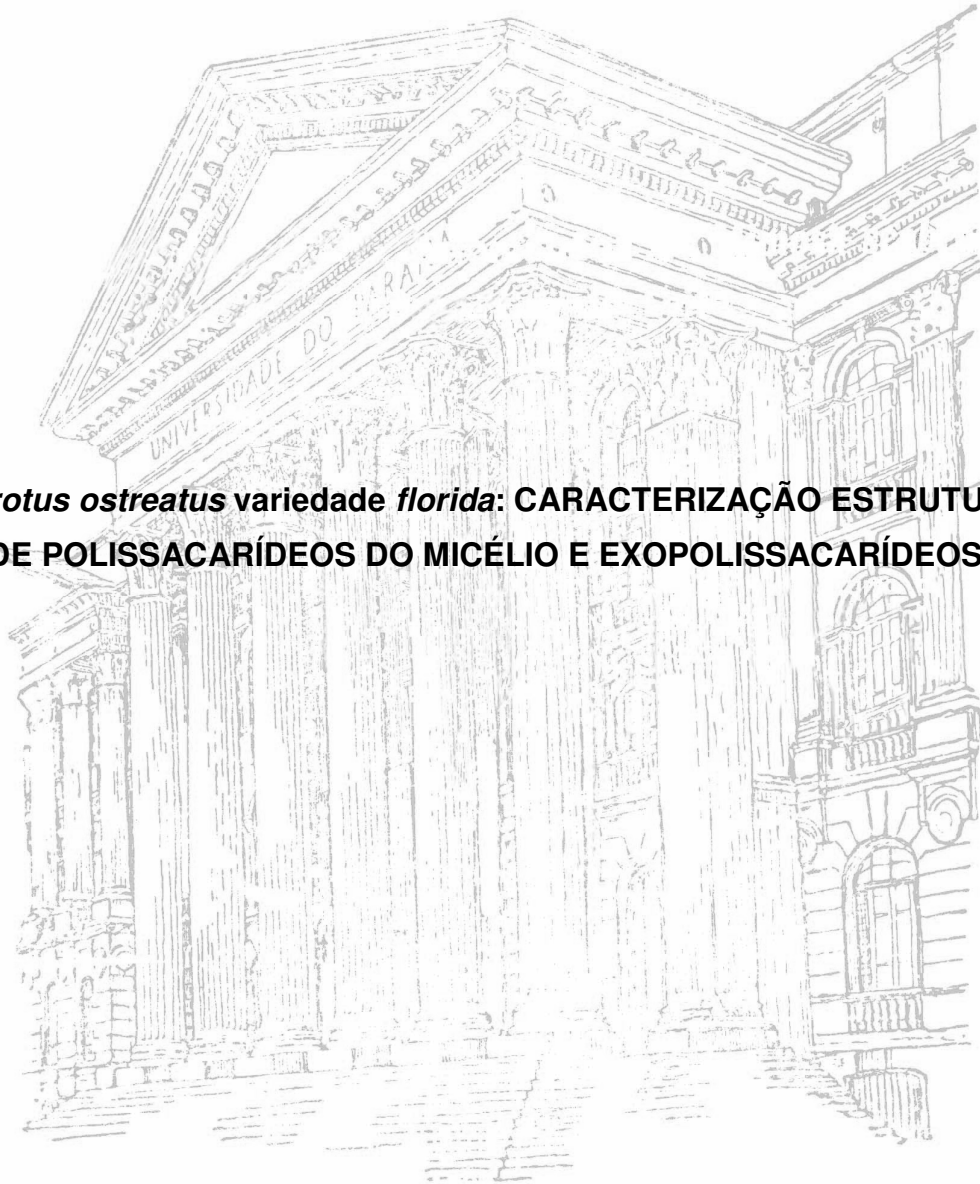


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIRCE LEIMI KOMURA

Pleurotus ostreatus variedade *florida*: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO E EXOPOLISSACARÍDEOS



CURITIBA
2009

DIRCE LEIMI KOMURA

***Pleurotus ostreatus* variedade *florida*: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO E EXOPOLISSACARÍDEOS**

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

Orientador:

Prof. Dr. Marcello Iacomini

Coorientadora:

Dra. Elaine Rosehrer Carbonero

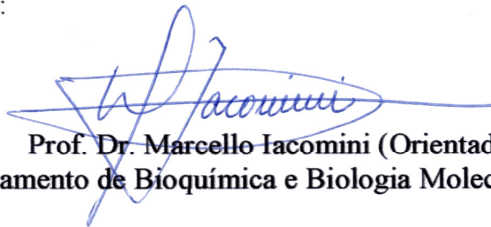
**CURITIBA
2009**

TÉRMO DE APROVAÇÃO

DIRCE LEIMI KOMURA

***Pleurotus ostreatus* variedade florida: Caracterização Estrutural de Polissacarídeos do Micélio e Exopolissacarídeos**

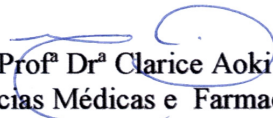
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



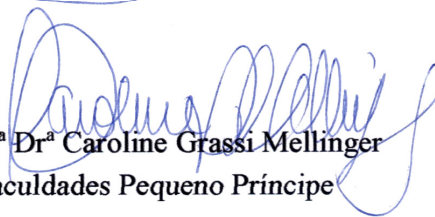
Prof. Dr. Marcello Iacomini (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr. Lauro Mera de Souza
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª Drª Clarice Aoki Osaku
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - UNIOESTE



Profª Drª Caroline Grassi Mellinger
Faculdades Pequeno Príncipe

Curitiba, 11 de fevereiro de 2009.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Coorientadora: Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Colaboradora: Andrea Caroline Ruthes

À minha família por todo amor e compreensão. À minha Mãe, em especial, que sempre vai estar em meu coração, pelo carinho e pelo exemplo de vida. Ao meu Pai e ao meu Irmão por serem meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só se tornou possível, pois contaram com o carinho, apoio, críticas, discussões de pessoas maravilhosas que acompanharam o encaminhar desta pesquisa.

Primeiramente quero agradecer a Deus e à minha família por estarem sempre presentes na minha vida. À minha irmã de coração, Mizinha, por todo carinho, incentivo e pela amizade sincera. À minha cunhada Suely, que considero como uma irmã, pela força, carinho e amizade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Marcello Iacomini pela orientação e pelo carinho e confiança.

À minha coorientadora Elaine Carbonero pela paciência e dedicação em me ensinar a desvendar os mistérios dos polissacarídeos e pela amizade.

À minha colaboradora Andrea C. Ruthes por estar sempre disposta a me ajudar, por estar presente em todos os momentos que eu me sentia “perdida” e pela amizade.

Ao Prof. Miguel Nosedá, Prof. Guilherme L. Sasaki e à Dra. Elaine Carbonero pelas análises de RMN. E em especial, ao Prof. Guilherme e sua equipe que ressuscitaram o RMN a tempo de analisar os espectros que ainda faltavam na minha dissertação.

À Rosane e à Elizângela pelas análises em GC-MS e GLC e GPC.

Ao Prof. Adair R. S. dos Santos e colaboradores e em especial à doutoranda Cristiane Baggio do Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, pelos experimentos biológicos.

Aos ótimos professores que ministraram as disciplinas durante esse período.

Ao programa de pós-graduação, à Professora Leda e à Dona Marilza

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao pessoal do mestrado, em especial ao Arquimedes, Jú Osaki, Larry, Ricardo, Tuca, Anelis, Carol Heyse, Tati, Michelle, Vivian, Paulo pelo ótimo convívio.

À Carol das Oxidações e à Ana Helena por compartilhar a experiência de representantes dos alunos no Colegiado do programa de Pós-graduação.

À Moira e à Natália por embarcarem junto na pesquisa com os cogumelinhos.

À Carol S'antana e ao Daniel pela amizade e pelas conversas animadas.

À Giovana e à Carol de Pira pelas companhias nos finais de semana de laboratório, sem elas todo o trabalho teria sido muito mais difícil.

À Ana Helena, Fhernada e Giovana, que foram as companheiras dos congressos de Cogumelos.

À Fer Simas por me assessorar nas normas de formatação e pelas discussões científicas.

À todos do Laboratório, que sem a convivência animada e divertida desse povo, tudo seria muito chato: Amanda, Douglas, Prof. Gorin, Lauro, Lorena, Lucimara, Phelipe, Ruth e Thales.

Ao Talles pelo carinho, compreensão, amizade e pelas conversas “filosóficas” e pelo incentivo.

A todos os amigos da Biologia, Fausto, Vivi, Ester, Jú Osaki, pelo apoio em todos os momentos!!!

À todos que de alguma forma fizeram parte desta etapa científica. Obrigada a todos!!!

“Se eu pudesse deixar algum presente à você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* var. *florida* conhecido como “Hiratake” é um dos cogumelos consumidos no Brasil, apresenta alto valor nutricional, além de propriedades nutracêuticas. Este basidiomiceto foi cultivado em meio líquido com o objetivo de obter os exopolissacarídeos e a biomassa micelial. Foram utilizados os meios CZAPECK e POL, os quais forneceram 525 mg.l⁻¹ e 530 mg.l⁻¹ de EPS e 3 g.l⁻¹ e 2,53 g.l⁻¹ de biomassa micelial, respectivamente. A partir dos EPSs foram caracterizadas mananas similares, independente do meio no qual o micélio foi cultivado. Estas são compostas por uma cadeia principal formada por α -Manp-(1→6)-ligadas, parcialmente substituída em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais contêm unidades de α -Manp 2-O- e 3-O-substituídas e uma massa molar de 3,9.10⁴ g.mol⁻¹ e 4,6.10⁴ g.mol⁻¹, para as mananas obtidas a partir do meio CZAPECK e POL, respectivamente. Ainda, a partir da biomassa cultivada em meio CZAPECK foram obtidos extratos aquosos e alcalino, os quais foram submetidos a processos de purificação. Estas frações foram caracterizadas quanto a sua estrutura química com análises, incluindo metilação-GC-MS e RMN-¹³C, desta forma foi observada a presença de uma manogalactana, glicogênio e uma β -glucana. A manana obtida a partir do EPS produzido pelo cultivo do micélio em meio líquido POL (fração M-EP) foi analisada quanto a sua atividade antinociceptiva e antiinflamatória, e foi observado que este polímero promoveu uma inibição da resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético em 91 ± 7% na dose de 100 mg/kg, porém não apresentou atividade antiinflamatória. Os resultados mostram que é possível obter, tanto polímeros similares, quanto diferentes àqueles encontrados no basidioma, desta forma o cultivo submerso apresenta um potencial na produção de moléculas com atividade biológica de interesse farmacológico.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESQUEMA DO BASIDIOMA DE BASIDIOMICETOS (A); CRESCIMENTO MICELIAL EM PLACA COM MEIO BDA (B), MICÉLIO EM FORMA DE <i>PELLETS</i> EM CULTURA SUBMERSA (C) DE <i>Pleurotus eryngii</i>	19
FIGURA 2 -	<i>Pleurotus</i> spp: <i>P. ostreatus</i> var. <i>H1</i> (A); <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> (B); <i>P. citrinopileatus</i> (C); <i>P. eryngii</i> (D) e <i>P. ostreatoroseus</i> (E).....	22
FIGURA 3 -	BASIDIOMA DE <i>Lentinus edodes</i> (A); LENTINANA COMERCIALIZADA NO JAPÃO (B); ESQUEMA DE ESTRUTURA DA LENTINANA (C).....	30
FIGURA 4 -	BASIDIOMA DE <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	33
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DO MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	36
FIGURA 6 -	MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> , EM MEIO LÍQUIDO BD (A), HIFAS COM ANSAS (SETA) (B).....	47
FIGURA 7 -	FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DO EPS DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> EM CULTIVO SUBMERSO NOS MEIOS LÍQUIDOS CZAPECK E POL.....	49
FIGURA 8 -	PERFIS DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO R16PF-EC (A) E R16PF-EP (B) POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	51
FIGURA 9 -	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO R16PF-EC (A) e R16PF-EP (B) DO EPS DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	52
FIGURA 10 -	FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	55
FIGURA 11 -	FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO CW.....	56
FIGURA 12 -	PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA FRAÇÃO SFCW POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	57

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO R16-CW (A) R10CW (B) DO MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> OBTIDA EM MEIO CZAPECK.....	58
FIGURA 14 - PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES R16DCW E POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	59
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO R10CW (A) E ESPECTRO DE RMN- ¹³ C-DEPT (B) DO MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> ; MANOGALACTANA DO BASIDIOMA DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> (C).....	60
FIGURA 16 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO II.....	61
FIGURA 17 - PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES SFHW E RMHW POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	62
FIGURA 18 - ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES RMHW DO MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> OBTIDA EM MEIO CZAPECK (A), ESPECTRO DE RMN- ¹³ C-DEPT (B) E PADRÃO DE GLICOGÊNIO (C).....	63
FIGURA 19 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO N1.....	65
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO SFN1 (A); RDN1 (B) E RMN- ¹³ C-DEPT (C) DO MICÉLIO DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> OBTIDA EM MEIO CZAPECK.....	66
FIGURA 21 - EFEITO DE EFP-AB (1-100 mg/Kg, I.P.) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE EVAN'S BLUE (C) INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	EXOPOLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS.....	28
TABELA 2 -	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE <i>Pleurotus</i> spp.....	31
TABELA 3 -	MEIO DE BATATA-DEXTROSE (BD).....	33
TABELA 4 -	MEIO DE CULTURA LÍQUIDO CZAPECK.....	34
TABELA 5 -	MEIO DE CULTURA LÍQUIDO POL.....	34
TABELA 6 -	QUADRO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE EPS E BIOMASSA MICELIAL EM <i>Pleurotus</i> spp.....	48
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> EM MEIO CZAPECK.....	50
TABELA 8 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> EM MEIO POL.....	50
TABELA 9 -	ANÁLISE POR METILAÇÃO DAS FRAÇÕES R16PF-EC (M-EC) E R16PF-EP (M-EP) DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	53
TABELA 10 -	ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO R16PF-EP (M-EP) DE <i>P.</i> <i>ostreatus</i> var. <i>florida</i>	54
TABELA 11 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO AQUOSO I DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	54
TABELA 12 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO AQUOSO II DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	62
TABELA 13 -	ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO RMHW DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	62
TABELA 14 -	ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO RMHW DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	64
TABELA 15 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ACALINO I DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α	- alfa
α/β	- alfa e beta
α -D-Manp	- alfa-D-manopiranoose
β	- beta
δ	- deslocamento químico
α -L-Fuc	- alfa-L-fucose
(NH ₄) ₂ SO ₂	- sulfato de amônio
¹³ C DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
3-O-Me-Gal	- 3-O-metil-galactose
BDA	- meio de cultivo – Batata, dextrose e ágar
CaCO ₃	- carbonato de cálcio
Cu ²⁺	- cobre
CW	- extrato aquoso a frio
D ₂ O	- óxido de deutério (água deuterada)
dn/dc	- variação do índice de refração em relação à concentração
E10CW	- fração eluída após ultrafiltração em membrana de 10 KDa originada a partir da fração R16DCW
E16CW	- fração insolúvel em solução de Fehling eluída em membrana de 16 KDa do extrato aquoso a frio
E16DCW	- fração solúvel em solução de Fehling retida em membrana de 16 KDa após degradação enzimática e eluída 16 KDa em do extrato aquoso a frio
E16SFS-EC	- fração solúvel em solução de Fehling eluída em membrana de 16 KDa do EPS obtida em meio CZAPECK
EC	- cultivo em meio CZAPECK
EDN1	- fração eluída em membrana de diálise após degradação enzimática do extrato alcalino
EMHW	- fração eluída em membrana de 1000 KDa do extrato aquoso em banho fervente
EP	- cultivo em meio POL
EPS	- exopolissacarídeo

FeSO ₄ . 7H ₂ O	- sulfato de ferro heptahidratado
Fuc	- fucose
Fuc _p	- fucopirranose
Gal	- galactose
Gal _p	- galactopirranose
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
Glc	- glucose
HPSEC-MALLS	- cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
HW	- extrato aquoso obtido em banho fervente, ~ 100°C
i.p.	- via intraperitoneal
ID ₅₀	- dose do composto que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle
K ₂ HPO ₄	- fosfato de potássio dibásico
KCl	- cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	- fosfato de potássio monobásico
<i>m/z</i>	- relação entre massa e carga
Man	- manose
Man _p	- manopirranose
M-EP	- manana obtida a partir do exopolissacarídeo do cultivo em meio POL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	- sulfato de magnésio heptahidratado
N1	- extrato obtido em solução alcalina 1%
NaB ² H ₄	- boroidreto de sódio deuterado
NaNO ₃	- nitrato de sódio
NaOH 1%	- solução de hidróxido de sódio 1 %
<i>p/v</i>	- relação peso e volume
PCW	- precipitado obtido por congelamento/ degelo do extrato aquoso a frio
P-EC	- precipitado obtido por congelamento /degelo do EPS produzido em meio CZAPECK

P-EC	- precipitado obtido por congelamento /degelo do EPS produzido em meio CZAPECK
P-EP	- precipitado obtido por congelamento/degelo do EPS produzido em meio POL
PFCW	- fração insolúvel em solução de Fehling do extrato aquoso a frio
PFHW	- fração insolúvel em solução de Fehling do extrato aquoso em banho fervente
PFN1	- fração insolúvel em solução de Fehling do extrato alcalino
PFS-EC	- fração insolúvel em solução de Fehling do EPS obtida em meio POL
PFS-EP	- fração insolúvel em solução de Fehling do EPS obtida em meio CZAPECK
PHW	- precipitado obtido por congelamento/ degelo do extrato aquoso a quente
PN1	- precipitado obtido por congelamento/ degelo do extrato alcalino
r.p.m.	- rotações por minuto
R10CW	- fração retida após ultrafiltração em membrana de 10 KDa originada a partir da fração R16DCW
R16CW	- fração insolúvel em solução de Fehling retida em membrana de 16 KDa do extrato aquoso a frio
R16DCW	- fração solúvel em solução de Fehling retida em membrana de 16 KDa após degradação enzimática e retida em 16 KDa do extrato aquoso a frio
R16PFS-EC	- fração insolúvel em solução de Fehling retida em membrana de 16 KDa do EPS obtida em meio CZAPECK
R16PFS-EP	- fração insolúvel em solução de Fehling retida em membrana de 16 KDa do EPS obtida em meio POL
R16SFS-EC	- fração solúvel em solução de Fehling retida em membrana de 16 KDa do EPS obtida em meio CZAPECK
RDN1	- fração retida em membrana de diálise (16 KDa) após degradação enzimática do extrato alcalino

