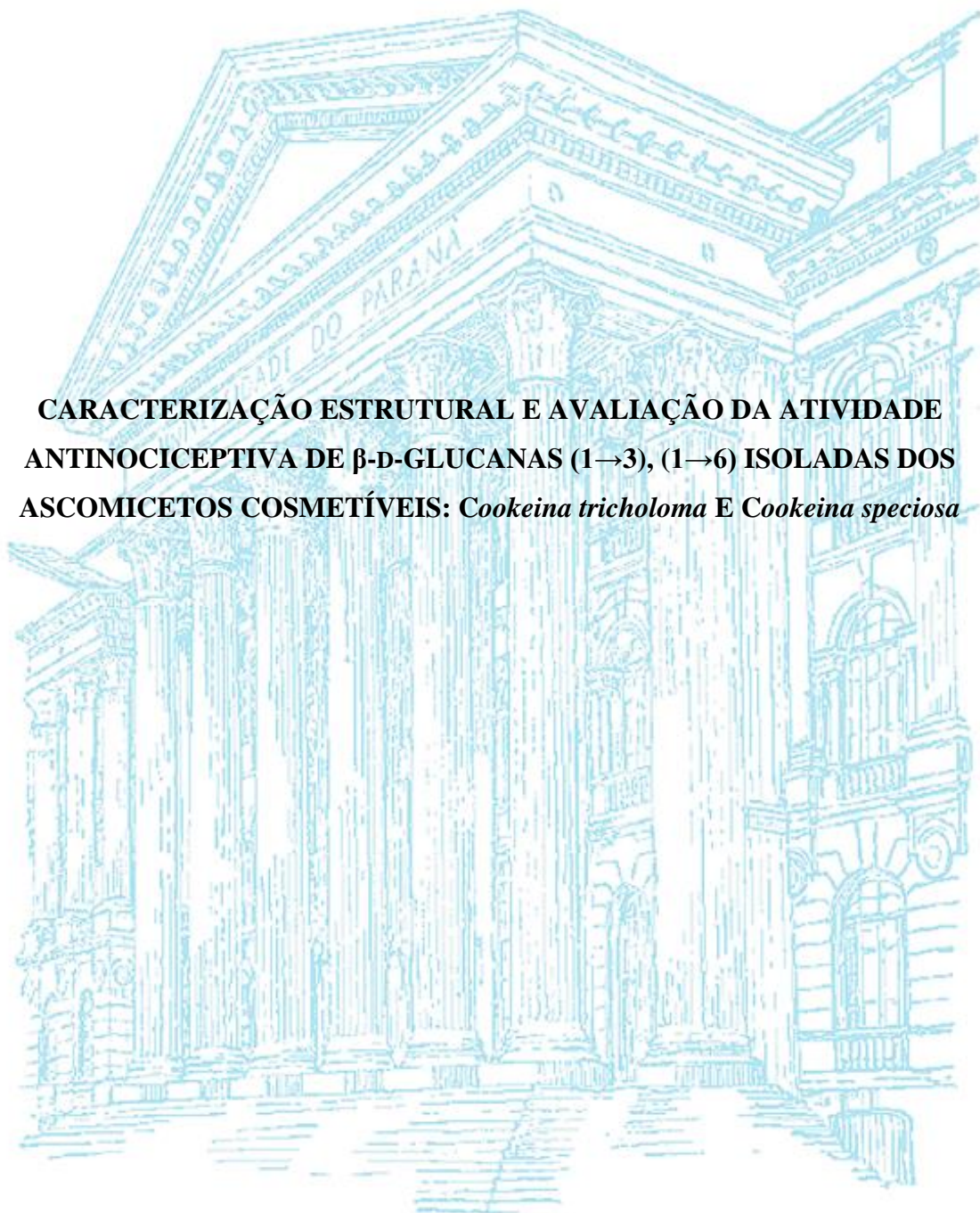


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTA BÁRBARA MORENO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DE β -D-GLUCANAS (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) ISOLADAS DOS
ASCOMICETOS COSMETÍVEIS: *Cookeina tricholoma* E *Cookeina speciosa***



CURTIBA

2015

ROBERTA BÁRBARA MORENO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DE β -D-GLUCANAS (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) ISOLADAS DOS
ASCOMICETOS COSMETÍVEIS: *Cookeina tricholoma* E *Cookeina speciosa***

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

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Co-orientadora: Dra. Andrea Caroline Ruthes

CURITIBA


2015

TERMO DE APROVAÇÃO

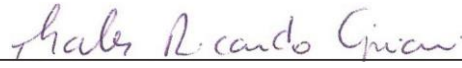
ROBERTA BARBARA MORENO CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DE J3-D-GLUCANAS (1---+3),(1---+6) ISOLADAS DOS
ASCOMICETOS COSMETÍVEIS: *Cookeina tricholoma* E *Cookeina speciosa*

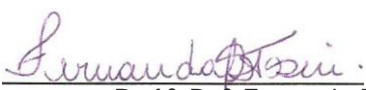
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



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



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



- Prof.ª Dr.ª Fernanda F. Simas Tosin
Departamento de Química, UFPR

Curitiba, 27 de agosto de 2015.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Co-orientadora: Dra. Andrea Caroline Ruthes

Dedico este trabalho àqueles que estiveram ao meu lado durante toda essa trajetória: meus pais Leila e Roberto, minha irmã Renata, meu namorado Thiago, meu orientador Prof. Dr. Marcelo Iacomini e minha co-orientadora Dra. Andrea.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer à Deus, por ter me guiado nesse caminho, colocando anjos ao longo de toda essa trajetória.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, de maneira especial:

Ao professor Dr. Marcello, meu orientador, pelos ensinamentos. Sou muito grata por ter me aceitado e acredito em mim, permitindo que eu fizesse parte do grupo de pesquisa de Química de Carboidratos.

À Dra Andrea, minha co-orientadora, por toda sua paciência e dedicação, por me acompanhar e orientar mesmo tão distante. Durante esses dois anos, sempre que precisei você esteve presente e sempre com todas as soluções para qualquer problema.

Às professoras Maria Fernanda de Paula Werner e Cristiane Hatsuko Baggio, do Departamento Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, por todo o auxílio na realização dos experimentos biológicos.

À minha ‘mamis’, Leila, por sempre se preocupar – “filha, não foi dormir ainda ?!”- e me incentivar –“Filha, não adianta se estressar, você precisa ter calma”.

Ao meu pai, Roberto, que sempre se preocupou com meus os estudos e sempre proporcionou meu aprimoramento.

À minha irmã, Renata, que mesmo sem entender uma vírgula de química se esforçava para me apoiar.

Às titias, Leda e Luziane, que a cada passo certo vibravam comigo e a cada tropeço me levantavam.

Às minhas amigas Nathalia, Liliane e Tamires, sempre presentes no *WhatsApp* prontas para me motivar e nunca me deixar desanimar. Sinto muito a falta de vocês e as amo muito.

Ao Thiago, meu namorado, que ficou ao meu lado o tempo todo. Presenciou todos os meus “pitis”- e em todos eles tentou me acalmar e me fazer entender que era só uma fase e que logo, logo passaria - uma hora porque iniciaria nova disciplina, em outra porque as análises de metilado não “batiam” e, no final, porque a defesa estava próxima. Muito obrigada, amo você.

Aos meus amigos do laboratório 247 por me receber, compartilhar conhecimentos, doar espaço nas bancadas, dividir angustias e gargalhadas. Andrea, Thaisa, Geórgia, Camila, esse trabalho também é de vocês. Muito obrigada pela amizade e companhia.

Aos colegas dos demais laboratórios, 250, 252 e E1, obrigada pela convivência e por compartilhar não apenas as bancadas, tubos de *vials* ou de RMN, mas por se mostrarem dispostos sempre.

À Dirce, por coletar e disponibilizar os materiais usados nesse trabalho.

À banca examinadora: Fernanda e Profº Thales.

Ao Prof. Guilherme e ao Arquimedes, pelas análises de RMN.

À Rosane, pelas análises em GC-MS.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À CAPES, pelo suporte financeiro e ao PRONEX Carboidratos.

Muito Obrigada !!!!

“ Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida, ou como um resultado que aponta uma nova direção. ”

Steve Jobs.

RESUMO

Os ascomicetos comestíveis *Cookeina speciosa* (Cs) e *Cookeina tricholoma* (Ct), encontrados em regiões tropicais e subtropicais de países como Brasil, Panamá e Costa Rica foram submetidos à sucessivas extrações exaustivas: aquosa a frio (CW) e a quente (HW), e alcalina (KOH 2%; K2). As frações polissacarídicas brutas obtidas a partir dos diferentes extratos foram fracionadas por congelamento e degelo, e as frações insolúveis (I) resultantes mostraram-se compostas por β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) -ligadas. Foram purificadas seis β -D-glucanas, com características estruturais diferentes, as quais foram determinadas através de análises de metilação, RMN- 13 C, degradação controlada de Smith e por análises de SEC. Todas as β -D-glucanas apresentaram cadeia principal, formada por unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3) -ligadas, mas com diferentes graus de ramificações. As cadeias laterais mostraram-se compostas, tanto apenas por cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6) -ligadas de diferentes extensões (ICW-Ct e ICW-Cs, IHW-Ct), quanto por uma mistura de cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6) -ligadas e unidades terminais não redutoras β -D-Glcp (IHW-Cs, IK2-Ct e IK2-Cs), substituindo a cadeia principal em O-6. Além de apresentar diferentes graus de ramificação, as β -D-glucanas também apresentaram diferentes pesos moleculares (M_w 3,7 – 8,2 x 10⁵ Da). Devido as diferenças estruturais observadas, diferentes graus e padrões de ramificação e M_w , nas diferentes β -D-glucanas purificadas, estas apresentaram-se como boas candidatas para avaliação da relação entre estrutura e atividade. O modelo de nocicepção induzida por injeção de formalina foi escolhido para avaliação das propriedades antinociceptivas das β -D-glucanas de *C. tricholoma* e *C. speciosa*. O tamanho das cadeias laterais e o peso molecular mostraram-se importantes na avaliação da atividade biológica, uma vez que a molécula IK2-Ct não mostrou atividade no modelo de antinocicepção utilizado. Já a fração IK2-Cs, apresentando menor quantidade relação de cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6) -ligadas, foi a fração que desempenhou atividade biológica mais significativa, com DI₅₀ 0,55 (0,32-0,93) mg kg⁻¹.

Palavras-chave: Ascomicetos, *Cookeina tricholoma*, *Cookeina speciosa*, β -D-glucanas-(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6), atividade antinociceptiva.

ABSTRACT

The edible ascomycetes *Cookeina speciosa* (*Cs*) and *Cookeina tricholoma* (*Ct*), found in tropical and subtropical regions of countries like Brazil, Panama and Costa Rica underwent successive exhaustive extractions: cold (CW) and hot water (HW) and alkaline (KOH 2%; K2). The crude polysaccharide fractions obtained from the different extracts were fractionated by freeze-thawing, and the resulting insoluble fractions (I) showed to be composed of (1→3), (1→6)-linked β -D-glucans. Six β -D-glucans were purified presenting different structural characteristics, which were determined by methylation analysis, ^{13}C -NMR, controlled Smith degradation and SEC analysis. All β -D-glucans showed a main chain formed by (1→3)-linked β -D-Glcp units, but with different degrees of branching. The side chains were shown to be composed, either only (1→6)-linked β -D-Glcp side chains of different extensions (ICW- *Ct*, ICW-*Cs* and IHW-*Ct*), or a mixture of (1→6)-linked β -D-Glcp side chains and single β -D-Glcp as non-reducing units (IHW-*Cs*, IK2-*Cs* and IK2-*Cs*) substituting the main chain at *O*-6. In addition to presenting different degrees of branching, the β -D-glucans also showed different molecular weights (M_w from 3.7 to 8.2 x 10⁵ Da). Due to the structural differences, difference in pattern and branching degree, and M_w presented by the purified β -D-glucans, they presented themselves as good candidates regarding the evaluation of structure-activity relationship. The model of nociception induced by formalin injection was chosen for evaluation of the antinociceptive properties of the β -D-glucans from *C. tricholoma* and *C. speciosa*. The length of the side chains and the molecular weight proved to be important when assessing the biological activity, since IK2-*Ct* showed no antinociceptive activity in the model used. On the other hand IK2-*Cs* exhibited a low ratio of (1→6)-linked β -D-Glcp side chains and was the fraction which displayed the most significant biological activity with ID₅₀ 0.55 (0.32 to 0.93) mg kg⁻¹.

Keywords: Ascomycetes, *Cookeina tricholoma*, *Cookeina speciosa*, (1→3), (1→6) β -D-glucan, antinociceptive activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO DA ESTRUTURA DE HÉLICE SIMPLES (A) E DE TRIPLA HÉLICE (B E B') DE B-D-GLUCANAS (1→3), (1→6) –LIGADAS	20
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Cookeina</i> : <i>C. colensoi</i> (A), <i>C. tricholoma</i> (B), <i>C. speciosa</i> (C), <i>C. sinensis</i> (D), <i>C. venezuelae</i> (E) E <i>C. insititia</i> (F).	23
FIGURA 3 - FOTO ILUSTRATIVA DOS COGUMELOS COMESTÍVEIS: <i>C. speciosa</i> (A) E <i>C. tricholoma</i> (B).	23
FIGURA 4 - POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE D-GLUCANAS NOS DIFERENTES SETORES: ALIMENTAR, FARMACÊUTICO E QUÍMICO.	27
FIGURA 5 - β-D-GLUCANAS RAMIFICADAS CONTENDO LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS (1→3), (1→6).	28
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA (ESQUERDA) E CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. edodes</i> (DIREITA) A) E ESQUIZOFILANA DERIVADA DE <i>Schizophyllum commune</i> (B).	30
FIGURA 7 - <i>Cookeina speciosa</i> (A); <i>Cookeina tricholoma</i> (B).	34
FIGURA 8 - ESQUEMA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS COGUMELOS <i>C. Tricholoma</i> E <i>C. speciosa</i>	42
FIGURA 9 - RESÍDUO APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA. <i>C. tricholoma</i> (A) E <i>C. speciosa</i> (B).	43
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN-13C DAS FRÇÕES CW-Ct (A) E CW-Cs (B).	44
FIGURA 11 - PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DOS EXTRATOS AQUOSOS A QUENTE DE <i>C. tricholoma</i> (A) e <i>C. speciosa</i> (B).	45
FIGURA 12- ESPECTRO DE RMN -13C DAS FRAÇÕES HW-Ct (A) E HW-Cs (B).	46
FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN -13C DAS FRAÇÕES K2-Ct (A) E K2-Cs (B).	48
FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR E TAMANHO MACROMOLECULAR (A); CONFORMAÇÃO EM SOLUÇÃO (B).	51
FIGURA 15 - ESPECTROS RMN 13C DAS FRAÇÕES DE β-D-GLUCANAS INSOLÚVEIS: ICW-Ct (A), IHW-Ct (B) E IK2-Ct (C); REALIZADOS EM Me ₂ SO-d ₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).	52
FIGURA 16 - ESPECTRO DE HSQC-DEPT DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS ICW-Ct (A), IHW-Ct (B) E IK2-Ct (C) DA ESPÉCIE <i>C. tricholoma</i> ; REALIZADOS EM Me ₂ SO-d ₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).	54
FIGURA 17- ESPECTROS DE RMN-13C DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH: SM-ICW (A), SM-IHW (B) E SM-IK2 (C) DE <i>C. tricholoma</i> ; β-D-GLUCANAS EM Me ₂ SO-d ₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).	55
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN-13C DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS DE <i>C. speciosa</i> : ICW-Cs (A), IHW-Cs (B) E IK2-Cs (C); REALIZADOS EM Me ₂ SO-d ₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).	57
FIGURA 19 - ESPECTRO DE HSQC-DEPT DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS ICW-Cs (A), IHW-Cs (B) E IK2-Cs (C) DA ESPÉCIE <i>C. speciosa</i> ; REALIZADOS EM Me ₂ SO-d ₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).	59
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN-13C DOS PRODUTO DA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DE <i>C. speciosa</i> : SM-ICW (A), SM-IHW (B) E	

SM-IK2 (C); β -D-GLUCANA EM Me ₂ SO-d ₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).	60
FIGURA 21 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DAS FRAÇÕES ICW-Ct, IHW-Ct, IK2-Ct, ICW-Cs, IHW-Cs E IK2-Cs NA FASE NEUROGÊNICA (A, B, C, D, E, F) E FASE INFLAMATÓRIA (G, H, I, J, K, L) NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR INJEÇÃO DE FORMALINA 2,5% EM CAMUNDOS).	62

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS À FRIO DE <i>C. tricholoma</i> E <i>C. speciosa</i>	43
TABELA 2- RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS À QUENTE DE <i>C. tricholoma</i> E <i>C. speciosa</i>	46
TABELA 3 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS DE <i>C. tricholoma</i> E <i>C. speciosa</i>	48
TABELA 4 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS D-GLUCANAS ISOLADAS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>C. tricholoma</i>	50
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR, TAMANHO MACROMOLECULAR E CONFOMAÇÃO DAS FRAÇÕES INSOLUVÉIS DE <i>C. tricholoma</i>	52
TABELA 6 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS D-GLUCANAS ISOLADAS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DO <i>C. speciosa</i>	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	–	Deslocamento químico
β	–	Configuração Beta
D	–	Conformação D
C-1	–	Carbono 1
C-2	–	Carbono 2
C-3	–	Carbono 3
C-4	–	Carbono 4
C-5	–	Carbono 5
C-6	–	Carbono 6
2,3,4,6 Me ₄ -Glc	–	2,3,4,6 Tetrametil glucose
2,3,4, Me ₃ -Glc	–	2,3,4 Trimetil glucose
2,4,6 Me ₃ -Glc	–	2,4,6 Trimetil glucose
2,4 Me ₂ -Glc	–	2,4 Dimetil glucose
1M	–	Um molar
2M	–	Dois molar
ACOH	–	Ácido Acético
CHCl ₃	–	Clorofórmio
CH ₂ O ₂	–	Ácido fórmico
DEPT-135	–	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DI ₅₀	–	Dose necessário para reduzir a resposta nociceptiva em 50%
DMSO-d ₆	–	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>f</i>	–	furanosídico
Gal	–	Galactose
GC-MS	–	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc	–	Glucose
HPLC	–	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	–	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy</i>
i.p.	–	Intraperitoneal
KDa	–	Quilodalton

KOH	–	Hidróxido de potássio
Man	–	Manose
Me	–	Grupamento metil (-CH ₃)
MeOH	–	Metanol
\bar{M}_n	–	Massa molecular numérica média
M_w	–	Massa molecular ponderal média
NaBD ₄	–	Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	–	Boroidreto de sódio
NaOH	–	Hidróxido de sódio
<i>p</i>	–	Piranosídico
ppm	–	Partes por milhão
per- <i>O</i> -metilado	–	Parcialmente <i>O</i> -metilado
R_g	–	Raio de giro
RMN- ¹³ C	–	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	–	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SEC	–	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
spp.	–	Espécies pertencentes ao mesmo gênero
TFA	–	Ácido trifluoroacético
v_{\square}	–	Gráficos logarítmicos
W	–	Distribuição de massa (<i>weight distribution</i>)
$\langle \bar{R}_g \rangle_w$	–	Raios de giro médios

LISTA DE SIGLAS DAS FRAÇÕES

Cs	–	Fração correspondente ao cogumelo <i>Cookeina speciosa</i>
Ct	–	Fração correspondente ao cogumelo <i>Cookeina tricholoma</i>
CW	–	Extração aquosa à frio
HW	–	Extração aquosa a quente
K2	–	Extração alcalina
ICW	–	Fração precipitada do gelo e degelo da extração aquosa à frio
IHW	–	Fração precipitada do gelo de degelo da extração aquosa a quente
IK2	–	Fração precipitada do gelo de degelo da extração Alcalina
SCW	–	Fração sobrenadante do gelo e degelo da extração aquosa à frio
SHW	–	Fração sobrenadante do gelo de degelo da extração aquosa a quente
SK2	–	Fração sobrenadante do gelo de degelo da extração Alcalina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 <i>COOKEINA SPP</i>	22
2.2 POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS	24
2.2.1 D-Glucanas	26
2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE B-D-GLUCANAS (1→3), (1→6)-LIGADAS	29
2.3.1 Atividade antinociceptiva de β-D-glucanas (1→3), (1→6)-ligadas.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODO	34
4.1 MATERIAIS DE ESTUDO	34
4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	34
4.2.1 Extração de Polissacarídeos	34
4.2.1.1 Extração Aquosa à Temperatura Ambiente.....	35
4.2.1.2 Extração Aquosa com Água Fervente	35
4.2.1.3 Extração Alcalina	35
4.2.2 Purificação dos Polissacarídeos.....	36
4.2.2.1 Congelamento e Descongelamento	36
4.2.2.2 Caracterização Estrutural dos Polissacarídeos	36
4.2.2.3 Hidrólise Ácida Total	36
4.2.2.4 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida Total.....	37
4.2.2.5 Degradação de Smith.....	37
4.2.2.6 Metilação das Frações Polissacarídicas.....	38
4.2.2.7 Hidrólise Ácida Total das Frações Polissacarídicas Após Metilação.....	38
4.2.3 Métodos Cromatográficos	38
4.2.3.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS).....	38
4.2.3.2 Determinação da Distribuição Da Massa Molar (M_w) por SEC	39
4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	40
4.3.1 Animais.....	40
4.3.2 Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina em Camundongos	40

4.3.3 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 EXTRAÇÃO AQUOSA À FRIO.....	42
5.2 EXTRAÇÃO À QUENTE	45
5.3 EXTRAÇÃO ALCALINA.....	47
5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	49
5.4.1 <i>Cookeina tricholoma</i>	49
5.4.2 <i>Cookeina speciosa</i>	56
5.5 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS B-D-GLUCANAS (1→3), (1→6)-LIGADAS ISOLADAS DE <i>C. TRICHOLOMA</i> E <i>C. SPECIOSA</i>	61
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos, comumente consumidos como alimento, são ditos comestíveis e/ou medicinais e são considerados como fonte de proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos, aminoácidos e minerais (BELLO; AKINYELE, 2007; BHANJA *et al.*, 2012). No Brasil o consumo de cogumelos ainda não é muito difundido, comparado com países orientais, como China e Japão, ou com países da Europa, mas tem aumentado ao longo dos últimos 50 anos, bem como a sua produção, o que é cerca de 20 mil toneladas / ano, e o país importa quase essa mesma quantidade (EMBRAPA, 2014).

