

DIRCE LEIMI KOMURA

***Pleurotus eryngii*: ISOLAMENTO, CULTIVO E EXOPOLISSACARÍDEOS**

Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas, realizada durante o período de Agosto a Dezembro de 2006, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

Co-orientadores: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Dra. Elaine R. Carbonero

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

Esta monografia só se tornou possível pela presença de pessoas que me motivaram a seguir na busca de desvendar mistérios da Bioquímica com todo apoio, amor e carinho.

Primeiramente, agradeço a Deus e à minha família. Minha Mamãe e meu Pai, que me trouxeram a este mundo maluco, ao meu irmão que juntos pudemos trocar muitas experiências desde a infância. A esta família que soube entender as minhas estadas longe de casa e com que pude contar com todo apoio.

Agradeço aos ótimos professores(as) de Biologia que me inspiraram.

Já nesta Universidade, agradeço aos ótimos amigos que encontrei, em especial, Jú, Ester, Marco, Fausto, Diogo e Vitor.

À Mimi, minha amiga e companheira de Apê, é muito bom saber que se pode contar com alguém, ainda mais longe de casa.

À Profa. Sionara Eliasaro (Departamento de Botânica-UFPR) de Fungos e Líquens que mostrou o quanto estes organismos são fantásticos e que me guiou a embarcar no Mundo da Bioquímica.

À Lucimara Cordeiro e ao Rodrigo Reis que foram os primeiros orientadores.

Ao Prof. Marcello Iacomini, quem eu acho que acredita em mim, por demonstrar carinho e confiança.

À Andrea com quem eu sempre pude contar em todos os momentos, principalmente em vésperas de entrega de Relatórios finais, Apresentações de EVINCIs. Ufa!! Me salvou de cada aperto, heheh!!!

À Elaine Carbonero (Super Nani), pois tenho aprendido muito com ela, pra mim ela é a minha mamãe científica!!

Às "meninas" Izabel e Juliana por todo apoio e pelas conversas e muitas risadas fizeram com que este trabalho se tornasse menos árduo.

À todos do Laboratório 247 (em reforma, heheh), 252 e anexo, Ricardo, Fernanda, Carol, Fhernandinha, Ana Helena, Larissa...

Ao Prof. Guilherme Sasaki e Prof. Miguel Nosedá pelas amostras de RMN e à Rosane pelas amostras no CG-EM.

À todos os pesquisadores e cientistas que se envolvem com o CG-EM, RMN e todas as técnicas para o estudo dos Polissacarídeos.

Aos Basidiomicetos "Cogumelinhos" que são organismos fascinantes e que guardam muitos mistérios para serem desvendados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vi
RESUMO	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 BASIDIOMICETOS – CARACTERÍSTICAS GERAIS	2
1.2 BASIDIOMICETOS – POLISSACARÍDEOS	4
1.3 BASIDIOMICETOS – EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)	6
1.4 CULTIVO EM CULTURA SUBMERSA	8
1.5 <i>Pleurotus</i> spp.	9
2 OBJETIVOS	11
3 MATERIAS E MÉTODOS	12
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	12
3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO	12
3.3 CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS	13
3.4 RECUPERAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS	14
3.5 PURIFICAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS	15
3.5.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo	15
3.5.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling	15
3.6 Análise estrutural dos exopolissacarídeos	16
3.6.1 Composição monossacarídica	16
3.6.2 Metilação dos exopolissacarídeos e hidrólise de Seaman	16
3.6.3 Degradação Controlada de Smith	17
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	17
3.7.1 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar	17
3.7.2 Análise da composição monossacarídica e de metilação	18
3.7.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 ISOLAMENTO DE <i>Pleurotus eryngii</i>	19
4.2 CULTIVO DE <i>Pleurotus eryngii</i>	20
4.3 PURIFICAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)	22
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPS	23
4.4.1 EPS Insolúvel em Água Fria	23

4.4.2 EPS Solúvel em Água Fria	25
5 CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Ciclo de vida dos basidiomicetos.....	3
FIGURA 2 – Basidiomas de <i>Pleurotus eryngii</i> em diferentes etapas de desenvolvimento	12
FIGURA 3 - Fluxograma de isolamento do micélio de <i>P. eryngii</i>	13
FIGURA 4 – Cultivo do micélio de <i>P. eryngii</i> em meio BDA	19
FIGURA 5 - Pré-inóculo de <i>P. eryngii</i>	20
FIGURA 6 – Cultivo micelial de <i>P. eryngii</i> em meio POL	21
FIGURA 7 - Fluxograma do processo de purificação dos exopolissacarídeos de <i>P. eryngii</i> ..	22
FIGURA 8 - FIGURA 8 – Espectro de RMN ¹³ C da fração B, em Me ₂ SO-d ₆ a 70 °C.	23
FIGURA 9 – Espectro de DEPT (região do C-6) da fração B, obtida de <i>P. eryngii</i>	24
FIGURA 10 - Espectro de RMN ¹³ C da fração B, após degradação de Smith, em Me ₂ SO-d ₆ a 70 °C.	24
FIGURA 11 - Perfil de eluição por HPSEC da fração A1 isolada de <i>P. eryngii</i>	25
FIGURA 12 - Espectro de RMN- ¹³ C da fração A1, em D ₂ O a 50 °C, obtida de <i>P. eryngii</i>	26
FIGURA 13 - Espectro de Espectro de ¹ H, ¹³ C HMQC da fração A1, obtida de <i>P. eryngii</i>	26
FIGURA 14 - Espectro de DEPT da fração A1, em D ₂ O a 50 °C, obtida de <i>P. eryngii</i>	27
TABELA 1 - Meio Batata-dextrose (BD).....	12
TABELA 2 - Meio de Cultura Líquido POL	14
TABELA 3 - Isolamento do micélio de <i>Pleurotus eryngii</i> em relação à concentração de hipoclorito utilizada	19
TABELA 4 - Análise de metilação da fração A1 isolada de <i>Pleurotus eryngii</i>	28

RESUMO

Muitos dos basidiomicetos conhecidos como cogumelos vêm se tornando populares devido as suas propriedades nutricionais e medicinais, recebendo grande destaque, principalmente, pela presença de carboidratos que podem atuar como modificadores de resposta biológica. Uma vez que a caracterização estrutural é importante para entender os efeitos biológicos apresentados por esta classe de polímeros, o presente trabalho teve como objetivos: o isolamento do basidioma em meio axênico, o cultivo e a elucidação dos polissacarídeos produzidos por *Pleurotus eryngii*, um dos cogumelos que vem recebendo destaque. O basidiomiceto *P. eryngii* foi isolado a partir de fragmentos do basidioma em meio BDA sólido (25 °C) e cultivado em cultura submersa em meio POL (ausência de luz, sob agitação por 10 dias), pois o cultivo submerso é uma forma rápida de produção de polissacarídeos extracelulares (EPS). Posteriormente o micélio foi removido por centrifugação (5,14 g.l⁻¹) e os exopolissacarídeos obtidos por precipitação com etanol (3:1, v/v) (EPS, 241 mg.l⁻¹). Os EPS (2,9 g) foram tratados com água a 100 °C por 3 h, sendo a fração solúvel (1,39 g) submetida ao processo de congelamento e degelo, resultando em um sobrenadante (fração A) e um precipitado (fração B). A fração B apresentou apenas glucose, sugerindo a presença de uma glucana. As análises espectroscópicas (RMN ¹³C e DEPT) indicam que este homopolímero apresenta ligações do tipo β-(1→3) e (1→6), e a cadeia principal formada por β-Glc-(1→3) foi confirmada por degradação de Smith. A fração A (574 mg) foi tratada com Solução de Fehling, a qual forneceu um complexo cúprico insolúvel (Fração A1, 275 mg), e quando analisada por HPSEC apresentou um perfil homogêneo e apenas manose como componente monossacarídeo (CG-EM), sugerindo tratar-se de uma manana. Baseado nos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados, esta fração mostrou-se altamente ramificada, contendo altas proporções de terminais não redutores de Manp. Também foram observados os derivados 2,3,4-Me₃Man e 3,4-Me₂Man, 2,4,6-Me₃Man, e 3,4,6-Me₃Man, correspondentes as unidades da cadeia principal e das ramificações, respectivamente. O espectro de RMN ¹³C apresentou três sinais na região anomérica que correspondem aos C-1 das unidades de Manp terminais não redutores e 3-O-substituída (δ 102.0), 2-O- substituída (δ 100.5) e 2,6- di-O-substituídas (δ 98.3). A configuração glicosídica do tipo α foi confirmada pelos valores de ¹H e ¹³C observados na análise de HMQC. De acordo com os dados obtidos, o polímero isolado é formado por uma cadeia principal de α-Manp-(1→6), parcialmente substituídas em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais contém unidades de α-Manp 2-O- e 3-O-substituídas.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos tanto para fins alimentícios quanto medicinais, que antes se restringia aos países orientais, como a China e o Japão, vem cada vez mais se tornando popular.

No Brasil, a primeira espécie cultivada foi o Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), cujo cultivo em escala comercial foi iniciado nos anos 50, e sua popularização foi devido ao hábito alimentar na região Centro-Sul.

Outras espécies atualmente cultivadas no país são, principalmente, *Lentinus edodes* (Shiitake), *Agaricus brasiliensis* (syn. *A. blazei*; "Cogumelo do sol"), espécies do gênero *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus*, "cogumelo Ostra"; *P. ostreatoroseus*, "salmão"; *P. eryngii*), entre outros.

