

ANA HELENA PEREIRA GRACHER



**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO
CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *Ganoderma multiplicatum***

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências –
Bioquímica, Curso de Pós – Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2005

ANA HELENA PEREIRA GRACHER

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO
CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *Ganoderma multiplicatum***

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências –
Bioquímica, Curso de Pós – Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2005

Aos meus pais, Nelson e Maria Inez simplesmente por tudo! Vocês são o meu ponto de referência, não só nas tempestades, mas sempre. Eu sei que não foi sempre fácil para vocês, mas conseguimos! E tudo que eu conquistei devo a vocês. Amo muito vocês! Quem diria, de adolescente rebelde a Mestre. Nem vocês acreditavam! Ao Marcelo por to apoio e amor. Sempre com uma palavra de carinho. Te amo!

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todos que me ajudaram nessa caminhada. Gostaria de falar um pouquinho de cada um, mas a lista é grande e o espaço pequeno.

Agradeço a Deus por me dar forças e por tornar tudo possível.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marcello Iacomini pelos ensinamentos, orientação e carinho e ao Prof. Dr. Philip A. J. Gorin pelo exemplo e alegria, sempre dedicado a ciência.

Aos meus pais, Nelson e Maria Inez, pelo amor, dedicação, apoio incondicional e torcida. Sem vocês eu não teria realizado nem uma parte disso. Amo vocês.

Ao meu namorado Marcelo pelo carinho e apoio sempre. Por me ajudar, me consolar, me agüentar nos momentos de crise e entender muitas vezes minha ausência e abrir mão de muitas coisas por mim. Além de sempre ter uma palavra de incentivo.

À minha irmã Juliane, ao Tico (Alcides), à Amanda e à Victória (minhas princesas) que apesar da distância, sempre torceram por mim e entenderam as ausências, principalmente nos aniversários. Sempre é bom conversar com vocês!

À minha irmã Paula e ao Celso, pelo carinho, cuidados comigo e apoio. Sei que vocês sempre torceram e oraram muito por mim.

À Ilda que sempre cuidou de mim, na maioria das vezes fazendo minhas vontades e por me escutar mesmo sem entender nada, quando chegava em casa falando pelos cotovelos.

À tia Lurdinha pela torcida e pela propaganda, muitas vezes enganosa, que sempre vez de mim.

Aos meus sogros Seu Nilton e D. Marlene pelo apoio, carinho, momentos compartilhados e pelas refeições ótimas e animadoras.

À minhas sempre e antigas amigas Fernanda Zanicotti e Sulamitha, por não entenderem nada do que faço, mas sempre me apoiarem e me manterem em uma vida que não só a do laboratório.

À minhas amigas da faculdade Giane e Giselle, juntamente com Drehna (Nilton Jr.) e Pirih (Eduardo), ao namoro arranjado (que deu certo), aos momentos de festa, viagem, apoio e mesmo com caminhos diferentes profissionalmente a amizade ficou. Além de sempre me manterem informada das outras áreas da nossa profissão.

À família Honório, principalmente Luciane Almerinda (não pude resistir) pelas discussões literárias e ótimas conversas e D. Luci pela torcida, apoio e sempre com uma palavra para confortar.

À minha amiga paulista, Carlinha, pelas conversas, principalmente pelo msn, e carinho. To esperando você vir para Curitiba de novo!

À minha madrinha Stela pelo apoio, torcida e carinho.

À minha prima Silvana pelo empréstimo do monitor, que era por um dia, mas acabei ficando por uma semana.

À toda minha família pela torcida e ótimas reuniões, principalmente na Fescafé e no Natal. Não vou citar todos pois a família é grande.

Ao Prof. Dr. Fabio R. Rosado pela coleta e doação do material estudado. E também pelos momentos de descontração e conversas.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki e Prof. Dr. Miguel D. Nosedá pelas análises de RMN.

A Prof. Dra. Patrícia Stuelp Campelo por me dar a chance de iniciar no mundo científico através dos carboidratos e suas atividades biológicas.

À minha grande amiga Elaine, por toda ajuda (que foram muitas) nesses anos e pela amizade. Não sei como agradecer. Como você disse: espero que mesmo que tenhamos caminhos diferentes, nossa amizade permaneça.

À minha amiga Carol (Caroline Mellinger) pelas ótimas conversas, apoio, ajuda e pelo exemplo de pessoa. Um dia quem sabe eu chego lá!

Ao meu amigo Ricardo, companheiro de laboratório, natação e FESCAFÉ! Obrigada por toda disposição em ajudar e pelo apoio. Adoro conversar com você!

À Prof. Sandra Woranovicz Barreira (Sandrinha) pelas ótimas conversas, sorriso contagiante e ótima companheira de viagem.

Às companheiras de Caxambu e amigas Andrea e Fhernanda pelas conversas, das quais, geralmente, eu que mais falava do que vocês!

Às minhas amigas da época da iniciação até hoje Giovana Alquini e Rafinha. Pelas ótimas conversas. A Rafinha com suas frases ótimas!

À Rosane pelas análises de GC-MS e conversas durante o cigarrinho.

À Andréia T. pelas ótimas conversas, sempre acompanhadas de um cafezinho e um cigarro, trocas sobre livros e ensinamento sobre astrologia. E também pelas análises de GLC e GPC.

Aos colegas do laboratório E1, 247, 250 cada um com suas características que não serão esquecidas, pelos momentos de experimentos, conversas e cafezinhos, Rodrigo Vassoler, Lauro, Guilherme, Thales, Juliana Curi, Lucimara e Rodrigo Reis e os alunos de iniciação Roger, Dania, Juliana Caxambu, Bruno, João, Maria Luiza, Dirce e Grazielle.

Aos alunos de iniciação que passaram, mas que também foram importantes Anderson e Caroline Vöhringer.

Ao Eduardo Baiano pela sua presença sempre “discreta”, comentários oportunos e de suma importância científica (por exemplo do chá de cordinha!)

À Fernanda Simas pelas conversas, empréstimo de protocolos e a ótima viagem na Fescafé.

À minha amiga Grazielle Viccini, companheira de mestrado, conselheira. Espero continuar dividindo com você sonhos, experiências, frustrações, etc. É ótimo conversar com você!

A minha turma de mestrado Giovana, Patilene (Patrícia), Juliana Inaba, Gus (Gustavo), Lauro, Diogo, Marcelo, Tatiane (super mãe), Gerusa e Marcelo Ferro (não é do mestrado, mas entrou no departamento com a gente). Valeu os momentos de estudo, sofrimento, alegrias, conversas e trocas de experiências. Chegamos lá!

Aos amigos dos outros laboratórios Adriano (sempre feliz), Alan, Ana Paula Newton (a pessoa mais “pink” que conheço), Juliana Cassolato, Marco, Paulinha (sempre carinhosa e companheira), Rosiane, pelo empréstimo de material e conversas, principalmente nos corredores, sempre animadas.

Aos antigos colegas e amigos, Cíntia, Selene, César, Ana Paula Busato e Renato.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela dedicação.

As coordenadoras do Curso de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular Prof^{as}. Fany Reicher, Leda S. Chubatsu e Maria Eugênia Duarte Nosedá.

À D. Marilza pela dedicação ao curso e disposição em ajudar.

À CAPES, Fundação Araucária e PRONEX-Carboídratos pelo suporte financeiro.

À todos que por ventura esqueci de mencionar, mas me ajudaram nessa caminhada.

“Peçam e receberão; procurem e acharão; batam e a porta se abrirá. Porque todos aqueles que pedem recebem; aqueles que procuram acham; e a porta se abre para quem bate... Vocês, mesmo sendo maus, sabem dar coisas boas aos seus filhos. Quanto mais o Pai que está no céu dará coisas boas aos que lhe pedirem.”

MATEUS 7:1

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS	XIII
RESUMO	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 BASIDIOMICETOS	1
1.2 POLISSACARÍDEOS	3
1.2.1 Polissacarídeos de Basidiomicetos.....	3
1.2.1.1 Homopolissacarídeos	4
1.2.1.2 Heteropolissacarídeos	13
1.3 <i>Ganoderma</i> spp	20
1.3.1 <i>Ganoderma multiplicatum</i>	21
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE <i>Ganoderma multiplicatum</i>	23
3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO.....	23
3.2.1 Extração Clorofórmio-Metanol	23
3.2.2 Extração Aquosa.....	23
3.2.3 Extração Alcalina.....	24
3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	24
3.3.1 Precipitação de Polissacarídeos com Ácido Acético até pH 5,0.....	24
3.3.2 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo.....	24
3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos com Solução de Fehling	25
3.3.4 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração ou Diálise por Membranas .	25
3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	26
3.4.1 Composição Monossacarídica.....	26
3.4.1.1 Hidrólise ácida total.....	26
3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise.....	26

3.4.2	Teste de Homogeneidade	27
3.4.2.1	Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)	27
3.4.3	Metilação.....	27
3.4.3.1	Hidrólise dos produtos parcialmente <i>O</i> -metilados	28
3.4.4	Degradação Controlada de Smith.....	28
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	29
3.5.1	Métodos Cromatográficos.....	29
3.5.1.1	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).....	29
3.5.1.2	Cromatografia em Papel (CP)	29
3.5.2	Métodos Espectroscópicos	29
3.5.2.1	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1	EXTRAÇÃO AQUOSA a 100°C.....	32
4.2	EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 2% a 100°C.....	38
4.3	EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 10% a 100°C.....	42
4.4	EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 20% a 100°C.....	48
4.5	EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 30% a 100°C.....	49
5	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Esquema do ciclo de vida geral dos basidiomicetos	2
FIGURA 2	- Diagrama da formação de <i>clamp connections</i> em basidiomicetos	2
FIGURA 3	- Esquema da estrutura da glucana obtida para a maioria dos basidiomicetos estudados.....	5
FIGURA 4	- Esquema da estrutura da glucana obtida para <i>Auricularia auricula-judae</i> (SONE, 1978).....	6
FIGURA 5	- Esquema da estrutura da glucana obtida para <i>Ganoderma lucidum</i> (SONE et al., 1985).....	7
FIGURA 6	- Esquema da estrutura da glucana obtida a partir de esporos <i>Ganoderma lucidum</i> (BAO et al., 2001).....	8
FIGURA 7	- Esquema da estrutura da glucana obtida para <i>Agaricus blazei</i> (DONG et al., 2002).....	8
FIGURA 8	- Esquema da estrutura da manufucogalactana obtida para a maioria dos basidiomicetos.....	13
FIGURA 9	- Esquema da estrutura da manogalactana parcialmente metilada obtida do corpo de frutificação de <i>Pleurotus</i> spp.....	14
FIGURA 10	- Esquema estrutural da fucoxilomanana isolada de <i>Polyporus pinicola</i> (AXELSSON; BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969) e <i>Fomes annosus</i> (AXELSSON et al., 1971).....	15
FIGURA 11	- Esquema estrutural da fucoxilomanana isolada de <i>Ganoderma lucidum</i> (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1982).....	15
FIGURA 12	- Esquema estrutural da xilomanana isolada do micélio de <i>Armillaria mellea</i> (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967).....	16
FIGURA 13	- Foto do basidiomiceto <i>G. multiplicatum</i> (cedida pelo Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado- CESUMAR).....	21
FIGURA 14	- Fluxograma dos processos de extração dos polissacarídeos do corpo de frutificação de <i>Ganoderma multiplicatum</i>	31
FIGURA 15	- Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extrações aquosas.....	32
FIGURA 16	- Perfil eluição da fração SW (solubilizada em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtido por HPSEC.....	33
FIGURA 17	- Perfil de eluição das frações 10RSFW (A) e 10ESFW (B) (solubilizada em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtido por HPSEC.....	34
FIGURA 18	- Espectro de RMN - ¹³ C da fração 10ESFW (em D ₂ O a 50°C) obtida de <i>G. multiplicatum</i>	35
FIGURA 19	- Perfil de eluição das frações PFW (solubilizada em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtido por HPSEC.....	36
FIGURA 20	- Perfil de eluição das frações 300RPFW (A), 300EPFW (B), 30EPFW (C) e 30RPFW (D) obtido por HPSEC.....	37
FIGURA 21	- Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 2%.....	38
FIGURA 22	- Perfil de eluição das frações SFK2 (A), 300ESFK2 (B), 10RSFK2 (C) e 10ESFK2 (D) obtido por HPSEC.....	39
FIGURA 23	- Espectros de RMN- ¹³ C das frações 10RSFK2 (A) e 10ESFK2 (B) (em D ₂ O a 30°C) obtidas de <i>G. multiplicatum</i>	40

FIGURA 24	- Espectro de RMN- ¹³ C-DEPT da fração 10ESFK2 (em D ₂ O a 30°C) obtida de <i>G. multiplicatum</i>	41
FIGURA 25	- Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 10%.....	43
FIGURA 26	- Perfil eluição da fração PFK10 (solubilizada em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtido por HPSEC.....	43
FIGURA 27	- Espectros de RMN- ¹³ C das frações 30RPFK10 (A) e 30EPFK10 (B) em D ₂ O (50°C) obtidas de <i>G. multiplicatum</i> . Os insertos correspondem aos sinais referentes ao grupamento $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ das unidades de fucose.....	44
FIGURA 28	- Região anomérica do espectro de RMN- ¹³ C acoplado da fração 30EPPF5 em D ₂ O (50°C) obtida de <i>G. multiplicatum</i>	45
FIGURA 29	- Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 20% a 100°C.....	48
FIGURA 30	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração P5K20 (laminarana) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70°C) obtida de <i>G. multiplicatum</i>	48
FIGURA 31	- Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 30%.....	49
FIGURA 32	- Perfil de eluição da fração SFK30 (solubilizada em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtido por HPSEC.....	50
FIGURA 33	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração 300ESFK30 em D ₂ O (50°C) obtida de <i>G. multiplicatum</i>	51
FIGURA 34	- Espectro de RMN- ¹³ C-DEPT da fração 300ESFK30 em D ₂ O (50°C) obtida de <i>G. multiplicatum</i>	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Glucanas isoladas de basidiomicetos	10
TABELA 2	- Heteropolissacarídeos isolados de basidiomicetos.....	17
TABELA 3	- Composição monossacarídica das frações PFW e SFW obtidas de <i>G. multiplicatum</i>	33
TABELA 4	- Composição monossacarídica das frações 300EPFW, 30RPFW e 30EPFW obtidas de <i>G. multiplicatum</i>	36
TABELA 5	- Análise por metilação da fração 10ESFK2 obtida de <i>G. multiplicatum</i>	41
TABELA 6	- Composição monossacarídica das frações PFK10, 30RPFK10 e 30EPFK10 obtidas de <i>G. multiplicatum</i>	44
TABELA 7	- Análise por metilação da fração 30EPFK10 obtida de <i>G. multiplicatum</i>	46
TABELA 8	- Análise por metilação das frações 300ESFK30 e S300ESF obtida de <i>G. multiplicatum</i>	52

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

α	- Alfa
β	- Beta
μl	- Microlitro
μm	- Micrometro
\sim	- Aproximadamente
^{13}C	- Carbono treze
3-O-MeGal	- 3-O-metil-galactopiranosose
Ac_2O	- Anidrido acético
AcOH	- Ácido acético
Ag_2CO_3	- Carbonato de prata
AgNO_3	- Nitrato de prata
BaCO_3	- Carbonato de bário
CH_3I	- Iodeto de metila
CHCl_3	- Clorofórmio
CuSO_4	- Sulfato de cobre
d.i.	- Diâmetro interno
D_2O	- Óxido de deutério
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- Glucose
GlcA	- Ácido glucurônico
h	- Hora
H_2O	- Água
H_2SO_4	- Ácido sulfúrico
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)
Hz	- Hertz
IR	- Índice de refração
J	- Constante de acoplamento
kDa	Kilodaltons
KOH	- Hidróxido de potássio
M	- Molar
Man	- Manose
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	- Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	- Metanol
mg	Miligrama
min	- Minuto

ml	-	Mililitros
NaB^2H_4	-	Boroidreto de sódio deuterado
NaBH_4	-	Boroidreto de sódio
NaIO_4	-	Periodato de sódio
NaN_3	-	Azida de sódio
NaNO_2	-	Nitrito de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
<i>p</i>	-	Piranosídico
p/v	-	Peso/volume
pH		Potencial hidrogeniônico
ppm	-	Partes por milhão
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	-	Rotações por minuto
TFA	-	Ácido trifluoracético
v/v	-	Volume/volume
Xyl	-	Xilose

RESUMO

O corpo de frutificação do basidiomiceto *Ganoderma multiplicatum* seco, moído e deslipidificado foi submetido a extrações aquosas e alcalinas (KOH a 2, 10, 20 e 30%). O extrato aquoso foi primeiramente submetido a precipitação com etanol, enquanto que os extratos alcalinos foram submetidos a precipitação com adição de ácido acético até ~ pH 5,0. Os extratos obtidos foram submetidos aos processos de purificação por congelamento e degelo, precipitação com solução de Fehling e por ultrafiltração e diálise em membranas de diferentes porosidades, respectivamente. A partir destes processos foram purificadas e caracterizadas diferentes estruturas. As frações 10ESFW e 10RSFW, obtidas por extração aquosa, apresentaram-se homogêneas quando analisadas por HPSEC e compostas principalmente por glucose. O espectro de RMN-¹³C apresentou sinais na região anomérica em δ 102,7 e 102,3 correspondentes ao C-1 sugerindo configuração glicosídica do tipo β . Além destes, também foi observado sinais pouco intensos em δ 100,3 e 97,7 correspondentes ao C-1, provavelmente, em configuração do tipo α . Estes dados sugerem a presença de uma glucana apresentando unidades em α e β configuração. A fração eluída (30EPFW) e a fração retida (30RPFW) apresentaram fucose, xilose e manose como principais monossacarídeos, sugerindo tratar-se de uma fucoxilomanana. As frações 10ESFK2 e 10RSFK2, obtidas a partir do sobrenadante de Fehling (SK2) da extração com KOH 2%, apresentaram-se homogêneas e glucose como principal monossacarídeo. Os dados obtidos por RMN-¹³C, DEPT e análise de metilação sugerem a presença de uma β -glucana ramificada contendo, principalmente, ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Também pode ser observado unidades ligadas (1 \rightarrow 4). A partir da extração com KOH 10% foi isolada uma xilomanana (30RPFP5 e 30EPFP5). As análises de metilação, juntamente com os dados de RMN-¹³C, sugerem um heteropolissacarídeo ramificado contendo uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 4) e parcialmente substituída em O-3 por terminais não redutores de β -Xylp. Uma glucana linear com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3), denominada de laminarana, foi obtida por extração com KOH 20%. Além destas estruturas, foi isolada, da extração com KOH 30%, uma β -glucana ramificada contendo uma cadeia principal com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) a qual encontra-se substituída em O-6 apenas por unidades de β -Glc p-(1 \rightarrow 4)- ligadas. Estes dados foram confirmados por análises de metilação, degradação controlada de Smith e RMN-¹³C.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BASIDIOMICETOS

Os fungos compreendidos no filo *Basidiomycota* são chamados de basidiomicetos e popularmente conhecidos como cogumelos, orelhas de pau, bolores, “bufa de lobo”, trufas, mofos, entre outros. Esta classe de fungos abrange aproximadamente 15.000 espécies, dentre as quais podemos citar os mais conhecidos mundialmente, *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), *Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp. e *Lentinus edodes* (shiitake) (PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L., 1998).