Em todo o mundo, a diversidade de fungos é estimada em 5,1 milhões de espécies, mas atualmente apenas uma pequena porcentagem dessas espécies foi descrita (BLACKWELL, 2011). Grande parte dessa biodiversidade pode ser vista na Amazônia, onde o clima é muito favorável para o desenvolvimento desses organismos. Apesar do papel importante que os cogumelos têm de manter a floresta, muitas espécies são comestíveis e podem ter potenciais biológicos. Algumas tribos indígenas, tal como a *Yanomami*¹, os consomem como fonte de proteína (INPA, 2008). Os cogumelos encontrados nesta região são ainda desconhecidos do ponto de vista científico, tornando-os um tópico muito interessante de estudo.

Um grande número de estudos tem revelado que as diferentes espécies de cogumelos têm valor na prevenção e tratamento de inúmeras doenças (WASSER, 2002). Neste sentido, os cogumelos comestíveis são reconhecidos como alimentos funcionais por apresentarem compostos bioativos que oferecem diversos impactos benéficos sobre a saúde humana (ZHU *et al.*, 2015). Entre as diferentes substâncias bioativas já identificadas, os polissacarídeos têm recebido algum destaque, em especial, as D-glucanas. Essas têm sido vastamente isoladas, especialmente a partir de Basidiomicetos (REN *et al.*, 2012; SMIDERLE *et al.*, 2006) e apresentam uma abundância de propriedades biológicas, tais como, atividade hipoglicemia, anti-inflamatória, antimicrobiana, imunomoduladora, antiviral e, principalmente, antitumoral (SMIDERLE *et al.*, 2013).

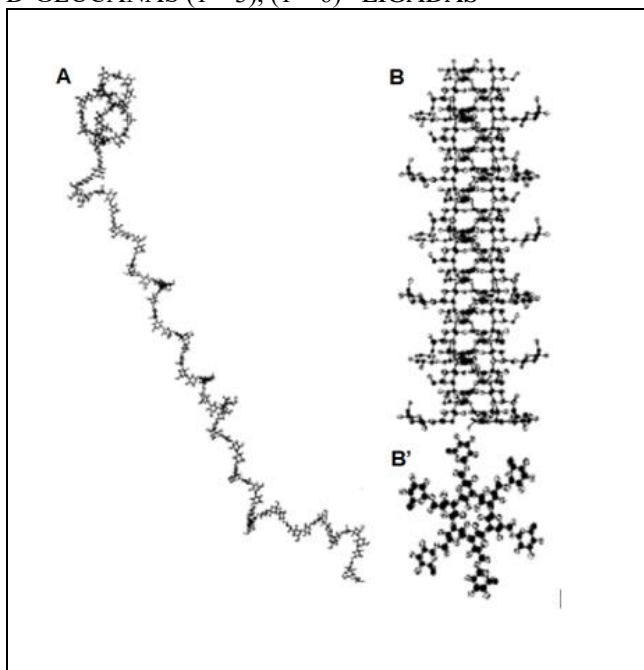
Cogumelos da classe dos ascomicetos são bem menos numerosos que aqueles da classe dos Basidiomicetos, mas têm atraído alguma atenção por causa de seus benefícios à saúde (GIAVASIS, 2013). Os polissacarídeos, bem como os efeitos produzidos por estes tipos de moléculas, tendo como fonte Ascomicetos, são principalmente relativas as espécies

¹ *Yanomami*: são índios caçadores-agricultores que habitam o Brasil e a Venezuela.

Cordyceps militaris e *Cordyceps sinensis*. Ambos são fungos entomopatogênicos, e considerados os mais importantes medicamentos na medicina tradicional chinesa, sendo altamente comercializados na China, Coréia e Japão (WANG et al. 2010; SMIDERLE et al., 2013;).

Em geral, D-glucanas isoladas de cogumelos consistem principalmente de uma cadeia principal de unidades β -D-glucose (1 \rightarrow 3)-ligadas, parcialmente substituídas em O-6 por cadeias laterais de unidades de β -D-glucose (1 \rightarrow 3)-ligadas, (1 \rightarrow 6)-ligadas e/ou unidades de β -D-glucose terminais não redutoras (MORADALI et al., 2007; BHANJA et al, 2014; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013; ZHU et al., 2015). A diferença no padrão de substituição implica na variação que a estrutura terciária assume quando em solução (ZHU et al., 2015). β -D-glucanas com pouca ou nenhuma ligação (1 \rightarrow 6) apresentam estrutura de hélice simples (FIGURA 1A), enquanto que aquelas apresentando graus mais elevados de ligações (1 \rightarrow 6) formam uma estrutura terciária na forma de hélice tripla (FIGURA 1B) (LORACHE; MICHAUD, 2007; NITSCHKE et al., 2011). Além disso, sabe-se que β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas, são nomeadas como modificadores da resposta biológica (MRB), pois são capazes de estimular de forma não específica o sistema de animais (BI et al., 2013).

FIGURA 1 - MODELO DA ESTRUTURA DE HÉLICE SIMPLES (A) E DE TRIPLA HÉLICE (B E B') DE β -D-GLUCANAS (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) -LIGADAS



FONTE: MAEDA et al. (2001)

As estruturas químicas das β -D-glucanas, tem relação direta com suas características de ligação com receptores biológicos, a conformação terciária que estas assumem em solução,

o peso molecular, a proporção de ramificação, a solubilidade em água e a carga do polímero (OKAZAKI et al., 1995; MORADALI et al., 2007). Portanto, a caracterização da estrutura química torna-se de fundamental importância para uma melhor compreensão das propriedades biológicas que tais polissacarídeos exercem.

Um trabalho recente descreve a forma como a estrutura em hélice tripla, em conjunto com o peso molecular, afetam positivamente a atividade biológica das β -D-glucanas (NITSCHKE et al., 2011). A conformação em tríplice hélice que algumas β -D-glucanas assumem em solução e presença de grupos hidrófilos localizados na superfície externa da hélice são importantes para suas atividades biológicas, especialmente a imunomoduladora, como por exemplo, relacionada a atividade antitumoral (MORADALI et al., 2007). Até o momento ainda há poucos dados na literatura que correlacionam as características estruturais com as propriedades biológicas apresentadas por esta classe de polissacarídeos.

Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar estruturalmente β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) -ligadas a partir de corpos de frutificação de duas espécies de ascomicetos, pertencentes ao mesmo gênero, *Cookeina tricholoma* e *Cookeina speciosa*, as quais não tinham sido previamente estudadas em relação ao seu conteúdo de polissacarídeos. Estas espécies caracterizam-se como comestíveis, amplamente consumidas no Panamá e por tribos indígenas encontradas na floresta amazônica (SÁNCHEZ; MARTIN; SÁNCHEZ, 1995). Uma vez que as β -D-glucanas isoladas mostraram diferenças de solubilidade, diferentes graus de ramificação e diferentes pesos moleculares, seu efeito antinociceptivo (SUTHERLAND, 1998), foi avaliado *in vivo*, a fim de melhor compreender de que maneira a estrutura está relacionada com os efeitos biológicos produzidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

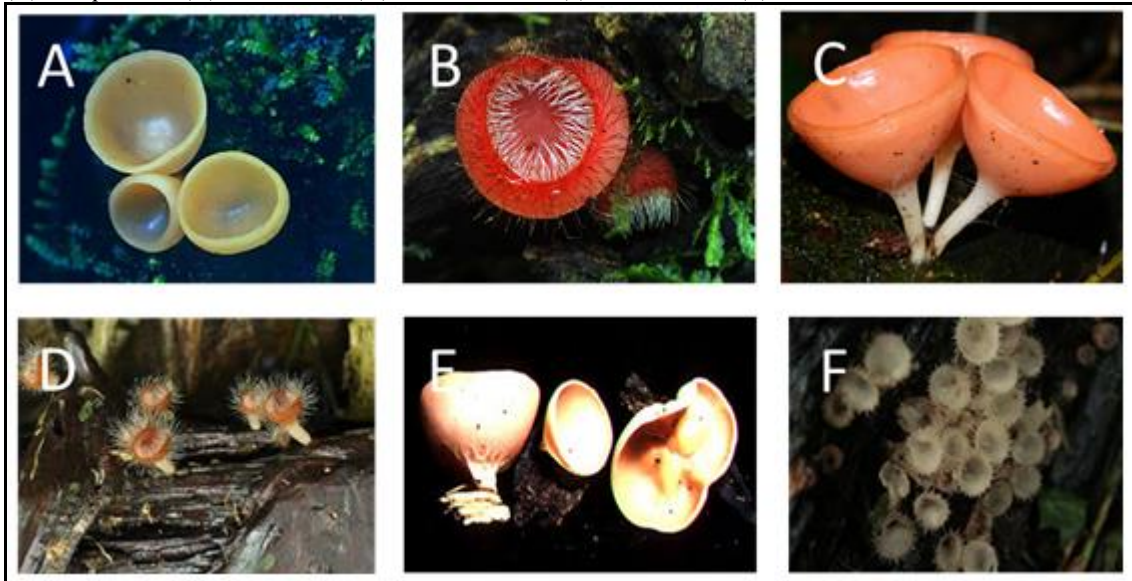
Neste capítulo serão apresentados os conceitos utilizados para a análise título deste trabalho. Os conceitos de *Cookeina* SPP, polissacarídeos de cogumelos e atividades antinociceptiva de β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas serão discutidos, bem como estes temas se relacionam na literatura e viabilizam a pesquisa proposta.

2.1 COOKEINA SPP

O gênero *Cookeina*, com sete espécies conhecidas, *Cookeina colensoi*, *Cookeina tricholoma*, *Cookeina speciosa* (=sulcipes), *Cookeina sinensis*, *Cookeina venezuelae*, *Cookeina insititia* e *Cookeina indica* (FIGURA 2), é um dos gêneros mais comuns encontrados na família Sarcoscyphaceae (Pezizales), e está presente principalmente em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (WEINSTEIN; PFISTER; ITURRIAGA, 2002).

Salvo algumas peculiaridades, micro e macroscópicas, são espécies comumente encontradas em troncos de árvores Angiospermas de regiões tropicais e subtropicais. A coloração das espécies pode variar do branco ao bege podendo ser amarelo, laranja, escarlate, e mesmo castanho chocolate (WEINSTEIN; PFISTER; ITURRIAGA, 2002). Morfologicamente as espécies distinguem-se pela combinação de várias características, incluindo a forma de ascósporos e relevo da superfície, a presença de pelos e origem apothecial e presença ou ausência de material gelatinoso na camada cortical do tecido excipular. A cor do himênio, atribuído a pigmentos carotenóides, é particularmente variável em algumas espécies, especialmente aqueles referidos como *C. speciosa* (WEINSTEIN; PFISTER; ITURRIAGA, 2002).

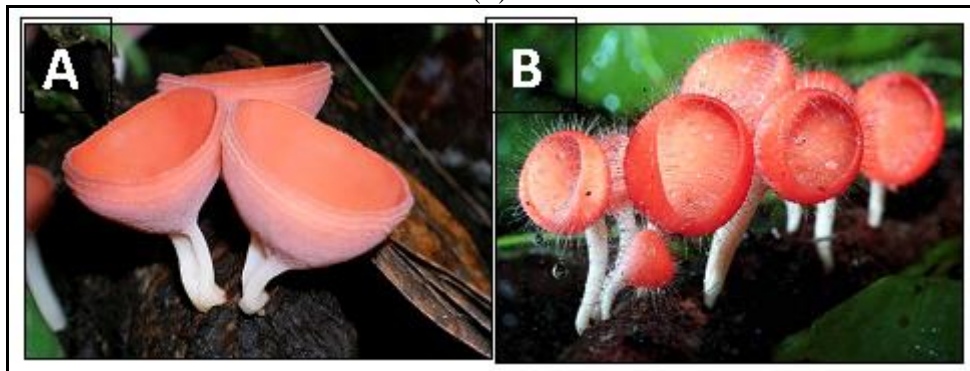
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Cookeina*: *C. colensoi* (A), *C. tricholoma* (B), *C. speciosa* (C), *C. sinensis* (D), *C. venezuelae* (e) E *C. insititia* (F).



FONTE: a Autora (2015).

As espécies *C. tricholoma* e *C. speciosa* diferem uma da outra quanto a dimensão, sendo que os corpos de frutificação de *C. tricholoma* são menores, e apresentam pelos no corpo de frutificação (FIGURA 3). Ambos foram descritos pela primeira vez pelo pesquisador Kuntze em 1891. Estas espécies de Ascomicetos podem ser encontradas em locais com clima tropical e clima subtropical, em países como Venezuela, Brasil, Malásia, Tailândia e Colômbia, dentre outros, e comumente desenvolvem-se em troncos das árvores produtoras do fruto cacau, *Theobroma caca* (SÁNCHEZ; MARTIN; SÁNCHEZ, 1995). Segundo Sánchez, Martin e Sánchez (1995) e Henkel (2004), cogumelos do gênero *Cookeina* são utilizados como alimento por habitantes de países, tais como, Panamá, Costa Rica e México (SÁNCHEZ; MARTIN; SÁNCHEZ, 1995; HENKEL, 2004).

FIGURA 3 - FOTO ILUSTRATIVA DOS COGUMELOS COMESTÍVEIS: *C. speciosa* (A) E *C. tricholoma* (B).



FONTE: a Autora (2015).

Sánchez, Martin e Sánchez (1995), publicaram um estudo relatando a composição química, em termos das porcentagens de lipídeos, proteínas e carboidratos solúveis presentes na bioamassa de *C. speciosa* (= *sulcipes*). Os carboidratos insolúveis não foram quantificados tampouco caracterizados. Porém, para a espécie *C. tricholoma* não existem trabalhos publicados relacionados à composição de lipídeos, proteínas e carboidratos (SÁNCHEZ; MARTIN; SÁNCHEZ, 1995).

Quando estudando a composição química de *C. speciosa*, Sánchez, Martin e Sánchez (1995) estudou separadamente as composições do estipe e do corpo de frutificação. O autor encontrou porcentagem de lipídeos brutos de 2.95 e 2.7, no corpo de frutificação e estipe, respectivamente. Além disso, a porcentagem de proteínas e carboidratos solúveis presentes no corpo de frutificação e estipe, também foram determinados. Foram quantificados 24.79 e 20.68% de proteínas e 6.8 e 6.2% de carboidratos solúveis, respectivamente para o corpo de frutificação e estipe (SÁNCHEZ; MARTIN; SÁNCHEZ, 1995). Nesse trabalho, o pesquisador não citou carboidratos insolúveis, tampouco os quantificou.

2.2 POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS

Polissacarídeos derivados de fungos compreendem um grande grupo de biopolímeros que são parte da parede celular ou podem formar inclusões intracelulares e servir como reserva de energia, ou ainda, são excretados extracelularmente proporcionando um mecanismo para a proteção da célula ou para auxiliar na fixação em diferentes superfícies (GIAVASIS, 2014).

Embora muitos fungos são conhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e têm sido amplamente consumidos durante séculos em muitos países, principalmente China e Japão, a sua exata aplicação farmacêutica, e os mecanismos de suas atividades biológicas têm sido estudados apenas nas últimas décadas. Esses estudos têm revelando o papel crucial de vários polissacarídeos derivados de cogumelos comestíveis na terapia anticâncer, na estimulação do sistema imunológico, bem como a sua atividade profilática contra quimioterapia e radioterapia, atividade antimicrobiana, e seu potencial para regulação e prevenção de hiperglicemia e hipercolesterolêmia (WASSER, 2002; GIAVASIS, 2013; MIZUNO; NISHITANI, 2013; GIAVASIS, 2014). Estas propriedades, juntamente com a ausência de toxicidade, tornam esses biopolímeros compostos ideais para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais ou nutracêuticos (GIAVASIS, 2014).

Conforme descrito por Smiderle et al., (2013) a comunidade científica tem provado, com inúmeros dados, que os extratos de cogumelos demonstram interessantes atividades biológicas, tais como, atividade anti-tumoral (WASSER, 2002; DABA; EZERONYE, 2003; GIAVASIS, 2014), anti-inflamatória (DORE et al., 2007; SMIDERLE et al., 2008; ROY et al., 2009; KOMURA et al., 2010; RUTHES et al., 2013a; RUTHES et al., 2013b; SILVEIRA et al., 2014), antiviral (LINDEQUIST, 2005), e imunomoduladora (SMIDERLE et al., 2011; CHANPUT et al., 2012; CHEN, 2010; LIN et al., 2012;). Esses extratos podem conter diferentes moléculas como esteróides, polifenóis, hidroquinonas, triterpenos, compostos anti-protozoário, proteínas, glicoproteínas, e polissacarídeos que estão envolvidos em tais efeitos biológicos (LINDEQUIST et al., 2005, SMIDERLE et al., 2013).

