

A fração SCW foi escolhida para dar continuidade ao trabalho, devido a sua solubilidade e alto rendimento (17,9 g).

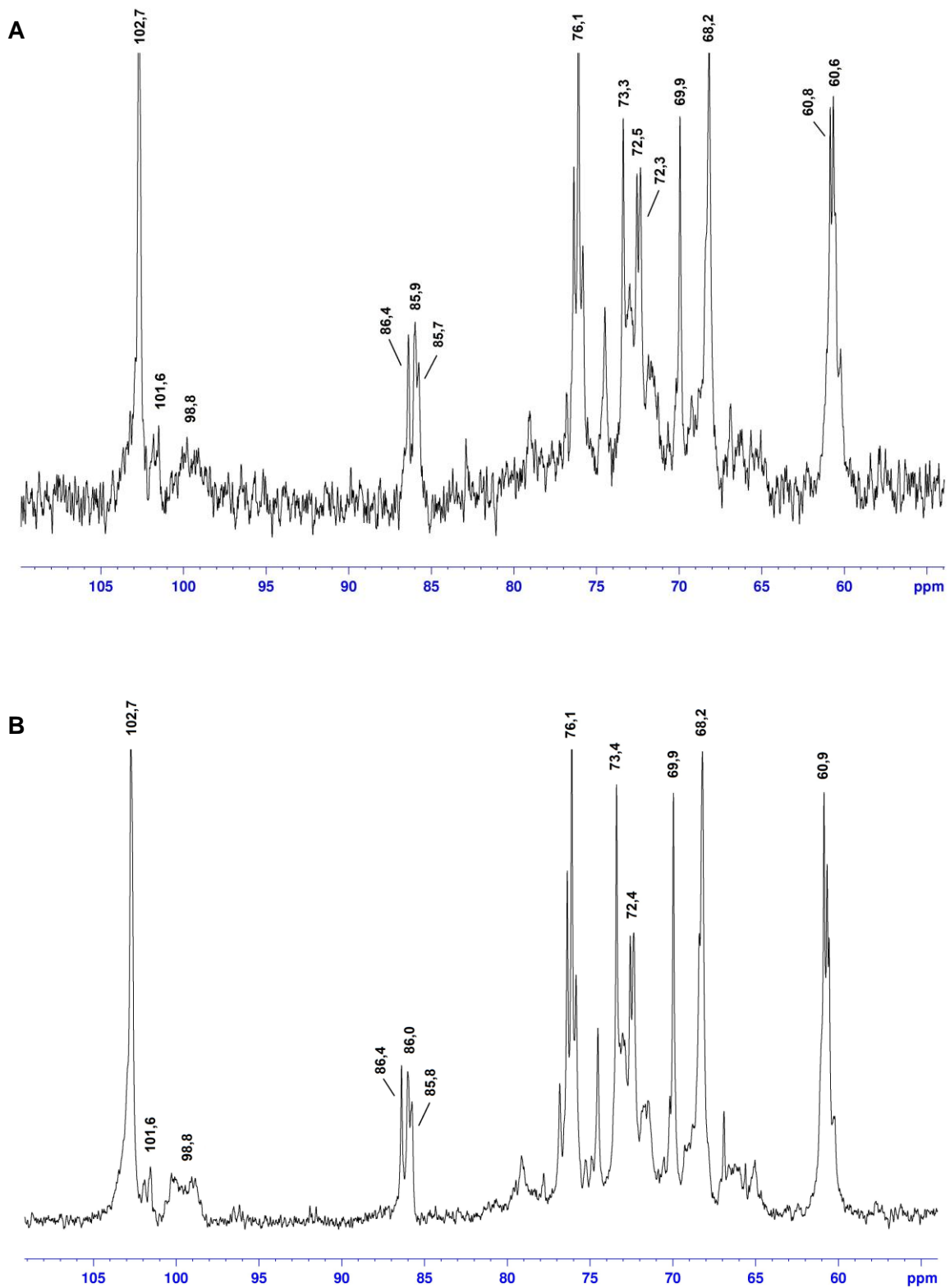


Figura 8. ^{13}C -RMN das frações PCW (A) e SCW (B) em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ a 70°C , obtidas após fracionamento do extrato CW, obtido de *Pholiota nameko*, por congelamento e degelo.

Visando o fracionamento deste material a fração SCW foi tratada com solução de Fehling, obtendo duas frações: sobrenadante (SCW-SF) e precipitada (SCW-PF) (Figura 9). Após fracionamento o material foi submetido à análise de RMN.

De acordo com o espectro de ^{13}C -RMN a fração precipitada (SCW-PF) e a fração sobrenadante (SCW-SF) apresentaram sinais característicos de C-1 de unidades de β -glucose (δ 102,9), β -manose (δ 101,7) e α -galactose (δ 98,8) (Figura 10). Além disso, a composição monossacarídica destas frações comprova a presença destas unidades (Tabela 1), possivelmente relacionadas à presença de duas moléculas distintas neste extrato (CARBONERO, 2003; RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016).

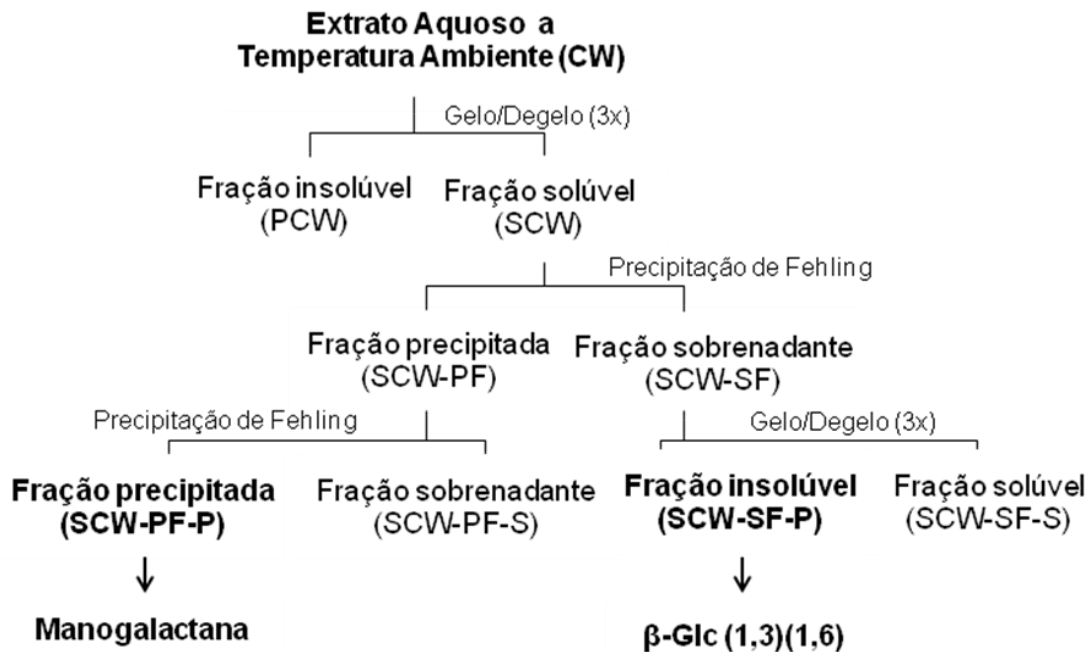


Figura 9. Esquema geral das etapas de purificação do extrato aquoso de *Pholiota nameko* obtido a temperatura ambiente (CW).