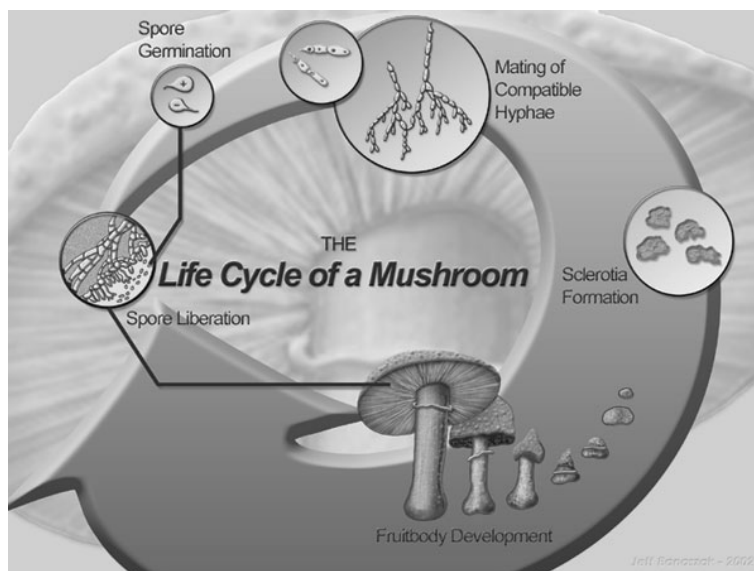
Neste Filo está reunido o que há de mais evoluído dentre os organismos do Reino Fungi (PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L., 1998). Devido a grande variedade deste grupo é muito difícil identificar qualquer característica morfológica que seja única e constante.

CHANG e MILES (1992) definiram cogumelos como “macrofungos com um distinto corpo de frutificação, os quais podem ser tanto hipogeo quanto epigeo, grande o bastante para ser visto a olho nu e ser pego com as mãos”.

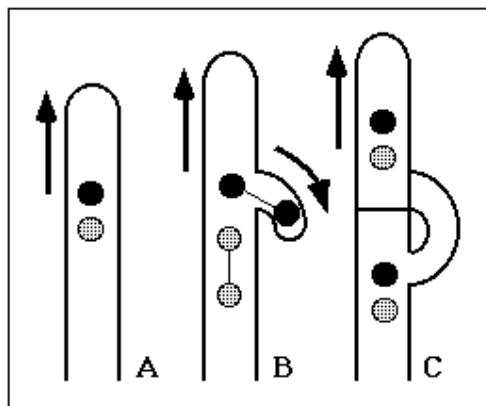
Apesar deste grupo ser muito abundante e ser representado por um grande número de espécies sua exploração comercial é pequena no Brasil (PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L., 1998).

Os basidiomicetos são caracterizados por produzirem esporos sexuais, denominados de basidiosporos, e uma estrutura microscópica especializada para esta função, o basídio. Estes esporos podem ser liberados violentamente, sendo denominados de balitosporos ou serem liberados passivamente. A maioria das espécies forma uma estrutura macroscópica, com hifas modificadas que originam pseudotecidos, denominados de basidioma ou corpo de frutificação. Alguns basidiomicetos podem formar uma estrutura de resistência em condições desfavoráveis as quais podem ficar dormentes por longos períodos. Esta estrutura é denominada de esclerócio (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Estas estruturas formam o ciclo de vida geral dos basidiomicetos (Figura 1).

FIGURA 1 - Esquema do ciclo de vida geral dos basidiomicetos



O micélio, o qual é formado por muitos filamentos septados chamados de hifas, denomina a fase vegetativa dos basidiomicetos. Estes septos podem ser simples ou possuírem *clamp connections* (Figura 2), sendo esta uma estrutura característica do micélio secundário e está envolvida na manutenção de condições dicarióticas. Estas estruturas garantem a localização de um núcleo de cada tipo nas células filhas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Sendo que a classificação taxonômica deste grupo é baseada na morfologia macro e microscópica do basidioma.

FIGURA 2 – Diagrama da formação de *clamp connections* em basidiomicetos

Por milênios, cogumelos têm sido valiosos para a humanidade como recursos comestíveis e medicinais. Um grande número de moléculas ativas, incluindo substâncias antitumorais, têm sido identificadas em muitas espécies de cogumelos.

Cogumelos como *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga) e muitos outros têm sido coletados e usados por milhares de anos na Coreia, China, Japão e leste da Rússia. Estas práticas formam a base dos modernos estudos científicos de atividades medicinais dos fungos (WASSER, 2002).

Historicamente, frações solúveis em água quente (decoctos e essências) de cogumelos medicinais são utilizados na medicina oriental, onde o conhecimento e prática do uso dos cogumelos foram primariamente originados (WASSER, 2002). Atualmente, muitas culturas em todo o mundo reconhecem que extratos de certos cogumelos podem ter muitas atividades benéficas para a saúde (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002; WASSER; WEIS, 1999).

O conhecimento da composição química de cogumelos é importante tanto para prevenir sua expansão, quanto para estimular seu crescimento. Estudos envolvendo algumas cepas de *Agaricus blazei* mostraram a presença de produtos no material seco, sendo composto por 41,3% de proteínas e 45,8% de carboidratos e somente 1,6% de gordura. Já a parede celular consiste majoritariamente de polissacarídeos (89%) e proteínas (3%) e em menor quantidade gorduras, minerais e pigmentos (MOHAČEK-GROŠEV; BOŽAC; PUPPELS, 2001).

1.2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são as macromoléculas mais abundantes em alguns materiais biológicos. Os mais conhecidos são a celulose, amido e seus derivados; quitina e gomas extraídas de vegetais e algas. Desempenham papel estrutural, energético, de adesão e proteção. Esta ampla gama de finalidades deve-se à estrutura química dos polímeros de carboidratos, que permitem grande variabilidade molecular. Esta variabilidade estrutural fornece a flexibilidade necessária para os complexos

mecanismos regulatórios de várias interações célula-célula em organismos superiores (OOI; LIU, 2000).

Polissacarídeos e complexos polissacarídeo-proteínas são importantes biopolímeros usados em diferentes aplicações, tais como aditivos alimentares e farmacêuticos. Devido a isso, informações sobre isolamento, estrutura química, propriedades físico-químicas e bioatividades sobre estes polímeros são essenciais para pesquisas futuras e aplicação destes polissacarídeos (PENG; ZHANG, 2003).

A parede celular de fungos, geralmente é formada por celulose e/ou quitina e outros polissacarídeos, principalmente glucanas. Sendo que a classe *Basidiomicetos* não possui celulose na sua parede celular, sendo esta composta de 33% de quitina, 50% de outros polissacarídeos e 10% de proteínas (GRIFFIN, 1994).

1.2.1 Polissacarídeos de Basidiomicetos

Polissacarídeos de fungos, principalmente de basidiomicetos, têm sido amplamente estudados devido as suas atividades antitumorais, antivirais, anticoagulantes, entre outras (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002). Estas estruturas podem ser isoladas do corpo de frutificação, do esclerócio, do micélio ou de exopolissacarídeos provenientes das culturas em laboratório destes organismos.

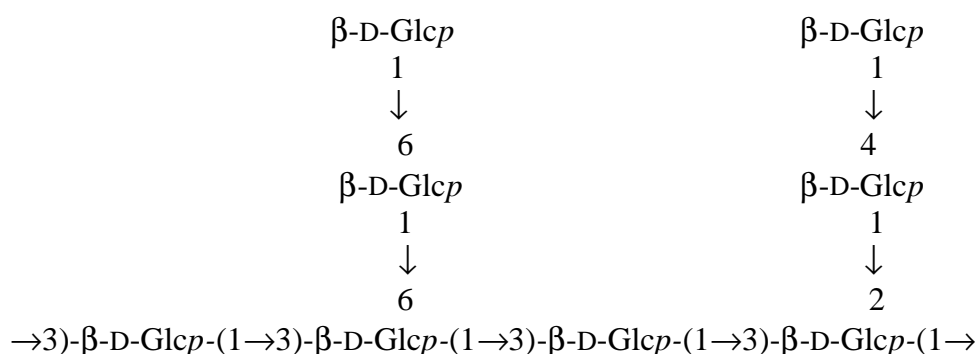
A atividade antitumoral é exibida por uma grande classe de glicanos, a qual se estende de homopolímeros até heteropolímeros complexos. Estas diferenças na atividade podem estar correlacionadas com a solubilidade em água, tamanho das moléculas, proporção de ligação e forma. Devido a estes fatores, torna-se difícil correlacionar a estrutura e a atividade antitumoral de polissacarídeos complexos (WASSER, 2002; JONG; DONOVICK, 1989).

1.2.1.1 Homopolissacarídeos

As glucanas são os homopolissacarídeos mais frequentemente encontrados em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas (Tabela 1).

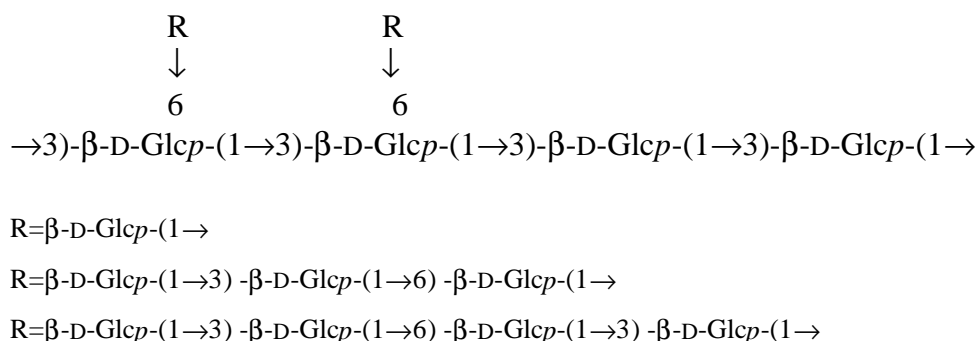
Um estudo detalhado sobre a estrutura de polissacarídeos isolados do corpo de frutificação e do micélio de *Ganoderma lucidum*, sugere uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- ligadas, sendo substituída em O-6 por unidades de Glcp ou pelo grupo dissacarídico 6-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp e em O-2 pelo dissacarídeo 4-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp. O grau de substituição e os grupos constituintes variam de acordo com os tipos de extrações, aquosa a frio e a quente, álcali a frio e a quente (Figura 5), sendo que as estruturas provenientes das extrações aquosas apresentam um maior grau de substituição do que aquelas obtidas por extrações alcalinas (SONE et al., 1985).

FIGURA 5 - Esquema da estrutura da glucana obtida para *Ganoderma lucidum* (SONE et al., 1985)



BAO et al. (2001a) estudando polissacarídeos isolados de esporos de *Ganoderma lucidum*, descreveram uma β -glucana complexa com cadeia principal contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3), a qual apresenta-se ramificada em O-6 por diferentes substituintes. Estes podem ser apenas uma unidade de Glcp, ou cadeias laterais de diferentes tamanhos formadas por unidades de β -D-Glcp contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) (Figura 6).

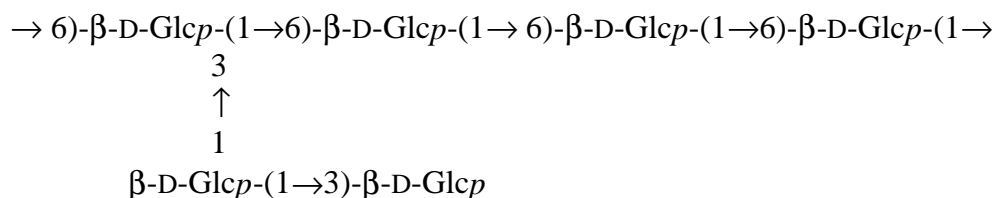
FIGURA 6 - Esquema da estrutura da glucana obtida a partir de esporos *Ganoderma lucidum* (BAO et al., 2001a)



Diferentemente das estruturas descritas anteriormente, estudos realizados a partir do corpo de frutificação de *Grifora umbellata* sugerem uma β -glucana com ligações (1 \rightarrow 3) ramificada em O-6 por cadeias de β -D-Glcp contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) (MIYAZAKI et al., 1979).

β -Glucanas com cadeia principal composta por ligações (1 \rightarrow 6) também foram descritas para basidiomicetos. MIZUNO et al. (1995) estudando extratos provenientes do corpo de frutificação de *Tricholoma giganteum* isolou um polímero com cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- ligadas, apresentando ramificações em O-3 por uma única unidade de glucose. Em *Polyporus confluens* esta mesma estrutura também foi descrita, tanto para extratos provenientes do corpo de frutificação, quanto para o micélio (MIZUNO et al., 1992). DONG et al. (2002) estudando extratos aquosos do corpo de frutificação de *Agaricus blazei* isolaram uma glucana também composta pela mesma cadeia principal, porém ramificada em O-3 pelo dissacarídeo 3-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp (Figura 7).

FIGURA 7 - Esquema da estrutura da glucana obtida para *Agaricus blazei* (DONG et al., 2002)



Polissacarídeos ácidos também foram descritos para algumas espécies de basidiomicetos. Para o corpo de frutificação de *Lyophyllum decastes* Sing. foi descrita uma β -glucana ácida ramificada contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 6) (UKAWA; ITO; HISAMATSU, 2000). Uma β -D-glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) contendo 4,5% de ácido glucurônico foi obtida a partir de extratos do corpo de frutificação de *Agaricus blazei* (MIZUNO et al., 1990a) e *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971).

β -Glucanas lineares foram descritas para alguns basidiomicetos. Em *Agaricus blazei* uma β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- ligada foi caracterizada (MIZUNO et al., 1990b; KAWAGASHI et al., 1989). Porém, β -glucana ligada (1 \rightarrow 3) são mais comumente encontradas, como por exemplo, em *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI et al., 2004), *Armillaria mellea* (FRASER; LINDBERG, 1967) e *Ganoderma tsugae* (WANG et al., 1993).

α -Glucanas também foram descritas para alguns cogumelos. MIZUNO et al. (1986) estudando o corpo de frutificação de *Grifora frondosa*, descreveram uma α -D-glucana ácida e uma α -D-glucana contendo uma cadeia principal formada por ligações (1 \rightarrow 4), sendo substituída em O-6 por terminais não redutores de α -D-Glcp. Em um estudo sobre atividade antitumoral de polissacarídeos de *Tricholoma giganteum* os autores citam uma α -D-glucana contendo ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6), porém não há detalhes sobre a estrutura (MIZUNO et al., 1986). Esta mesma estrutura também foi descrita para *Astraeus hygrometricus* (CHAKRABORTY et al., 2004). Em *Termitomyces eurhizus* duas α -glucanas foram isoladas: uma contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 3) (2,5:1) e uma linear apenas com ligações do tipo (1 \rightarrow 6) (MONDAL et al., 2004). Uma α -D-glucana ácida, contendo ligações (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 4), com 5,2% de ácido glucurônico foi isolada do corpo de frutificação de *Agaricus blazei* (MIZUNO et al., 1990a). Uma α -glucana linear contendo ligações (1 \rightarrow 3) foi isolada de esporos de *Ganoderma lucidum* (BAO et al., 2001a).

Além das glucanas citadas, outro homopolímero descrito para *Pleurotus sajor-caju* foi uma β -xilana. Porém os autores não concluem o tipo de ligação, citando apenas que as ligações podem ser (1 \rightarrow 3) ou (1 \rightarrow 4) (ZHUANG et al., 1993).

