

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHAYANE DA SILVA

**POLISSACARÍDEOS DO COGUMELO *Macrocybe titans*: CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

CURITIBA

2017

**SHAYANE DA SILVA**

**POLISSACARÍDEOS DO COGUMELO *Macrocybe titans*: CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

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

Orientador: Professor Dr. Marcello Iacomini

Co-orientadora: Dra. Fhernanda Ribeiro Smiderle

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná Sistema  
de Bibliotecas

Silva, Shayane da

Polissacarídeos do cogumelo *Macrocybe titans*: caracterização estrutural  
e atividade biológica. / Shayane da Silva. – Curitiba, 2017.

100f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo Iacomini

Co-orientadora: Fhernanda Ribeiro Smiderle

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

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



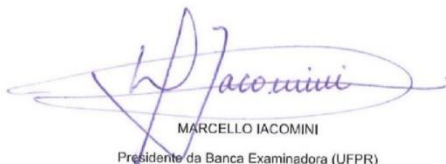
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de SHAYANE DA SILVA intitulada: Polissacarídeos do cogumelo *Macrocybe titans*: Caracterização estrutural e atividade biológica, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

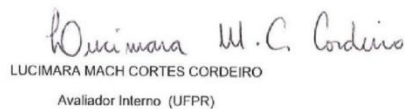
CURITIBA, 21 de Agosto de 2017.



MARCELLO IACOMINI  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS TOSIN  
Avaliador Externo (UFPR)



LUCIMARA MACH CORTES CORDEIRO  
Avaliador Interno (UFPR)

A Deus.

A minha mãe, irmã e irmão, minha raiz.

Aos meus avós.

A minha família.

Ao meu noivo.

Pelo amor, força, apoio, paciência e compreensão.

Nós conseguimos!

Amo vocês demais!

## AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem, jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém nem nada cresce sozinho: sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor” (AUTOR DESCONHECIDO).

A Deus, pela vida, saúde, força, oportunidade, família, amigos e tudo que me concedeu. Por ser minha luz e a paz da minha alma.

A minha mãe/pai, Maria Madalena, pelo papel duplo que faz com amor e dedicação, por me apoiar, amar e apesar das dificuldades, nos cuidar, fazer tudo por nós e ajudar com tudo que pode, nos mostrando o verdadeiro significado dos termos: *ser guerreira, ser dedicada e amor de mãe*. Te amo demais!

Aos meus irmãos, Keila e Ederson, pelo amor incondicional, pela torcida e por serem meus parceiros desde 1994! Amo vocês!

A grande família Oliveira, dona dos melhores reencontros. Pela união, carinho, amor e por ser uma família acolhedora e animada, da qual me orgulho em fazer parte.

Aos meus avós, Rosária e Antônio, pelo carinho, apoio, acolhimento e melhor comida sempre! Com vocês tenho a certeza de que os avós são segundos pais, ricos em amor e cuidado.

Ao meu noivo, William, pelo amor, amizade, apoio, incentivo, paciência e claro, por todos os chocolates com os quais me presenteou para me ajudar a concluir esta etapa! Tenho aprendido muito com você! Te amo!

A família Milhorini, pelo amor, acolhimento, fraternidade e por me receberem da melhor forma sempre!

A minha família palotinense que jamais será esquecida, Jessica, Dagna, Leidi, Fer e Vane, da UFPR para a vida! Vocês sabem o quanto são especiais!

Ao meu orientador, professor Dr. Marcello Iacomini, pela receptividade, confiança, oportunidade, dedicação e ensino.

A minha co-orientadora, Dra. Fhernanda Ribeiro Smiderle, pelas valiosas orientações, explicações, paciência e evidente amor pelo que faz.

Ao professor Dr. Fábio Rogério Rosado, por ter gentilmente cedido o cogumelo para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Edvaldo da Silva Trindade e a Dra. Stellee Marcela Petris Biscaia, pela colaboração para realização dos experimentos biológicos.

A todas (os) as (os) colegas e amigas de todos os labs, 252, 250, 247, 248, anexo I. Não vou nomear todas porque vocês sabem que sou esquecida, melhor não correr o risco! Vocês foram uma parte muito importante deste processo! Obrigada por todas as dicas laboratoriais, conversas descontraídas, por toda ajuda e claro, pelo meu novo nome, "Shajane".

A Elisangela A. Rodrigues e Rosane pelas análises de HPSEC-RI e CG-EM.

Ao professor Dr. Guilherme L. Sasaki e ao Dr. Arquimedes P. de Santa-Filho, pelas análises de RMN.

A CAPES pela bolsa.

A Universidade Federal do Paraná.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a  
Ele eternamente. Amém.”  
Romanos 11:36



“Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada”.

(Immanuel Kant)

## RESUMO

O cogumelo gigante *Macrocybe titans* assim como os demais basidiomicetos, desperta o interesse científico devido a sua possível bioatividade, em parte decorrente da presença de polissacarídeos com variadas características estruturais. Com base nisto, o presente trabalho teve por objetivo elucidar a estrutura química de alguns polissacarídeos presentes no basidioma de *M. titans*, bem como verificar seu efeito biológico frente a células de melanoma murino B16F10. Para isto, o corpo de frutificação do basidiomiceto seco, moído e deslipidificado foi submetido a processos sucessivos de extrações aquosas (a frio e a quente) e alcalina (NaOH 5%). Os extratos aquosos foram precipitados com etanol e dialisados contra água destilada, enquanto que o extrato alcalino foi neutralizado e dialisado contra água corrente. O extrato obtido a frio foi purificado por tratamento com  $\alpha$ -amilase, congelamento e degelo e diálise em membrana (1.000 kDa). O extrato a quente foi fracionado por congelamento e degelo, tratamento com  $\alpha$ -amilase e tratamento com Me<sub>2</sub>SO. O extrato alcalino, por sua vez, foi purificado por congelamento e degelo, tratamento com solução de Fehling ou NaOH 2% seguido de precipitação com ácido acético. A fração E1000, obtida do extrato a frio apresentou-se homogênea, sendo composta por galactose e fucose e contendo uma massa molar estimada em  $14,2 \times 10^3$  g/mol. As análises de espectroscopia e metilação sugerem que esta molécula seja uma fucogalactana com uma cadeia principal composta por  $\alpha$ -D-Galp ligadas (1→6), substituída a cada 2 ou 3 unidades em O-2 por terminais não redutores de  $\alpha$ -L-Fucp. A atividade biológica desta molécula, bem como da fração bruta R6CW obtida do extrato a frio, foi avaliada em células de melanoma murino B16F10, sendo que a fração R6CW aumentou a capacidade endocítica do corante vermelho neutro pelas células em 48 h na concentrações de 10 e 50  $\mu$ g/mL, enquanto que a proliferação celular foi aumentada em todas as concentrações testadas em 48 h. A fucogalactana, por sua vez, não causou alteração na viabilidade celular e alterou a proliferação celular apenas na concentração de 50  $\mu$ g/mL em 72 h de tratamento. A fração SSD, obtida do extrato a quente, apresentou-se composta por mais de uma molécula, contendo principalmente glucose, galactose, manose e fucose. A análise espectroscópica indicou a presença de  $\beta$ -D-Glcp,  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -L-Fucp e  $\alpha$ -D-Galp nesta fração, que será submetida a outras etapas de fracionamento visando a purificação da mesma. As frações SFSEA e SSIEA, obtidas do extrato alcalino, apresentaram principalmente glucose em sua composição monossacarídica. Ambas as frações ao serem analisadas por espectroscopia, apresentaram sinais correspondentes à uma  $\beta$ -D-Glucana contendo uma cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -D-Glcp ligadas (1→3), ramificada em O-6 por  $\beta$ -D-Glcp, o que foi confirmado pela degradação controlada de Smith, em que o material resistente à degradação apresentou sinais correspondentes à  $\beta$ -D-Glcp ligada (1→3). A análise de metilação da fração SSIEA mostrou que a glucana presente nesta fração é substituída em O-6 na proporção de 1:1, podendo estas substituições serem tanto por unidades de  $\beta$ -D-Glcp quanto por cadeias laterais de  $\beta$ -D-Glcp ligadas (1→6). A fração SFSEA será submetida a análise de metilação visando a elucidação da sua estrutura química.

Palavras-chaves: *Macrocybe titans*; Glucana; Fucogalactana; Atividade biológica.

## ABSTRACT

The giant mushroom *Macrocybe titans*, as well as the other basidiomycetes, arouse the scientific interest due to its possible bioactivity, in part due to the presence of polysaccharides with a varied chemical structures. Based on this, this work aimed to elucidate the chemical structure of some polysaccharides of *M. titans* fruiting bodies, as well as evaluate its biological activity on murine melanoma cells (B16F10). Therefore, the dried, powdered and defatted fruiting bodies were submitted to successive aqueous (cold and hot) and alkaline (NaOH 5%) extractions. The aqueous extracts were precipitated with ethanol and dialyzed against distilled water, while the alkaline extract was neutralized and dialyzed against tap water. The cold water extract was purified by  $\alpha$ -amylase treatment, freeze and thawing process and dialysis through membrane (1,000 kDa). The hot water extract was fractionated by freeze and thawing process,  $\alpha$ -amylase treatment and Me<sub>2</sub>SO treatment. The alkaline extract, on its turn, was purified by freeze and thawing, treatment with Fehling solution or with NaOH 2% followed by precipitation with acetic acid. The E1000 fraction, obtained from cold water extract, was pure and contained galactose and fucose, and an estimated molar mass of  $14.2 \times 10^3$  g/mol. The spectroscopy and methylation analyses suggest that this molecule is a fucogalactan with a main chain composed of  $\alpha$ -D-Galp (1→6) linked, branched at O-2 position by non reducing end units of  $\alpha$ -L-Fucp in the proportion of 2 to 3 units. The biological activity of this molecule, as well as the crude fraction R6CW obtained from the cold water extract, was evaluated in B16F10 cells. The R6CW fraction increased the cell endocytic capacity in 48 h at 10 and 50  $\mu$ g/mL, while the cell proliferation was increased in 48 h at all concentrations tested. On the other hand, the fucogalactan did not cause changes in the cell viability, and altered the proliferation only at 50  $\mu$ g/mL in 72 h of treatment. The SSD fraction, obtained of hot water extract was composed of more than one molecule and contained mainly glucose, galactose, mannose, and fucose. The spectroscopic analyses indicated the presence of  $\beta$ -D-Glcp,  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -L-Fucp and  $\alpha$ -D-Galp in this fraction, that will be submitted to other purification steps aiming its purification. The fractions SFSEA and SSIEA, obtained from alkaline extract, presented mainly glucose as monosaccharides. Both fractions, when analyzed by spectroscopy showed signals corresponding to a  $\beta$ -D-glucan containing a main chain composed of  $\beta$ -D-Glcp (1→3) linked, branched at O-6 position by  $\beta$ -D-Glcp, which was confirmed after Smith degradation, which generated a resistant fraction with signals corresponding to the  $\beta$ -D-Glcp (1→3)-linked. The methylation analysis of SSIEA suggested that the  $\beta$ -glucan present in this fraction is branched at a rate of 1:1, and the side chains can be composed by  $\beta$ -D-Glcp units or  $\beta$ -D-Glcp (1→6)-linked chains. The SFSEA fraction will be subjected to methylation analysis to determine its chemical structure.

Keywords: *Macrocybe titans*; Glucan; Fucogalactan; Biological activity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ESTRUTURAS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.....	27
FIGURA 2- EXEMPLOS DE BASIDIOMAS, CORPO DE FRUTIFICAÇÃO OU COGUMELO. ....	28
FIGURA 3- BASIDIOMAS DO COGUMELO GIGANTE <i>Macrocybe titans</i> . ....	29
FIGURA 4- ESTRUTURA QUÍMICA DE UMA $\beta$ -GLUCANA LIGADA (1 $\rightarrow$ 3), COM RAMOS EM O-6.....	32
FIGURA 5- ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCOGALACTANA ISOLADA DE <i>Agaricus brasiliensis</i> (A) E <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>hortensis</i> (B).....	35
FIGURA 6- O ABCD DO MELANOMA. FIGURA REPRESENTATIVA DA MORFOLOGIA DE UMA VERRUGA COMUM E UM MELANOMA. (A) ASSIMETRIA; (B) BORDA; (C) COR; (D) DIÂMETRO. ....	39
FIGURA 7- FIGURA ILUSTRATIVA DE UMA MASSA TUMORAL DO TIPO MALIGNA ORIGINADA EM MELANÓCITOS (MELANOMA) EM PROCESSO DE METÁSTASE, PERMEANDO OS VASOS SANGUÍNEOS E SE ESTENDENDO PARA A CAMADA MAIS PROFUNDA DA PELE. ....	39
FIGURA 8- ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA INVASÃO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 PARA UMA MATRIZ DE FIBRONECTINA, EM TRANSWELL. (A) CONTROLE; (B) TRATADO COM 100 $\mu$ g/mL DA MANOGALACTANA NATURALMENTE METILADA OBTIDA DE <i>Pleurotus eryngii</i> (P1).....	43
FIGURA 9- EVOLUÇÃO TUMORAL EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS B16F10, APÓS TRATAMENTO (DO 5º AO 14º DIA) COM O POLISSACARÍDEO EM UMA CONCENTRAÇÃO DE 50mg/kg DE PESO DO ANIMAL.....	43
FIGURA 10- ESQUEMA DAS EXTRAÇÕES PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS BASIDIOMAS DESIDRATADOS DE <i>Macrocybe titans</i> . ....	45
FIGURA 11- LINHAGEM CELULAR B16F10 (MELANOMA MURINO).....	56

FIGURA 12- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO OBTIDO COM ÁGUA A TEMPERATURA AMBIENTE A PARTIR DE BASIDIOMAS DE <i>Macrocybe titans</i> .....	59
FIGURA 13- (A) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO E6CW SOLUBILIZADA EM D <sub>2</sub> O (B) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DO PADRÃO DE TREALOSE SOLUBILIZADO EM D <sub>2</sub> O.....	61
FIGURA 14- FIGURA REPRESENTATIVA DA MOLÉCULA DE TREALOSE. ....	61
FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO R6CW SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	62
FIGURA 16- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES R6CW (LINHA VERDE) E SCW (LINHA VERMELHA), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA. ....	63
FIGURA 17- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO SCW SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	63
FIGURA 18- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO R1000 SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	64
FIGURA 19- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES R1000 (LINHA VERDE) E E1000 (LINHA VERMELHA), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA. ....	65
FIGURA 20- ESPECTRO DE HSQC-DEPT A 70°C DA FRAÇÃO E1000 SOLUBILIZADA EM D <sub>2</sub> O. ....	66
FIGURA 21- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO SFR6 SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	67
FIGURA 22- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO COM ÁGUA FERVENTE.....	68
FIGURA 23- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO E6HW SOLUBILIZADA EM D <sub>2</sub> O. ....	69
FIGURA 24- (A) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO R6HW SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> . (B) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO SHW SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> . (C) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO IHW SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> ...	70
FIGURA 25- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES R6HW (LINHA VERMELHA); IHW (LINHA VERDE) E SHW (LINHA AZUL),	

SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.....	70
FIGURA 26- ESPECTRO DE HSQC-DEPT A 70°C DA FRAÇÃO SSD SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> .....	72
FIGURA 27- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DA FRAÇÃO SSD, SOLUBILIZADA EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.....	72
FIGURA 28- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO OBTIDO COM NaOH 2%.....	73
FIGURA 29- (A) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> . (B) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO SEA SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> .....	74
FIGURA 30- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES EA (LINHA VERMELHA), IEA (LINHA VERDE) E SEA (LINHA AZUL), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.....	75
FIGURA 31- (A) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO SFSEA SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> . (B) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DO MATERIAL RESISTENTE NA DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO SFSEA, SOLUBILIZADO EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> .....	76
FIGURA 32- (A) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO SSIEA SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> .....	77
FIGURA 33- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C A 70°C DA FRAÇÃO GeIEA SOLUBILIZADA EM Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub> .....	78
FIGURA 34- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DA FRAÇÃO GeIEA, SOLUBILIZADA EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.....	78
FIGURA 35- FRAÇÃO GeIEA NA CONCENTRAÇÃO DE 20 mg/mL, APÓS SER SUBMETIDA AO RESFRIAMENTO A 5°C.....	79
FIGURA 36- ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR, ATRAVÉS DO MÉTODO DO VERMELHO NEUTRO. AS CÉLULAS B16F10 FORAM EXPOSTAS A FRAÇÃO R6CW (A) E A FUCOGALACTANA (B), NAS CONCENTRAÇÕES DE 10, 50, 100, 250 µg/mL POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 24, 48 OU 72h. ESTES ENSAIOS FORAM	

REALIZADOS EM QUADRUPLICATA, TRÊS VEZES INDEPENDENTES. OS ENSAIOS FORAM SUBMETIDOS À ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E PÓS-TESTE DE TUKEY, DETERMINANDO A SIGNIFICÂNCIA À \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  E \*\*\*\* $p < 0,0001$ . .....82

FIGURA 37- ENSAIO DE DENSIDADE CELULAR, ATRAVÉS DO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA. AS CÉLULAS B16F10 FORAM EXPOSTAS A FRAÇÃO R6CW (A) E A FUCOGALACTANA ISOLADA (B), NAS CONCENTRAÇÕES DE 10, 50, 100, 250  $\mu\text{g/mL}$  POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 24, 48 E 72h. ESTE ENSAIO FOI REALIZADO EM QUADRUPLICATA, TRÊS VEZES INDEPENDENTES. OS ENSAIOS FORAM SUBMETIDOS À ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E PÓS-TESTE DE TUKEY, DETERMINANDO A SIGNIFICÂNCIA À \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . .....84

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE GLUCANAS ISOLADAS DE COGUMELOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	33
TABELA 2 - EXEMPLOS DE HETEROGALACTANAS ISOLADAS DE COGUMELOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	36
TABELA 3 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Macrocybe titans</i> OBTIDO A TEMPERATURA AMBIENTE.....	60
TABELA 4 - ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS FORMADOS NA METILAÇÃO DA FRAÇÃO E1000.....	65
TABELA 5 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO A QUENTE DE <i>Macrocybe titans</i> .....	69
TABELA 6 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO ALCALINO DE <i>Macrocybe titans</i> .....	74



## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Alfa
B	- Beta
$\delta$	- Delta / ppm
$\Lambda$	- Lambda / Comprimento de onda
$\mu\text{L}$	- Microlitro
$^1\text{H}$	- Núcleo de hidrogênio
$^{13}\text{C}$	- Núcleo de carbono
B16F10	- Linhagem de melanoma murinho
$\text{BaCO}_3$	- Carbonato de bário
BCRJ	- Banco de Células do Rio de Janeiro
Células NK	- Células Natural Killer
C57BL/6	- Camundongos isogênico utilizado como modelo para imunologia, oncologia e toxicologia.
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CR3	- Receptor do complemento 3
D	- Conformação D
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
d. i.	- Diâmetro interno
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
$dn/dc$	- Taxa de variação do índice de refração com relação à Concentração
DNS	- 3,5-dinitrosalicílico
Fucp	- Fucopirranose
Galp	- Galactopirranose
GlcP	- Glucopirranose

HPSEC-RI	- Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada à detector de índice de refração
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HSQC-DEPT	- <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
INCA	- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
kDa	- Quilodalton
LacCer	- Lactosilceramida
M	- Molar
Man <sub>p</sub>	- Manopirranose
min	- Minutos
mg	- Miligramas
mL	- Mililitros
Mm	- Micrômetro
mm	- Milímetros
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Mw	- Massa molar
Nm	- Nanômetros
P1	- Manogalactana parcialmente metilada obtida de <i>Pleurotus eryngii</i>
PBS	- Tampão fosfato salino
<i>per-O</i> -metilado	- Parcialmente <i>O</i> -metilado
PG	- Extrato polissacarídico obtido de <i>Phellinus gilvu</i>
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppm	- Partes por milhão
q.s.p	- Quantidade suficiente para
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
rpm	- Rotações por minuto

SCID	- Imunodeficiência combinada severa
SFB	- Soro fetal bovino
T CD4 <sup>+</sup>	- Linfócito T auxiliar
T CD8 <sup>+</sup>	- Linfócito T citotóxico
TFA	- Ácido trifluoroacético
TLR	- Receptor Toll-like
VN	- Vermelho Neutro
v/v	- Volume/volume