Polissacarídeos de diferentes espécies, principalmente de Basidiomicetos têm sido caracterizados e estudados com relação a atividade biológica, diferente da imunomoduladora e antitumoral, como por exemplo atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (RUTHES et al., 2013). São alguns exemplos as fucogalactanas, fucomannogalactanas, e mannogalactans isoladas de *Agaricus brasiliensis* e *Agaricus bisporus var. hortensis* (KOMURA et al., 2010), *Lentinus edodes* (CARBONERO et al., 2008), e *Pleurotus pulmonarius* (SMIDERLE et al., 2008), respectivamente.

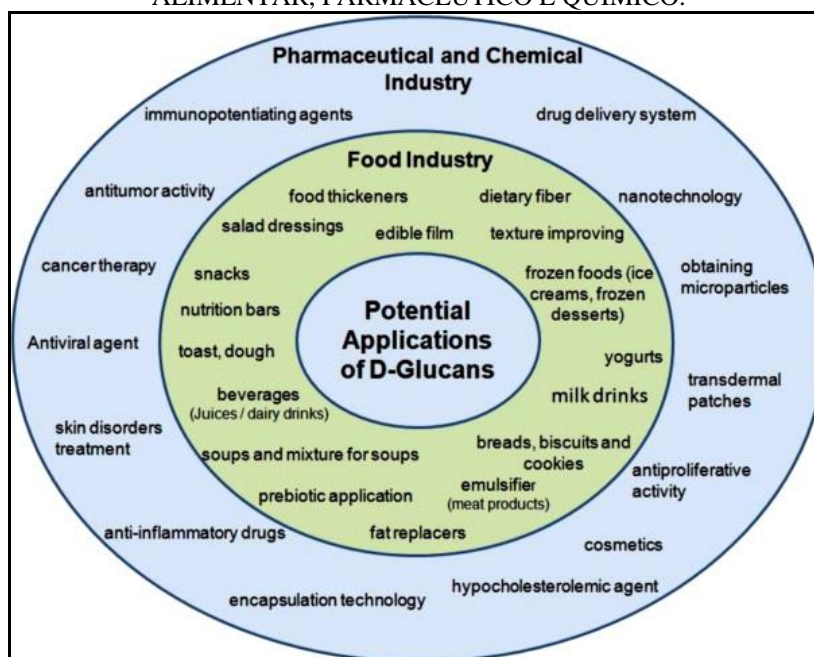
Diferentemente dos Basidiomicetos, os Ascomicetos apresentam principalmente heteropolissacarídeos com cadeia principal constituída por unidades de D-manose, como por exemplo, glucomananas e galactomananas (BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983; SMIDERLE, 2013).

Dentre os biopolímeros observados em fungos em geral, e também em espécies formadoras de cogumelos, um em especial tem chamando a atenção, as β -D-glucanas. D-Glucanas derivadas de fungos são polímeros formados por unidades de D-glucopiranosose (D-Glcp), com estruturas variáveis. Elas constituem parte obrigatória da parede celular no micélio, corpos de frutificação, ou de outras partes de micro e macrofungos (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Apesar da simplicidade da sua composição monossacarídica (de acordo com a definição que deveriam conter apenas glucose), grande diversidade pode ser observada com relação à configuração anomérica, ao número de unidades D-Glcp, posição e sequência dessas ligações glicosídicas ao longo de uma cadeia, grau de ramificação e conformação de cadeia. As glucanas ramificadas podem apresentar cadeias laterais, com uma ou mais unidades de D-Glcp ligadas à cadeia principal em diferentes posições (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

2.2.1 D-Glucanas

D-glucanas têm sido alvo de interesse para aplicações nos setores químico e farmacêutico, e em vários grupos de pesquisa em todo o mundo (KAGIMURA et al., 2015) (FIGURA 4). β -D-glucanas têm atraído a atenção ao longo dos anos por causa de suas propriedades físicas e químicas (ZHU, DU; XU, 2016). Podem ser obtidas a partir de diferentes fontes e com diferentes pesos moleculares, apresentando diferentes atividades biológicas (ZHU, DU; XU, 2016). Alguns estudos têm mostrado resultado positivo quanto a utilização de β -D-glucanas como prebióticos (GUZMÁN-VILLANUEVA et al., 2013; GIAVASIS, 2014), enquanto outros pesquisadores têm demonstrado sua atividade imunomoduladora (BHANJA et al., 2012; BOBADILLA et al., 2013; RIEDER et al., 2013; SADOVSKAYA et al., 2014; SILVEIRA et al., 2014;). β -D-glucanas derivadas de cogumelos são úteis na defesa antitumoral, como um impulsor do sistema imunológico (ZHU et al., 2015). Além das atividades citadas acima, as β -D-glucanas podem exibir atividade anti-envelhecimento (ZHU, DU; XU, 2016), anti-oxidativa (DENG et al., 2012; LIU et al., 2014; NANDI et al., 2014), anti-inflamatória (DORE et al., 2007; SMIRDELE et al., 2008a; RUTHES et al., 2013a; b; ZHU; DU; XU, 2016) , antinociceptiva (SMIDERLE et al., 2008a; RUTHES et al., 2013b, SILVEIRA et al., 2014), protetora do sistema cardiovascular (WASSER; WEIS, 1999; ZHU et al., 2015;), protetora do fígado (LINDEQUIST et al., 2005; ZHU et al., 2015), além de desempenhar atividade anti-diabética (KIM et al., 2005; ZHU *et al.*, 2015), antibacteriana (SUAY et al., 2000; ISHIKAWA et al., 2001; AHMED et al., 2005; BEATTIE et al., 2010; ZHU et al., 2015), também têm se mostrado aliada contra a obesidade (ZHANG et al., 2013; ZHU et al., 2015).

FIGURA 4 - POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE D-GLUCANAS NOS DIFERENTES SETORES: ALIMENTAR, FARMACÊUTICO E QUÍMICO.



FONTE: KAGIMURA et al. (2015).

Experimentos *in vitro* mostram que β -D-glucanas podem estimular diretamente leucócitos, provocando inibição citotóxica e apresentando atividade antimicrobiana (SMIDERLE et al., 2008; BHANJA et al., 2014). Além disso, elas exibem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e analgésicas (SMIDERLE et al., 2008; BHANJA et al., 2014).

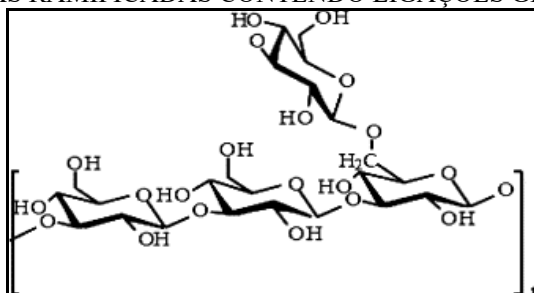
As β -D-glucanas constituem homopolissacarídeos de estruturas que podem variar de simples a complexas, que podem ser solúveis, pouco solúveis ou insolúveis em solução aquosa (KAGIMURA et al., 2015). De acordo com a configuração do carbono anomérico as D-glucanas podem ser separadas em α -D-glucanas e β -D-glucanas e ainda, de acordo com a disposição dos monômeros de glicose, essas podem ser lineares ou ramificadas. α -D-Glucanas lineares são normalmente encontradas em leveduras e macrofungos (SYNYTSYA; NOVAK, 2013). A estrutura química destes polissacarídeos é variável, dependendo da fonte fúngica. Algumas α -D-Glucanas lineares possuem suas unidades de D-Glcp dispostas em ligações (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) ou (1 \rightarrow 6), enquanto outras contêm uma combinação das ligações glicosídicas mencionadas (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Em comparação com as investigações intensivas dedicada às β -D-glucanas, a atividade biológica de α -D-glucanas (1 \rightarrow 3)-ligadas é relatada com menos frequência na literatura (BRANJA et al., 2014). Alguns grupos estudaram a estrutura e as propriedades de α -D-glucanas lineares (1 \rightarrow 3)-ligadas, obtidas a partir de *Lentinus edodes* (ZHANG; CHEUNG, 2002) e do micélio de *Poria cocos* (JIN et al., 2004). Algumas propriedades bioativas de α -D-glucanas (1 \rightarrow 4)-ligadas e α -D-

glucanas (1→4), (1→6)-ligadas, isoladas do micélio de fungos do gênero *Cordyceps*, também foram relatadas, como por exemplo atividade antitumoral avaliada *in vitro* em células de melanoma (YAN et al., 2011).

β -D-Glucanas lineares podem ser encontradas em microfungos, macrofungos e em associações de fungos e algas (liquens), onde normalmente o fungo em questão pertence à classe dos Ascomicetos. Esses polissacarídeos possuem suas unidades de D-Glcp dispostas na cadeia principal unidas por ligações glicosídicas do tipo (1→3) e/ou (1→6). As β -D-glucanas também podem apresentar ramificações, contendo ligações glicosídicas (1→3) e (1→6), sendo estas, os principais constituintes comuns de paredes celulares fúngicas (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Há muitos relatos sobre o isolamento, a estrutura e a atividade biológicas deste tipo de polissacarídeo (WASSER, 2002; CHEN; SEVIOUR 2007; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). A maioria das β -D-glucanas ramificadas possuem unidades de D-Glcp (1→3)-ligadas na cadeia principal, a qual é ramificada em O-6, e como cadeias laterais formados por unidades de D-Glcp (1→6)-ligadas ou (1→3)-ligadas (CHEN; SEVIOUR 2007; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Enquanto que em alguns casos o arranjo é oposto, ou seja, a cadeia principal é formada por unidades de D-Glcp (1→6)-ligadas e as cadeias laterais formadas por unidades de D-Glcp (1→3)-ligadas (DONG et al, 2002; GE; ZHANG; SUN, 2010; SUN *et al.*, 2012; SYNYTSYA; NOVAK, 2013).

Algumas destas β -D-glucanas (1→3), (1→6)-ligadas (FIGURA 5) derivadas de fontes fúngicas têm nomes próprios, como por exemplo: lentinana, um polissacarídeo de *Lentinula edodes* (= *Lentinus edodes*). Existem também, grifolana que são glucanas extraídas de *Grifola frondosa* e dois polissacarídeos extracelulares, esquizofilana e escleroglucana produzidos respectivamente por *Schizophyllum commune* e *Sclerotium sp.* (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

FIGURA 5 - β -D-GLUCANAS RAMIFICADAS CONTENDO LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS (1→3), (1→6).

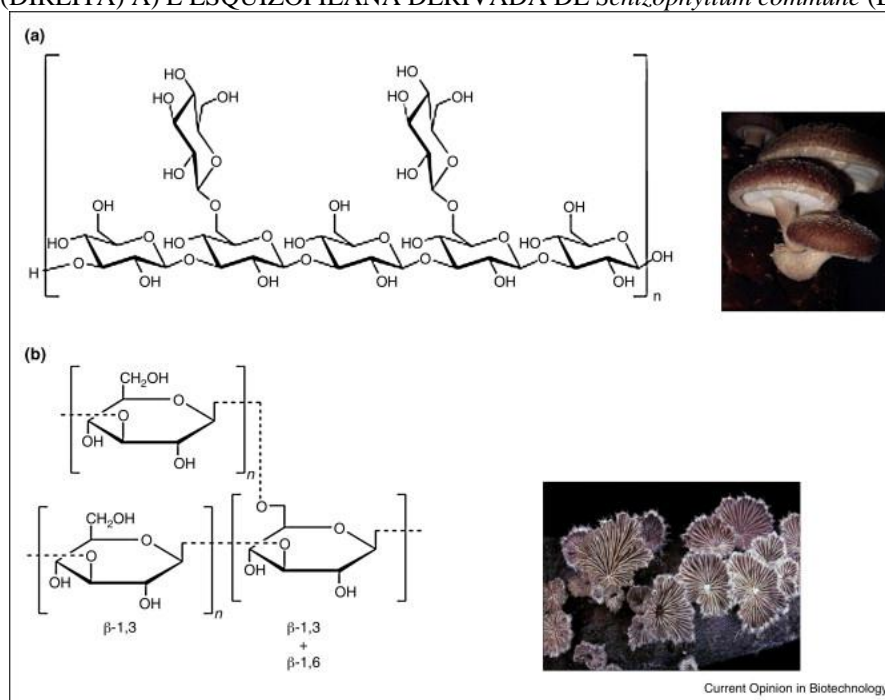


FONTE: a Autora (2015).

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE β -D-GLUCANAS (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-LIGADAS

A maior parte das β -D-glucanas descritas com atividades biológicas são produzidas por cogumelos da classe dos Basidiomicetos. Um dos mais comuns e bem estudados polissacarídeos fúngicos com ação medicinal é a lentinana, uma β -D-glucana produzida pelo cogumelo comestível *Lentinus* (= *Lentinula*) *edodes*, também conhecido popularmente como “Shiitake” (GIAVASIS, 2014). Esse polissacarídeo é composto por uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3) -ligadas com ramificações em O-6, por terminais não redutores de β -D-Glcp. Os terminais não redutores de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6) -ligados às unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3) -ligadas da cadeia principal são observados a cada três unidades da cadeia principal (FIGURA 6A), e apresenta um peso molecular médio de cerca de 500.000 Da (WASSER, 2002; GIAVASIS, 2014). Ela exibe atividade antitumoral provavelmente por ter habilidade de modular os fatores hormonais, que são conhecidos por desempenhar um papel no crescimento tumoral (WASSER, 2002). Uma D-glucana semelhante, a esquizofilana (também chamada de sizofirana) (FIGURA 6B), produzida pelo cogumelo comestível *Schizophyllum commune* tem peso molecular entre 100.000-200.000 Da, apresenta conformação tridimensional de tríplice hélice (GIAVASIS, 2014), e características estruturais similares as descritas para a lentinana. A lentinana e a esquizofilana são, provavelmente, as β -D-glucanas que exibem atividade imunomoduladora mais bem estudada, com relação à polissacarídeos de fontes fúngicas (GIAVASIS, 2014).

FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA (ESQUERDA) E CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. edodes* (DIREITA) A) E ESQUIZOFILANA DERIVADA DE *Schizophyllum commune* (B).



FONTE: GIAVASIS (2014)

Ganoderma lucidum é um outro cogumelo, também comumente utilizado como medicamento, bem estudado, pertencente também à classe dos Basidiomicetos. Esse cogumelo tem sido utilizado na medicina tradicional do leste asiático como um pó seco ou como um extrato em água quente (um tipo de chá amargo de cogumelo). Esse cogumelo produz a ganoderana, uma típica β -D-glucana (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligada, com cadeia principal de unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)-ligadas, também ramificada em O-6 por unidades β -D-Glcp, assim como a lentinana e a esquizofilana, mas podendo apresentar variados graus de ramificação e peso molecular (GIAVASIS, 2014).

Os Ascomicetos, em sua maioria não formam corpos de frutificação. Os efeitos mais estudados de polissacarídeos de Ascomicetos são atribuídos a D-glucanas de *Sclerotium rolfsii*, *Saccharomyces cerevisiae*, e os fungos formadores de corpos de frutificações *Cordyceps militaris* e *Cordyceps sinensis*. Sendo estes dois últimos, fungos entomopatogênicos, considerados os mais importantes medicamentos tradicionais chineses, altamente comercializados na China, Coréia e Japão (DAS et al. 2010; WANG et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que estes cogumelos podem exercer atividade antioxidante, antiviral e imunoprotetora (OHTA et al., 2007; YU et al., 2009; WANG et al., 2012).

2.3.1 Atividade antinociceptiva de β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas

Polissacarídeos e os complexos polissacarídeo-proteína têm sido amplamente investigados, principalmente por apresentarem diferentes tipos de respostas biológicas, assim como, antitumoral, antioxidante e atividade estimuladora do sistema imune. Recentemente, os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios vêm sendo estudados (CARBONERO et al., 2008; NOVÁK; VETVICKA, 2008; SMIDERLE et al., 2008; RUTHES et al., 2013a; SMIDERLE, 2014). Polissacarídeos isolados de cogumelos vêm mostrando efeitos significativos a serem avaliados como antinociceptivos e anti-inflamatórios. Essas atividades biológicas podem ser avaliadas, tanto em estudos *in vitro*, como em estudos *in vivo* (KIM et al., 2007; KOMURA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; CHANG et al., 2013; RUTHES et al., 2013c; SMIDERLE; RUTHES; IACOMINI, 2014).

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória avaliada *in vivo* podem ser avaliadas por uma abordagem bem definida que consiste em injeção de formalina, um teste modelo de dano periférico sustentado, frequentemente utilizado na busca de drogas com atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias (TJØLSEN et al., 1992). Além disso, a injeção de formalina gera duas etapas diferentes, dor neurogênica (primeira etapa) e dor inflamatória (segunda etapa), de sensação de dor em humanos e de comportamento nociceptivos em animais (TJØLSEN et al., 1992).

As β -D-glucanas são sem dúvida os polissacarídeos de origem fúngica com as estruturas químicas melhor elucidadas. Nas últimas décadas muitas pesquisas têm ajudado a revelar os efeitos que esses homopolissacarídeos têm no sistema imunológico, no entanto pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dessas D-glucanas na nocicepção e na ação anti-inflamatória (SMIDERLE; RUTHES; IACOMINI; 2014).

β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas isoladas dos cogumelos comestíveis *Lactarius rufus* e *Pleurotus pulmonarius* foram testadas em camundongos usando o método de indução de nocicepção por injeção de formalina. Em ambos os estudos, foi verificada uma leve inibição na primeira etapa (dor neurogênica), usando doses maiores de 30 mg kg⁻¹, e um melhor efeito na segunda etapa (dor inflamatória) com a mesma dose ou com doses maiores (SMIDERLE et al., 2008a; RUTHES et al., 2013b; SMIDERLE; RUTHES; IACOMINI, 2014). Esses estudos mostraram que os efeitos analgésicos demonstrados por β -D-glucanas isoladas de cogumelos comestíveis está provavelmente relacionado com uma ação anti-inflamatória similar a desempenhada por anti-inflamatórios não esteroidais (SMIDERLE; RUTHES; IACOMINI, 2014).

Visto todo o potencial de utilização dos extratos de cogumelos comestíveis e sabendo que pouco das atividades descritas são dos cogumelos pertencentes à família dos

Ascomicetos, esse trabalho teve como objetivo realizar a caracterização estrutural e avaliar a possível atividade antinociceptiva de β -D-glucanas de duas espécies de comestíveis ascomicetos formadoras de corpos de frutificação. As espécies estudadas foram popularmente consumidas em alguns países da América do Sul, e coletadas na região da Floresta Amazônica Brasileira, *Cookeina speciosa* e *Cookeina tricholoma*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivo geral extrair, purificar e caracterizar a estrutura química fina de β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas dos ascomicetos *Cookeina tricholoma* e *Cookeina speciosa*. Além de avaliar o efeito destes polissacarídeos quanto às suas propriedades analgésicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos dos ascomicetos *Cookeina tricholoma* e *Cookeina speciosa*;
- Purificar as frações polissacarídicas obtidas utilizando diferentes metodologias;
- Caracterizar a estrutura química das β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas purificadas;
- Avaliar as propriedades analgésicas destes polímeros;
- Verificar as diferenças estruturais entre os polissacarídeos purificados para ambas as espécies;
- Correlacionar as atividades com a estrutura química, levando em consideração o grau de ramificação, o peso molecular e a conformação tridimensional das moléculas extraídas.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 MATERIAIS DE ESTUDO

Os ascomicetos *Cookeina tricholoma* e *Cookeina speciosa* (= *C. sulcipes*) (FIGURA 7) utilizados nesse estudo foram coletados e gentilmente cedidos pela Doutoranda Dirce Leimi Komura, do INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

FIGURA 7 - *Cookeina speciosa* (A); *Cookeina tricholoma* (B).



FONTE: a Autora (2015).

Os espécimes foram coletados no estado do Amazonas, cidade de Manaus, na Estação Experimental de Manejo Florestal ZF-2 (latitude: -2,645 S, longitude: -60,256 W e -60,147 W para *Cookeina tricholoma* e *Cookeina speciosa*, respectivamente.