RMHW	- fração retida em membrana de 1000 KDa do extrato aquoso em banho fervente
RMN- ¹³ C	- ressonância magnética nuclear de carbono treze
SCW	- sobrenadante obtido por congelamento/ degelo do extrato aquoso a frio
S-EC	- sobrenadante obtido por congelamento/degelo do EPS obtida em meio POL
S-EP	- sobrenadante por congelamento/degelo do EPS obtida em meio CZAPECK
SFCW	- fração solúvel em solução de Fehling do extrato aquoso a frio
SFHW	- fração solúvel em solução de Fehling do extrato aquoso em banho fervente
SFN1	- fração solúvel em solução de Fehling do extrato alcalino
SFS-EC	- fração solúvel em solução de Fehling do EPS obtida em meio CZAPECK
SFS-EP	- fração solúvel em solução de Fehling do EPS obtida em meio POL
SHW-M	- fração solúvel obtida por congelamento/ degelo do extrato aquoso a frio
SN1	- fração solúvel obtida por congelamento/ degelo do extrato alcalino
TFA	- ácido trifluoracético
v/v	- relação volume e volume
Xyl	- xilose
var.	- variedade
Zn ²⁺	- zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVO GERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 <i>Pleurotus</i> spp.	22
2.2 CULTIVO EM CULTURA SUBMERSA.....	23
2.3 BASIDIOMICETOS - POLISSACARÍDEOS	25
2.4 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	33
3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO	33
3.3 CULTIVO SUBMERSO DO MICÉLIO DE <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	34
3.4 RECUPERAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS).....	35
3.5 EXTRAÇÃO DA BIOMASSA MICELIAL.....	35
3.5.1 Extração Aquosa	36
3.5.2 Extração Alcalina.....	37
3.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS EM CULTURA SUBMERSA.....	37
3.6.1 Fracionamento dos Polissacarídeos por congelamento e Degelo.....	37
3.6.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling	38
3.6.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas e Ultrafiltração	38
3.6.4 Purificação por Degradação Enzimática.....	39
3.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	39
3.7.1 Composição Monossacarídica	40
3.7.2 Metilação dos Polissacarídeos Hidrólise por Ácido Fórmico	40
3.7.3 Hidrólise por Ácido Fórmico	41
3.7.4 Hidrólise por Ácido Sulfúrico	41
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	41
3.8.1 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar.....	41
3.8.2 Determinação da Composição Monossacarídica e de Metilação	42
3.8.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	43

3.9 TESTE BIOLÓGICO: ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA.....	43
3.9.1 Animais.....	43
3.9.2 Constrição Abdominal, Permeabilidade Capilar Peritoneal e Infiltração de Leucócitos Causada por Injeção de Solução de Ácido Acético 0,6%	44
3.9.3 Análises Estatísticas	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	46
4.2 PURIFICAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS.....	48
4.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS DO MICÉLIO EM CULTIVO SUBMERSO EM MEIO CZAPECK.....	55
4.3.1 Purificação do Extrato Aquoso I	56
4.3.2 Purificação do Extrato Aquoso II	61
4.3.3 Purificação do Extrato Alcalino N1	64
4.4 TESTE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA.....	68
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Os basidiomicetos, muitos destes, conhecidos popularmente como cogumelos, vêm sendo extensivamente estudados, devido principalmente ao interesse medicinal, que é atribuído à presença de polissacarídeos que atuam como modificadores de resposta biológica. Dentre as ações reportadas, destacam-se as atividades: hipoglicemiante, antiviral, antiinflamatória e principalmente antitumoral.

O primeiro passo para esses estudos é a obtenção de seus polissacarídeos. Estes podem ser provenientes do basidioma ou do cultivo submerso, que fornece os exopolissacarídeos, presentes no meio de cultura, e o micélio para sua posterior extração (Figura 1).

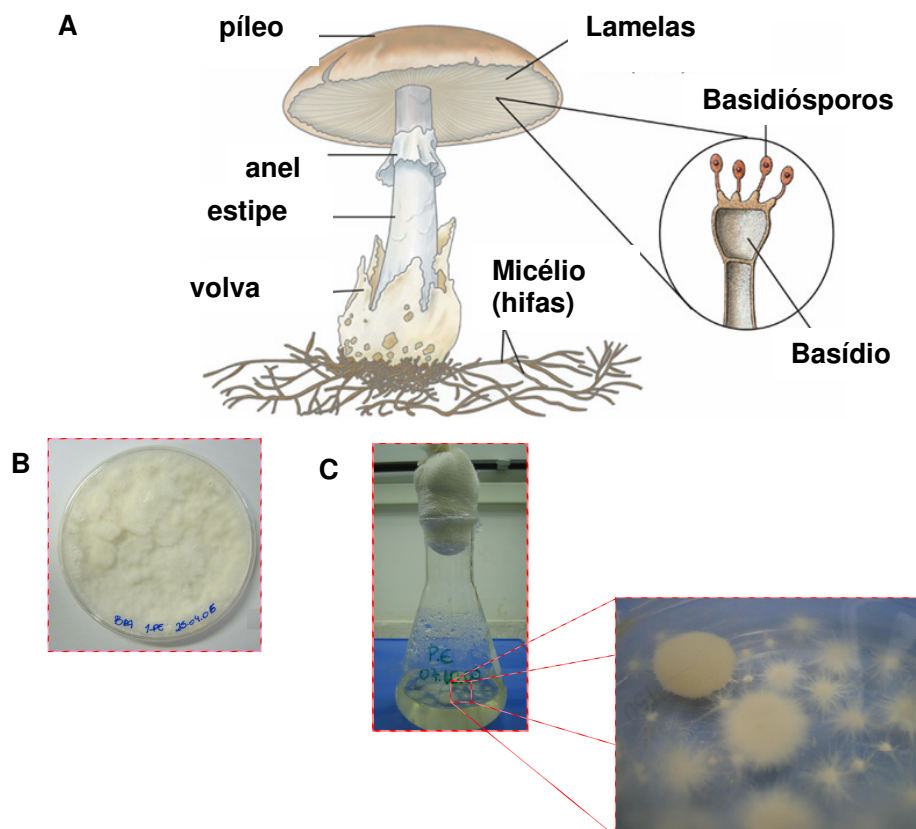


FIGURA 1 - ESQUEMA DO BASIDIOMA DE BASIDIOMICETOS (A); CRESCIMENTO MICELIAL EM PLACA COM MEIO BDA (B), MICÉLIO EM FORMA DE *PELLETS* EM CULTURA SUBMERSA (C) DE *Pleurotus eryngii*

Fonte: Figura A - Modificado de http://www.kalipedia.com/kalipediamedia/cienciasnaturales/edia/200704/17/delavida/20070417klpcnavid_35.Ees.SCO.png

A caracterização estrutural dessas moléculas é importante para o entendimento de seus mecanismos de ação, uma vez que a maioria dos estudos relacionados à atividade biológica utiliza o extrato bruto de basidiomicetos e este, em geral, apresenta uma mistura de polissacarídeos de estruturas distintas. Desta forma, não se pode afirmar quais as moléculas que, de fato, teriam algum efeito farmacológico. O isolamento e a caracterização destes polímeros são etapas importantes para elucidar esta questão.

O cultivo submerso de basidiomicetos é uma alternativa na obtenção de polissacarídeos por apresentar vantagens como, maior controle sobre as condições de cultivo, como pH, temperatura e composição do meio de cultura. Além disso, apresenta um período de tempo mais curto quando comparado com o cultivo em substrato sólido (serragem, palha de arroz, etc), tanto para a obtenção dos exopolissacarídeos quanto dos polissacarídeos provenientes do micélio.

A partir da revisão bibliográfica foi observado que trabalhos relacionados à caracterização da estrutura fina de polissacarídeos obtidos em cultivo submerso de basidiomicetos, os exopolissacarídeos e polissacarídeos obtidos por extração do micélio, vêm recebendo certo destaque. No entanto, ainda há poucos estudos dessas fontes quando comparados aos estudos relacionados aos polímeros obtidos a partir do basidioma.

Pleurotus ostreatus var. *florida* foi o material de escolha para a realização deste estudo por se tratar de uma espécie recentemente estudada em nosso laboratório (Química de Carboidratos-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR), quanto às estruturas polissacarídicas presente no basidioma. Contudo, o cultivo submerso deste basidiomiceto visando à obtenção de polissacarídeos extracelulares e micelial, bem como a caracterização da estrutura fina destes polímeros, ainda não foi descrita na literatura. Assim, será possível fazer uma análise comparativa dessas fontes de polissacarídeos e revelar qual o verdadeiro potencial do cultivo submerso na produção de polímeros que apresentam potencial farmacológico.

1.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a estrutura fina de exopolissacarídeos e polissacarídeos do micélio obtidos por cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*, comparando-os com as estruturas encontradas no basidioma.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o micélio de *P. ostreatus* var. *florida* através de fragmentos do basidioma do cogumelo em meio de cultivo;
- Cultivar o micélio de *P. ostreatus* var. *florida* em cultura submersa com a finalidade de obter biomassa micelial e os exopolissacarídeos;
- Isolar, purificar e caracterizar estruturalmente os exopolissacarídeos obtidos;
- Extrair os polissacarídeos do micélio para obter extratos aquosos e alcalinos;
- Purificar e caracterizar estruturalmente os extratos obtidos do micélio;
- Analisar comparativamente os polissacarídeos encontrados no micélio e no meio de cultivo.
- Submeter a fração polissacarídica purificada a testes biológicos: Atividade antinociceptiva e antiinflamatória.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pleurotus* spp.

Mais de 1000 espécies de *Pleurotus* foram descritas no mundo, no entanto aproximadamente 50 destas são reconhecidas como válidas para este gênero (GUZMAN, 2000).

A maioria das espécies conhecidas do gênero *Pleurotus* é comestível, sendo o *Pleurotus ostreatus* (“Shimeji”; cinza) um dos mais consumidos. Outras espécies como *P. ostreatus* variedade *florida* (“Hiratake”; branco), *P. ostreatoroseus* (Salmão) e *P. eryngii*, também são comumente encontrados (Figura 2).

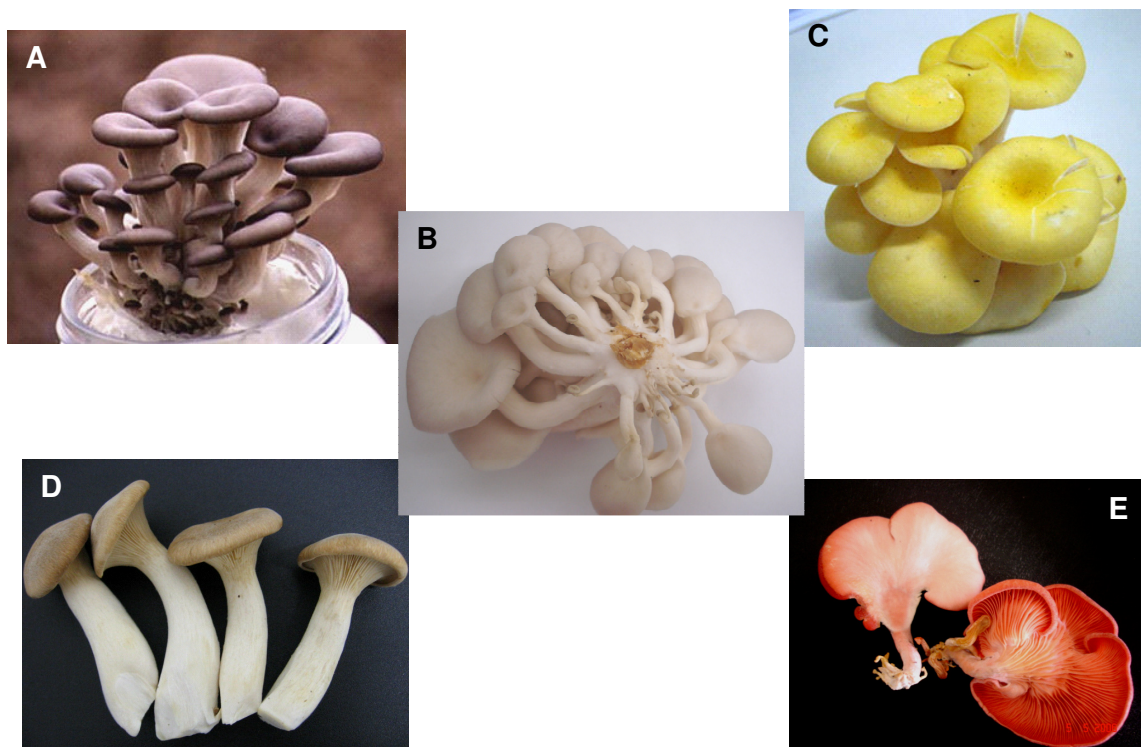


FIGURA 2 – *Pleurotus* spp: *P. ostreatus* var. H1 (A); *P. ostreatus* var. *florida* (B); *P. citrinopileatus* (C); *P. eryngii* (D) e *P. ostreatoroseus* (E)

Os “cogumelos Ostra”, como são conhecidos os *Pleurotus*, são boas fontes de carboidratos, contendo alta quantidade de fibras, além de proteínas com quase todos os aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Os fungos deste gênero são conhecidos por serem eficientes na degradação de lignina, sendo capazes de crescer em troncos de árvores vivas e mortas, principalmente em florestas de clima temperado (GUNDE-CIMERMAN, 1999). Estes organismos produzem enzimas extracelulares como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases (fenol oxidases) que podem modificar e degradar a lignina, tornando-os conhecidos como fungos de podridão branca.

Por apresentarem estas características, muitos cogumelos deste grupo têm sido utilizados na degradação de resíduos de matéria orgânica oriunda da agricultura, tais como casca de café, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, entre outros (CROAN, 2000, LABARÈRE; BOIS, 2002). Desta forma, o cultivo de *Pleurotus* sp. vem se tornando uma forma de utilizar melhor estes recursos, e ainda, os resíduos orgânicos produzidos pelo fungo podem ser utilizados na alimentação bovina, uma vez que tem se observado que este material tem uma melhor digestibilidade comparado ao material não colonizado pelo cogumelo (ZADRAZIL, 1984¹ apud LABARÈRE; BOIS, 2002).

Além do cultivo em substratos, as espécies de *Pleurotus* vêm sendo cultivadas em meio líquido (cultivo submerso), sendo o *Pleurotus ostreatus* uma das espécies mais estudadas em termos de obtenção de biomassa micelial e exopolissacarídeos (GUTIÉRREZ et al., 1996, ROSADO et al., 2003a, GERN et al., 2008).

2.2 CULTIVO EM CULTURA SUBMERSA

O cultivo submerso parece ter iniciado com o objetivo de produzir biomassa micelial utilizando meio líquido obtido a partir de restos de suco de pêra e aspargos (HUMFELD, 1948). Desta forma, poder-se-ia obter o cogumelo com baixo custo e em grande escala, com a finalidade de utilizá-los em sopas, como aromatizante e espessante (SUGIHARA; HUMFELD; 1954).

¹ ZADRAZIL, F. Microbial conversion of lignocellulose into feeds. In: SUNDTAL; E. OWEN (eds.) **Development in animal and veterinary sciences**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984.

Atualmente têm sido utilizadas ferramentas estatísticas como a “Plackett-Burman design” (WANG; LU, 2004), “Taguchi method” (CHANG et al., 2006), Delineamento composto central rotacional (WU et al., 2008), dentre outros. Estes métodos determinam a relação mútua de fatores que interferem no cultivo de Basidiomicetos, e busca o meio de cultivo e as condições de cultivo (pH, temperatura, entre outros) mais adequadas a cada espécie. Estes métodos são utilizados para otimizar o processo diminuindo o tempo de cultivo e uma produção maior de biomassa micelial e menor número de cultivos, quando comparado com o método tradicional, no qual, as fermentações são realizadas modificando apenas um fator e mantendo as demais - “One-factor-at-a-time design” (WU et al., 2008).

A produção de polissacarídeos em cultivo submerso de basidiomicetos apresenta grande potencial biotecnológico por apresentar vantagens como alta produção de biomassa micelial em espaço reduzido, tempo de cultivo mais curto e menores chances de contaminação (WU et al., 2008).

Um estudo com 56 espécies de basidiomicetos, incluindo espécies de *Pleurotus*, mostrou que muitos desses cogumelos produzem polissacarídeos extracelulares, mas que são necessários estudos detalhados para cada espécie visando a otimização dessa produção (MAZIERO, 1996).

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

O tempo de cultivo foi um dos fatores importantes no cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *P. ostreatus* “florida” em meio líquido POL. Sendo que o tempo ótimo de incubação para a produção de EPS foi de sete dias e para a produção de biomassa nove dias, sugerindo que à medida que a fonte de carbono se exaure do meio, há um decréscimo no rendimento de EPS, por consumo deste durante o processo (ROSADO et al., 2003a). Porém, tal fenômeno não foi observado em estudo com *P. ostreatus*, o qual não apresentou uma diminuição no rendimento de EPS no decorrer do tempo (GERN et al., 2008).

Outro ponto importante é a concentração inicial e o tipo de fonte de carbono utilizado. Em *Ganoderma applanatum* a temperatura e a concentração de glucose no meio foram fatores que levaram a uma produção diferenciada de exopolissacarídeo e biomassa micelial. Para um rendimento ótimo do EPS foi necessária uma temperatura de 25 °C e uma concentração de 60 g de glucose por litro, enquanto

que para a melhor obtenção de biomassa, a temperatura foi de 10-15 °C e uma menor relação da concentração de carbono/ nitrogênio (LEE et al., 2007). Para *Agaricus brasilienses*, a melhor fonte de carbono foi a sacarose, à temperatura de 30 °C e pH de 6,1, o que resultou em um aumento de 78,62% na produção de exopolissacarídeos (FAN et al., 2007).

Alguns trabalhos utilizaram diferentes fontes de carbono, como celobiose, frutose, xilose, maltose, dentre outros, e foi observado que a produção de biomassa e EPS são diferenciadas, além da composição monossacarídica (KHONDKAR et al., 2002; KIM et al., 2002). Porém, a relação entre a fonte de carbono e a produção de polímeros distintos não foi bem estabelecida, pois não há um estudo fino em relação à caracterização de suas estruturas.

Apesar de existirem várias condições que devem ser controladas no cultivo submerso de basidiomicetos, esta técnica apresenta vantagens quando comparada a obtenção do basidioma, pois os polímeros podem ser obtidos em um curto período de tempo, e as condições nutricionais e ambientais podem ser controladas, adequando-se às características de cada espécie.

2.3. BASIDIOMICETOS – POLISSACARÍDEOS

Nos basidiomicetos, os polissacarídeos podem ser encontrados na forma de homopolímeros, heteropolímeros, glicoproteínas, peptideopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (GOW; GADD, 1995) e desempenhar inúmeras funções nestes organismos, tais como: reserva, composição da estrutura da parede celular, entre outros (RUIZ-HERRERA, 1991). Nestes organismos, os principais polissacarídeos que constituem a parede celular são: a quitina e as glucanas com configuração do tipo beta (β) (BARTINICKI-GARCIA, 1968² apud MAZIERO, 1996).

Os polissacarídeos encontrados externamente às hifas de basidiomicetos são conhecidos como exopolissacarídeos (EPS). A síntese desses polímeros não é bem entendida, mas alguns autores sugerem seu papel fisiológico: como polímero de reserva (PITSON; SEVIOUR; McDOUGALL, 1993), prevenção da desidratação por

² BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 22, p. 87-107, 1968.

formar géis e proporcionar aderência de uma célula a outra, ou sobre uma superfície (CATLEY³, 1992 apud MAZIERO, 1996).