## LISTA DE SIGLAS DAS FRAÇÕES

$\alpha$ -IHW	- Resultante do tratamento com $\alpha$ -amilase da fração IHW
E6CW	- Eluído da diálise do extrato a frio
E6HW	- Eluído da diálise do extrato a quente
E1000	- Eluído da diálise da fração SCW
EA	- Resultante da diálise contra água corrente do extrato alcalino
ICW	- Insolúvel no congelamento e degelo da fração R6CW
ID	- Insolúvel no tratamento com $\text{Me}_2\text{SO}$ da fração $\alpha$ -IHW
IEA	- Insolúvel no congelamento e degelo da fração EA
IHW	- Insolúvel no congelamento e degelo da fração R6HW
ISD	- Insolúvel no congelamento e degelo da fração SD
ISIEA	- Insolúvel no congelamento e degelo da fração SIEA
Pacido	- Precipitado com ácido acético da fração IEA
Palcali	- Precipitado com NaOH 2% da fração IEA
PFSEA	- Precipitado de Fehling da fração SEA
PFR6	- Precipitado de Fehling da fração R6CW
R6CW	- Retido da diálise do extrato a frio
R6HW	- Retido da diálise do extrato a quente
R1000	- Retido da diálise da fração SCW
Resíduo I	- Material residual da extração com clorofórmio-metanol
Resíduo II	- Material residual da extração com água a temperatura ambiente
Resíduo III	- Material residual da extração com água fervente
Resíduo IV	- Material residual da extração com NaOH 5%
SCW	- Solúvel no congelamento e degelo da fração $\alpha$ -R6CW
SD	- Solúvel no tratamento com $\text{Me}_2\text{SO}$ da fração $\alpha$ -IHW
SEA	- Solúvel no congelamento e degelo da fração EA

SFR6	- Sobrenadante de Fehling da fração R6CW
SFSEA	- Sobrenadante de Fehling da fração SEA
SHW	- Solúvel no congelamento e degelo da fração R6HW
SIEA	- Solúvel no tratamento com NaOH 2% da fração IEA
SSD	- Solúvel no congelamento e degelo da fração SD
SSIEA	- Solúvel no congelamento e degelo da fração SIEA

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	26
2.1 REINO FUNGI .....	26
2.2 FILO BASIDIOMYCOTA.....	26
2.3 <i>Macrocybe titans</i> .....	29
2.4 POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS: ESTRUTURAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....	30
2.4.1- Glucanas de cogumelos .....	31
2.4.2- Heterogalactanas de cogumelos .....	34
2.5 CÂNCER DE PELE - MELANOMA.....	37
2.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS E SEUS EFEITOS SOBRE O MELANOMA.....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	44
3.1 - OBJETIVOS GERAIS .....	44
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	45
4.1 BASIDIOMICETO .....	45
4.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO .....	45
4.2.1- Extração com Clorofórmio-Metanol .....	46
4.2.2- Extração com água fria.....	46
4.2.3- Extração com água fervente.....	46
4.2.4- Extração alcalina .....	47
4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	47
4.3.1- Fracionamento e purificação da fração obtida com água a temperatura ambiente.....	48
4.3.1.1- Tratamento com $\alpha$ -amilase .....	48

4.3.1.2- Congelamento e degelo.....	48
4.3.1.3- Purificação do polissacarídeo por diálise em membrana.....	48
4.3.1.4- Precipitação com solução de Fehling .....	49
4.3.2- Fracionamento da amostra obtida com água fervente.....	49
4.3.2.1- Tratamento com dimetilsulfóxido (Me <sub>2</sub> SO). .....	50
4.3.3- Fracionamento e purificação da fração obtida na extração alcalina ...	50
4.3.3.1- Precipitação com solução de Fehling .....	50
4.3.3.2- Precipitação com NaOH 2%.....	51
4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS .....	51
4.4.1- Hidrólise ácida total, redução e acetilação .....	51
4.4.2- Metilação dos polissacarídeos.....	52
4.4.3- Hidrólise ácida total dos polissacarídeos <i>per-O</i> -metilados .....	53
4.4.4- Degradação de Smith .....	53
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	54
4.5.1 – Determinação da homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração (HPSEC-RI) .....	54
4.5.2 – Determinação relativa da massa molecular ( <i>M<sub>w</sub></i> ) .....	54
4.5.3 – Determinação da composição monossacarídica e dos acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) .....	55
4.5.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	55
4.6 - ENSAIO BIOLÓGICO .....	55
4.6.1.- Cultivo de células (Linhagem B16F10).....	56
4.6.2- Avaliação da viabilidade celular.....	57
4.6.3- Avaliação da proliferação .....	57
4.6.4- Análise estatística.....	58
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
5.1 EXTRAÇÃO AQUOSA A TEMPERATURA AMBIENTE .....	59

5.2 EXTRAÇÃO COM ÁGUA FERVENTE.....	68
5.3 EXTRAÇÃO ALCALINA.....	73
5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	80
5.4.1- Avaliação da viabilidade .....	80
5.4.2- Avaliação da proliferação celular .....	82
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Os basidiomicetos são apreciados mundialmente como alimento e consumidos por apresentarem elevados valores nutricionais e baixos teores calóricos. Utilizados amplamente na medicina oriental, pelas propriedades terapêuticas que possuem, são extensivamente estudados devido ao interesse medicinal atribuído à presença de componentes que atuam como modificadores da resposta biológica (ALQUINI, 2010). Vários componentes bioativos são reportados para os cogumelos, como os metabólitos secundários (BABY *et al.*, 2015), glicoproteínas (CUI *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2013), proteínas (ZHANG *et al.*, 2014), lipopolissacarídeos (WASSER, 2011) e polissacarídeos (ZHANG *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013b; SMIDERLE *et al.*, 2014; SAMANTA *et al.*, 2015).

Os polissacarídeos de cogumelos tem sido alvo de diversas pesquisas devido às atividades imunomoduladora (SMIDERLE *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016), antitumoral (JEFF *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014b; BISCAIA, 2016), prebiótica (SYNYTSYA *et al.*, 2009), anti-inflamatória (KOMURA *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2015), antinociceptiva (CARBONERO *et al.*, 2008; RUTHES *et al.*, 2013c), anti-herpética (CARDOZO, 2012) e anticoagulante (GRACHER, 2010; ROMÁN *et al.*, 2016) que estes apresentam.

De acordo com Polishchuk e Kovalenko (2009) e Elisashvili (2012), as atividades biológicas dos polissacarídeos estão relacionadas com as características químicas dos mesmos. Conforme Alquini (2010), isto justifica o interesse em se estudar suas atividades potenciais em conjunto com a caracterização química, pois ter ciência da estrutura da molécula é de fundamental importância para que se compreendam os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Estes polímeros já foram isolados de diversas espécies de basidiomicetos, sendo que o grupo de pesquisa em química de carboidratos da Universidade Federal do Paraná tem contribuído em grande parte na literatura, relacionando a estrutura química dos polissacarídeos com a atividade biológica dos mesmos. O grupo avaliou estas estruturas obtidas de diferentes espécies de cogumelos como *Agaricus bisporus*; *Agaricus brasiliensis* (SMIDERLE *et al.*, 2013), *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (KOMURA *et al.*, 2010) *Pleurotus pulmonarius* (SMIDERLE *et al.*, 2008a), *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (KOMURA *et al.*, 2014); *Pholiota nameko*

(SOVRANI *et al.*, 2017), *Pleurotus sajor-caju* (SILVEIRA *et al.*, 2014) *Pleurotus florida* (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008), *Lentinus edodes* (CARBONERO *et al.*, 2008), *Amanita muscaria* (RUTHES *et al.*, 2013a), *Lactarius rufus* (RUTHES *et al.*, 2013b) e *Cookeina tricholoma* (MORENO *et al.*, 2016).

De acordo com Wasser (2011), os cogumelos são uma fonte ainda pouco explorada para o isolamento de novos polissacarídeos com propriedades biológicas, sendo que muitos, ou possivelmente todos os basidiomicetos, contêm polissacarídeos biologicamente ativos em seu corpo de frutificação ou em micélios cultivados.

O cogumelo *Macrocybe titans* é uma espécie considerada comestível (CALONGE; MATA; UMAÑA, 2007), que foi relatada como sendo o maior cogumelo já visto no estado do Paraná, (BOLETIM INFORMATIVO, 2003 *apud* WISNIEWSKI, 2009). Algumas pesquisas foram realizadas com este fungo e demonstraram a atividade antioxidante (SAYKA *et al.*, 2008; KNAK; GUEDES; TAVARES, 2009) e anti-helmíntica (PEREIRA *et al.*, 2014) do mesmo, além de seu potencial para produção de enzimas (WISNIEWSKI, 2010). No entanto, não foram encontrados estudos que relatem a atividade biológica de polissacarídeos obtidos deste macrofungo. Com base nisto, observa-se a necessidade de explorar o potencial medicinal de polissacarídeos presentes nesta espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 REINO FUNGI

Os fungos foram reconhecidos como um reino a parte na década de 60, quando o pesquisador Whittaker (1956), propôs a nova classificação dos reinos, sendo estes: *Monera*, *Protista*, *Plantae*, *Fungi* e *Animália*.

O Reino Fungi é representado por organismos aclorofilados, eucariontes, heterotróficos, que podem ser uni ou pluricelulares (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; REIS, 2010; CHUDZIK, 2015) e que possuem glicogênio como polímero de reserva (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009; GUIMARÃES, 2011).

Segundo Abreu, Rovida e Pamphile (2015), os fungos são de grande interesse biotecnológico, pois possuem extrema importância em áreas diversas, como na produção de alimentos fermentados e bebidas, na indústria farmacêutica, no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação. Além disto, os mesmos são os agentes mais importantes de degradação de matéria orgânica na Terra, visto que degradam celulose e lignina com alta eficiência (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

De acordo com Kirk et al., (2008), o Reino Fungi é dividido em 8 filos distintos, sendo estes: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Blastocladiomycota e Basidiomycota.

### 2.2 FILO BASIDIOMYCOTA

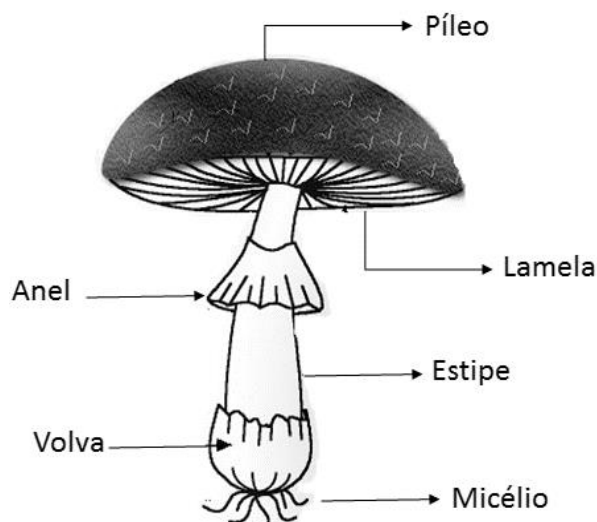
Os membros da subdivisão Basidiomycota, comumente chamados de basidiomicetos (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001), juntamente com os outros fungos, possuem uma participação substancial na ciclagem de nutrientes, especialmente na degradação de compostos orgânicos. Muitos deles desempenham um papel insubstituível nos processos de simbiose (micorriza). Eles também são

usados em processos industriais, em pesquisa básica ou aplicada, no ensino, em estudos sistemáticos e de biodiversidade (HOMOLKA, 2014).

De acordo com Kirk *et al.*, (2008), o Filo Basidiomycota é dividido em 3 sub-filos: Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina e Agaricomycotina. O sub-filo Agaricomycotina, por sua vez, possui três classes: Tremellomycetes, Dacrymycetes e Agaricomycetes (KIRK *et al.*, 2008), sendo que o último compreende todos os fungos do filo Basidiomycota que formam basidiomas com himênio definido (HIBBETT *et al.*, 2007 *apud* FONSECA *et al.*, 2015)

Os basidiomas, também chamados de cogumelo ou corpo de frutificação (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL, 1996), são estruturas formadas por filamentos denominados hifas, sendo que o conjunto de hifas é denominado micélio. Estes filamentos se modificam formando pseudotecidos, os quais se diferenciam nas distintas partes do cogumelo, sendo estas: píleo, estipe, lamelas, anel e volva (PUTZKE; PUTZKE, 1998) (FIGURA 1).

FIGURA 1- DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ESTRUTURAS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.



FONTE: Adaptado de: <http://fireandthel.blogspot.com.br/2010/06/>

Os cogumelos foram definidos por Chang e Miles (1992), como sendo macrofungos com um corpo de frutificação nítido que pode ser epígeo (acima do solo) ou hipógeo (sob o solo) e grande o suficiente para ser visto a olho nu e ser pegado com as mãos (FIGURA 2).

FIGURA 2- EXEMPLOS DE BASIDIOMAS, CORPO DE FRUTIFICAÇÃO OU COGUMELO.



FONTE: A autora (2017).

O número de espécies de cogumelos na Terra é atualmente estimado em 140.000, entretanto, apenas 10% (cerca de 14.000) são conhecidas pela ciência. Destas, 2.000 são seguras para consumo humano, e cerca de 660 possuem propriedades medicinais (BARSEGYAN; BARAZANI; WASSER, 2016).

Há mais de 2.000 anos estas estruturas fúngicas já eram apreciadas e consumidas em países orientais, devido ao seu valor nutricional e propriedades medicinais (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015). Desde a segunda metade do século XX, as tecnologias de produção de cogumelos têm crescido grandemente, e o valor da produção mundial em 2011 foi estimado em cerca de \$ 60 bilhões (BARSEGYAN; BARAZANI; WASSER, 2016).

Estes fungos têm sido tradicionalmente utilizados para a prevenção e tratamento de uma variedade de doenças, e têm sido cada vez mais consumidos como suplementos dietéticos por pacientes portadores de câncer durante os seus tratamentos. Além disto, os cogumelos são considerados alimentos saudáveis porque são fonte de vitaminas, minerais, proteínas e carboidratos, além de terem um baixo nível de lipídios e baixo teor calórico (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015). Eles são ricos em muitos metabólitos bioativos de alto valor medicinal, como polissacarídeos, lectinas, compostos fenólicos, terpenóides, ergosteróis e compostos orgânicos voláteis. Extratos de cogumelos foram avaliados e apresentaram ter

potencial medicinal como imunomoduladores, antitumorais, antibacterianos, antivirais, antioxidantes e anti-hipoglicêmicos (ELSAYED et al., 2014).

### 2.3 *Macrocybe titans*

*Macrocybe titans* (H.E. Bigelow & Kimbr.) Pegler, Lodge e Nakasone (1998), trata-se de um fungo de dimensões gigantescas, cujos basidiomas podem atingir até 1,0 metro de altura e pesar até 20 kg (TIBÉRIO et al., 2014) (FIGURA 3). Esta espécie pertence ao filo Basidiomycota; Sub-filo: Agaricomycotina; Classe: Agaricomycetes; Ordem: Agaricales; Família: Tricholomataceae; Gênero: *Macrocybe*.

FIGURA 3- BASIDIOMAS DO COGUMELO GIGANTE *Macrocybe titans*.



FONTE: Claudemir Tezolin, Chácara Naturele.

Há registros deste fungo no estado de Chiapas, no extremo sul do México, (ANDRADE, 2007 apud WISNIEWSKI, 2009), na Índia (VINDRA et al., 1997), Colômbia (CORRALES; LÓPEZ-Q, 2005), Costa Rica (CALONGE; MATA; UMAÑA, 2007) e Georgia (DELONG; BREWER, 2013). Este é o maior cogumelo já visto no estado do Paraná, que foi encontrado pela primeira vez em outubro de 2003 no município de Antonina, pelo pesquisador André de Meijer (BOLETIM

INFORMATIVO, 2003 *apud* WISNIEWSKI, 2009). Poucos registros foram relatados, especialmente no Brasil (WISNIEWSKI, 2010), entretanto, uma colônia do macrofungo *Macrocybe titans* foi encontrada no estado do Paraná em Cornélio Procópio (SAYKA, 2008) e Assis Chateaubriand (TIBÉRIO *et al.*, 2014), além de outros estados como Pernambuco (COIMBRA; GIBERTONI, 2009), Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COIMBRA; GIBERTONI, 2009).

O *Macrocybe titans* é considerado um cogumelo comestível (STIJVE, 2004; CALONGE; MATA; UMAÑA, 2007), e não apresenta toxinas clássicas, além de possuir vitaminas essenciais (STIJVE, 2004). Estudos têm sido realizados acerca de seu potencial para produção de enzimas e possibilidades de seu cultivo (STIJVE, 2004; DEPCKE, 2008; WISNIEWSKI, 2009; WISNIEWSKI, 2010; ZILLY *et al.*, 2012), sua atividade antioxidante e citotóxica frente a *Artemia salina* (KNAK; GUEDES; TAVARES, 2009), atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (SAYKA *et al.*, 2008) e atividade anti-helmíntica (PEREIRA *et al.*, 2014).

A espécie *Macrocybe titans* foi pouco estudada e pode conter produtos metabólicos tanto primários quanto secundários que poderão ter importância terapêutica para várias doenças (KNAK; GUEDES; TAVARES, 2009).

Alguns trabalhos foram realizados visando avaliar a composição química deste macrofungo (NAME *et al.*, 2005; CARBONERO *et al.*, 2006; SAYKA *et al.*, 2007; SAYKA, 2008), porém, ainda é necessário avaliar a estrutura química dos polissacarídeos oriundos deste cogumelo e a bioatividade destas moléculas purificadas.

## 2.4 POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS: ESTRUTURAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Diversos polissacarídeos foram extraídos de basidiomicetos e descritos na literatura, podendo estes serem homopolissacarídeos (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015) ou heteropolissacarídeos (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016).

As glucanas são os homopolissacarídeos mais comumente encontrados em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas, e apresentarem diferentes



configurações e massas molares. Além disso, podem ser solúveis ou insolúveis em água, dependendo de suas características químicas (ZHANG *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2011).

Segundo Ruthes, Smiderle e Iacomini (2016), os heteropolissacarídeos de fungos, por outro lado, podem ser classificados como heterogalactanas, heteroglucanas ou heteromananas, dependendo da cadeia principal que o constituir. Estas moléculas além de possuírem diferentes monossacarídeos, tipo de configuração anomérica, ligação ou ramificação, podem ser naturalmente metiladas ou, menos frequentemente, conterem monossacarídeos ácidos.

Os cogumelos representam uma fonte alternativa e pouco explorada para isolamento de novos polissacarídeos, pois além de apresentarem altos teores destas moléculas, estes organismos apresentam polímeros com um amplo potencial terapêutico (WASSER, 2011). Destes fungos já foram isoladas várias destas moléculas, como as glucanas (SILVEIRA *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2016), fucomanogalactanas (CARBONERO *et al.*, 2008; RUTHES *et al.*, 2013a), manogalactanas (SMIDERLE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013a; ROSADO *et al.*, 2003; SMIDERLE *et al.*, 2008b), glucogalactanas (SUN; LIU, 2009), fucogalactanas (KOMURA *et al.*, 2010; RUTHES *et al.*, 2012; RUTHES *et al.*, 2013c, SAMANTA *et al.*, 2015), xilomananas (SMIDERLE *et al.*, 2006), dentre outros.

Diversas propriedades, como a atividade imunomoduladora (WANG *et al.*, 2014a; SAMANTA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016), antitumoral (JEFF *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014a), anti-inflamatória (KOMURA *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2014; SILVEIRA, 2015), antinociceptiva (RUTHES *et al.*, 2013a; RUTHES *et al.*, 2013b; RUTHES *et al.*, 2013c; SILVEIRA *et al.*, 2015), anti-herpética (CARDOZO, 2012), anticoagulante (GRACHER, 2010) e antioxidante (DING; HOU; HOU, 2012; SAMANTA *et al.*, 2015), foram reportadas para estes polímeros.

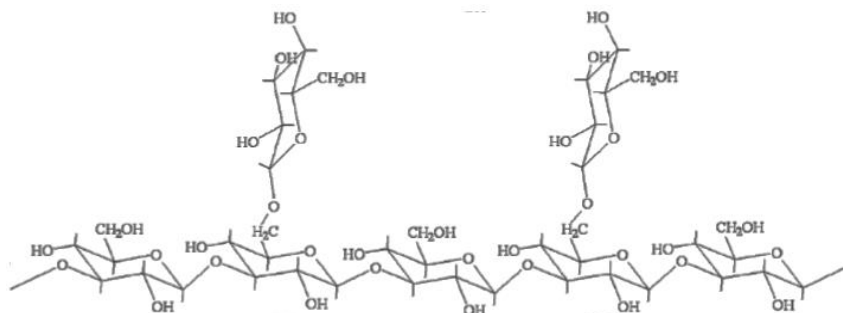
#### 2.4.1- Glucanas de cogumelos

Segundo Ruthes, Smiderle e Iacomini (2015), os cogumelos podem apresentar  $\alpha$ -D-glucanas,  $\beta$ -D-glucanas e também  $\alpha/\beta$ -D-glucanas, as quais podem possuir diferentes características químicas, como grau de ramificação, massa e solubilidade. A glucana mais comumente encontrada consiste em uma cadeia



principal de  $\beta$ -D-glucose ligada (1 $\rightarrow$ 3), frequentemente ramificada na posição O-6 por resíduos de  $\beta$ -D-glucose (FIGURA 4).