TABELA 1 - GLUCANAS ISOLADAS DE BASIDIOMICETOS

BASIDIOMICETO	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Agaricus blazei</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1→6)	Linear	MIZUNO et al., 1990b; KAWAGASHI et al., 1989.
<i>Agaricus blazei</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Glcp-(1→6) (1→4)	Apresenta 5,2% de ácido glucurônico	MIZUNO et al, 1990a
	β -D-Glcp-(1→3) (1→6)	Apresenta 4,5% de ácido glucurônico	
	β -D-Glcp-(1→6) (1→3)		
<i>Agaricus blazei</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1→6)	Substituição em O-3 a cada três resíduos por 3-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp	DONG et al., 2002.
<i>Astraeus hygrometricus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Glcp-(1→4)- β -D-Glcp-(1→6)	Linear	CHAKRABORTY, et al., 2004
<i>Armillaria mellea</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1→3)	Linear	FRASER; LINDBERG, 1967
<i>Armillaria mellea</i> (Micélio)	β -D-Glcp-(1→3)	Linear	BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967
<i>Auricularia auricula-judae</i> (Corpo de Frutificação)	β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 2 unidades da cadeia principal	MISAKI et al., 1981; SONE, KAKUTA; MISAKI, 1978
	β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp e por cadeias curtas de β -D-Glcp-(1→6) (Substituição de três unidades a cada quatro unidades da cadeia principal).	
	β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	
<i>Boletus erythropus</i> (Corpo de Frutificação)	β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	CHAUVEAU et al., 1996
<i>Diccyophora indusiata</i> (Corpo de Frutificação)	β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 7 unidades da cadeia principal	HARA et al., 1982
<i>Fomes annosus</i> (Corpo de Frutificação)	Glucuronoglucana	A estrutura não é detalhada	AXELSSON et al., 1971

TABELA 1 - GLUCANAS ISOLADAS DE BASIDIOMICETOS

(continuação)

BASIDIOMICETO	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Ganoderma appplanatum</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	USUI et al., 1981.
<i>Ganoderma japonicum</i> (Corpo de Frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 30 unidades da cadeia principal	UKAI et al., 1982
<i>Ganoderma lucidum</i> (Esporos)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp e por cadeias laterais de diferentes tamanhos de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6)- ligadas.	BAO et al., 2001 (b)
<i>Ganoderma lucidum</i> (Corpo de frutificação e micélio)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp ou pelo dissacarídeo 6-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp e substituída em O-2 pelo dissacarídeo 4-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp	SONE et al., 1985.
<i>Grifora frondosa</i> (Corpo de frutificação cultivado)	α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)	Substituição em O-6 por unidades de α -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	MIZUNO et al., 1986
	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp	
	α -D-glucana ácida	A estrutura não é detalhada	
	β -D-glucana ácida	A estrutura não é detalhada	
<i>Grifora frondosa</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	KATO et al., 1983a; KATO et al., 1983b
<i>Grifora umbellata</i> (Esclerócio)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Apresenta também ligações β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6), porém a estrutura não está totalmente determinada.	KATO et al., 1978.
<i>Grifora umbellata</i> (Esclerócio)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	UENO et al., 1980; UENO et al., 1982
<i>Grifora umbellata</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por cadeias curtas de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)	MYAZAKI et al., 1979
	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	
	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por cadeias curtas de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 4)	
<i>Hohenbuehelia serotina</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp	MA; MIZUNO; ITO al., 1991

TABELA 1 - GLUCANAS ISOLADAS DE BASIDIOMICETOS

(conclusão)

BASIDIOMICETO	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Linear	ALQUINI et al., 2004
<i>Leninus edodes</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 5 unidades da cadeia principal. Ligações β -D-(1 \rightarrow 6) internas podem estar presentes	SASAKI; TAKASURA, 1976.
<i>Lyophyllum decastes</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) ácida	Apresenta pontos de ramificação.	UKAWA et al., 2000.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	YOSHIOKA et al., 1985
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal. Contém pequenas proporções de ligações (1 \rightarrow 6)- e (1 \rightarrow 4)- nas unidades interiores, porém a localização precisa destas ligações não foi determinada.	KARÁCSONYI; KUNIAK, 1994.
<i>Polyporus confluentis</i> (Corpo de frutificação e micélio)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Não detalha a cadeia Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp	MIZUNO et al., 1992
<i>Schizophyllum commune</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal	TABATA; ITO; KOJIMA, 1981
<i>Termitomyces eurhizus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) α -D-Glcp- (1 \rightarrow 6)	Proporção das ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) = 2,5:1 Linear	MONDAL et al., 2004
<i>Tricholoma giganteum</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6) β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Linear	MIZUNO et al., 1995
<i>Volvarella volvacea</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-3 a cada três resíduos por β -D-Glcp Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 5 unidades da cadeia principal. Ligações β -(1 \rightarrow 6) podem estar presente internamente Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 2 unidades da cadeia principal.	MISAKI et al., 1986

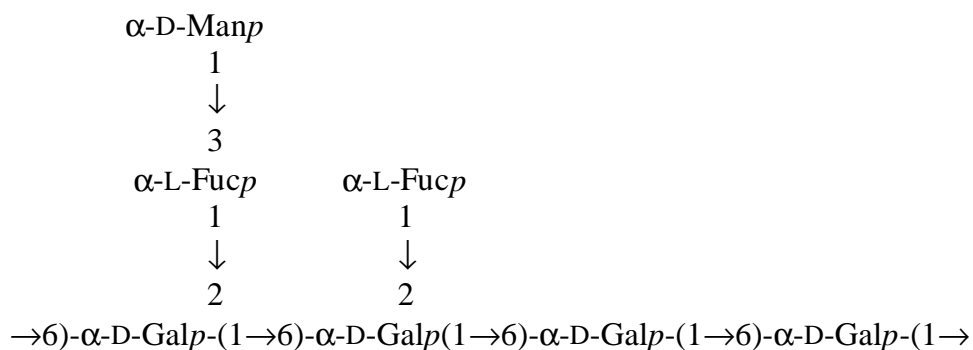
1.2.1.2 Heteropolissacarídeos

Dentre os heteropolissacarídeos mais comuns em Basidiomicetos estão as heterogalactanas, sendo a maioria formada por uma cadeia principal de α -D-Galp-(1 \rightarrow 6) contendo diferentes substituintes, principalmente por fucose e/ou manose (Tabela 2).

Um dos primeiros estudos descrevendo as heterogalactanas foi realizado por BHAVANANDAN, BOUVENG e LINDBERG (1964) a partir do corpo de frutificação de *Polyporus giganteus*. Estes autores descreveram um polissacarídeo com cadeia principal β -D-Galp-(1 \rightarrow 6) substituída em O-2 pelo grupo dissacarídico 3-O- β -D-Manp- β -L-Fucp.

A partir de diferentes Basidiomicetos, tais como, *Polyporus fomentarius* (Fr.), *Polyporus igniarius* (Fr.) (BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969), *Ganoderma applanatum* (USUI; IWASAKI; MIZUNO, 1981), *Armillaria mellea* (FRASER; LINDBERG, 1967) e *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1977) foi isolado um polissacarídeo composto por uma cadeia principal constituída por α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- ligada sendo esta substituída em O-2 por L-Fucp e pelo dissacarídeo 3-O- β -D-Manp- β -L-Fucp (Figura 8). Em *P. fomentarius* (Fr.) e *P. igniarius* (Fr.) também foi descrito uma heterogalactana com cadeia principal de α -D-Galp-(1 \rightarrow 6), porém substituída em O-2 por unidades de terminais não redutoras de α -L-Fucp e D-Galp (BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969).

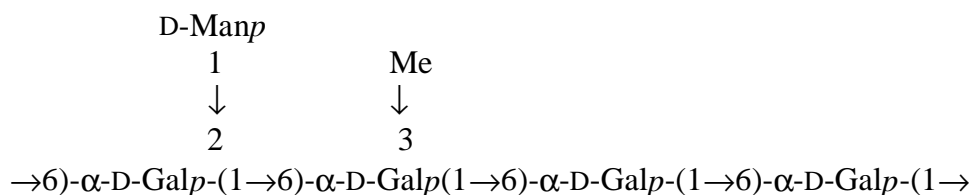
FIGURA 8 - Esquema da estrutura da manufucogalactana obtida para a maioria dos basidiomicetos



ALQUINI et al. (2004) reportaram uma estrutura similar às descritas anteriormente, porém, além dos grupos substituintes citados, este polímero é substituído por unidades únicas de α -D-Man_p.

Heteropolissacarídeos naturalmente metilados também foram descritos (Figura 9). Um polímero formado por uma cadeia principal constituído por unidades de α -D-Galp e 3-O-Me-Galp contendo ligações do tipo (1→6), podendo ser substituída em O-2 por terminais não redutores de β -D-Man_p foi encontrado em *Pleurotus ostreatus* (JAKOVLJEVIC et al., 1998). ROSADO et al. (2003) estudando polissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* “florida” e *P. ostreaturoseus* descreveram uma estrutura similar, porém as unidades da cadeia principal são substituídas em O-2 por unidades de α -D-Man e sugerem que a presença de grupos metil pode ser uma característica do gênero *Pleurotus*.

FIGURA 9- Esquema da estrutura da manogalactana parcialmente metilada obtida do corpo de frutificação de *Pleurotus* spp.



Além dos heteropolímeros descritos anteriormente, como as heterogalactanas, outros polissacarídeos isolados do corpo de frutificação de basidiomicetos foram estudados, dentre estes encontram-se as xilomananas e as fucoxilomananas. Estas estruturas apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de manopiranosose com diferentes tipos de ligações e grupos substituintes.

A partir de estudos realizados com *Polyporus pinicola* (AXELSSON; BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969) e *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971) foi descrito uma fucoxilomanana contendo uma cadeia principal composta por unidades de β -Man_p ligadas (1→3) e substituída em O-4 por cadeias laterais de 2-

O- α -L-Fucp- β -D-Xylp (Figura 10). Uma estrutura similar (Figura 11) foi isolada de *Ganoderma lucidum*, porém a cadeia principal é composta por ligações do tipo (1 \rightarrow 4), substituída em O-3 por cadeias laterais de 4-*O*-L-Fucp-D-Xylp (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1982).

FIGURA 10 - Esquema estrutural da fucoxilomanana isolada de *Polyporus pinicola* (AXELSSON; BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969) e *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971)

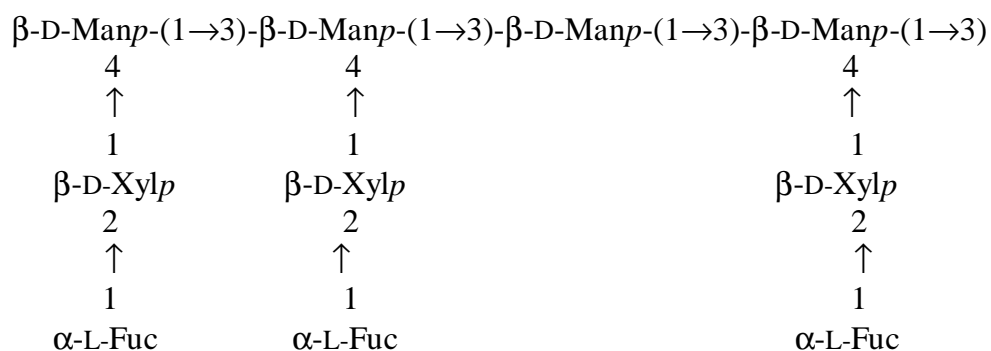
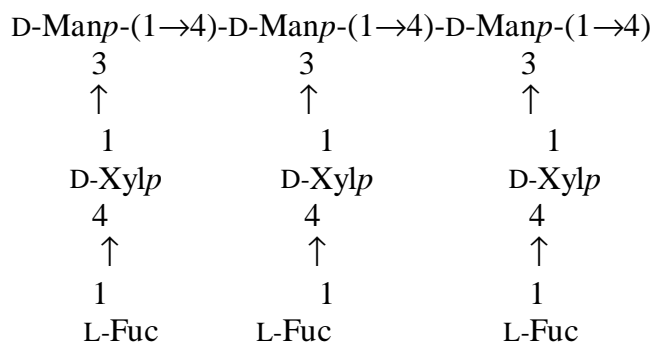


FIGURA 11 - Esquema estrutural da fucoxilomanana isolada de *Ganoderma lucidum* (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1982)

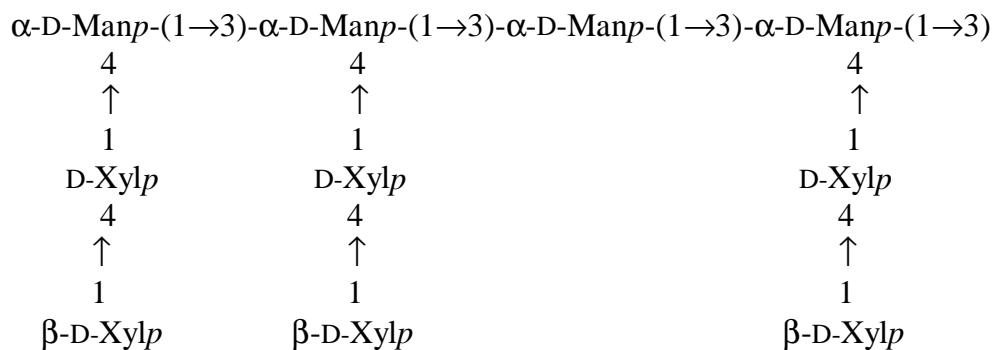


No micélio de *Armillaria mellea* foi isolado uma xilomanana (Figura 12) contendo uma cadeia principal com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3), substituída em O-4 por cadeias laterais de 4-*O*- β -D-Xylp-D-Xylp (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967).

Esta mesma estrutura foi isolada do micélio de *Polyporus tumulosus* (ANGYAL; BENDER; RALPH¹, citado por BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983).

Exopolissacarídeos produzidos por basidiomicetos do gênero *Tremella* (Tabela 2) também apresentaram estruturas com a mesma cadeia principal, porém contendo substituintes ácidos, além de Xylp e Fucp.

FIGURA 12 - Esquema estrutural da xilomanana isolada do micélio de *Armillaria mellea* (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967)



¹ ANGYAL, S. J.; BENDER, V. J.; RALPH, B. J. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 362, p. 175-187, 1973.

TABELA 2 - HETEROPOLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS

BASIDIOMICETO	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Agaricus blazei</i> (Micélio)	β -D-Manp-(1 \rightarrow 2)	Substituição em O-6 por cadeias de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3). Estrutura altamente substituída.	MIZUNO et al., 1999.
<i>Armillaria mellea</i> (Micélio)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-4 pelo grupo dissacarídico 4-O- β -D-Xilp-D-Xilp	BOUVENG, FRASER; LINDBERG, 1967
<i>Armillaria mellea</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de L-Fucp e pelo grupo dissacarídico 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	FRASER; LINDBERG, 1967
<i>Flammulina velutipes</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de α -L-Fucp e pelo grupo dissacarídico 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp (3:1)	MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1977
<i>Fomes annosus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de α -L-Fucp	AXELSSON et al., 1971
<i>Fomitella fraxinea</i> (Corpo de frutificação)	β -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-3 pelo grupo dissacarídico 4-O- α -D-Xilp-D-Xilp	CHO et al., 1998
<i>Ganoderma applanatum</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 pelo grupo dissacarídico 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	USUI et al., 1981.
<i>Ganoderma lucidum</i> (Corpo de frutificação)	(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp Arabinoxiloglucana	Substituição em O-2 apenas por unidades de L-Fucp Cadeia principal e cadeias laterais constituídas por Glcp contendo ligações do tipo α - e β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 6) e β -(1 \rightarrow 3). A arabinose e xilose podem estar presentes como terminais não redutores	MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1981
<i>Ganoderma lucidum</i> (Corpo de frutificação)	D-Manp-(1 \rightarrow 4)	Substituição em O-3 pelo grupo dissacarídico 4-O-L-Fucp-D-Xylp.	MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1982
<i>Hericum erinaceus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de 4-O-Gal-L-Fucp, 3-O-Glcp-Glcp e por 6-O-Gal-L-Glcp	WANG; LUO; LIANG, 2004
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de L-Fucp, α -D-Manp e 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	ALQUINI et al., 2004
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de α -D-Manp e em O-3 por grupos metil.	ROSADO et al., 2003

TABELA 2 - HETEROPOLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS

(continuação)

BASIDIOMICETO	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Exopolissacarídeo)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 4) e 3-O-Linear Me-Galp-(1 \rightarrow 4) α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)	Substituição em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos de α -D-Manp-(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2)-ligadas	ROSADO et al., 2002
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6) e 3-O-Me-Galp (1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades terminais não redutoras de β -D-Manp	JAKOVLEVIC et al., 1998
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6) e 3-O-Me-Galp (1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de α -D-Manp	ROSADO et al., 2003
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Corpo de frutificação)	β -Xiloglucana	Contém pequenas proporções de manose, porém a estrutura não é detalhada.	ZHUANG et al., 1993
	β -Manogalactana	Contém pequenas proporções de xilose, porém a estrutura não é detalhada.	
	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	Substituída por xilose	
<i>Polyporus fomentarius</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de L-Fucp, D-Galp e 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	BJORNDAL; LINDBERG, 1969
<i>Polyporus giganteus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	BHAVANADAN, BOUVENG; LINDBERG,1964
<i>Polyporus igniarius</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de L-Fucp, D-Galp e 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	BJORNDAL; LINDBERG, 1969
<i>Polyporu ovinus</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-2 por unidades de α -L-Fucp (25% da cadeia principal é substituída).	AXELSSON; BJÖRNDAL, 1969
<i>Polyporus piniicola</i> (Corpo de frutificação)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-4 pelo grupo dissacarídico 2-O- α -L-Fucp- α -D-Xilp	AXELSSON; BJÖRNDAL; LINDBERG,1969

TABELA 2 - HETEROPOLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS

(conclusão)

BASIDIOMICETO	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Tremella aurantia</i> ² (Exopolissacarídeo)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-2 e/ou O-4 pelo grupo dissacarídico 3-O- β -D-Xilp- α -D-Xilp e em O-2 pelo dissacarídeo 4-O- α -D-Manp- β -D-GlcAp	BAETS; VANDAMME, 2001
<i>Tremella fuciformis</i> ³ (Corpo de frutificação)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-2 pelo grupo dissacarídico 2-O- β -D-Xilp- β -D-Xilp e por terminais não redutores de β -D-GlcAp, β -D-Manp e L-Fucp	BAETS; VANDAMME, 2001
<i>Tremella fuciformis</i> ³ (Exopolissacarídeo)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-2 pelo grupo dissacarídico 2-O- β -D-Xilp- β -D-Xilp e por terminais não redutores de β -D-GlcAp e de β -D-Xilp	BAETS; VANDAMME, 2001
<i>Tremella mesenterica</i> (Exopolissacarídeo)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-2 por 6-O-Ac- α -Manp-(1 \rightarrow 4)- β -GlcAp-(1 \rightarrow e 3/4-O-Ac- β -GlcA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow e em O-4 por 6-O-Ac- α -Manp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow	VINOGRADOV et al., 2004
<i>Tremella mesenterica</i> ⁴ (Exopolissacarídeo)	α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)	Substituição em O-2 por cadeias curtas de β -D-Xylp-(1 \rightarrow 2) e terminais não redutores de β -D-GlcAp	BAETS; VANDAMME, 2001

² KIHU, T.; KOBAYASHI, T.; MORIMOTO, H.; USUI, S.; UKAI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Structural features of an antidiabetic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 8, p. 1793-1795, 2000.