As espécies de *Pleurotus* compõem um grupo de cogumelos distribuído em praticamente todo o mundo, sendo freqüentemente encontrado nas matas brasileiras. Até a década de 70, o seu consumo era feito basicamente pela coleta destes cogumelos diretamente na natureza, a partir de então foi iniciado o cultivo em escala comercial.

A produção brasileira em 2004 foi de 28 mil toneladas, estimando-se que o consumo anual de cogumelos no Brasil seja de 30 gramas por habitante, o que caracteriza um consumo ainda muito baixo, uma vez que em países da Europa como a Alemanha, esse chega a 4 Kg/ ano por habitante (URBEN, 2006).

O aumento do consumo destes basidiomicetos se deve também, aos efeitos benéficos à saúde que têm sido difundidos na mídia, além disso, trabalhos científicos têm demonstrado a presença de carboidratos que podem levar a modificações de respostas biológicas, tais como, atividade antitumoral, imunomoduladora, hipoglicemiante, entre outras.

Os polissacarídeos de basidiomicetos podem ser obtidos a partir do basidioma, quando cultivados em substratos sólidos, como palha de arroz, serragem, toras, dentre outras. E também, a partir do cultivo submerso do micélio, que fornece tanto o próprio micélio para a posterior extração dos polissacarídeos e os exopolissacarídeos provenientes do meio de cultura.

A vantagem na obtenção dos exopolissacarídeos é que não há a necessidade de serem realizadas extrações com solventes, sendo possível obter polissacarídeos

em um período de tempo menor, quando comparado com o obtido a partir do basidioma.

Portanto, tendo em vista que a caracterização estrutural de polissacarídeos é importante para o entendimento dos efeitos biológicos apresentados por esta classe de polímeros, o presente trabalho se propõe a elucidar as estruturas dos exopolissacarídeos produzidos por *Pleurotus eryngii*.

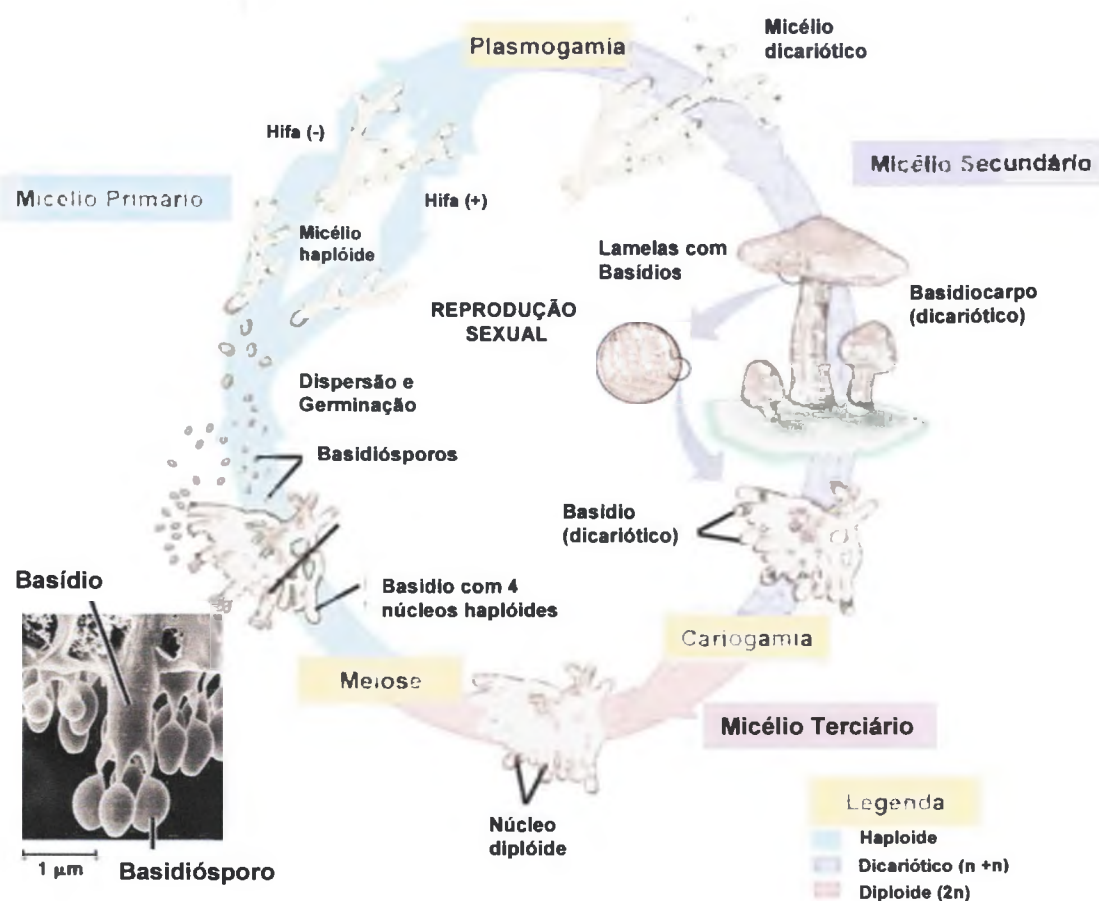
1.1 BASIDIOMICETOS – CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os organismos que compreendem o filo Basidiomycota (basidiomicetos) são os fungos conhecidos popularmente como cogumelos, orelhas-de-pau, ferrugem, entre outros.

Os basidiomicetos caracterizam-se por produzir basidiósporos, ou seja, esporos que se desenvolvem externamente a sua estrutura produtora, no caso chamada de basídio, e por apresentar micélio septado, com septos perfurados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A maioria dos basidiomicetos apresenta três fases de desenvolvimento: primário, secundário e terciário, completando desta forma o seu ciclo de vida (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL, 1996) (Figura 1). O micélio primário apresenta um estágio inicial multinucleado com posterior formação de septos, o qual faz com que cada compartimento celular apresente um único núcleo (mononucleado). Já o micélio secundário caracteriza-se por ser dicariótico, resultado da fusão de duas hifas monocarióticas. Um mecanismo observado em 50% das espécies de basidiomicetos para a manutenção da condição dicariótica em cada nova célula é a formação de grampos ou fibulas (*clamp connections*). Este processo permite que núcleos de hifas diferentes, após a divisão celular, resultem em hifas dicarióticas com núcleos distintos. O micélio terciário, que também é dicariótico, caracteriza-se por formar estruturas especializadas do basidioma (estruturas produtoras de esporos) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

FIGURA 1 – Ciclo de vida dos basidiomicetos



O corpo de frutificação ou basidioma de um basidiomiceto é a parte do fungo que emerge do substrato, ou seja, uma estrutura para a dispersão dos esporos e que geralmente é mantida apenas por um curto período de tempo. Além disso, as características do basidioma e dos esporos também são utilizadas para identificar as espécies deste grupo.

Os basidiomicetos são componentes essenciais em ecossistemas florestais, como na ciclagem de carbono, com a biodegradação de celulose e lignina, na remoção de substâncias tóxicas do ambiente, além de estarem presentes como micorrizas em plantas (STAMENTS, 2006). Segundo GOW e GADD (1995), os basidiomicetos foram responsáveis pela formação de ectomicorrizas, permitindo que as florestas se espalhassem dos trópicos para regiões temperadas, durante o período Cretáceo

No entanto, algumas espécies de basidiomicetos são parasitas de plantas, como as do gênero *Armillaria*, além de outras, que podem ser fitopatogênicas, podendo trazer prejuízos na agricultura, ou ainda, responsáveis por doenças em humanos, como *Filobasidiella neoformans*, conhecido como *Cryptococcus neoformans*, que acomete principalmente pacientes com AIDS causando meningite (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL, 1996).

Muitos dos cogumelos pertencentes ao grupo dos basidiomicetos são utilizados como alimento na China desde 5000 a.C. e seu cultivo tem pelo menos 1900 anos (ZHANXI; ZHANHUA, 2001), como exemplos tem-se *Lentinus edodes* e *Flammulina velutipes*.

A utilização destes basidiomicetos também é popularmente conhecida na medicina tradicional chinesa, como por exemplo, o *Ganoderma lucidum* (Ling Chih – “Cogumelo Rei”) um dos cogumelos mundialmente famoso por suas propriedades medicinais, no tratamento de hepatite crônica, hipercolesterolemia e hipertensão, entre outras (ZHANXI; ZHANHUA, 2001).

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

Os basidiomicetos são organismos interessantes de serem investigados, uma vez que desempenham inúmeros papéis ecológicos na manutenção da vida na Terra, além de produzirem inúmeras substâncias que podem ser utilizadas no tratamento de uma série de enfermidades humanas.

1.2 BASIDIOMICETOS – POLISSACARÍDEOS

Nos basidiomicetos, os polissacarídeos podem ser encontrados associados à parede e à membrana celular, dentro da célula (intracelular) e externamente à célula do fungo (extracelular). Podem ser encontrados na forma de homopolímeros,

heteropolímeros, glicoproteínas, peptideopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (GOW; GADD, 1995).

Os polissacarídeos para os basidiomicetos desempenham inúmeros papéis, tais como: reserva, composição da estrutura da parede celular, entre outros (RUIZ-HERRERA, 1991).

Nestes organismos os principais polissacarídeos encontrados constituindo a parede celular são: a quitina e as glucanas com configuração do tipo beta (β) (BARTINICKI-GARCIA, 1968¹ apud MAZIERO, 1996).