FIGURA 4- ESTRUTURA QUÍMICA DE UMA  $\beta$ -GLUCANA LIGADA (1 $\rightarrow$ 3), COM RAMOS EM O-6.



FONTE: ZHANG; XU; ZHANG (2008).

Glucanas com estas características estruturais já foram isoladas de diversos basidiomicetos (SMIDERLE *et al.*, 2008a; ZHANG *et al.*, 2011; JAMIL *et al.*, 2013; RUTHES *et al.*, 2013a). A  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) obtida do macrofungo *Lentinula edodes*, denominada lentinana, é um dos polissacarídeos de cogumelos melhor caracterizados até o momento (LEMIESZEK; RZESKI, 2012). Esta molécula foi obtida pela primeira vez por Chihara *et al.*, (1969), que a isolaram a partir de uma extração com água quente (80-100°C) e demonstraram que a mesma apresentou atividade antitumoral em camundongos transplantados com células de Sarcoma 180. De acordo com Zhang *et al.*, (2011), após este relato muitos estudos foram desenvolvidos e mostraram a atividade anticâncer da lentinana contra diferentes tipos de células cancerígenas. Esta molécula se apresentou capaz de ativar muitas células do sistema imune, como as células T, macrófagos e células NK, culminando com o aumento da produção de citocinas, óxido nítrico e aumento na capacidade de fagocitose, suprimindo assim o crescimento de células cancerosas ou causando a morte das mesmas. Conforme Valverde, Hernández-Pérez e Paredes-López (2015) a lentinana também é capaz de aumentar a resistência do hospedeiro contra infecções por bactérias, fungos, parasitas e vírus. Além disso, a lentinana modificada quimicamente por sulfatação apresentou atividade antiviral contra a doença de Newcastle (GUO *et al.*, 2008) e contra HIV (YOSHIDA *et al.*, 1988).

Segundo Zhang *et al.*, (2013b), outra  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) que têm sido extensivamente estudada é a schizophyllan, isolada do cogumelo *Schizophyllum*

*commune*. Esta molécula, assim como a lentinana, possui propriedades biológicas como a atividade antitumoral, imunomoduladora, antineoplásica, hepatoprotetora e anti-inflamatória.

As  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) foram isoladas também de outros cogumelos e além destas, outras glucanas com diferentes estruturas foram obtidas de diversas espécies de basidiomicetos, apresentando atividades biológicas (TABELA 1).

TABELA 1 - EXEMPLOS DE GLUCANAS ISOLADAS DE COGUMELOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

Fonte	Cadeia principal	Ramificação	Efeito Biológico	Referência
<i>Agaricus bisporus</i> ;	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6)	Ausente	Imunomodulador	SMIDERLE <i>et al.</i> , (2013)
<i>Agaricus brasiliensis</i>				
<i>Agaricus blazei</i>	$\alpha$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6),	Substituições com $\alpha$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4) (local da ramificação não especificado)	Imunomodulador	MIZUNO <i>et al.</i> , (1998)
<i>Amanita muscaria</i>	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)	Substituída em O-6 por uma unidade de $\beta$ -D-Glcp e em menor proporção por oligossacarídeos de $\beta$ -D-Glcp	Antinociceptivo	RUTHES <i>et al.</i> , (2013a)
<i>Cookeina tricholoma</i>	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)	Substituída em O-6 por diferentes comprimentos de $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6) ligadas; Substituída em O-6 por $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6) ligadas ou uma unidade de $\beta$ -D-Glcp	As glucanas ramificadas apenas por $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6) ligadas inibiram significativamente a dor neurogênica.	MORENO <i>et al.</i> , (2016)
<i>Cordyceps militaris</i>	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)	Ausente	Anti-inflamatório	SMIDERLE <i>et al.</i> , (2014)
<i>Entoloma lividoalbum</i>	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6)	Substituída em O-3 por três unidades $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3) ligadas	Antioxidante	MAITY <i>et al.</i> , (2014)
<i>Lactarius rufus</i>	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)	Substituída em O-6 por uma unidade de $\beta$ -D-Glcp; Substituída em O-6 por uma unidade de $\beta$ -D-Glcp e em menor proporção em O-6 por oligossacarídeos de $\beta$ -D-Glcp	Antinociceptivo; Anti-inflamatório	RUTHES <i>et al.</i> , (2013b)
<i>Lentinus edodes</i>	$\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)	Substituída em O-6 a cada cinco unidades por $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6) ligadas	Antitumoral Imunoestimulante Antioxidante Bactericida	ZHANG <i>et al.</i> , (2011)
<i>Pleurotus ostreatus</i> ;	$\alpha$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)	Ausente	Prebiótico	SYNYTSYA <i>et al.</i> , (2009)
<i>Pleurotus eryngii</i>				

TABELA 1 - EXEMPLOS DE GLUCANAS ISOLADAS DE COGUMELOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

				(Conclusão)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	$\beta$ -D-Glcp (1→3)	Substituída a cada três unidades em O-6 por uma unidade de $\beta$ -D-Glcp	Anti-inflamatório	SMIDERLE <i>et al.</i> , (2008a)
<i>Pleurotus sajor caju</i>	$\beta$ -D-Glcp (1→3)	Ausente	Imunomodulador	SILVEIRA <i>et al.</i> , (2014)

De acordo com Wasser (2014), as glucanas e outros polissacarídeos de cogumelos são utilizados na indústria de cosmético devido a sua capacidade de formação de filme, ativação de fator de crescimento da epiderme, efeito antioxidante, antialérgico, bactericida, anti-inflamatório, estimulação da síntese de colágeno, inibição de vitiligo autoimune e tratamento de acne. Conforme Laroche e Michaud (2007), devido a capacidade de geleificação das glucanas, as mesmas são também empregadas na indústria alimentícia.

#### 2.4.2- Heterogalactanas de cogumelos

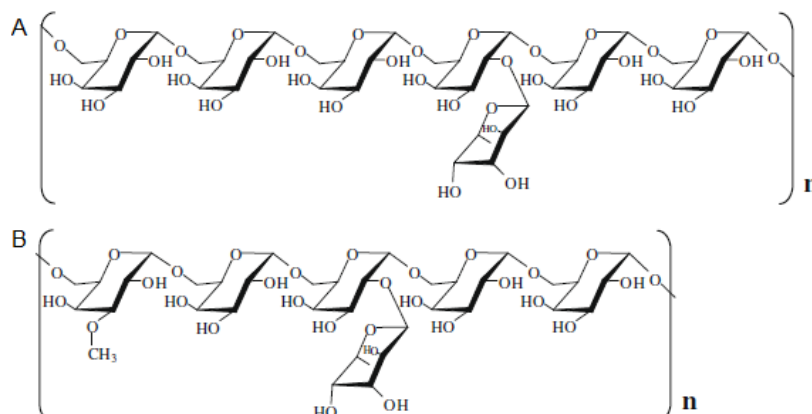
Nesta classe estão incluídas as heterogalactanas, polímeros que geralmente apresentam uma cadeia principal constituída por galactopiranosose ligada (1→6), com algumas unidades substituídas em O-2 por resíduos de L-Fucp (RUTHES *et al.*, 2012; RUTHES *et al.*, 2013a), D-Manp (ROSADO *et al.*, 2003), D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015), 3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp (RUTHES *et al.*, 2013a) ou 3-O- $\alpha$ -D-Manp- $\alpha$ -L-Fucp (ALQUINI *et al.*, 2004). As heterogalactanas, assim como as glucanas, são reconhecidas por apresentarem atividades biológicas relevantes (RUTHES, SMIDERLE, IACOMINI, 2016).

Estes polímeros podem ser encontrados com variadas características estruturais que influenciam seus diferentes efeitos biológicos. A exemplo, Ruthes e colaboradores (2013c), obtiveram uma fucogalactana parcialmente metilada do cogumelo comestível *Agaricus bisporus* (*champignon*). A administração intraperitoneal desta molécula em camundongos produziu uma significativa inibição da dor neurogênica e inflamatória induzida pela injeção intraplantar de formalina, além de prevenir a letalidade causada pela sepse induzida por ligadura e punção do ceco.

Komura e colaboradores (2010) avaliaram o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de uma fucogalactana não metilada obtida de *Agaricus brasiliensis* e

da fucogalactana parcialmente metilada de *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (FIGURA 5). Os resultados mostraram que ambas as moléculas apresentaram efeito antinociceptivo mas apenas a fucogalactana parcialmente metilada apresentou atividade anti-inflamatória.

FIGURA 5- ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCOGALACTANA ISOLADA DE *Agaricus brasiliensis* (A) E *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (B).



FONTE: KOMURA *et al.*, (2010).

Uma fucomanogalactana obtida de *Amanita muscaria* (RUTHES *et al* 2013a) foi também avaliada quanto a seu efeito antinociceptivo em camundongos que receberam injeção intraplantar de formalina. Esta molécula não produziu um efeito inibitório da dor neurogênica (primeira etapa), entretanto foi mais efetiva na inibição da dor inflamatória (segunda etapa), quando comparada com a fucogalactana de *Agaricus bisporus* (RUTHES *et al.*, 2013c), pois promoveu a inibição mesmo na menor dose testada (10 mg kg<sup>-1</sup>), enquanto a fucogalactana atingiu uma inibição semelhante na maior dose testada (100 mg kg<sup>-1</sup>).

Os trabalhos descritos acima evidenciam como a diferença existente na estrutura química da molécula altera sua respectiva atividade biológica, enfatizando a importância da elucidação da estrutura molecular dos polissacarídeos, afim de compreender quais as características químicas necessárias para a obtenção de determinado efeito biológico.

Além das atividades anti-inflamatória, antisséptica e antinociceptiva, outros efeitos biológicos foram descritos para heterogalactanas. As estruturas das moléculas supracitadas e de outras heterogalactanas obtidas de cogumelos, assim como suas respectivas atividades biológicas, encontram-se detalhadas na tabela 2.

TABELA 2 - EXEMPLOS DE HETEROGALACTANAS ISOLADAS DE COGUMELOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

Heterogalactana	Fonte	Cadeia principal	Ramificação	Efeito Biológico	Referências
Fucogalactana	<i>Agaricus brasiliensis</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição a cada 5 unidades de $\alpha$ -D-Galp na posição O-2 por uma unidade de $\alpha$ -L-Fucp	Antinociceptivo	KOMURA <i>et al.</i> , (2010)
	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>hortensis</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6) e 3-O-metil- $\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição a cada 4 unidades de $\alpha$ -D-Galp na posição O-2 por uma unidade de $\alpha$ -L-Fucp e em menor proporção por $\beta$ -D-Galp	Antinociceptivo e anti-inflamatório	
	<i>Agaricus bisporus</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6) e 3-O-metil- $\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição a cada 4 unidades de $\alpha$ -D-Galp na posição O-2 por uma unidade de $\alpha$ -L-Fucp e em menor proporção por $\beta$ -D-Galp	Antinociceptivo; anti-inflamatório e asséptico	RUTHES <i>et al.</i> , (2013a)
	<i>Lactarius rufus</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição em O-2 por uma unidade de $\alpha$ -L-Fucp	Ativo na sepse	RUTHES <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Sarcodon aspratus</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituído em grande proporção na posição O-2 e O-4 possivelmente por uma unidade de $\beta$ -D-Galp, podendo esta ramificação estar substituída em O-2 por unidade de $\alpha$ -L-Fucp (uma das possibilidades de ligação da $\alpha$ -L-Fucp)	Provoca a liberação do fator de necrose tumoral e de óxido nítrico em macrófagos murinos	MIZUNO <i>et al.</i> , (2000)
Manogalactana	Cogumelo híbrido de <i>Pleurotus florida</i> e <i>Lentinula edodes</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição em O-2 por uma unidade $\beta$ -D-Manp	Imunomodulador	MAITY <i>et al.</i> , (2013)
	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6) e 3-O-metil- $\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição em O-2 tanto em algumas unidades de $\alpha$ -D-Galp quanto em 3-O-metil- $\alpha$ -Galp (1→6) por uma unidade de $\beta$ -D-Manp	Antinociceptivo	SMIDERLE <i>et al.</i> , (2008b)
	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6) e 3-O-metil- $\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição nas unidades de $\alpha$ -D-Galp em O-2 por uma unidade de $\beta$ -D-Manp	Antinociceptivo e anti-inflamatório	SILVEIRA <i>et al.</i> , (2015)
Fucomanogalactana	<i>Amanita muscaria</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição em O-2 por uma unidade de $\alpha$ -L-Fucp e em menor proporção $\beta$ -D-Manp	Inibição da dor inflamatória	RUTHES <i>et al.</i> , (2013a)
	<i>Lentinus edodes</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição em O-2 por uma unidade de $\beta$ -Manp ou $\alpha$ -L-Fucp	Antinociceptivo e anti-inflamatório	CARBONERO <i>et al.</i> , (2008)
Glucogalactana	<i>Pleurotus ostreatus</i>	$\alpha$ -D-Galp (1→6)	Substituição em O-2 por uma unidade de $\beta$ -D-Glcp	Imunomodulador	SUN e LIU (2009)

## 2.5 CÂNCER DE PELE - MELANOMA

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças causadas por alterações genéticas que podem ocorrer em genes denominados proto-oncogenes, que quando mutados transformam-se em oncogenes, responsáveis pela cancerização das células normais. Conforme Parham (2011), como consequência destas mutações ocorre a perda do controle de divisão celular pelas células originais, resultando em crescimento excessivo e formação de tumores.

Conforme o INCA (2011), os tumores podem ser benignos ou malignos. No caso dos benignos, o crescimento ocorre de forma organizada e lenta, apresentando limites bem nítidos. Trata-se de uma massa localizada de células que apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes. Este tipo de tumor raramente constitui um risco de vida. Os tumores malignos, por sua vez, manifestam um maior grau de autonomia e são capazes de permear a corrente sanguínea, migrar para outros tecidos, se estabelecer e proliferar em outros locais, gerando outros tumores em outras partes do corpo a partir de um já existente. Estes novos focos da doença são chamados de metástases. Apenas o tumor maligno é denominado câncer e a capacidade de realizar metástase é a principal característica desta doença. Este tumor pode ser resistente ao tratamento e causar a morte do paciente.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as mortes causadas pelo câncer foram estimadas em 8,8 milhões em 2015, sendo que aproximadamente 1 em cada 6 mortes no mundo é devido ao câncer. Dentre estes, o câncer de pele é o tipo de câncer mais incidente no Brasil (DIMATUS *et al.*, 2009; INCA, 2011). Segundo o INCA, o câncer de pele corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país e pode ser do tipo melanoma ou não-melanoma.

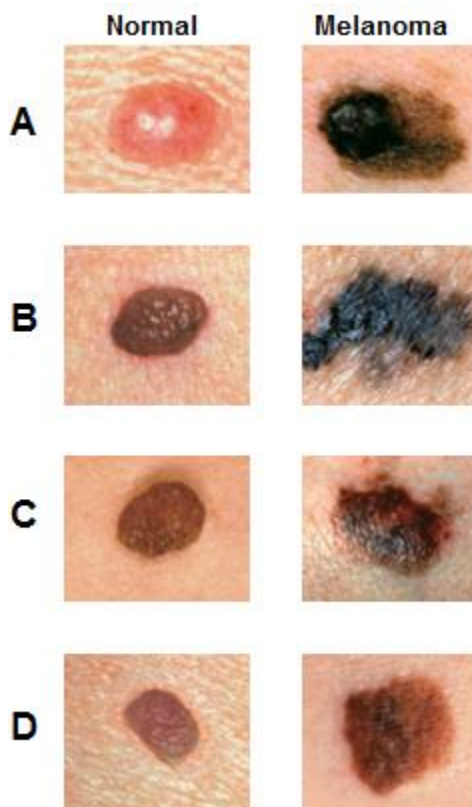
O câncer não-melanoma embora ocorra em maior incidência possui baixa mortalidade, pois apresenta altos percentuais de cura se for detectado precocemente. Ocorre comumente em pessoas com mais de 40 anos, principalmente em indivíduos com a pele clara ou com doenças cutâneas

prévias, sendo relativamente raro em crianças e negros sem histórico de doenças cutâneas anteriores (INCA, 2011). Outros fatores de risco também já estudados são o tempo de exposição ao sol, atividade rural, histórico familiar, genodermatose, exposição ao arsênico e radiações ionizantes, que são fatores que apesar de menos comuns, aumentam o risco de incidência desta patologia (FERREIRA; COSTA; ROTA *et al.*, 2011). Foram relatados 175.760 casos de câncer não-melanoma em 2016, sendo 80.850 homens e 94.910 mulheres (INCA).

O câncer de pele do tipo melanoma, por sua vez, representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, entretanto, é o mais grave devido à sua elevada possibilidade de metástase quando comparado ao câncer não melanoma. Esta patologia tem origem nos melanócitos e é mais incidente em adultos brancos. Foram relatados 5.670 casos de melanoma em 2016, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres (INCA).

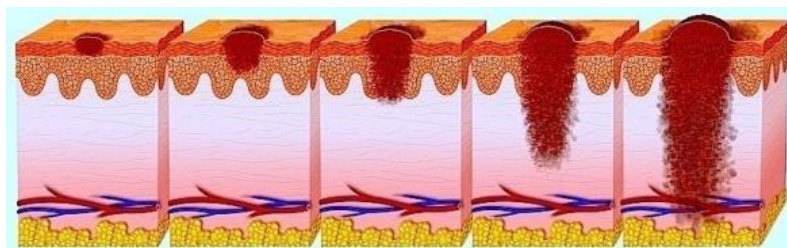
De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (2010), muitas vezes o primeiro sinal da ocorrência do melanoma é uma mudança na forma, cor ou tamanho de uma verruga existente, com alteração na simetria, irregularidade nas bordas, espalhamento do pigmento para a pele circundante, cor com tons desiguais e aumento no diâmetro (FIGURA 6). Em melanoma mais avançado, a textura também pode ser alterada podendo parecer raspada, sangrar, coçar ou doer. Pode ainda haver o aparecimento de uma nova verruga. O melanoma pode invadir o tecido normal nas proximidades e também se espalhar por todo o corpo. Quando as células tumorais se espalham, elas se separam do crescimento original e permeiam vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, podendo ser encontradas em linfonodos próximos (FIGURA 7).

FIGURA 6- O ABCD DO MELANOMA. FIGURA REPRESENTATIVA DA MORFOLOGIA DE UMA VERRUGA COMUM E UM MELANOMA. (A) ASSIMETRIA; (B) BORDA; (C) COR; (D) DIÂMETRO.



FONTE: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>

FIGURA 7- FIGURA ILUSTRATIVA DE UMA MASSA TUMORAL DO TIPO MALIGNA ORIGINADA EM MELANÓCITOS (MELANOMA) EM PROCESSO DE METÁSTASE, PERMEANDO OS VASOS SANGUÍNEOS E SE ESTENDENDO PARA A CAMADA MAIS PROFUNDA DA PELE.



Fonte: <http://www.fisioterapiaparatodos.com/p/doencas-da-pele/melanoma-pele/>

Segundo Farias (2012), as células de melanoma podem ser facilmente mantidas em cultura devido a sua alta capacidade proliferativa, o que as constitui como um excelente modelo para o estudo de ação de novos compostos contra as células tumorais. Um modelo de estudo estabelecido para melanoma é a utilização de células de melanoma murino, conhecidas como



B16F10, obtidas de camundongos da linhagem C57BL/6 (BENNETT *et al.*, 1987 *apud* FARIAS, 2012)

## 2.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS E SEUS EFEITOS SOBRE O MELANOMA

Dentre os compostos bioativos dos cogumelos, os polissacarídeos são os mais conhecidos e mais potentes quanto as propriedades antitumoral e imunomoduladora (PATEL; GOYAL, 2012; SMIDERLE; RUTHES; IACOMINI, 2014). Extratos de  $\beta$ -D-glucana de *Lentinula edodes* (lentinana) e *Schizophyllum commune* (schizophyllan) são utilizados na medicina tradicional para o tratamento do câncer no Japão desde 1980, embora pouco tenha sido publicado sobre seus efeitos em humanos (SMIDERLE; RUTHES; IACOMINI, 2014). Conforme Meng, Liang e Luo (2016), a lentinana atua como um adjuvante imunológico em conjunto com a quimioterapia, sendo aplicada desde a década de 80 para o tratamento do câncer de estômago.