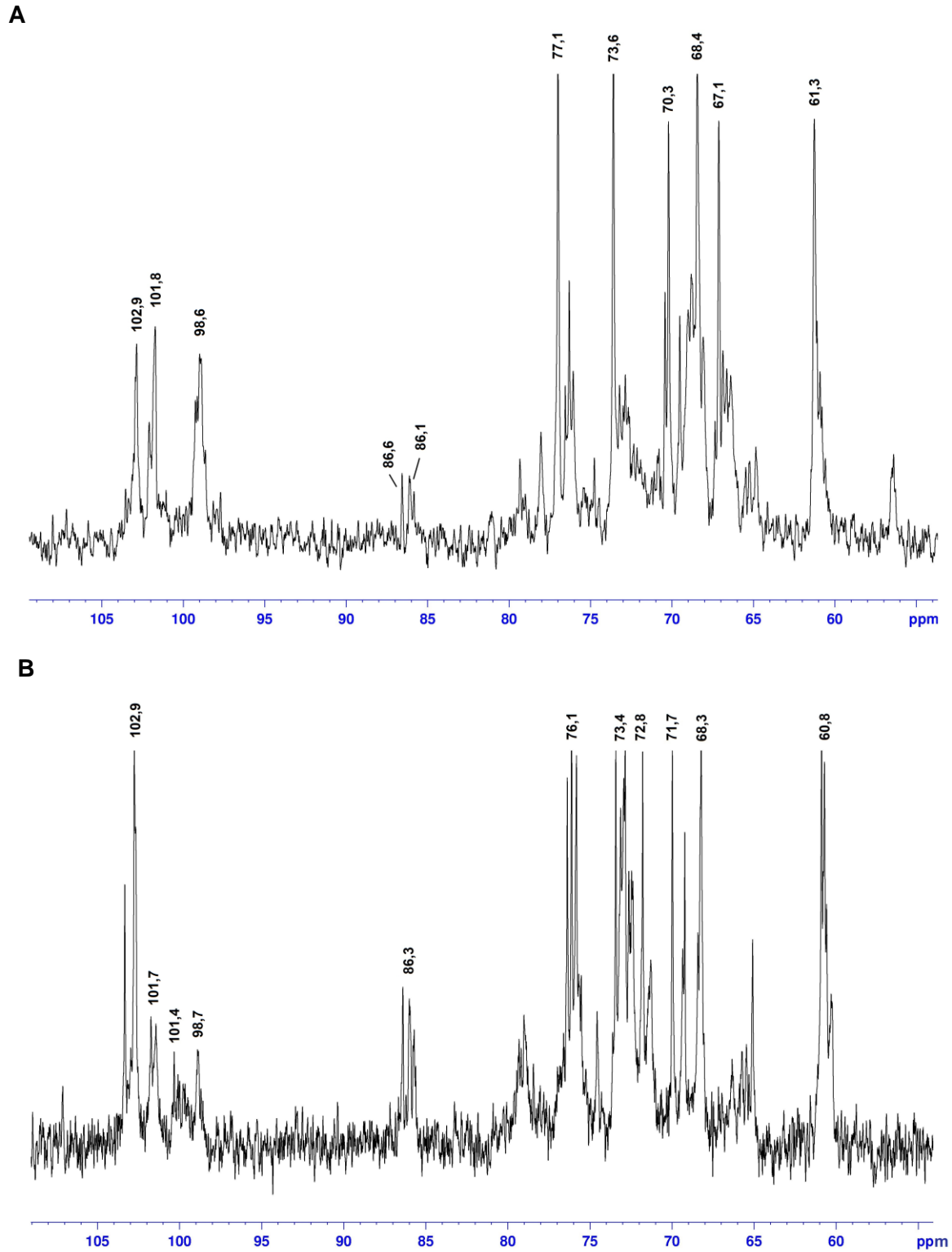


Figura 10. ^{13}C -RMN da fração SCW-PF (A) e SCW-SF (B) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C , obtidas através de Precipitação com Fehling.

Tabela 1. Composição monossacarídica das frações SCW-PF e SCW-SF, obtidas após tratamento de Fehling da fração SCW.

Composição monossacarídica	Manose*	Galactose*	Glucose*
SCW-PF	47,7%	26,4%	25,9%
SCW-SF	36,1%	6,6%	57,3%

*Derivados alditol-acetatos obtidos após hidrólise, redução e acetilação. Analisados por GC-MS.

5.1.1 Isolamento e caracterização estrutural da Manogalactana (fração SCW-PF-P)

Devido a intensidade dos sinais relativos às unidades de manose e galactose na fração SCW-PF (Figura 10A), o isolamento da manogalactana prosseguiu através do fracionamento deste material, conforme o procedimento de extração demonstrado na Figura 11.

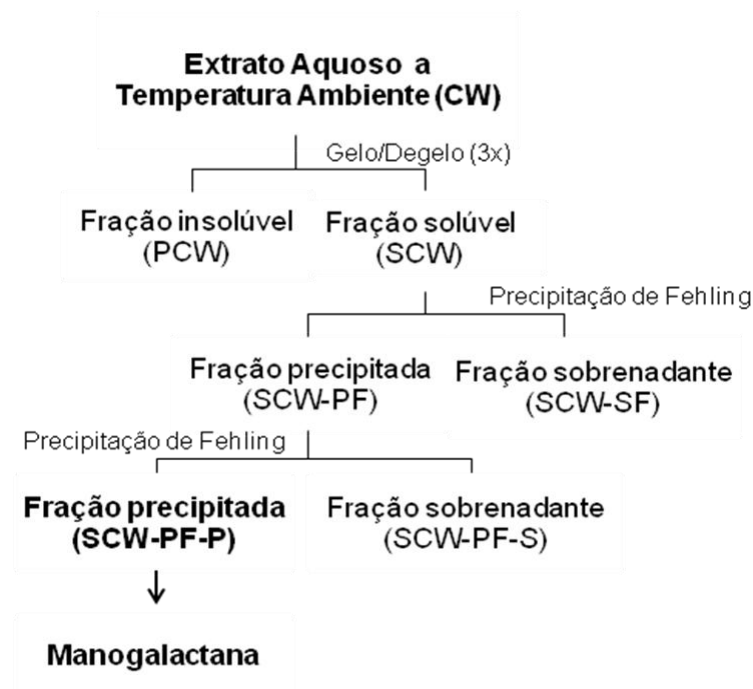


Figura 11. Fluxograma do processo de purificação da manogalactana extraída do cogumelo *Pholiota nameko*.

Visando purificar esta fração foi realizado um novo fracionamento por precipitação com solução de Fehling. Este tratamento originou duas novas frações, SCW-PF-P e SCW-PF-S, sendo o material precipitado (SCW-PF-P) referente à molécula de interesse (Figura 12).

Esta fração apresentou manose (33,0%), galactose (43,0%) e 3-O-metil-galactose (24,0%). Uma manogalactana semelhante, com presença de manose, galactose e 3-O-metil-galactose, foi isolada de um exopolissacarídeo produzido por *Pleurotus sajor-caju* (SILVEIRA et al., 2015), além de também ser relatada em algumas outras espécies do gênero *Pleurotus* (CARBONERO et al., 2008).