Atualmente, 651 espécies de basidiomicetos de 182 gêneros foram estudadas em relação aos seus polissacarídeos (WASSER, 2002), e estes têm se destacado devido à possibilidade dos mesmos atuarem como modificadores de resposta biológica (atividade antitumoral, antiviral, imunológica, entre outros). Portanto, o isolamento e a caracterização estrutural destes polímeros se fazem necessários para um melhor entendimento dos mecanismos de ação dos mesmos.

Para a obtenção destas macromoléculas são realizadas extrações do basidioma ou do micélio, utilizando solventes como, água e soluções alcalinas em diferentes concentrações. Os polissacarídeos também podem ser obtidos a partir de culturas submersas, na forma de exopolissacarídeos (WASSER; WEIS, 1999). No entanto, a maioria dos trabalhos relata a estrutura dos polissacarídeos provenientes apenas do basidioma, sendo as glucanas e as heterogalactanas as mais comumente encontradas (WASSER; WEIS, 1999; MIZUNO, 1999; ZHANG et al., 2007).

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

A partir do basidioma e do micélio vegetativo de *Lentinus edodes* (Shiitake) foi descrita uma β -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3), apresentando substituições em O-6 por β -D-Glcp (HOBBS, 2000). Além deste basidiomiceto, estrutura similar a esta foi descrita para o corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatoroseus* e *P. eryngii* (CARBONERO et al., 2006) e *Pleurotus tuber-regium* (CHENGHUA et al., 2000).

¹ BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual review in Microbiology*, v. 22, p. 87-107, 1968.

DONG e colaboradores (2002) caracterizaram a partir do basidioma de *Agaricus blazei*, uma β -D-Glcp-(1→6)-ligada, com cadeias laterais constituídas de duas unidades de β -D-Glcp-(1→3)-ligada a cada três unidades de glucose. Além dessas estruturas, outras glucanas também foram descritas para este basidiomiceto, como uma β -D-Glcp-(1→6) linear (KAWAGASHI et al., 1989) e uma α -D-Glcp-(1→6)-(1→4) por MIZUNO e colaboradores (1990).

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

A partir do basidioma de *Pleurotus ostreatus* "florida" e *P. ostreatoroseus*, ROSADO e colaboradores (2003b) caracterizaram uma manogalactana parcialmente 3-O-metilada, composta de uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp e 3-O-Me- α -D-Galp ligadas (1→6), sendo parte desta, substituída em O-2 por β -D-Manp.

1.3 BASIDIOMICETOS – EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Os polissacarídeos que podem ser encontrados externamente às hifas dos basidiomicetos são conhecidos como polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS). Segundo PACE e RIGHELATO (1980) estes polímeros, são possivelmente sintetizados pelos mesmos mecanismos da síntese da parede celular ou semelhante a estes.

A síntese de exopolissacarídeos pode ocorrer externamente à célula, no caso das bactérias *Leuconostoc mesenteroides* e *Pseudomonas* spp., ou internamente com posterior transporte para fora da célula (PACE; RIGHELATO, 1980). Embora estes mecanismos não se encontrem bem descritos para os basidiomicetos, alguns trabalhos citam o papel fisiológico destes polímeros, conforme proposto pelos autores abaixo relatados.

Para CATLEY² (1992 apud MAZIERO, 1996), o gel formado pela hidratação

² CATLEY, B.J. The biochemistry of some fungal polysaccharides with industrial potential. In: D.K. ARORA; R.P. ELANDER; K.G. MUKERJI (eds.). Handbook of Applied Mycology. v. 4: Fungal Biotechnology. New York: Marcel Dekker, Inc., 1114 p., 1992

destes açúcares, previne a desidratação das células, possibilitando a aderência de uma célula à outra ou em determinadas superfícies. PITSON; SEVIOU; McDOUGALL (1993) sugerem a possibilidade de síntese dos EPS como material de reserva.

No basidiomiceto ectomicorrízico, *Paxillus involutus*, foi observado que a ligação do Zn^{2+} aos EPS presentes nas hifas, possibilita a sobrevivência destes fungos em ambientes tóxicos (COOKE; WHIPPS, 1993³ apud MAZIERO, 1996).

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

Quanto aos estudos referentes à estrutura química dos exopolissacarídeos, bem como quanto ao comportamento fisiológico e sua aplicação industrial e farmacêutica, estes são pouco explorados em comparação aos polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação. Dentre estes, pode ser observado que as estruturas mais comumente encontradas são as glucanas.

GUTIÉRREZ e colaboradores (1996) trabalhando com EPS de seis espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju*, *P. cornucopiae*, *P. floridanus* e *P. pulmonarius*) encontraram na fração insolúvel uma β -D-glucana com ligação (1→3), com unidades de glucose ramificando a cadeia principal em O-6 a cada duas ou três unidades de glucose.

Outros homopolímeros contendo galactose e manose, respectivamente, foram descritos por ROSADO e colaboradores (2002) a partir do exopolissacarídeo de *Pleurotus ostreatoroseus*, sendo uma α -D-galactana com ligações do tipo (1→4) parcialmente 3-O-metilada e uma α -D-manana ramificada.

Em relação aos heteropolissacarídeos, LIM e colaboradores (2005) caracterizaram, a partir de *Collybia maculata* uma galactomanana com cadeia principal formada por unidades de β -D-Manp-(1→3) substituída em O-6 por Galp.

³ COOKE, R. C.; WHIPPS, J.M. *Ecophysiology of Fungi*. Oxford: Bichwell Scientific Publications, 337 p., 1993.

A atividade biológica dos EPS de basidiomicetos vem sendo estudada, em *Grifola frondosa*, onde foi demonstrado efeito inibitório da expressão da matriz de metaloproteinase-1 em dermofibroblastos humanos, que sofreram a irradiação de UV. Este polímero trata-se de uma proteoglicana com 82,5% glucose e 9,8% galactose (BAE et al., 2005).

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

Em *Agaricus blazei*, por exemplo, foi observada atividade antitumoral, tanto dos polissacarídeos obtidos através do corpo de frutificação, do micélio em cultivo submerso e do meio de cultura líquido (EPS) (MIZUNO et al., 1990; FAN et al., 2007).

1.4 CULTIVO EM CULTURA SUBMERSA

Os exopolissacarídeos são obtidos principalmente por cultivo submerso do micélio de basidiomicetos. Contudo diversas condições de cultivos vêm sendo estudadas, e têm se observado que estes estudos fisiológicos são de grande importância na obtenção de polímeros estruturalmente distintos.

MAZIERO (1996) em sua tese de doutorado realizou um *screening* quanto à produção de exopolissacarídeos em cultivo submerso, utilizando 56 espécies de basidiomicetos, dentre os quais, cogumelos pertencem ao gênero *Pleurotus*. Este trabalho mostrou que muitos dos basidiomicetos apresentam um grande potencial biotecnológico, mas são necessários estudos detalhados para cada espécie para a otimização da produção de EPS.

O cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus ostreatus* "florida" em meio líquido POL mostrou que o tempo ótimo de incubação para a produção de EPS foi de 7 dias e para a produção de biomassa 9 dias, ainda foi estimado que concentrações menores de sulfato de amônio (2,5 mg/l) levaria a um aumento na produção de EPS para o *P. ostreatoroseus* (ROSADO et al., 2003a).

Em *Ganoderma applanatum* a temperatura e a concentração de glucose no meio foram fatores que levaram a uma produção diferenciada de exopolissacarídeo e biomassa micelial. Para um rendimento ótimo do EPS foi necessária uma

temperatura de 25 °C e uma concentração de 60 g de glicose por litro, enquanto que para a melhor obtenção de biomassa, a temperatura foi de 10 – 15 °C e uma menor relação da concentração de carbono/ nitrogênio (LEE et al., 2007).

FAN e colaboradores (2005) estudando diferentes condições nutricionais e ambientais para a produção de EPS em *Agaricus brasilienses*, observaram que a melhor fonte de carbono era a sacarose, à temperatura de 30 °C e pH de 6,1, levando, desta forma, a um aumento de 78,62% na produção de exopolissacarídeos.

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

1.5 *Pleurotus* spp.

Mais de 1000 espécies de *Pleurotus* foram descritas no mundo, no entanto aproximadamente 50 destas são reconhecidas como válidas para este gênero (GUZMAN, 2000). As dificuldades quanto à identificação taxonômica do gênero *Pleurotus* se devem à grande variação de espécies e sua ampla distribuição, assim como estudos genéticos e bioquímicos, nos quais estes organismos não foram bem determinados (GUZMAN, 2000).

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

Por apresentarem estas características, muitos cogumelos deste grupo têm sido utilizados na degradação de restos de matéria orgânica deixada pela agricultura, tais como casca de café, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar entre outros (LABARÈRE e BOIS, 2002). Desta forma o cultivo de *Pleurotus* para a alimentação humana vem se tornando uma forma de utilizar melhor estes recursos,

e ainda, os restos orgânicos deixados pelo fungo podem ser utilizados na alimentação bovina, uma vez que tem se observado que este material tem uma melhor digestibilidade comparado ao material não colonizado pelo cogumelo (ZADRAZIL, 1984⁴ apud LABARÈRE; BOIS, 2002).

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

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

Além do uso na culinária, a aplicação medicinal destes cogumelos, vem se tornando conhecida, devido aos estudos que têm mostrando atividade antitumoral, antioxidante, entre outras.