Além disso, no basidiomiceto ectomicorrízico, *Paxillus involutus*, foi observado que a ligação do Zn²⁺ aos EPS presentes nas hifas, possibilita a sobrevivência destes fungos em ambientes tóxicos (COOKE; WHIPPS, 1993⁴ apud MAZIERO, 1996). Segundo Gutiérrez (1995), os exopolissacarídeos estariam envolvidos na promoção de condições ótimas para o funcionamento do sistema lignolítico de basidiomicetos, no qual a bainha formada por estes polímeros estaria limitando as reações de repolimerização dos radicais aromáticos liberados durante o ataque do fungo, e também, estaria propiciando um microambiente especial, no qual se encontrariam as enzimas lignolíticas e os produtos de degradação.

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

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

Já foram descritas α , β e α/β glucanas, sendo a β -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3), substituída em O-6 por uma unidade de β -D-Glcp a estrutura comumente descrita para diversos basidiomicetos, tais como: *Lentinus edodes* (lentinana), a partir do basidioma e do micélio (SASAKI; TAKASURA, 1976; HOBBS, 2000), *Sclerotium glucanicum* (escleroglucana) (JOHNSON, et al., 1963), *Schizophyllum commune* (esquizofilana) (TABATA et al., 1981), *Pleurotus ostreatus* (pleurana) (KARÁCSONYI; KUNIAK, 1994), *P. tuber-regium* (CHENGHUA et al., 2000), e do basidioma de *P. ostreatoroseus*, *P. eryngii* (CARBONERO et al., 2006).

Estrutura similar descrita anteriormente foi encontrada em fração insolúvel do EPS de seis espécies de *Pleurotus*: *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju*, *P. cornucopiae*, *P. floridanus* e *P. pulmonarius* (GUTIÉRREZ et al., 1996).

³ CATLEY, B.J. The biochemistry of some fungal polysaccharides with industrial potential. In: D.K. ARORA; R.P. ELANDER; K.G. MUKERJI (eds.). Handbook of Applied Mycology. v. 4: **Fungal Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1114 p., 1992

⁴ COOKE, R. C.; WHIPPS, J.M. **Ecophysiology of Fungi**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 337 p., 1993.

β -glucanas com graus de ramificação diferentes foram reportados no basidioma de *Agaricus blazei*, o qual apresentou cadeias laterais constituídas de duas unidades de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-ligadas a cada três unidades de glucose (DONG et al., 2002), e uma β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) linear também foi isolada deste basidiomiceto (KAWAGASHI et al., 1989).

Além das β -glucanas, polímeros com configuração do tipo α foram descritos, como uma α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 4) para *Agaricus blazei* (MIZUNO et al., 1990) e *Tricholoma giganteum* (MIZUNO et al., 1995).

Recentemente, foi descrita uma $\alpha\beta$ -glucana ramificada a partir do basidioma de *Pleurotus florida* (SANTOS-NEVES et al., 2008a), e em *P. sajor-caju* (PRAMANIK et al., 2005).

Outros homopolímeros contendo galactose e manose, respectivamente, foram descritos a partir do exopolissacarídeo de *P. ostreatoroseus*, sendo uma α -D-galactana com ligações do tipo (1 \rightarrow 4) parcialmente 3-*O*-metilada nas unidades de galactose e uma α -D-manana ramificada (ROSADO et al., 2002). Para o basidioma de *P. eryngii* e *P. ostreatoroseus* foi isolada uma α -D-galactana linear parcialmente 3-*O*-metilada (CARBONERO et al., 2008b).

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

A partir do basidioma de *Pleurotus ostreatus* "florida" e *P. ostreatoroseus*, foi caracterizada uma manogalactana parcialmente 3-*O*-metilada, composta de uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp e 3-*O*-Me- α -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 6), sendo esta, em parte, substituída em O-2 por β -D-Manp (ROSADO et al., 2003b). Uma estrutura semelhante também já foi encontrada em *Pleurotus ostreatus* (JAKOVLJEVIĆ et al., 1998).

As fucogalactanas caracterizadas contêm estruturas com cadeia principal formada por α -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 6), substituídas em O-2 por α -L-Fuc, estes polímeros foram descritos para o basidioma de *Sarcodon aspratus* (MIZUNO et al., 1999), *Hericium erinaceus* (ZHANG et al., 2006) e para o micélio obtido de cultura submersa de *Coprinus comatus* (FAN et al., 2006).

Em relação aos heteropolissacarídeos de EPS, foi descrita uma galactomanana com cadeia principal formada por unidades de β -D-Manp-(1→3) substituída em O-6 por Galp, encontrada em *Collybia maculata* (LIM et al., 2005).

A estrutura de EPS de alguns Basidiomicetos está sumarizada na Tabela 1, na qual pode se observar que as principais estruturas descritas são de glucanas e mananas.

TABELA 1 – EXOPOLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Espécie	Estrutura		Referência
	Cadeia Principal	Outras especificações	
<i>Pleurotus cornucopiae</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>P. floridanus</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> , <i>P. sajor-caju</i>	β -D-Glcp-(1→3)	Ramificado em O-6 por uma unidade de β -D-Glcp	GUTIÉRREZ et al., 1996
<i>P. ostreatoroseus</i>	α -D-Galp-(1→4), metilada em 3-O	Proporção de 2:1 (Galp:3-Me-Galp)	ROSADO et al., 2002
	α -D-Manp-(1→6)	Ramificação em O-2 por cadeias laterais de Manp, Manp ligadas em O-2 e O-3	
<i>Collybia maculata</i>	β -D-Manp-(1→3)	Substituída em O-6 por α -D-Galp	LIM et al., 2005
<i>Ganoderma tsugae</i>	β -D-Manp-(1→6)	Substituída em O-2 por α -D-Manp-(1→2) com terminal não redutor de β -D-Galp	PENG et al., 2003
<i>Tremella mesenterica</i>	α -D-Manp-(1→3)	Cadeia lateral formada por 6-O-Ac- β -D-Manp-(1→4)- β -D-GlcA-(1→2); 3/4-O-Ac- β -D-GlcA-(1→4)- β -D-Xyl-(1→3))- β -D-Xyl-(1→2)	VINOGRADOV et al., 2004
<i>Ganoderma lucidum</i>	α -D-Galp-(1→4)	Substituída em O-6 por L-Ara, L-Rha, α -D-Manp e β -D-Glcp	LI; FANG; ZHANG, 2007
<i>Ganoderma lucidum</i>	β -D-Glcp-(1→3)	Ramificação em O-6 por uma unidade de β -D-Glcp	SONE et al., 1985
	α -D-Manp-(1→6)	Ramificado em O-2 por Manp	

A partir dessa revisão bibliográfica pode se observar que a maior parte dos trabalhos sobre caracterização estrutural de polissacarídeos de basidiomicetos é realizada a partir do basidioma, seguido do EPS e por último, dos polissacarídeos provenientes do micélio, em cultivo submerso.

2.4. POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os estudos referentes ao cultivo e a caracterização estrutural de polissacarídeos foram impulsionados, devido às possibilidades de apresentarem atividade biológica.

No Brasil, *Agaricus blazei* (“Cogumelo do Sol”, “Himematsutake”) apresentou potencial medicinal após ser descoberto a partir de estudos epidemiológicos no interior de São Paulo, onde foi observado que a população que se alimentava constantemente desse cogumelo, apresentava índices muito baixos de várias doenças, como o câncer (WASSER, 2002). Posteriormente, estudos verificaram que polissacarídeos (Beta-glucanas) provenientes de *A. blazei* apresentavam atividade imunoestimulante (KAWAGISHI et al., 1989; FUJIMIYA et al., 1999).

As propriedades antitumorais de polissacarídeos obtidos de vários basidiomicetos têm sido a ação biológica mais estudada. Em revisão feita por Mizuno (1999), atribui-se tal atividade às glicoproteínas e xiloglucanas extraídas do basidioma de *Pleurotus sajor-caju*, enquanto que em *P. citrinopileatus* uma β -glucana proveniente de um complexo protéico estaria apresentando tal atividade. Ainda, uma α -glucana extraída do micélio de *P. ostreatus* inibiu a proliferação de células cancerígenas (LAVI et al., 2006).

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

Polissacarídeos denominados de lentinana (*L. edodes*), esquizofilana (*S. commune*), PSK e PSP⁵ (*T. versicolor*) já são utilizados clinicamente em terapias antitumorais (0,5–1,0 mg lentinana por dia, intravenosa), principalmente no Japão e

⁵ Heteroglucanas com ligação do tipo α -1,4 e β -1,3, ligadas à porção proteína. PKS apresenta fucose e PSP apresenta rhaminose e arabinose.

na China, em adição às terapias tradicionais, como a cirurgia e quimioterapia (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH; 2005). Abaixo se encontram o basidioma de *Lentinus edodes* (Shiitake), a lentinana comercializada no Japão e sua estrutura química (Figura 3).

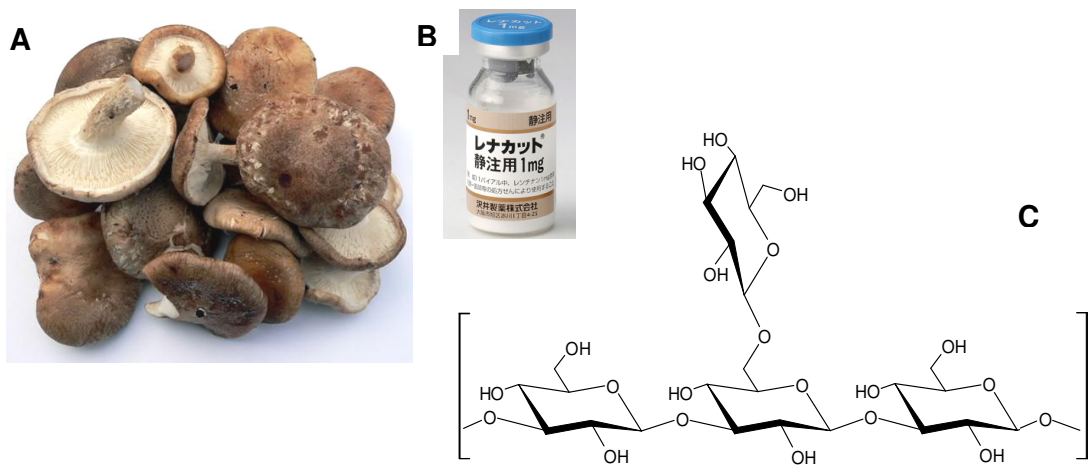


FIGURA 3 – BASIDIOMA DE *Lentinus edodes* (A); LENTINANA COMERCIALIZADA NO JAPÃO (B); ESQUEMA DE ESTRUTURA DA LENTINANA (C)

Fontes: Figura A - <http://www.anticancer-drug.net/img/lentinan.jpg>;

Figura B - http://www.dialogosuniversitarios.com.br/UserFiles/91/Image/Saude/cog_shitake.jpg.

Além das atividades farmacológicas já citadas, atualmente tem se observado trabalhos que avaliam a atividade antinociceptiva e antiinflamatória de polissacarídeos isolados de basidiomicetos. A fucomanogalactana obtida do basidioma de *Lentinus edodes* é um dos polissacarídeos que apresentaram tais atividades, sendo que sua estrutura apresentou-se composta por uma cadeia principal de α -D-Gal-(1 \rightarrow 6) com substituição em O-2 por unidades de β -D-Manp ou α -D-Fucp (CARBONERO et al., 2008a).

O gênero *Pleurotus* tem recebido atenção quanto as suas propriedades medicinais e os polissacarídeos deste grupo de cogumelos estão sendo utilizados na avaliação de diversas atividades biológicas (Tabela 2).

TABELA 2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE *Pleurotus* spp.

Espécie	Estrutura		Atividade Biológica	Referência
	Cadeia Principal	Outras especificações		
<i>P. pulmonarius</i> (basidioma)	α -D-Galp-(1→6) e 3-O-Me- α -D-Galp	Ramificado em O-2 por terminais não redutores de - β -D-Manp	Efeito analgésico	SMIDERLE et al., 2008a
<i>P. pulmonarius</i> (basidioma)	β -D-Glcp-(1→3)	Substituída em O-6 por β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	Efeito analgésico e antiinflamatório	SMIDERLE et al., 2008b
<i>P. ostreatus florida</i> (micélio em cultivo submerso)	α -glucana	-	Efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico de células cancerígenas	LAVI et al., 2006
<i>P. ostreatus</i> e <i>P. eryngii</i> (basidioma)	β -D-Glcp-(1→3),(1→6); Complexo proteína- β -D-Glcp-(1→3),(1→6); α - Glcp-(1→3)		Efeito pro-biótico	SYNYTSYA et al., 2008 <i>in press</i>
<i>P. ostreatus</i> (basidioma)	Glcp-(1→3)	Substituída em O-6 Galp-(1→4)-Glcp e Glcp-(1→3)-Manp-(1→4)-Galp	Atividade antitumoral	TONG et al., 2009
<i>P. tuber-regium</i> (esclerócio e micélio)	Não detalha estrutura. Apresenta glucose como componente majoritário		Atividade antitumoral	ZHANG et al., 2004

A atividade antioxidante, também já foi observada em experimentos utilizando extratos do basidioma, do micélio e do meio de cultivo de *Pleurotus citrinopileatus* (LEE et al., 2007).

Kim et al. (2006) observaram que o extrato do basidioma de *P. eryngii* aumentava o metabolismo ósseo, estimulando a formação de osteoblastos em ratos com osteoporose, no entanto, os componentes que estariam atuando neste processo não foram ainda descritos.

A atividade biológica dos EPS de basidiomicetos também vem sendo estudada. Em *Grifola frondosa* foi demonstrado efeito inibitório da expressão da matriz de metaloproteinase-1 em dermofibroblastos humanos, que sofreram a

irradiação de UV. Este polímero trata-se de uma proteoglicana com 82,5% de glucose e 9,8% de galactose (BAE et al., 2005).

A fração solúvel do EPS de *Pleurotus citrinopileatus* apresentou efeito anti-hiperglicêmico, porém a estrutura do polissacarídeo não foi caracterizada (HU et al., 2006).

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada neste estudo, os trabalhos utilizando frações purificadas e com a estrutura química fina de EPS em experimentos com atividade biológica ainda é escasso quando comparadas com polímeros obtidos a partir do basidioma. No entanto, a produção de EPS vem se tornando uma fonte interessante na obtenção de polímeros biologicamente ativos, sendo assim necessários novos estudos para avaliar o potencial farmacológico das mesmas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O basidioma de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* Berk.(Figura 4) foi cultivado em sacos plásticos, utilizando palha de trigo como substrato, foi fornecido pela empresa Makoto Yamashita, localizada em São José dos Pinhas, PR.



FIGURA 4 – BASIDIOMA DE *Pleurotus ostreatus* var. *florida*.

3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO

O isolamento do micélio foi feito a partir de pequenos fragmentos (em torno de 5 mm de diâmetro) da região interna do basidioma, os quais foram depositados em meio de cultivo BDA sólido (Tabela 3) e incubados à 25 °C, em ausência de luz.

TABELA 3 – MEIO DE BATATA-DEXTROSE (BD)*

140 g	batatas sem casca
20 g	glucose
1000 ml	água destilada

*Para o meio BDA sólido são adicionados 10 g de ágar ao meio BD

Análises do crescimento micelial, bem como das características (presença de hifas septadas e de *clamp connections* ou ansas) que indicam tratar-se do

basidiomiceto em estudo foram feitas periodicamente, a fim de se obter placas contendo o isolamento micelial em condições axênicas.

3.3 CULTIVO SUBMERSO DO MICÉLIO DE *Pleurotus ostreatus* var. *florida*

O micélio de *P. ostreatus* var. *florida*, após isolamento em meio de cultivo sólido, foi inoculado para o meio líquido BD (Tabela 3), que foi incubado por 10 dias e utilizado como pré-inóculo, tanto para o meio líquido CZAPECK (Tabela 4), quanto para o meio líquido POL (Tabela 5).

TABELA 4 – MEIO DE CULTURA LÍQUIDO CZAPECK

NaNO ₃	3,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,18 g
extrato de levedura	1,0 g
glucose	10,0 g
Água destilada q.s.p. 1000 ml	

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

TABELA 5 – MEIO DE CULTURA LÍQUIDO POL

c	(NH ₄) ₂ SO ₂	5,0 g
	K ₂ HPO ₄	1,0 g
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
	extrato de levedura	2,0 g
	peptona de carne	1,0 g
	CaCO ₃	1,0 g
Água destilada q.s.p. 900 ml		
Solução B*	Solução de glucose:	
	glucose	60 g
	Água destilada	100 ml

*Estas soluções são autoclavadas separadamente a 121 °C por 20 minutos e depois são agrupadas em condições estéreis.

Fonte: CAVAZZONI; ADAMI, 1992, citado por MAZIERO, 1996.

Os cultivos no meio CZAPECK e POL foram realizados em frascos de 2000 ml contendo 1000 ml de meio, sob agitação, a 25 °C, em ausência de luz por 10 dias. Tais condições foram determinadas por estudos anteriores realizados por Maziero (1996), e Rosado et al. (2003a), com outros meios de cultivo, em experimentos com outros cogumelos do mesmo gênero.

3.4 RECUPERAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Após 10 dias de cultivo, a biomassa micelial foi separada por meio de centrifugação. O meio líquido foi concentrado a um volume reduzido e tratado com etanol (3:1, v/v), com a finalidade de separar os compostos de alta massa dos de baixa massa molar. O precipitado foi separado por centrifugação, dialisado, concentrado e liofilizado para obtenção do rendimento de EPS. Após este processo o material foi submetido a sucessivos processos de purificação.

A biomassa micelial passou por processos de extração para obtenção dos polissacarídeos que posteriormente foram purificados de acordo com os métodos descritos no item 3.6.

3.5 EXTRAÇÃO DA BIOMASSA MICELIAL

A extração dos polissacarídeos a partir da biomassa micelial foi realizada através de extrações seqüenciais e exaustivas, com água a temperatura ambiente (~ 28 °C) e banho fervente (~ 100 °C) e com solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH 1%) em banho fervente, com temperatura em torno de 100 °C (Figura 5).