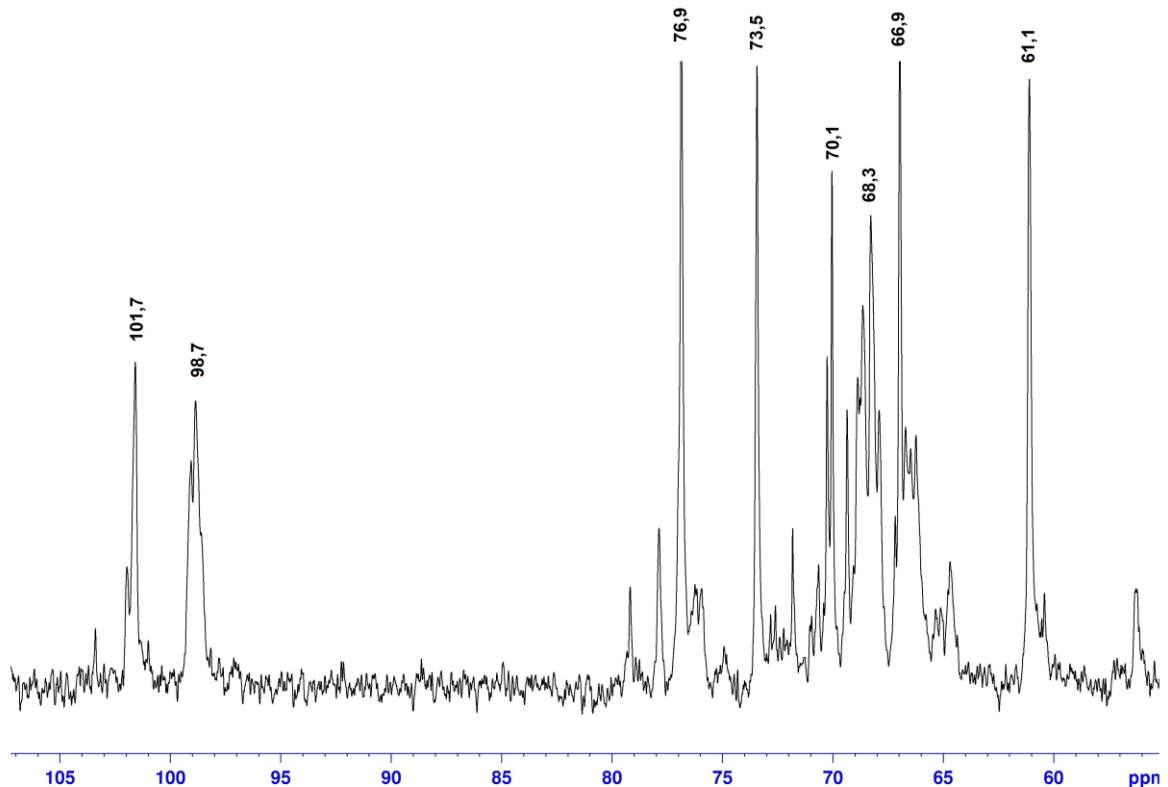


Figura 12. ^{13}C -RMN da fração SCW-PF-P em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ a 70°C .

A análise de metilação demonstra um polissacarídeo com cadeia principal constituída por unidades de 3-O-Me-Galp, com unidades de Galp 2,6-di-O-substituídas, indicando ligações glicosídicas do tipo (1→6), confirmadas no espectro de DEPT135-RMN, pela inversão de fase e deslocamento dos sinais δ 66,3; 66,5 e 66,8 (Figura 13) e ramificações constituídas por unidades terminais não redutores de Manp (Tabela 2), indicando a presença de uma manogalactana.

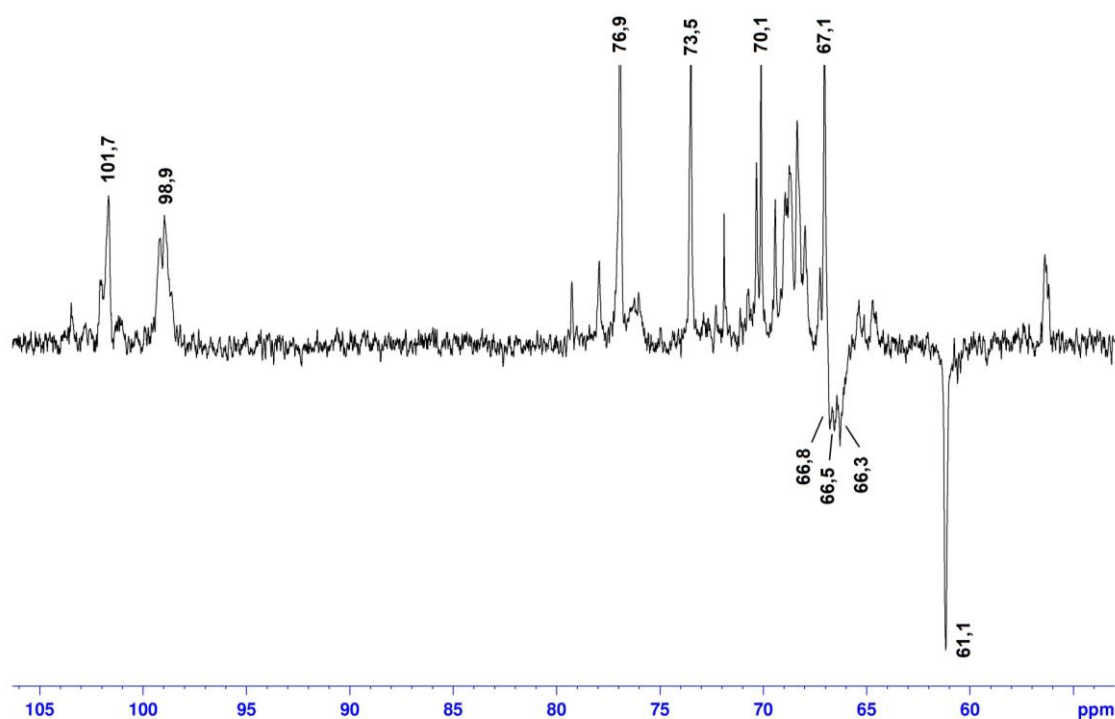


Figura 13. Espectro de DEPT135-RMN da Manogalactana obtida de *Pholiota nameko*.

Tabela 2. Análise dos derivados metilados da fração SCW-PF-P obtida do cogumelo *Pholiota nameko*.

Acetatos de Alditóis parcialmente O-metilados ⁽¹⁾	%	Tipo de ligação ⁽²⁾
2,3,4,6-Me ₄ -Man _p	31,0	Man _p -(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal _p	37,0	→6)-3-O-Me-Gal _p -(1→
3,4-Me ₂ -Gal _p	32,0	→2,6)-Gal _p -(1→

⁽¹⁾Analizado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução com NaDH₄ e acetilação.

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

O espectro de HSQC da manogalactana (Figura 14) mostrou a correlação dos sinais δ 98,6/4,62, 76,7/2,96, 66,3/3,55 e 66,1/3,44 referentes ao C1/H1, C3/H3 e C6/H6, respectivamente, de unidades de 3-O-metil-Gal_p, além do sinal do grupamento metil destas unidades em δ 56,1/3,23 e sinais em 98,9/4,82, 66,3/3,55 e 66,1/3,44 correspondentes ao C1/H1 e C6/H6 de unidades de α -Gal_p 2,6-di-O-

substituídas. Os sinais referentes ao C1/H1 das unidades terminais não redutoras de β -Manp foram observados em 101,7/4,35 e 101,5/4,42.