As propriedades antitumorais de polissacarídeos de vários basidiomicetos é freqüentemente citada na literatura. Em revisão feita por MIZUNO (1999), atribui-se tal atividade as glicoproteínas e xiloglucanas extraídas do basidioma de *Pleurotus sajor-caju*, enquanto que em *P. citrinopileatus* uma β -glucana proveniente de um complexo protéico estaria apresentando tal atividade.

LAVI e colaboradores (2006) observaram que uma α -glucana do micélio de *P. ostreatus* levou a indução de morte programada de células cancerígenas de colo de útero, inibindo sua proliferação.

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

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

⁴ ZADRAZIL, F. Microbial conversion of lignocellulose into fees. In: SUNDTAL; E. OWEN (eds.) **Development in animal and veterinary sciences**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral caracterizar estruturalmente os exopolissacarídeos obtidos de *Pleurotus eryngii*.

Sendo que, para o objetivo proposto as seguintes estratégias de ação foram traçadas:

- ☉ Isolar o micélio de *P. eryngii* através de fragmentos do basidioma do cogumelo em meio de cultivo;
- ☉ Cultivar o micélio de *P. eryngii* em cultura submersa com a finalidade de obter os exopolissacarídeos;
- ☉ Isolar, purificar e caracterizar estruturalmente os exopolissacarídeos obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O basidioma de *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. (Figura 2) foi adquirido no Mercado Municipal de Curitiba.

FIGURA 2 – Basidiomas de *Pleurotus eryngii* em diferentes etapas de desenvolvimento



3.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO

O isolamento foi feito a partir de pequenos fragmentos (em torno de 5 mm) da região interna do basidioma do basidiomiceto (Figura 3), os quais foram depositados em meio de cultivo BDA sólido (Tabela 1).

TABELA 1 - MEIO BATATA-DEXTROSE (BD)*

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

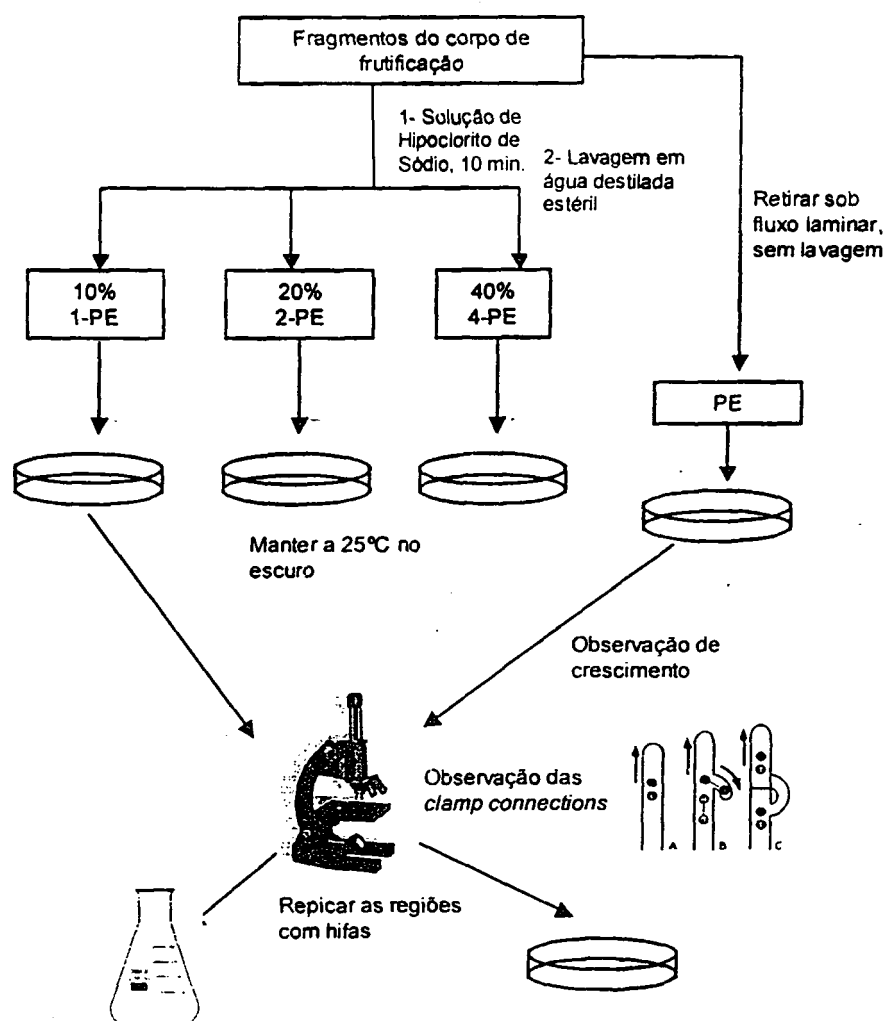
*Para o meio BDA sólido é adicionado 10 g de ágar ao meio BD

Fonte: CAVAZZONI; ADAMI, 1992⁵, citado por MAZIERO, 1996.

⁵ CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. Exopolisaccharides produced by micelial edible mushrooms. Italian Journal of Food Science, v. 1, p. 9-15, 1992.

Duas estratégias foram utilizadas: a) os fragmentos retirados do basidiomiceto foram lavados previamente com solução de hipoclorito de sódio (água sanitária) em diferentes concentrações, 10, 20 e 40% por 10 minutos, e posteriormente foram lavadas com água destilada estéril; ou b) os fragmentos foram retirados sob fluxo laminar sem este processo inicial e depositados diretamente no meio de cultivo (Figura 3).

FIGURA 3 – Fluxograma de isolamento do micélio de *P. eryngii*



As placas contendo fragmentos de *P. eryngii* foram mantidas a 25 °C, em ausência de luz. Análises do crescimento micelial, bem como das características

(presença de hifas septadas e de *clamp connections*) que indicassem tratar-se do basidiomiceto em estudo foram feitas diariamente.

3.3 CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

O micélio de *Pleurotus eyngii* isolado em meio de cultivo sólido foi inoculado para o meio líquido BD (Tabela 1), que foi incubado por 10 dias e utilizado como pré-inóculo para o meio líquido POL (Tabela 2).

TABELA 2 - MEIO DE CULTURA LÍQUIDO POL

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

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

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

Os cultivos no meio POL foram realizados em 12 frascos de 2000 ml contendo 1000 ml de meio, sob agitação, a 25 °C, em ausência de luz por 10 dias.

3.4 RECUPERAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Após 10 dias de cultivo, a biomassa micelial foi separada por meio de centrifugação. O meio líquido foi tratado com etanol (3:1, v/v), sendo o precipitado separado por centrifugação, dialisado, concentrado e liofilizado. Após este processo o material foi submetido a processos de purificação.

3.5 PURIFICAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Para a purificação dos exopolissacarídeos foram utilizados os processos usualmente empregados no Laboratório de Química de Carboidratos, tais como, congelamento e descongelamento, precipitação por formação de complexo solúvel e insolúvel em Cu^{2+} (Precipitação com solução de Fehling), entre outros.

3.5.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

A fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada e submetida ao congelamento e posterior descongelamento a temperatura ambiente. Esse processo leva a formação de um precipitado insolúvel em água fria, que foi separado por centrifugação (9000 r.p.m. por 15 min a 25 °C). Este processo foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante aquoso não apresentasse mais precipitado (GORIN; IACOMINI, 1985).

3.5.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling

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

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

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

3.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

3.6.1 Composição monossacarídica

Os materiais que foram submetidos à análise de composição monossacarídica passaram por processo de derivatização, que inicia-se com a hidrólise ácida total, passando para redução e acetilação, com a formação de acetatos de alditol.

A hidrólise ácida total foi realizada utilizando aproximadamente 1 mg da amostra que foi hidrolizada com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, por 8 horas a 100 °C ou com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 1 M, *overnight* a 100 °C. Após este período o ácido foi evaporado até *secura*.

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio até pH 9-10, sendo mantidos a temperatura ambiente por 15 horas. Após este período foi adicionado resina catiônica até pH 7, o material foi filtrado, seco em rotaevaporador e posteriormente co-destilado com metanol até total remoção do ácido bórico, na forma de borato de trimetila (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

O material reduzido e seco foi acetilado com anidrido acético e piridina (1:1, v/v), mantidos a temperatura ambiente, *overnight* (em torno de 12 horas). A reação foi interrompida com adição de água e extraída com clorofórmio. Após este processo o material foi lavado com solução de sulfato de cobre 5% para a remoção da piridina. Sulfato de sódio anidro foi adicionado à fase clorofórmica, e o material filtrado com algodão e seco em temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

3.6.2 Metilação dos exopolissacarídeos e hidrólise de Seaman

Para a metilação, alíquotas dos polissacarídeos (5-10 mg) foram solubilizadas em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a solubilização foi adicionado 1 ml de iodeto de metila (CH₃I) e hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado. Seguido de agitação vigorosa por 30 min., sendo então mantido em repouso *overnight*. Após este período o material foi neutralizado com ácido acético em banho de gelo, dialisado exaustivamente contra água corrente e liofilizado, repetindo-se este processo para garantir a total metilação do material (CIUCANU; KEREK, 1984).

A hidrólise total dos polissacarídeos metilados foi realizada com 0,5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (p/v); mantido em banho de gelo por 1 hora. Seguido por diluição com 4 ml de água destilada e mantido a 100 °C (10-18h) (SEAMAN et al, 1954).

Após o período necessário para hidrólise, o material foi neutralizado com carbonato de bário, centrifugado e reduzido com borohidreto de sódio deuterado (NaB^2D_4), e a acetilação foi feita como citado anteriormente (item 3.6.1).