³ KAKUTA, M.; SONE, Y.; UMEDA, T.; MISAKI, A. Comparative structural studies on acidic heteropolysaccharides isolated from “Shirokikurage”, fruit body of *Tremella fuciformis* Berk, and the growing culture of its yeast-like cells. **Agricult. Biol. Chem.**, v. 43, p. 1659-1668, 1979.

⁴ FRASER C. G.; JENNINGS, H. J.; MOYNA, P. Structural analysis of an acidic polysaccharide from *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158. **Can. J. Biochem.**, v. 51, p. 219-224, 1973.

1.3 *Ganoderma* spp.

O gênero *Ganoderma* é membro da Ordem Aphyllophorales (chamados de “Poliporos”), sendo estes um grupo morfológicamente complexo de basidiomicetos terrestres.

Muitos destes fungos são saprófitos e decompositores de madeira. São tipicamente duros e apresentam uma textura amadeirada, sendo popularmente conhecidos por “orelhas de pau”.

A maioria dos poliporos absorve nutrientes da madeira morta de partes das plantas, porém alguns podem crescer em árvores vivas e causar decomposição nas partes não funcionais da madeira. Poucos destes fungos invadem o tecido condutivo das plantas, ou são micorrizas retirando nutrientes e carbono das raízes.

O gênero *Ganoderma* foi estabelecido por P. Karsten em 1881 e mais de 120 espécies foram descritas desde esta data, porém devido a grande diversidade deste grupo, sua classificação taxonômica é problemática (HUIE; DI, 2004; KIM; JUANG, 2000).

Muitos autores consideram estes organismos como a maior fonte de produtos naturais farmacologicamente ativos (ZJAWIONY, 2004). Além disso, há um grande interesse comercial destes basidiomicetos, com um aumento de sua produção mundial, devido sua capacidade de degradar material lignocelulósico (YILDIZ; KARAKAPLAN; AYDIN, 1998). São chamados de fungos de podridão branca, pois são capazes de degradar lignina e celulose. Devido a esta característica podem ser potencialmente utilizados para converter este tipo de substrato em compostos úteis, como por exemplo, moléculas com atividades farmacológicas (CROAN, 2004).

O fungo mais estudado deste gênero, *Ganoderma lucidum*, conhecido como “Lingzhi” na China, “Reishi” no Japão, “Youngzhi” na Coreia e “cogumelo Rei” no Brasil tem sido tradicionalmente usado na medicina popular principalmente no Oriente. “Lingzhi” foi citado em *Shen Nong's Herbal Classic* (considerado o livro mais antigo da medicina herbal-oriental e a fundação de medicina tradicional chinesa) para aumento da “força vital” e promotor de “longevidade”.

Durante as últimas duas décadas, pesquisas modernas têm revelado que o “Reishi” contém uma variedade de compostos químicos, como: triterpenos, polissacarídeos, nucleotídeos, esteróis, ácidos graxos, alcalóides, proteínas, peptídeos, aminoácidos e elementos inorgânicos. Dentre estes compostos, triterpenos e polissacarídeos têm recebido grande atenção por possuírem diversas e potencialmente significantes atividades farmacológicas. “Reishi” tem sido usado no tratamento de doenças crônicas, hipertensão, artrite, bronquite, asma, anorexia, gastrite, hemorróidas, diabetes, hipercolesterolemia, nefrites, dismnorréia, constipação, lupus eritematoso, hepatites e problemas cardiovasculares. Estudos recentes demonstraram atividades anti-cancerígenas, atividade antimicrobial e antiviral contra HIV (HUIE; DI, 2004; JONG; BIRMINGHAM,1992; ZHANG et al., 2003).

1.3.1 *Ganoderma multiplicatum*

Ganoderma multiplicatum (Mont.) Pat., foi descrito em 1889, porém estudos químicos não foram relatados até a presente data. Este basidiomiceto também é conhecido por *Polyporus multiplicatus* Mont. (1854). É uma espécie neotropical e apresenta uma variedade morfológica causada por condições climáticas (GOTTLIEB; WRIGHT, 1999).

FIGURA 13 – Foto do basidiomiceto *G. multiplicatum* (cedida pelo Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado)



2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral a análise estrutural de polissacarídeos isolados do basidiomiceto *Ganoderma multiplicatum*.

Os objetivos específicos foram:

- a) Realizar extrações aquosas e alcalinas com hidróxido de potássio a 2, 10, 20 e 30%;
- b) Purificar os polissacarídeos obtidos;
- c) Caracterizar estruturalmente os principais polissacarídeos isolados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE *Ganoderma multiplicatum*

Ganoderma multiplicatum (Mont.) Pat., popularmente conhecido como “orelha de pau”, foi coletado na Avenida Perimetral, em Maringá, Paraná, Brasil, pelo Prof. Dr. Fábio R. Rosado do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR). A identificação foi realizada segundo GOTTLIEB e WRIGHT (1999) e RYVARDEN (2000), em 16/09/2004, pela Dra. Adriana M. Gugliota, do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, Brasil. A exsicata encontra-se depositada no Instituto de Botânica de São Paulo sob número SP307950.

3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO

Ganoderma multiplicatum foi limpo, seco e moído. Em seguida, foi submetido aos processos seqüenciais de extração e purificação, conforme os itens descritos a seguir.

3.2.1 Extração Clorofórmio-Metanol

O material foi deslipidificado com uma mistura de solvente clorofórmio-metanol (CHCl_3 : MeOH, 2:1, v/v), sob refluxo, durante 2 ou 3 horas na temperatura de 60°C. Após este procedimento, os extratos obtidos foram filtrados a quente e evaporados até *secura* em temperatura ambiente (MACHADO et al., 1994).

3.2.2 Extração Aquosa

O material residual dos processos anteriores foi submetido a extrações aquosas em água fervente, sob refluxo, durante 3 horas. Os materiais foram filtrados com a solução ainda a quente. Sendo este procedimento realizado três vezes.

Os extratos obtidos foram reunidos e precipitados com etanol (3:1, v/v). Este material foi centrifugado e o precipitado etanólico obtido, foi dialisado em água corrente por 48 horas. Após este procedimento, a fração dialisada foi congelada e liofilizada.

3.2.4 Extração Alcalina

O material residual da extração aquosa foi tratado, sequencialmente, com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH), nas concentrações de 2, 10, 20 e 30%, em água fervente, sob refluxo, com adição de boroidreto de sódio (NaBH_4) para evitar degradação das cadeias polissacarídicas, sendo este procedimento realizado por 3 horas e repetido três vezes. Os extratos obtidos, ainda quentes, foram filtrados por algodão.

3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.3.1 Precipitação de Polissacarídeos com Ácido Acético até pH 5,0

Foi adicionado ácido acético (HOAc) nas frações provenientes das extrações alcalinas até pH 5,0, resultando, geralmente, em frações solúveis e insolúveis. Após esta metodologia, tanto os precipitados quanto os sobrenadantes foram neutralizados, dialisados contra água corrente, congelados e liofilizados (MIZUNO et al., 1986).

3.3.2 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

As frações obtidas através das extrações aquosas e as frações solúveis em pH 5,0 foram submetidas, separadamente, ao processo de purificação por congelamento e degelo. Cada fração foi solubilizada em água destilada e submetida ao processo de congelamento e posterior degelo em temperatura ambiente. Os precipitados insolúveis

em água fria foram separados dos componentes solúveis por centrifugação (9000 rpm, 15 min, 25°C). Esse processo foi repetido até que o sobrenadante aquoso não apresentasse mais precipitado por congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984).

3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos com Solução de Fehling

A solução de Fehling é formada por duas soluções distintas, denominadas de solução A e solução B. A solução A é composta por de tartarato de potássio e sódio (173 g) e KOH (125 g) em volume de água suficiente para 500 ml. A solução B é composta por 55,74 g de sulfato de cobre 5. H₂O em volume de água suficiente para 500 ml.

As frações submetidas a este procedimento foram, primeiramente, solubilizadas, em aproximadamente 10 ml da solução A, seguindo da adição de igual volume da solução B. Após intensa agitação, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas (JONES; STOODLEY, 1965).

O precipitado formado foi separado por centrifugação (9000 rpm, 15 min, 25°C). As frações obtidas (precipitado e sobrenadante) foram neutralizadas com HOAc, dialisadas contra água corrente (~ 48 horas) e tratadas com resina Dowex na forma catiônica fortemente ácida. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida, congeladas e liofilizadas.

3.3.4 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração ou Diálise por Membranas

As frações, as quais estivessem heterogêneas quando analisadas por HPSEC (item 3.4.2) após tratamento com solução de Fehling, foram submetidas a ultrafiltração em membranas de celulose regenerada ou polietersulfona com limite de exclusão de 10 kDa, 30 kDa e/ou 300 kDa (Millipore).

As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração adequado (modelo 16249, Sartorius) acoplado a um cilindro de ar comprimido (CARBONERO et al., 2005).

A purificação dos polissacarídeos também foi realizada por diálise fechada contra água destilada, através de membranas com limite de exclusão de 16 kDa.

3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Composição Monossacarídica

3.4.1.1 Hidrólise ácida total

Alíquotas de polissacarídeos (~ 1 mg) foram tratadas com 1,0 ml de TFA (ácido trifluoracético) 2 M, durante 8 horas a 100°C ou TFA 1 M a 100°C, *overnight* (12-15 h) (CORRADI da SILVA et al., 1993). Após este tempo, o ácido foi eliminado por evaporação até *secura*. Parte dos polissacarídeos hidrolisados foi solubilizada em água e cromatografada em papel (item 3.5.1.2). A outra parte foi submetida a redução e acetilação, conforme o item 3.4.1.2.

3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com NaBH₄ (boroidreto de sódio) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a) em temperatura ambiente, pH 9-10, por 15 horas. Após este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica (pH 7,0), filtradas e levadas à *secura* sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac₂O)/piridina 1:1 (v/v) *overnight* (WOLFROM; THOMPSON, 1963b), a temperatura ambiente. O processo foi interrompido por adição de gelo e o material acetilado foi extraído com clorofórmio. A piridina residual presente no extrato clorofórmico foi removida por sucessivas lavagens com solução de sulfato de cobre 5%. Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato

de sódio anidro e filtrada por algodão. Após secura, os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por GC-MS.

3.4.2 Teste de Homogeneidade

3.4.2.1 Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por 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) $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ ou água MilliQ para uma concentração final de 2 mg.ml^{-1} , sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro equivalente a $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) 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, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS 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.

3.4.3 Metilação

Alíquotas dos polissacarídeos (2-5 mg) foram metiladas segundo CIUCANU e KEREK (1984). A amostra foi dissolvida (1%, p/v) em dimetilsulfóxido (Me_2SO). Após a solubilização, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) desidratado e triturado (4:1 de carboidrato). A solução foi mantida sob agitação e adicionado iodeto de metila (CH_3I) na proporção, $\text{CH}_3\text{I/NaOH/carboidrato}$, recomendada (1:200:50). Após 24 horas, o material foi neutralizado com HOAc em banho de gelo e dialisado, exaustivamente, contra água corrente, liofilizado, sendo todo o processo repetido.

Encerrada esta metodologia, os produtos *O*-metilados foram extraídos com CHCl_3 , e após secura, submetidos a hidrólise (item 3.4.3.1).

3.4.3.1 Hidrólise dos polissacarídeos parcialmente *O*-metilados

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados foi realizada com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (p/v; 0,5 ml) por 1 hora a 0°C , seguido por diluição a 8% (p/v; adição de 4,0 ml de água destilada) a qual foi mantida a 100°C por 14-18 horas, seguido por neutralização com BaCO_3 (SAEMAN et al., 1954).

Os produtos de hidrólise foram reduzidos e acetilados conforme o item 3.4.1.2., porém a redução foi realizada com NaB^2H_4 (boroidreto de sódio deuterado).

3.4.4 Degradação Controlada de Smith

A fração 30ESFK30 (120 mg) foi dissolvida em água e foi acrescentado periodato de sódio (NaIO_4) até atingir uma concentração final de 0,05 M. A solução foi mantida sem agitação por 72 ou 96 horas na ausência de luz . O processo de oxidação foi interrompido pela adição de etileno glicol e diálise exaustiva contra água corrente. A solução foi reduzida com NaBH_4 (pH 9-10) por 24 horas (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; HAY; LEWIS; SMITH, 1965). Em seguida, a amostra foi tratada com resina catiônica (pH 7,0) e dialisada por 48 horas. A solução reduzida foi submetida a hidrólise ácida parcial com TFA até pH 2,0 por 30 minutos a 100°C , sob refluxo. Após neutralização, o polissacarídeo foi precipitado com EtOH (5:1, v/v) e dialisado em membranas com limite de exclusão de 2 kDa.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Métodos Cromatográficos

3.5.1.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300 acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50°C (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual em uma razão de 40°C.min⁻¹ até 215°C (acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados) ou 220°C (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

3.5.1.2 Cromatografia em papel (CP)

As análises cromatográficas qualitativas dos monossacarídeos foram realizadas pela técnica descendente, com o sistema de solvente 1-butanol-piridina-água (5:3:3, v/v), em papel Whatman n° 1 (HOUGH; JONES, 1962).

A detecção dos carboidratos foi realizada com os reagentes de nitrato de prata alcalino (TREVELYAN; PROCTER; HARRISON, 1950).

3.5.2 Métodos Espectroscópicos

3.5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

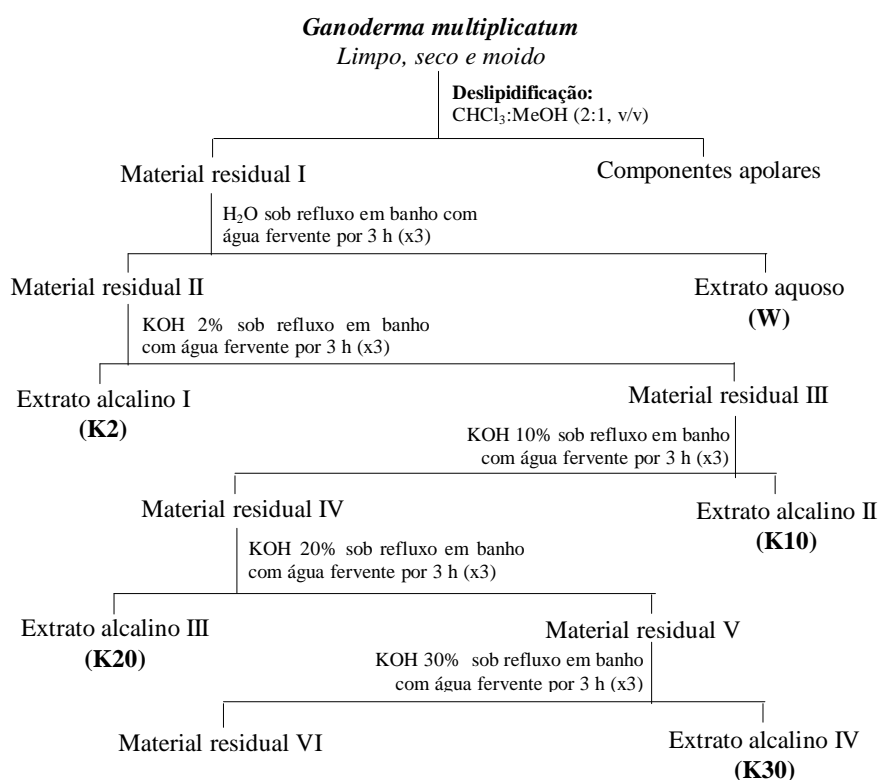
Os espectros de RMN-¹³C e RMN-¹³C-DEPT foram realizados em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400.

As análises foram feitas a 30°C, 50°C ou 70°C, com as amostras sendo solubilizadas em D₂O (óxido de deutério) ou Me₂SO-*d*₆, dependendo da sua solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D₂O foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ¹³C da acetona em δ 30,20 e aos sinais do Me₂SO-*d*₆ em δ 39,5 (¹³C), para as amostras solúveis no mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O corpo de frutificação de *G. multiplicatum* (peso seco: 200g) foi submetido, primeiramente, ao processo de deslipidificação utilizando clorofórmio-metanol (2:1 v/v) a 60°C por 3h, sob refluxo (3 vezes). Os extratos lipídicos obtidos foram reunidos e secos em temperatura ambiente, resultando em 3,74g. O material residual foi submetido à extração aquosa, sob refluxo, em banho com água fervente (3 vezes). Além das extrações aquosas, foram realizadas extrações alcalinas nas mesmas condições, nas concentrações de 2, 10, 20 e 30%, sucessivamente, sendo os procedimentos gerais de extração visualizados na Figura 14.