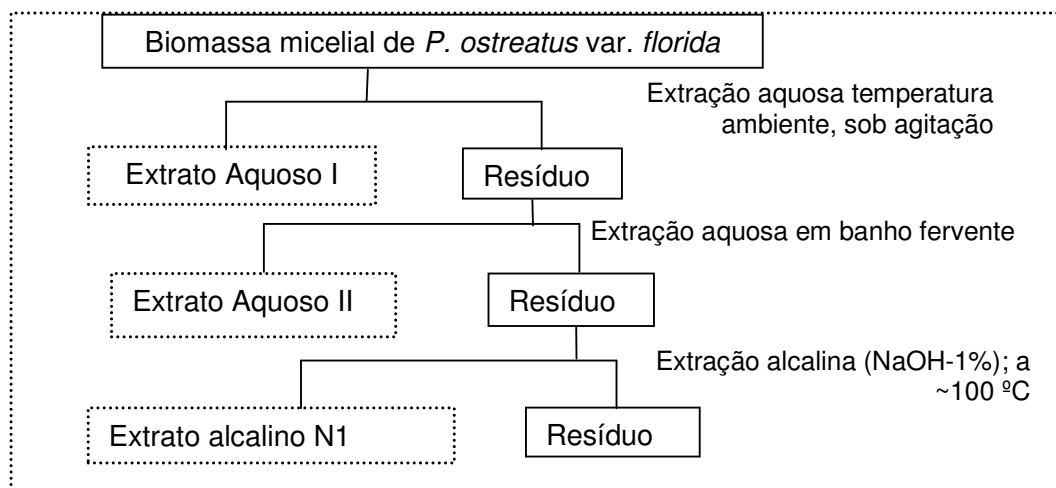


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DO MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida*

3.5.1 Extração Aquosa

A biomassa micelial após liofilização foi inicialmente extraída com água destilada a temperatura ambiente, sob agitação mecânica. O extrato foi separado do resíduo por centrifugação e submetido à extração aquosa em banho fervente.

As extrações foram acompanhadas por análise colorimétrica pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A extração aquosa a temperatura ambiente foi realizada por diversas vezes até apresentar coloração negativa para carboidratos. A partir desse momento o material residual foi extraído em banho fervente.

Os extratos desses processos foram concentrados e precipitados com etanol (v/v, 3:1), centrifugados, dialisados e liofilizados. Deste modo, foram obtidos os extratos aquoso I (extração aquosa a temperatura ambiente) e aquoso II (extração aquosa em banho fervente) (Figura 5).

3.5.2 Extração Alcalina

O material residual da extração aquosa, foi extraído com solução alcalina de NaOH 1%, (p/v, 1 g/100 ml), até apresentar coloração negativa para carboidratos. O extrato deste processo foi neutralizado com ácido acético glacial, dialisado, concentrado e liofilizado, dando origem ao extrato N1 (extrato alcalino NaOH 1%) (Figura 5). A extração alcalina é realizada com adição de uma pequena quantidade de NaBH₂.

3.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS EM CULTURA SUBMERSA

A purificação dos exopolissacarídeos e dos polissacarídeos obtidos das frações aquosas e alcalinas foi realizada através de processos como: congelamento e descongelamento, precipitação por formação de complexo solúvel e insolúvel em Cu²⁺ (Precipitação com solução de Fehling), ultrafiltrações e/ou diálises em membranas, entre outros, que serão descritos a seguir.

O processo de purificação foi monitorado através do perfil cromatográfico obtido por cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS), composição monossacarídica e RMN-¹³C.

3.6.1 Fracionamento dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

A fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada e submetida ao congelamento e posterior descongelamento a temperatura ambiente (~28°C). Geralmente, esse processo resulta na formação de um precipitado insolúvel em água fria, que é separado por centrifugação (9000 r.p.m. por 15 min a 25 °C). Este

procedimento foi repetido até fracionamento adequado, no qual não se observou mais a formação de precipitado após o processo (GORIN; IACOMINI, 1985).

3.6.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling

A solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965) consiste em duas soluções A e B. A solução A é composta de 173 g de tartarato de sódio e potássio e 125 g de hidróxido de potássio em volume suficiente de água para 500 ml. A solução B é composta de 55,74 g de sulfato de cobre pentahidratado em volume de água suficiente para 500 ml.

As frações polissacarídicas submetidas a este processo foram inicialmente solubilizadas na solução A, seguida da adição de mesmo volume da solução B. Após intensa agitação, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas.

O precipitado formado foi separado por centrifugação (8.000 rpm), sendo as frações resultantes (precipitado e sobrenadante) neutralizadas com ácido acético glacial e dialisadas contra água corrente (~ 48 horas).

Em seguida as mesmas foram tratadas com resina catiônica fortemente ácida e novamente dialisadas (~24 horas). Estas frações foram concentradas em rotaevaporador, congeladas e liofilizadas.

3.6.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas e Ultrafiltração

As frações solúveis em água fria que se mostraram heterogêneas em HPSEC após tratamento com solução de Fehling foram submetidas à purificação por diálises em membranas com diferentes limites de exclusão (Spectra/Por® Biotech). As membranas utilizadas foram de: 16 KDa, 25 KDa e 50 KDa, sendo as duas últimas membranas constituídas de ester celulose. Além da membrana de 1000 KDa de polivinilideno difluor (PVDF). A purificação destes polissacarídeos foi realizada com água destilada por diálise fechada com agitação magnética a temperatura ambiente

(~28 °C) por 48 horas, sendo que a água de diálise foi trocada duas vezes. O processo foi interrompido quando a água de diálise apresentou reação negativa para carboidratos por meio do método de fenol-ácido sulfúrico.

A purificação com membranas de ultrafiltração foram realizadas através de membranas com limite de exclusão de 30 KDa e 10 KDa (Millipore®) e 5 KDa (triacetato de celulose, Sartorius®). Estas membranas foram inseridas em um aparato de ultrafiltração acoplado ao cilindro de gás comprimido.

3.6.4 Purificação por Degradação Enzimática

As frações que apresentaram glicogênio foram purificadas por degradação enzimática utilizando α -amilase salivar, o processo foi acompanhado utilizando lugol. Após o tratamento enzimático, as frações foram dialisadas em sistema fechado utilizando membrana de 16 KDa, o qual forneceu uma fração retida e uma fração eluída (produtos de hidrólise).

3.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

A caracterização estrutural dos polissacarídeos foi realizada através de metodologias e experimentos. Estes fornecem dados que indicam: composição monossacarídica, homogeneidade, tipo de ligação, massa molar, grau de ramificação, dentre outros. Desta forma, foi possível determinar a estrutura fina destes polímeros.

Abaixo serão descritas estas metodologias, que são baseadas em métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

3.7.1 Composição Monossacarídica

As frações polissacarídicas obtidas foram derivatizadas (hidrólise ácida total, seguido de redução (NaBH_4) e acetilação) com a formação de acetatos de alditol para a determinação da composição monossacarídica.

A hidrólise ácida total foi realizada utilizando aproximadamente 1 mg de amostra com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, por 6 horas a 100 °C ou com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 1 M, “overnight” (12 horas) a 100 °C. Após este período, o ácido foi evaporado.

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio até pH 9-10, sendo mantidos a temperatura ambiente por 12 horas. Após este período, o material foi neutralizado com resina catiônica, filtrado e co-destilado com metanol, em rota-evaporador, até total remoção do ácido bórico, na forma de borato de trimetila (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

O material resultante foi acetilado com anidrido acético e piridina (1:1, v/v), mantidos a temperatura ambiente, “overnight” (em torno de 12 horas). A reação foi interrompida com adição de gelo e os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio. A remoção da piridina foi feita com solução de sulfato de cobre 5%. Sulfato de sódio anidro foi adicionado à fase clorofórmica, e o material filtrado com algodão e seco em temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

3.7.2 Metilação dos Polissacarídeos

Para a metilação, alíquotas dos polissacarídeos (5-10 mg) foram solubilizadas em 1 ml de dimetilsulfóxido (Me_2SO). Após a solubilização foi adicionado 1 ml de iodeto de metila (CH_3I) e hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado. Seguido de agitação vigorosa por 30 min, sendo então mantido em repouso *overnight*. Após este período o material foi neutralizado com ácido acético em banho de gelo, dialisado exaustivamente contra água corrente (~24 h) e liofilizado, repetindo-se este processo por mais uma vez para garantir a total metilação do material (CIUCANU; KERREK, 1984).

3.7.3 Hidrólise por Ácido Fórmico

A hidrólise total dos polissacarídeos per-*O*-metilados foi realizada com 1 ml de solução de ácido fórmico 45% a 100 °C por 6, 9 e 12 horas de acordo com cada material (STORTZ, et al., 1997).

Após o período necessário para hidrólise, o material foi evaporado e reduzido com borohidreto de sódio deuterado (NaB^2H_4), e acetilado como citado anteriormente (item 3.6.1).

3.7.4 Hidrólise por Ácido Sulfúrico

A hidrólise total dos polissacarídeos metilados foi realizada com 0,5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (p/v); mantido em banho de gelo por 1 hora. Seguido por diluição com 4 ml de água destilada e mantido a 100 °C por 14h (SEAMAN et al, 1954).

Após o período necessário para hidrólise, o material foi evaporado e reduzido com borohidreto de sódio deuterado (NaB^2H_4), e acetilado como citado anteriormente (item 3.6.1).

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar

As análises de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizadas através de cromatografia de exclusão estérica de alta resolução Acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS).

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2 \text{ g.l}^{-1}$, numa concentração final de 1 mg de amostra por 1 ml de

solvente e em seguida, filtradas através de membrana de acetato de celulose com limite de exclusão de 0,22 μm .

Após estes procedimentos, as amostras foram analisadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC-MALLS) WATERS equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS em série com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ contendo NaN_3 , $0,2 \text{ g.l}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ ml/min}$, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515.

3.8.2 Determinação da Composição Monossacarídica e de Metilação

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

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa VARIAN-SATURN 2000, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225-MS. As injeções nas colunas foram feitas com a temperatura inicial de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 1 min), com aumento gradual de $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até $210 \text{ }^\circ\text{C}$ (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$.

As composições monossacarídicas, também foram analisadas em cromatógrafo gasoso THERMO ELETRONIC CORPORATION, modelo Trace GC Ultra, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas com a temperatura inicial de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 1 min), com aumento gradual de $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até $215 \text{ }^\circ\text{C}$ (tempo de corrida 15 min.) para os materiais com 3-O-metil-galactitol ou com a temperatura inicial de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 1 min) com aumento gradual de $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até $225 \text{ }^\circ\text{C}$ (tempo de corrida 15 min.) para os acetatos de alditóis, sendo mantida

isotermicamente até o final da análise. Hélio, ar sintético, hidrogênio e nitrogênio grau FID foram utilizados. O hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹ e a detecção feita por FID.

3.8.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Foram realizadas análises espectroscópicas de RMN-¹³C, RMN-¹³C-DEPT e ¹H, ¹³C -HMQC em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400.

As análises foram feitas a 30, 50 ou 70 °C, com as amostras sendo solubilizadas em D₂O (óxido de deutério) ou Me₂SO-*d*₆ (dimetilsulfóxido deuterado), dependendo da solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D₂O foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ¹³C e ¹H da acetona em δ 30,20 e 2,22, respectivamente, ou aos sinais do Me₂SO-*d*₆ em δ 39,43 (¹³C) e 2,40 (¹H), para as amostras solúveis no mesmo.

3.9 TESTE BIOLÓGICO: ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA

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

3.9.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos Swiss (25-35 g), os quais foram mantidos em sala climatizada (23 ± 2 °C), em ciclos de claro-escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos no laboratório para aclimação, por no mínimo, duas horas antes dos

testes e utilizados uma única vez para os experimentos. Os ensaios foram realizados de acordo com as normas vigentes sobre cuidados com animais utilizados em laboratórios e sobre ética em experimentos sobre dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina. O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos dos tratamentos.

3.9.2 Constrição Abdominal, Permeabilidade Capilar Peritoneal e Infiltração de Leucócitos Causada por Injeção de Solução de Ácido Acético 0,6%

As contorções abdominais foram induzidas de acordo com procedimentos previamente descritos (LUCENA et al., 2007), em que a resposta à injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% resulta na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores.

Inicialmente, foi administrada nos animais, por via intravenosa, uma solução do corante Evans Blue 2,5% (10 ml/kg), a qual é utilizada como marcador da permeabilidade capilar peritoneal. Após uma hora, foi administrado o polissacarídeo M-EP (1-100 mg/kg, i.p.) e nos animais controle negativo, um volume similar de salina (10 ml/kg, i.p.), a qual foi utilizada também para diluir as amostras em estudo.

Em seguida, os animais foram mantidos individualmente em cilindros de vidro de 20 cm de diâmetro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada pela redução do número de contorções abdominais (diferença entre o controle negativo e animais pré-tratados com amostra). Imediatamente após os testes, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi exposta e lavada com 1 ml de salina estéril contendo heparina (25 UI/ml) e o fluido peritoneal coletado com pipetas automáticas. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico, após diluição do fluido peritoneal com solução de Türk (1:20), uma alíquota do material coletado (700 µl) foi centrifugada (1000 rpm por 10 min) e a absorbância do sobrenadante foi lida a 550 nm com analisador de ELISA. A permeabilidade capilar

peritoneal induzida por ácido acético foi expressa em relação ao extravasamento do corante Evan's Blue ($\mu\text{g/ml}$), de acordo com a curva padrão obtida por Lucena et al. (2007).

3.9.3 Análises Estatísticas

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os polissacarídeos, extracelular e do micélio de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* foram avaliados quanto à sua estrutura química.

Inicialmente, o micélio foi isolado a partir do basidioma deste cogumelo, desta forma, foi obtido o micélio para realizar o cultivo submerso nos meios líquidos CZAPECK e POL. Após o tempo necessário (10 dias) para o crescimento micelial e para a produção de exopolissacarídeo (EPS), a biomassa micelial foi separada por centrifugação e o meio líquido foi concentrado e precipitado com etanol, fornecendo a fração contendo o EPS.

A biomassa micelial foi submetida a extrações seqüenciais com água a temperatura ambiente (Extrato Aquoso I), água em banho fervente (Extrato aquoso II) e solução alcalina de NaOH 1% (Extrato Alcalino NI).

O EPS e os extratos obtidos passaram por processos de purificação descritos anteriormente (Item 3.6) e as frações polissacarídicas foram analisadas quanto a sua estrutura fina, utilizando métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos. Além disso, uma das frações purificadas a partir do EPS e caracterizada estruturalmente foi avaliada quanto a sua atividade antinociceptiva e antiinflamatória.

4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO *PLEUROTUS OSTREATUS* VAR. *FLORIDA*

O isolamento do micélio de *P. ostreatus* var. *florida* realizado de acordo com o método descrito anteriormente resultou em culturas axênicas do basidiomiceto em estudo e possibilitou a realização do cultivo em meio líquido utilizando os meios CZAPECK e POL.

Inicialmente, discos do micélio em meio BDA foram transferidos para o meio BD líquido para a produção do pré-inóculo (Figura 6A) e estes foram transferidos para os meios líquidos CZAPECK e POL. Os *pellets* formados apresentaram forma esférica com pequenas projeções em toda sua superfície. A análise em microscópio

óptico revelou a presença de *clamp connections* ou ansas (Figura 6B), que são estruturas características das espécies de *Pleurotus*.

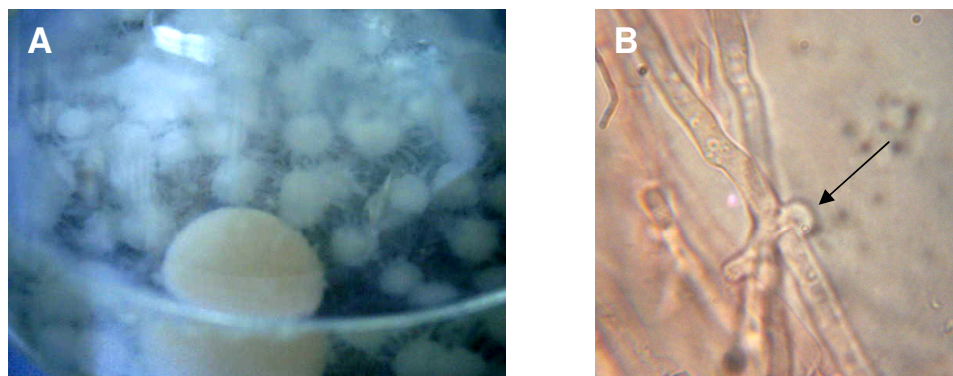


FIGURA 6 – MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida*, EM MEIO LÍQUIDO BD (A), HIFAS COM ANSAS (SETA) (B)
Aumento de 1000x em microscópio óptico

O cultivo foi realizado utilizando frascos de 2000 ml, contendo 1000 ml de meio de cultura, sob agitação, a 25 °C, em ausência de luz, por 10 dias. Foram utilizados 12 l para o meio CZAPECK e 12 l para o meio POL. O micélio foi separado por centrifugação e o meio líquido foi concentrado e precipitado com etanol (3:1, v/v). Desta forma, obteve-se 36 g de micélio (3 g.l⁻¹) e 6,3 g de EPS (525 mg.l⁻¹), a partir do cultivo em meio líquido CZAPECK e 30,4 g de micélio (2,53 g.l⁻¹) e 6,4 g de EPS (530 mg.l⁻¹), a partir do meio POL.

Quando comparado com a produção de EPS de *P. eryngii* em meio POL (241 mg.l⁻¹), a obtida para *P. ostreatus* var. *florida* foi maior. Contudo, a produção de biomassa micelial foi menor (5,14 g.l⁻¹) (KOMURA et al., 2006).

Além disso, foi observado que, em geral, a produção de EPS e biomassa em outras espécies de *Pleurotus* superaram a produção em relação ao cogumelo em estudo, chegando a produzir até 5 g.l⁻¹ de EPS, em *P. ostreatoroseus*, sendo que a biomassa ficou em torno de 22 g.l⁻¹ para *P. sp* “florida” (ROSADO et al., 2002).

A Tabela 6 mostra a produção de EPS e biomassa micelial de algumas espécies de *Pleurotus*, inclusive da espécie em estudo que foi cultivada por outros autores.

TABELA 6 – QUADRO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE EPS E BIOMASSA MICELIAL EM *Pleurotus* spp.

Espécie	EPS (mg.l ⁻¹)	Biomassa micelial (g.l ⁻¹)	Meio de cultivo Tempo de cultivo	Referência
<i>P. flabellatus</i>	800 – 2000	5,9 – 8,5	Meio POL, 7 e 10 dias	MAZIERO, 1996
<i>P. sp. "florida"</i>	2850 – 1400	11,0 – 11,7		
<i>P. ostreatus</i>	570 – 320	4,1 – 4,5		
<i>P. ostreatoroseus</i>	2200 – 2400	8,6 – 9,0		
<i>P. sajor-caju</i>	1800 – 1700	11,5 – 10,4		
<i>P. eryngii</i>	241	5,1	Meio POL, 10 dias	KOMURA et. al., 2006
<i>P. ostreatus</i> var. <i>H1</i>	275	2,1	POL, 12 dias	KOMURA et. al., 2008
<i>P. citrinopileatus</i>	675	7,9	Meio MCM ⁶	
<i>P. ostreatus</i>	862	6,7	MCM, 10 dias	KIM et al., 2002
<i>P. sajor-caju</i>	883	6,5		
<i>P. sp. "florida"</i>	1400	22,8	POL, 7 dias (EPS) e 10 (biomassa)	ROSADO et. al., 2002
<i>P. ostreatoroseus</i>	5800	16,8		

No entanto, apesar do baixo rendimento relativo obtido neste trabalho, o material obtido foi suficiente para ser utilizado para a etapa de purificação e caracterização de uma das frações polissacarídicas presentes.