3.6.3 Degradação Controlada de Smith

Em torno de 100 mg de amostra foi solubilizada em água, seguido da adição de NaIO_4 (periodato de sódio) 0,05 M (20 ml). O material foi mantido sob agitação, por 72 horas em ausência de luz. O processo de oxidação foi interrompido e o material foi dialisado em água corrente. Após a diálise o material foi reduzido com borohidreto de sódio (NaBH_4), com pH 9-10 por 24 horas (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; HAY; LEWIS; SMITH, 1965). Em seguida foi neutralizado com ácido acético (pH 7) e dialisado por 48 horas.

O material reduzido foi submetido à hidrólise ácida parcial com TFA até pH 2 por 40 minutos a 100 °C, sob refluxo. Após neutralização, o polissacarídeo foi dialisado (diálise fechada) em membrana com limite de exclusão de 2 kDa.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar

As análises de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizadas por meio de 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) $0,2 \text{ g.l}^{-1}$, numa concentração final de 1 mg de amostra por 1 ml de solvente e em seguida, filtradas através de membrana de acetato de celulose com limite de exclusão de $0,22 \mu\text{m}$.

Após estes procedimentos as amostras 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.

3.7.2 Análise da composição monossacarídica e de metilação

A determinação da composição monossacarídica e dos derivados per-O-metilados foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM).

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso VARIAN, modelo 3.300 acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.}$) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual em uma razão de $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$.

3.7.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

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

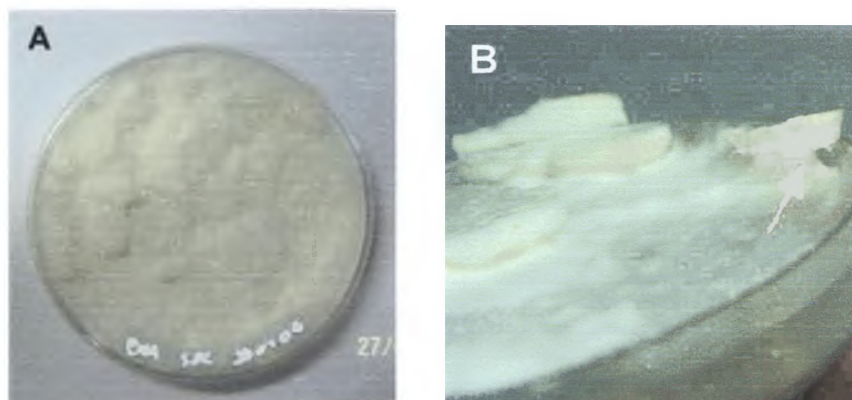
As análises foram feitas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $70 \text{ }^\circ\text{C}$, com as amostras sendo solubilizadas em D_2O (óxido de deutério) ou $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (dimetilsulfóxido deuterado), dependendo da solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D_2O são expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ^{13}C da acetona em $\delta 30,20$ e aos sinais do $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ em $\delta 39,7$, para as amostras solúveis no mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DE *Pleurotus eryngii*

O isolamento axênico (Figura 4), ou seja, sob condições estéreis foi obtido com crescimento micelial em 33,4% das placas quando os fragmentos foram lavados com solução de hipoclorito de sódio a 10% e quando estes não passaram por este processo, a porcentagem de placas que apresentaram crescimento micelial foi de 55,6% (Tabela 3).

FIGURA 4 – Cultivo do micélio de *P. eryngii* em meio BDA (A) Em meio BDA; (B) Detalhe do micélio e formação de EPS.



Concentrações acima de 20% de solução de hipoclorito de sódio, não apresentaram crescimento de contaminantes, bem como crescimento micelial.

TABELA 3 – Isolamento do micélio de *Pleurotus eryngii* em relação à concentração de hipoclorito utilizada

Amostras	Concentração de hipoclorito de sódio	Crescimento micelial axênico
PE	0%	55,6%
1-PE	10%	33,4%
2-PE	20%	0%
4-PE	40%	0%

Desta forma, sob fluxo laminar e utilizando materiais esterilizados para a retirada de fragmentos de regiões internas do basidioma foi um procedimento que se mostrou adequado para o isolamento micelial deste basidiomiceto.

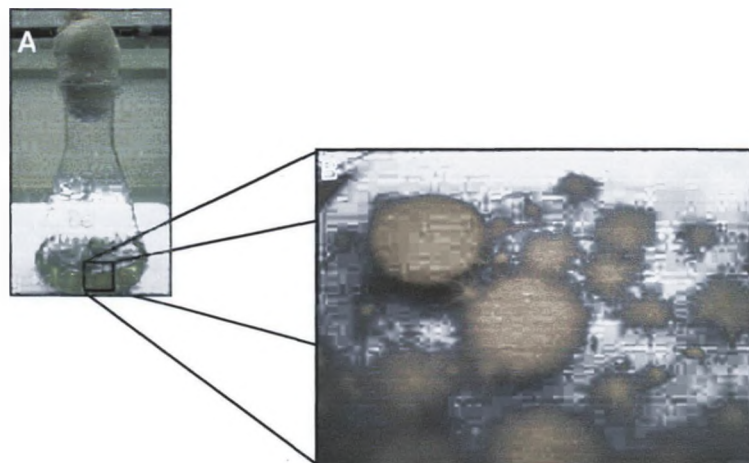
Procedimento semelhante foi descrito por ZHANXI e ZHANHUA (2001) e é conhecido por separação tissular, provavelmente derivado do isolamento de tecidos de vegetais.

4.2 CULTIVO DE *Pleurotus eryngii*

Após o isolamento micelial de *P. eryngii*, este foi primeiramente cultivado em meio líquido BD (pré-inóculo – Figura 5) e transferido para o meio POL (Figura 6) e desta forma foram obtidos 241 mg.l^{-1} de EPS após 10 dias de cultivo. Tal rendimento é considerado baixo, uma vez que dentre as espécies de *Pleurotus* estudadas por MAZIERO (1996), *Pleurotus ostreatus* foi a espécie que produziu o menor rendimento de EPS (570 mg.l^{-1}) em 7 dias de cultivo, e *Pleurotus* sp. “florida” foi a que produziu mais EPS ($2,85 \text{ g.l}^{-1}$) em 7 dias de cultivo.

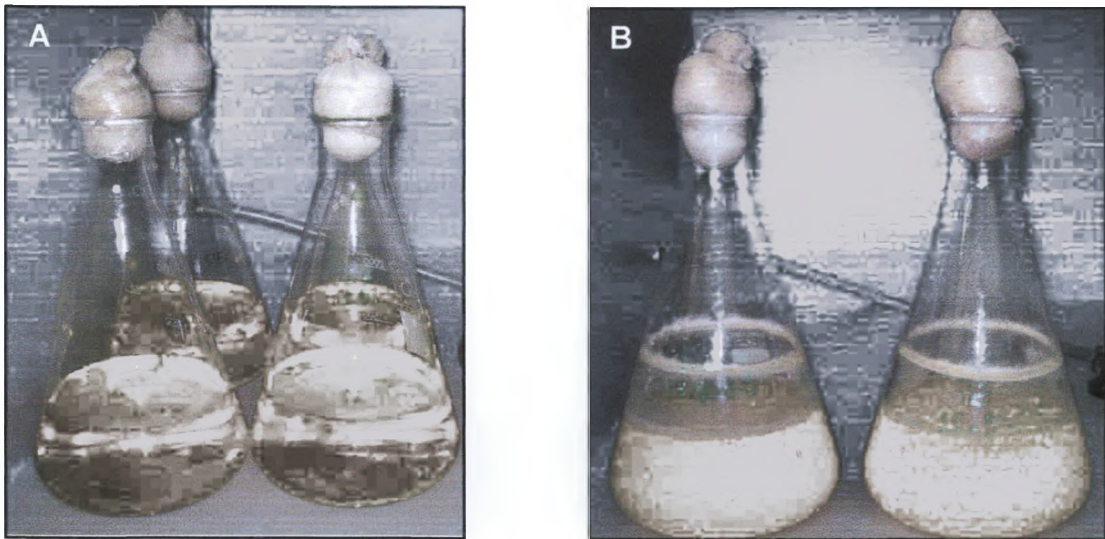
Provavelmente, o tempo de cultivo de *P. eryngii* (10 dias) foi determinante para um rendimento mais baixo de EPS, uma vez que, quando a disponibilidade de glucose no meio diminui, o EPS é utilizado como fonte de carbono por estes organismos.

FIGURA 5 - Pré-inóculo de *P. eryngii*. (A) Em meio líquido BD; (B) Detalhe do crescimento micelial.



Quanto à produção de biomassa micelial *P. eryngii* produziu $5,15 \text{ g.l}^{-1}$, um rendimento maior que em *P. ostreatus*, que produziu $4,50 \text{ g.l}^{-1}$ em cultivo de 14 dias. *Pleurotus* sp. "florida" também foi a espécie que obteve maior rendimento em biomassa em 14 dias ($11,72 \text{ g.l}^{-1}$) (MAZIERO, 1996).

FIGURA 6 – Cultivo micelial de *P. eryngii* em meio POL. (A) Início do cultivo; (B) Após 10 dias.