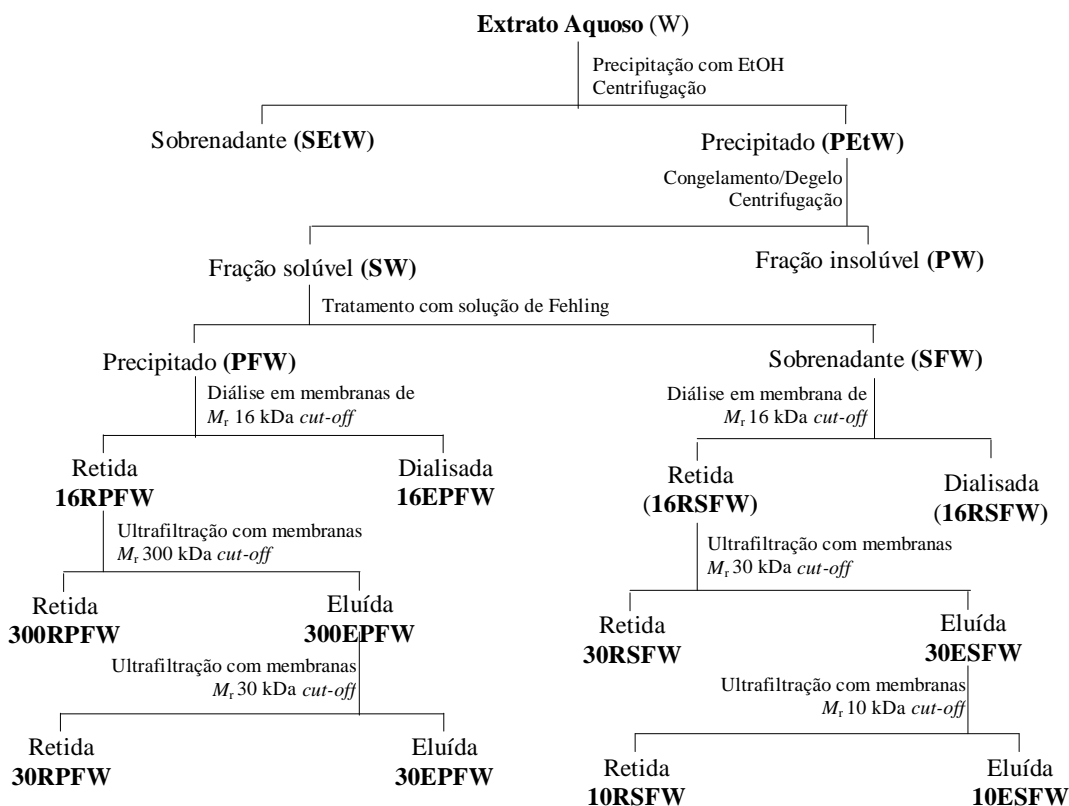
FIGURA 14 - Fluxograma dos processos de extração dos polissacarídeos do corpo de frutificação de *Ganoderma multiplicatum*



4.1 EXTRAÇÃO AQUOSA A 100°C

Os extratos aquosos obtidos foram filtrados a quente em algodão, reunidos e o volume foi concentrado em rotaevaporador. Após estes processos o material foi submetido a precipitação com etanol em excesso (3:1 v/v) resultando em um precipitado (1,39 g) e um sobrenadante (6,57 g). Com a finalidade de purificação, a fração precipitado etanólico foi submetida a diversas técnicas, as quais estão ilustradas na Figura 15.

FIGURA 15 - Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extrações aquosas a 100°C

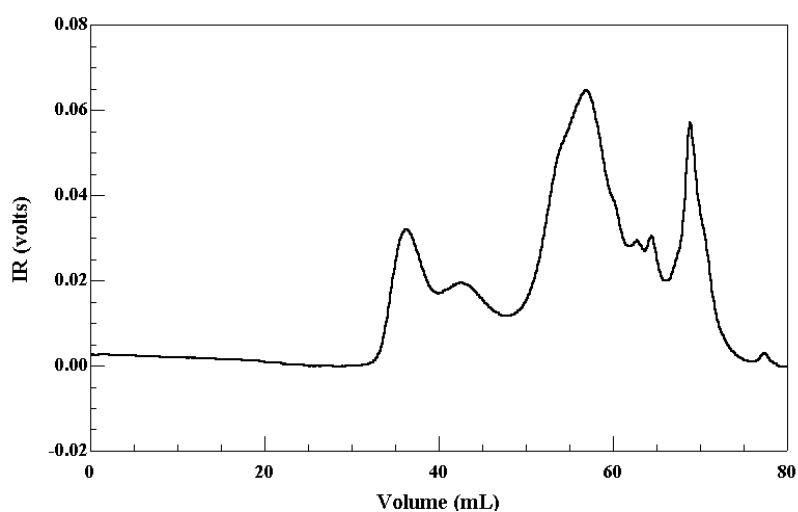


Quando analisado quanto a composição monossacarídica, o precipitado etanólico, mostrou-se ser composto por ramnose (2,7%), fucose (2,2%), arabinose (tr), xilose (2,0%), manose (15,1%), galactose (5,0%) e glucose (71,7%). Como primeira

etapa de purificação este material foi submetido a precipitação por congelamento e degelo, resultando em uma fração solúvel (SW) e uma insolúvel em água fria (PW). Devido ao baixo rendimento da fração PW (0,1 g), esta não foi estudada.

A fração SW apresentou-se heterogênea quando analisada por HPSEC (Figura 16), sendo submetida a precipitação por solução de Fehling. Este processo originou um precipitado e um sobrenadante, denominados PFW e SFW, respectivamente.

FIGURA 16– Perfil eluição da fração SW (solubilizada em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, contendo azida sódica) obtido por HPSEC



A fração SFW apresentou glucose como principal monossacarídeo, enquanto que a fração PFW foi composta principalmente por galactose, glucose e fucose (Tabela 3).

TABELA 3 - Composição monossacarídica das frações PFW e SFW obtidas de *G. multiplicatum*

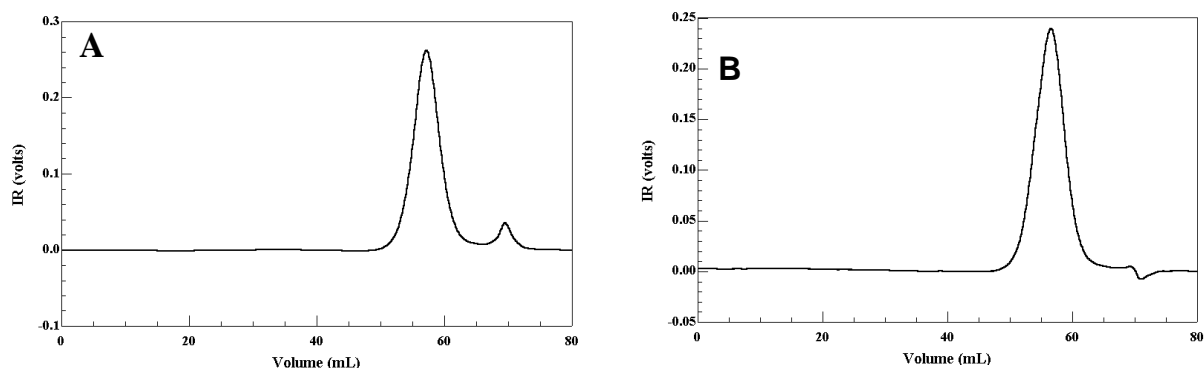
FRAÇÕES	Composição Monossacarídica (mol%) ⁽¹⁾						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
SFW	2,9	1,8	2,2	1,6	11,4	8,0	72,1
PFW	9,7	15,3	-	5,0	5,8	50,9	13,1

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

Como o tratamento com solução de Fehling não foi totalmente eficiente na purificação das frações, as mesmas foram submetidas a técnicas adicionais de fracionamento.

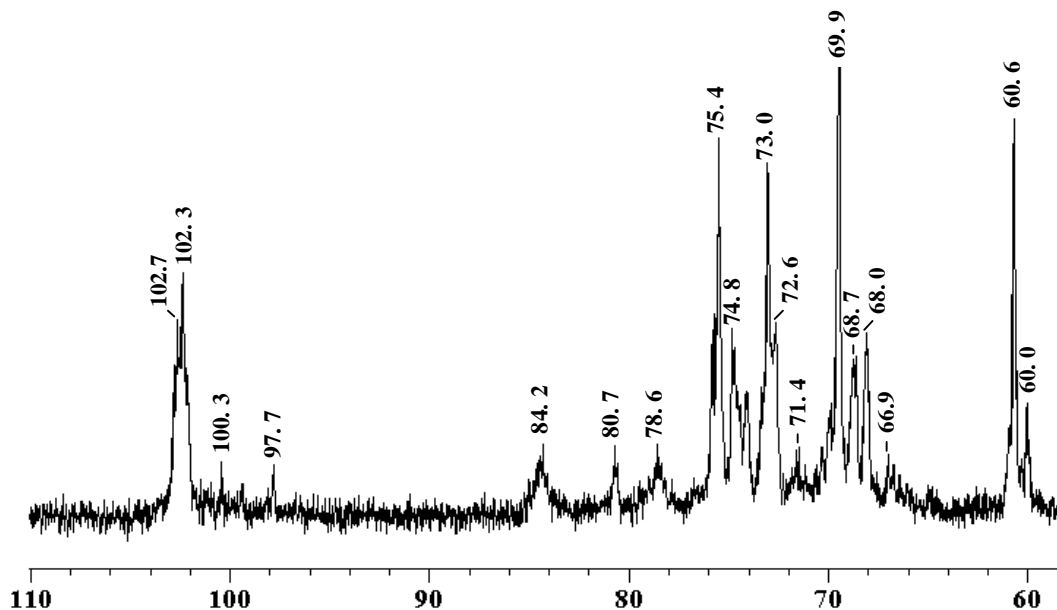
A fração SFW foi, primeiramente, dialisada (sistema fechado) em membranas com limite de exclusão de 16 kDa. O material retido na membrana foi submetido a ultrafiltração em membranas com limite de exclusão de M_r 30 kDa resultando em uma fração retida (30RSFW) e uma eluída (30ESFW) sendo esta fracionada em membranas com M_r 10 kDa. Tanto o material retido (10RSFW) quanto o eluído (10ESFW) mostraram-se homogêneos quando analisados por HPSEC (Figura 17A e B, respectivamente) e compostos principalmente por glucose, sugerindo a presença de glucanas.

FIGURA 17 – Perfil de eluição das frações 10RSFW (A) e 10ESFW (B) (solubilizada em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, contendo azida sódica) obtido por HPSEC



O espectro de RMN- ^{13}C da fração 10ESFW (Figura 18) apresentou sinais na região anomérica em δ 102,7 e 102,3 sugerindo configuração glicosídica do tipo β . Além destes, também podem ser observados sinais pouco intensos em δ 100,3 e 97,7 correspondentes ao C-1, provavelmente, em configuração do tipo α . Estes dados sugerem a presença de uma glucana apresentando unidades em configuração α e β .

FIGURA 18 - Espectro de RMN ^{13}C da fração 10ESFW (em D_2O a 50°C) obtida de *G. multiplicatum*



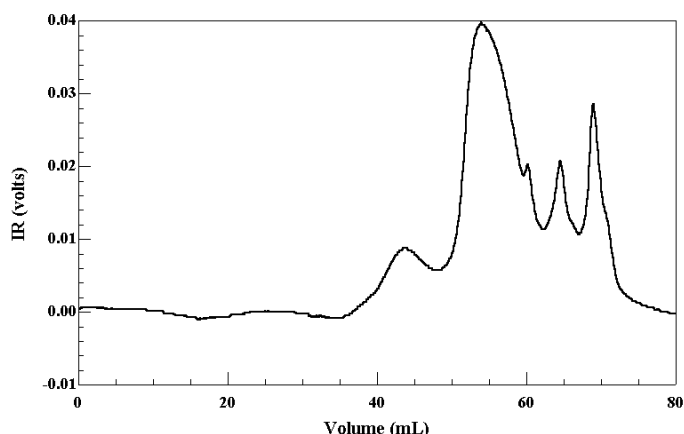
Glucanas apresentando os dois tipos de configuração (α e β) têm sido descritas em basidiomicetos, como por exemplo, *Astreus hygrometricus* o qual sintetiza um polímero contendo uma cadeia linear de α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) (CHAKRABORTY et al., 2004). Em *Ganoderma lucidum* foi caracterizado um polímero contendo altos teores de glucose (Glc:Xyl:Ara em uma proporção molar de 18,8:1,5:1,0) com cadeia principal e laterais constituídas por unidades de Glcp contendo ligações α - e β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6).

Até a presente data não foram realizadas análises complementares para caracterização de sua estrutura fina, sendo que estudos adicionais tornam-se necessários para a elucidação da estrutura da molécula isolada.

Outra fração estudada foi a precipitado de Fehling (PFW). Como esta fração apresentava-se heterogênea quando analisada por HPSEC (Figura 19) este material foi dialisado (sistema fechado) em membrana de M_r 16 kDa, resultando em uma fração dialisada (16EPFW) e uma retida (16RPFW). A fração 16RPFW foi submetida a ultrafiltração em membrana de M_r 300 kDa. Como este procedimento não foi eficiente

na purificação (Figura 20 A e B), o material eluído (300EPFW) foi ultrafiltrado em membrana com limite de exclusão de M_r 30 kDa.

FIGURA 19– Perfil de eluição das frações PFW (solubilizada em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, contendo azida sódica) obtido por HPSEC



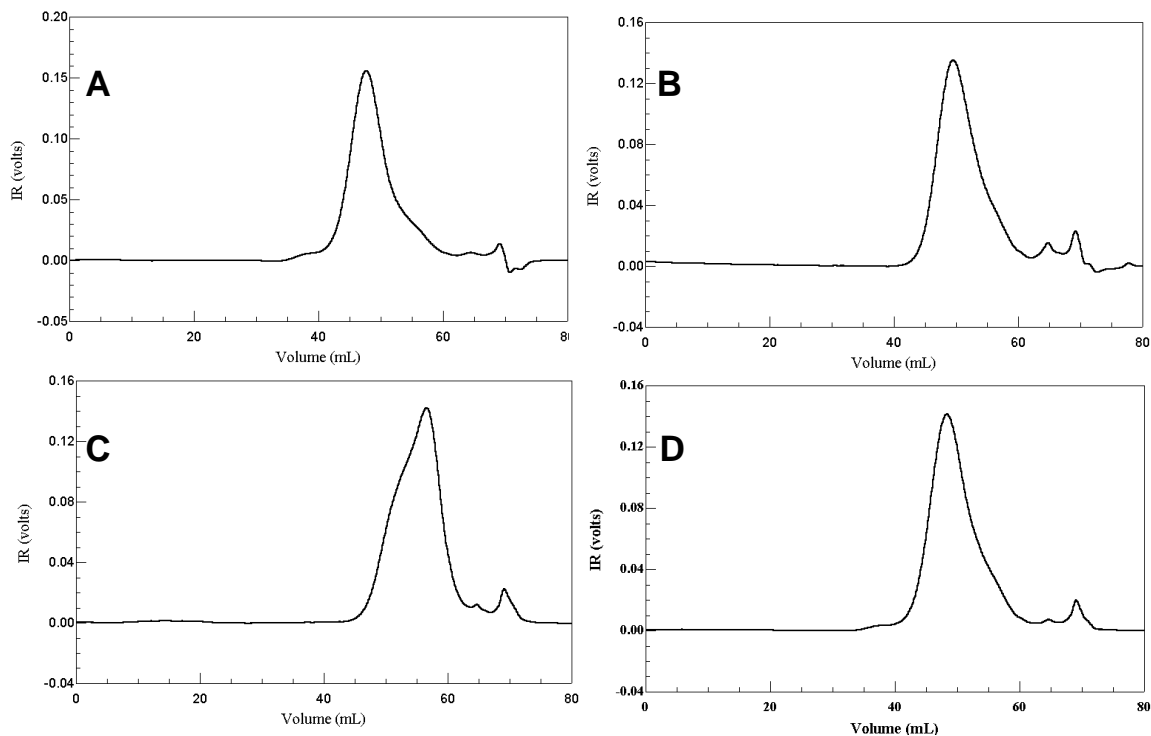
Como pode ser observado na Figura 18C e D, as frações obtidas a partir da ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de M_r 30 kDa (30EPFW: eluída e 30RPFW: retida) apresentaram um perfil heterogêneo ao serem analisadas por HPSEC. A análise da composição monossacarídica destas frações, mostrou-se similar sendo constituídas por fucose, xilose, manose e glucose como principais monossacarídeos (Tabela 4).

TABELA 4 - Composição monossacarídica das frações 300EPFW, 30RPFW e 30EPFW obtidas de *G. multiplicatum*

FRAÇÕES	Composição Monossacarídica (mol%) ⁽²⁾				
	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc
300EPFW	14,0	15,6	25,9	2,6	41,8
30RPFW	24,7	24,2	36,9	-	12,8
30EPFW	23,7	20,7	38,1	2,3	15,1

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

FIGURA 20 – Perfil de eluição das frações 300RPFW (A), 300EPFW (B), 30EPFW (C) e 30RPFW (D) obtido por HPSEC

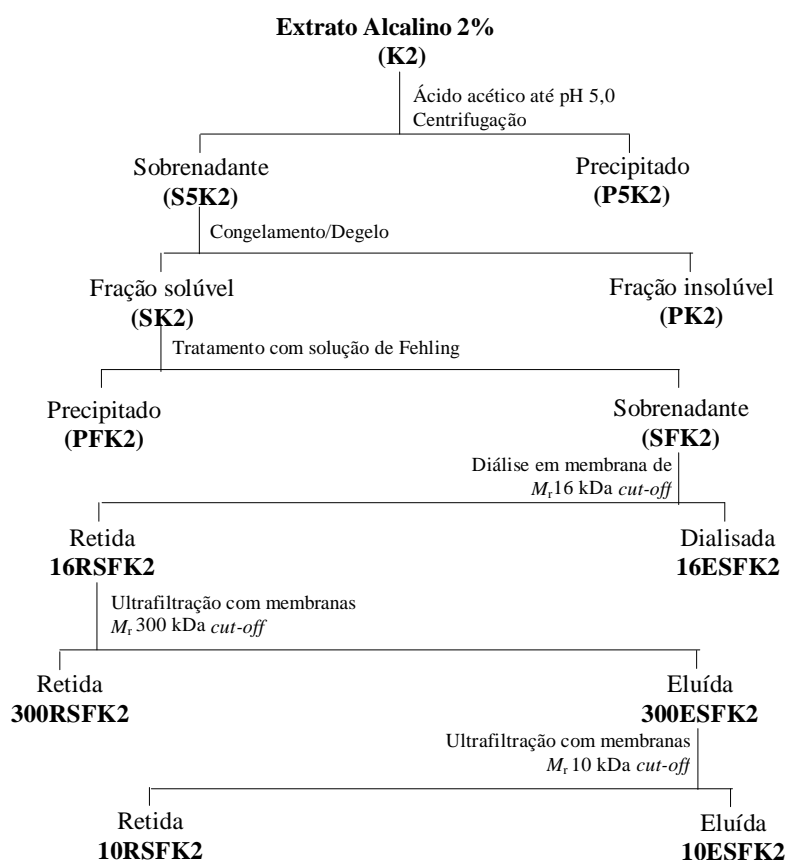


Embora as frações 30EPFW e 30RPFW apresentem-se heterogêneas, os resultados obtidos sugerem a presença de uma fucoxilomanana a qual tem sido descrita em basidiomicetos. A presença de glucose nestas frações pode ser devido a contaminação por glucanas. Em *Polyporus pinicola* (AXELSSON; BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969) e *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971) foi descrito uma fucoxilomanana contendo uma cadeia principal composta por unidades de β -Manp ligadas (1 \rightarrow 3) e substituída em O-4 por cadeias laterais de 2-O- α -L-Fucp- β -D-Xylp. A quatr unidades da cadeia principal, três unidades apresentam-se substituídas. Em *Ganoderma lucidum* foi isolado uma estrutura similar, porém a cadeia principal é composta por Manp com ligações do tipo (1 \rightarrow 4), totalmente substituída em O-3 por cadeias laterais de 4-O-L-Fucp-D-Xylp (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1982).