De acordo com Smiderle, Ruthes e Iacomini (2014), os polissacarídeos podem exercer seus efeitos anti-tumorigênicos através do aumento da imunidade celular. Esta alteração na resposta imunológica é ocasionada pela ligação dos polissacarídeos à receptores de membrana das células imunes. Segundo Netea *et al.*, (2008), dentre estes receptores, nos macrófagos são encontrados os receptores de lectina tipo C (para manose e dectina-1), do sistema complemento (CR3, seus ligantes inclui  $\beta$ -glucanas) e do tipo *Toll-like* (TLR2, TLR4, TLR6). Conforme Smiderle, Ruthes e Iacomini (2014), além da estimulação do sistema imunológico através dos macrófagos os polissacarídeos estimulam também as células NK, neutrófilos, células dendríticas e células T, com consequente produção de citocinas. Segundo Ruthes, Smiderle e Iacomini (2016), estas células realizam uma série de funções importantes, incluindo o reconhecimento e destruição de células anormais, como as células cancerígenas.

Segundo Meng, Liang e Luo (2016), polissacarídeos com distintas características estruturais isolados de cogumelos apresentam bioatividade quando avaliados frente a diferentes tipos de tumores, incluindo o melanoma.

Bae e colaboradores (2005) avaliaram o efeito anti-melanoma de um extrato de polissacarídeos obtido de *Phellinus gilvus*, sobre a linhagem B16F10 *in vitro* e *in vivo*, utilizando camundongos inoculados com células B16F10. Quando avaliado *in vitro*, o extrato inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose de forma dose-dependente. Na avaliação *in vivo*, houve a inibição do crescimento tumoral de forma significativa, o que foi associado a um aumento significativo na taxa de apoptose do melanoma.

Um polissacarídeo isolado do cultivo micelial de *Inonotus obliquus* por Kim *et al.*, (2006), não apresentou toxicidade direta contra as células de melanoma-B16F10 ou células normais quando avaliado pelo método de MTT. Entretanto, quando administrado via intraperitoneal em camundongos implantados com B16F10, resultou em um aumento de 4,07 vezes na taxa de sobrevivência a uma dose de 30 mg/kg/dia. Após 60 dias de administração, aproximadamente 67% do número inicial de camundongos sobreviveram sem incidência de tumor com base no exame macroscópico.

HAN *et al.*, (2006) demonstraram que um polissacarídeo ácido isolado de *Phellinus linteus* inibiu a adesão e invasão de células da linhagem B16F10 *in vitro* e a metástase em camundongos implantados com B16F10, além de atuar como imunopotenciador estimulando a produção de óxido nítrico por macrófagos.

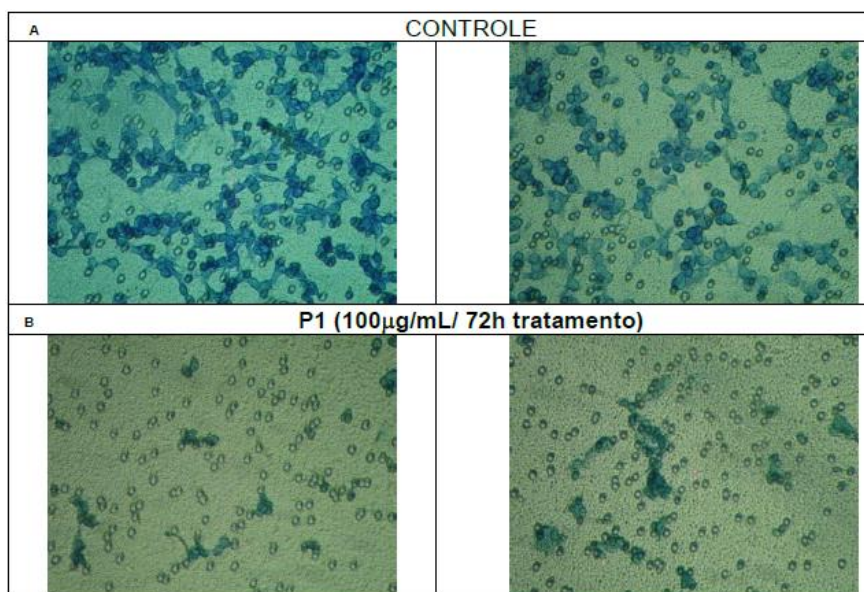
Uma fração polissacarídica isolada de *Ganoderma formosanun* foi administrada, por Wang e colaboradores (2014b), em camundongos implantados com células de melanoma B16. A administração intraperitoneal ou oral contínua desta molécula efetivamente suprimiu o crescimento das células tumorais, no entanto, quando administrado em camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID) implantados com melanoma, o polissacarídeo não apresentou efeito antitumoral. Os animais imunodeficientes receberam células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e soro de camundongos sem imunodeficiência portadores de tumor que haviam sido previamente tratados com o polissacarídeo, após esta administração, os camundongos deficientes apresentaram uma redução do tumor. Estes dados indicam que o tratamento

com este polímero estimulou as respostas imunes celular e humoral específicas contra o tumor.

Uma manogalactana parcialmente metilada extraída de *Pleurotus eryngii*, obtida em parceria entre o grupo de Química de Carboidratos da UFPR e da UFG, foi avaliada por Biscaia (2012) do grupo de Biologia Celular da UFPR, quanto a seus efeitos sobre a linhagem celular B16F10 *in vitro*. Esta molécula não alterou a proliferação celular e não apresentou citotoxicidade, no entanto, reduziu 41,8% o percentual de invasão celular *in vitro* (FIGURA 8). Esta molécula foi posteriormente avaliada *in vivo* em camundongos (C57BL/6) portadores de melanoma (BISCAIA, 2016). Estes animais foram tratados diariamente com o polissacarídeo (50mg/kg corporal), via intraperitoneal, por 10 dias, resultando na redução do volume tumoral em 60% (FIGURA 9). Ao ser avaliado o perfil bioquímico e hematológico dos animais tratados não foi encontrado nenhum efeito colateral decorrente do tratamento. Este polímero apresentou também efeito adjuvante quando associado ao quimioterápico padrão dacarbazina.

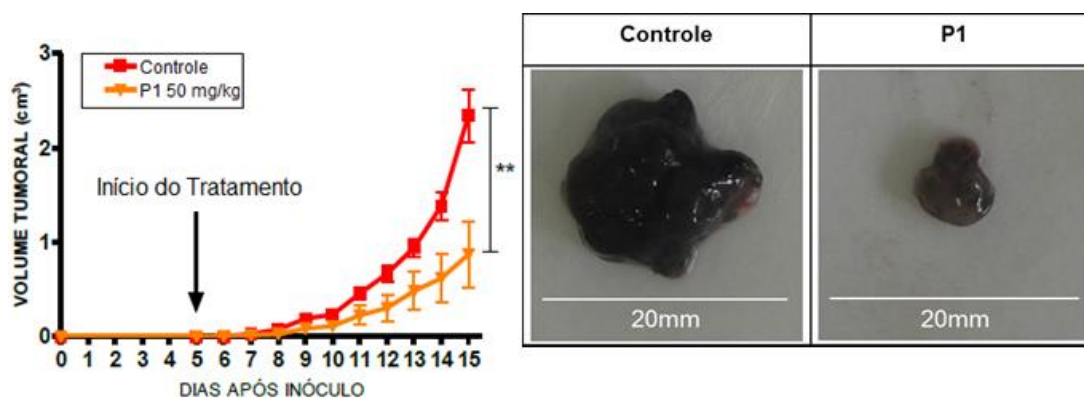
Estes trabalhos evidenciam o potencial antitumoral de polissacarídeos obtidos de diversos cogumelos, contra células de melanoma murino B16F10. Algumas espécies de basidiomicetos, como o *Macrocybe titans*, que não foram ainda exploradas quanto a seus polissacarídeos, podem conter polímeros com uma promissora atividade biológica, incluindo a atividade antitumoral, que carece ser avaliada.

FIGURA 8- ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA INVASÃO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 PARA UMA MATRIZ DE FIBRONECTINA, EM TRANSWELL. (A) CONTROLE; (B) TRATADO COM 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DA MANOGALACTANA NATURALMENTE METILADA OBTIDA DE *Pleurotus eryngii* (P1)



FONTE: BISCAIA (2012)

FIGURA 9- EVOLUÇÃO TUMORAL EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS B16F10, APÓS TRATAMENTO (DO 5º AO 14º DIA) COM O POLISSACARÍDEO EM UMA CONCENTRAÇÃO DE 50mg/kg DE PESO DO ANIMAL.



FONTE: BISCAIA (2016)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 - OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral isolar e caracterizar estruturalmente polissacarídeos extraídos do basidioma de *Macrocybe titans* e verificar sua bioatividade em células de melanoma murino B16F10.

#### 3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter os polissacarídeos do basidioma através de extrações aquosas e alcalina;
- b) Purificar as frações polissacarídicas obtidas, utilizando diferentes metodologias;
- c) Determinar a estrutura química dos polissacarídeos purificados;
- d) Avaliar se o polissacarídeo obtido do extrato a frio bem como a fração bruta, podem alterar viabilidade e proliferação celular em células de melanoma murino B16F10.

## 4 METODOLOGIA

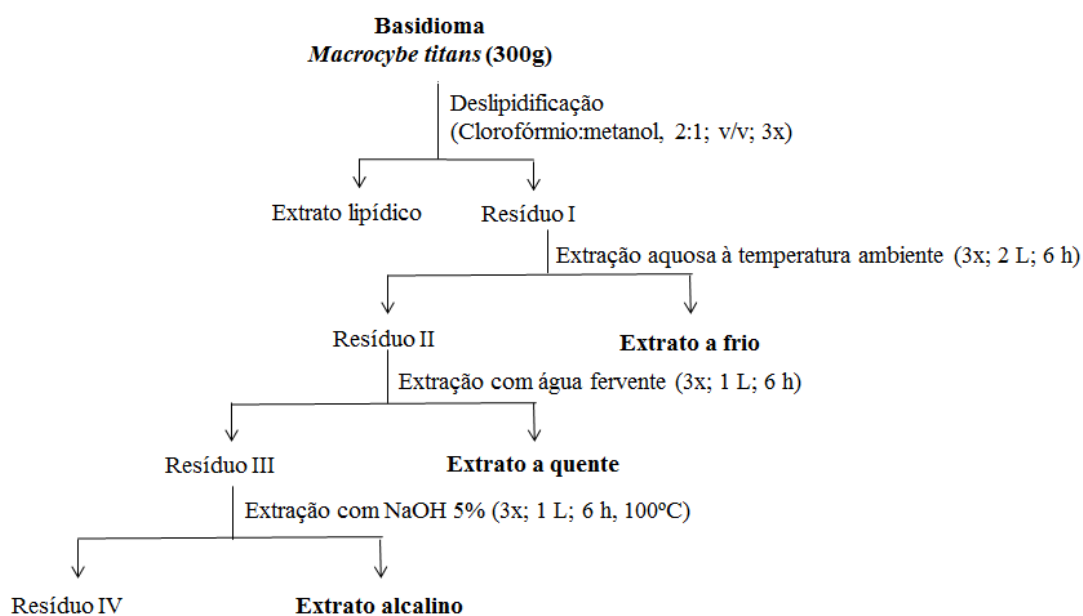
### 4.1 BASIDIOMICETO

Os basidiomas desidratados e triturados de *Macrocybe titans*, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Fabio Rogerio Rosado, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

### 4.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO

As extrações foram realizadas utilizando 300 g de basidiomas secos e triturados. O material foi primeiramente deslipidificado sendo em seguida submetido a extrações sequenciais (aquosas e alcalina) visando a obtenção dos polissacarídeos (FIGURA 10).

FIGURA 10- ESQUEMA DAS EXTRAÇÕES PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS BASIDIOMAS DESIDRATADOS DE *Macrocybe titans*.



#### 4.2.1- Extração com Clorofórmio-Metanol

A amostra foi inicialmente deslipidificada com uma solução de clorofórmio-metanol ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ , 2:1; v/v; 3x), sob refluxo, durante 3 horas a aproximadamente 60°C (SMIDERLE, 2012). O extrato de compostos apolares resultante foi separado do resíduo I por filtração a vácuo.

#### 4.2.2- Extração com água fria

O resíduo I foi submetido à extração com água destilada sob agitação mecânica à temperatura ambiente durante 6 horas (3x; 2 L). Os extratos obtidos foram reunidos, separados do material residual por centrifugação (10.000 rpm; 20 min; 15°C) e concentrados sob pressão reduzida até pequeno volume. O concentrado resultante foi precipitado com etanol (3:1; v/v) para separação dos componentes de baixa massa molar. O precipitado etanólico foi obtido por centrifugação (10.000 rpm; 20 min; 15°C) e dialisado em um sistema fechado contra água destilada utilizando membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, originando as frações eluída (E6CW) e retida (R6CW). A diálise foi realizada até que o material eluído não apresentasse mais carboidrato, o qual foi acompanhado pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As frações eluída e retida foram concentradas sob pressão reduzida e liofilizadas.

#### 4.2.3- Extração com água fervente

O resíduo obtido no processo de extração a frio (resíduo II), foi submetido à extração com água fervente (100°C; 6h; 3x). Os extratos obtidos foram reunidos, separados do material residual por centrifugação (10.000 rpm; 20 min; 15°C) e concentrados sob pressão reduzida até pequeno volume. O concentrado resultante foi precipitado com etanol (3:1; v/v) para separação dos componentes de baixa massa molar. O precipitado etanólico foi obtido por centrifugação (10.000 rpm; 20 min; 15°C) e dialisado contra água destilada em sistema fechado utilizando membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa,

originando as frações eluída (E6HW) e retida (R6HW), sendo a diálise interrompida quando a fração eluída não apresentou mais carboidratos pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Ambas as frações foram congeladas e liofilizadas.

#### 4.2.4- Extração alcalina

O resíduo III resultante da extração com água fervente foi tratado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5%, sob refluxo (6h; 100°C; 3x) na presença de borohidreto de sódio, que foi adicionado para proteger a unidade redutora do polissacarídeo, evitando sua degradação. Os extratos obtidos foram reunidos, centrifugados para separação do material residual (10.000 rpm; 20 min; 15°C), neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente por 48h utilizando membranas com limites de exclusão de 6-8 kDa. O volume resultante foi concentrado sob pressão reduzida e liofilizado, sendo esta fração denominada EA.

### 4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os extratos obtidos foram submetidos a diferentes procedimentos de purificação de acordo com as características químicas das moléculas presentes em cada fração. Estes procedimentos foram: diálise, tratamento com enzima, congelamento e descongelamento, tratamento com dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO), tratamento com NaOH e tratamento com solução de Fehling.

As etapas de purificação foram monitoradas através do perfil de eluição obtido por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada à detector de índice de refração (HPSEC-RI), composição monossacarídica (CG-EM) e RMN.



#### 4.3.1- Fracionamento e purificação da fração obtida com água a temperatura ambiente

##### 4.3.1.1- Tratamento com $\alpha$ -amilase

Uma alíquota (1,0 g) do material retido na membrana de 6-8 KDa (R6CW) foi submetido ao tratamento com  $\alpha$ -amilase (Sigma A3403-500KU). A amostra liofilizada foi primeiramente diluída em água destilada e a esta solução foi adicionada a enzima. O tratamento foi realizado a 85°C e a degradação do glicogênio foi acompanhada através da formação de açúcares redutores utilizando o reativo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O tratamento foi interrompido quando o aumento na concentração de açúcares redutores na solução não foi mais detectado pelo método de DNS. O material tratado foi então precipitado com etanol resfriado (3:1; v/v) centrifugado (9.000 rpm; 20 min; 15°C) dialisado contra água corrente em membrana de 6-8 kDa, congelado e liofilizado. Posteriormente, a fração obtida ( $\alpha$ -R6CW) foi fracionada por congelamento e degelo, conforme descrito a seguir.

##### 4.3.1.2- Congelamento e degelo

A amostra foi submetida ao processo de congelamento e degelo como descrito por Gorin e Iacomini (1984). A mesma foi solubilizada em água destilada e congelada, seguido do descongelamento a temperatura ambiente (4x). O material solúvel foi separado do insolúvel por centrifugação (9.000 rpm; 25 min; 4°C) e ambas as frações foram congeladas e liofilizadas.

##### 4.3.1.3- Purificação do polissacarídeo por diálise em membrana

A fração que foi solúvel no gelo e degelo (SCW) foi submetida a diálise contra água destilada utilizando membrana com limite de exclusão de 1.000 kDa, originando as frações retida (R1000) e eluída (E1000). A diálise foi interrompida somente quando a fração eluída não apresentou mais carboidrato sendo avaliada pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

#### 4.3.1.4- Precipitação com solução de Fehling

Uma alíquota (1,0 g) da fração retida na membrana (R6CW) foi submetida a precipitação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste na mistura de duas soluções: A solução A (86,5 g de tartarato de sódio e potássio e 62,5 g de hidróxido de potássio em água destilada q.s.p 250 mL) e a solução B (27,87 g de sulfato de cobre em água destilada q.s.p 250 mL).

A amostra foi inicialmente solubilizada na solução A. Posteriormente, adicionou-se igual volume da solução B e a mistura foi agitada vigorosamente durante 1 hora. Decorrido o período, a mesma foi mantida sob refrigeração por 12 horas.

O complexo cúprico insolúvel foi então separado do sobrenadante por centrifugação (9.000 rpm; 25 min; 4°C). Ambas as frações foram neutralizadas com ácido acético e dialisadas contra água corrente em membranas de 6-8 kDa por 48 horas. Em seguida, as frações foram deionizadas com resina catiônica para a remoção do excesso de cobre e dialisadas contra água corrente em membranas de limite de exclusão entre 6 e 8 kDa durante 24 horas. O volume obtido foi concentrado sob pressão reduzida, congelado e liofilizado.

#### 4.3.2- Fracionamento da amostra obtida com água fervente

O material retido da diálise de 6-8 kDa (R6HW) foi inicialmente submetido ao processo de congelamento e degelo conforme o item 4.3.1.2. O material solúvel obtido não foi utilizado neste trabalho. O precipitado, por sua vez, foi tratado com  $\alpha$ -amilase, conforme a metodologia descrita no item 4.3.1.1, seguido de congelamento e degelo (item 4.3.1.2), sendo a fração solúvel deste procedimento submetida ao tratamento com dimetilsulfóxido, conforme descrito a adiante.

#### 4.3.2.1- Tratamento com dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO).

A amostra liofilizada foi tratada com Me<sub>2</sub>SO conforme metodologia adaptada de Smiderle *et al.*, (2013). A fração foi solubilizada em Me<sub>2</sub>SO e esta solução foi mantida sob agitação magnética por 2 h a 40°C. Em seguida, foi centrifugada (9.000 rpm; 25 min; 25°C), originando a fração solúvel (SD) e insolúvel (ID) em Me<sub>2</sub>SO. Ambas as frações foram dialisadas contra água corrente em membranas de 6-8 kDa por 24 horas, concentradas sob pressão reduzida, congeladas e liofilizadas. Posteriormente, a fração SD foi solubilizada em água destilada, submetida ao processo de congelamento e descongelamento (item 4.3.1.2) e centrifugada (9.000 rpm; 25 min; 4°C), originando a fração solúvel no gelo e degelo (SSD) e a fração insolúvel (ISD), as quais foram congeladas e liofilizadas.

#### 4.3.3- Fracionamento e purificação da fração obtida na extração alcalina

A fração dialisada (EA) foi primeiramente submetida ao processo de congelamento e degelo (item 4.3.1.2), resultando nas frações solúvel (SEA) e insolúvel (IEA), as quais foram purificadas conforme descrito a seguir.

##### 4.3.3.1- Precipitação com solução de Fehling

A fração solúvel no gelo e degelo (SEA) foi submetida a precipitação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965), conforme a metodologia descrita no item 4.3.1.4. Durante a diálise realizada após a precipitação e centrifugação observou-se a formação de um precipitado dentro da membrana contendo a fração solúvel em Fehling (SFSEA), devido a isto, a amostra foi submetida a centrifugação (3.000 rpm; 25 min; 25°C) originando um material precipitado (PSEA). Todas as frações (SFSEA, PSEA e PFSEA) foram deionizadas com resina catiônica para a remoção do excesso de cobre e dialisadas (6-8 KDa) por 24 horas. O volume obtido foi concentrado sob pressão reduzida, congelado e liofilizado.

#### 4.3.3.2- Precipitação com NaOH 2%

A fração insolúvel no gelo e degelo (IEA) foi submetida ao tratamento com NaOH seguido de neutralização com ácido acético, conforme metodologia adaptada de Smiderle *et al.*, (2008). A amostra foi inicialmente solubilizada em uma solução de NaOH 2% (100 mL para cada 1 g de amostra). Em seguida, esta solução foi mantida sob refluxo por 2 horas a 85°C, na presença borohidreto de sódio, que foi adicionado visando proteger a cadeia polissacarídica. Este material foi subsequentemente centrifugado (9.000 rpm; 25 min; 15°C), para separar a fração precipitada (Palcali) da fração sobrenadante. Ao sobrenadante foi acrescentado 4% do volume de ácido acético. Este material foi centrifugado (9.000 rpm; 25 min; 15°C), originando a fração precipitada com ácido (Pacido) e a fração sobrenadante (SIEA). Todas as frações foram neutralizadas, dialisadas contra água corrente em membranas de 6-8 kDa por 24 horas, congeladas e liofilizadas. Após a liofilização, a fração SIEA foi solubilizada em água destilada e submetida ao processo de congelamento e degelo (item 4.3.1.2), originando as frações solúvel (SSIEA) e insolúvel (ISIEA), as quais foram congeladas e liofilizadas.