4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Serão discutidos os métodos de extração e purificação de polissacarídeos, compreendendo a extração aquosa em temperatura ambiente, com água fervente e alcalina, e também a purificação pelos métodos de congelamento e descongelamento e o monitoramento através de análises de RMN e SEC.

4.2.1 Extração de Polissacarídeos

A extração dos polissacarídeos a partir dos corpos de frutificação foi realizada, através de extrações aquosas, a frio (~25 °C) e à quente sob refluxo (~98 °C), e alcalina

com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 2%, sob-refluxo em banho-maria fervente (~98 °C).

4.2.1.1 Extração Aquosa à Temperatura Ambiente

Os corpos de frutificação de cada uma das espécies em estudo foram submetidos a sucessivas extrações, aquosas a 25°C, sob agitação mecânica, por 4 h, até a exaustão. A extração foi interrompida quando o extrato aquoso apresentou reação negativa para carboidratos totais, através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após cada etapa, o material foi centrifugado para a separação do extrato aquoso, do material residual (8000 rpm, 15 min., a 15°C). Os extratos obtidos foram reunidos e então, concentrados até pequeno volume e precipitados com etanol (3:1 v/v). O precipitado etanólico obtido foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa, contra água corrente por 48 h e liofilizado.

4.2.1.2 Extração Aquosa com Água Fervente

O resíduo da extração aquosa a frio foi submetido à extração aquosa sob-refluxo em banho com água fervente por 4 h. A extração foi interrompida quando o extrato obtido apresentou reação negativa para carboidratos totais, através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Decorrido o tempo de extração, o material foi filtrado e o extrato aquoso a quente obtido foi concentrado até pequeno volume. Com a finalidade de obter os polissacarídeos, o extrato aquoso foi tratado com etanol (3:1 v/v), sendo o precipitado etanólico resultante dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, contra a água corrente por 48 h e liofilizado.

4.2.1.3 Extração Alcalina

O material residual proveniente da extração aquosa à quente foi submetido ao tratamento com solução aquosa de KOH 2% (p/v) sob refluxo, em banho-maria com água fervente, na presença de borohidreto de sódio (NaBH₄), para evitar degradação das cadeias polissacarídicas. A extração foi interrompida quando o extrato alcalino apresentou reação negativa para carboidratos totais, através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O extrato alcalino obtido foi filtrado, neutralizado com

ácido acético (AcOH), dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, contra a água corrente por 48 h e liofilizado.

4.2.2 Purificação dos Polissacarídeos

As purificações dos extratos polissacarídicos obtidos foram realizadas por processos de congelamento e descongelamento. O processo de purificação foi monitorado através de análises de SEC.

4.2.2.1 Congelamento e Descongelamento

Os extratos obtidos foram submetidos, separadamente, ao processo de purificação por congelamento e degelo. Cada mistura polissacarídica foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetida ao processo de congelamento e posterior descongelamento em temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (8000 rpm, por 15 min, a 5 °C). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante aquoso não apresentasse material insolúvel em água fria, e até que o precipitado não apresentasse material solúvel (RUTHES et al., 2015).

4.2.2.2 Caracterização Estrutural dos Polissacarídeos

A caracterização estrutural dos polissacarídeos foi realizada por metodologias e experimentos que fornecem dados para análises de composição monossacarídica, homogeneidade, tipos de ligação, peso molecular, grau de ramificação entre outros. Desta forma, foi possível determinar a estrutura fina destes polímeros. Abaixo se encontram descritas metodologias utilizadas, baseadas em métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

4.2.2.3 Hidrólise Ácida Total

As frações (1 mg) foram hidrolisadas em vials com 1 ml de solução aquosa de TFA 1 M, durante 16 h à 100 °C. Posteriormente o ácido foi completamente evaporado.

4.2.2.4 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida Total

Aos produtos de hidrólise, no vial, foram adicionados 100 μ l de H₂O, em seguida 1 mg de NaBH₄ foi adicionado para a redução dos monossacarídeos (pH 8,0-9,0, 10 min., 100 °C). Para interromper a reação foi adicionado 20 μ l de AcOH até pH 5,0-7,0 e as amostras foram secas sob fluxo constante de ar (SASSAKI et al., 2008). O ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de trimetila, por co-evaporação pela adição de MeOH (1 ml, 3x consecutivas). Os alditóis formados foram acetilados pela adição de anidrido acético: piridina (1:1, v/v) em estufa 100 °C, por 30 min (SASSAKI et al., 2008). Os acetatos de alditol foram então extraídos com CHCl₃ (1 ml), e a piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por complexação com sulfato de cobre 5%. Após a completa remoção da piridina, o CHCl₃ foi evaporado e os derivados acetilados foram analisados em GC-MS (Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas).

4.2.2.5 Degradação de Smith

As D-glucanas purificadas (ICW-*Ct*, IHW-*Ct*, IK2-*Ct*; ICW-*Cs*, IHW-*Cs* e IK2-*Cs*, 100 mg cada) foram submetidos a oxidação em solução aquosa de NaIO₄ 0,05 M (15 mL) à temperatura ambiente durante 72 h, no escuro. Etileno glicol foi adicionado para interromper a reação, e as soluções foram dialisadas contra água corrente em membrana com limite de exclusão de 2 kDa. Os polialdeídos resultantes foram na sequência reduzidos com NaBH₄ durante 24 h, neutralizados com AcOH, dialisados contra água corrente, novamente em uma membrana com limite de exclusão de 2 kDa, concentrados e liofilizados (GOLDSTEIN et al., 1965). Os produtos obtidos a partir da oxidação com periodato foram parcialmente hidrolisados em solução aquosa de TFA pH 2,0 (30 min., 100 °C), seguido de diálise contra água corrente em uma membrana com limite de exclusão de 2 kDa, e liofilizados. Uma alíquota (40 mg) de cada produto da degradação controlada de Smith (SMICW-*Ct*, SMIHW-*Ct*, SMIK2-*Ct*, SMICW-*Cs*, SMIHW-*Cs* e SMIK2-*Cs*) foi submetida a espectroscopia de RMN de ¹³C e uma amostra (10 mg) foi submetido à análise de metilação.

4.2.2.6 Metilação das Frações Polissacarídicas

As frações polissacarídicas puras (5-10 mg) foram metiladas pelo método de Ciucanu e Kerek (1984), solubilização em Me₂SO (1 ml). Após foi adicionado NaOH seco e triturado (~ 1 mg). A solução foi mantida sob agitação e, então foi adicionado CH₃I (1 ml). Após 24 h, as amostras foram neutralizadas com AcOH, dialisadas exaustivamente contra água corrente, em membrana com limite de exclusão de 2 kDa e liofilizadas. O processo foi repetido no material liofilizado, e terminado o segundo ciclo de metilação, os produtos *per-O*-metilados foram extraídos com CHCl₃, através de partição em água. Após a evaporação do CHCl₃ os derivados *per-O*-metilados foram submetidos à hidrólise ácida total, conforme descrito abaixo.

4.2.2.7 Hidrólise Ácida Total das Frações Polissacarídicas Após Metilação

A hidrólise ácida total das amostras parcialmente metiladas da espécie *C. tricholoma* (~2 mg; ICW-*Ct*, IHW-*Ct* e IK2-*Ct*) foram realizadas com solução aquosa de ácido fórmico (45% v/v) durante 20-24 h à 100 °C, dependendo da estrutura do polissacarídeo. Enquanto que a hidrólise das frações da espécie *C. speciosa* (~2 mg; ICW-*Cs*, IHW-*Cs* e IK2-*Cs*) foram realizadas com TFA 2 M durante 1 h e 45 min – 5 h à 120 °C, dependendo da estrutura do polissacarídeo. Uma vez que a hidrólise com ácido fórmico não produziu resultados representativos para as frações polissacarídicas de *C. speciosa*. Posteriormente, o ácido fórmico ou o TFA remanescente nas soluções hidrolisadas foi removido por evaporação, e o material foi reduzido, com NaBD₄ e, acetilado como descrito no item 4.2.2.2.

4.2.3 Métodos Cromatográficos

4.2.3.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás 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 m x 0,25 mm d.i.) DB-225. As injeções foram feitas a 50 °C (temperatura mantida por 1 min.), seguindo-se um

aumento gradual de 40 °C min⁻¹, até 215 °C, sendo mantida isotermicamente até o final da análise. O gás de arraste utilizado foi o hélio ultrapuro, com fluxo de 1 ml min⁻¹.

4.2.3.2 Determinação da Distribuição Da Massa Molar (M_w) por SEC

As distribuições das massas moleculares das β -D-glucanas isoladas a partir de *C. tricholoma* (ICW-Ct, IHW-Ct e IK2-Ct) foram analisados por cromatografia por exclusão de tamanho (SECcurity 1260, Polymer serviços padrão, Mainz, Alemanha) acoplado a detector de espalhamento de luz laser multi ângulos (MALLS; BIC-MwA7000, Brookhaven Instrument Corp., New York), e detector de índice de refração (SECcurity 1260, Polymer serviços padrão, Mainz, Alemanha) com termostato a 45 °C. As frações foram dissolvidas diretamente no eluente, que consiste em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO, de grau HPLC, Scharlab, Suécia) com 0,5% (p/p) de LiBr (ReagentPlus) a 60 °C. As concentrações foram ajustadas entre 0,5 - 2 g L⁻¹ para otimização do sinal de detecção. As separações por SEC foram realizadas com uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹, a 60 °C, utilizando um conjunto de colunas, consistindo de uma pré-coluna GRAM, e de colunas analíticas 100 e 10000 (Polymer Standards Services, Mainz, Alemanha). A calibração da separação por SEC foi realizada por injeção de padrões de pululana de pesos moleculares conhecidos, fornecidas por *Polymer Standards Services* (PSS, Mainz, Alemanha). Os volumes de eluição de SEC foram assim convertidos em volume hidrodinâmico (V_h) utilizando a equação de Mark-Houwink. Os parâmetros Mark-Houwink para a pululana em DMSO/LiBr (0,5%) são $K = 2,427 \times 10^{-4}$ dL g⁻¹ e $a = 0,6804$ (Kramer e Kilz, PSS, Mainz, comunicação privada). O tratamento e a coleta de dados foram realizados utilizando software WinGPC (Polymer Standards Services, Mainz, Alemanha) e posteriormente analisados por processos matemáticos adicionais, como descrito por (VILAPLANA et al., 2010). O incremento do índice de refração (dn/dc) para pululana em DMSO/LiBr 0,5% foi considerado como 0,0853 mL g⁻¹ (Kramer e Kilz, PSS, Mainz, comunicação privada). A distribuição de peso por SEC, $w(\log V_h)$, a dependência do tamanho do peso molecular médio $\bar{M}_w(V_h)$, e o raio de giro (R_g) foram então obtidos. As distribuições de tamanho macromolecular foram apresentadas em termos de raio hidrodinâmico (R_h), com $V_h = \text{Erro!}\pi R_h^3$.

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros mono- (RMN- ^{13}C e ^1H), e bidimensionais [HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy) e HSQC-DEPT (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)] foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance-DRX-400.

As análises foram realizadas a 70 °C, com as amostras sendo solubilizadas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$. Os deslocamentos químicos das amostras foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ^{13}C e ^1H do $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ em δ 39,70 e 2,40, respectivamente.

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a professora Maria Fernanda de Paula Werner e a Dra. Cristiane Hatsuko Baggio do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

4.3.1 Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos *Mus musculus*, variedade Swiss (25-35g), fêmeas, mantidos em sala climatizada (22 ± 2 °C) e umidade controlada, com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e acondicionados no laboratório por no mínimo 12 h antes da realização dos testes e utilizados uma única vez para os experimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR) sob o número 657 e foram desenvolvidos de acordo com as diretrizes sobre cuidados com animais utilizados em laboratório (“Principles of Laboratory Animal Care” - NIH Publication 85-23, revisado 1985) e sobre ética em experimentos que causem dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos dolorosos utilizados foi o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos testados.

4.3.2 Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina em Camundongos

Os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e mantidos por um período de 30 min para aclimatação, seguindo a metodologia de Rodrigues et al. (2012) (RODRIGUES et al., 2012). Em seguida, grupos de camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com a fração polissacarídica nas doses de 0,1 a 30 mg kg⁻¹, i.p para as frações ICW-Cs e IHW-Cs e IK2-Cs e dose de 0,1 a 10 mg kg⁻¹, i.p. para as frações ICW-Ct e IHW-Ct, 60 min antes da injeção de 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. Após a injeção da formalina, os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (FASE I) e 15-30 min (FASE II). O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção. Dessa maneira, foram utilizados os grupos de animais: a) controle - não tratado (veículo, 0,1 mL/10 g, i.p.) + formalina 2,5% (20 µL/pata); b) animais tratados - β-D-glucanas em diferentes concentrações, de 0,1; 1; 3; e 10 mg kg⁻¹ (i.p), para as frações de *C. tricholoma* (ICW-Ct, IHW-Ct e IK2-Ct) e de 0,1; 0,3; 1; 10 e 30 mg kg⁻¹ (i.p) para as frações de *C. speciosa* (ICW-Cs, IHW-Cs e IK2-Cs) + formalina 2,5% (20 µL/pata).

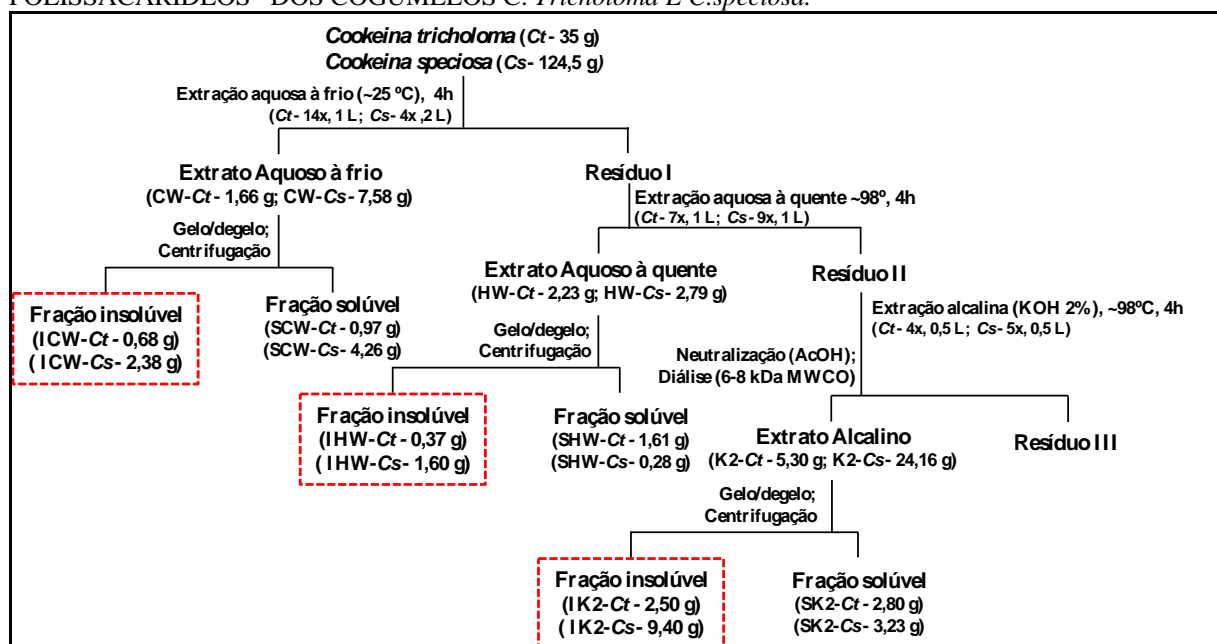
4.3.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) com 6-8 animais por grupo. As comparações entre os grupos experimentais e de controle foram realizadas por análise unidirecional da variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keul. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados como indicativos de significância. Os valores de DI₅₀ (ou seja, a dose de polissacárido necessário para reduzir a resposta nociceptiva em 50% em relação ao valor do controle) foram relatados como médias geométricas acompanhados pelos seus respectivos limites de confiança de 95% e determinados por análise de regressão não-linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad (GraphPad software, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os corpos de frutificação dos cogumelos, *C. tricholoma* e *C. speciosa*, após coletada foram limpos e liofilizados, e apresentaram um peso seco de 35 g e 124,5 g, respectivamente. As amostras foram separadamente submetidas à extração aquosa à frio (~25°C), aquosa à quente (~98°C) e alcalina (KOH 2%), conforme demonstrado no fluxograma (FIGURA 8).

FIGURA 8 - ESQUEMA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS COGUMELOS *C. Tricholoma* E *C. speciosa*.



FONTE: a Autora (2015)

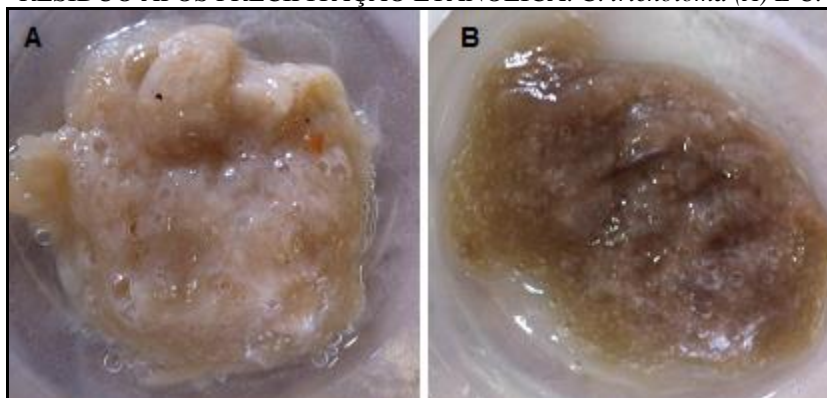
A partir dos diferentes extratos obtidos, para cada uma das espécies em estudo, foi dada sequência ao processo de purificação para obtenção das β -D-glucanas. Na sequência serão apresentados os resultados da caracterização estrutural e dos testes biológicos das frações insolúveis em água fria, resultantes de cada extração.

5.1 EXTRAÇÃO AQUOSA À FRIO

Os corpos de frutificação liofilizados, de *C. tricholoma* e *C. speciosa*, foram submetidos separadamente, para cada uma das espécies, primeiramente a extração aquosa à frio (FIGURA 8). Os extratos obtidos foram reunidos, concentrados em rota-evaporador e submetidos à precipitação com etanol (3:1, v/v) para precipitação dos

componentes de alta massa molar (FIGURA 9A e B), os quais foram separados dos componentes de baixa massa por centrifugação, seguida de diálise contra água corrente. Como resultado foram obtidos as frações polissacarídicas CW-Ct (1,66 g; 4,74% em relação ao peso seco inicial) e CW-Cs (7,58 g; 6,09% em relação ao peso seco inicial).

FIGURA 9 - RESÍDUO APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA. *C. tricholoma* (A) E *C. speciosa* (B).



FONTE: a Autora (2015)

A análise da composição monossacarídica demonstrou que a fração polissacarídica bruta, resultante da extração aquosa à frio de *C. tricholoma*, CW-Ct é composta principalmente por manose, glucose e galactose. Enquanto que a fração correspondente para a espécie *C. speciosa*, CW-Cs é composta principalmente por glucose, seguida de manose e por fim, galactose (TABELA 1).

TABELA 1 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS À FRIO DE *C. tricholoma* E *C. speciosa*.

Espécie	Frações	Rendimento (g)	Composição monossacarídica ^a (%) ^b		
			Man	Gal	Glc
<i>Ct</i>	CW-Ct	1,66	52,21	21,90	25,89
	SCW-Ct	0,98	47,46	16,09	36,45
	ICW-Ct	0,68	-	-	100,00
<i>Cs</i>	CW-Cs	7,58	31,0	17,2	51,80
	SCW-Cs	3,60	43,04	25,09	31,87
	ICW-Cs	1,40	-	-	100,00

FONTE: a Autora (2015).