4.2 EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 2% a 100°C

Os extratos alcalinos obtidos por extrações com KOH a 2% foram filtrados a quente em algodão, reunidos e fracionados conforme a Figura 21. Em seguida foi adicionado ácido acético até, aproximadamente, pH 5, ocorrendo a formação de um precipitado (P5K2) o qual foi separado por centrifugação. Tanto a fração sobrenadante (S5K2) quanto a precipitada (P5K2) obtida por este procedimento foram neutralizadas, dialisadas contra água corrente (~ 48 h). Decorrido o tempo, as frações dialisadas foram reduzidas a pequeno volume em rotaevaporador e liofilizadas.

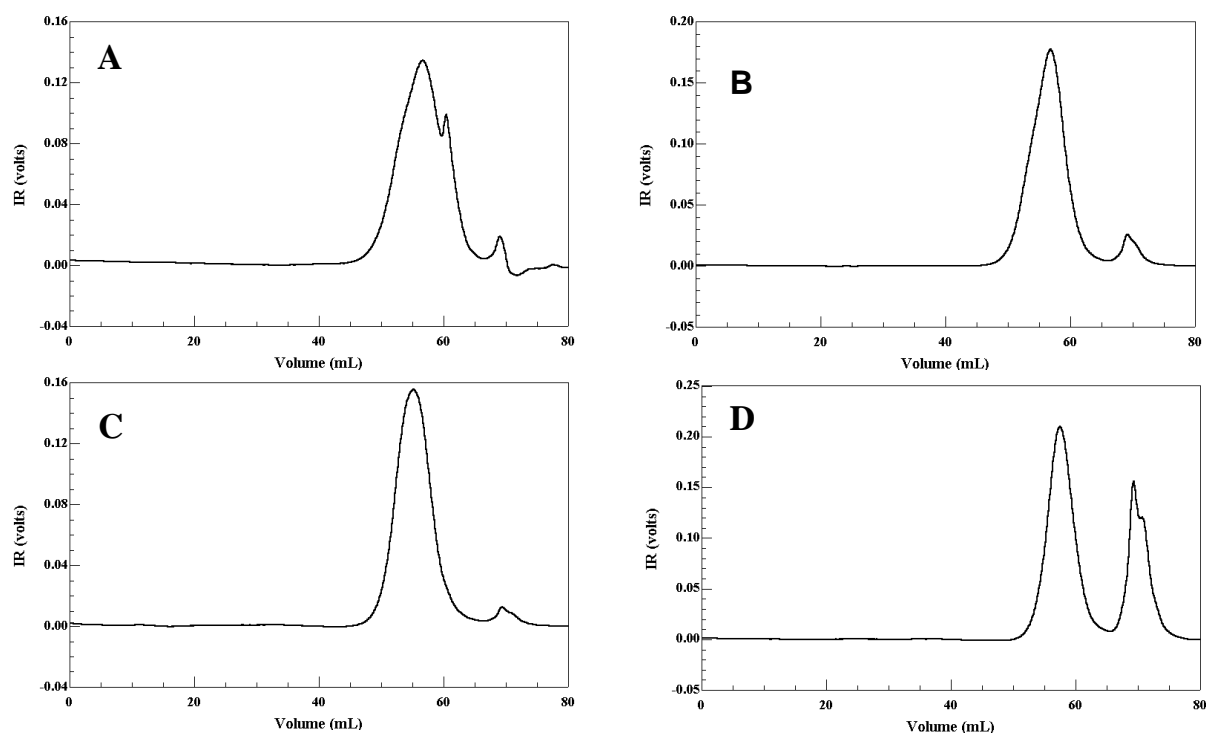
FIGURA 21 - Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 2% a 100°C



A fração S5K2 foi submetida ao processo de purificação por congelamento e degelo resultando em uma fração insolúvel (PK2) e outra solúvel (SK2) em água fria, sendo esta tratada com solução de Fehling. O processo resultou em uma fração sobrenadante (SFK2) e uma precipitado de Fehling (PFK2).

A fração SFK2 apresentou um perfil heterogêneo quando analisado por HPSEC (Figura 22 A), sendo esta, primeiramente, dialisada (sistema fechado) em membranas com limite de exclusão de 16 kDa, sendo o material retido (16RSFK2) submetido a ultrafiltração em membranas com limite de exclusão de 300 kDa resultando em uma fração retida (300RSFK2) e uma eluída (300ESFK2). A fração 300ESFK2 (Figura 22 B) foi fracionada em membranas com limite de exclusão de 10 kDa, originando uma fração retida (10RSFK2) e uma eluída (10ESFK2) as quais mostraram-se compostas, principalmente, por glucose e um perfil homogêneo quando analisadas por HPSEC (Figura 22 C e D).

FIGURA 22 – Perfil de eluição das frações SFK2 (A), 300ESFK2 (B), 10RSFK2 (C) e 10ESFK2 (D) obtido por HPSEC



Os espectros de RMN- ^{13}C das frações 10RSFK2 e 10ESFK2 (Figura 23 A e B, respectivamente) mostraram-se similares. Estes contém sinais na região anomérica em δ 102,3 e 102,2, os quais correspondem a uma configuração glicosídica do tipo β . Os sinais observados em δ 84,1 e 78,4, característicos de C-3 e C-4 substituídos, respectivamente, sugerem a presença de unidades contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4). Além destes tipos de ligações também pode ser observado unidades ligadas (1 \rightarrow 6) em decorrência do sinal em δ 68,5 observado no espectro de RMN- ^{13}C e confirmado pela inversão do correspondente sinal no espectro de RMN- ^{13}C -DEPT da fração 10ESFK2 (Figura 23 C).

FIGURA 23 - Espectros de RMN- ^{13}C das frações 10RSFK2 (A) e 10ESFK2 (B) (em D_2O a 30°C) obtidas de *G. multiplicatum*

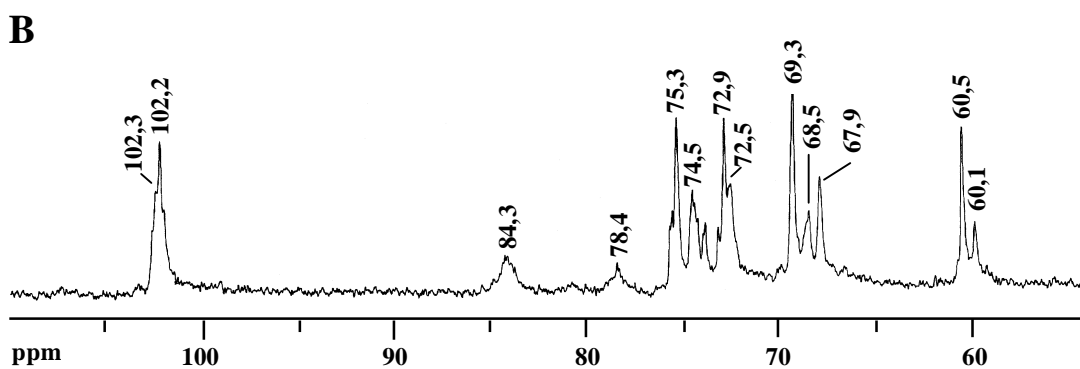
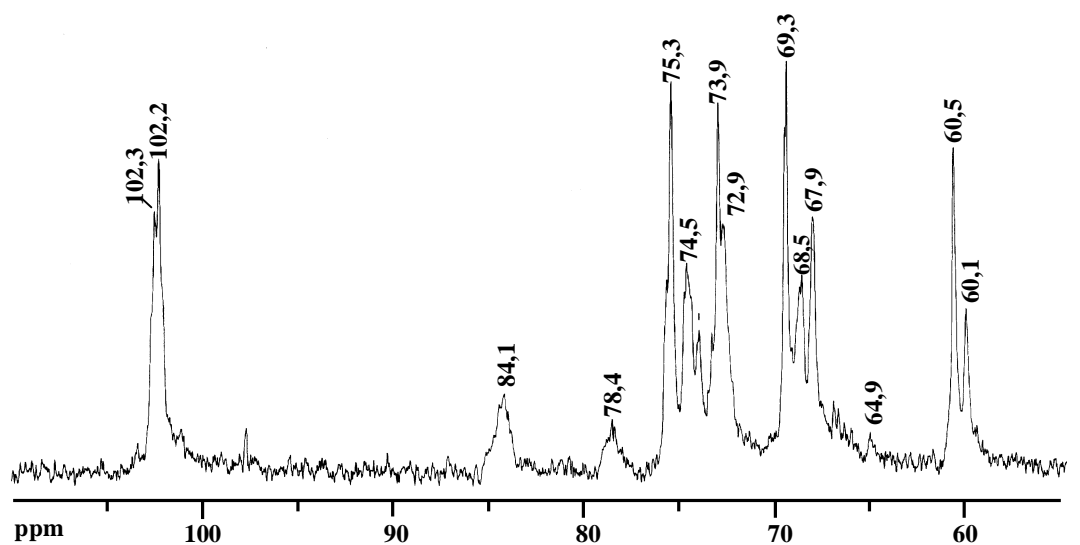
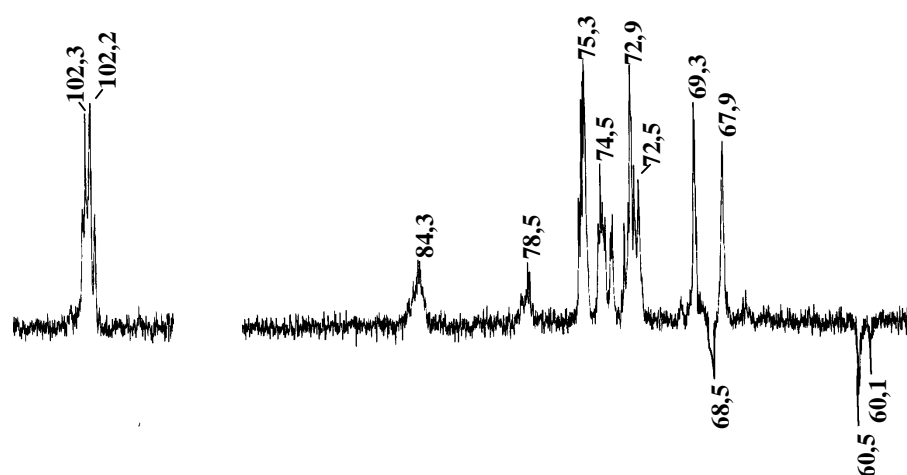


FIGURA 24 - Espectros de RMN-¹³C DEPT da fração 10ESFK2 (em D₂O a 30°C) obtidas de *G. multiplicatum*



Os dados obtidos por metilação da fração 10ESFK2 (Tabela 5) estão de acordo com os observados por RMN-¹³C onde foram detectados os derivados 2,4,6-Me₃Glc, 2,3,6-Me₃Glc, 2,3,4-Me₃Glc e 2,4-Me₂Glc correspondentes, respectivamente, as unidades 3-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*- e 3,6-di-*O*- substituídas. Além destes, também foi observado altos teores de terminais não redutores (2,3,4,6-Me₄Glc; 21,9%) sugerindo a presença de uma estrutura ramificada.

TABELA 5 - Análise por metilação da fração 10ESFK2 obtida de *G. multiplicatum*

Acetatos de alditóis parcialmente metilados ⁽¹⁾	<i>O</i> - mol%	Tipo de ligação ⁽²⁾
2,3,4,6-Me ₄ Glc	21,9	Glc _p -(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	19,1	3→)-Glc _p -(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	8,4	4→)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me ₃ Glc	29,6	6→)-Glc _p -(1→
2,4-Me ₂ Glc	19,8	3,6→)-Glc _p -(1→
2,3-Me ₂ Glc	1,2	4,6→)-Glc _p -(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado no derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

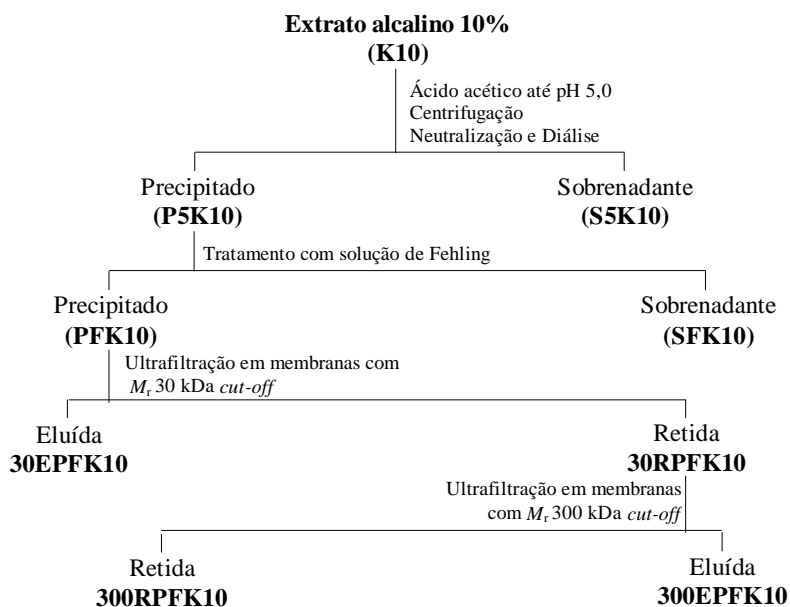
Os dados obtidos sugerem uma glucana com uma estrutura ramificada, constituída por uma cadeia principal com ligações do tipo 1→3, substituída em O-6, principalmente, por unidades de Glcp ligadas 1→6, além de uma menor quantidade de unidades de Glcp com ligações do tipo 1→4.

Polissacarídeos constituídos, principalmente, por unidades de glucose são comumente encontrados em basidiomicetos. A partir de estudos do esclerócio de *Grifora umbellata* (Fr.) Pilát foi isolado uma glucana com ligação do tipo β -(1→3) e (1→6), além de unidades de Glcp com ligações do tipo β -(1→4) (KATO et al.,1978). Em *Auricularia auricula-judae* também foi isolado um glucana com ligações do tipo β -(1→3) e (1→6) (SONE; KAKUTA; MISAKI, 1978).

4.3 EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 10% a 100°C

Os extratos alcalinos obtidos por extrações com KOH a 10% a 100°C foram filtrados a quente em algodão, reunidos e fracionados conforme a Figura 25. Primeiramente, foi adicionado ácido acético até, aproximadamente, pH 5, ocorrendo a formação de um precipitado (P5K10) o qual foi separado por centrifugação. Tanto a fração sobrenadante (S5K10) quanto a precipitada (P5K10) obtidas por este procedimento foram neutralizadas, dialisadas contra água corrente (~ 48 h). Decorrido o tempo, as frações dialisadas foram reduzidas a pequeno volume em rotaevaporador e liofilizadas.

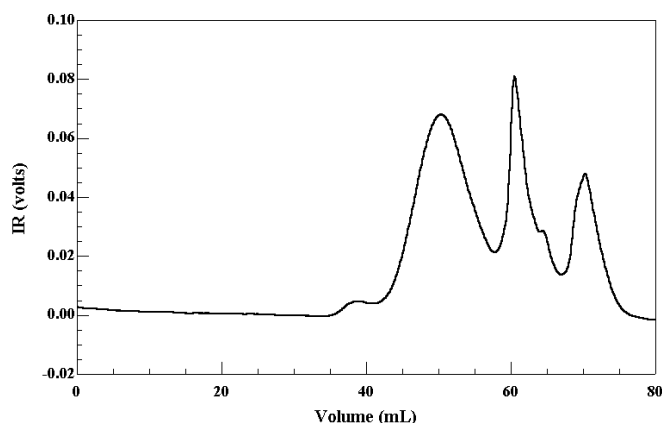
FIGURA 25 – Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 10% a 100°C



A fração P5K10 mostrou-se composta por fucose (1,5%), xilose (5,5%), manose (10,6%) e glucose (81,8%). Com a finalidade de purificação, a mesma foi submetida a tratamento com solução de Fehling, como descrito em material e métodos.

O precipitado (PFK10) obtido apresentou um perfil heterogêneo ao ser analisado por HPSEC (Figura 26) e composto por 30,9% de fucose, 32,6% de xilose, 54,2 de manose e 9,2% de glucose (Tabela 6).

FIGURA 26 – Perfil eluição da fração PFK10 (solubilizada em nitrito de sódio 0,1 mol.l⁻¹, contendo azida sódica) obtido por HPSEC



Esta foi dialisada em membrana com limite de exclusão de 16 kDa, sendo a fração retida (16RPFK10) ultrafiltrada em membrana com limite de exclusão de 30 kDa obtendo-se as frações 30RPFK10 e 30EPFK10 para eluída e retida, respectivamente. A fração 30RPFK10 apresentou-se composta por fucose (3,4%), xilose (28,5%) e manose (68,1%). A fração 30EPFK10 apresentou uma composição monossacarídica similar, sendo composta por fucose (2,9%), xilose (27,8%) e manose (69,3%) (Tabela 6).

TABELA 6 - Composição monossacarídica das frações PFK10, 30RPFK10 e 30EPFK10 obtidas de *G. multiplicatum*

FRAÇÕES	Composição Monossacarídica (mol%) ⁽¹⁾						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
PFK10	-	30,9	-	32,6	54,2	-	9,2
30RPFK10	-	3,4	-	28,5	68,1	-	-
30EPFK10	-	2,9	-	27,8	69,3	-	-

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

Os espectros de RMN-¹³C das frações 30RPFK10 e 30EPFK10 mostraram-se similares (Figura 27 A e B). Os sinais na região anomérica em δ 103,9 correspondem as unidades de Xylp (GORIN; MAZUREK, 1974) e os sinais em δ 101,8 e 101,3 correspondem ao C-1 das unidades de Manp. A configuração glicosídica foi determinada pelos valores de constante de acoplamento ($J_{C-1,H-1}$) observadas no espectro de RMN-¹³C acoplado (Figura 28). As unidades de Xylp apresentam configuração de tipo β em virtude do valor $J_{C-1,H-1} = 162,8$ Hz, enquanto que as unidades de Manp correspondente a cadeia principal apresentam configuração do tipo α de acordo com o valor $J_{C-1,H-1} = 173,4$ Hz observado (PERLIN; CASU, 1969).