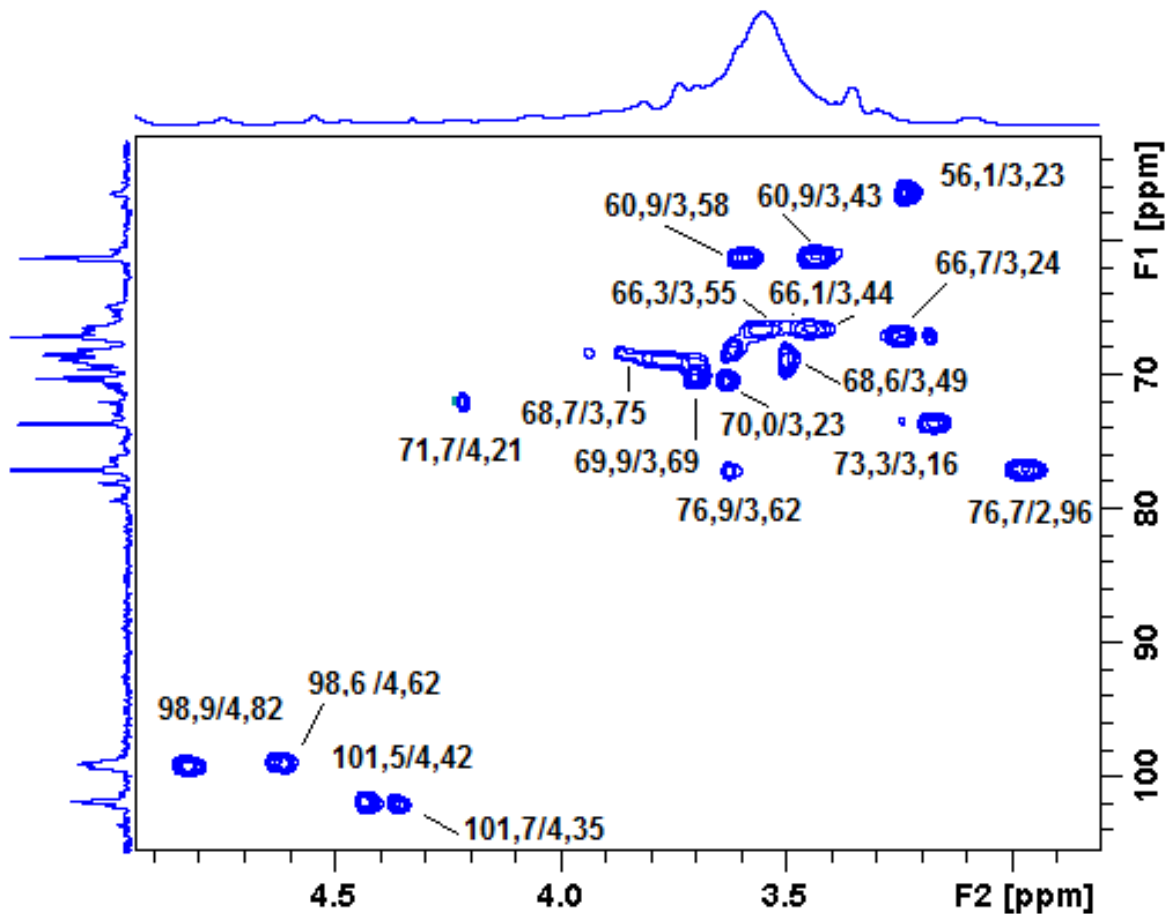


Figura 14. Espectro de HSQC da manogalactana (SCW-PF-P) em DMSO deuterado a 70°C.

A investigação sobre a presença de heterogalactanas em cogumelos vem sendo crescente, assim como a de diversos heteropolissacarídeos fúngicos. Polissacarídeos extraídos de cogumelos do gênero *Pholiota* não são comumente descritos na literatura e a caracterização estrutural de nenhuma dessas moléculas havia sido elucidada até o momento, para esta espécie.

Manogalactanas são descritas frequentemente associadas as suas relevantes atividades biológicas (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016), podendo conter em suas estruturas unidades parcialmente metiladas, tais como 3-O-Me-Galp. Silveira e colaboradores (2015) relataram a presença de uma manogalactana, composta por manose (37,0%), galactose (39,7%) e 3-O-metil-galactose (23,3%), purificada do exopolissacarídeo de *Pleurotus sajor-caju*. Manogalactanas parcialmente metiladas

também foram relatadas por Smiderle e colaboradores (2008), extraídas do basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius*.

5.1.2 Isolamento e caracterização da β -Glucana-(1,3)(1,6) (fração SCW-SF-P)

O isolamento da glucana prosseguiu através do fracionamento da amostra SCW-SF (Figura 10B). Visando obter a purificação desta fração foi realizado um gelo/degelo, obtendo duas novas frações, SCW-SF-P e SCW-SF-S, sendo a fração precipitada correspondente a uma molécula composta somente por unidades de glucose. O procedimento de purificação está exemplificado na Figura 15.

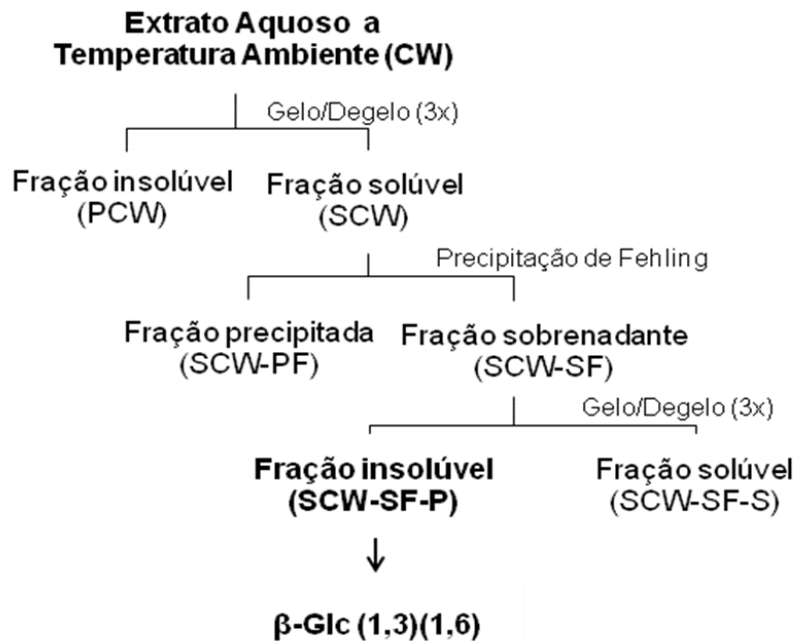


Figura 15. Fluxograma do processo de purificação da glucana extraída do basidioma de *Pholiota nameko*.

O espectro de ^{13}C -RMN (Figura 16) apresentou sinais em δ 102,9 correspondendo ao carbono anomérico das unidades de β -Glc_p, além da presença de sinais de ligação em C-3 (δ 86,0 e 86,6).