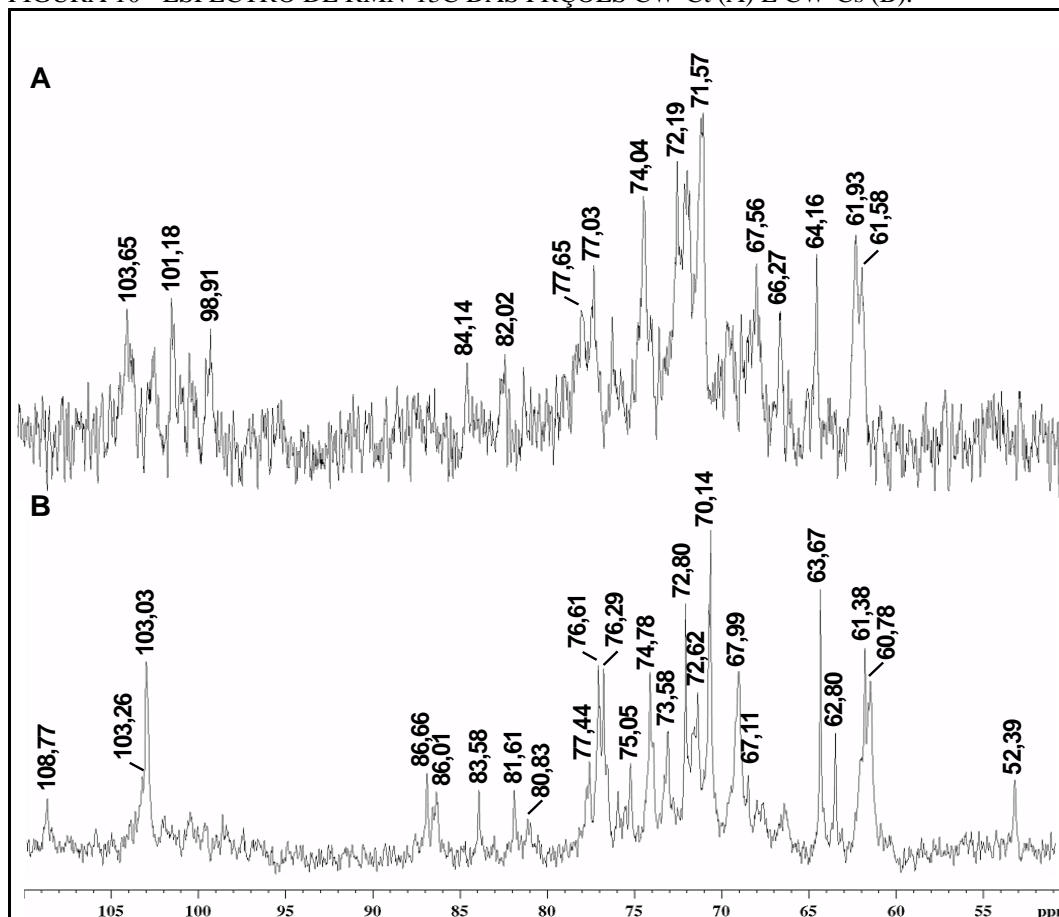
^a Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 1M, 100 °C, 8 horas), redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Percentual relativo as áreas de todos os picos.

As frações brutas foram analisadas por RMN-¹³C para uma visualização geral dos polissacarídeos presentes (FIGURA 10). Pode-se observar em ambos os espectros, CW-Ct e CW-Cs que os sinais são pouco definidos. Mas ainda assim é possível

observar sinais característicos da presença de β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) -ligadas (RUTHES et al., 2013).

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN-13C DAS FRÇÕES CW-Ct (A) E CW-Cs (B).



FONTE: a Autora (2015).

Os sinais em δ 86,66/86,29/86,01 e δ 84,14 indicam a presença de unidades (1 \rightarrow 3)-ligadas, enquanto aqueles observados na região δ 67,99 e δ 67,56 indicam que pode existir unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas. Os sinais em δ 61,38/60,78 e δ 61,93/61,58, por sua vez, sugerem a presença de unidades com C-6 não substituído.

Pode-se observar ainda, em CW-Cs, um sinal em δ 108,77, característico da presença de β -D-galactofuranose. Enquanto que na fração CW-Ct, também é possível observar sinais em δ 101,18 e 98,91 característicos da presença de unidades monossacarídicas na configuração α (GORIN; MAZUREK, 1975).

Com a finalidade de separar moléculas com características de solubilidade diferentes, foi realizado o processo de congelamento e degelo das frações CW-Cs e CW-Ct. Como resultado foram originadas uma fração insolúvel em água fria (ICW-Cs e ICW-Ct) e uma fração solúvel (SCW-Cs e SCW-Ct) para cada uma das espécies. As

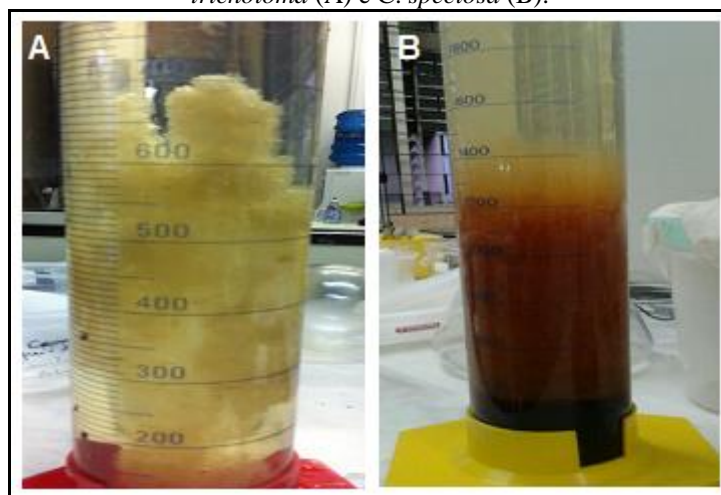
frações insolúveis apresentaram glucose como único componente monossacarídeo em sua composição (TABELA 1). Já as frações solúveis apresentaram manose, galactose e glucose como monossacarídeos constituintes. Para ambas as espécies, manose pode ser observada como composto majoritário, 47,46% para SCW-Ct e 43,04% para SCW-Cs (TABELA 1), seguidas de glucose, 36,45% (SCW-Ct) e 31,87% (SCW-Cs), e galactose, 16,09% (SCW-Ct) e 25,09% (SCW-Cs). Esses resultados sugerem não apenas uma mistura de diferentes polissacarídeos, como também pode sugerir a presença de heteropolissacarídeos com cadeia principal formada por unidades de D-manose, típicos de ascomicetos, como glucomananas e galactomananas (BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983).

A caracterização estrutural das frações insolúveis será discutida no item 5.4.

5.2 EXTRAÇÃO À QUENTE

O resíduo resultante da extração aquosa a frio foi submetido a extração aquosa a quente sob refluxo (FIGURA 8, pg.), para a extração dos polissacarídeos mais firmemente ligados à parede celular fúngica. Os extratos obtidos foram reunidos, concentrados em rota-evaporador e submetidos à precipitação com etanol (3:1, v/v) para precipitação dos componentes de alta massa molar, os quais foram separados dos componentes de baixa massa por centrifugação, seguida de diálise contra água corrente. Obtendo-se as frações polissacarídicas HW-Ct (2,23 g; 6,37% em relação ao peso seco inicial) e HW-Cs (2,79 g; 2,24% em relação ao peso seco inicial) (FIGURA 11A e B).

FIGURA 11 - PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA Dos EXTRATOS AQUOSOS A QUENTE DE *C. tricholoma* (A) e *C. speciosa* (B).



FONTE: a Autora (2015).

As frações HW-*Ct* e HW-*Cs* apresentaram maior porcentagem de glucose, em sua composição monossacarídica, seguida por manose e galactose conforme mostrado na Tabela 2.

TABELA 2- RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS À QUENTE DE *C. tricholoma* E *C. speciosa*.

Espécie	Frações	Rendimento (g)	Composição monossacarídica ^a (%) ^b		
			Man	Gal	Glc
<i>Ct</i>	HW- <i>Ct</i>	2,23	9,33	3,16	87,51
	SHW- <i>Ct</i>	0,28	26,51	12,38	61,11
	IHW- <i>Ct</i>	1,60	-	-	100,00
<i>Cs</i>	HW- <i>Cs</i>	2,79	27,13	23,98	48,89
	SHW- <i>Cs</i>	0,77	32,04	27,57	40,39
	IHW- <i>Cs</i>	0,37	-	-	100,00

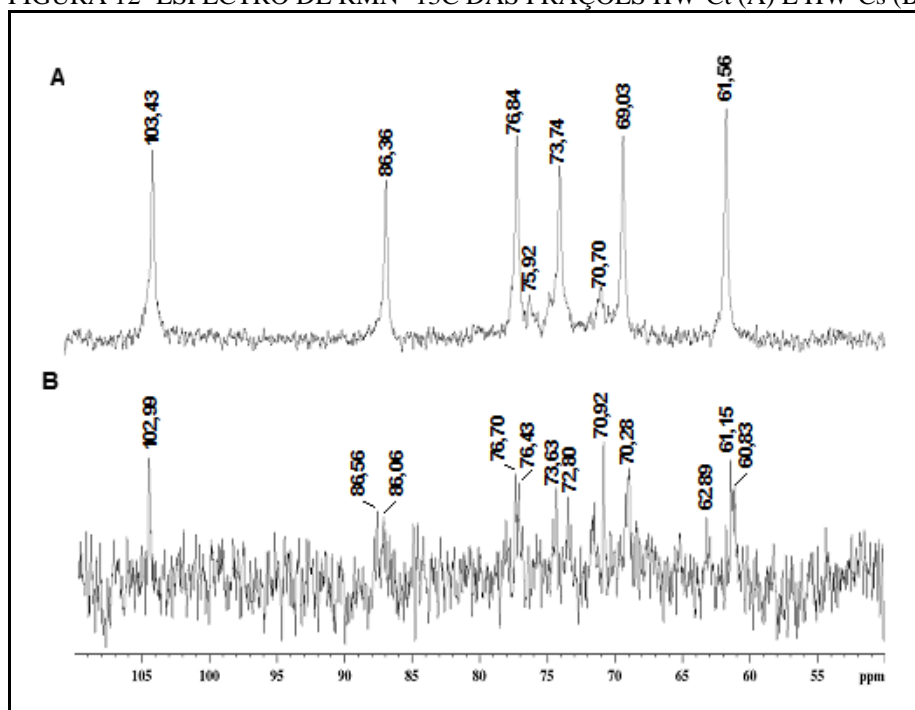
FONTE: a Autora (2015).

^aAnalisado por GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 1M, 100 °C, 8 horas), redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Percentual relativo as áreas de todos os picos.

Quando as frações aquosas a quente foram analisadas por RMN-¹³C, o espectro de HW-*Ct* apresenta uma melhor definição dos sinais, enquanto no espectro de HW-*Cs*, os sinais apresentam-se pouco definidos (FIGURA 12).

FIGURA 12- ESPECTRO DE RMN -¹³C DAS FRAÇÕES HW-*Ct* (A) E HW-*Cs* (B).



FONTE: a Autora (2015).

Em ambos os espectros é possível observar sinais característicos, que podem ser atribuídos a presença de β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas (RUTHES *et al.*, 2013). Os sinais de C-1 em δ 103,43 e 102,99, para HW-Ct e HW-Cs, respectivamente (FIGURA 12A e B) indicam a configuração β (GORIN; MAZUREK, 1975). Os sinais de C-3 substituídos podem ser observados em δ 86,36 e 86,56/ 86,06.

As frações brutas HW-Ct e HW-Cs foram submetidas ao processo de congelamento e degelo, resultando em frações insolúveis em água fria, IHW-Ct e IHW-Cs, as quais apresentaram apenas glicose em sua composição monossacarídica, e frações solúveis em água fria, SHW-Ct e SHW-Cs. As frações SHW-Ct e SHW-Cs apresentaram glicose (61,11% e 40,39%), manose (26,51% e 32,04%) e galactose (12,38% e 27,57%), respectivamente, em suas composições monossacarídicas. Sugerindo a presença de heteropolissacarídeos com cadeia principal formada por unidades de D-manose, típicos de Ascomycetos, como glucomanas e galactomananas (BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983).

Maiores detalhes da caracterização estrutural das frações insolúveis estão apresentados no item 5.4.

5.3 EXTRAÇÃO ALCALINA

Por fim, foi realizada a extração alcalina (KOH 2%) sob refluxo em banho-maria fervente (FIGURA 8 pg. 41) para a extração dos demais polissacarídeos. Os extratos foram neutralizados com AcOH, dialisados e concentrados em rota-evaporador, resultando nas frações K2-Ct (5,30 g; 15,14% em relação ao peso seco inicial) e K2-Cs (24,16 g; 19,41% em relação ao peso seco inicial).

A composição monossacarídica da fração K2-Ct, assim como da fração K2-Cs e as demais frações, apresentaram maior porcentagem de glicose em relação aos demais monossacarídeos, seguido de manose e galactose (TABELA 3).

TABELA 3 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS DE *C. tricholoma* E *C. speciosa*.

Espécie	Frações	Rendimento (g)	Composição monossacarídica ^a (%) ^b		
			Man	Gal	Glc
<i>Ct</i>	K2- <i>Ct</i>	5,30	15,08	7,14	69,58
	SK2- <i>Ct</i>	2,30	21,14	7,68	71,18
	IK2- <i>Ct</i>	2,60	-	-	100,00
<i>Cs</i>	K2- <i>Cs</i>	24,16	13,06	13,06	73,88
	SK2- <i>Cs</i>	3,23	25,18	20,38	54,44
	IK2- <i>Cs</i>	9,66	-	-	100,00

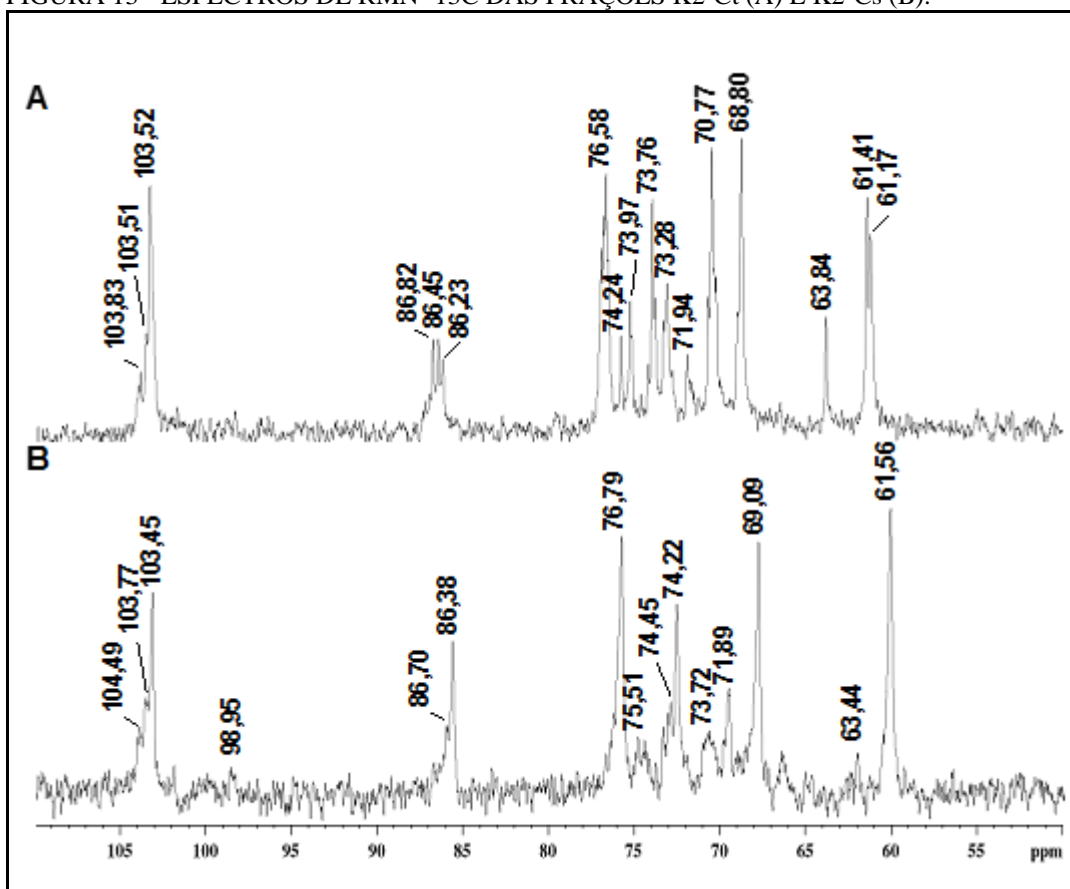
FONTE: a Autora (2015).

^a Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 1M, 100 °C, 8 horas), redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Percentual relativo as áreas de todos os picos.

Os espectros de RMN-¹³C das frações alcalinas brutas, K2-*Ct* e K2-*Cs* (FIGURA 12A e B), assim como aqueles das frações brutas das extrações aquosa a frio (CW-*Ct* e CW-*Cs*) e a quente (HW-*Ct* e HW-*Cs*), apresentaram sinais característicos da presença de β-D-glucanas (1→3), (1→6)-ligadas (RUTHES *et al.*, 2013).

FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN -¹³C DAS FRAÇÕES K2-*Ct* (A) E K2-*Cs* (B).



FONTE: a Autora (2015).

Além dos sinais característicos da presença de β -D-glucanas, no espectro da fração K2-C_s, também é possível observar a presença de sinais de baixa intensidade na região anomérica, δ 98,95, indicando a presença de unidades com configuração α (GORIN; MAZUREK, 1975).

Assim como as demais frações brutas, as frações K2-C_t e K2-C_s, também foram submetidas a etapa de purificação por congelamento e degelo. Como resultado foram obtidas frações insolúveis em água fria (IK2-C_t e IK2-C_s) as quais apresentaram apenas glucose como monossacarídeo em sua composição, e frações solúveis em água fria (SK2-C_t e SK2-C_s). Essas frações, assim como aquelas obtidas a partir das extrações aquosas, apresentaram manose, galactose e glucose em sua composição monossacarídica. Sendo o monossacarídeo majoritário a glucose, 71,18% e 54,44% seguido de manose, 21,14% e 25,18% e galactose 7,68% e 20,38%, para SK2-C_t e SK2-C_s, respectivamente. Sugerindo a presença de heteropolissacarídeos com cadeia principal formada por unidades de D-manose, típicos de Ascomicetos, como glucomanas e galactomananas (BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983).

A caracterização estrutural, análise de metilado, peso molecular e espectros mais detalhados das frações insolúveis serão apresentados no item 5.4.

5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Para facilitar o entendimento, os resultados da caracterização estrutural das β -D-glucanas isoladas a partir das frações insolúveis em água fria (ICW, IHW e IK2) dos diferentes extratos, aquoso a frio (CW), aquoso a quente (HW) e alcalino (K2) serão apresentados separadamente para cada uma das espécies *C. tricholoma* (C_t) e *C. speciosa* (C_s).

5.4.1 *Cookeina tricholoma*

As três frações insolúveis em água fria obtidas a partir dos extratos de *C. tricholoma*, ICW-C_t, IHW-C_t e IK2-C_t, puderam ser consideradas como frações puras, tendo como base os resultados de composição química, dos experimentos de RMN 1D e 2D, das análises de metilação e das análises de SEC.

Cada fração polissacarídica mostrou ser composta exclusivamente por glucose, quando analisada quanto a sua composição monossacarídica (TABELAS 1, 2 e 3, p.