4.2 PURIFICAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

A purificação do EPS foi realizada utilizando as metodologias descritas anteriormente (item 3.6). O Fluxograma (Figura 7) mostra as etapas de purificação dos EPS obtidos a partir do cultivo em meio CZAPECK (EC) e POL (EP).

Inicialmente as frações foram solubilizadas em água destilada e submetidas ao processo de congelamento e descongelamento a temperatura ambiente, este processo forneceu uma fração insolúvel em água fria que mostrou ser composta por

⁶ MCM- Mushroom Complete Medium: glucose 20 g.l⁻¹, peptona de carne 2 g.l⁻¹, extrato de levedura 2 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 0,46 g.l⁻¹, K₂HPO₄ 1 g.l⁻¹, MgSO₄. 7 H₂O 0,5 g.l⁻¹ (KIM et al., 2005).

93,2% de glucose para a fração P-EC (precipitado de gelo/degelo do EPS em meio CZAPECK) e manose (49,9%) e glucose (42,8%) para a fração P-EP (precipitado de gelo/degelo do EPS em meio POL).

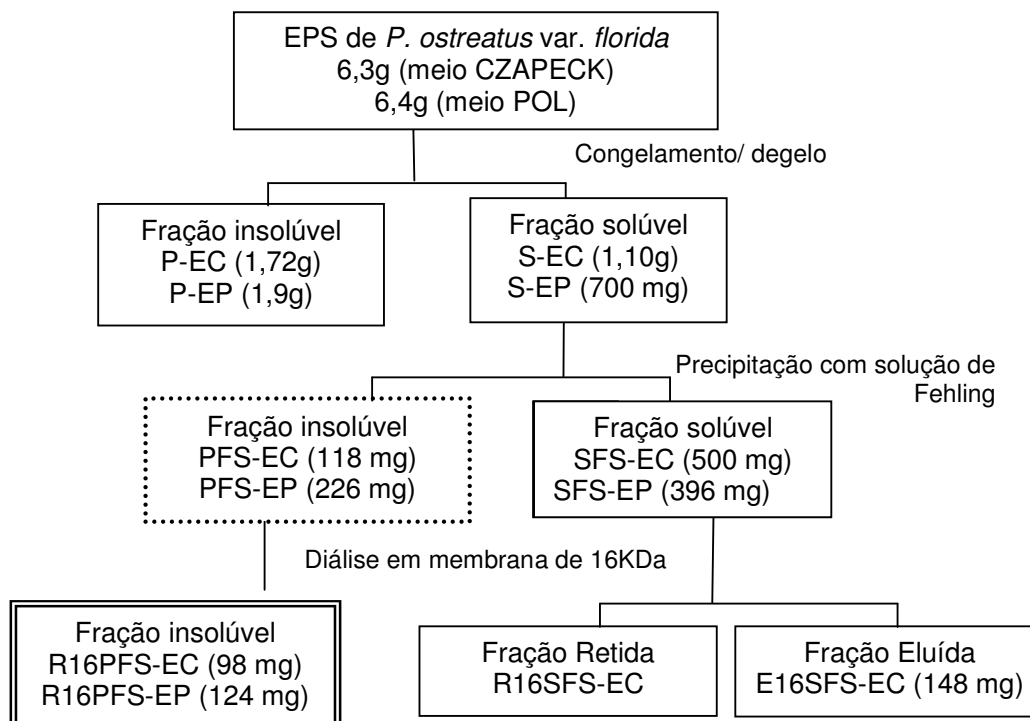


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DO EPS DE *P. ostreatus* var. *florida* EM CULTIVO SUBMERSO NOS MEIOS LÍQUIDOS CZAPECK E POL

As frações polissacarídicas solúveis em água fria do processo anterior, S-EC e S-EP foram submetidas ao tratamento com solução de Fehling, o qual forneceu frações complexo cúpricas solúveis e insolúveis. As frações solúveis deste processo apresentaram-se compostas por manose, 3-O-Me-galactose, galactose e glucose (Tabelas 7 e 8).

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS DE *P. ostreatus* var. *florida* EM MEIO CZAPECK

Fração	Composição Monossacarídica (mol%) ^a				
	Xyl	Man	3-O-Me-Gal ^b	Gal	Glc
EC	-	45,2	8,4	11,7	34,7
S-EC	-	50,0	16,9	6,8	35,3
P-EC	-	5,0	0,8	1,0	93,2
PF-EC	-	95,3	-	-	-
R16PF-EC	-	100	-	-	-
SFS-EC	-	28,3	42,6	11,7	17,4
E16SFS-EC	16,5	25,3	2,8	4,6	50,8
R16SFS-EC	-	26,2	20,6	15,6	37,6

^aAnalisado em GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaB²H₄) e acetilação.

^bConfirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190.

As frações SFS-EC e SFS-EP apresentaram-se heterogêneas quando analisadas por HPSEC-MALLS.

A fração SFS-EC foi submetida à diálise em sistema fechado com água destilada, utilizando membrana com limite de exclusão de 16 KDa. Este procedimento forneceu uma fração eluída (E16SFS-EC) e outra retida (R16SFS-EC). As composições monossacarídicas destas frações mostraram que a fração R16SFS-EC apresenta uma maior proporção de galactose e 3-O-metil-galactose em relação à fração E16SFS-EC (Tabela 7). Desta forma, este procedimento de purificação tem se mostrado uma etapa importante no isolamento de frações homogêneas.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS DE *P. ostreatus* var. *florida* EM MEIO POL

Fração	Composição Monossacarídica (mol%) ^a			
	Man	3-O-Me-Gal ^b	Gal	Glc
EP	49,9	1,9	-	48,2
S-EP	40,5	16,3	7,0	35,5
P-EP	49,9	1,9	Tr	48,2
PF-EP	61,3	4,5	0,5	23,7
R16PF-EP	94,6	-	1,2	4,2
SFS-EP	34,6	10,7	29,1	25,6

^aAnalisado em GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaB²H₄) e acetilação.

^bConfirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190.

Por outro lado, as frações complexo cúprico insolúveis, PF-EC e PF-EP, denominadas de precipitados de Fehling, quando analisadas em relação à composição monossacarídica, apresentaram ser compostas principalmente de manose (Tabelas 7 e 8). Porém, após a diálise em membrana de 16 KDa, as frações precipitado de Fehling que ficaram retidas na membrana, apresentaram uma maior proporção de manose e em relação ao perfil de eluição por HPSEC as frações R16PF-EC e R16PF-EP apresentaram-se homogêneas (Figura 8).

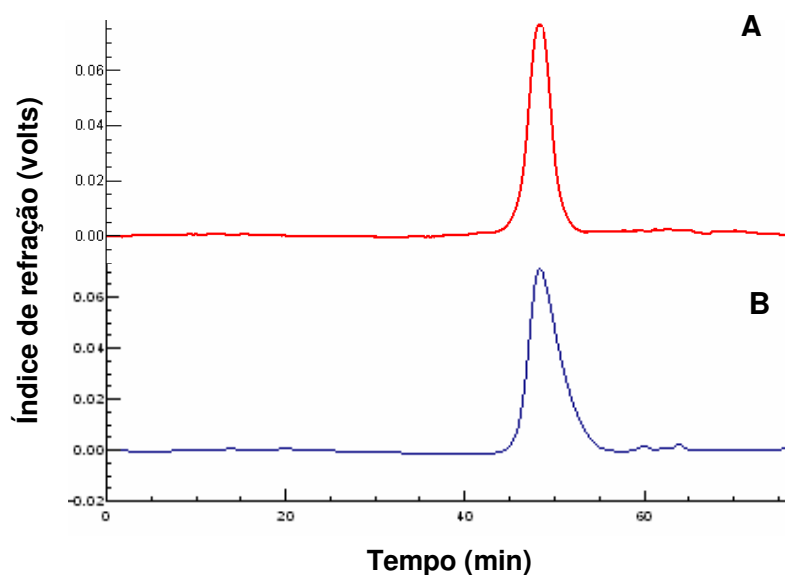


FIGURA 8 – PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES R16PF-EC (A) E R16PF-EP (B) POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Estas frações apresentaram uma massa molar de $3,9 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹ (1,0% de probabilidade de erro) e $4,6 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹ (0,5% de probabilidade de erro), com dn/dc de 0,149 e 0,145, para as mananas das frações R16PF-EC e R16PF-EP, respectivamente

Os espectros de RMN-¹³C das frações R16PF-EC e R16PF-EP mostraram-se similares às mananas descritas por Rosado et al. (2002) e Corsaro et al. (1998). Nestes dois trabalhos tal estrutura foi descrita para o EPS de *Pleurotus ostreatus* e *Phomopsis foeniculi*, respectivamente. Desta forma, foi possível determinar os assinalamentos destes polímeros (Figuras 9A e B), que foram cultivados em meios de cultura distintos, porém apresentam estruturas idênticas.

Na região anomérica, o sinal em δ 102,0 corresponde ao terminal não-redutor e às unidades 3-*O*-substituídas. Os sinais em δ 100,5 e 98,3, às unidades 2-*O*- e 2,6-*O*-substituídas de α -D-manopiranoose, respectivamente. Às unidades 2,6-*O*- e 2-*O*-substituídas são atribuídos os sinais em δ 78,5 e 78,1, enquanto que os sinais em δ 66,1 e 61,2 referem-se a C-6 substituído e C-6 livre, respectivamente (GORIN, 1973).

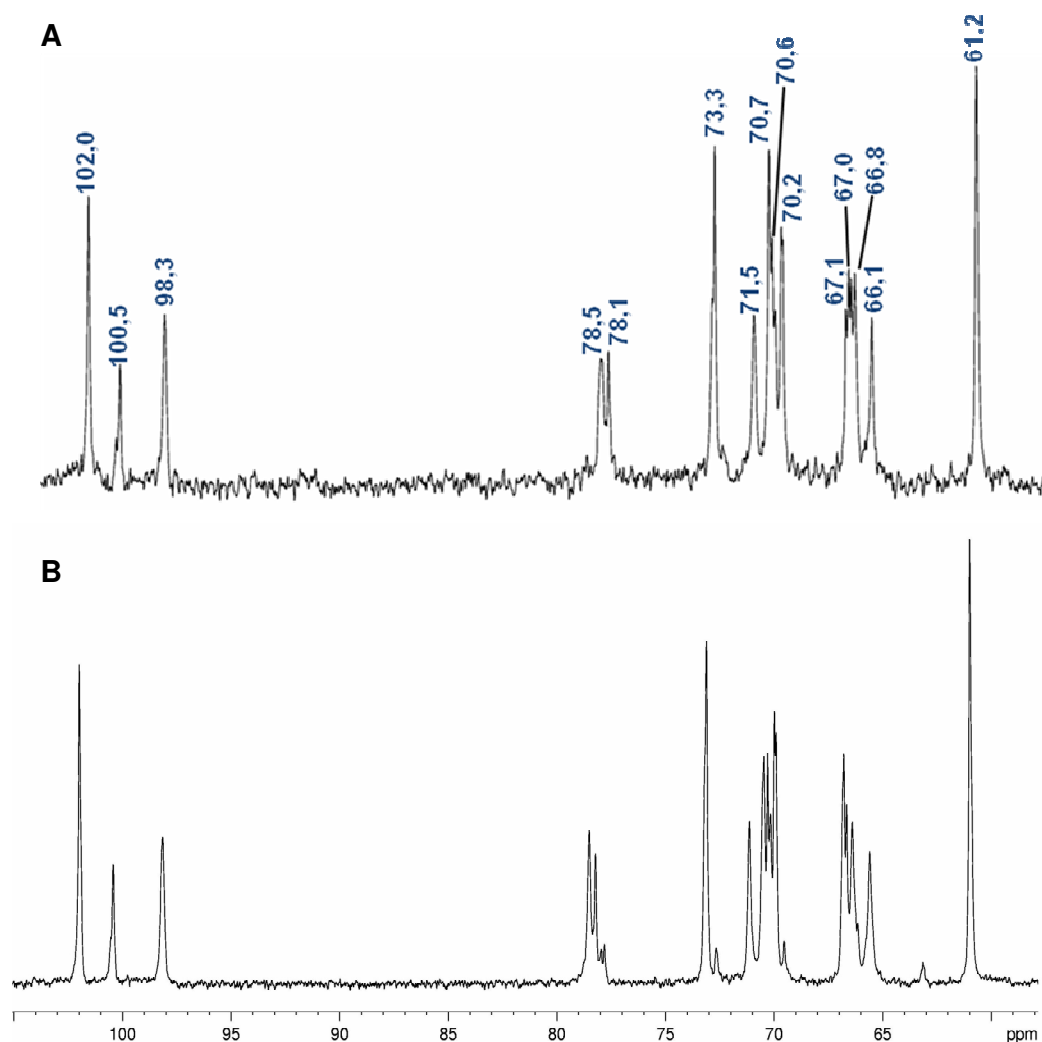


FIGURA 9 – ESPECTROS DE RMN-¹³C DA FRAÇÃO R16PF-EC (A) E R16PF-EP (B) DO EPS DE *P. ostreatus var. florida*
Solvente: D₂O a 50 °C. Deslocamento químico expresso em δ (ppm)

Inicialmente, com o objetivo de confirmar os dados obtidos pelos espectros de RMN-¹³C, foram realizadas hidrólises das frações polissacarídicas parcialmente O-metiladas utilizando ácido fórmico nos tempos de 6 e 12 horas a 100 °C (Tabela 9). No entanto, as proporções obtidas desses derivados não correspondem ao esperado, pois a proporção de terminal não-redutor das frações M-EC6 e M-EP6 é muito alta em relação à ramificação. Aparentemente, as frações M-EC12 e M-EP12 tiveram essa proporção diminuída, o que sugere que um tempo maior de hidrólise poderia levar à hidrólise total destes polímeros, que a principio a cadeia principal estaria resistente à quebra.

Porém, outra hipótese descrita por Barreto-Bergter e Gorin (1983), é que o derivado 3,4-Me₂-Man é ácido-label e desta forma, estaria ocorrendo a sua degradação durante o processo de hidrólise, levando a uma baixa proporção deste.

TABELA 9 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DAS FRAÇÕES R16PF-EC (M-EC) E R16PF-EP (M-EP) DE *P. ostreatus* var. *florida*

Acetato de alditol parcialmente O- metilado ^a	Fração (mol %)				Tipo de ligação ^b
	M-EC6 ^c	M-EC12 ^d	M-EP6 ^c	M-EP12 ^d	
2,3,4,6-Me ₄ -Man	79,0	67,6	63,6	55,8	Man _p – (1→
3,4,6-Me ₃ -Man	13,8	24,5	19,2	23,7	2→) – Man _p – (1→
2,4,6-Me ₃ -Man	2,6	3,0	6,8	3,3	3→) – Man _p – (1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,7	2,7	1,3	3,5	6→) – Man _p – (1→
3,4-Me ₂ -Man	1,9	2,2	9,1	13,7	2,6→) – Man _p – (1→

^a Analisado em GC-MS, após metilação, hidrólise ácida total com ácido fórmico, redução (NaB²H₄) e acetilação.

^b Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

^c Tempo de hidrólise de 6 horas;

^d Tempo de hidrólise de 12 horas

Outra metodologia comumente utilizada é a hidrólise com ácido sulfúrico. A fração R16PF-EC foi submetida a esse processo por 14 horas a 100 °C, levando a resultados condizentes com o esperado (Tabela 10), no qual foram observados os derivados parcialmente O-metilados referentes aos terminais não-redutores de α-D-Man_p (29,8 %), além dos derivados 2,3,4-Me₃Man (4,0%), 3,4-Me₂Man (34,0%), referentes à cadeia principal e 2,4,6- (2,0%) e 3,4,6-Me₃Man (30,2%), das ramificações.

TABELA 10 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO R16PF-EP (M-EP) DE *P. ostreatus* var. *florida*

Acetato de alditol parcialmente <i>O</i> -metilado ^a	Proporção (%)	Tipo de ligação ^b
2,3,4,6-Me ₄ -Man	29,8	Man β -(1→
3,4,6-Me ₃ -Man	30,2	2→)-Man β -(1→
2,4,6-Me ₃ -Man	2,0	3→)-Man β -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	4,0	6→)-Man β -(1→
3,4-Me ₂ -Man	34,0	2,6→)-Man β -(1→

^a Analisado em GC-MS, após metilação, hidrólise ácida total H₂SO₄ a 100 °C por 14 horas, redução (NaB²H₄) e acetilação.

^b Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

De acordo com os dados obtidos, avaliados conjuntamente com a literatura, sugere-se que as mananas obtidas são constituídas por uma cadeia principal de α -Man β -(1→6), parcialmente substituída em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais contêm unidades de α -Man β 2-*O*- e 3-*O*-substituídas.

Mananas similares foram encontradas em EPS de outras espécies de *Pleurotus* estudadas no Laboratório de Química de Carboidratos, como *P. eryngii*, *P. ostreatus* var. *H1* e *P. citrinopileatus* (KOMURA et al., 2008). Porém, tal estrutura não foi descrita, na literatura, para o basidioma e nem para o micélio obtido em cultura submersa de basidiomicetos.

Além do gênero *Pleurotus*, há descrição da manana em estudo, para o EPS de *Ganoderma tsugae* (PENG et al., 2003). Mananas com diferentes estruturas são descritas para várias espécies de levedura, como *Saccharomyces* spp e *Torulopsis* spp. e foram obtidas através da acetólise parcial para a produção de oligossacarídeos. Desta forma, foi evidenciado que a cadeia principal de polímeros de muitas leveduras é formada por unidades de α -Man β (1→6)-ligadas (GORIN, 1973; BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983).

A manana encontrada na fração R16PF-EP (M-EP), obtida a partir do cultivo submerso no meio POL, caracterizada estruturalmente foi submetida ao teste de efeito antinociceptivo e antiinflamatório, os resultados estão descritos no Item 4.4. Esta fração foi selecionada por apresentar maior rendimento em relação à manana obtida a partir do meio CZAPECK.

4.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS DO MICÉLIO EM CULTIVO SUBMERSO EM MEIO CZAPECK

O micélio de *P. ostreatus* var. *florida* foi submetido a extrações aquosas (temperatura ambiente e água fervente) e alcalinas (NaOH 1%), desta forma, foram obtidos os seguintes extratos: Aquoso I (1,4 g), Aquoso II (3,4 g) e Alcalino N1 (10,7 g), respectivamente (Figura 10). Estas massas correspondem a um rendimento de 3,9%, 9,5% e 29,7% para CW, HW e N1, respectivamente.