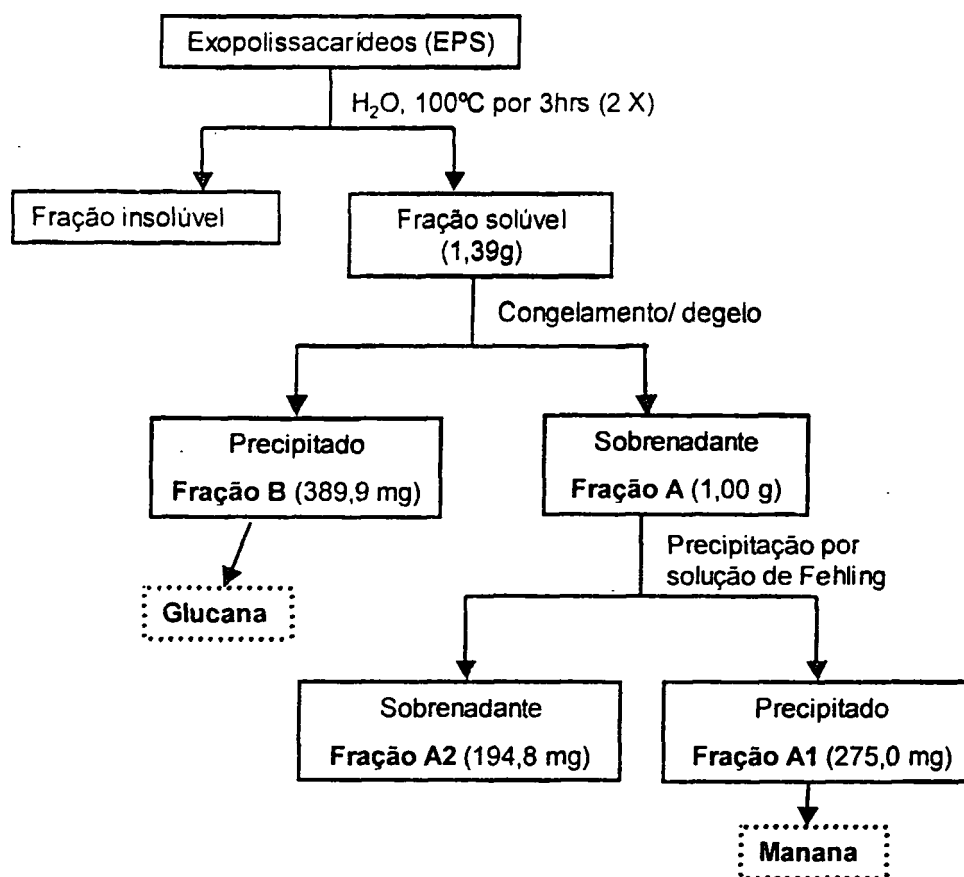
Dados relativos ao cultivo de basidiomicetos em meio líquido, mostram a existência de uma grande variação entre organismos do mesmo gênero com relação à produção de EPS e biomassa. Desta forma, estudos fisiológicos que buscam condições adequadas para a produção de EPS ou biomassa tornam-se necessários, uma vez que condições distintas como, o tempo de cultivo, devem ser levados em consideração (MAZIERO, 1996; ROSADO et al., 2003).

No entanto, para os propósitos deste trabalho o rendimento de EPS (241 mg.l^{-1}) foi suficiente para a caracterização estrutural dos mesmos, porém estudos fisiológicos mais detalhados, como concentração inicial de glucose, pH, tempo de cultivo e temperatura, são necessários para a otimização da produção destes polímeros para sua utilização com finalidade biotecnológica e farmacológica.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

A purificação dos exopolissacarídeos (2,9 g), provenientes de 12 L de meio de cultura, foi iniciada com o aquecimento do material em água destilada a 100 °C, obtendo-se 1,39 g de EPS solúvel. Este foi submetido ao tratamento por congelamento e degelo que forneceu uma fração precipitada (fração B) e uma fração sobrenadante (fração A) (Figura 7).

FIGURA 7 – Fluxograma do processo de purificação dos exopolissacarídeos de *P. eryngii*



A fração B, por análise de CG-EM, apresentou-se composta principalmente por glucose, caracterizando uma glucana. Enquanto, a fração A foi tratada com solução de Fehling, originando uma fração solúvel (A2, 194,8 mg) e um complexo cúprico insolúvel (Fração A1, 275 mg), o qual apresentou somente manose na composição monossacarídica, sugerindo se tratar de uma manana.

A fração A2 apresentou como principais monossacarídeos manose (33,9%), 3-O-Me-galactose (10,3%), galactose (13,7%) e glucose (28,3%), no entanto esta fração apresentou um perfil ainda heterogêneo, sendo necessários processos adicionais de purificação.

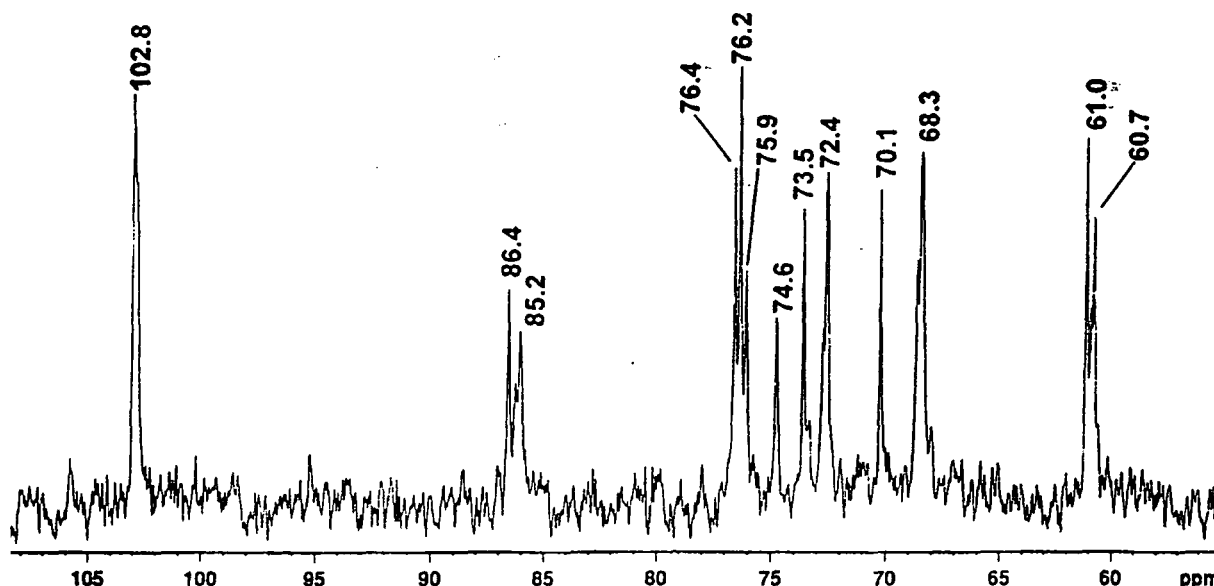
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

4.4.1 EPS Insolúvel em Água Fria

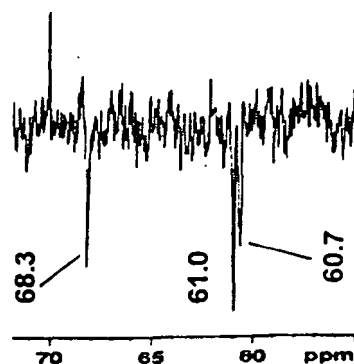
A fração B (precipitado de congelamento/degelo) apresentou apenas glucose como componente monossacarídeo por análise em CG-EM, sugerindo a presença de uma glucana.

O espectro de RMN ^{13}C da glucana (Figura 8) apresentou sinais na região anomérica em δ 102.8, sugerindo configuração do tipo β .

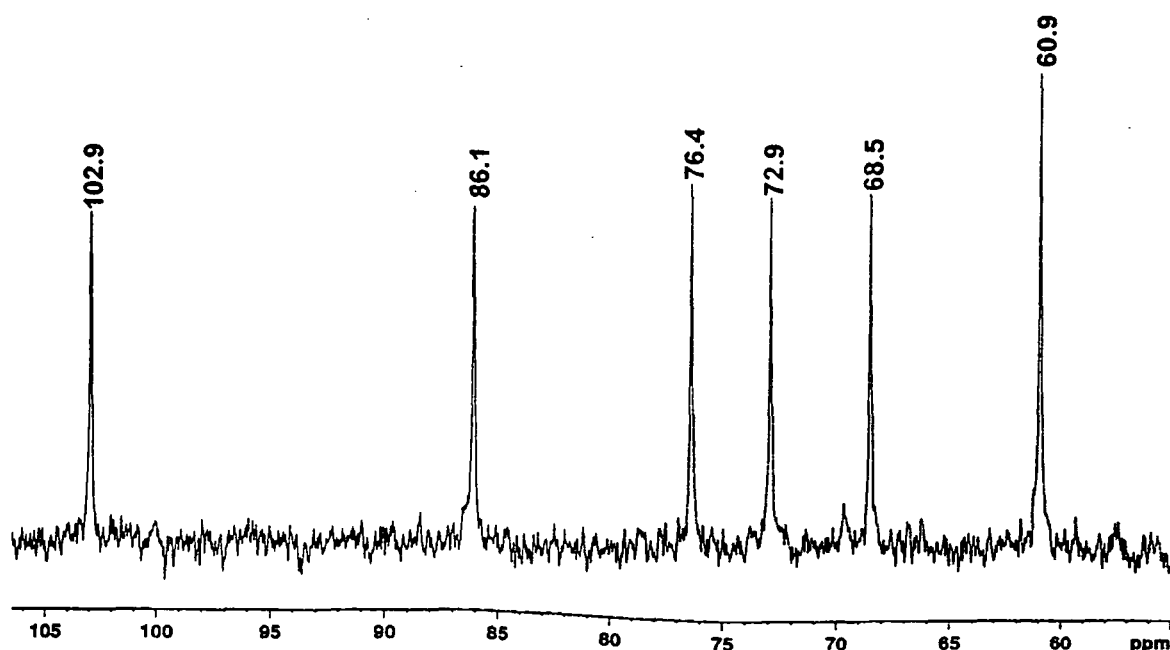
FIGURA 8 – Espectro de RMN ^{13}C da fração B, em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70 °C.