41,44 e 46). Submetidas a análise de metilação, os acetatos de alditol parcialmente *O*-metilados resultantes, mostram que as frações polissacarídicas, ICW-*Ct*, IHW-*Ct* e IK2-*Ct* são constituídas por D-glucanas (1→3), (1→6)-ligadas, devido a presença dos derivados *per-O*-metilados, 2,3,4,6-Me₄-Glc, 2,4,6-Me₃-Glc, 2,3,4-Me₃-Glc e 2,4-Me₂-Glc (TABELA 4). A relação entre os derivados *per-O*-metilados foi de 1:3:2:1 para ICW-*Ct*, 1:10:1:1 para IHW-*Ct* e 1:1:0, 5:1 para IK2-*Ct*. Estes resultados mostram que a D-glucana da fração alcalina, IK2-*Ct* tem um grau de substituição maior (26,25%), seguida pela D-glucana da fração ICW-*Ct* (13,46%), sendo a D-glucana da fração IHW-*Ct*, a menos substituída IHW-*Ct* (6,27%). A análise de metilação também mostrou que a D-glucana presente na fração ICW-*Ct*, apresenta pelo menos duas unidades de D-Glcp (1→6)-ligadas para uma unidade de D-Glcp como terminal não redutor. Enquanto que na fração IHW-*Ct*, cada ramificação é provavelmente composta por uma unidade de D-Glcp (1→6)-ligada à uma unidade de D-Glcp terminal não redutora, e na fração IK2-*Ct*, a substituição da cadeia principal se dá tanto por uma única unidade de D-Glcp, quanto por cadeias laterais de D-Glcp (1→6)-ligadas.

TABELA 4 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS D-GLUCANAS ISOLADAS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *C. tricholoma*.

Acetatos de alditol parcialmente <i>O</i> -metilados ^a	<i>Tr</i> ^b	Área dos fragmentos (%) ^c			Tipo de Ligações ^d
		ICW- <i>Ct</i>	IHW- <i>Ct</i>	IK2- <i>Ct</i>	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	10.457	15,06	7,57	29,97	Glcp-(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc	13.017	40,86	78,54	30,26	3→)-Glcp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc	14.239	30,36	7,62	13,52	6→)-Glcp-(1→
2,4-Me ₂ -Glc	19.685	13,46	6,27	26,25	3,6→)-Glcp-(1→

FONTE: a Autora (2015).

^a Análise em GC-MS, coluna CP-Sil-43CB;

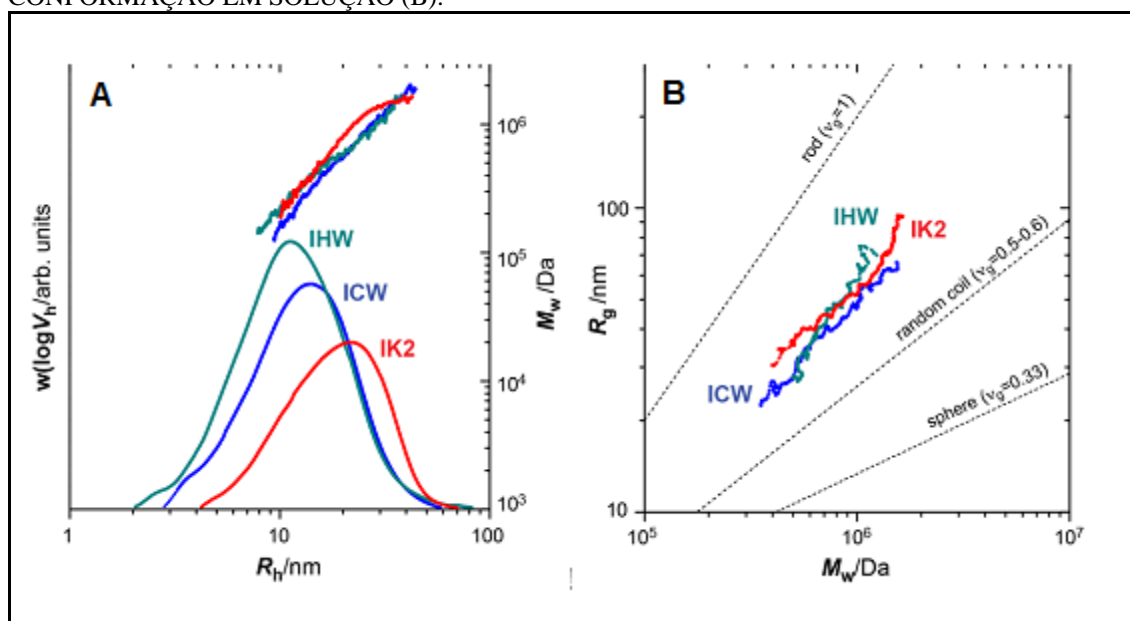
^b Tempo de Retenção (min);

^c Percentual relativo às áreas de todos os picos;

^d Baseado nos acetatos de alditol parcialmente *O*-metilados.

Na sequência foram verificados a distribuição de massa molecular, o tamanho macromolecular, assim como a conformação em solução das D-glucanas presentes nas frações ICW-*Ct*, IHW-*Ct* e IK2-*Ct* (FIGURA 14; TABELA 5). As três frações de polissacarídeos exibiram distribuições de peso monomodais $w(\log V_h)$ para uma variação de tamanhos hidrodinâmicos compreendidos entre 5-50 nm, indicando uma distribuição homogênea das populações moleculares.

FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR E TAMANHO MACROMOLECULAR (A); CONFORMAÇÃO EM SOLUÇÃO (B).



FONTE: a Autora (2015).

A fração alcalina IK2-Ct mostrou as maiores massas molares tanto em média, quanto em distribuição, seguida por ICW-Ct e IHW-Ct (TABELA 5). Os valores médios das massas molares correlacionam-se bem com os raios de giro médios $\langle R_g \rangle_w$ para as diferentes β -D-glucanas, com valores entre 30 a 55 nm. Os gráficos de conformação representam a relação entre a massa molar média \bar{M}_w e o raio de giro (R_g) para as diferentes frações (FIGURA 14B). A inclinação das plotagens logarítmicas (ν_g) está relacionada com a conformação em solução, de acordo com a teoria de escala, com um valor teórico de 0,33 para uma esfera compacta (*compact sphere*), 0,5-0,6 para a conformação de mola flexível (*flexible random coil*) e 1 para uma haste rígida (*stiff rod*) (TSAIH; CHEN, 1999). Todas as amostras apresentam conformações em solução, em DMSO, que podem ser atribuídas a cadeias semi flexíveis, com IK2-Ct apresentando a conformação mais flexível ($\nu_g = 0,59$) e IHW-Ct a conformação da cadeia mais rígida, próxima a de uma haste ($\nu_g = 0,97$) (TABELA 5). Estas conformações estão em concordância com os resultados dos graus de ramificação obtidos pelas análises de metilação (TABELA 4), onde as cadeias com menor grau de ramificação (IHW-Ct) têm conformações mais rígidas, e as cadeias principais das D-glucanas com maior grau de ramificação e com cadeias laterais mais extensas (IK2-Ct) resultou em cadeia com conformação mais flexível, quando em solução.

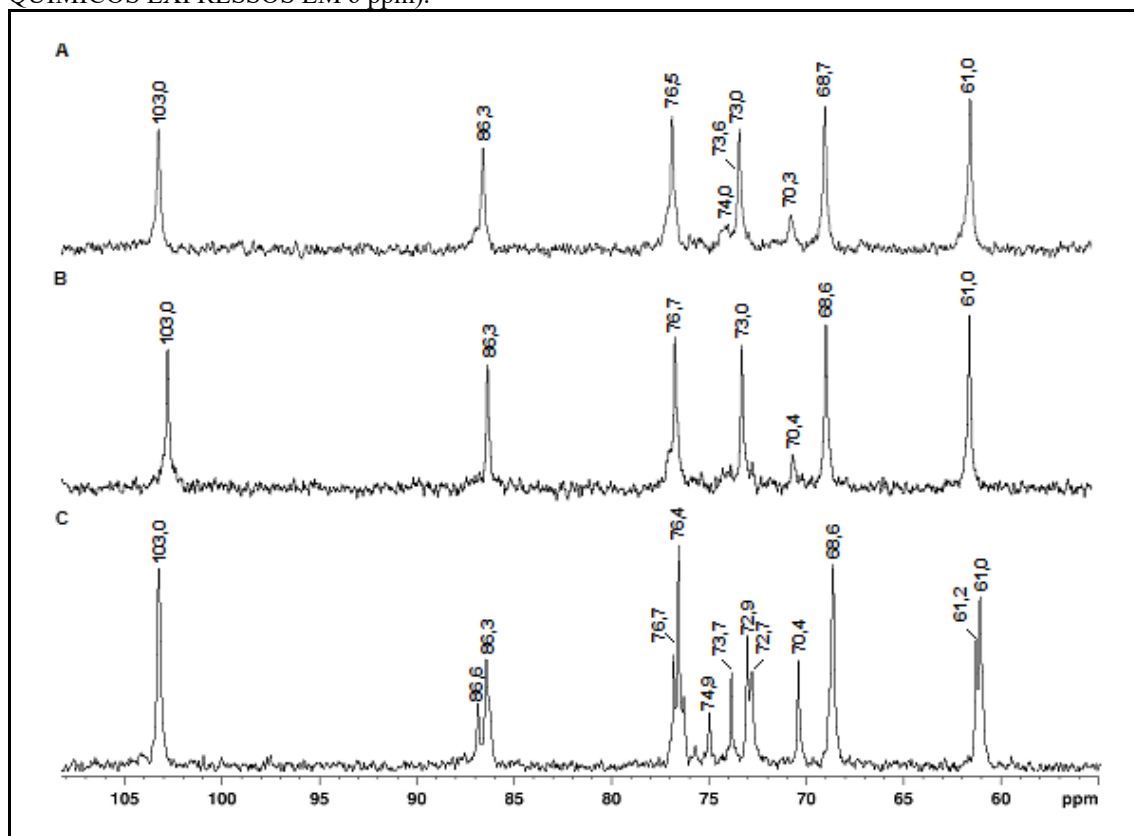
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR, TAMANHO MACROMOLECULAR E CONFOMAÇÃO DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS DE *C. tricholoma*.

Amostra	\bar{M}_n (Da)	\bar{M}_w (Da)	D	$\langle \bar{R}_g \rangle_w$ (nm)	$\square\square$
ICW-Ct	184220	432290	2,3	29,2	0,72
IHW-Ct	170290	370920	2,2	33,1	0,97
IK2-Ct	412950	817450	2,0	55,4	0,59

FONTE: a Autora (2015).

Os espectros de RMN- ^{13}C (FIGURA 15) e de HSQC-DEPT (FIGURA 15) das β -D-glucanas obtidos a partir da fração insolúvel ICW-Ct, contêm quatro sinais distintos na região anomérica em δ 103,5/4,29, 103,0/4,16, 102,5/4,42 e 102,5/4,27, que correspondem as unidades, terminal não redutor, 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas, respectivamente. Enquanto para as frações IHW-Ct e IK2-Ct, podem ser observados três sinais na região anomérica, em δ 102,8/4,29 e 103,0/4,29 correspondendo ao C-1 das unidades terminais não redutores, δ 102,9/4,17 e 102,7/4,14 das unidades 3-O-substituída e δ 102,6/4,43 e 102,5/4,43 das unidades 6-O- e 3,6-di-O-substituídas para as frações IHW-Ct (FIGURA 15B) e IK2-Ct (FIGURA 15C), respectivamente.

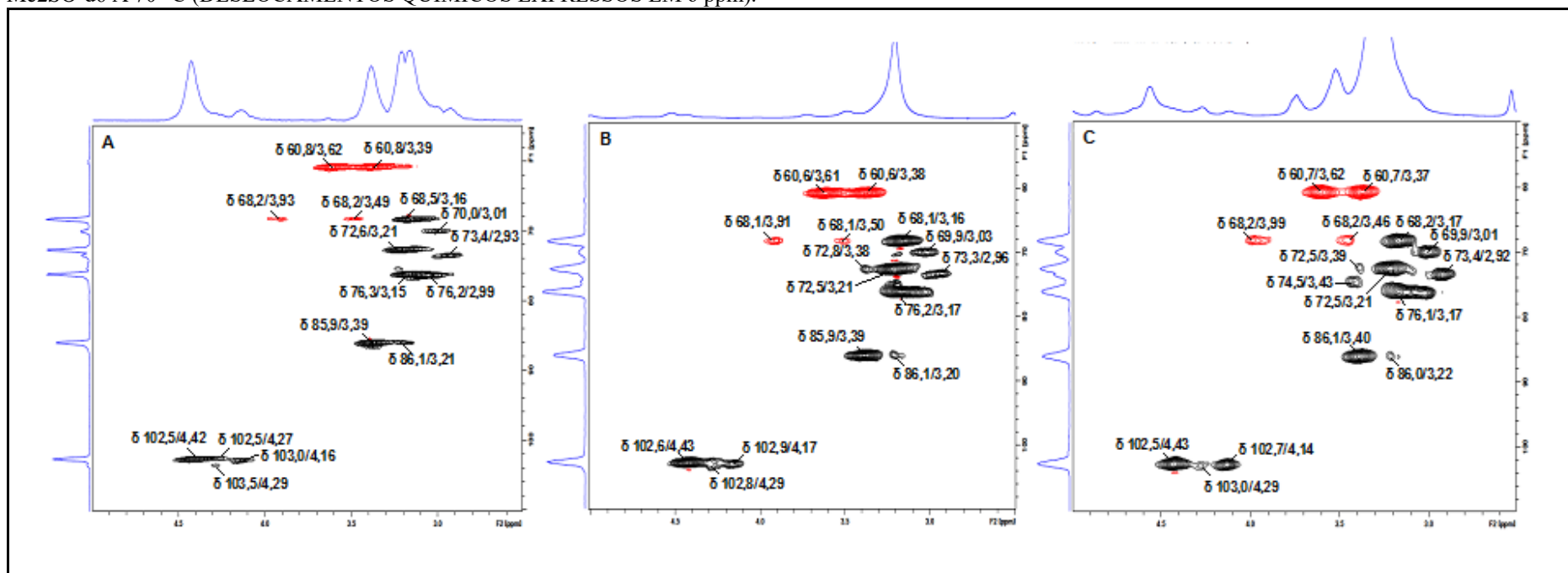
FIGURA 15 - ESPECTROS RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES DE β -D-GLUCANAS INSOLÚVEIS: ICW-Ct (A), IHW-Ct (B) E IK2-Ct (C); REALIZADOS EM Me 2SO-d_6 A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).



FONTE: a Autora (2015).

No entanto, os sinais correspondentes às unidades 6-*O*-substituídas não são observados separadamente para IHW-*Ct* e IK2-*Ct*, devido a sobreposição com os sinais das unidades 3,6-di-*O*-substituídas. A configuração β foi confirmada pela presença de sinais de H-1 em baixa frequência, para todas as frações δ 4,43(4,42), 4,29, 4,27, e 4,17(4,16; 4,14) e de sinais de C-1 em alta frequência (δ 103,5; 103,0; 102,9; 102,7; 102,6 e 102,5) (FIGURA16) (HALL; JOHNSON, 1969).

FIGURA 16 - ESPECTRO DE HSQC-DEPT DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS ICW-Ct (A), IHW-Ct (B) E IK2-Ct (C) DA ESPÉCIE *C. tricholoma*; REALIZADOS EM Me₂SO-d₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).



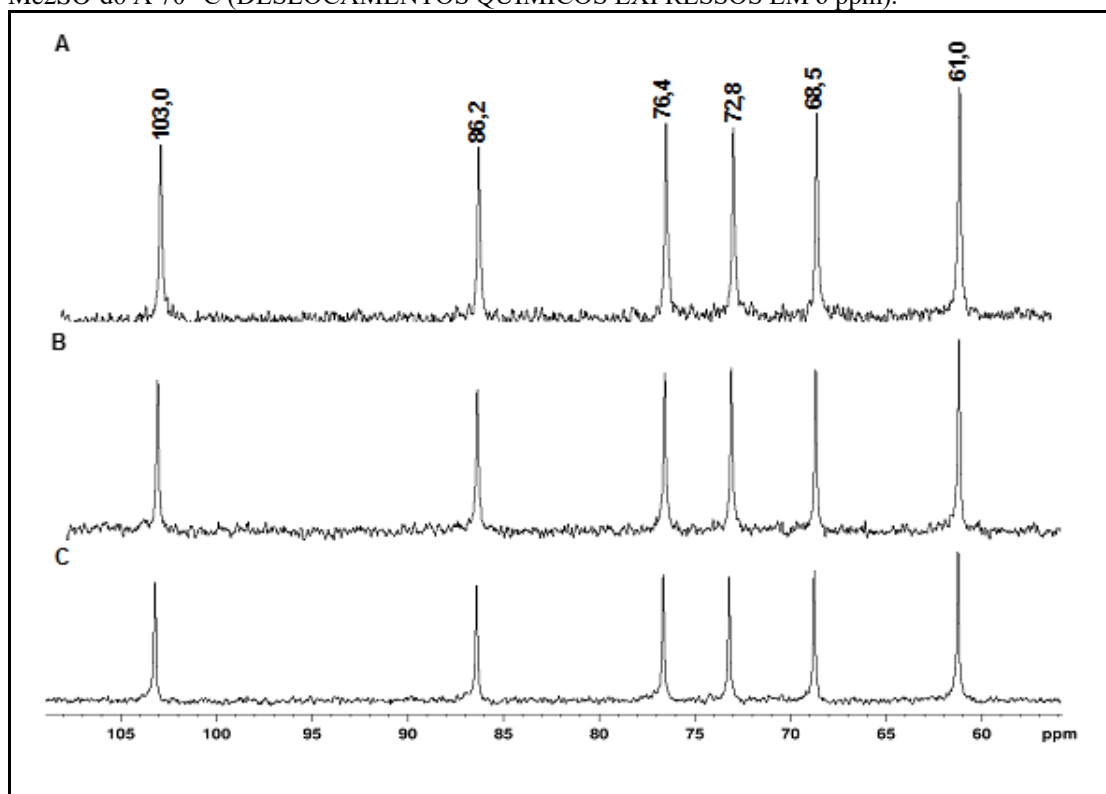
FONTE: a Autora (2015).

* Correlações para os grupos CH₂ estão apresentadas na fase negativa, em **vermelho**. Os demias picos em **preto** estão em fase positiva.

As ligações glicosídicas das três D-glucanas insolúveis são demonstrados pela presença de sinais característicos para unidades 3-*O*-substituídas em δ 85,9/3,39 e 86,1/3,21 para ICW-*Ct*, δ 85,9/3,39 e 86,1/3,20 para IHW-*Ct* em δ 86,1/3,40 e 86,0/3,22 para IK2-*Ct* (FIGURA 16A, B e C, respectivamente). Enquanto a substituição em O-6 foi confirmada pelos sinais presentes na fase negativa (mostrados em vermelho) observados no espectro HSQC-DEPT (FIGURA 16A, B e C, RESPECTIVAMENTE). Os sinais de substituição em C-6 podem ser observados em δ 68,2/3,93 e 3,49 (ICW-*Ct*), δ 68,1/3,91 e 3,50 (IHW-*Ct*) e em δ 68,2/3,99 e 3,46 (IK2-*Ct*) (FIGURA 15A, B e C, respectivamente).

A estrutura da cadeia principal das D-glucanas da espécie *C. tricholoma* foram caracterizados através da degradação controlada de Smith. A partir da qual, os produtos de degradação (SM-ICW, SM-IHW, e SM-IK2, respectivamente) foram analisados por espectrometria de RMN- ^{13}C (FIGURA 17). Baseado no espectro de RMN- ^{13}C , pode-se observar que cada fração insolúvel apresenta uma cadeia linear formada por unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)-ligadas, devido a presença de apenas seis sinais de ^{13}C , típicos de uma estrutura linear 3-*O*-substituída.