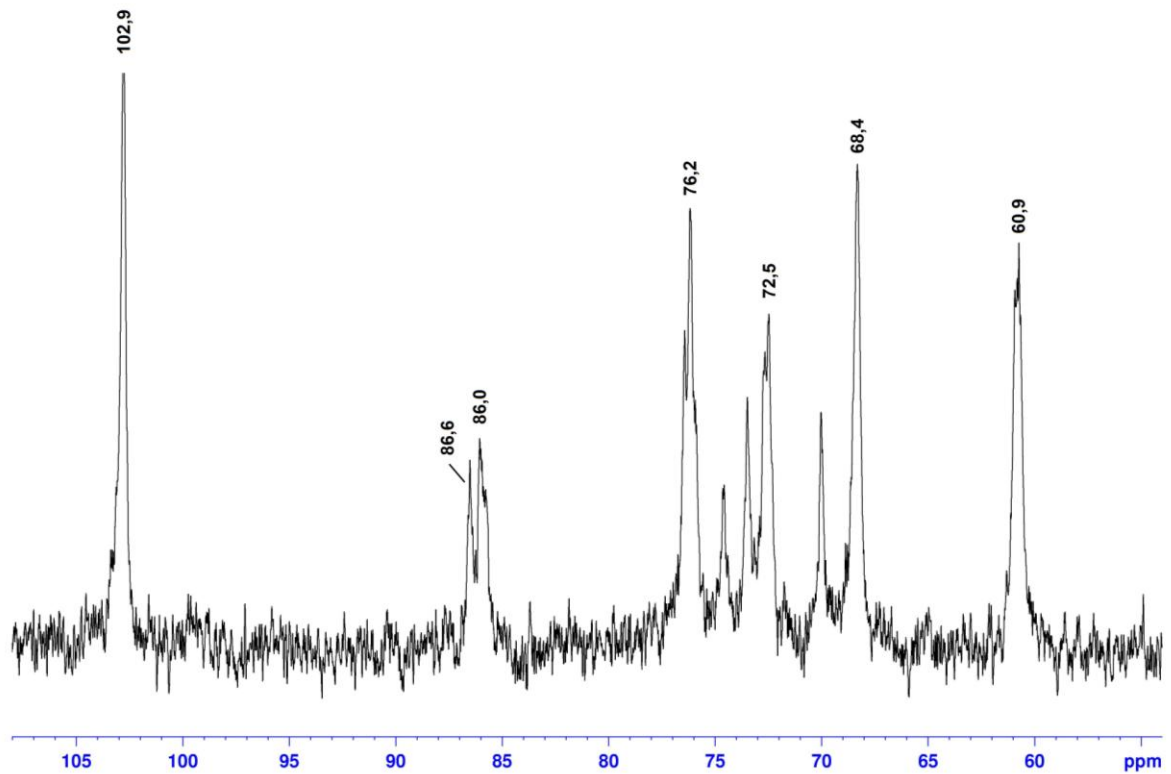


Figura 16. ^{13}C -RMN da fração β -Glucana-(1,3)-(1,6) em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ a 70°C .

A análise de metilação (Tabela 3) revelou a presença de uma molécula altamente ramificada, com cadeia principal do tipo β -(1 \rightarrow 3), devido a presença das unidades de Glcp 3-O-substituídas. As unidades 2,4-Me₂-Glcp indicam a presença de unidades 3,6-di-O-substituídas, revelando o alto grau de ramificação deste polímero. Comprovando a ramificação foram identificados derivados metilados 2,3,4-Me₃-Glcp e 2,3,4,6-Me₄-Glcp, indicando a presença de unidades de Glcp 6-O-substituídas na ramificação e de unidades terminais não redutores de Glcp, respectivamente.

Tabela 3. Análise dos derivados metilados da fração SCW-SF-P obtida do basidioma de *Pholiota nameko*.

Acetatos de Alditóis parcialmente O-metilados⁽¹⁾	%	Tipo de ligação⁽²⁾
2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	24,5	Glc _p -(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc _p	26,2	→3)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc _p	23,6	→6)-Glc _p -(1→
2,4-Me ₂ -Glc _p	25,7	→3,6)-Glc _p -(1→

⁽¹⁾Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução com NaDH₄ e acetilação.

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

Visando comprovar o tipo de ligação da cadeia principal foi realizada uma Degradação Controlada de Smith na fração SCW-SF-P, seguida de hidrólise ácida parcial. A fração resistente à degradação (Figura 17) demonstra as unidades monossacarídicas que não sofreram degradação e que constituem a cadeia principal do polímero. No espectro de ¹³C-RMN da fração obtida após Degradação Controlada de Smith pode ser observada a presença de sinais em δ 102,8; 86,1; 76,3; 72,8; 68,3 e 60,7 ppm correspondentes aos C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6 das unidades de β -Glc_p 3-O-substituídas.

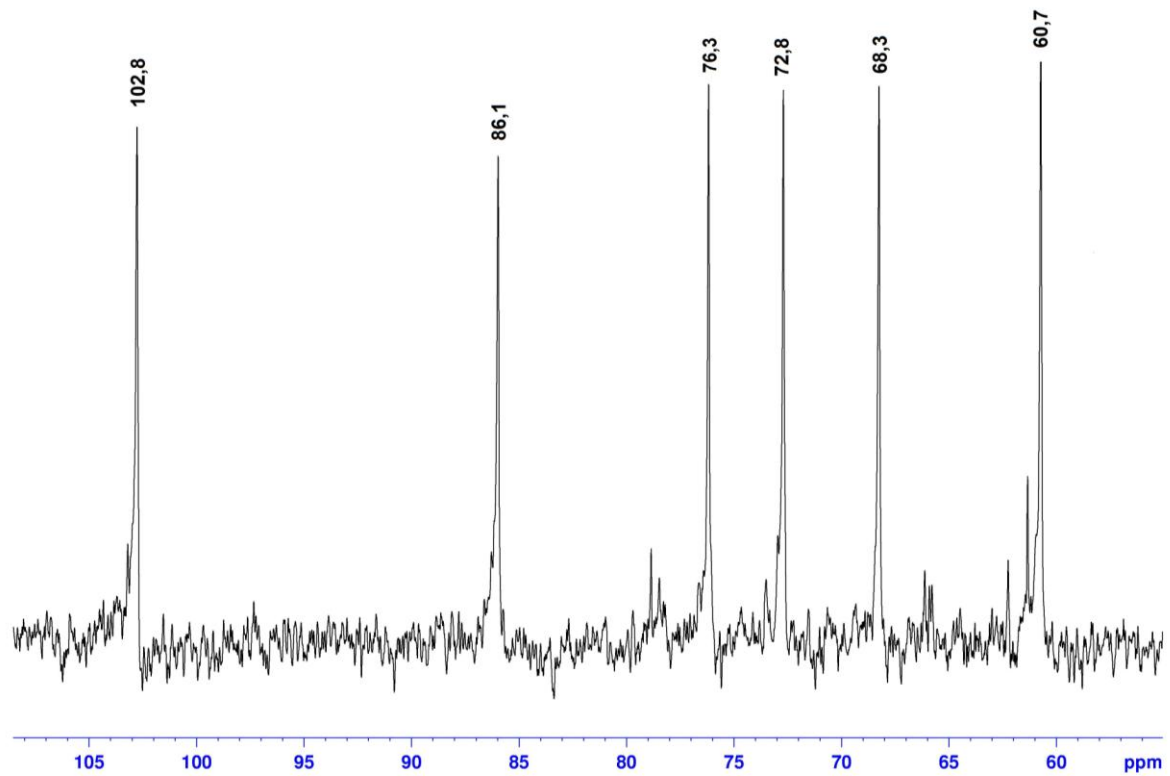


Figura 17. ^{13}C -RMN da fração SCW-SF-P resistente à degradação controlada de Smith em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C .