### 4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

#### 4.4.1- Hidrólise ácida total, redução e acetilação

Alíquotas das frações polissacarídicas obtidas foram hidrolisadas, reduzidas e derivatizadas a seus respectivos acetatos de alditóis, para serem analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

Para isto, as amostras (1,0 mg) foram hidrolisadas com 200 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M durante 8 horas a 100°C (CORRADI DA SILVA *et al.*, 1993). Após este período, o ácido foi removido por evaporação até *secura*.

Os produtos de hidrólise foram solubilizados em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada e reduzidos com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), pH 9-10, a temperatura ambiente, *overnight* (WOLFROM; THOMPSON, 1963a,b). O material reduzido foi neutralizado com ácido acético e levado à secura sob fluxo constante de ar. Em seguida, as amostras foram lavadas com metanol (200  $\mu\text{L}$ ; 3x), visando eliminar, por co-evaporação, o ácido bórico na forma de borato de trimetila.

Os alditóis formados foram acetilados utilizando uma mistura de anidrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) e piridina (1:1, v/v; 100  $\mu\text{L}$ ), a 100°C por 30 min (SASSAKI *et al.*, 2008). Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio (1,0 mL) e a piridina residual foi removida por complexação com sulfato de cobre 5% (m/v), que foi adicionado repetidas vezes, até a completa remoção. Posteriormente, a fração apolar foi desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada em algodão.

Após a evaporação do clorofórmio, os derivados acetilados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e identificados pelos típicos tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (ALQUINI, 2010; SMIDERLE, 2012).

#### 4.4.2- Metilação dos polissacarídeos

As frações polissacarídicas purificadas (E1000 e SSIEA) foram metiladas pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Uma alíquota de cada amostra (5-10 mg) foi solubilizada em 0,5 mL de dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ). À solução foi acrescentado hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) em pó (4:1 carboidrato) e 0,5 mL de iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ). A amostra foi mantida em agitação vigorosa por 30 minutos e em seguida, deixada em repouso por 24 horas. Decorrido o período, o material foi solubilizado em água destilada, neutralizado com ácido acético, dialisado contra água corrente por 24 horas em membrana de 2 kDa e liofilizado. O procedimento foi repetido com o material liofilizado afim de garantir a total metilação do polissacarídeo. Neste segundo ciclo de metilação, após o repouso de 24 horas os produtos *per-O*-metilados foram extraídos com

clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) através de partição em água destilada. O clorofórmio foi evaporado a temperatura ambiente e os derivados *per-O*-metilados foram hidrolisados conforme descrito a seguir.

#### 4.4.3- Hidrólise ácida total dos polissacarídeos *per-O*-metilados

A hidrólise da amostra *per-O*-metilada da fração E1000 foi realizada com 1,0 mL de ácido fórmico 45% por 6 h a 100°C. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de água destilada, seguido de congelamento e liofilização (2 x) para total remoção do ácido. O material hidrolisado foi solubilizado em água destilada (200  $\mu\text{L}$ ), reduzido com borodeuterio de sódio ( $\text{NaBD}_4$ ) e acetilado conforme o item 4.4.1 (KOMURA *et al.*, 2010).

A amostra *per-O*-metilada da fração SSIEA, foi tratada com uma solução de metanol-ácido clorídrico ( $\text{MeOH-HCl}$ ) 3 N por 2 horas a 80°C (adaptado de Woranovicz *et al.*, 1999). Posteriormente, a solução foi evaporada sob fluxo constante de ar e o material seco foi hidrolisado com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2 N, conforme metodologia adaptada de Jansson *et al.*, (1976), até a obter a hidrólise total da amostra. (100°C; 24 h). Em seguida, o ácido foi neutralizado com carbonato de bário ( $\text{BaCO}_3$ ) e centrifugado. O material sobrenadante foi reduzido com borodeuterio de sódio ( $\text{NaBD}_4$ ) e acetilado conforme o item 4.4.1.

Os derivados hidrolisados *per-O*-metilados obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

#### 4.4.4- Degradação de Smith

Alíquotas das frações polissacarídicas SFSEA (120 mg) e SSIEA (80 mg), foram separadamente solubilizadas em água e acrescidas de periodato de sódio para uma concentração final de 0,05 M. Esta solução foi mantida sob agitação magnética, na ausência de luz por 72 horas. Posteriormente, o material oxidado foi dialisado (2 kDa) contra água corrente por 24 horas. O volume obtido foi reduzido, *overnight*, com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), neutralizado com ácido acético e dialisado (2 kDa) contra água corrente por 24 horas (ABDEL-AKHER *et al.*, 1952). O material reduzido foi submetido à

hidrólise parcial com TFA (pH 2,0) por 35 minutos a 100°C (SMIDERLE, 2008). Em seguida, a amostra parcialmente hidrolisada foi dialisada contra água corrente (2 kDa), liofilizada e analisada por RMN-<sup>13</sup>C (item 5.5.4).

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1 – Determinação da homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração (HPSEC-RI)

As análises foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo Waters 2410. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS: 2000, 500, 250, 120, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  Da. O eluente utilizado foi nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), 0.1 mol/L, contendo  $\text{NaN}_3$  0,2 g/L, com fluxo de 0,6 ml/min, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

Para as análises de homogeneidade as amostras foram solubilizadas na mesma solução utilizada como eluente (1 mg/mL), filtradas em membrana de acetato de celulose 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), e em seguida aplicadas no cromatógrafo (100  $\mu\text{L}$  loop). Os dados foram analisados pelo *software* Astra 4.70.70.

### 4.5.2 – Determinação relativa da massa molecular ( $M_w$ )

O tempo de retenção da fração que apresentou perfil de eluição homogêneo em HPSEC-RI (E1000) foi comparado com uma curva de padrões de dextrana (Sigma-Aldrich) de diferentes massas moleculares ( $5,00 \times 10^3$ ;  $9,40 \times 10^3$ ;  $1,72 \times 10^4$ ;  $4,02 \times 10^4$ ;  $7,22 \times 10^4$ ;  $1,24 \times 10^5$ ;  $2,66 \times 10^5$ ;  $4,87 \times 10^5$ ;  $2,00 \times 10^6$ ), visando estimar sua massa molecular relativa.

#### 4.5.3 – Determinação da composição monossacarídica e dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo DB-3800, acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 4000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,32 mm d. i.) modelo DB-1. As injeções na coluna foram feitas partindo-se de 100°C (mantida por 1,0 min), seguindo-se de um aumento gradual de 5°C/min até 220°C (mantida por 1,0 min). Posteriormente, a temperatura foi elevada até 280°C (18°C/min), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min.

#### 4.5.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN mono- (RMN-<sup>13</sup>C e RMN-DEPT) e bidimensionais (HSQC e HSQC-DEPT), foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400/600. As análises foram conduzidas a 70°C com as amostras de polissacarídeos (20 mg) solubilizadas em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>), dependendo da solubilidade das mesmas. Os deslocamentos químicos das amostras foram expressos em ppm ( $\delta$ ) relativos à ressonância da acetona ( $\delta$  30,2/ 2,22; <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H), para as amostras solubilizadas em D<sub>2</sub>O, ou do Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  39,70/2,40; <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H), para as amostras solúveis no mesmo.

#### 4.6 - ENSAIO BIOLÓGICO

Após a obtenção, purificação e caracterização de uma fração polissacarídica oriunda da extração com água a temperatura ambiente (E1000), esta fração e a fração bruta R6CW foram utilizadas para avaliar seus respectivos efeitos *in vitro*, utilizando células de melanoma murino B16F10. A



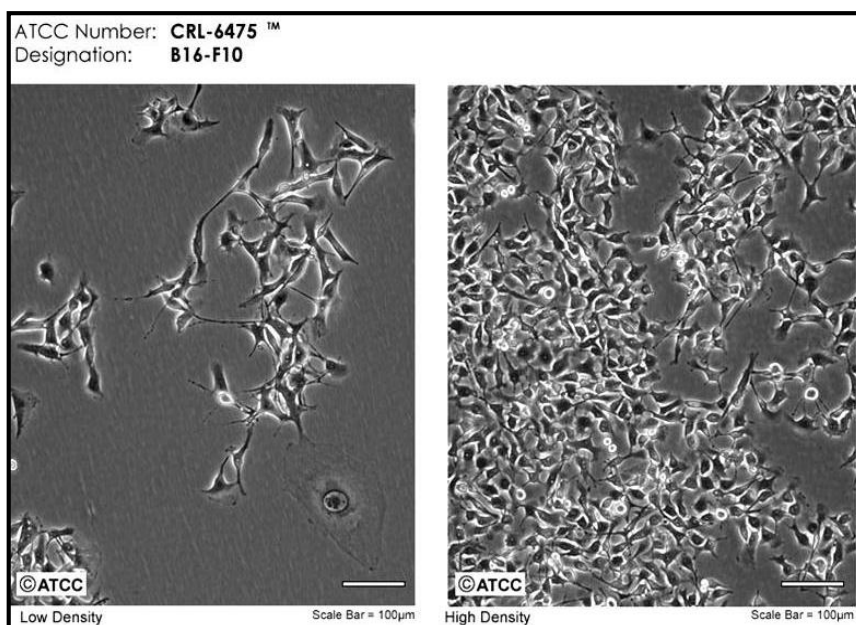
atividade biológica foi avaliada em parceria com o professor Dr. Edvaldo da Silva Trindade e a Dra. Stelée Marcela Petris Biscaia, do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

#### 4.6.1.- Cultivo de células (Linhagem B16F10)

Com o objetivo de realizar o estudo da ação destes compostos, foram realizados ensaios *in vitro*, utilizando como modelo as células de melanoma murino B16F10, oriundas do Banco de Células do Rio de Janeiro, (BCRJ) (FIGURA 11).

Estas células foram cultivadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza, CAT 12-604Q, USA). Este meio foi suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO, CAT 10270-106, USA); 10 mM de tampão HEPES e 0,25 µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% salina (GIBCO, CAT 15140148, USA). A cultura foi incubada a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas em placas (Costar) e garrafas de cultivo celular (Sarstedt), com passagens entre 1-10 e a confluência celular entre 70-90%.

FIGURA 11- LINHAGEM CELULAR B16F10 (MELANOMA MURINO).



FONTE: <https://www.atcc.org/~media/682555E1D2CE45EBBE60F713C2D3B91D.ashx>

#### 4.6.2- Avaliação da viabilidade celular

Para análise da viabilidade das células foi utilizado o método de Vermelho Neutro (VN), realizado de acordo com as metodologias descritas por Borenfreund e Puerner (1985). De acordo com Repetto, Peso e Zurita, (2008) , este método permite avaliar a integridade física e funcional da membrana plasmática, que somente é mantida em células viáveis. Estas células endocitam, por fase fluída, o corante vermelho neutro, que no pH fisiológico apresenta carga líquida próxima a zero, o que permite que ele penetre nas membranas da célula. Nos lisossomos, onde há um gradiente de prótons para manter um pH menor que o pH do citoplasma, o corante torna-se carregado e se liga a grupos aniônicos e/ou fosfatos da matriz. Este corante, após ser eluído, pode ser quantificado por medida de absorvância.

As células B16F10 foram cultivadas como descrito anteriormente (item 4.6.1). Posteriormente, foram plaqueadas 600 células por poço em placas de 96 poços, com 200  $\mu$ L de meio de cultura. Após 24 horas, estas foram tratadas com as frações polissacarídicas (R6CW e E1000), dissolvidas em meio de cultura e previamente esterilizadas em filtro de 0.22  $\mu$ m. Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 10, 50, 100 e 250  $\mu$ g/mL, com um tempo de tratamento de 24, 48 e 72 horas.

Decorrido o período, o meio de cultura foi removido e foi acrescentado a solução de VN 0,04 mg/mL (SIGMA, N6634), seguido de incubação por 2 h a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio foi removido e o VN endocitado foi eluído por uma solução de extração (etanol, ácido acético, água ultrapura; 50:1:49). O corante foi totalmente dissolvido por homogeneização branda e em seguida foi realizada a leitura de absorvância em um comprimento de onda de 550 nm, em leitora de microplacas (BIOTEK, EPOCH).

#### 4.6.3- Avaliação da proliferação celular

Para avaliar o efeito da fração bruta ou do polissacarídeo na proliferação das células tumorais, após o ensaio de viabilidade o corante VN foi

retirado e após a lavagem da placa a mesma foi submetida ao ensaio de cristal violeta.

Conforme Gillies, Didier e Denton (1986), o método do cristal violeta é um processo de coloração das células, o qual correlaciona a quantidade de corante adsorvido com a quantidade de células presentes no cultivo, em um determinado momento fixo do tratamento. Após a adsorção do corante nas células e eluição, pode-se então mensurar a absorbância. A determinação da densidade celular nos permite avaliar se os tratamentos estimulam, inibem ou não alteram a proliferação celular em relação ao grupo controle.

Para tanto, as células após o ensaio de VN, foram lavadas com água ultrapura e posteriormente foi adicionada a solução de coloração de cristal violeta 0,25 mg/mL (VETEC, Cat 178), seguido de incubação por 20 min a temperatura ambiente. Subsequentemente, as mesmas foram lavadas com água ultrapura (2x) e eluídas com uma solução de ácido acético 33% e água ultrapura 67%. Após completa dissolução, foi realizada a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 550 nm, em leitor de microplacas (BIOTEK, EPOCH) (metodologia adaptada de Gillies, Didier e Denton, 1986).

#### 4.6.4- Análise estatística

Todos os experimentos biológicos foram realizados em quadruplicata, em três experimentos independentes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, determinando a significância à \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

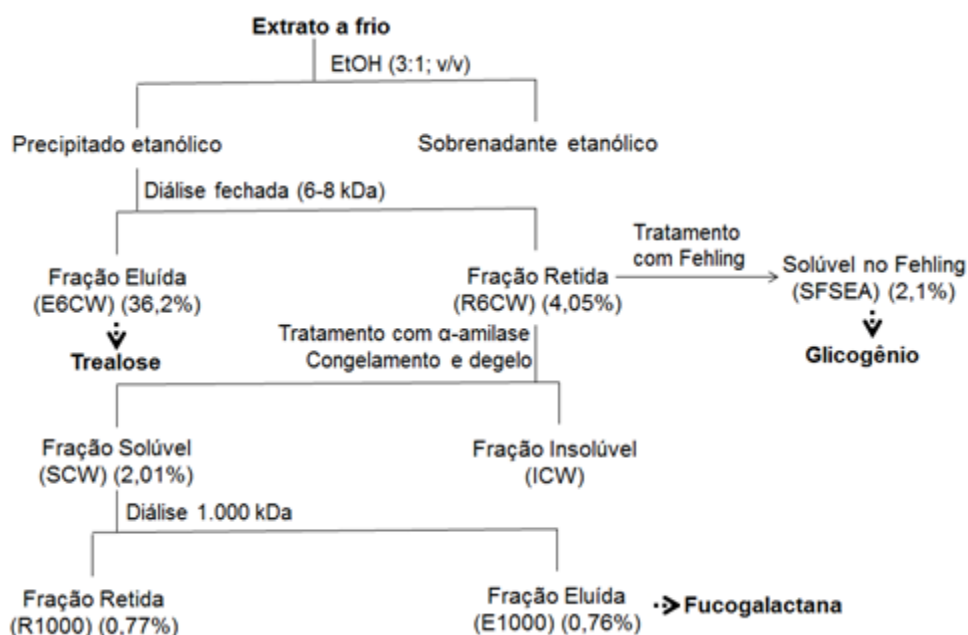
Os basidiomas liofilizados e triturados de *Macrocybe titans* (300 g), foram inicialmente submetidos a deslipidificação com clorofórmio-metanol (2:1; v/v). O material deslipidificado resultante foi extraído sequencialmente com água a temperatura ambiente (~25°C), água fervente (~98°C) e com solução alcalina (NaOH 2%, ~98°C).

Os extratos obtidos em cada procedimento de extração foram separadamente submetidos a diferentes processos de purificação, dependendo das características químicas das moléculas presentes nos mesmos.

### 5.1 EXTRAÇÃO AQUOSA A TEMPERATURA AMBIENTE

O extrato aquoso obtido com a extração a temperatura ambiente foi submetido a etapas de fracionamento e purificação conforme descrito na figura 12.

FIGURA 12- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO OBTIDO COM ÁGUA A TEMPERATURA AMBIENTE A PARTIR DE BASIDIOMAS DE *Macrocybe titans*.



Inicialmente, o extrato aquoso obtido foi submetido à precipitação com etanol (3:1; v/v) e o precipitado resultante foi dialisado em sistema fechado contra água destilada utilizando membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa.

O material eluído na diálise (E6CW; 36%), apresentou-se composto principalmente por glucose, seguido de manose e galactose (TABELA 3). A análise de RMN-<sup>13</sup>C desta fração (figura 13A) apresentou 6 sinais principais. Os sinais em  $\delta$  93,6 e  $\delta$  60,9, correspondiam ao C1 e C6 da molécula de trealose, respectivamente, e os demais sinais correspondentes aos outros carbonos deste dímero (DONKER, BRAAKSMA, 1997). Visando confirmar esta hipótese, o espectro obtido foi comparado com o espectro de um padrão de trealose (figura 13B), observando-se compatibilidade entre os espectros.

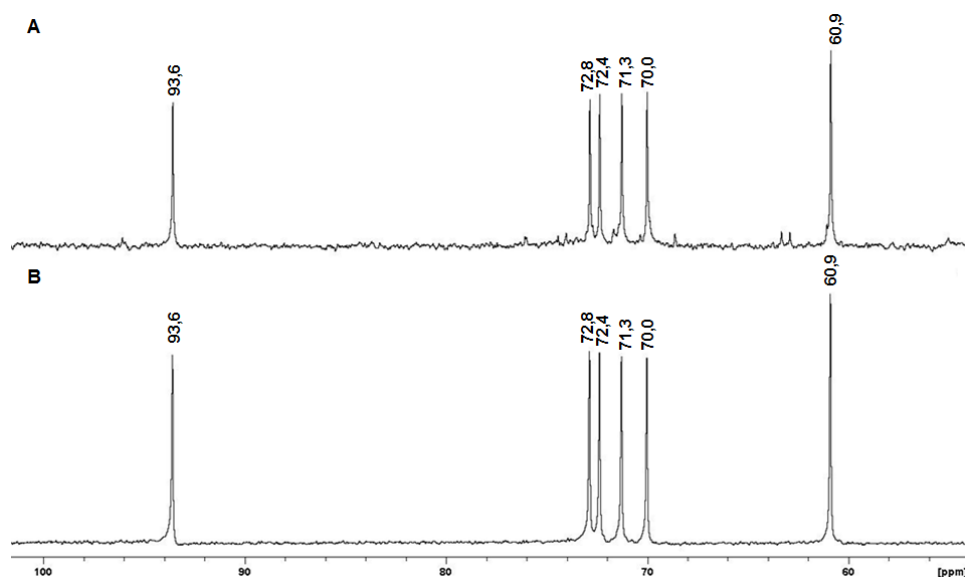
TABELA 3 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe titans* OBTIDO A TEMPERATURA AMBIENTE.

Fração	Composição (%) <sup>a</sup>				Rendimento <sup>b</sup> (%)
	Fuc	Man	Glc	Gal	
<b>E6CW</b>	—	13,2	79,6	7,2	36,2
<b>R6CW</b>	2,7	6,2	60,8	30,3	4,05
<b>SCW</b>	13,7	7,3	18,8	60,2	2,01
<b>R1000</b>	12,5	1,1	6,6	79,8	0,77
<b>E1000</b>	17	—	—	83	0,76
<b>SFR6</b>	—	4,8	90,8	4,4	2,10

<sup>a</sup> Acetatos de alditóis obtidos após hidrólise, redução com NaBH<sub>4</sub> e acetilação.

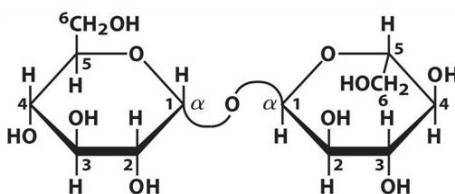
<sup>b</sup> Percentual relativo ao cogumelo seco (300g).