Os sinais em δ 86.4 e 85.2 referem-se a ligações do tipo (1 \rightarrow 3) enquanto que aquele em δ 68.3 sugere a presença de C-6 substituído, e C-6 livre em δ 61.1 e 60.7, os quais foram confirmados por inversão no espectro de DEPT (Figura 9).

FIGURA 9 – Espectro de DEPT (região do C-6) da fração B, obtida de *P. eryngii*

Com a finalidade de elucidar a cadeia principal deste polímero, uma alíquota desta fração foi submetida à degradação controlada de Smith. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 10) apresentou apenas 6 sinais característicos de uma glucana (1 \rightarrow 3) ligada. De acordo com os dados obtidos, esta fração corresponde a uma glucana contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3), sendo parte destas substituídas em O-6 por unidades de β -Glc p , além disto, análises de metilação estão sendo realizadas para a confirmação do grau de ramificação desta estrutura.

FIGURA 10 – Espectro de RMN ^{13}C da fração B, após degradação de Smith, em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70 °C

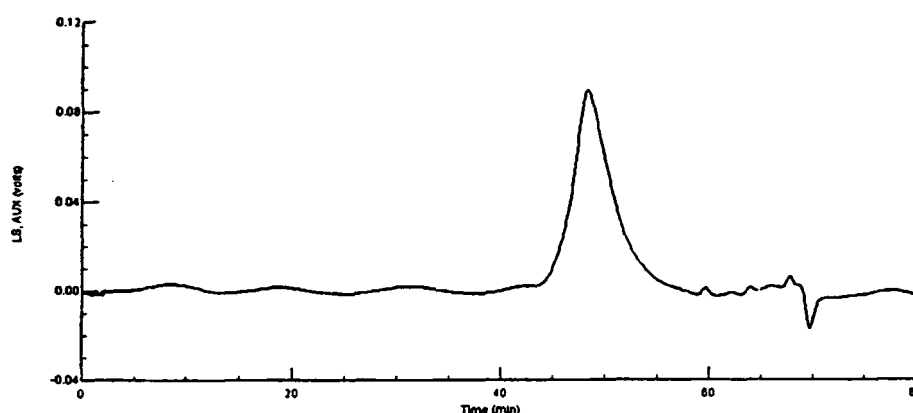
A glucana caracterizada neste trabalho é semelhante a encontrada por GUTIÉRREZ e colaboradores (1995), que estudando os EPS de seis espécies de *Pleurotus*, dentre estas, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju*, observaram na fração insolúvel uma β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3) ramificada em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada dois ou três resíduos da cadeia principal.

Em relação ao basidioma de *P. eryngii*, esta estrutura é similar, apresentando uma cadeia principal formada por β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3) ligada, ramificada em O-6 por unidades de β -D-Glcp (CARBONERO et al., 2006). Sugerindo que a glucana em questão pode ser obtida através do cultivo submerso, ou seja, por meio de uma maneira mais rápida de obter estes polímeros, quando comparado com o cultivo do basidioma, uma vez que não há a necessidade de realizar extrações prévias.

4.4.2 EPS Solúvel em Água Fria

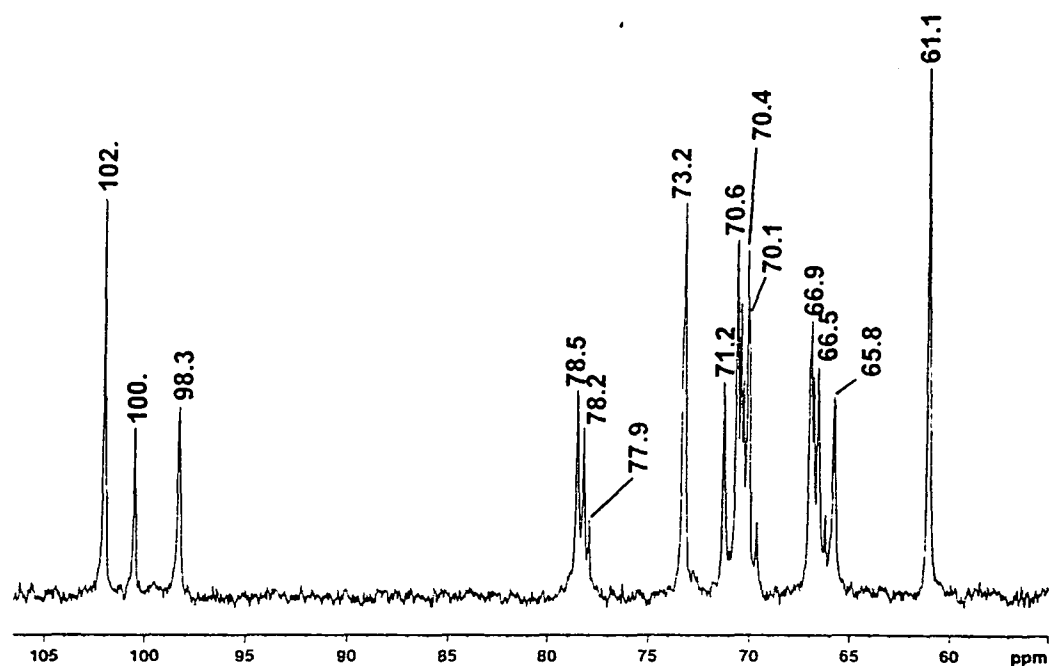
A fração A (574 mg) após o tratamento com Solução de Fehling, forneceu um complexo cúprico insolúvel (Fração A1, 275 mg), o qual apresentou apenas manose como componente monossacarídeo (CG-EM) e um perfil homogêneo por HPSEC (Figura 11), sugerindo tratar-se de uma manana.

FIGURA 11 - Perfil de eluição, análise em HPSEC da fração A1 isolada de *P. eryngii*.



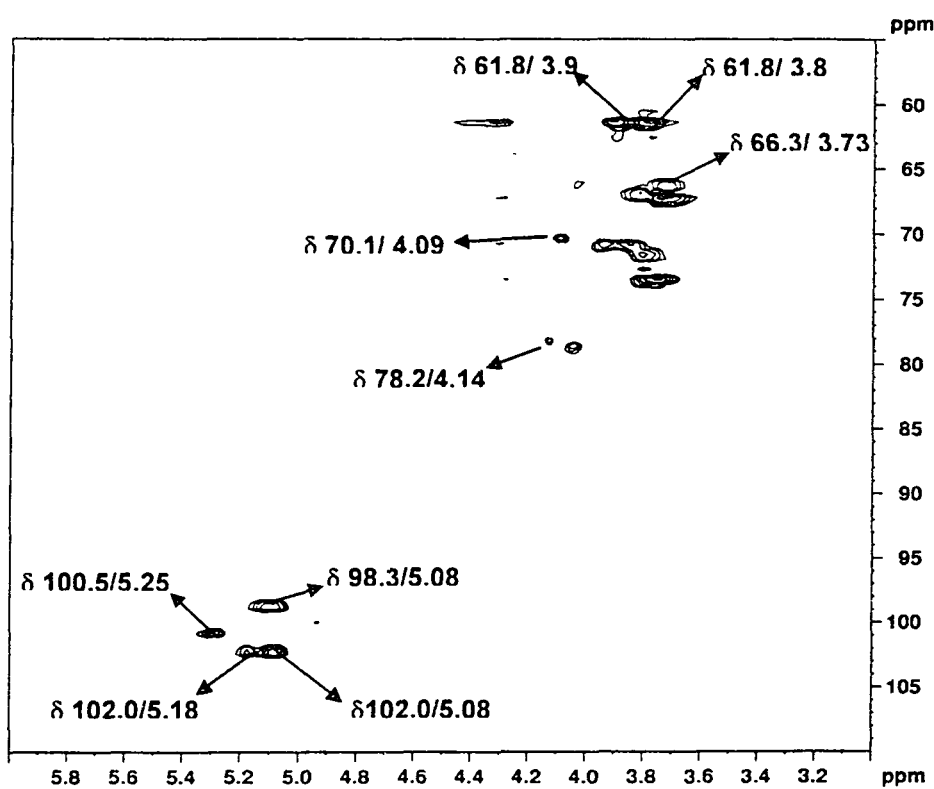
Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 12) e HMQC (Figura 13) desta fração apresentaram sinais na região anomérica que correspondem aos C-1/H-1 dos terminais não redutores (δ 102.0/ 5.18) e das unidades 3-O-substituídas (δ 102.0/ 5.08), 2-O- (δ 100.5/ 5.25) e 2,6-di-O-substituídas (δ 98.3/ 5.08) de α -Manp.