O espectro de HSQC da glucana (Figura 18) mostrou os sinais δ 102,4/4,41 e 102,4/4,12; 85,8/3,38; 60,5/3,58 e 60,6/3,36, respectivos ao C1/H1, C3/H3 e C6/H6 de unidades de β -Glc ρ 3-O-substituídas. Além disso, sinais em δ 68,1/3,41 e 68,1/3,15 e 68,1/3,96 são referentes às unidades de β -Glc ρ 6-O-substituídas.

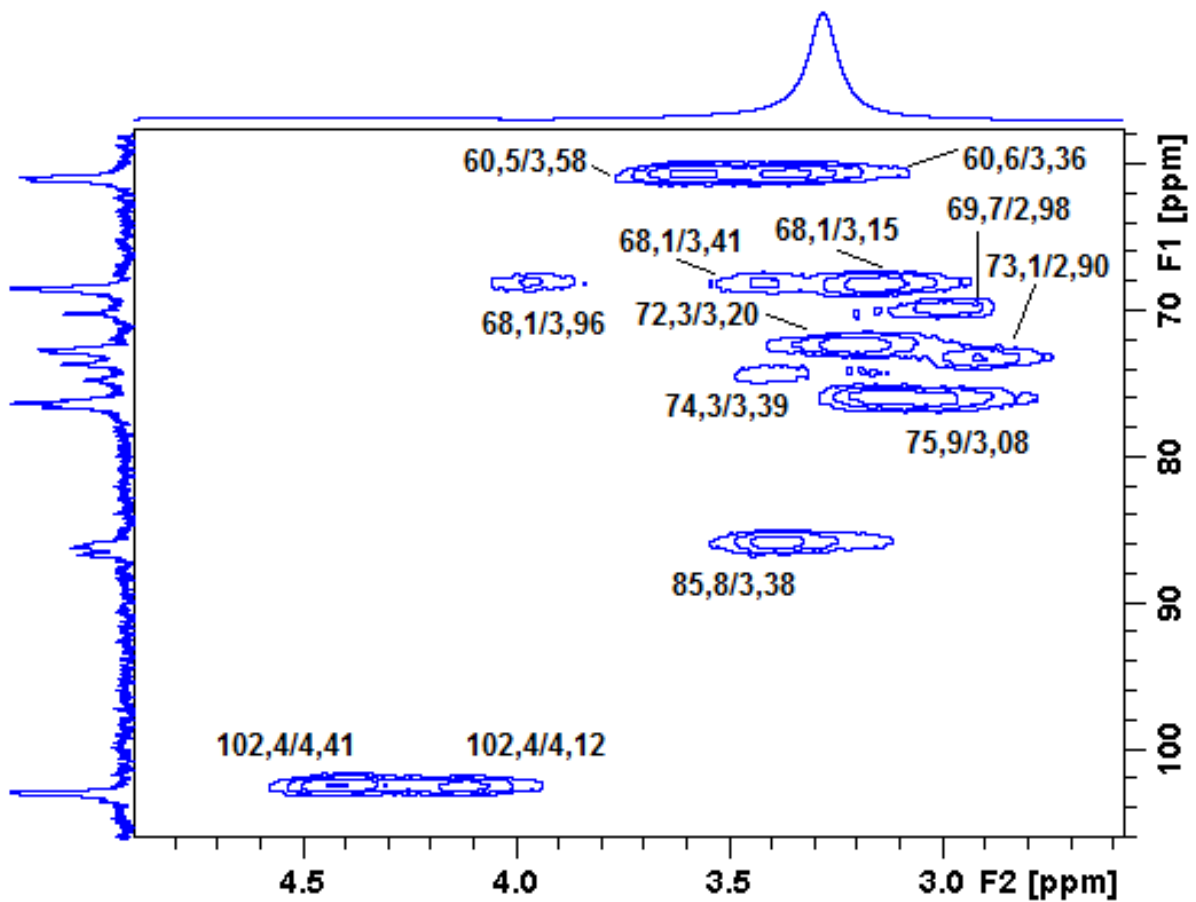


Figura 18. Espectro de HSQC da β -Glucana-(1,3)-(1,6) em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ a 70°C .

O oligossacarídeo repetitivo da glucana isolada (SCW-SF-P) está representado na Figura 19.

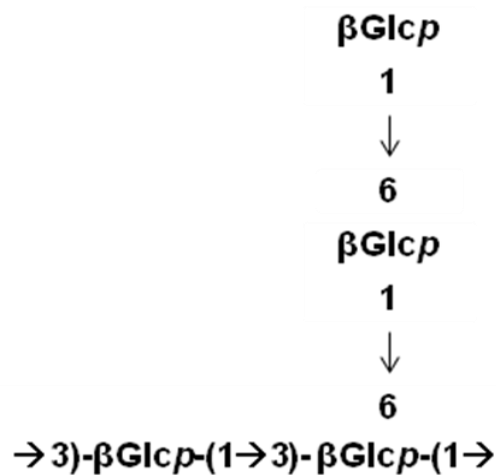


Figura 19. Oligossacarídeo repetitivo da glucana obtida do basidioma de *Pholiota nameko*.

Glucanas com cadeia principal β -(1 \rightarrow 3) e ramificações em β -(1 \rightarrow 6) são frequentemente descritas em extratos obtidos a partir de basidiomicetos, seja de seu basidioma ou biomassa micelial. Diversas espécies vêm sendo estudadas em relação a estes polissacarídeos, tais como *Hericium erinaceum* (DONG; JIA; FANG, 2006), *Pleurotus pulmonarius* (CARBONERO et al., 2006) e *Agaricus subrufescens* (WISITRASSAMEEWONG et al., 2012). Estes polímeros geralmente estão associados a outras estruturas da parede celular fúngica e apresentam ampla diversidade de estruturas e aplicações (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013; GIAVASIS, 2014).

5.2 EXTRATO AQUOSO A QUENTE

A fração aquosa a quente (HW), com rendimento de 15,6 g, foi analisada quanto a sua composição monossacarídica e apresentou como monossacarídeos glucose, manose e galactose (Tabela 4).

Tabela 4. Composição monossacarídica da fração HW.

Composição monossacarídica	Manose*	Galactose*	Glucose*
HW	10,1%	6,7%	83,2%

*Derivados alditol-acetatos obtidos após hidrólise, redução e acetilação. Analisados por GC-MS.