FIGURA 13- (A) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO E6CW SOLUBILIZADA EM D<sub>2</sub>O (B) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DO PADRÃO DE TREALOSE SOLUBILIZADO EM D<sub>2</sub>O.



A trealose é um dissacarídeo não redutor composto por Glcp ( $\alpha 1 \leftrightarrow 1 \alpha$ ) (RICHARDS *et al.*, 2002; NELSON; COX. 2014) (figura 14), que por ser um composto abundante em cogumelos, foi relatado para diversas espécies de basidiomicetos, como *Morchella conica* e *Leucopaxillus candidus* (VIEIRA 2014), *Grifola frondosa* (HAUNG *et al.*, 2011), *Macrolepiota procedera* (FERNANDES *et al.*, 2014), *Agrocybe cylindracea*, *Pleurotus cystidiosus*, *Agaricus blazei*, *Pleurotus eryngii*, e *Coprinus comatus* (LI *et al.*, 2014). Esta molécula além de ser um carboidrato de reserva, pode atuar como um protetor eficaz contra vários tipos de estresse, como temperaturas extremas, estresse osmótico e radiação (WANNET *et al.*, 1998), podendo estes efeitos serem resultantes da estabilização de proteínas e da membrana lipídica exercida pela molécula de trealose (RICHARDS *et al.*, 2002).

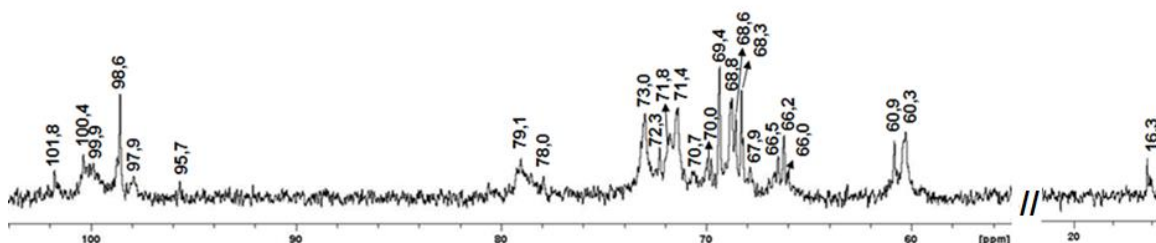
FIGURA 14- FIGURA REPRESENTATIVA DA MOLÉCULA DE TREALOSE.



FONTE: NELSON; COX (2014).

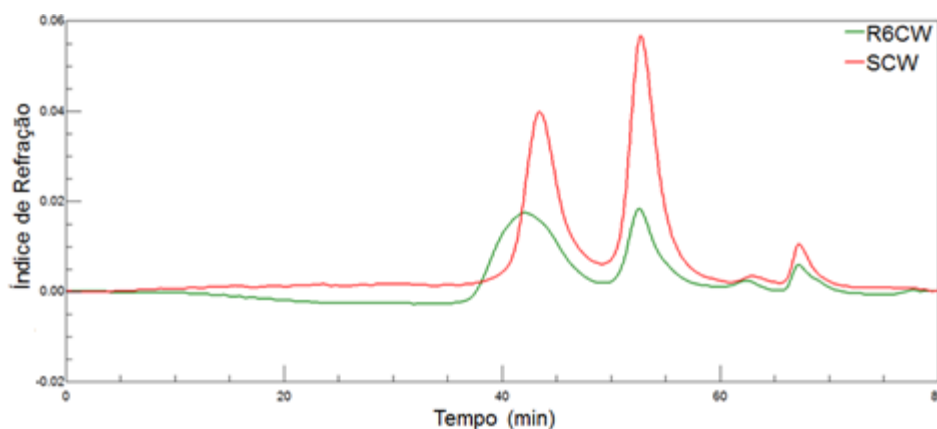
A fração retida na diálise (R6CW; 4,05%) apresentou ser composta principalmente por glucose, seguido de galactose, manose e fucose (TABELA 3, p. 60). O espectro de RMN-<sup>13</sup>C desta fração (figura 15) apresentou vários sinais na região anomérica, sendo em  $\delta$  98,6 e  $\delta$  97,9 correspondente ao carbono anomérico da  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015). O sinal em  $\delta$  101,8 pode ser correspondente a  $\beta$ -D-Manp (KOMURA, 2009) ou a  $\alpha$ -L-Fucp (RUTHES *et al.*, 2012). O sinal em  $\delta$  16,2 corresponde ao CH<sub>3</sub> da fucose (KOMURA *et al.*, 2010). Além disso, o espectro evidencia a presença de uma  $\alpha$ -D-glucana ligada (1 $\rightarrow$ 4), com ramificação em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-Glcp (glicogênio), indicado pelos sinais na região anomérica em  $\delta$  100,4 e 99,9, correspondente à  $\alpha$ -D-Glcp e em  $\delta$  79,1, referente ao C-4 das unidades de  $\alpha$ -D-Glcp 4-O-substituídas (SMIDERLE *et al.*, 2010). As inversões dos sinais no experimento de RMN-DEPT (dado não apresentado) na região de  $\delta$  65-66 confirmaram a substituição em O-6 (RUTHES *et al.*, 2013b).

FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO R6CW SOLUBILIZADA EM ME<sub>2</sub>SO-D<sub>6</sub>.



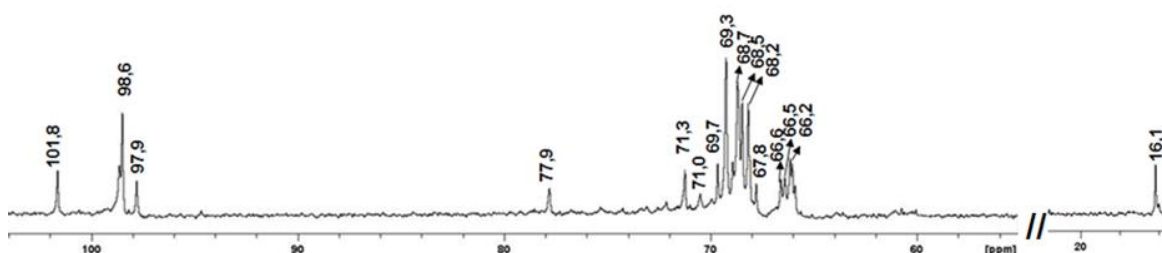
Esta fração resultou em um perfil de eluição heterogêneo quando analisada em HPSEC-RI (figura 16), apresentando dois picos eluídos em diferentes tempos (~43 min e ~53 min), indicando a presença de mais de uma molécula na fração e a necessidade de mais procedimentos de purificação. Como os sinais observados no RMN-<sup>13</sup>C indicaram a presença de  $\alpha$ -D-glucana ligada (1 $\rightarrow$ 4) e, sabendo-se que o estoque de energia dos fungos é o glicogênio, optou-se pelo tratamento da fração R6CW com  $\alpha$ -amilase (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). O material tratado ( $\alpha$ -R6CW) foi submetido ao processo de congelamento e degelo, originando uma fração solúvel (SCW) e uma fração insolúvel (ICW).

FIGURA 16- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES R6CW (LINHA VERDE) E SCW (LINHA VERMELHA), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.



A fração solúvel (SCW; 2,01%) apresentou principalmente galactose em sua composição, contendo ainda glucose residual, seguido de fucose e manose (TABELA 3, p. 60). O espectro de RMN-<sup>13</sup>C desta fração (figura 17) apresentou sinais mais definidos na região anomérica em  $\delta$  98,6 e 97,9, referente a  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015) e em  $\delta$  101,8, que pode ser correspondente a  $\beta$ -D-Manp (KOMURA, 2009) ou a  $\alpha$ -L-Fucp (RUTHES *et al.*, 2012). O sinal em  $\delta$  16,2 corresponde ao CH<sub>3</sub> da fucose (KOMURA *et al.*, 2010).

FIGURA 17- ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO SCW SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>.



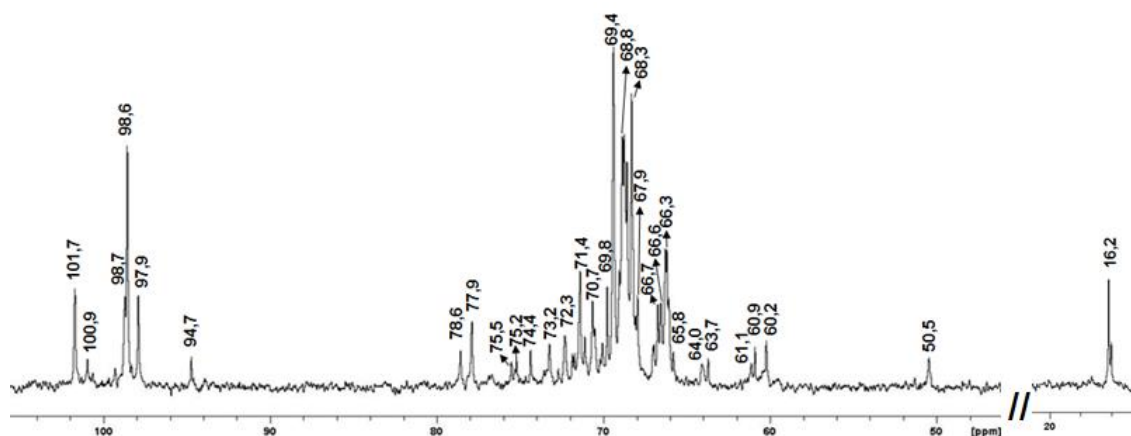
A fração SCW apresentou um perfil de eluição ainda heterogêneo quando analisada em HPSEC-RI (figura 16), com a presença de dois picos (em ~43 min e ~53 min), no entanto, o pico em ~43 min apresentou base mais estreita, quando comparado à fração R6CW, indicando que ocorreu uma purificação parcial. Considerando a diferença no peso molecular evidenciada



na análise de HPSEC-RI, a fração SCW foi submetida a diálise contra água destilada utilizando membrana com limite de exclusão de 1.000 kDa.

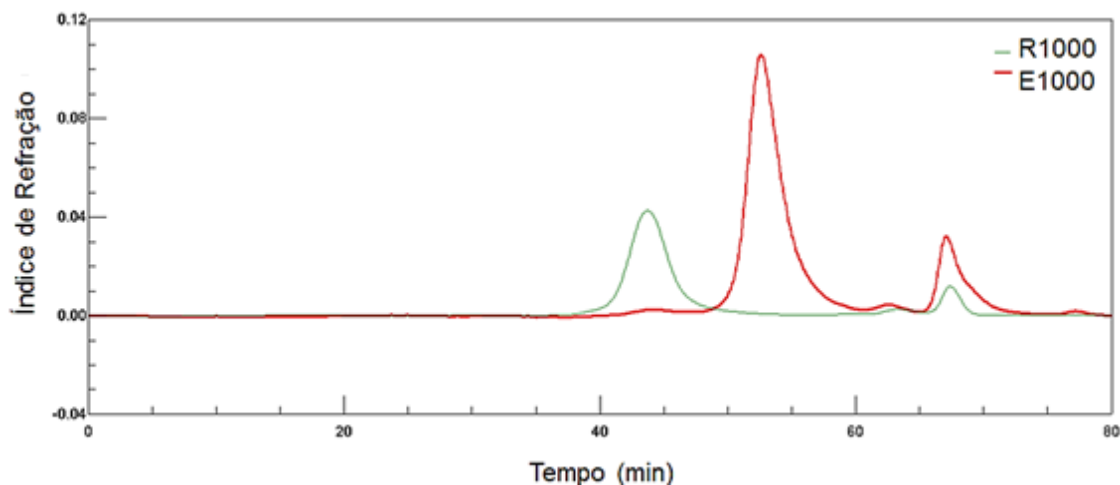
A fração retida na diálise (R1000; 0,77%), apresentou principalmente galactose em sua composição, seguido de fucose, glucose e manose (TABELA 3, p. 60). A análise de RMN-<sup>13</sup>C (figura 18), apresentou sinais na região anomérica em  $\delta$  101,7; 100,9 e 98,7/ 98,6/ 97,9, correspondente às unidades de  $\beta$ -D-Manp (KOMURA, 2009) e/ou  $\alpha$ -L-Fucp (RUTHES *et al.*, 2012),  $\alpha$ -D-Glcp (SMIDERLE *et al.*, 2010) e  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015), respectivamente.

FIGURA 18- ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO R1000 SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>.



O perfil de eluição desta fração em HPSEC-RI apresentou um único pico (figura 19), entretanto os resultados de RMN-<sup>13</sup>C sugerem que esta amostra pode ser composta por mais de um polímero de massa molar semelhante que eluem ao mesmo tempo na coluna de HPSEC-RI, entretanto, análise de metilação deve ser realizada para confirmar esta hipótese.

FIGURA 19- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES R1000 (LINHA VERDE) E E1000 (LINHA VERMELHA), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.



A fração eluída na diálise (E1000; 0,76%) apresentou apenas galactose e fucose em sua composição (TABELA 3, p. 60). A análise desta fração em HPSEC-RI resultou em um perfil de eluição homogêneo contendo apenas um pico em ~53 min (figura 19), com uma massa molar estimada em  $14,2 \times 10^3$  g/mol.

A análise de metilação da fração pura E1000 (tabela 4) resultou em derivados compatíveis com uma fucogalactana contendo uma cadeia principal composta por D-Galp ligada-(1→6), ramificada na posição O-2 por terminais não redutores de L-Fucp a cada 2 ou 3 unidades de D-Galp.

TABELA 4 - ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS FORMADOS NA METILAÇÃO DA FRAÇÃO E1000.

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	(mol%) <sup>b</sup>	Tipo de ligação <sup>c</sup>
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fucp	20,7	Fucp-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Galp	1,4	Galp-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Galp	56,0	6→)-Galp-(1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Galp	21,9	2,6→)-Galp-(1→

<sup>a</sup> Analisado pro CG-EM depois da metilação, hidrólise ácida total, redução com NABD<sub>4</sub> e acetilação.

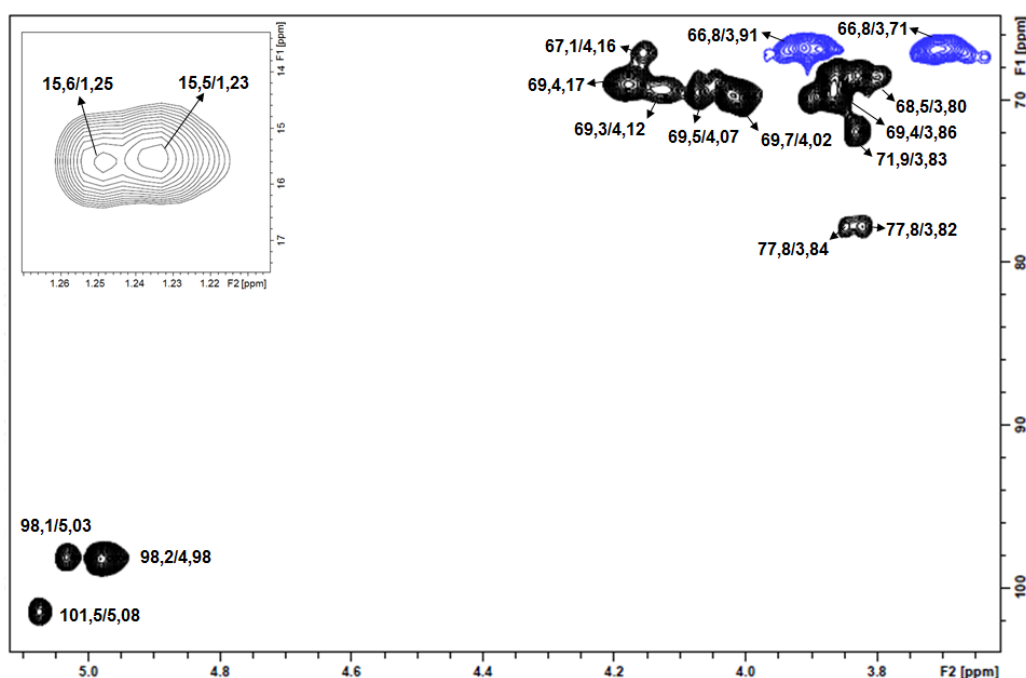
<sup>b</sup> % da área relativa do pico para a área total dos picos.

<sup>c</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

Esta fração foi analisada por HSQC-DEPT (figura 20), apresentando sinais na região anomérica em  $\delta$  101,5/5,08, 98,2/4,98 e 98,1/5,03, correspondentes a unidades de  $\alpha$ -L-Fucp,  $\alpha$ -D-Galp-6-O e 2,6-di-O substituídas,

respectivamente. A substituição em O-2 das unidades de 2,6 $\rightarrow$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  foi confirmada pelos sinais em  $\delta$  77,8/3,84 e 77,8/3,82 . Os sinais em  $\delta$  15,6/1,25 e 15,5/1,23 são correspondentes ao CH<sub>3</sub> da fucose. Os sinais invertidos em  $\delta$  66,8/3,91 e 66,8/3,71 confirmam a substituição em O-6 (KOMURA *et al.*, 2010; RUTHES *et al.*, 2012).

FIGURA 20- ESPECTRO DE HSQC-DEPT A 70°C DA FRAÇÃO E1000 SOLUBILIZADA EM D<sub>2</sub>O.

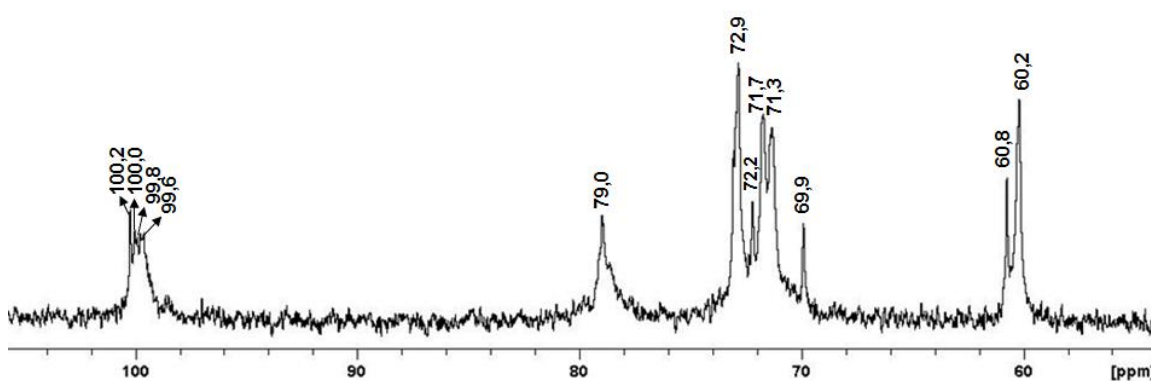


Fucogalactanas com semelhantes características estruturais já foram obtidas de outros cogumelos, como *Coprinus comatus* (FAN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2013) e *Hericium erinaceus* (ZHANG *et al.*, 2006). Outras fucogalactanas com diferentes graus de ramificação, contendo galactose também como unidades de ramificação e/ou naturalmente metiladas, foram relatadas para basidiomicetos por outros autores (MIZUNO *et al.*, 2000; KOMURA *et al.*, 2010; RUTHES *et al.*, 2012; RUTHES *et al.*, 2013a). As estruturas químicas destas moléculas encontram-se detalhadas na tabela 2, p. 36.

Uma alíquota (1,0 g) da fração R6CW foi reservada para o tratamento de Fehling, que gerou as frações precipitada (PFR6) e sobrenadante (SFR6) do tratamento. A fração precipitada não foi utilizada neste trabalho. A fração sobrenadante, por sua vez, apresentou principalmente glucose em sua

composição monossacarídica (TABELA 3, p. 60). A análise de RMN-<sup>13</sup>C (figura 21) apresentou sinais na região anomérica em  $\delta$  100,4; 100,0; 99,8 e 99,6 correspondentes ao C-1 de  $\alpha$ -D-Glcp, em  $\delta$  79,1, referente às substituições em O-4 destas unidades e em  $\delta$  69,9 e 60,8/60,2 correspondentes ao CH<sub>2</sub> substituído e CH<sub>2</sub> livre das mesmas (SMIDERLE *et al.*, 2010). Estes sinais evidenciam a presença de uma  $\alpha$ -D-glucana ligada (1 $\rightarrow$ 4), com ramificação em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-Glcp, características do glicogênio.

FIGURA 21- ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO SFR6 SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>.