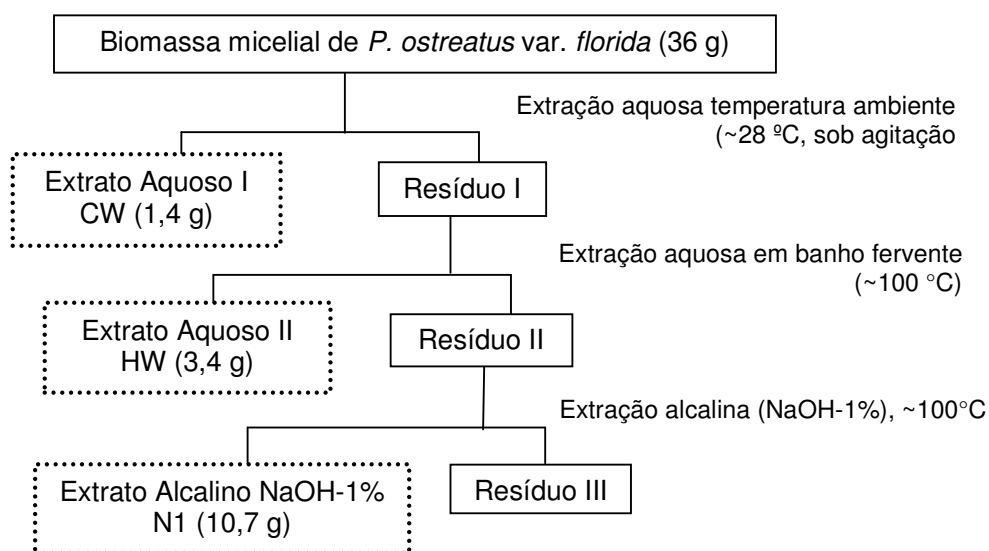


FIGURA 10 – FLUXOGRMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida*

Esses extratos foram fracionados e purificados de acordo com os métodos descritos anteriormente (Item 3.6).

As extrações seqüenciais, partindo de condições mais brandas até condições mais drásticas, tem se mostrado uma maneira eficiente de extrair e fracionar polissacarídeos, pois a purificação é feita com frações com uma menor mistura de polissacarídeos. A partir das composições monossacarídicas, constatou-se que as extrações aquosas apresentam uma maior proporção de 3-O-Me-galactose em relação ao extrato alcalino.

4.3.1 Purificação do Extrato Aquoso I

A extração do micélio com água fria forneceu o extrato aquoso I (1,4 g), o qual passou por processos de purificação (Figura 11).

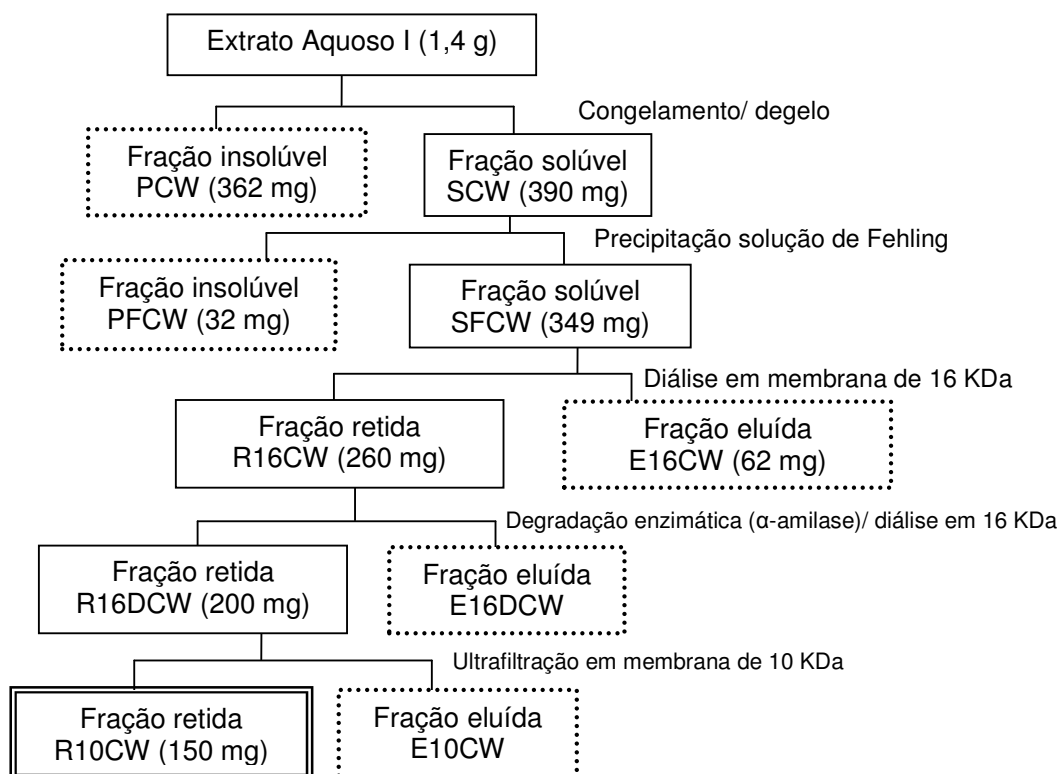


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO CW

Após os processos iniciais de purificação, a fração SFCW foi selecionada para ser submetida a métodos adicionais de purificação. Inicialmente esta fração foi dialisada em sistema fechado, em membrana de 16 kDa, resultando nas frações retida (R16CW) e eluída (E16CW). Estas frações apresentaram-se heterogêneas (Figura 12), porém pode se observar que este método foi parcialmente eficiente no fracionamento de moléculas presentes na fração anterior, SFCW.

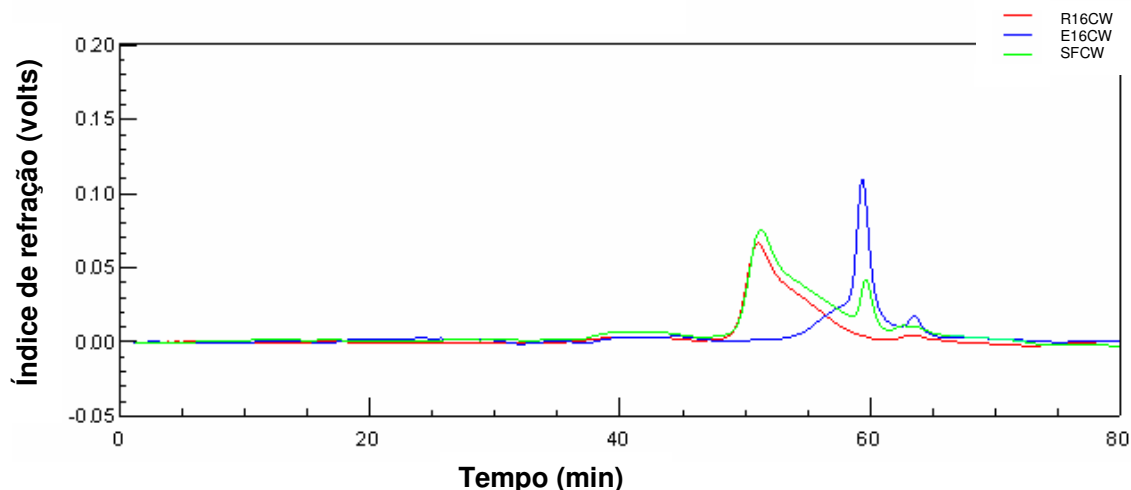


FIGURA 12 – PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA FRAÇÃO SFCW POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Além disso, a análise de composição monossacarídica (Tabela 11), mostrou que a proporção das unidades de Gal e 3-*O*-Me-gal é maior na fração retida em relação à fração eluída.

TABELA 11– COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO AQUOSO I DE *P. ostreatus* var. *florida*

Fração	Composição Monossacarídica (mol%) ^a				
	Fuc	Man	3- <i>O</i> -Me-Gal ^b	Gal	Glc
CW	-	20,5	14,3	11,4	53,8
SCW	-	12,7	8,3	10,3	68,7
PFCW	5,0	54,8	11,1	16,7	6,3
SFCW	-	23,0	22,3	12,7	40,6
E16CW	-	13,8	1,5	10,1	71,9
R16CW	-	8,8	6,9	21,5	50,0
R16DCW	-	20,3	16,9	32,6	30,2
E10CW	-	8,1	2,5	4,5	84,9
R10CW	-	31	34	24,2	10,8

^aAnalisado em GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaB²H₄) e acetilação.

^bConfirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190.

A fração R16CW foi analisada quanto ao seu espectro de RMN-¹³C (Figura 13A) e apresentou sinais semelhantes à manogalactana descrita para o basidioma

de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (SANTOS-NEVES, 2007). Além disso, foram observados os sinais em δ 99,9, 78,3, 73,3 e 60,8 referentes à α -glucanas (1 \rightarrow 4)-ligadas, sugerindo a presença de glicogênio (descrito a diante no item 4.3.2)

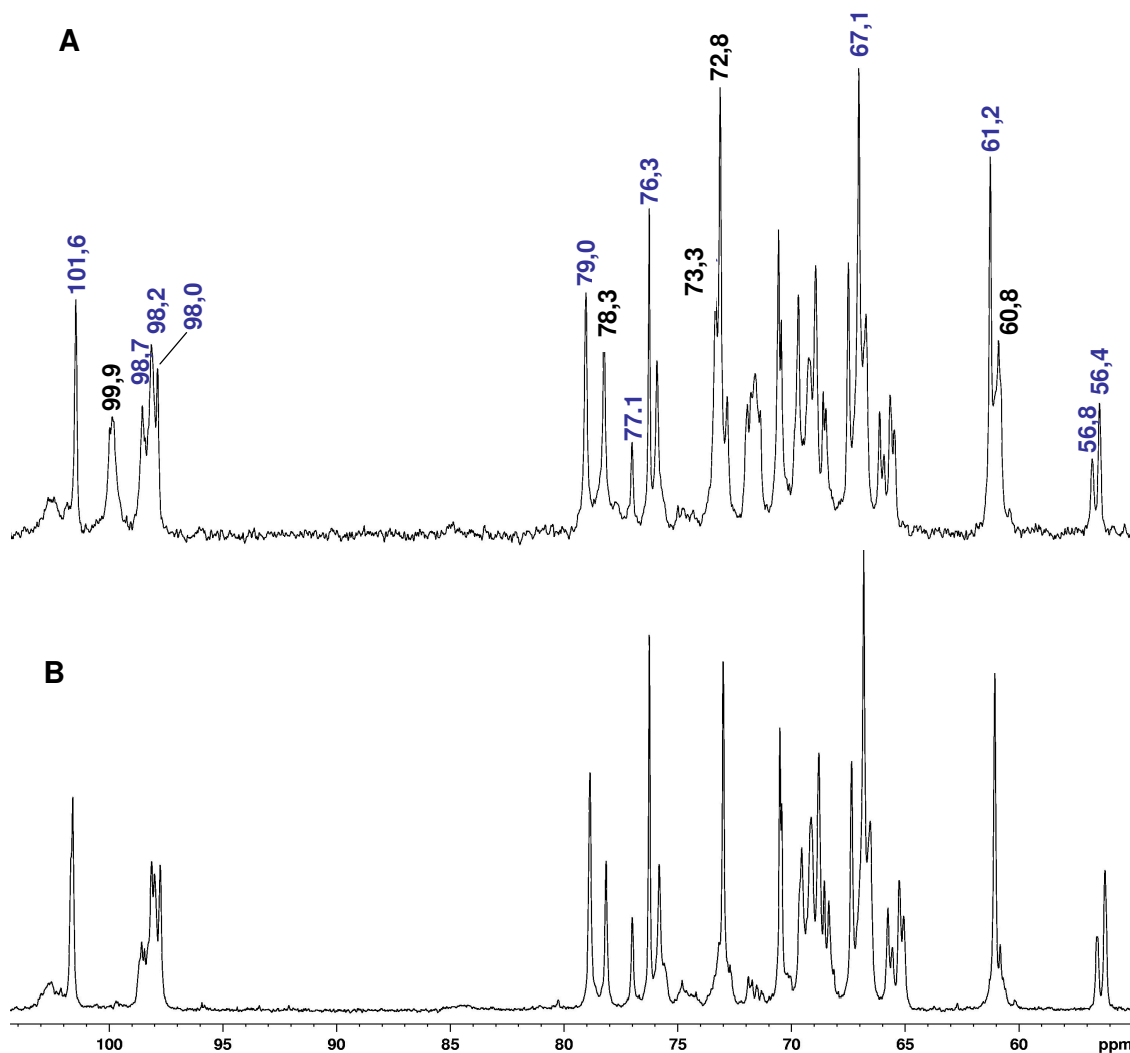


FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN-¹³C DAS FRAÇÕES R16-CW (A) E R10CW (B)

MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida* OBTIDA EM MEIO CZAPECK
Solvente: D₂O a 30 °C. Deslocamento químico expresso em δ (ppm)

Desta forma, com o intuito de purificar a fração R16CW, esta foi tratada com α -amilase, e após diálise em membrana de 16 KDa, foram obtidas as frações eluída (E16DCW) e retida (R16DCW). Esta última por apresentar um perfil heterogêneo quando analisado em HPSEC-MALLS, foi submetida a uma ultra-filtração com

membrana de 10 KDa de limite de exclusão, a qual forneceu a fração retida R10CW, que apresentou-se homogênea, com uma massa molar de $4,4 \cdot 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ (dn/dc 0,139 e 0,8% -probabilidade de erro) (Figura 14).

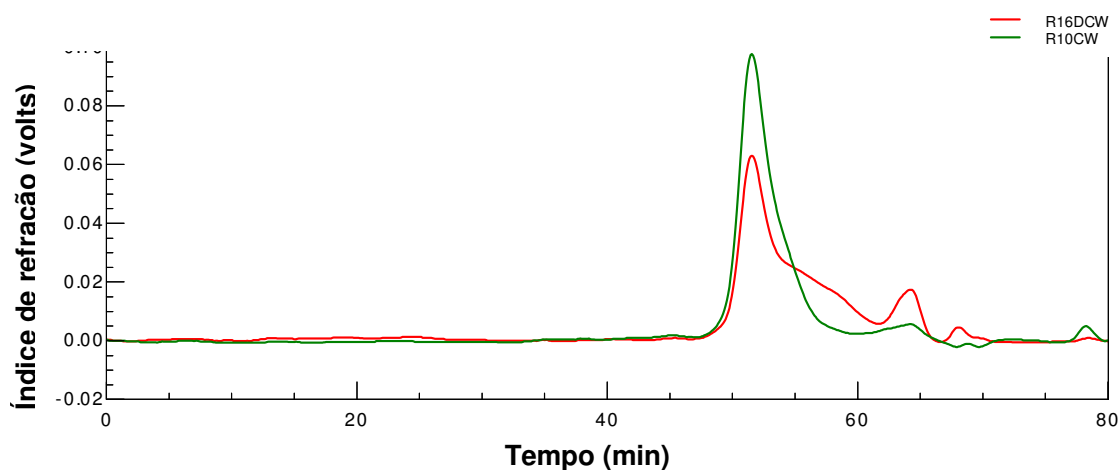


FIGURA 14 – PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES R16DCW E R10CW POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

A fração R10CW foi analisada quanto ao seu espectro de RMN- ^{13}C (Figura 13B) e pode se observar que alguns sinais referentes ao glicogênio não foram evidenciados (δ 98,9, 73,3, 71-72 e 60,8), desta forma pode-se sugerir que o processo enzimático foi eficiente na purificação desta fração.

Baseado nos dados da literatura foi possível determinar alguns sinais presentes neste espectro. Na região de carbono anomérico pode-se destacar os sinais em δ 101,6, 98,7, 98,3 referentes aos terminais não-redutores de β -D-Manp, α -D-Galp 6-O- e 2,6-O-substituídas de α -D-Galp, respectivamente. Além disso, podem ser assinalados os sinais de CH_2 dos terminais não-redutores de β -D-Manp em δ 61,2 e os sinais δ 66,8 e 66,5 referentes a C-6 livre confirmado pela inversão destes sinais por espectro de RMN- ^{13}C -DEPT. Os sinais em δ 56,8 e 56,4 referem-se ao O- CH_3 (SANTOS-NEVES, 2007).

A Figura 15 mostra o espectro da manogalactana obtida neste trabalho (Figura 15A) e o espectro obtido por Santos-Neves (Figura 15C), nos quais, podem se observar que, apesar de muito semelhantes, um ponto que chama atenção são os sinais δ 56,8 e 56,4 com maior intensidade para o polímero deste trabalho.

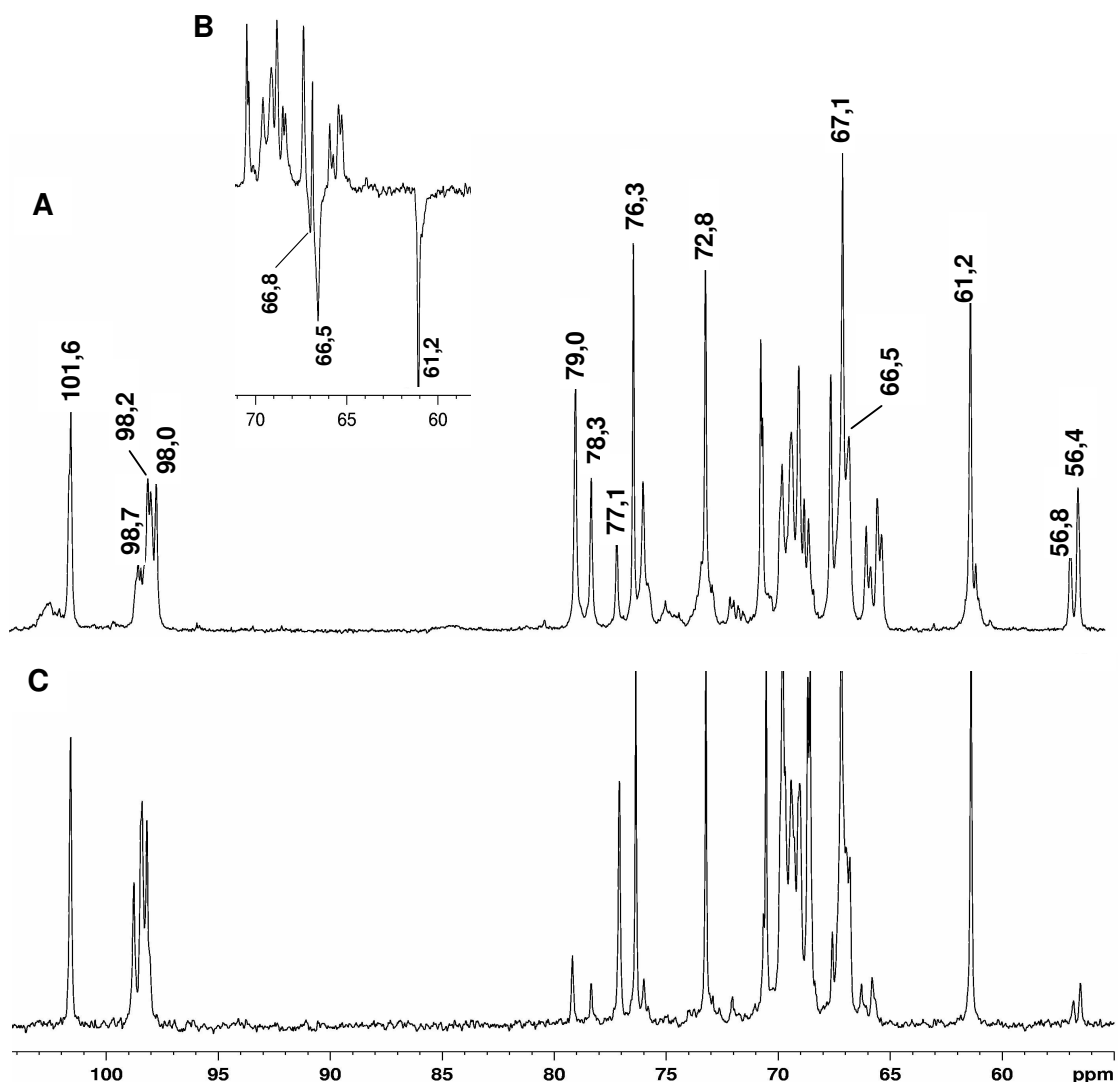


FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN-¹³C DA FRAÇÃO R10CW (A) E ESPECTRO DE RMN-¹³C-DEPT (B) DO MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida*; MANOGALACTANA DO BASIDIOMA DE *P. ostreatus* var. *florida* (C) SOLVENTE: D₂O a 30 °c. Deslocamento químico expresso em δ (ppm)

Figura B – Retirado de SANTOS-NEVES, 2007.