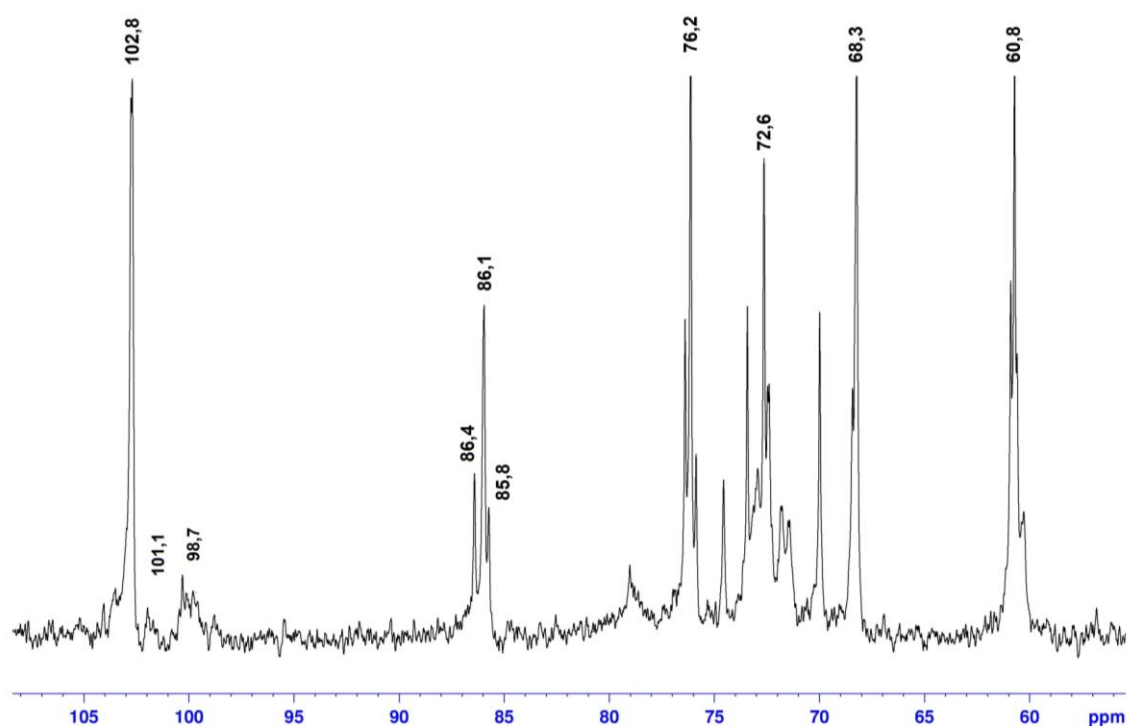


Figura 20. ¹³C-RMN da fração HW bruta em Me₂-SO-*d*₆ a 70°C.

A análise de ¹³C-RMN (Figura 20) apresentou os sinais δ 102,8; 101,1 e 98,7 correspondentes aos carbonos anoméricos das unidades de β -Glc_p, α -Gal_p e β -Man_p, respectivamente. O sinal em δ 68,3 revela a presença de unidades 6-O-substituídas e em δ 85,8; 86,1 e 86,4 a presença de unidades 3-O-substituídas (SMIDERLE et al., 2013).

Devido à presença de diferentes monossacarídeos constituindo essa fração, novos fracionamentos devem ser realizados em futuro próximo para a purificação e elucidação da estrutura dos principais polissacarídeos desta fração.

5.3 EXTRATO ALCALINO

A fração aquosa alcalina a 5% (AK), com rendimento de 26,0 g, apresentou como principais monossacarídeos manose, galactose e glucose (Tabela 5).

Tabela 5. Composição monossacarídica da fração AK.

Composição monossacarídica	Manose*	Galactose*	Glucose*
AK	50,3%	9,1%	40,6%

*Derivados alditol-acetatos obtidos após hidrólise, redução e acetilação. Analisados por GC-MS.

O espectro de ^{13}C -RMN (Figura 21) apresentou um padrão semelhante a fração HW, porém com maior intensidade no sinal δ 102,8 referente ao C-1 da β -Glc p . Para a purificação desta fração devem ser desenvolvidas metodologias de fracionamento para a completa elucidação das estruturas presentes neste extrato.

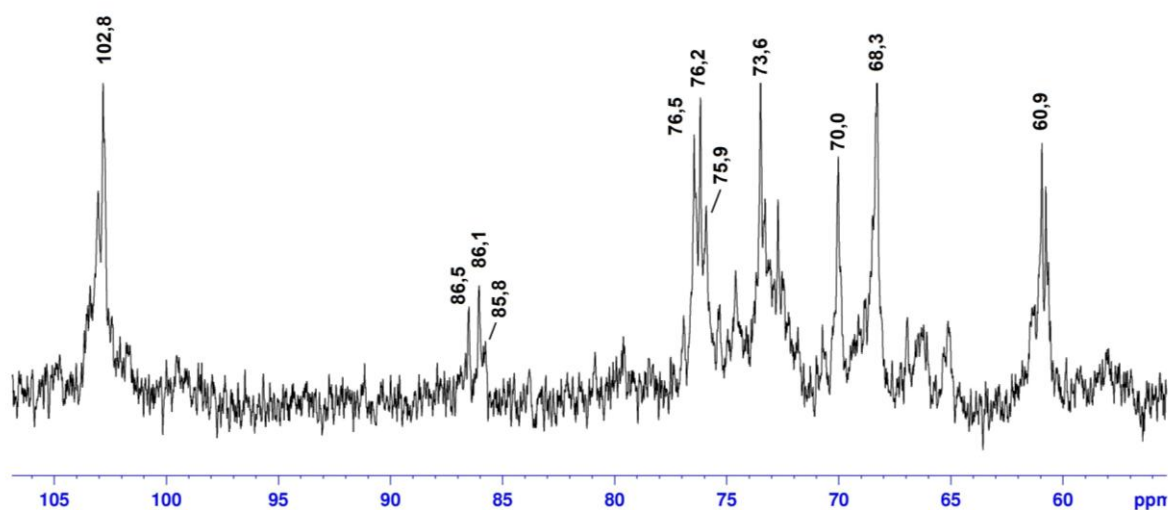


Figura 21. ^{13}C -RMN da fração AK bruta em $\text{Me}_2\text{-SO-}d_6$ a 70°C .

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após o processo de extração de polissacarídeos do cogumelo *Pholiota nameko* sugerem as seguintes estruturas:

- a) Manogalactana com cadeia principal de 3-O-Me- α -Galp e α -Galp (1 \rightarrow 6) ligadas, com unidades α -Galp 2,6-di-O-substituídas, constituindo uma ramificação em O-2 por terminais não redutores de β -Manp;
- b) β -glucana com cadeia principal ligada (1 \rightarrow 3), com presença de unidades de β -Glc p substituídas em O-6, como unidades ramificantes e posteriormente por unidades terminais não redutoras de β -Glc p.

Os extratos obtidos das extrações aquosa a quente e alcalina não foram purificados, portanto as estruturas químicas não foram caracterizadas. No entanto, por estudos parciais dos espectros de ^{13}C -RMN e composição monossacarídica, pode-se sugerir a presença de estruturas compostas por β -Glc p, α -Galp e β -Manp, possivelmente semelhantes às extraídas na fração aquosa a temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULUS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Phylum Basidiomycota. In: ALEXOPOULUS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **The Mycota**. 4 ed. 1996.

BOT, A.; SMORENBURG, H. E.; VREEKER, R.; PÂQUES, M.; CLARK, A. H. Melting behaviour of schizophyllan extracellular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20°C. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 4, p. 363-372, 2001.

CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M.; DIAS P. F.; MARASCHIN, M. W. B-glucanas do cogumelo *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets): Extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 35, p. 36-47, 2005.