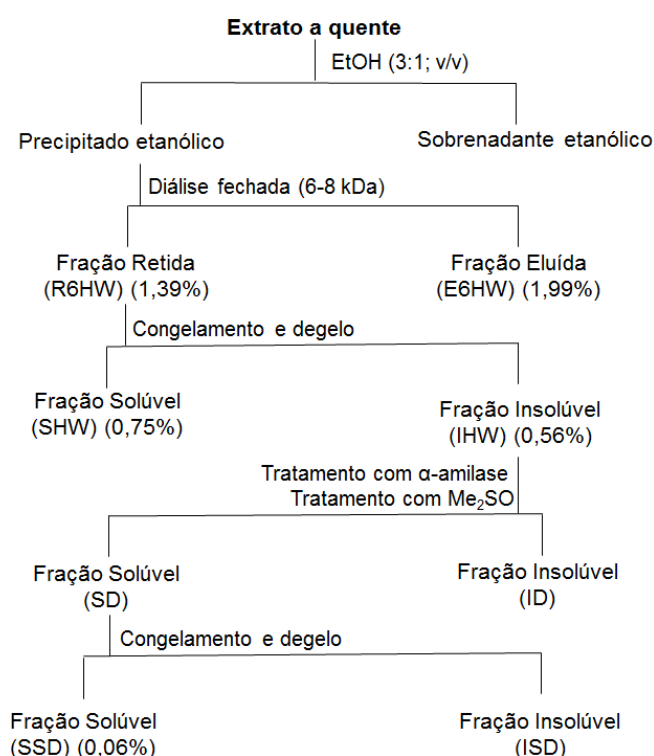


O glicogênio é um polímero de reserva comumente encontrado em cogumelos (KOZARSKI *et al.*, 2011; KALAĈ, 2013; SÁNCHEZ, 2017). Sua porcentagem varia conforme a fase de maturação do basidiomiceto (JIRJIS; MOORE, 1976; LAU; ABDULLAH, 2017), com as condições ambientais e nutricionais (RÚA *et al.*, 1993), variando também de espécie para espécie. A quantidade de glicogênio relatada para *Agaricus bisporus* foi entre 2-4% do peso seco no estágio imaturo e 5-8% no estágio maduro (HAMMOND; NICHOLS, 1976), em 15,6% para *Tricholoma portentosum* (DIÉZ; ALVARES, 2001) e 10,6% para *Tricholoma terreum* (DIÉZ; ALVARES, 2001). A fração composta por glicogênio, SFR6, corresponde a 2,1% do peso seco de *M. titans*. Além desta fração, o glicogênio foi encontrado como “contaminante” em frações do extrato aquoso a quente e no extrato alcalino, que serão descritos na sequência.

## 5.2 EXTRAÇÃO COM ÁGUA FERVENTE

O resíduo do processo de extração a frio (resíduo II), foi submetido à extração com água fervente (~98°C, 6h, 3x). O extrato obtido foi fracionado conforme esquematizado na figura 22.

FIGURA 22- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO COM ÁGUA FERVENTE.



O extrato aquoso a quente obtido foi inicialmente precipitado com etanol (3:1, v/v). O precipitado resultante foi dialisado contra água destilada em sistema fechado utilizando membrana de limite de exclusão entre 6 e 8 kDa, originando as frações R6HW e E6HW.

A fração E6HW apresentou principalmente glucose como monossacarídeo constituinte, seguido de galactose, manose, ramnose, fucose, arabinose e xilose (TABELA 5).

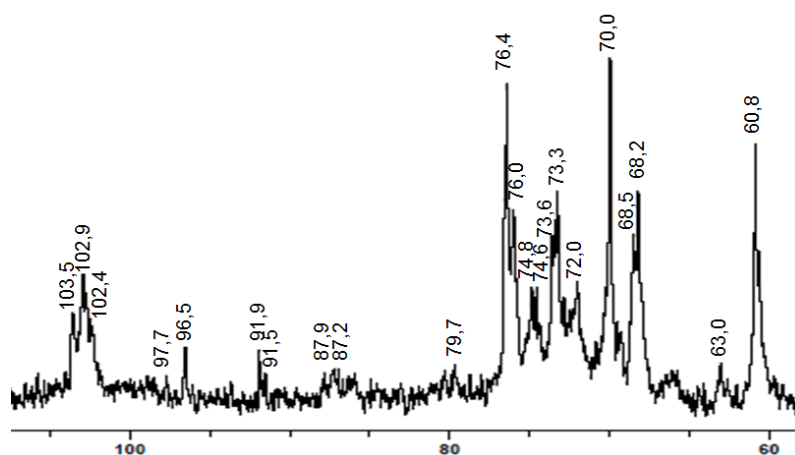
TABELA 5 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO A QUENTE DE *Macrocybe titans*.

Fração	Composição (%) <sup>a</sup>							Rendimento <sup>b</sup> (%)
	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Glc	Gal	
E6HW	2,7	1,6	1,5	0,4	7,6	74,1	12,1	1,99
R6HW	—	2,5	1,2	1,2	7,6	70,2	17,3	1,39
SHW	—	0,7	0,2	0,6	14,3	72,7	11,5	0,75
IHW	—	—	—	—	21,3	56,1	22,6	0,56
SSD	—	4,6	2,2	1,9	17,2	39,6	34,5	0,06

<sup>a</sup> Acetatos de alditóis obtidos após hidrólise, redução com NaBH<sub>4</sub> e acetilação.

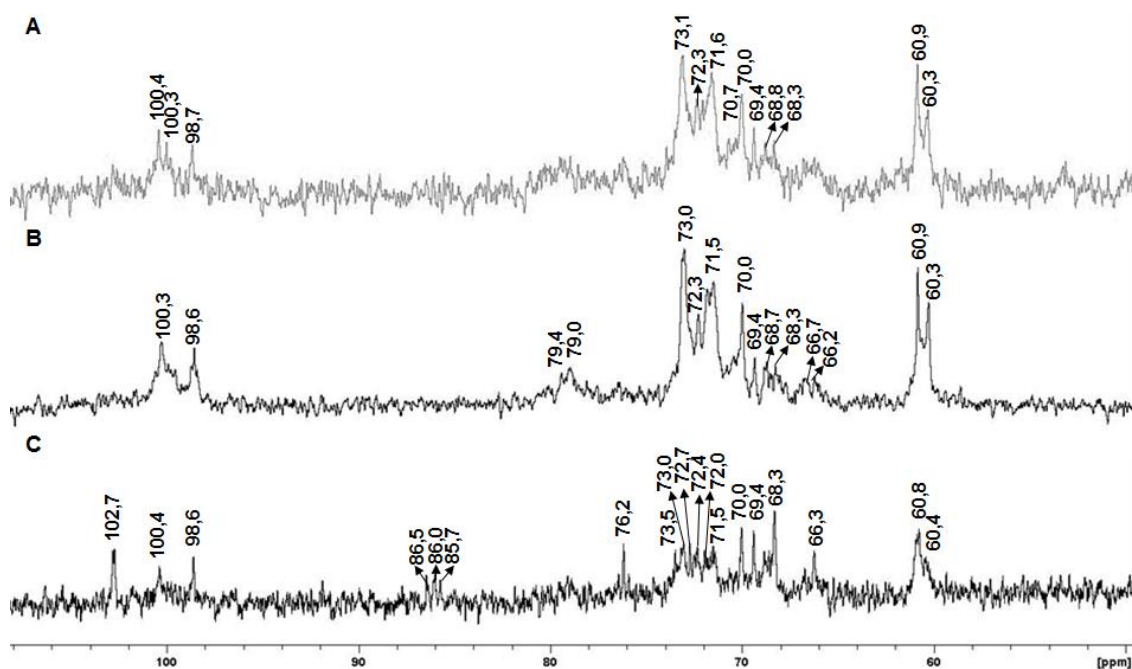
<sup>b</sup> Percentual relativo ao cogumelo seco (300g).

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C desta fração (FIGURA 23) apresentou predominantemente sinais na região anomérica  $\delta$  103,5; 102,9; e 102,4, referentes ao C-1 em configuração  $\beta$ , bem como sinais em  $\delta$  87,2 e 87,9, que pode ser atribuído ao C3 substituído, sugerindo a presença de uma  $\beta$ -glucana ligada (1 $\rightarrow$ 3) (CARBONERO *et al.*, 2012). No entanto, esta fração requer outras etapas de purificação e análises químicas para confirmar esta hipótese.

FIGURA 23- ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO E6HW SOLUBILIZADA EM D<sub>2</sub>O.

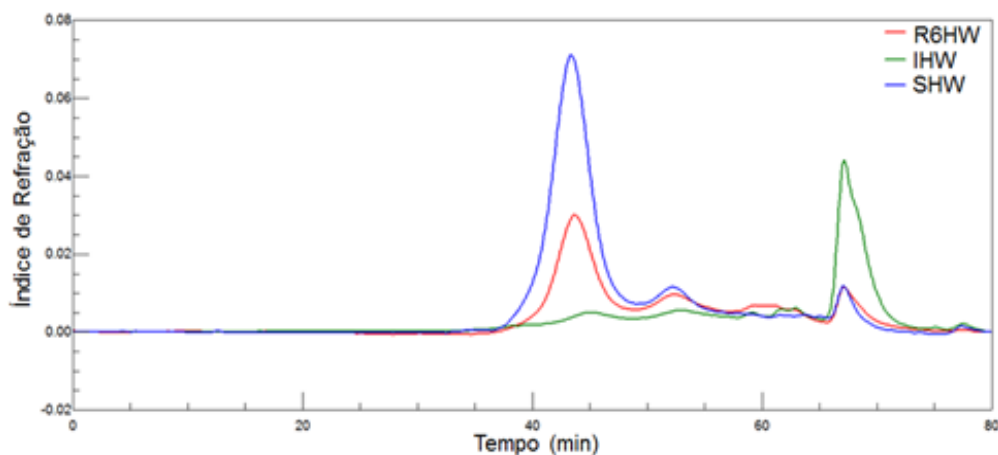
A fração R6HW apresentou principalmente glucose, seguido de galactose, manose, xilose e arabinose (TABELA 5, p. 69). A análise de RMN-<sup>13</sup>C (figura 24A) desta fração, apresentou principalmente sinais referentes a um polissacarídeo em configuração  $\alpha$ , com a predominância do sinal do carbono anomérico em  $\delta$  100,4 e 100,3 (possivelmente glicogênio) (SMIDERLE *et al.*, 2010) e em 98,7, correspondente a  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015).

FIGURA 24- (A) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO R6HW SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. (B) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO SHW SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. (C) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO IHW SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>.



O perfil de eluição em HPSEC-RI (figura 25) de R6HW mostrou-se heterogêneo, confirmando a presença de moléculas de diferentes massas nesta fração, sendo requeridas novas etapas de fracionamento. Esta fração foi então submetida ao processo de congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984), originando as frações solúvel (SHW) e insolúvel (IHW).

FIGURA 25- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES R6HW (LINHA VERMELHA); IHW (LINHA VERDE) E SHW (LINHA AZUL), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.



A fração SHW apresentou glucose em maior quantidade, seguido de manose e galactose (TABELA 5, p. 69). Esta fração foi analisada por RMN-<sup>13</sup>C (figura 24B) e apresentou sinais na região anomérica em  $\delta$  100,3, correspondente a  $\alpha$ -D-Glcp (SMIDERLE *et al.*, 2010) e em  $\delta$  98,6, referente a  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015). Os sinais em  $\delta$  79,4 e 79,0 sugerem substituição em O-4 das unidades  $\alpha$ -D-Glcp (SMIDERLE *et al.*, 2010). O espectro não apresentou sinais de  $\beta$ -D-Glcp, com isto podemos sugerir que a glucose presente nesta fração (72,7%) é proveniente do glicogênio, o que corresponde a 0,54% do peso total do fungo seco. Seu perfil de eluição permaneceu com os mesmos picos provenientes da fração anterior, com maior concentração do pico referente ao glicogênio que eluiu em ~40 min (figura 25). Como este polímero de reserva não é a molécula de interesse, optou-se por não seguir com a purificação desta fração.

A fração IHW continha principalmente glucose, galactose e manose em sua composição (TABELA 5, p. 69). A análise de RMN-<sup>13</sup>C (figura 24C) desta fração, mostrou sinais na região anomérica em  $\delta$  102,7, correspondente a  $\beta$ -D-Glcp (CARBONERO *et al.*, 2012), em  $\delta$  100,4, referente a  $\alpha$ -D-Glcp, possivelmente glicogênio (SMIDERLE *et al.*, 2010) e em  $\delta$  98,6, relativo à  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015). Os sinais em  $\delta$  86,5, 86,0 e 85,7, indicam a presença de polissacarídeo com unidades 3-O-substituídas, possivelmente uma glucana com cadeia principal ligada (1→3) (MORENO *et al.*, 2016). Esta fração não apresentou picos definidos quando analisada em HPSEC-RI, possivelmente devido a sua insolubilidade no solvente utilizado (FIGURA 25). Visando obter a  $\beta$ -glucana isolada e considerando a presença de glicogênio nesta fração, esta amostra foi inicialmente tratada com  $\alpha$ -amilase. O material tratado ( $\alpha$ -IHW) era insolúvel e devido a isto, esta fração foi submetida ao tratamento com Me<sub>2</sub>SO, obtendo-se uma fração solúvel (SD) e insolúvel (ID) em Me<sub>2</sub>SO. A fração solúvel foi submetida ao processo de congelamento e degelo, originando as frações solúvel (SSD) e insolúvel (ISD).

A fração SSD apresentou principalmente glucose, entretanto ainda com altos teores de galactose e manose (TABELA 5, p. 69). Sua análise de HSQC-DEPT (figura 26) apresentou sinais na região anomérica em  $\delta$  102,7/4,71 e 102,9/4,51, correspondentes a  $\beta$ -D-Glcp (CARBONERO *et al.*, 2012), em  $\delta$



101,5/5,07, referente a  $\beta$ -D-Manp (KOMURA, 2009) ou  $\alpha$ -L-Fucp (RUTHES *et al.*, 2012), e em  $\delta$  98,0/5,04 e 98,2/4,99, relativos a  $\alpha$ -D-Galp (SILVEIRA *et al.*, 2015). A análise desta fração em HPSEC-RI (figura 27) resultou em um perfil de eluição heterogêneo. Estes dados indicam que os processos de separação aplicados até o momento não foram suficientes para purificar as moléculas obtidas, sendo necessária a realização de outras etapas de purificação, para posterior caracterização química e avaliação dos efeitos biológicos das moléculas isoladas.

FIGURA 26- ESPECTRO DE HSQC-DEPT A 70°C DA FRAÇÃO SSD SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>.

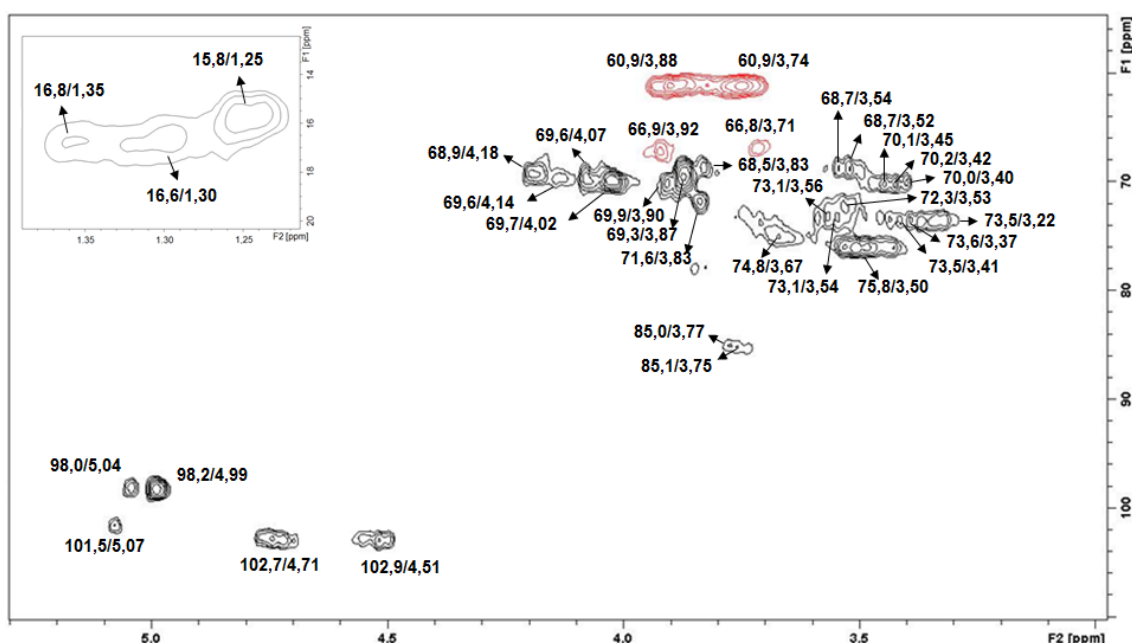
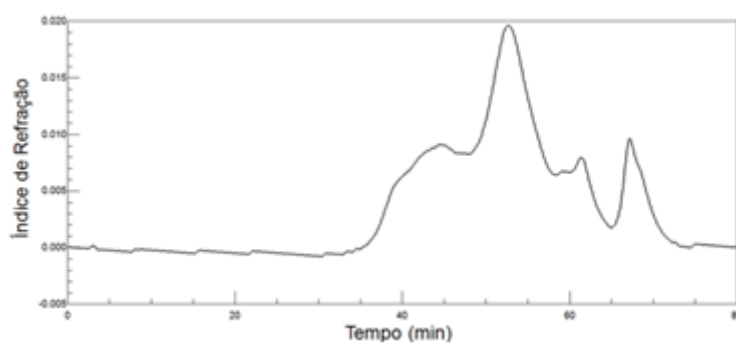


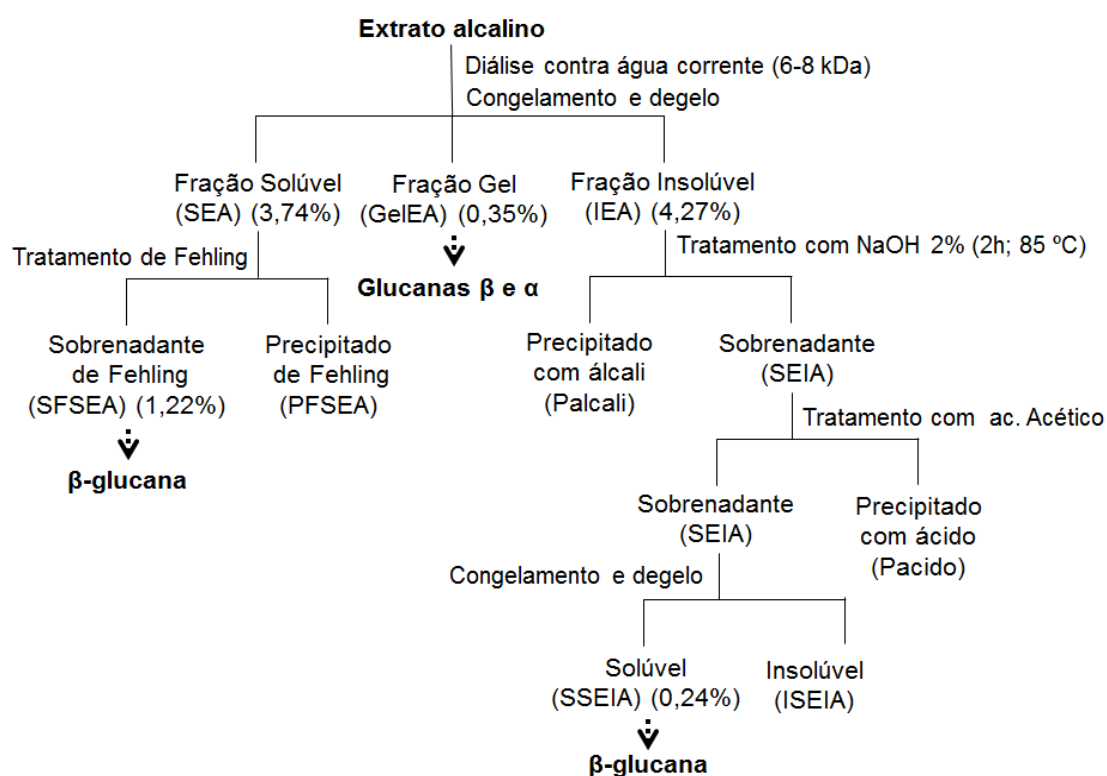
FIGURA 27- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DA FRAÇÃO SSD, SOLUBILIZADA EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.



### 5.3 EXTRAÇÃO ALCALINA

O resíduo do processo de extração com água fervente (resíduo III), foi submetido a extração com NaOH 2% (~96°C, 6h, 3x). O extrato obtido foi fracionado conforme esquema da figura 28.

FIGURA 28- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO OBTIDO COM NaOH 2%



Inicialmente, o extrato alcalino foi neutralizado e posteriormente dialisado contra água corrente (6-8 kDa) para a remoção dos sais. O material dialisado, denominado EA, apresentou-se composto majoritariamente por glucose (TABELA 6).

TABELA 6 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO ALCALINO DE *Macrocybe titans*.