FIGURA 12 – Espectro de RMN- ^{13}C da fração A1, em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$, obtida de *P. eryngii*



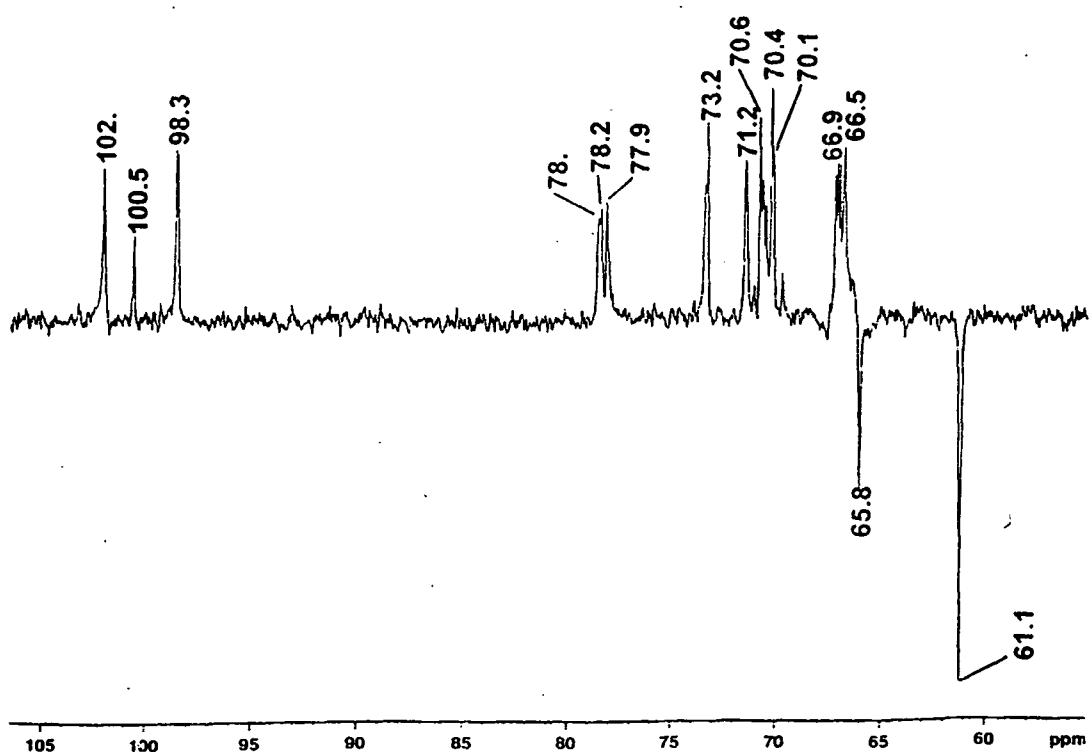
A configuração glicosídica do tipo α foi confirmada pelos valores de ^1H e ^{13}C observados na análise de HMQC, na região de campo mais baixo (figura 13). Os valores δ 5.18 e 5.08 referem-se aos terminais não redutores e unidades 3-O-substituídas de Manp, respectivamente.

FIGURA 13 - Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC da fração A1, obtida de *P. eryngii*



Os sinais em δ 78.5 e 78.2 sugerem C-2 ligado enquanto que aqueles em δ 65.8 e 61.1 referem-se ao C-6 substituído e não substituído, respectivamente. Estes -CH₂ substituídos e não substituídos foram confirmados pelo espectro de DEPT (Figura 14).

FIGURA 14 - Espectro de DEPT da fração A1, em D₂O a 50 °C, obtida de *P. eryngii*



A análise dos alditóis parcialmente O-metilados (Tabela 4), sugere a presença de uma estrutura ramificada, contendo altas proporções de terminais não redutores de Manp (28,9%). Também foram observados os derivados 2,3,4-Me₃Man e 3,4-Me₂Man, 2,4,6- e 3,4,6-Me₃Man, correspondentes às unidades da cadeia principal e das ramificações, respectivamente.

De acordo com os dados obtidos, esta fração é constituída por uma cadeia principal de α -Man β -(1 \rightarrow 6), parcialmente substituída em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais contêm unidades de α -Man β 2-O- e 3-O-substituídas.

TABELA 4 – Análise de metilação da fração A1 isolada de *Pleurotus eryngii*

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados*	Proporção (%)	Tipo de ligação
2,3,4,6-Me ₄ -Man	28,9	Man β -(1 \rightarrow
3,4,6-Me ₃ -Man	30,2	2 \rightarrow)-Man β -(1 \rightarrow
2,4,6-Me ₃ -Man	1,8	3 \rightarrow)-Man β -(1 \rightarrow
2,3,6-Me ₃ -Man	0,8	4 \rightarrow)-Man β -(1 \rightarrow
2,3,4-Me ₃ -Man	4,0	6 \rightarrow)-Man β -(1 \rightarrow
3,4-Me ₂ -Man	34,1	2,6 \rightarrow)-Man β -(1 \rightarrow

*Analisado em CG-EM após metilação, hidrólise ácida total (H₂SO₄ a 100 °C por 14 horas), redução (NaB²D₄) e acetilação.

A α -D-manana obtida a partir dos exopolissacarídeos de *P. eryngii* caracterizada neste trabalho é similar à encontrada em *P. ostreatoroseus* (ROSADO et al., 2002), porém não há descrição desta estrutura isolada a partir do basidioma das espécies de basidiomicetos estudadas até o presente momento.

No entanto, GORIN (1993) descreve estrutura similar em diversas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula subpelliculosa*, *Endomycopsis fibuliger*.

Os polissacarídeos caracterizados estruturalmente a partir do basidioma se diferem dos encontrados nos exopolissacarídeos, desta forma, estudos fisiológicos são necessários para o entendimento da síntese destes polímeros e se é possível de acordo com o meio de cultivo obter moléculas semelhantes, tanto no basidioma, quanto no EPS.

5 CONCLUSÕES

Isolamento e Cultivo:

- ⊗ Em 33,4% das placas com fragmentos de *Pleurotus eryngii* que foram lavados em solução de hipoclorito de sódio 10% foram isoladas culturas axênicas;
- ⊗ Em 55,6% das placas que continham fragmentos não lavados previamente apresentaram micélio de *P. eryngii* com crescimento axênico;
- ⊗ O cultivo em meio POL do micélio de *P. eryngii* apresentou um rendimento de biomassa micelial de 5,41 g.l⁻¹ e 241 mg.l⁻¹ de exopolissacarídeos, após 10 dias de crescimento.

Portanto, o método utilizado para o isolamento foi adequado, representando uma forma rápida para a obtenção de culturas livres de contaminação. O cultivo para obtenção de EPS apresentou um baixo rendimento comparando com outras espécies já estudadas, devendo ser otimizado, uma vez que o fator tempo foi limitante na produção do mesmo. Porém foi suficiente para caracterização estrutural.

Caracterização estrutural:

- ⊗ A fração B (precipitado por congelamento e degelo) parece ser composta por uma glucana com cadeia principal formada por β -Glc-(1 \rightarrow 3) e ramificada em O-6 por unidades de β -Glc_p;
- ⊗ A partir do precipitado do tratamento por solução de Fehling foi caracterizada uma manana constituída por uma cadeia principal de α -Manp-(1 \rightarrow 6), parcialmente substituídas em O-2 por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais contêm unidades de α -Manp 2-O- e 3-O-substituídas.

Neste trabalho, o cultivo de *P. eryngii*, em meio POL, produziu polissacarídeos, cuja estrutura fina foi caracterizada, sendo uma manana e uma glucana, e que provavelmente uma terceira estrutura faz parte da composição de polímeros presentes no EPS.

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**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- BAE, J.T.; SIM, G.S.; LEE, D.H.; LEE, B.C.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; YUN, J.W. Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 251, p. 347-354, 2005.
- CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; SMIDERLE, F.R.; ROSADO, F.R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydr. Res.**, v. 66, p. 252-257, 2006.
- CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G.; YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A β -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydr. Res.**, v. 328, p. 629-633, 2000.
- CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.
- DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.; FANG, J. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 1417-1421, 2002.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28: p. 350-356, 1956
- DYER, J.R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods Biochem. Anal.**, v. 3, p. 112-149, 1956.
- FAN, L.; SOCCOL, A.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT**, v. 40, p. 30-35, 2007.
- FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R.; EBINA, T. Tumor-specific and immunopotentiating effect of relatively low molecular weight products derived from the Basidiomycete, *Agaricus blazei* Murril. **Anticancer Res.**, v. 186, p. 267-273, 1999.

GORIN, P.A.J. **Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear na análise de oligo e polissacarídeos**. 115 p. Tese (Concurso para professor titular – Universidade Federal do Paraná, 1993).

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

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

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

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

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

GUZMAN, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. **Intern. J. of Medicinal Mushrooms**, v. 2, 29 p., 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

LEE, Y.; HUANG, G.; LIANG, Z.; MAU, J. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. **LWT**, v. 40, p. 823-833, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** 6^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

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

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

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

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

SINGER, R.; DIGILIO, P.L. Pródromo de la Flora Agariciana Argentina. **Lilloa-Revista de Botânica**, San Miguel de Tucuman, v. 25 125-131 e 471-473, 1952.

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

URBEN, A.F. Cogumelos cultivados no Brasil com a técnica "Juncao". In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS NO BRASIL E II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 2006, São Paulo. **Anais do Terceiro Simpósio Internacional de Cogumelos Comestíveis no Brasil e Segundo Simpósio sobre Cogumelos Comestíveis**. Brasília: EMBRAPA, 2006. p. 16-20.

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

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

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

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

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

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

ZHANXI, L.; ZANHUA, L. **Juncao Technology**. China: China Agricultural Sciencetech Press, 2001.