Polímeros contendo manose e galactose são descritos para outras espécies de *Pleurotus*. Manogalactanas são descritas para o basidioma de *Pleurotus ostreatus* “florida” e *P. ostreatoroseus* (ROSADO et al, 2003b) e *P. pulmonarius* (SMIRDELE et. al., 2008), sendo que tais estruturas apresentam unidades de

3-*O*-Me- α -D-Galp e α -D-Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas na cadeia principal com substituição em O-2 por unidades de β -D-Manp.

A presença de unidades de 3-*O*-Me- α -D-Galp na estrutura de polissacarídeos é sugerida como típica para o gênero *Pleurotus* (ROSADO et al, 2003b).

Desta forma, pode-se observar que a estrutura encontrada no micélio de *P. ostreatus* var. *florida* é similar à encontrada no basidioma de *Pleurotus* spp. Além disso, as manogalactanas descritas por Rosado et al. (2003b) apresentaram uma massa molar muito próxima à encontrada neste trabalho.

4.3.2 Purificação do extrato aquoso II

O material residual da extração aquosa a frio foi submetida a extração aquosa em banho fervente, pelo qual foi obtido o extrato aquoso II (3,4 g). Este extrato foi submetido a processos de purificação de maneira similar aos descritos anteriormente (Figura 16).

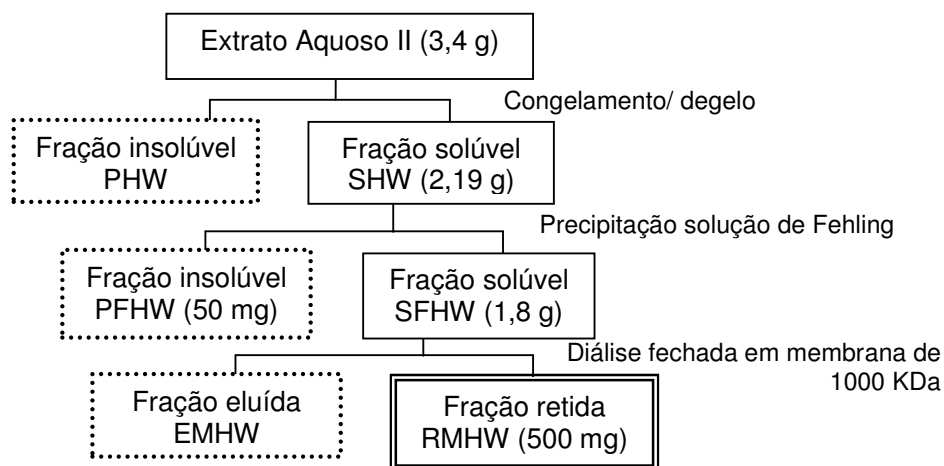


FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO II

A fração sobrenadante de Fehling (SFHW) por apresentar maior rendimento, foi selecionada para a etapa posterior de purificação. Esta fração, quando analisada em HPSEC, mostrou-se heterogênea, e de acordo com o perfil de eluição apresentado (Figura 17), esta fração poderia ser purificada utilizando a diálise

fechada em membrana de 1000 KDa de limite de exclusão. Desta forma, a partir deste processo foi obtida uma fração eluída (EMHW) e uma fração retida (RMHW), esta última apresentou um perfil homogêneo em HPSEC (Figura 17) e composta principalmente, de Glc (97,8%) (Tabela 12).

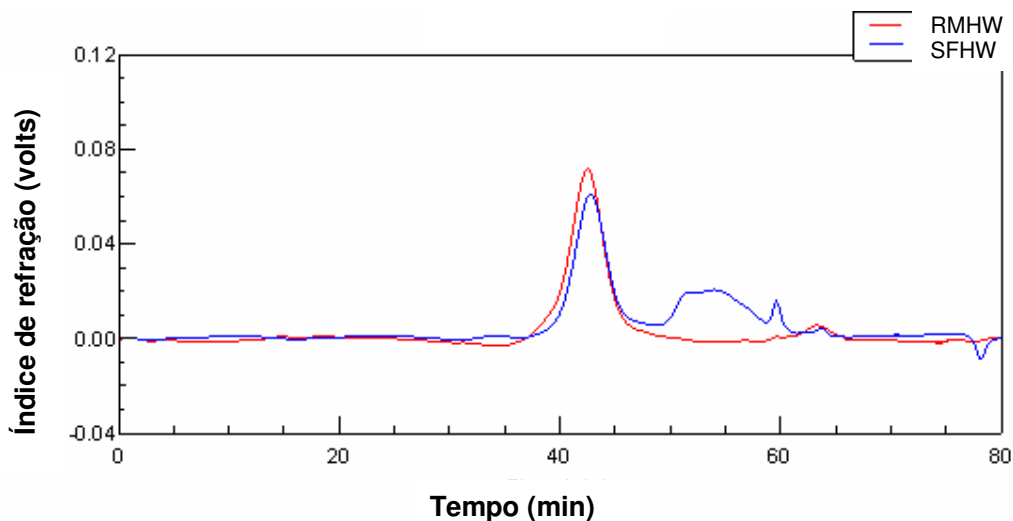


FIGURA 17 – PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES SFHW E RMHW POR HPSEC UTILIZANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO AQUOSO II DE *P. ostreatus* var. *florida*

Fração	Composição Monossacarídica (mol%) ^a			
	Man	3-O-Me-Gal ^b	Gal	Glc
HW	13,4	8,4	6,9	71,3
PHW	6,1	Tr	4,9	89,0
SHW	9,2	4,9	3,7	82,2
PFHW	2,9	1,7	2,5	90,8
SFW	3,3	2,5	2,9	91,3
RMHW	-	-	-	97,8
EMHW	5,5	5,7	8,8	75,7

^aAnalisado em GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaB²H₄) e acetilação.

^bConfirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190.

A fração RMHW foi analisada quanto ao seu espectro de RMN- ^{13}C (Figura 18A) e mostrou-se idêntica ao espectro do glicogênio (Figura 18C), no qual os sinais em δ 78,3 e 77,6 referem-se ao C-4 das unidades 4-O-ligadas e C-6 livres em δ 60,9 (STANEK; FALK; HUBER, 1998). Este último confirmado pela inversão deste sinal no experimento de RMN- ^{13}C DEPT (Figura 18 B)

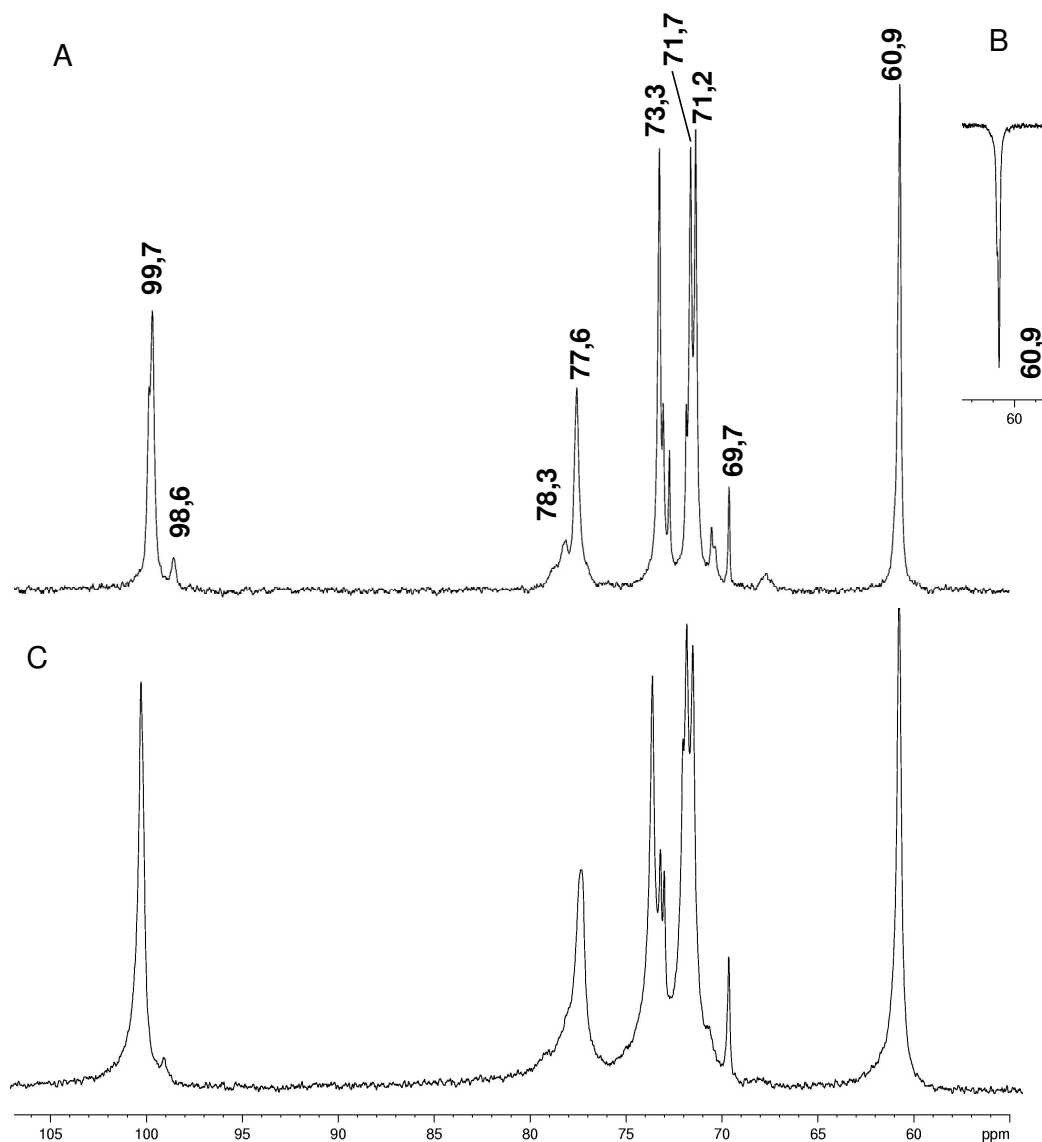


FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES RMHW DO MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida* OBTIDA EM MEIO CZAPECK (A), ESPECTRO DE RMN- ^{13}C -DEPT (B) E PADRÃO DE GLICOGÊNIO (C).

*Região do C-6 livre

Solvente: D_2O a 30 °C. Deslocamento químico expresso em δ (ppm)

Os dados anteriores foram confirmados por resultados de metilação (Tabela 13) no qual foram observados os derivados 2,3,4,6-Me₄-Glc, 2,3,6-Me₃-Glc e 2,3-Me₂-Glc, dos terminais não-redutores, das cadeias e dos pontos de ramificação, respectivamente.

TABELA 13 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO RMHW DE *P. ostreatus* var. *florida*

Acetato de alditol parcialmente O-metilado ^a	Fração (mol %)	Tipo de ligação ^b
	RMHW	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	8,2	Glc _p – (1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	80,0	4→) – Glc _p – (1→
2,3-Me ₂ -Glc	11,8	4,6→) – Glc _p – (1→

^a Analisado em GC-MS, após metilação, hidrólise ácida total com ácido fórmico, redução (NaB²H₄) e acetilação.

^b Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

^c Tempo de hidrólise de 9 horas

O Glicogênio encontrado na fração RMHW apresentou uma massa molar de 1,1.10⁶ g.mol⁻¹ (0,8% de probabilidade de erro), sendo que esta estrutura é um polímero de reserva típica de fungos, encontrado inclusive no basidioma de basidiomicetos (GRIFFIN, 1994).

Além desta fração, o glicogênio foi encontrado como “contaminante” nas frações derivadas do extrato aquoso a frio (descrito anteriormente) e no extrato alcalino que será descrito a seguir.

4.3.3 Purificação do Extrato Alcalino N1

Após a extração do micélio com água em banho fervente, o material residual foi submetido à extração com solução de NaOH 1 % a 60 °C, desta forma foi obtido o extrato alcalino (10,7 g), que também foi submetido ao processo de purificação (Figura 19).

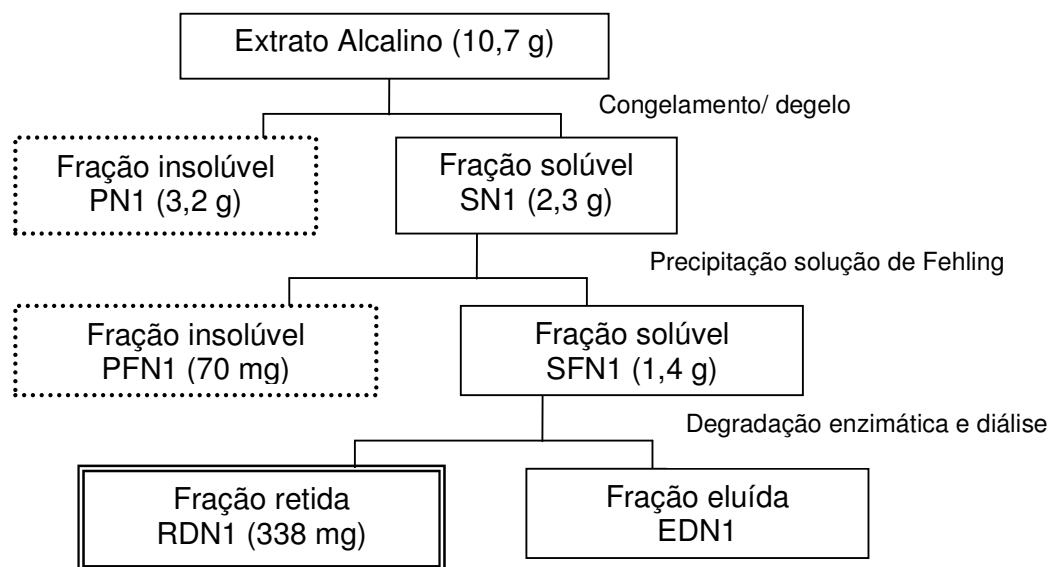


FIGURA 19 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO N1

O processo de purificação mostrou que desde o início, este extrato apresentou altos teores de glucose (Tabela 15). A fração SFN1 foi selecionada para posterior processo de purificação por apresentar maior rendimento.

TABELA 15– COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ACALINO I DE *P. ostreatus* var. *florida*

Fração	Composição Monossacarídica (mol%) ^a					
	Fuc	Xyl	Man	3-O-Me-Gal ^b	Gal	Glc
N1	2,6	2,0	7,7	3,6	-	84,1
PN1	-	1,4	2,5	-	1,7	94,0
SN1	1,7	1,8	4,2	-	-	90,6
PFN1	1,6	4,3	7,2	-	1,0	85,6
SFN1	-	3,9	3,7	-	1,6	90,4
RDN1	-	-	1,6	-	-	98,4

^aAnalisado em GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaB²H₄) e acetilação.

^bConfirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190.

A fração SFN1 foi analisada quanto ao seu espectro de RMN-¹³C e apresentou os sinais em δ 99,7, 98,4, 77,6, 73,3, 71,7, 71,2, 69,7 e 60,9 que sugerem a presença de glicogênio (Figura 20A). Com o intuito de eliminar o

glicogênio presente nesta fração, foi realizada uma degradação enzimática com α -amilase e após o tratamento enzimático, o material foi dialisado fornecendo uma fração retida (RDN1).

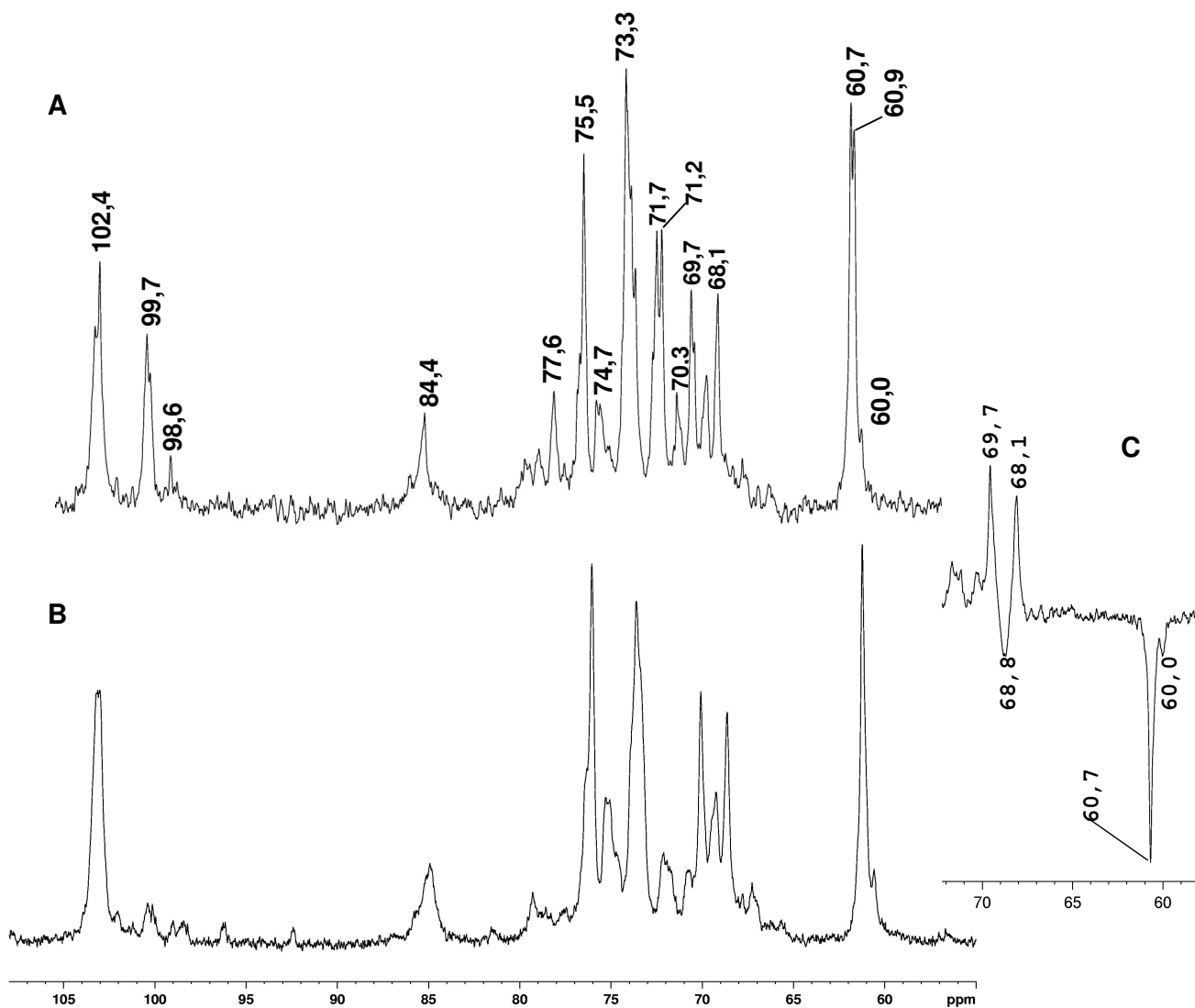


FIGURA 20 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO SFN1 (A); RDN1 (B) E RMN- ^{13}C -DEPT (C) DO MICÉLIO DE *P. ostreatus* var. *florida* OBTIDA EM MEIO CZAPECK
Solvente: D_2O a 30 °C. Deslocamento químico expresso em δ (ppm)

Nesta fração pode-se observar a diminuição de sinais característicos de glicogênio (Figura 20B), mostrando que o método de purificação foi eficaz na degradação deste polímero. Após este processo, pode-se sugerir que a fração

apresenta uma glucana do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ -ligada, devido ao sinal em δ 102,4, caracterizando a configuração do tipo β e o sinal em δ 84,4, característico para C-3 ligado de unidades de glucose. Além disso, os sinais em δ 68,8 e 60,7 referem-se aos sinais de C-6 substituídos e C-6 livres, respectivamente (Figura 20C) (CARBONERO et al., 2005). Porém análises complementares como metilação, degradação de Smith, devem ser realizadas para desvendar a estrutura fina desta glucana.