FIGURA 17- ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH: SM-ICW (A), SM-IHW (B) E SM-IK2 (C) DE *C. tricholoma*; β -D-GLUCANAS EM Me₂SO-d₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).



FONTE: a Autora (2015).

Todos os sinais puderam ser assinalados, δ 103,0 (C-1), 86,2 (C-3), 76,4 (C-5), 72,8 (C-2), 68,5 (C-4) e 61,0 (C-6) para todos os produtos da degradação controlada de Smith (SM-ICW, SM-IHW e SM-IK2) (RUTHES et al., 2013a; RUTHES; SMIRDELE; IACOMINI, 2015).

5.4.2 *Cookeina speciosa*

Assim como para as frações insolúveis da espécie *Cookeina tricholoma*, as três frações insolúveis, obtidas a partir das extrações aquosa a frio (ICW-C_s), aquosa a quente (IHW-C_s) e alcalina (IK2-C_s) da espécie *Cookeina speciosa* puderam ser consideradas como frações puras, tendo como base os resultados de composição química, dos experimentos de RMN 1D e 2D e, análises de metilação.

Cada fração polissacarídica mostrou ser composta exclusivamente por glucose, quando analisadas quanto a sua composição monossacarídica (TABELAS 1, 2 e 3, p. 42,45 e 47).

Quando submetidas a análise de metilação, os acetatos de alditol parcialmente *O*-metilados resultantes, mostram que as frações polissacarídicas, ICW-C_s, IHW-C_s e IK2-C_s são constituídas por D-glucanas (1→3), (1→6)-ligadas, devido a presença dos derivados *per-O*-metilados, 2,3,4,6-Me₄-Glc, 2,4,6-Me₃-Glc, 2,3,4-Me₃-Glc e 2,4-Me₂-Glc (TABELA 6). A relação entre os derivados *per-O*-metilados foi de 1:0,5:1:1 para ICW-C_s, 1:1:0,5:1 para IHW-C_s e 5:21:1:5 para IK2-C_s. Os resultados de metilação mostram que, diferente do observado para as β-D-glucanas de *C. tricholoma*, as D-glucanas de *C. speciosa*, presentes nas frações ICW-C_s e IHW-C_s são as mais ramificadas, 24,5 e 25,0%, respectivamente, e IK2-C_s tem um grau de substituição menor, 16,9 %. Na fração ICW-C_s, cada ramificação é provavelmente composta por duas unidades de D-Glcp ligadas, e na fração IHW-C_s assim como observado para a fração IK2-C_s, a substituição da cadeia principal (1→6)-ligada se dá tanto por uma única unidade de D-Glcp, quanto por cadeias laterais de D-Glcp. Além disso, a fração IK2-C_s apresenta-se em maior parte substituída apenas por terminais não redutores de D-Glcp, com poucas cadeias laterais de D-Glcp(1→6)-ligada, aproximadamente uma unidade de D-Glcp (1→6)-ligada para 4 unidades de D-Glcp como terminal não redutor.

TABELA 6 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS D-GLUCANAS ISOLADAS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DO *C. speciosa*

Acetatos de alditol parcialmente <i>O</i> -metilados ^a	<i>Tr</i> ^b	Area dos fragmentos (%) ^c			Tipo de Ligações ^d
		ICW-C _s	IHW-C _s	IK2-C _s	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	10.457	23,70	27,00	16,80	Glc _p -(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc	13.017	17,20	30,60	63,30	3→)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc	14.239	34,70	16,80	3,00	6→)-Glc _p -(1→
2,4-Me ₂ -Glc	19.685	24,50	25,70	16,90	3,6→)-Glc _p -(1→

FONTE: a Autora (2015).

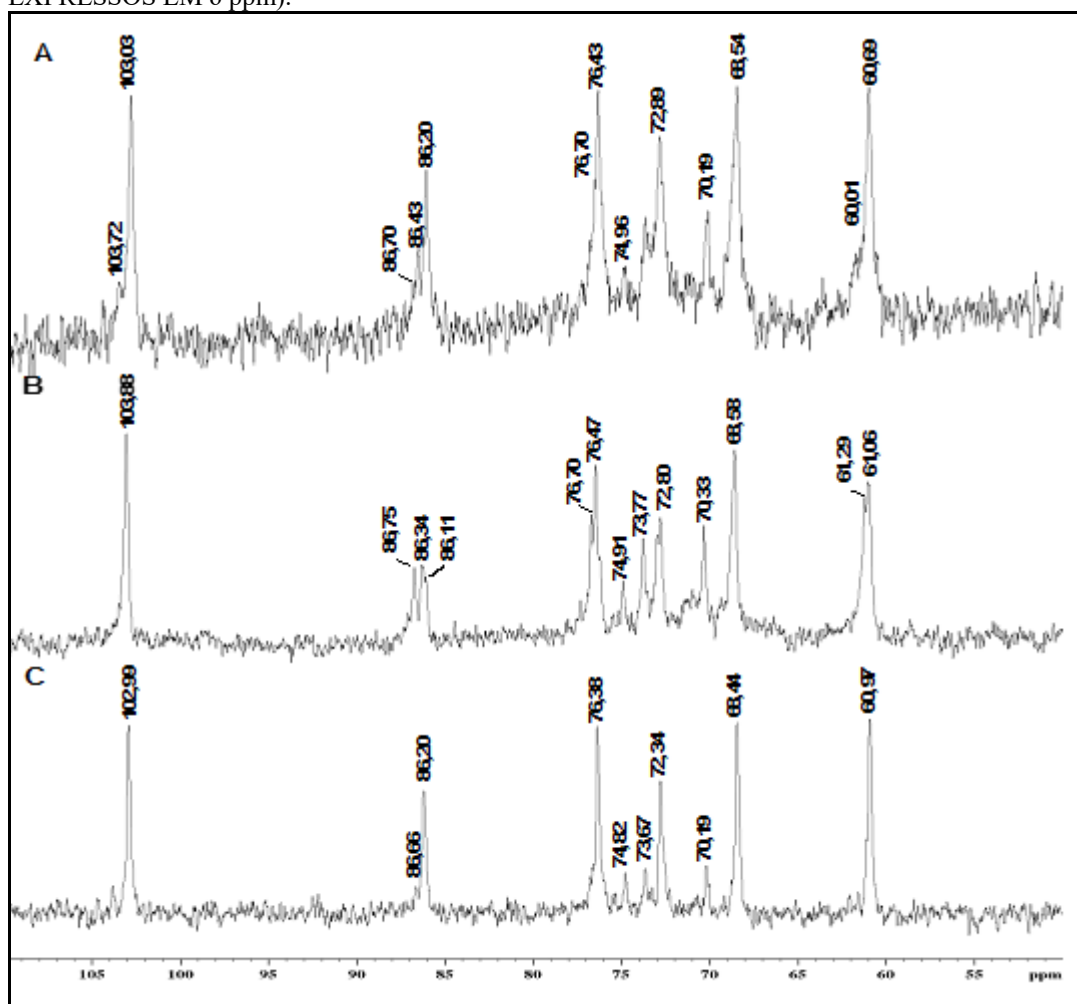
^a Análise em GC-MS, coluna CP-Sil-43CB;

^b Tempo de Retenção (min);

^c Percentual relativo às áreas de todos os picos;

^d Baseado nos acetatos de alditol parcialmente *O*-metilados.

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN-13C DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS DE *C. speciosa*: ICW-C_s (A), IHW-C_s (B) E IK2-C_s (C); REALIZADOS EM Me₂SO-d₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).



FONTE: a Autora (2015).

Todas as frações apresentaram sinais de RMN característicos de β-D-Glucanas (1→3), (1→6)-ligadas, assim como observado para as frações insolúveis obtidas a partir

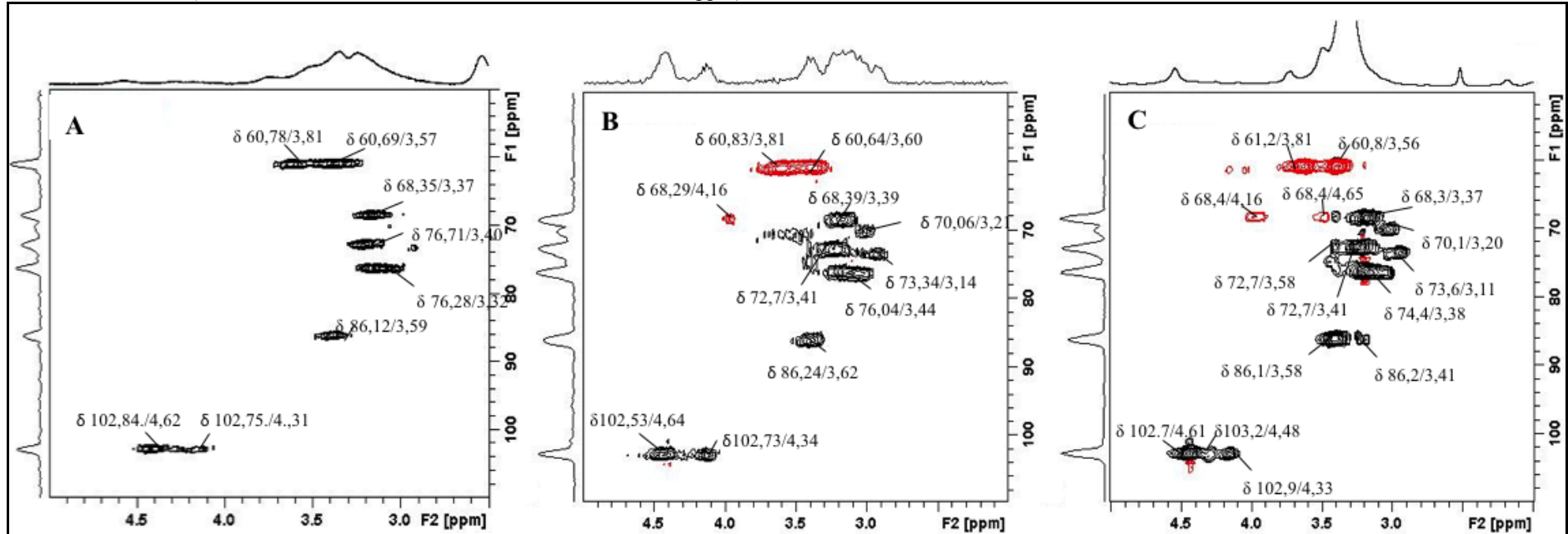
de *C. tricholoma*. Os sinais de C-1 das unidades de β -D-Glcp terminais não redutores podem ser observados em δ 103,03 (ICW-C_s); δ 103,88 (IHW-C_s) e δ 102,99 (IK2-C_s). A presença da substituição em C-3 pode ser confirmada pela presença dos sinais em δ 86,70/86,43/86,20 (ICW-C_s); δ 86,75/86,34/86,11 (IHW-C_s) e δ 86,66/86,20 (IK2-C_s).

Os espectros de RMN-¹³C (FIGURA 17) e de HSQC-DEPT (FIGURA 19) das β -D-glucanas obtidos a partir das frações insolúvel. Para as frações ICW-C_s pode ser observado apenas dois sinais que correspondem as unidades 6-O- e 3,6-di-O-substituídas em δ 102,84/4,62 e 102,75/4,31 e para a fração IHW-C_s em δ 102,8/4,29. Os sinais correspondentes a região anomérica são observados em δ 103,0/4,29 para a fração correspondendo ao C-1 das unidades terminais não redutores e δ 103,2/4,48 (FIGURA (FIGURA 18B) IHW-C_s e (FIGURA 19C) , respectivamente.

A configuração β foi confirmada pela presença de sinais de H-1 em baixa frequência, para todas as frações (δ 4,64; 4,62; 4,61; 4,48; 4,34; 4,33 e 4,31) e de sinais de C-1 em alta frequência (δ 103,2; 102,9; 102,84; 102,7; 102,75; 102,73 e 102,53) (FIGURA 19) (HALL; JOHNSON, 1969).

As ligações glicosídicas das três D-glucanas insolúveis são demonstrados pela presença de sinais característicos para unidades 3-O-substituídas em δ 86,12/3,59 para ICW-C_s, δ 86,24/3,62 IHW-C_s em δ 86,2/3,41 e 86,1/3,58 para IK2-C_s (FIGURA 19A, B e C, respectivamente). Enquanto a substituição em O-6 foi confirmada pelos sinais presentes na fase negativa (mostrados em vermelho para as frações IHW-C_s e IK2-C_s) observados no espectro HSQC-DEPT (FIGURA 19A, B E C, respectivamente). Os sinais de substituição em C-6 podem ser observados em δ 68,35/3,37 (ICW-C_s), δ 68,39/3,39 e 68,28/4,16 (IHW-C_s) e em δ 68,4/4,65 e 4,16 (IK2-C_s) (FIGURA 19B e C).

FIGURA 19 - ESPECTRO DE HSQC-DEPT DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS ICW-Cs (A), IHW-Cs (B) E IK2-Cs (C) DA ESPÉCIE *C. speciosa*; REALIZADOS EM Me₂SO-d₆ A 70 °C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).

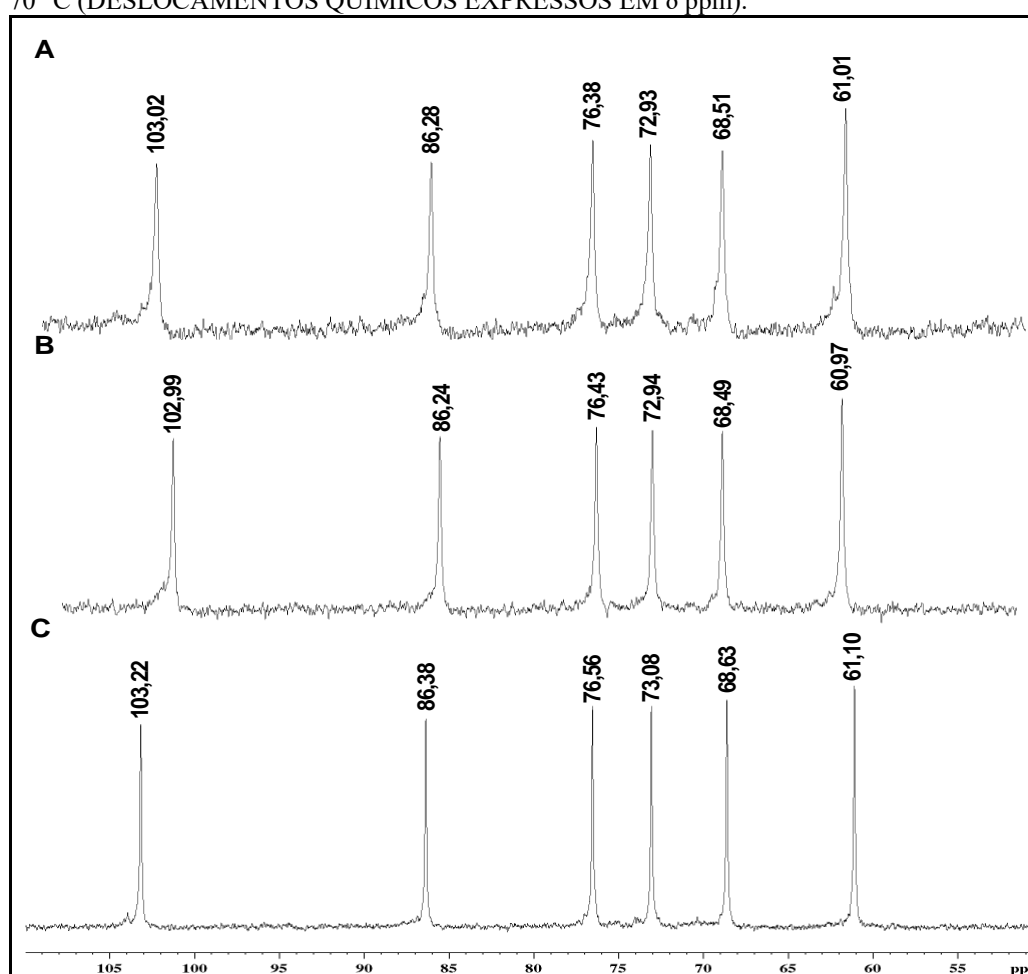


FONTE: a Autora (2015).

* Correlações para os grupos CH₂ estão apresentadas na fase negativa, em **vermelho**. Os demias picos em **preto** estão em fase positiva.

A estrutura da cadeia principal das D-glucanas de espécie *C. speciosa* foram caracterizados através da degradação controlada de Smith, assim como para *C. tricholoma*. Os produtos de degradação (SM-ICW, SM-IHW, e SM-IK2, respectivamente) foram analisados por espectrometria de RMN- ^{13}C (FIGURA 20). As análises indicaram que todos os produtos de degradação controlada de Smith apresentam uma cadeia linear formada por unidades de $\beta\text{-D-Glcp}$ (1 \rightarrow 3)-ligadas, devido a presença de apenas seis sinais de ^{13}C , típicos de uma estrutura linear 3-*O*-substituída.

FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DE *C. speciosa*: SM-ICW (A), SM-IHW (B) E SM-IK2 (C); $\beta\text{-D-GLUCANA}$ EM $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ A 70°C (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM δ ppm).



FONTE: a Autora (2015).

Todos os sinais puderam ser assinalados, δ 103,02/102,99/103,22 (C-1), 86,28/86,24/86,38 (C-3), 76,38/76,43/76,56 (C-5), 72,93/72,94/73,08 (C-2), 68,51/68,49/68,63 (C-4) e 61,01/60,97/61,10 (C-6) para SM-ICW, SM-IHW, e SM-IK2, respectivamente (FIGURA 20) (RUTHES et al., 2013a; RUTHES; SMIRDELE; IACOMINI, 2015).

5.5 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS β -D-GLUCANAS (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-LIGADAS ISOLADAS DE *C. tricholoma* e *C. speciosa*

Diferentes polissacárideos isolados de cogumelos têm demonstrado exibir uma variedade de atividades biológicas, incluindo efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios (CARBONERO et al., 2008; KOMURA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; RUTHES et al., 2013a; RUTHES et al., 2013b; RUTHES et al., 2012; SILVEIRA et al., 2015; SMIDERLE et al., 2008; SMIDERLE et al., 2014).