CARBONERO, E. R.; TISCHER, C. A.; COSENTINO, C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a galatomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 469-473, 2003.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J. et al. A β -glucan from the fruit bodies of an edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 252–257, 2006.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ROSA, M. C. C.; TORRI, G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual partialli 3-O-methylated α -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 252-257, 2008.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. Fungal diversity. In: CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 2 ed. 2001.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. A water-insoluble (1→3)-β-D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2990–2993, 2006.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β-(1→3),(1→6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, p. 635–652, 2007.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

CORRADI da SILVA, M. D. L.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P. A. J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. and effect of storage. **Phytochemistry**, v. 33, n. 3, p. 547-552, 1993.

CUI, Y. J. ;LI, Q. Z. Immune effect of *Pholiota nameko* polysaccharide on the aging model mice in the different period. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 35, n. 2, p. 159–161, 2004.

CUI, F. J.; TAO, W. Y.; XU, Z. H.; GUO, W. J.; XU, H. Y.; AO, Z. H.; JIN, J.; WEI, Y. Q. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 395-401, 2007.

DONG, Q.; JIA, L. M.; FANG, J. N. A β-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Hericium erinaceum* and its aqueous conformation. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 791-795, 2006.

ENSHASY, H. A. E.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, December 2013.

FEARON, K.; STRASSER, F.; ANKER, S. D.; BOSAEUS, I.; BRUERA, E.; FAINSINGER, R. L.; JATOI, A.; LOPRINZI, C.; MACDONALD, N.; MANTOVANI, G.; DAVIS, M.; MUSCARITOLI, M.; OTTERY, F.; RADBRUCH, L.; RAVASCO, P.;

WALSH, D.; WILCOCK, A.; KAASA, S.; BARACOS, V. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489-495, 2011.

GAN, D.; MA, L.; KIANG, C.; XU, R.; ZENG, X. Production, preliminary characterization and antitumor activity in vitro of polysaccharides from the mycelium of *Pholiota dinghuensis* Bi. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 997-1003, 2011.

GIAVASIS, I.; BILLIADERIS, C. Microbial polysaccharides. In: **Functional Food Carbohydrates**. Edited by: BILLIADERIS, C.; IZYDORCZYK, M. CRC Press, p. 167-214, 2006.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 162-173, 2014.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GRACHER, A. H. P. **Caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação de *Ganoderma multiplicatum***. Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 80 p., 2005.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Introdução aos Carboidratos. In: HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

JAMES, P. G.; CHERNIAK, R. 4-Methylmorpholine N-oxide-methyl sulfoxide soluble glucan of *Piptoporus betulinus*. **Carbohydrate Research**, v. 206, p. 167-172, 1990.

JANNSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. A. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. University of Stockholm, **Chemical Communications**, n. 8, p. 1-73, 1976.

JIN, Y.; ZHANG, L. N.; ZHANG, M.; CHEN, L.; CHEUNG, P. et al. Antitumor activities of heteropolysaccharides of *Poria cocos* mycelia from different strains and culture media. **Carbohydrate Research**, v. 338, v. 14, p. 1517–1521, 2003.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; NAGAI, K.; UKAI, S.; HARA, C. (1→3)-β-D-glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea* and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 273-279, 1989.

LEIFA, F.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT** **40**, v.2, p. 30–35, 2007.

LI, H.; WANG, S.; Kinetics of inhibition of ribonuclease A by *Pholiota nameko* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 2, p. 134-138, 2007.

LI, H.; LU, X.; ZHANG, S.; LU, M.; LIU, H. Anti-inflammatory Activity of Polysaccharide from *Pholiota nameko*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 6, p. 669-675, 2008.

LI, H.; ZHANG, M.; MA, G. Hypolipidemic effect of the polysaccharide from *Pholiota nameko*. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 556–562, 2010.

LI, H.; LIU, X.; LI, Y.; HUA, Y.; ZHI, D. PANG, G. Effects of the polysaccharide from *Pholiota nameko* on human cytokine network in serum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 164-170, 2012.

LI, H.; LIU, L.; TAO, Y.; ZHAO, P.; WANG, F.; HUAI, L.; ZHI, D.; LIU, J.; LI, G.; DANG, C.; XU, Y. Effects of polysaccharides from *Pholiota nameko* on maturation of

murine bone marrow-derived dendritic cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 188-167, 2014.

MIZUNO, T.; KINOSHITA, T.; ZHUANG, C.; ITO, H.; MAYUZUMI, Y. Antitumor active heteroglycans from *Niohshimeji* mushroom, *Tricholoma giganteum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 568-571, 1995.

MIZUNO, M.; NISHITANI, Y. Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. **Journal of Clinical and Biochemistry Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 202-207, 2013.

MORETTI, A.; SARROCCO, S. Fungi. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 162-168, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Fungos. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Guanabara Koogan, 2007.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 358-375, 2016.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography mass

spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1208, n. 1-2, p. 215-222, 2008.

SILVEIRA, M. L. L.; SMIDERLE, F. R.; AGOSTINI, F.; PEREIRA, E. M.; BONATTI-CHAVES, M.; WISBECK, E.; RUTHES, A. C.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; FURLAN, S. A.; IACOMINI, M. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 90-96, 2015.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2189-2196, 2006.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, n. 15, p. 2731-2736, 2008.

SMIDERLE, F. R. **Polissacarídeos produzidos por basidiomicetos e ascomiceto: caracterização estrutural e atividade imunomoduladora**. Tese de doutorado em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 159 p., 2012.

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z.; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 \rightarrow 6) – β – D – glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 91-99, 2013.

SMIDERLE, F. R.; BAGGIO, C. H.; BORATO, D. G.; SANTANA-FILHO, A. P.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Anti-inflammatory Properties of the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris* Might Be Related to Its Linear (1 \rightarrow 3) – β – D – glucans. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, e 110266, 2014.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n.1, p. 792-809, 2013.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p.17, 2014.

TAO, Y.; ZHANG, L.; YAN, F.; WU, X. Chain conformation of water-insoluble hyperbranched polysaccharide from fungus. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2321-2328, 2007.

WANG, X.; ZHANG, L. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2209–2216, 2009.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WISITRASSAMEEWONG, K.; KARUNARATHNA, S.C.; THONGKLANG, N.; ZHAO, R.; CALLAC, P.; MOUKHA, S.; FÉRANDON, C.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 131-146, 2012.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, v. 2, p. 65-68. 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, v. 2, p. 211-215, 1963b.

XIAO, Y.; LIANG, S.; QIU, G.; WU, J.; ZHANG, J.; HU, X. Preparation, characterization and tableting properties of two new pachyman-based

pharmaceutical AIDS: I. disintegrants in dispersible tablets. **Polymers of Advanced Technologies**, v. 18, n. 4, p. 268-274, 2007.

Z Aidman, B. Z.; Yassin, M.; Mahajna, J.; Wasser, S. P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 453–468, 2005.

Zhang, M.; Cui, S. W.; Cheung, P. C. K.; Wang, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 4–19, 2007.

Zhang, Y.; Liu, Z.; Ng, T. B.; Chen, Z.; Qiao, W.; Liu, F. Purification and characterization of a novel antitumor with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, v. 99, p. 28-37, 2014.

Zhao, H.; Wang, J.; Lu, Z. Optimization of process parameters of the *Pholiota squarrosa* extracellular polysaccharide by Box-Behnken statistical design. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 677-680, 2009.