No trabalho realizado por Santos-Neves et al. (2008b) com o basidioma de *P. ostreatus* var. *florida* foi caracterizada uma glucana, capaz de formar géis em baixa temperatura, de cadeia principal formada por unidades de α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-ligados, parcialmente substituída em O-6 por unidades de β -D-Glcp, sendo que parte desta ramificação é formada por três unidades de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-ligados (SANTOS-NEVES et al., 2008b).

Outra glucana descrita para o mesmo basidiomiceto é composta por α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-ligadas, parcialmente substituídas em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada quatro unidades da cadeia principal (SANTOS-NEVES, et al., 2008a).

As glucanas são homopolímeros que apresentam estruturas extremamente diversas, sendo ramificadas ou lineares e podendo apresentar comportamentos distintos, como propriedade de formar géis, e insolubilidade em água fria. Portanto merecem um estudo muito detalhado com relação à caracterização de sua estrutura, uma vez que a generalização desta leva a simplificações que geram descrições errôneas destes polímeros. Além disso, quando se tem o objetivo de estudar os mecanismos de ação destes polímeros, esse cuidado se torna ainda mais importante, uma vez que em estudos de atividades biológicas diversas é observado que a estrutura química destas glucanas é de extrema importância no efeito farmacológico (ZHANG et al., 2007).

4.4 TESTE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA

A administração intraperitoneal de M-EP (manana obtida a partir do cultivo em meio POL – fração R16PF-EP), foi testada nas doses de 1, 10 e 100 mg/Kg, 30 min. antes da injeção de ácido acético como agente irritante.

O polissacarídeo M-EP causou uma inibição da resposta nociceptiva induzida pelo ácido em $91 \pm 7\%$ na dose de 100 mg/kg (Figura 18 A). A dose calculada de M-EP necessária para inibir 50% das contorções (ID_{50}) foi de 19,6 (9,1- 42,1) mg/Kg.

No entanto, M-EP (1-100 mg) não foi capaz de inibir a migração de leucócitos (migração de células totais) e nem a permeabilidade capilar (extravasamento do corante Evan's Blue) induzidas pelo ácido acético (Figuras 18 B e 18 C), ou seja, não apresentou ação antiinflamatória.

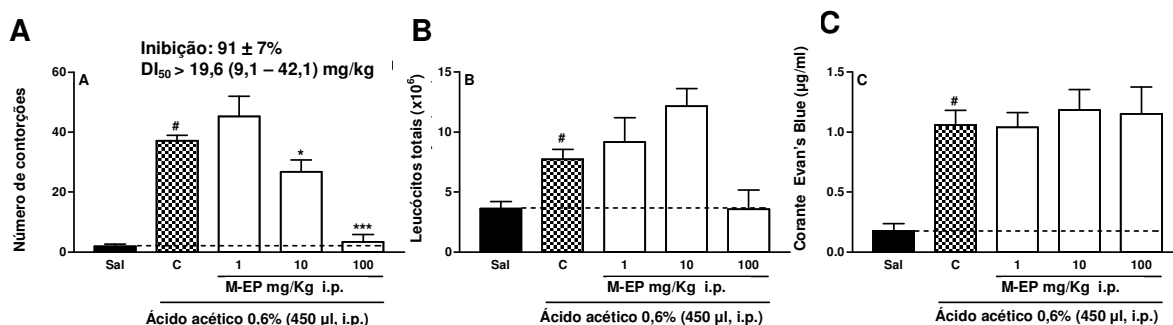


FIGURA 21 – EFEITO DE M-EP (1-100 mg/Kg, I.P.) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE EVAN'S BLUE (C) INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão; $n = 6-8$ animais por grupo. $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ vs. Controle (C), e $^{\#}p < 0,001$ vs. salina (Sal), ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls.

A ação antinociceptiva e/ou antiinflamatória de polissacarídeos isolados do basidioma de basidiomicetos foi estudada recentemente. A partir de *Lentinus edodes*, foi isolada uma fucomanogalactana, a qual possui uma cadeia principal de unidades de Galp ligadas (1 \rightarrow 6), parcialmente substituída por Manp e Fucp em O-2, sendo que este polímero inibiu totalmente a nocicepção com uma dose de 100 mg/kg. Além disso, nesta mesma dose, este polímero foi capaz de diminuir a

permeabilidade capilar peritoneal em 76% e inibiu completamente a infiltração leucocitária, ou seja, apresentou atividade antiinflamatória (CARBONERO et al., 2008).

Outro polissacarídeo que foi avaliado quanto a estas atividades foi uma manogalactana com cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp-(1 \rightarrow 6) e 3-O-Me- α -D-Galp, sendo parcialmente substituída em O-2 apenas por terminais não redutores de Manp, a qual foi isolada do basidioma de *Pleurotus pulmonarius*. Esta molécula inibiu em 93% a nocicepção induzida por ácido acético com a dose de 30 mg/kg (DI₅₀ = 16,2 mg/kg) e não apresentou atividade anti-inflamatória (SMIDERLE et al., 2008a).

A β -glucana com cadeia principal β -Glc ρ -(1 \rightarrow 3), substituída em O-6 a cada três unidades da cadeia principal por terminais não redutores de β -Glc ρ obtida do cogumelo citado anteriormente também foi submetida ao mesmo teste. Este polímero inibiu em 85% a nocicepção induzida por ácido acético com a dose de 3 mg/kg (DI₅₀= 1,26 mg/kg). Além disso, promoveu a redução da infiltração de leucócitos (migração de célula total) induzida por ácido acético. O DI₅₀ foi de 1,19 mg/kg, a inibição foi de 82% com uma dose de 3 mg/Kg. Porém, a administração desta molécula foi capaz de reduzir em apenas 37% (3mg/Kg) a permeabilidade capilar abdominal (extravasamento do corante Evans Blue) (SMIDERLE et al., 2008b).

O estudo de frações polissacarídicas puras e caracterizadas quanto a sua estrutura química é, portanto, um passo importante para o entendimento dos mecanismos de ação de drogas em vias complexas, como a inflamatória estudada neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

Após as análises dos resultados obtidos podem ser propostas algumas considerações sobre esta pesquisa com o Basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* var. *florida*:

CULTIVO:

A produção de EPS e biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* nos meios de cultivo CZAPECK (EPS: 530 mg.l⁻¹, Biomassa: 3 g.l⁻¹) e POL (464 mg.l⁻¹; Biomassa: 2,2 g.l⁻¹) apresentaram baixo rendimento, quando comparados com dados da literatura.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS:

A partir dos EPSs obtidos em cultivo submerso do micélio de *P. ostreatus* var. *florida* nos meios CZAPECK e POL foram caracterizadas mananas similares, independente do meio em que o micélio foi crescido. Estes polímeros apresentaram-se compostos por uma cadeia principal formada por α -Manp-(1→6)-ligadas, parcialmente substituída em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais contêm unidades de α -Manp 2-O- e 3-O-substituídas e uma massa molar de $3,9 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹ e $4,6 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹, para as mananas obtidas a partir dos meios CZAPECK e POL, respectivamente. Tal estrutura não foi descrita para o basidioma de *Pleurotus* spp;

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EXTRATOS OBTIDOS DO MICÉLIO:

A manogalactana presente no extrato aquoso a frio é similar à encontrada no basidioma do cogumelo em estudo;

A partir do extrato aquoso foi isolado o polímero de reserva típico de fungos – glicogênio, de massa molar de $1,1 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$;

No extrato alcalino foi detectada a presença de uma β -glucana-(1→3)-ligada, a princípio com pouca similaridade com as estruturas descritas para o basidioma.

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA:

A manana obtida pelo cultivo em meio POL (M-EP) apresentou atividade antinociceptiva, causando uma inibição da resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético em $91 \pm 7\%$ na dose de 100 mg/kg, porém não apresentou efeito antiinflamatório.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 74, p. 4970-4971, 1952.
- BAE, J. T.; SIM, G. S.; LEE, D. H.; LEE, B. C.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; YUN, J. W. Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 251, p. 347-354, 2005.
- BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. **Adv. Carbohydr. Chemem. Bioch.**, v. 41, p. 67-103, 1983.
- CARBONERO, E. R.; MONTAI, A. V.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Glucans of lichenized fungi: significance for taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia* **Phytochemistry**, v. 66, p. 929-934, 2005.
- CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chem.**, v. 111, p. 531-537, 2008a.
- CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ROSA, M. C. C.; TORRI, G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual partially 3-O-methylated α -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 252-257, 2008b.
- CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydr. Res.**, v. 66, p. 252-257, 2006.
- CHANG, M. Y.; TSAI, G. J.; HOUG, J. Y. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 38, p. 407-414, 2006.
- CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G.; YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A β -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydr. Res.**, v. 328, p. 629-633, 2000.
- CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.
- CORSARO, M. M., CASTRO, D. C., EVIDENTE, A., LANZETTA, R., MOLINARO, A., MUGNAI, L., PARRILL, M.; SURICO, G. Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by *Phomopsis foeniculi*. **Carbohydr. Res.**, v. 308, p. 349-357, 1998.

CROAN, S. C. Conversion of woods waste into value-added products by edible and medicinal *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. Species (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **Internat. J. Medicinal Mushrooms**, v. 2, p. 73-80, 200.

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

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

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

FAN, J.; ZHANG, J.; TANG, Q.; LIU, Y.; ZHANG, A.; PAN, Y. Structural elucidation of a neutral fucogalactan from mycelium of *Coprinus comatus*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 1130-1134, 2006.

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

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

GERN, R. M. M., WISBECK, E., RAMPINELLI, J. R., NINOW, J. L., FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresearch. Technol.** v. 99, p. 76-82, 2008.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2^o ed. New York: Wiley-Liss, Inc., 1994.

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

GORIN, P. A. J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. **Can. J. Chem.**, v. 51, p. 2375-2383, 1973.

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

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales S.l., Basidiomycetes). **Internat. J. Medicinal Mushrooms**, v. 1 p. 69-80, 1999.

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

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, A. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydr. Res.**, v. 281, p. 143-154, 1996.

GUZMAN, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. **Internat. J. Medicinal Mushrooms**, v. 2, 29 p., 2000.

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

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

HU, S.; WANG, J.; LIEN, J.; LIAW, E.; LEE, M. Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. **Appl. Microbiol. Cell Physiol.**, v. 70, p. 107-113, 2006.

HUMFELD, H. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. **Science**, v. 107 (2780), p. 373, 1948.

JAKOVLJEVIĆ, D.; MILJKOVIĆ-STOJANOVIĆ, J.; RADULOVIĆ, M.; VLJEVIĆ-JAKOVLJEVIĆ, M. H. On the mannogalactan from the fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (fr.) Quél. **J. Serb. Chem. Soc.** v. 63, p. 134-142, 1998.

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

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

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

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

KHONDKAR, P.; AIDOO, K. E.; TESTER, R. F. Sugar profile of extracellular polysaccharides from different *Tremella* species. **Internat. J. Food Microbiol.**, v. 79, p. 121-129, 2002.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; PARK, J. P.; CHO, Y. J.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Mycelial growth and exobiopolymer production by submerged culture of various

edible mushrooms under different media. **Letters Appl. Microbiol.**, v.34, p. 56-61, 2002a.

KIM, H. O.; KIM, J. M.; JOO, J. M.; KIM, S. W.; HWANG H. J.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Acrocybe cylindracea*. **Bio Tech.**, v. 96, p. 1175-1182, 2005.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P.; NA, Y. S.; SONG, S. K.; YUN, J. W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 34, p. 389-393, 2002b.

KIM, S.; KIM, H.; LEE, B.; HWANG, H.; BAEK, D.; KO, S. Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. **Clin. Nutr.**, v. 25, p. 166-170, 2006.

KOMURA, D. L.; CARBONERO, E. R.; ROSA, M. C. C., GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Avaliação estrutural de mananas produzidas através do cultivo submerso de *Pleurotus* spp. In: **Anais do IV simposio internacional sobre cogumelos no Brasil e III Simposio nacional sobre cogumelos comestíveis**. Caxias do Sul, RS, 2008, p. 120.

KOMURA, D. L.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Caracterização estrutural de exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* In: **Anais do III simposio internacional sobre cogumelos no Brasil e II Simposio nacional sobre cogumelos comestíveis**. São Paulo, SP, 2006, p. 120.

LABARÈRE, J; BOIS, F. La conservacion y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. In: SANCHEZ, J.E.; ROYSE D. **La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp.** Ecosur – Uteha, México 2002. p. 83-123.

LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 244, p. 61-70, 2006.

LEE, Y. L.; HUANG, G. W.; LIANG, Z. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. **Food Science Technol.**, v. 40, p. 823-833, 2007.

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

LI, Y.Q.; FANG, L.; ZHANG, K. C. Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 68, p. 323-328, 2007.

LIM, M. J.; JOO, J. H.; KIM, H. O.; KIM, H. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. .J.; YUN, J. W. Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides

produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata* TG-1. **Carbohydr. Polym.**, v. 61, p. 296-303, 2005.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Compl. Alternative**, v 2, p. 285-299, 2005.

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

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

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharm.**, v. 46, p. 113-121, 2000.

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

MIZUNO, Y.; KINOSHITA, T.; ZHUANG, C.; ITO, H.; MAYUZUMI, Y. Antitumor-active heteroglycans from niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 59, p. 68-71, 1995.

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

PACE, G. W.; RIGHELATO, R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 15, p. 41-70, 1980.

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; XU, Y. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. **Carbohydr. Polym.**, v. 54, p. 297-303, 2003.

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

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 629-636, 2005.

ROSADO, F. R.; CARBONERO, E. R.; KEMMELMEIER, C.; TISCHER, C.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1→4)-linked α -D-galactan and α -D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p 261- 265, 2002.

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

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

RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of β -glucans in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 73-81, 1991.

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

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ALQUINI, G.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A novel branched α -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydr. Res.**, v. 73, p. 309-314, 2008a.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 1456-1462, 2008b.

SANTOS-NEVES, J. C. **Caracterização estrutural dos polissacarídeos obtidos do basidioma de *Pleurotus ostreatus* var. *florida***. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, PR, 2007.

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

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, 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, p. 2731-2736, 2008a.

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

SONE, Y.; OKUDA, R.; WADA, N.; KISHIDA, E.; MISAKI, A. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. **Agric. Biol. Chem. (Japan)**, v. 49 (9), p. 2641-2653, 1985.

STAMENTS, P. Can mushrooms help save the world? **Explorer**, v. 2, p. 153-156, 2006.

STANEK, M.; FALK, H.; HUBER, A. Investigation of the branching characteristic of glycogen by means of two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. **Monatshefte für Chemie**, v. 129, p. 355-364, 1998.

STORTZ, C.A.; CASES, M.R.; CERESO, A.S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. **Carbohydr. Polym.** v. 34, p. 61-65, 1997.

SUGIHARA, T. F.; HUMFELD, H. Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 2 (3), p. 170-172, 1954.

SYNYTSYA, A.; MÍČKOVÁ, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPĚVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘÍKOVÁ, E.; ČOPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. **Carbohydr. Polym.** 2008 (in press).

TABATA, K.; ITO, W.; KOJIMA, T.; KAWABATA, S.; MISAKI, A. ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* fries. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 1483-1489, 2004.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D.; SUN, X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technol.**, v. 100, p. 1682-1686, 2009.

VINOGRADOV, E.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. Ø.; WASSER, S. The structure of the glucuronoxylomanan produced by culinary-medicinal yellow brain mushroom (*Tremella mesenterica* Ritz.:Fr., Heterobasidiomycetes) grown as one cell mass in submerged culture. **Carbohydr. Res.**, v. 86, p.121-135, 1981.

WANG, Y. X.; LU, Z.X. Statistical optimization of media for extracellular polysaccharide by *Pholiota squarrosa* (Pers. Ex. Fr.) Quel. AS 5.245 under submerged cultivation. **Biochem. Eng. J.**, v 20, p. 39-47, 2004.

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

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

WISBECK, E; ROBERT, A. E.; FURLAN, S. A. Avaliação de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Health Environ. J.**, v. 3, n. 2, p. 7-10, 2002.

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

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

WU, C. Y.; MAU, J. L.; LIANG, Z. C. Influence of cultivation conditions on mycelial growth and exopolysaccharide production of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus citrinopileatus* Singer (Agaricomycetidae). **Internat. J. Medicinal Mushrooms**, v. 10 (3), p. 279-292, 2008.

ZHANG, A.; ZHANG, J.; TANG, Q.; JIA, W.; YANG, Y.; LIU, Y.; FAN, J.; PAN, Y. Structural elucidation of a novel fucogalactan that contains 3-O-methyl rhamnose isolated from fruiting bodies of the fungus, *Hericium erinaceus*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 645-649, 2006.

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

ZHANG, M.; ZHANG, L.; P.; C. K., CHEUNG; OOI, V. E. C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydr. Polym.**, v. 56, p. 123-128, 2004.

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