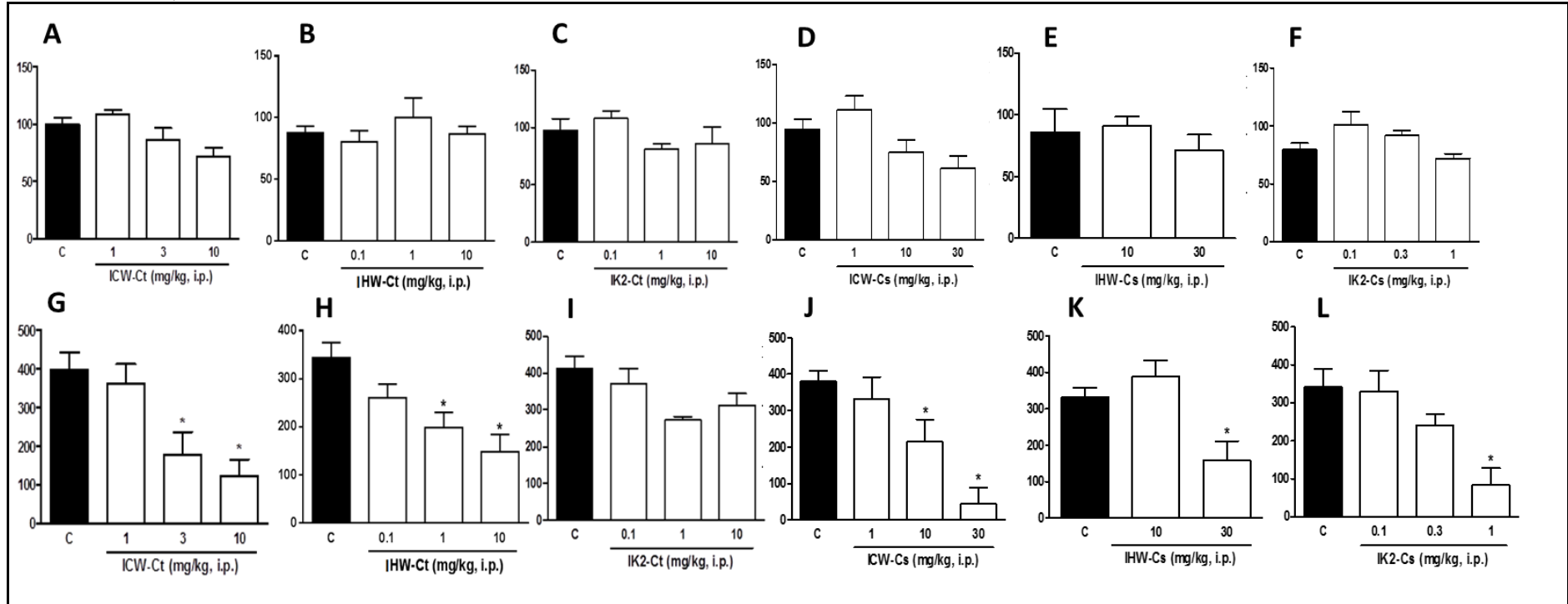
Considerando, que algumas glucanas de Basidiomicetos já foram testadas e apresentaram efeitos antinociceptivos significativos, inibindo a nocicepção da dor inflamatória (RUTHES et al., 2012; 2013; SILVEIRA et al., 2015; SMIDERLE et al., 2008), o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva das seis estruturas diferentes de β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas isoladas das espécies de ascomicetos *C. tricholoma* e *C. speciosa*, cuja caracterização estrutural foi discutida anteriormente. Para determinar tal atividade, o modelo de nocicepção induzida por formalina, que produz uma resposta comportamental bifásica foi escolhido. A primeira fase ou neurogênica é desencadeada pela ativação direta de nociceptores e, a segunda fase ou inflamatória é provocada pelo processo de inflamação no local da injeção.

A administração intraperitoneal das frações insolúveis (ICW-*Ct*, IHW-*Ct*, IK2-*Ct*, ICW-*Cs*, IHW-*Cs* e IK2-*Cs*) não reduziu a resposta nociceptiva da dor neurogênica (FIGURA 21 A, B, C, D, E e F respectivamente), primeira fase do modelo de nocicepção por injeção de formalina.

As frações obtidas por extração aquosa de *C. tricholoma*, ICW-*Ct* e IHW-*Ct* promoveram inibições de 69 ± 11 e $57 \pm 11\%$ na dose de 10 mg kg^{-1} , respectivamente, a resposta da dor inflamatória, segunda fase. Enquanto que a fração obtida por extração alcalina, IK2-*Ct*, não apresentou atividade antinociceptiva em ambas as fases (FIGURA 21I).

Quanto as frações insolúveis de *C. speciosa*, os valores de inibição da dor inflamatória foram de 99 ± 1 e $53 \pm 16\%$ para a dose de 30 mg kg^{-1} para as frações obtidas por extração aquosa, ICW-*Cs* e IHW-*Cs*, respectivamente e de $75 \pm 13\%$ na dose de 1 mg kg^{-1} para a fração IK2-*Cs*, obtida por extração alcalina (FIGURA 20 G, H, J, K e L).

FIGURA 21 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DAS FRAÇÕES ICW-Ct, IHW-Ct, IK2-Ct, ICW-Cs, IHW-Cs E IK2-Cs NA FASE NEUROGÊNICA (A, B, C, D, E, F) E FASE INFLAMATÓRIA (G, H, I, J, K, L) NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR INJEÇÃO DE FORMALINA 2,5% EM CAMUNDOS).



FONTE: a Autora (2015).

Os animais foram tratados com veículo (C - controle, 10 mL kg⁻¹, i.p.) ou doses das frações (0,1-30 mg kg⁻¹, i.p.). Dados expressos em média ± desvio padrão (n = 6- 8 animais por grupo) e comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste Newman Keul's. Diferenças entre grupo veículo (*p < 0.05

Os valores ID_{50} , ou seja, a dose de cada fração polissacarídica necessária para reduzir a resposta nociceptiva em 50% em relação ao valor do controle, para a resposta nociceptiva da dor inflamatória foram de 3,54 (1,71-7,34) e 3,65 (0,58-22,92) $mg\ kg^{-1}$ para ICW-Ct e IHW-Ct, respectivamente, e de 11,27 (7,11-17,86) e 0,55 (0,32-0,93) $mg\ kg^{-1}$ para as frações ICW-Cs e IK2-Cs, respectivamente. Não foi possível calcular o valor de DI_{50} da fração IHW-Cs, pois foram utilizadas apenas 2 doses. Esses resultados mostram que a resposta nociceptiva promovida pela fração IK2-Cs é a mais potente, quando comparados os valores de ID_{50} das β -D-glucanas de *C. tricholoma* e *C. speciosa*.

Curiosamente, verificou-se que a fração IK2-Ct, que apresenta M_w mais elevada ($8,17 \times 10^5$ Da) e apresentando tanto unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas, quanto unidades de β -D-Glcp como terminais não redutores substituindo a cadeia principal em O-6, não apresentou efeitos antinociceptivos no teste de formalina. Este resultado sugere que a elevada M_w pode influenciar mais a atividade biológica, quanto a resposta antinociceptiva. Por outro lado, ICW-Ct e IHW-Ct com M_w inferior do que IK2-Ct ($4,32 \times 10^5$ e $3,71 \times 10^5$ Da, respectivamente) e apresentando apenas cadeias principais substituídas por cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas, demonstraram inibição e potência (valores de ID_{50}) semelhantes. IHW-Cs por sua vez apresentou atividade apenas com a maior dose testada, $30\ mg\ kg^{-1}$, e ICW-Cs demonstrou atividade antinociceptiva com doses a partir de $10\ mg\ kg^{-1}$.

A fração IHW-Cs assim como a fração IK2-Ct, obtidas a partir de *C. speciosa* e *C. tricholoma*, respectivamente, apresentam cadeia principal substituída tanto por uma única unidade de β -D-Glcp, quanto por cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas.

No entanto a fração que se mostrou mais potente dentre todas as β -D-glucanas testadas foi a IK2-Cs, proveniente da extração alcalina KOH 2% dos corpos de frutificação de *C. speciosa*. Diferente das demais β -D-glucanas testadas, o teor de cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas é menor nesta fração, sendo principalmente substituída por unidades de β -D-Glcp como terminais não redutores.

Ao contrário dos resultados obtidos para β -D-glucanas com diferentes graus de ramificação e solubilidade, que não apresenta cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas substituindo a cadeia principal, isoladas do basidiomiceto *Lactarius rufus* (RUTHES et al., 2013^a), o grau de ramificação das β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas de *C. tricholoma* e *C. speciosa* pareceu não interferir na potência das frações ICW-Ct, IHW-Ct, que apresentam quantidades relativas de cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-

ligadas. No entanto, a β -D-glucana, com menor teor deste tipo de cadeia lateral, mostrou-se mais potente, indicando que a presença de cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas não é ideal quando busca-se um polímero com atividade antinociceptiva. É importante notar que apesar da menor solubilidade apresentada pelas β -D-glucanas obtidas de *C. tricholoma* e *C. speciosa*, estas apresentaram potência semelhante as apresentadas por β -D-glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas extraídas dos basidiomicetos *Lactarius rufus* [FSHW, M_w 1,13 x 10⁵ Da, DI₅₀ 2,35 (1,48-3,75) mg kg⁻¹] e *Amanita muscaria* [β GLC-Am, M_w 1.62 x 10⁴ Da, DI₅₀ 2,41 (1,13-5,14) mg kg⁻¹], na segunda fase da avaliação da nocicepção induzida por formalina (RUTHES et al., 2013a;b).

Além dos efeitos antinociceptivos avaliados para as β -D-glucanas de *L. rufus* e *A. muscaria*, esses efeitos também foram mensurados em β -D-glucanas extraídas do basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* (SMIRDELE et al., 2008). A β -D-glucana obtida de *P. pulmonarius* (M_w não determinada) mostrou efeito antinociceptivo semelhante quando avaliado em modelos de dor aguda e crônica os quais envolvem receptores glutaminérgicos, via das citocinas e inibição por proteína quinase C (BADDIO et al., 2012; BAGGIO et al., 2010). Por outro lado, a β -D-glucana de *P. pulmonarius* mostrou menor potência [ID₅₀ 12,9 (6,7-24,6) mg kg⁻¹], quando comparada às β -D-glucanas de *C. tricholoma* (ICW-Ct, IHW-Ct e IK2-Cs), *L. rufus* (FSHW) e *A. muscaria* (β GLC-Am), potência semelhante à apresentada pela fração ICW-Cs [ID₅₀ 11,17 (7,11-17,86) mg kg⁻¹] quando avaliadas pelo modelo de indução de nocicepção por injeção de formalina.

Os resultados obtidos confirmam a atividade das moléculas de β -D-glucanas e demonstram quem, no caso das β -D-glucanas insolúveis obtidas *C. tricholoma* e *C. speciosa*, o grau de ramificação pareceu não interferir na atividade antinociceptiva, quando estas apresentam quantidades relativas de cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas, substituindo a cadeia principal. Enquanto a M_w pareceu afetar mais a atividade antinociceptiva para as frações que apresentam cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas. Sendo assim, mais experimentos são necessários para investigar a particularidade e o(s) mecanismo(s) de ação relacionados à esse efeito, uma vez que foi observado que as diferenças nas estruturas das D-glucanas podem afetar suas propriedades biológicas.

6 CONCLUSÕES

As espécies *C. tricholoma* e *C. speciosa* foram submetidas a extrações exaustivas e dessas resultaram seis β -D-Glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-ligadas, insolúveis e com diferentes características estruturais, as quais foram avaliadas quanto a atividade antinociceptiva. Os resultados demonstraram que as moléculas mais ramificadas, com presença de longas cadeias laterais de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6)-ligadas apresentaram baixa potência, ou não apresentaram atividade biológica. Foi possível verificar também, a influência do peso molecular na atividade dessas moléculas, uma vez que β -D-Glucana obtida na extração alcalina da espécie *C. tricholoma* (IK2-Ct) apresentou maior peso molecular ($8,17 \times 10^5$ Da) e, devido as suas propriedades químicas, não foi possível avaliar a atividade biológica da mesma.

Os resultados obtidos com a caracterização e avaliação biológica destas moléculas, sugere que estudos mais detalhados, que correlacionem estrutura e características químicas com efeitos biológicos, são necessários para o melhor entendimento da aplicação destes polímeros na analgesia.

REFERÊNCIAS

- AHMED, T. et al. Comparative antimicrobial studies of selected antibiotics/antifungal with extracts of sesame radiatum against some common microorganisms. **Scientific Research and Essays**, March, 2005.
- BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of β -d-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 872-877, 2012.
- BAGGIO, C. H. et al. Antinociceptive effects of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.
- BARRETO-BERGTER, E; GORIN, P A. J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 41, p. 67-103, 1983.
- BEATTIE, K. D. et al. Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 8, p. 948-955, 2010.
- BELLO, B. K.; AKINYELE, B. J. Effect of Fermentation on the Microbiology and Mineral Composition. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 237-243, 2007.
- BHANJA, S. K. et al. Isolation and characterization of the immunostimulating β -glucans of an edible mushroom *Termitomyces robustus* var. **Carbohydrate research**, v. 357, p. 83-89, 2012.
- BHANJA, S. K. et al. Water-insoluble glucans from the edible fungus *Ramaria botrytis*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, n. 2, p. 52-58, 2014.
- BI, H. et al. Structures of (1 \rightarrow 6)- β -D-glucans from *Bulgaria inquinans* (Fries) and their immunological activities. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 547-552, 2013.
- BLACKWELL, M.. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BOBADILLA, F. et al. Soluble β -1, 3/1, 6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 241-248, 2013.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate polymers**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.
- CARBONERO, E. R. et al. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 531-537, 2008.

CARBONERO, E. R. et al. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 2, p. 814-819, 2012.

CHANG, S.-T. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. **Mushrooms as functional foods**, p. 1-33, 2008.

CHANPUT, W. et al. β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. **Molecular nutrition & food research**, v. 56, n. 5, p. 822-833, 2012.

CHEN, J.; RAYMOND, K. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. 2008.

CHEN, J.; SEVIOUR, R.. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological research**, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007.

CHEN, W. et al. Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages in vitro. **Cellular Immunology**, v. 262, n. 1, p. 69-74, 2010.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 672-678, 2004.

DAS, S. K. et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 961-968, 2010.

DENG, C. et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -d-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 1, p. 70-75, 2012.

DORE, C. M. P. G. et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 9, p. 1160-1169, 2007.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EMBRAPA. Embrapa capacita produtores no cultivo e análise química de cogumelos. Distrito Federal, 2014. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2009995/embrapa-capacita-produtores-no-cultivo-e-analise-quimica-de-cogumelos>. Acessado em abril de 2015.

GE, Q.; ZHANG, A.-Q.; SUN, P. Isolation, purification and structural characterization of a novel water-soluble glucan from the fruiting bodies of *phellinus baumii pilát*. **Journal of food biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1205-1215, 2010.

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

GIAVASIS, I. Production of microbial polysaccharides for use in food. **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**, p. 413-468, 2013.

GOLDSTEIN, I. J. et al. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 5, p. 361-370, 1965.

GUILLAMÓN, E. et al. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 715-723, 2010.

GUZMÁN-VILLANUEVA, L. T. et al. Dietary administration of β -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 1, p. 34-41, 2014.

HALL, L. D.; JOHNSON, L. F. Chemical studies by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shift dependencies of oxygenated derivatives. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, n. 10, p. 509-510, 1969.

HENKEL, T. W. et al. Edible mushrooms from Guyana. **Mycologist**, v. 18, n. 03, p. 104-111, 2004.

ISHIKAWA, S. et al. The plasma membrane intactness of root-tip cells is a primary factor for Al-tolerance in cultivars of five species. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 489-501, 2001.

INPA. A Riqueza dos cogumelos comestíveis da Amazônica. Publicado em 04 de agosto de 2008. Disponível em < <https://www.inpa.gov.br/noticia>>. Acessado em 04 de abril de 2015.

JIN, Y. et al. Solution properties of a water-insoluble (1 \rightarrow 3)- α -d-glucan isolated from *Poria cocos mycelia*. **Carbohydrate polymers**, v. 57, n. 2, p. 205-209, 2004.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015.

KIM, B.-C. et al. The anti-inflammatory activity of *Phellinus linteus* (Berk. & MA Curt.) is mediated through the PKC δ /Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 240-247, 2007.

KIM, Y.-W. et al. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 7, p. 483-487, 2005.

KOMURA, D. L. et al. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource technology**, v. 101, n. 15, p. 6192-6199, 2010.

LAROCHE, C.; MICHAUD, P. New developments and prospective applications for β (1, 3) glucans. **Recent patents on biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 59-73, 2007.

- LIN, J.-G. et al. An extract of *Agaricus blazei* Murill administered orally promotes immune responses in murine leukemia BALB/c mice in vivo. **Integrative cancer therapies**, v. 11, n. 1, p. 29-36, 2012.
- LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. HJ; JÜLICH, W.-D.. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285-299, 2005.
- LIU, Y. et al. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 63-68, 2014.
- MAEDA, H. et al. Low-degree oxidized scleroglucan and its hydrogel. **International journal of biological macromolecules**, v. 28, n. 5, p. 351-358, 2001.
- MIZUNO, M.; NISHITANI, Yosuke. Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 52, n. 3, p. 202-207, 2013.
- MORADALI, M. F. et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701-724, 2007.
- NITSCHKE, J. et al. A new colorimetric method to quantify β -1, 3-1, 6-glucans in comparison with total β -1, 3-glucans in edible mushrooms. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 791-796, 2011.
- NOSS, I. et al. IgG to various beta-glucans in a human adult population. **International archives of allergy and immunology**, v. 157, n. 1, p. 98-108, 2011.
- NOVAK, M.; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 9, n. 1, p. 67-75, 2009.
- OKAZAKI, M. et al. Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 18, n. 10, p. 1320, 1995.
- OHTA, Y. et al. In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10194-10199, 2007.
- PINHO, P. G. de et al. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1704-1712, 2008.

- QUEIROZ, L. S. et al. Glucans from the Caripiamontagnei mushroom present anti-inflammatory activity. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 2010.
- REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y.. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. **Food & function**, v. 3, n. 11, p. 1118-1130, 2012.
- RIEDER, A. et al. Generic tools to assess genuine carbohydrate specific effects on in vitro immune modulation exemplified by β -glucans. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 2075-2083, 2013.
- RODRIGUES, M. R. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 519-526, 2012.
- ROY, S. K. et al. Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 18, p. 2596-2601, 2009.
- RUTHES, A. C. et al. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1620-1627, 2012.
- RUTHES, A. C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 761-769, 2013a.
- RUTHES, A. C. et al. *Lactarius rufus* (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 129-136, 2013b.
- RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate polymers**, v. 117, p. 753-761, 2015.
- SADOVSKAYA, I. et al. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -d-glucan from *Isochrysis galbana*. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 139-148, 2014.
- SAMANTA, S. et al. Studies on antioxidative and immunostimulating fucogalactan of the edible mushroom *Macrolepiota dolichaula*. **Carbohydrate research**, v. 413, p. 22-29, 2015.
- SÁNCHEZ, J. E.; MARTIN, A. M.; SÁNCHEZ, A. D. Evaluation of *Cookeina sulcipes* as an edible mushroom: Determination of its biomass composition. **Developments in Food Science**, v. 37, p. 1165-1172, 1995.
- SASSAKI, G. L. et al. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1, p. 215-222, 2008.

SASSAKI, G. L. et al. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: Some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 731-739, 2005.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.

SILVEIRA, M. L. L. et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 588-596, 2014.

SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European journal of pharmacology**, v. 597, n. 1, p. 86-91, 2008.

SMIDERLE, F. R. et al. Isolation and chemical characterization of a glucogalactomannan of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 1, p. 74-80, 2013.

SMIDERLE, F. R. et al. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2189-2196, 2006.

SUAY, I. et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 2, p. 129-140, 2000.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.41-46, 1998

SYNYTSYA, Andriy; NOVÁK, Miroslav. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 792-809, 2013.

TJØLSEN, Arne et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TSAIH, M. L.; CHEN, Rong Huei. Effects of ionic strength and pH on the diffusion coefficients and conformation of chitosans molecule in solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 73, n. 10, p. 2041-2050, 1999.

VILAPLANA, Francisco; GILBERT, Robert G. Characterization of branched polysaccharides using multiple-detection size separation techniques. **Journal of separation science**, v. 33, n. 22, p. 3537-3554, 2010.

WANG, M. et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 2, p. 461-466, 2012.

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

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **International Journal of medicinal mushrooms**, v. 1, n. 1, 1999.

WEINSTEIN, R. N.; PFISTER, D. H.; ITURRIAGA, T. A phylogenetic study of the genus *Cookeina*. **Mycologia**, v. 94, n. 4, p. 673-682, 2002.

YU, Z. et al. Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 115-118, 2009.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 4-19, 2007.

ZHANG, P.; CHEUNG, P. C. K. Evaluation of sulfated *Lentinus edodes* α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan as a potential antitumor agent. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1052-1056, 2002.

ZHU, F. et al. β -Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 165-173, 2015.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.