FIGURA 27 - Espectros de RMN-¹³C das frações 30RPFK10 (A) e 30EPFK10 (B) em D₂O (50°C) obtidas de *G. multiplicatum*. Os insertos correspondem aos sinais referentes ao grupamento -CH₃ das unidades de fucose.

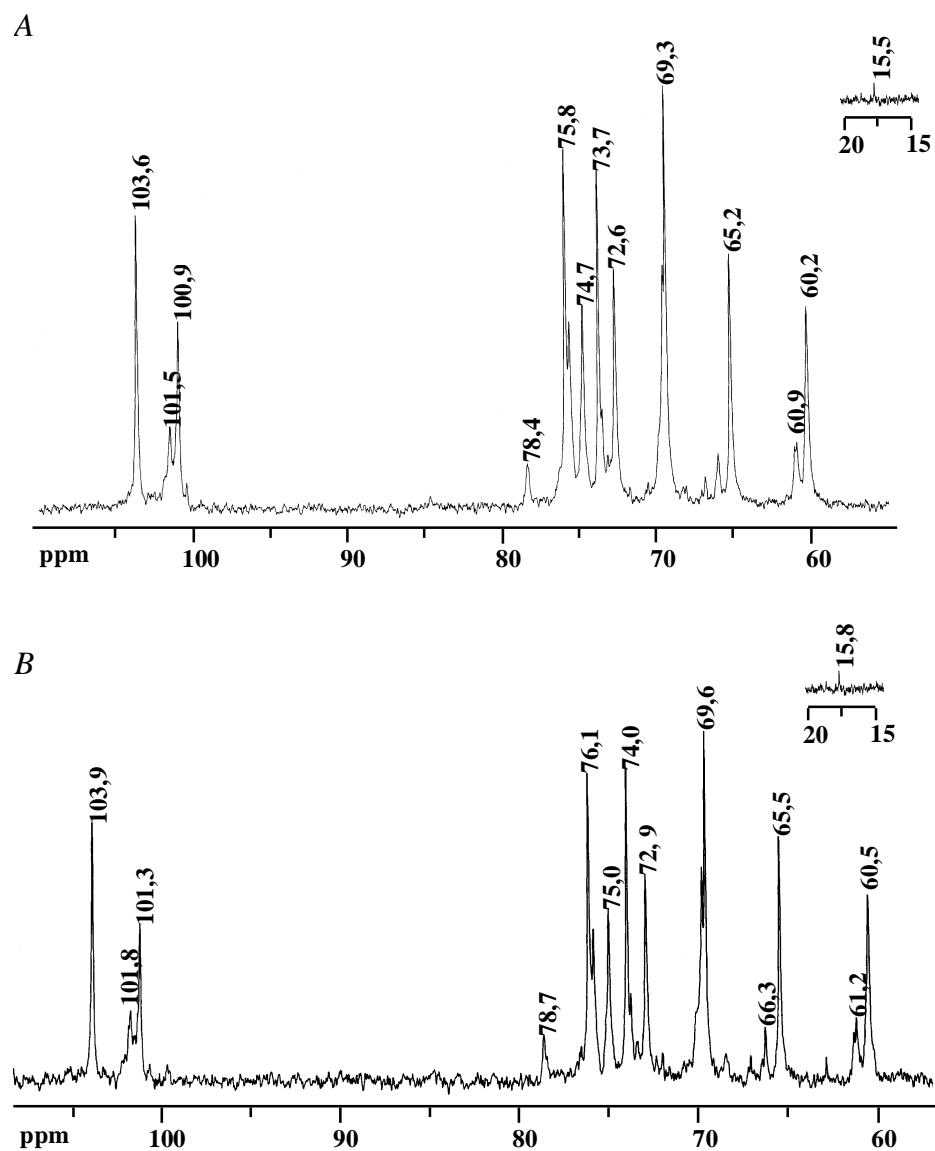
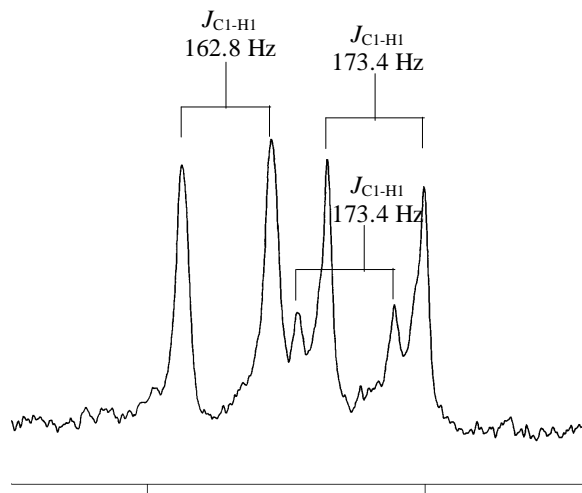


FIGURA 28 – Região anomérica do espectro de RMN-¹³C acoplado da fração 30EPFK10 em D₂O (50°C) obtida de *G. multiplicatum*



Outros sinais presentes no espectro de RMN-¹³C também puderam ser assinalados, como: δ 76,2; 72,9; 69,6 e 65,5 correspondem, respectivamente, ao C-3, C-2, C-4 e C-5 das unidades terminais não redutores de Xylp (GORIN; MAZUREK, 1975, SIMAS et al., 2004). Os sinais em δ 61,2 e 60,5 referem-se ao C-6 livre das unidades de Manp. O sinal em campo alto em δ 15,8 refere-se ao grupo $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ das unidades de Fucp.

Devido a similaridade entre as frações 30RPFK10 e 30EPFK10, observada tanto na composição monossacarídica quanto nos espectros de RMN-¹³C, somente a fração eluída (30EPFK10) foi analisada por metilação (Tabela 6).

TABELA 7 - Análise por metilação da fração 30EPFK10 obtida de *G. multiplicatum*

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	(mol%)	Tipo de ligação ⁽²⁾
2,3,4-Me ₃ Fuc	2,3	Fucp-(1→
2,3,4-Me ₃ Xyl	28,2	Xylp-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	37,5	4→)-Manp-(1→
2,6-Me ₂ Man	32,0	3,4→)-Manp-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado no derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

A análise de metilação sugere a presença de uma estrutura altamente ramificada devido a proporção dos grupos terminais não redutores de Fucp (2,3%) e Xylp (28,2%) observada. Os derivados 2,3,6-Me₃Man (37,5%) e 2,6-Me₂Man (32,0%) referem-se, respectivamente, as unidades de Manp 4-O- e 3,4-di-O- substituídas correspondentes a cadeia principal.

Os dados obtidos sugerem que o heteropolissacarídeo isolado corresponde a uma xilomanana altamente ramificada contendo uma cadeia principal formada por unidades de α -Manp apresentando ligações do tipo (1→4) a qual encontra-se parcialmente substituída em O-3, principalmente, por grupos terminais não redutores de β -Xylp.

Estruturas similares têm sido descritas a partir do corpo de frutificação de basidiomicetos, porém a maioria destas também apresenta fucose como principal componente monossacarídico, sendo estes denominados de fucoxilomanana. Estas podem apresentar diferentes tipos de cadeia principal as quais são, principalmente, constituídas por unidades de Manp contendo ligações do tipo β -(1→3) (AXELSSON; BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969; AXELSSON et al., 1971). Porém, em *Ganoderma lucidum* foi isolada uma estrutura contendo uma cadeia principal composta por ligações do tipo (1→4) a qual encontra-se totalmente substituída em O-3 por cadeias laterais de 4-O- α -L-Fucp- β -D-Xylp.

Estruturas contendo apenas xilose e manose como monossacarídeos, xilomananas, foram caracterizadas somente a partir do micélio de *Armillaria mellea* (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967) e de *Polyporus tumulosus* (ANGYAL; BENDER; RALPH¹, citado por BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983). Estas apresentam uma cadeia principal formada por unidades de α -Manp ligadas (1→3), sendo substituída em O-4 por cadeias laterais de 4-O- α -D-Xylp-D-Xylp.

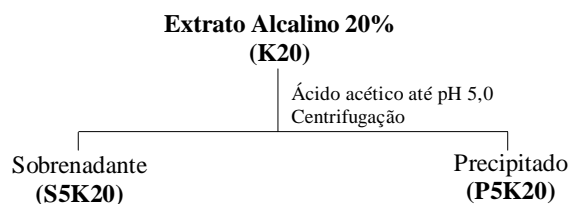
O polissacarídeo isolado no presente estudo apresenta uma cadeia principal não comumente descrita em basidiomicetos. Estruturas compostas principalmente por manose e xilose foram caracterizadas apenas no micélio de alguns basidiomicetos.

¹ ANGYAL, S. J.; BENDER, V. J.; RALPH, B. J. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 362, p. 175-187, 1973.

4.4 EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 20% a 100°C

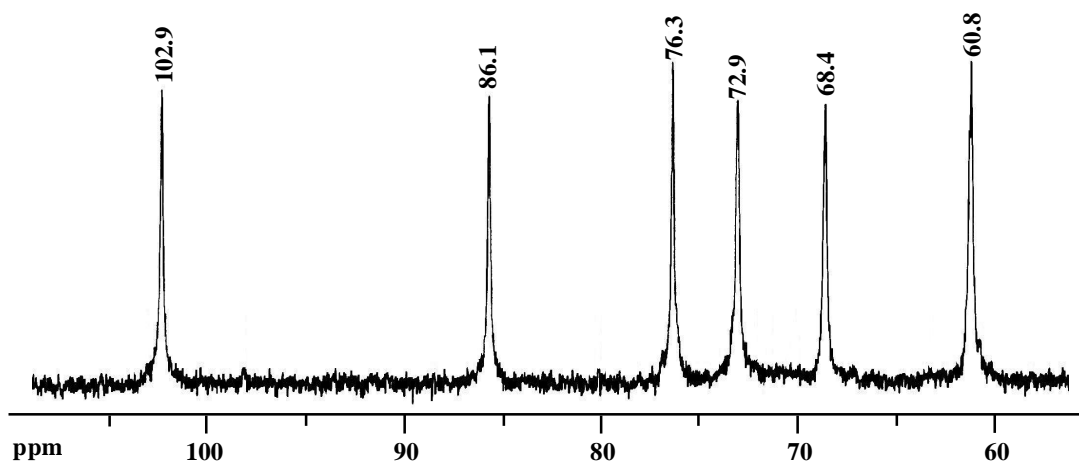
A fração P5K20 (precipitado), obtida após adição de ácido acético até pH 5,0 (Figura 29), apresentou-se composta principalmente por glucose (98%).

FIGURA 29 – Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 20% a 100°C



O espectro de RMN-¹³C (Figura 30) apresentou apenas 6 sinais presentes em δ 102,9; 86,1; 76,3; 72,8; 68,4; 60,8 correspondentes a C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6, respectivamente. De acordo com os dados obtidos, a fração P5K20 consiste de uma β -glucana contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3) a qual é denominada de laminarana (GORIN, 1981; ALQUINI et al., 2004).

FIGURA 30 - Espectro de RMN-¹³C da fração P5K20 (laminarana) em Me₂SO-*d*₆ (70°C) obtida de *G. multiplicatum*

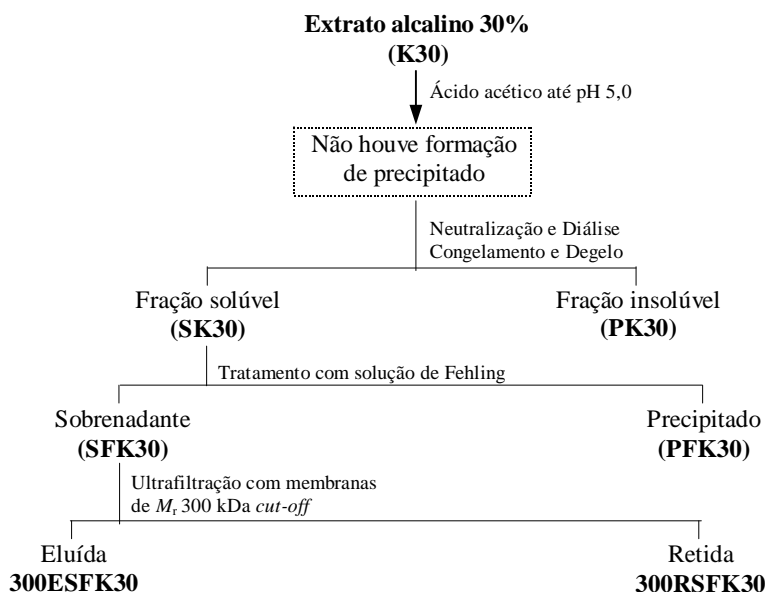


β -Glucanas ligadas (1 \rightarrow 3) são estruturas comumente encontradas em basidiomicetos, como por exemplo, em *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI et al., 2004), *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1977), *Armillaria mellea* (FRASER, 1967) e *Ganoderma tsugae* (WANG et al., 1993). De acordo com GRIFFIN (1994) este tipo de polímero é um dos componentes da parede celular nestes organismos.

4.5 EXTRAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO a 30% a 100°C

Os extratos alcalinos obtidos por extrações com KOH a 30% foram filtrados a quente em algodão, reunidos e submetidos a purificação conforme a Figura 31. Inicialmente, foi adicionado ácido acético até ~ pH 5, porém diferentemente das extrações anteriores este tratamento não resultou na formação de precipitado. Este extrato foi neutralizado, dialisado contra água corrente (~ 48 h). Decorrido o tempo, a fração dialisada foi reduzida a pequeno volume em rotaevaporador e liofilizada.

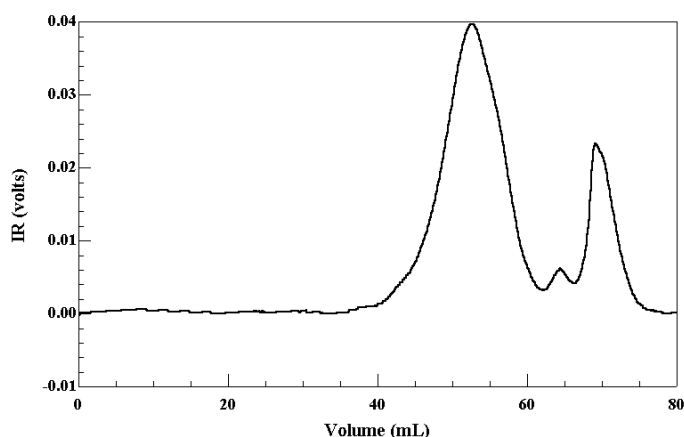
FIGURA 31 – Esquema de fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração com KOH a 30% a 100°C



Como realizado para as outras extrações, o material foi submetido ao processo de purificação por congelamento e degelo, resultando em uma fração solúvel (SK30) e uma insolúvel (PK30), sendo que ambas foram compostas, principalmente, por glucose (~ 96%).

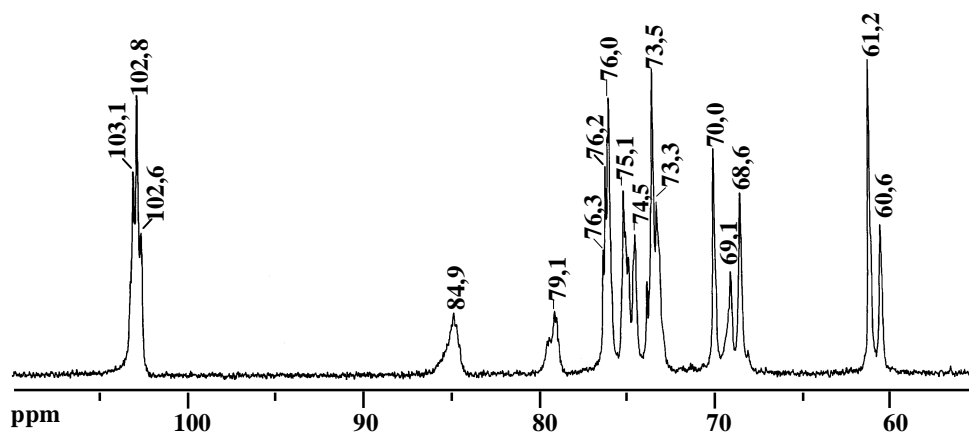
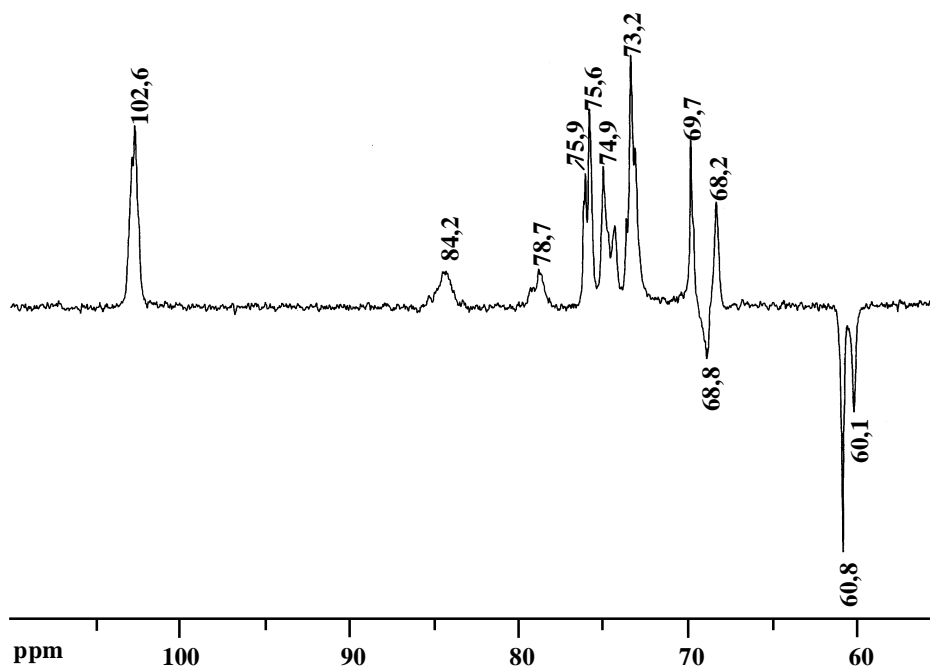
A fração solúvel foi submetida a precipitação com solução de Fehling, resultando em um sobrenadante (SFK30) e um precipitado (PFK30). Apesar da fração SFK30 apresentar altos teores de glucose (99,2%), quando analisada por HPSEC esta não estava homogênea (Figura 32).

FIGURA 32 – Perfil de eluição da fração SFK30 (solubilizada em nitrato de sódio 0,1 mol.l⁻¹, contendo azida sódica) obtido por HPSEC



Com o intuito de purificar esta fração, a mesma foi submetida a ultrafiltração em membrana de M_r 300 kDa, resultando em um material retido (300RSFK30) e outro eluído (300ESFK30). A fração 300ESFK30 quando analisada por GC-MS mostrou-se composta somente por glucose, sendo submetida a análises de RMN-¹³C.

O espectro de RMN-¹³C da fração 300ESFK30 (Figura 33) apresentou sinais em δ 103,1, 102,8 e 102,6 que correspondem aos carbonos anoméricos das unidades de β -Glc_p. Os sinais em δ 84,8 e 79,1 são referentes, respectivamente, ao C-3 e C-4 substituídos, enquanto que aqueles em δ 69,1 e 61,2 e 60,6 correspondem ao C-6 substituído e não substituído, respectivamente, sendo estes confirmados pela inversão no espectro de RMN-¹³C-DEPT (Figura 34).

FIGURA 33 – Espectro de RMN-¹³C da fração 300ESFK30 em D₂O (50°C) obtida de *G. multiplicatum*FIGURA 34 – Espectro de RMN-¹³C-DEPT da fração 300ESFK30 em D₂O (50°C) obtida de *G. multiplicatum*

Os dados de RMN-¹³C da fração 300ESFK30 estão de acordo com as análises de metilação (Tabela 8) onde foi observado além dos altos teores de terminais não redutores de Glcp, o qual sugere a presença de uma glucana ramificada, unidades de Glcp 3-*O*-, 4-*O*-, 3,6-di-*O*- e 4,6-di-*O*-substituídas. Além de baixos teores de unidades de Glcp 3,4,6-tri-*O*- substituídas.

TABELA 8 - Análise por metilação das frações 300ESFK30 e S300ESF obtida de *G. multiplicatum*

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	Frações (mol%)		Tipo de ligação ⁽²⁾
	300ESFK30	S300ESF	
2,3,4,6-Me ₄ Glc	21,4	2,8	Glcp-(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	19,8	97,2	3→)-Glcp-(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	37,2	-	4→)-Glcp-(1→
2,4-Me ₂ Glc	15,9	-	3,6→)-Glcp-(1→
2,3-Me ₂ Glc	4,6	-	4,6→)-Glcp-(1→
2-MeGlc	1,6	-	3,4,6→)-Glcp-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado no derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Com a finalidade de elucidar a estrutura da cadeia principal desta β-glucana, esta fração (120 mg) foi submetida ao procedimento de degradação de Smith controlada (ABDEL-AKHER et al., 1952; HAY et al., 1965). O material resistente (S300ESF; 12 mg) foi analisado por metilação fornecendo apenas terminais não-redutores de Glcp e unidades Glcp 3-*O*-substituídas, sugerindo a presença de uma cadeia principal composta por unidades de glucose contendo ligações do tipo (1→3) (Tabela 7).

De acordo com os dados obtidos, a fração 300ESF30K consiste de uma β-glucana ramificada, a qual apresenta uma cadeia principal contendo ligações do tipo (1→3) sendo substituída principalmente em O-6 por cadeias laterais formadas por unidades de β-Glcp contendo ligações do tipo (1→4). Esta mostrou-se similar àquelas obtidas por extração com KOH a 2% (10ESFK2 e 10RSFK2), porém a mesma não apresentou unidades de β-Glcp contendo ligações do tipo (1→6).

A maioria das β -glucanas de basidiomicetos citadas na literatura, e que apresentam o mesmo tipo de cadeia principal, são substituídas em O-6 por unidades terminais não redutoras de β -Glc_p ou por cadeias laterais formadas de unidades de β -Glc_p-(1→6)- ligadas (YOSHIOKA et al., 1985; MIZUNO et al, 1992; TABATA et al., 1981; SONE; KAKUTA; MISAKI, 1978).

Estrutura similar à isolada no presente estudo foi observada em *Ganoderma lucidum*, a qual apresenta cadeias laterais formadas por unidades de β -Glc_p-(1→4)- ligadas as quais substituem as unidades da cadeia principal em O-2, diferente do observado neste trabalho, onde este tipo de ramificação ocorre em O-6. Além disso, a glucana de *G. lucidum* contém cadeias laterais constituídas por unidades de β -Glc_p-(1→6)- ligadas substituindo a posição O-6 (SONE et al., 1985).

Embora β -glucanas sejam estruturas comuns em basidiomicetos, há uma grande diversidade estrutural, sendo que até a presente data não há relato nestes organismos de polímeros com altas proporções de unidades de β -Glc_p-(1→4)- ligadas. Desta maneira, devido a estrutura obtida não ser comum, torna-se necessário análises adicionais para a caracterização fina da molécula.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir das extrações aquosas e alcalina a 2, 10, 20 e 30% do corpo de frutificação do basidiomiceto *Ganoderma multiplicatum* sugerem as seguintes estruturas:

- a) um polissacarídeo ramificado obtido a partir das frações solúveis das extrações com KOH 2%, sendo constituído, principalmente, por glucose. Os dados de metilação sugerem unidades de *Glc*_p 3-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*- e 3,6-di-*O*- substituídas;
- b) uma glucana linear, com ligações do tipo β -(1→3), denominada de laminarana, obtida do precipitado de ácido acético das extrações com KOH a 20%;
- c) uma glucana com cadeia principal do tipo β -(1→3) ramificada em O-6 por cadeias laterais de β -D-*Glc*_p-(1→4), proveniente das frações solúveis das extrações com KOH 30%.
- d) uma xilomanana, com cadeia principal composta por unidades de α -D-*Man*_p ligadas (1→4) e parcialmente substituídas em O-3 por unidades terminais não de redutores de β -D-*Xyl*_p; originada do precipitado de Fehling da fração precipitada com ácido acético até pH 5,0 das extrações com KOH a 10%
- e) uma glucana contendo ligações do tipo α - e β - proveniente do sobrenadante de Fehling das extrações aquosas, porém a estrutura fina da molécula não foi determinada;
- f) um polímero composto principalmente por fucose, xilose e manose, o qual pode ser uma fucoxilomana, obtido a partir do precipitado de Fehling das extrações aquosas;

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.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4 ed., New York: John Wiley & Sons. 869 pp., 1996.

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

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H. Polysaccharides elaborated by *Polyporus ovinus* (Schaeff.). **Acta Chem. Scand.**, v. 23, p. 1815-1842, 1969.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. Structure of the fucoxylomannan from *Polyporus pinicola* (Fr.). **Acta Chem. Scand.**, v. 23, p. 1597-1600, 1969.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; SVENSSON, S.; HAMMARSTRÖM, S. Polysaccharides elaborated by *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. **Acta Chem. Scand.**, v. 25, p. 3645-3650, 1971.

BAO, X.; DUAN, J.; FANG, X.; FANG, J. Chemical modifications of the (1→3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their properties and immunological activity. **Carbohydr. Res.**, v. 336, p. 127-140, 2001a.

BAO, X.; LIU, C.; FANG, J.; LI, X. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohydr. Res.**, v. 332, p. 67-74, 2001b.

BARRETO-BERGTER, E; GORIN, P. A. J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 41, p. 67-103, 1983

BHAVANANDAN, V. P.; BOUVENG, H. O.; LINDBERG, B. Polysaccharides from *Polyporus giganteus*. **Acta Chem. Scand.**, v. 18, p. 504-512, 1964.

BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.). **Carbohydr. Res.**, v. 10, p. 79-85, 1969.

BOUVENG, H. O.; FRASER, R. N.; LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). Water-soluble mycelium polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 4, p. 20-31, 1967.

CARBONERO, E. R. Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes fotobiontes. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 120p, 2005.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2249-2254, 2004.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushroom biology- a new discipline. **Mycologist**, v. 6, p. 64-65, 1992.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; CHAVANT, L. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 413-415, 1996.

CHO, S. M.; KOSHINO, H.; YU, S. H.; YOO, I. D. A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.). **Carbohydr. Res.**, v. 37, p. 13-18, 1998.

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

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

CROAN, S. C. Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms. **Forest Prod. J.**, v. 54, n. 2, p. 68-76, 2004.

De BAETS, S.; VANDAMME, E. J. Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 1361-1366, 2001.

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

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

FRASER, R. N.; LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). **Carbohydr. Res.**, v. 4, p. 12-19, 1967.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, n. 8, p. 1212-1223, 1975.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 38, p. 13-104, 1981.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v. 128, p. 119-132, 1984.

GOTTLIEB, A. M.; WRIGTH, J. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. **Mycol. Res.**, v. 103, n. 6, p. 661-673, 1999.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 ed., New York: John Wiley & Sons. 458 pp., 1994.

HARA, C.; KIHIO, T.; TANAKA, Y.; UKAI, S. Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* FISCH. **Carbohydr. Res.**, v. 110, p. 77-87, 1982.

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

HOUGH, L.; JONES, J. K.N. Chromatography on paper. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 1, p. 21-31, 1962.

HUIE, C. W.; DI, X. Chromathographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. **J. Chromatogr. B**, v. 812, p. 241-257, 2004

JAKOVLJEVIC, D.; MILJKOVIC-STOJANOVIC, J.; RADULOVIC, M.; HRANISAVLJEVIC- JAKOVLJEVIC, M. On the mannogalactan from the fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quél. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 63, n. 2, p. 137-142, 1998.

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

JONG, S. C.; DONOVICK, R. Antitumor and antiviral substances of fungi. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 34, p. 183-262, 1989.

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

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.

KATO, K.; MUTOH, K.; EGASHIRA, T.; HIURA, M.; UENO, Y. Chemical heterogeneity of β -D-glucan in sclerotia of *Grifora umbellata* (Fr.) Pilát. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, n. 5, p. 1073-1074, 1978.

KATO, K.; INAGAKI, T.; SHIBAGAKI, H.; YAMAUCHI, R.; OKUDA, K.; SANO, T.; UENO, Y. Structural analysis of the β -D-glucan extracted with zinc chloride from the fruit body of *Grifola frondosa*. **Carbohydr. Res.**, v. 123, p. 259-265, 1983a.

KATO, K.; INAGAKI, T.; TERANISHI, T.; YAMAUCHI, R.; OKUDA, K.; SANO, T.; UENO, Y. Structural analysis of the alkali-soluble β -D-glucan from the fruit body of *Grifola frondosa*. **Carbohydr. Res.**, v. 124, p. 247-252, 1983b.

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.

KIM, S. Y.; JUANG, H. S. Phylogenetic relationships of the Aphyllophorales inferred from sequence analysis of nuclear small subunit ribosomal DNA. **J. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 122-131, 2000.

MACHADO, M. J.; GORIN, P. A. J.; TORRI, G.; IACOMINI, M. The occurrence of glycolipids in the lichen *Ramalina celastri*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 523-526, 1994.

MA, Y.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a chinese mushroom, "Huangmo", the fruit body of *Hohenbuchelia serotina*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n. 11, p. 2701-2710, 1991.

MISAKI, A.; KAKUTA, M.; SASAKI, T.; TANAKA, M.; MIYAJI, H. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)-β-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharide containing (1→3) glycosidic linkages. **Carbohydr. Res.**, v. 92, p. 115-129, 1981.

MISAKI, A.; NASU, M.; SONE, Y.; KISHIDA, E.; KINOSHITA, C. Comparison of structure and antitumor activity of polysaccharides isolated from *Fukurotake*, the fruiting body of *Volvariella volvacea*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, n. 9, p. 2171-2183, 1986.

MIYAZAKI, T.; OIKAWA, N.; YADOMAE, T.; YAMADA, H. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. **Carbohydr. Res.**, v. 69, p. 165-170, 1979.

MIYAZAKI, T.; NISHIJIMA, M. Studies on fungal polysaccharides. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 12, p. 3611-3616, 1981.

MIYAZAKI, T.; NISHIJIMA, M. Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of fungus *Ganoderma lucidum*. **Carbohydr. Res.**, v. 109, p. 290-294, 1982.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N.; KUBOYAMA, R. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from *Maitake*, *Grifola frondosa*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, n. 7, p. 1679-1688, 1986.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, n. 11, p. 2897-2905, 1990b.

MIZUNO, T.; ANDO, M.; SUGIE, R.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; MATSURA, A. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, *Ningyotake*, the fruit body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 56, n. 1, p. 34-41, 1992.

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

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murill. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 7, n. 4, p. 707-714, 1999.

MOHAČEK-GROŠEV, V.; BOŽAC, R.; PUPPELS, G. J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. **Spectrochim. Acta A**, v. 57, p. 2815-2829, 2001.

MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigation. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 1135-1140, 2004.

MUKUMOTO, T.; YAMAGUCHI, H. The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. **Carbohydr. Res.**, v. 59, p. 614-621, 1977.

OOI, V. E. C.; LIU F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr. Med. Chem.**, v. 7, p. 715-729, 2000.

PENG, Y.; ZHANG, L. Characterization of a polysaccharide-protein complex from *Ganoderma tsugae* mycelium by size exclusion chromatography combined with laser light scattering. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 56, p. 243-252, 2003.

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. **Tetrahedron Lett.** 34, 2919-2924, 1969.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2002 pp., 1998.

ROSADO, F. R.; CARBONERO, E. R.; KEMMELMEIER, C.; TISCHER, C. A.; 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.; 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 ostreaturoseus* Sng. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 119-124, 2003.

RYVARDEN, L. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with laccate pileus. **Mycologia**, v. 92, n. 1, p. 180-191, 2000.

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 Pap. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.

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

SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; GUERRINI, G.; NAGGI, A.; SASSAKI, G. L.; DELGOBO, C. L.; IACOMINI, M. Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2347-2355, 2004.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 1938-1845, 2002.

SONE, Y.; KAKUTA, M.; MISAKI, A. Isolation and characterization of polysaccharides of "Kikurage", fruit body of *Auricularia auricula-judae*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, n. 2, p. 417-425, 1978.

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.**, v. 49, n. 9, p. 2641-2653, 1985.

TABATA, K.; ITO, W.; KOJIMA, T. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* FRIES. **Carbohydr. Res.**, v. 89, p. 121-135, 1981.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.

UENO, Y.; ABE, M.; YAMAUCHI, R.; KATO, K. Structural analysis of the alkali-soluble polysaccharide from the sclerotia of *Grifora umbellata* (Fr.) Pilát. **Carbohydr. Res.**, v. 80, p. 257-264, 1980.

UENO, Y.; OKAMOTO, Y.; YAMAUCHI, R.; KATO, K. An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide (and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifora umbellata* (Fr.) PILÁT. **Carbohydr. Res.**, v. 101, p. 160-167, 1982.

UKAI, S.; YOKOYAMA, S.; HARA, C.; KIHNO, T. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of *Ganoderma japonicum* Lloyd. **Carbohydr. Res.**, v. 105, p. 237-245, 1982.

UKAWA, Y.; ITO, H.; HISAMATSU, M. Antitumor effects of (1→3)- β -D-glucan and (1→6)- β -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing). **J. Biosci. and Bioeng.**, v. 90, n. 1, p. 98-104, 2000.

USUI, T.; IWASAKI, Y.; HAYASHI, K.; MIZUNO, T.; TANAKA, M.; SHINKAI, K.; ARAKAWA, M. Antitumor activity of water-soluble β -D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, n. 1, p. 323-326, 1981.

USUI, T.; IWASAKI, Y.; MIZUNO, T. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* by employing a column of Concanavalin A-Sepharose 4B. **Carbohydr. Res.**, v. 92, p. 103-111, 1981.

USUI, T.; IWASAKI, Y.; MIZUNO, T.; TANAKA, M.; SHINKAI, K.; ARAKAWA, M. Isolation and characterization of antitumor active β -D-glucan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. **Carbohydr. Res.**, v. 115, p. 273-280, 1983.

VINOGRADOV, E.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. O.; WASSER, S. The structure of glucuronoxylomannan produced by culinary-medicinal yellow brain mushroom (*Tremella mesenterica* Ritz.: Fr., Heterobasidiomycetes) grown as one cell biomass in submerged culture. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 1483-1489, 2004.

WANG, G.; ZHANG, J.; MIZUNO, T.; ZHUANG, C.; ITO, H.; MAYUZUMI, H.; OKAMOYO, H.; LI, J. Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom *Songshan Lingzhi*, the fruit body of *Ganoderma tsugae*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, n. 6, p. 894-900, 1993.

WANG, Z.; LUO, D.; LIANG, Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. **Carbohydr. Polym.**, v. 57, p. 241-247, 2004.

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

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 258-274, 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.

YILDIZ, A.; KARAKAPLAN, M.; AYDIN, F. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr.) Kum. var. *saligns* (Pers. ex. Fr.) Konr. Et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carphores. **Food Chem.**, v. 61, p.127-130, 1998.

YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITO, H.; UEHARA, N.; FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) QuéL.: isolation and structure of a β -glucan. **Carbohydr. Res.**, v. 140, p. 93-100, 1985.

ZHANG, H. N.; HE, J. H.; YUAN, L.; LIN, Z. B. In vitro and in vivo protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. **Life Sciences**, v. 73, p. 2307-2319, 2003.

ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; SHIMADA, A.; ITO, H.; SUZUKI, C.; MAYUZUMI, Y.; OKAMOTO, H.; MA, Y.; LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides

from a Chinese mushroom *Fengweigu* or *Houbitake*, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sings. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, n. 6, p. 901-906, 1993.

ZJAWIONY, J. K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 300-310, 2004.