Fração	Composição (%) <sup>a</sup>						Rendimento <sup>b</sup> (%)
	Fuc	Ara	Xil	Man	Glc	Gal	
EA	0,8	1,4	4,0	8,1	80,2	5,5	9,05
SEA	0,7	1,3	0,6	8,7	82,9	5,8	3,74
IEA	1,2	1,6	6,8	6,0	25,9	58,5	4,27
GeIEA	0,3	1,2	1,0	2,4	87,8	7,3	0,35
SFSEA	—	—	—	0,5	93,2	6,3	1,22
SSIEA	1,0	1,2	5,3	9,2	81,2	2,1	0,24

<sup>a</sup> Acetatos de alditéis obtidos após hidrólise, redução com NaBH<sub>4</sub> e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo ao cogumelo seco (300g).

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (figura 29A) da fração EA apresentou sinais na região anomérica em  $\delta$  103,0 e 102,7 indicando a presença de  $\beta$ -D-Glcp (CARBONERO *et al.*, 2012), em  $\delta$  101,4, referente à  $\beta$ -D-Manp (KOMURA, 2009) e em  $\delta$  99,5, relativos à  $\alpha$ -D-Glcp (SMIDERLE *et al.*, 2010). A análise desta amostra em HPSEC-RI resultou em um perfil de eluição heterogêneo (figura 30), indicando a necessidade de novas etapas de purificação. Devido a isto, a mesma foi submetida ao processo de congelamento e degelo. Durante a etapa de centrifugação, realizada para separar a fração solúvel (SEA) da fração insolúvel (IEA), foi observada a formação de uma fase intermediária com consistência de gel, a qual foi separada das demais e denominada GeIEA.

FIGURA 29- (A) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO EA SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. (B) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO SEA SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>.

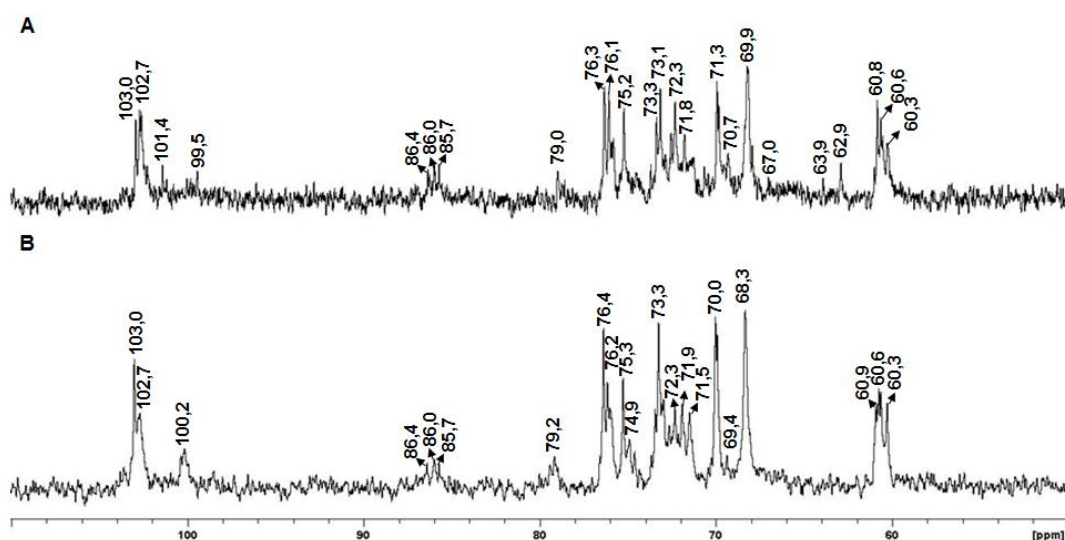
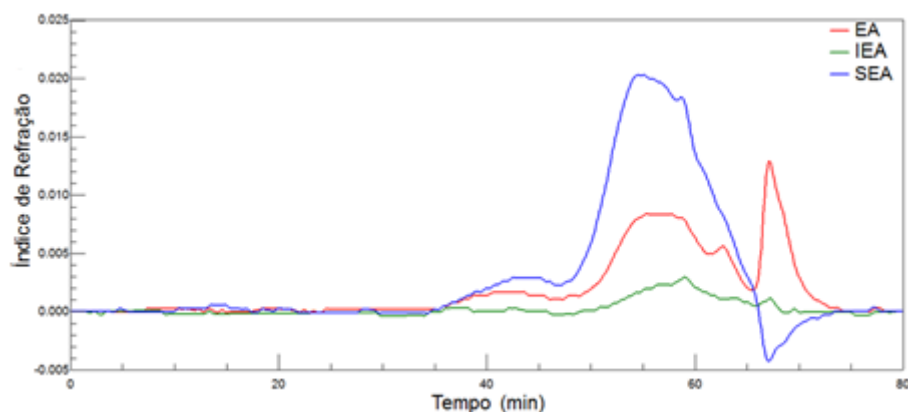


FIGURA 30- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DAS FRAÇÕES EA (LINHA VERMELHA), IEA (LINHA VERDE) E SEA (LINHA AZUL), SOLUBILIZADAS EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.

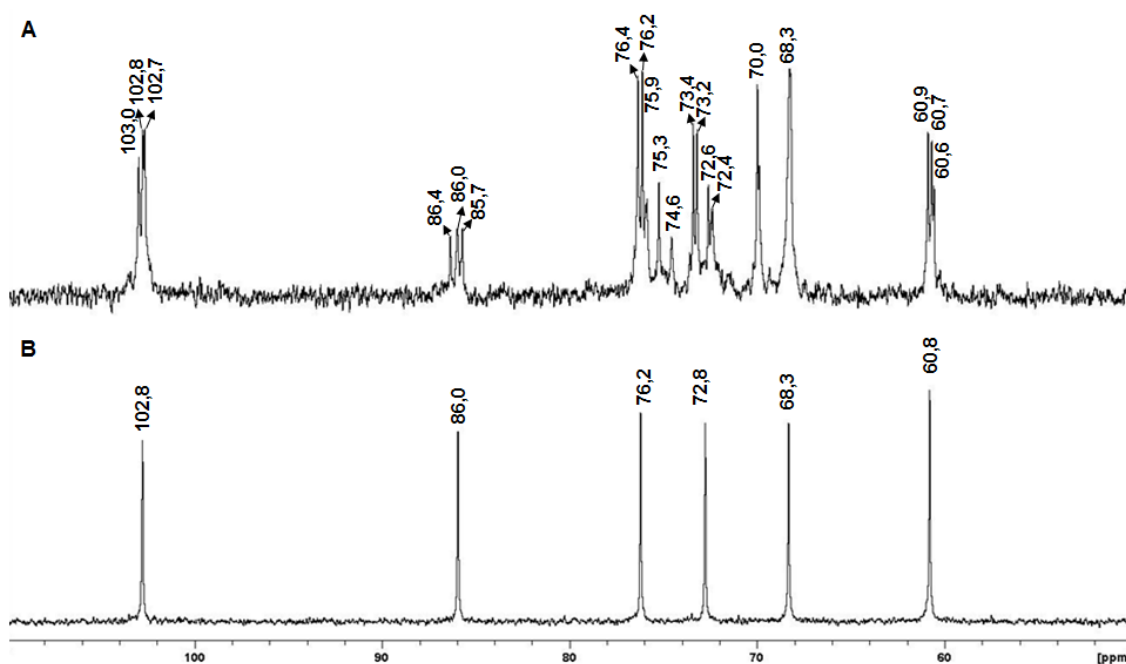


A fração solúvel, SEA, apresentou mais de 80% de glucose (TABELA 6 p. 74) e, ao ser analisada por RMN-<sup>13</sup>C (figura 29B), a mesma apresentou sinais bastante semelhantes ao da fração anterior, com exceção da ausência do sinal em  $\delta$  101,4. Como seu perfil de eluição em HPSEC-RI (figura 30) foi heterogêneo, SEA foi submetida ao tratamento com solução de Fehling, originando a fração sobrenadante de Fehling (SFSEA) e precipitado de Fehling (PFSEA). Durante a diálise destas frações observou-se a formação de um precipitado dentro da membrana contendo a fração solúvel em Fehling (SFSEA), devido a isto, a amostra foi centrifugada para obter o material precipitado (PSEA). A fração precipitada no Fehling (PFSEA) e precipitado na membrana (PSEA) apresentaram um baixo rendimento (0,04%) e portanto não foram utilizadas no presente trabalho.

O sobrenadante de Fehling, SFSEA, apresentou mais de 90% de glucose (TABELA 6, p. 74). Seu espectro de RMN-<sup>13</sup>C (figura 31A) mostrou sinais bem definidos em comparação às frações anteriores, sendo os sinais na região anomérica em  $\delta$  103,0, 102,8 e 102,7, correspondentes ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp. Os sinais em  $\delta$  86,4, 86,0 e 85,7, indicam a presença de unidades  $\beta$ -D-Glcp substituídas em O-3. Também foram observados sinais de CH<sub>2</sub> livre em  $\delta$  60,9, 60,7 e 60,6 e CH<sub>2</sub> substituído em  $\delta$  68,3 (MORENO *et al.*, 2016). Visando elucidar a cadeia principal desta molécula, uma alíquota desta fração foi utilizada para realizar a degradação controlada de Smith. O material resistente à degradação foi analisado por RMN-<sup>13</sup>C (figura 31B) e apresentou

apenas seis sinais referentes à cadeia principal de  $\beta$ -D-Glcp ligada (1 $\rightarrow$ 3):  $\delta$  102,8 (C-1); 86,0 (C-3); 76,2 (C-5); 72,8 (C-2); 68,3 (C-4) e 60,8 (C-6). Estes sinais quando comparados com dados apresentados na literatura (CARBONERO *et al.*, 2012; SOVRANI *et al.*, 2016; MORENO *et al.*, 2016), indicam a presença de uma  $\beta$ -glucana ligada (1 $\rightarrow$ 3), com ramificações em O-6 por unidades de  $\beta$ -D-Glcp. Análise de metilação é necessária para avaliar como estão ocorrendo as ramificações.

FIGURA 31- (A) ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  A 70°C DA FRAÇÃO SFSEA SOLUBILIZADA EM  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ . (B) ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  A 70°C DO MATERIAL RESISTENTE NA DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO SFSEA, SOLUBILIZADO EM  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ .



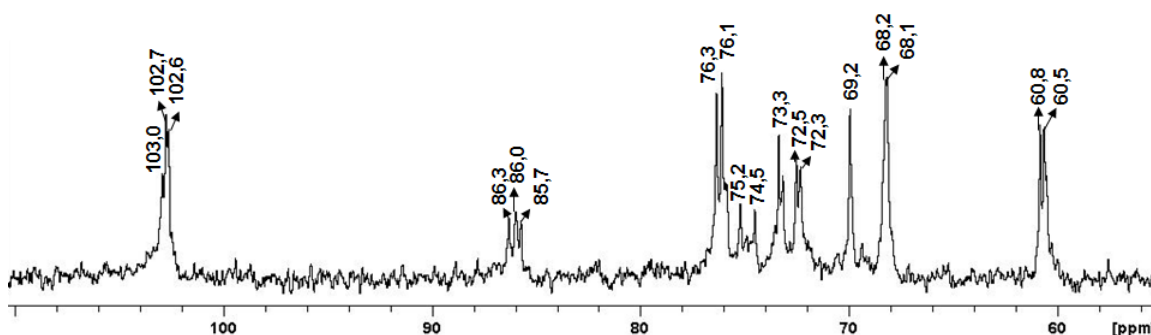
Diversas glucanas com esta estrutura foram obtidas de diferentes espécies de cogumelos, como *Pleurotus pulmonarius* (SMIDERLE *et al.*, 2008), *Lentinus edodes* (ZHANG *et al.*, 2011), *Amanita muscaria* (RUTHES *et al.*, 2013a) e *Cookeina tricholoma* (MORENO *et al.*, 2016). Estas moléculas variam quanto ao seu grau de ramificação e comprimento das cadeias laterais, que podem ser compostas por mono ou oligossacarídeos (tabela 1, p. 33), além de possuírem diferentes massas moleculares.

A fração insolúvel no processo de congelamento e degelo (IEA) por sua vez, apresentou alto teor de galactose (TABELA 6, p. 74). Devido a alta insolubilidade, esta fração foi submetida ao tratamento com NaOH 2%,

originando um material precipitado (Pacali) e um material sobrenadante. O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético, originando a fração sobrenadante do tratamento (SIEA), a fração precipitada com ácido (Pacido). As frações precipitadas não foram estudadas no presente trabalho. A fração SIEA, por sua vez, foi submetida ao processo de congelamento e degelo, originando uma fração solúvel (SSIEA) e uma fração insolúvel (ISIEA).

A fração solúvel apresentou principalmente glucose em sua composição (TABELA 6, p. 74). A análise de RMN-<sup>13</sup>C (figura 32) desta fração mostrou um espectro com sinais característicos de β-glucana ligada (1→3). Foram observados sinais na região anomérica em δ 103,0, 102,7 e 102,6, correspondentes a β-D-Glcp. Os sinais em δ 86,3, 86,0 e 85,7, indicaram substituição em O-3 e, em δ 68,2 e 68,1, à substituição em O-6 (MORENO *et al.*, 2016). Estes sinais, assim como os da fração SFSEA, mostram a presença de uma β-glucana ligada (1→3), com ramificações em O-6. A degradação controlada de Smith foi realizada para elucidar a cadeia principal e confirmar esta hipótese. O material resistente à degradação foi analisado por RMN-<sup>13</sup>C (dado não apresentado) e apresentou seis sinais: δ 102,7 (C-1); 86,3 (C-3); 76,2 (C-5); 72,7 (C-2); 68,3 (C-4) e 60,8 (C-6), confirmando a estrutura da cadeia principal, β-D-Glcp ligada (1→3) (SOVRANI *et al.*, 2016).

FIGURA 32- (A) ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C A 70°C DA FRAÇÃO SSIEA SOLUBILIZADA EM Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>.



Estes dados corroboram com os resultados obtidos na análise de metilação, que resultou nos derivados 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glcp (21,3%), 2,4-Me<sub>2</sub>-Glcp (21,7%), 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glcp (20,7%) e 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glcp (36,3%). Os resultados propõem que esta β-glucana possui uma cadeia principal ligada (1→3), com

substituições em O-6 por unidades de  $\beta$ -D-Glcp ou cadeias laterais de  $\beta$ -D-Glcp ligadas (1 $\rightarrow$ 6) na proporção de 1:1.

A fração formadora de gel obtida no processo de congelamento e degelo (GelEA), apresentou principalmente glucose, além de pequena proporção de galactose (TABELA 6, p. 74). A análise de RMN- $^{13}\text{C}$  desta fração (figura 33) apresentou sinais na região anomérica referentes a  $\beta$ -D-Glcp e  $\alpha$ -D-Glcp. Também foram observados sinais correspondentes à ligação glicosídica em  $\delta$  86,4, 86,0 e 85,7, indicando a presença de unidades  $\beta$ -D-Glcp ligadas (1 $\rightarrow$ 3) (MORENO *et al.*, 2016) e em  $\delta$  79,7, 79,4 e 79,1, referente à unidades de  $\alpha$ -D-Glcp ligadas (1 $\rightarrow$ 4) (SMIDERLE *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que esta fração é composta principalmente por glucanas  $\alpha$  e  $\beta$ , no entanto, outros experimentos são necessários para elucidar estas estruturas. Esta fração apresentou perfil heterogêneo quando analisada em HPSEC-RI (figura 34), comprovando a presença de mais de uma molécula na amostra.

FIGURA 33- ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  A 70°C DA FRAÇÃO GelEA SOLUBILIZADA EM  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ .

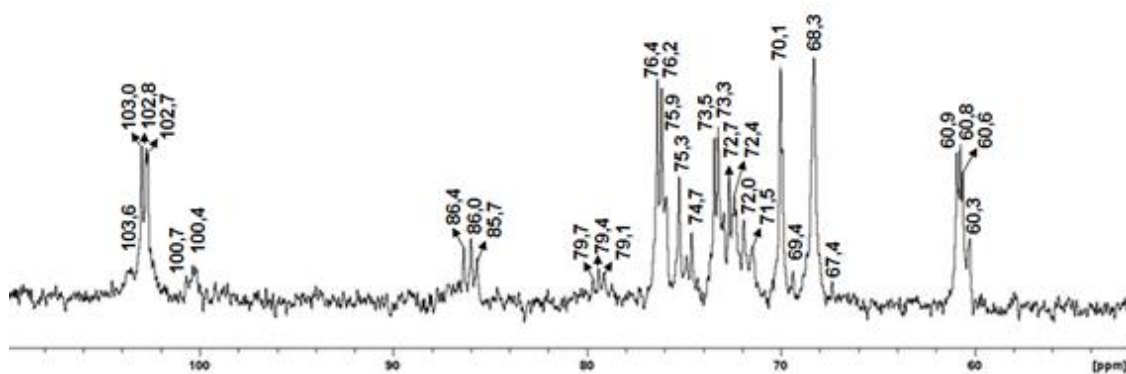
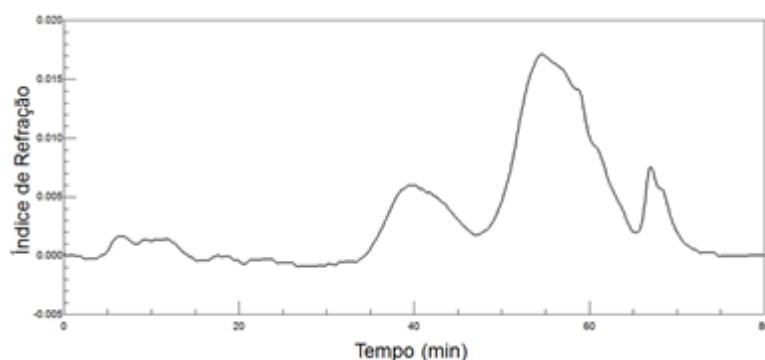


FIGURA 34- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-RI DA FRAÇÃO GelEA, SOLUBILIZADA EM NITRITO DE SÓDIO 0,1 mol/L, CONTENDO AZIDA SÓDICA.



Como citado anteriormente, a fração GeIEA formou uma solução de alta viscosidade semelhante a um gel quando submetida a baixas temperaturas. A exemplo, 10 mg desta amostra foram solubilizados em 500  $\mu$ L de água destilada, sendo o frasco armazenado a 5°C por ~15 min. Nestas condições houve a gelatinização da amostra, conforme pode ser observado na figura 35.

FIGURA 35- FRAÇÃO GeIEA NA CONCENTRAÇÃO DE 20 mg/mL, APÓS SER SUBMETIDA AO RESFRIAMENTO A 5°C.



Glucanas formadoras de gel que apresentam propriedades reológicas promissoras já foram relatadas para cogumelos. Sovrani e colaboradores (2016) obtiveram uma  $\beta$ -glucana ligada (1 $\rightarrow$ 3), ramificada em O-6 por unidades de  $\beta$ -D-Glcp, a qual apresentou comportamento de gel estável na faixa de temperatura testada (5-60°C), demonstrando potencial aplicação na indústria alimentícia, podendo tanto ser utilizada para espessar alimentos, quanto para melhorar a resistência de produtos submetidos a diferentes temperaturas durante seu processamento, armazenamento e/ou transporte. A fração GeIEA será submetida a processos de purificação visando isolar e caracterizar a  $\beta$ -glucana presente nesta amostra. Seu comportamento de formação de gel poderá ser avaliado em estudos reológicos posteriores.



## 5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 5.4.1- Avaliação da viabilidade

A viabilidade das células B16F10 foi avaliada pela sua capacidade de endocitar o corante vermelho neutro, sendo que, quanto maior o número de células viáveis, capazes de realizar endocitose, maior a absorbância obtida na leitura em espectrofotômetro e, ao contrário, quanto menor a absorbância, sugere menor número de células viáveis, uma vez que células mortas não são capazes de realizarem endocitose. Para tanto, as células tumorigênicas foram tratadas com a fração R6CW e com a fucogalactana, nas concentrações de 10, 50, 100 e 250 µg/mL, por períodos de 24h, 48h e 72h de exposição.

A fração oriunda do extrato a frio, R6CW, que contém, além da fucogalactana, uma elevada quantidade de glicogênio (60,8 % de glucose) além de manose (6,2%), foi capaz de aumentar a capacidade endocítica das células B16F10, de forma pontual, nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, com o tempo de tratamento de 48 horas (FIGURA 36A). No entanto, nos outros tempos e concentrações avaliadas não houve alteração, sendo iguais ao controle testado.

Já o tratamento com a fucogalactana (figura 36B) não alterou a capacidade endocítica em nenhuma concentração ou tempo testado. Este comportamento é similar ao de uma manogalactana estudada por Biscaia (2012), em que a mesma não alterou a viabilidade celular em nenhuma condição avaliada. No entanto, embora a manogalactana não tenha provocado a morte celular, a mesma foi capaz de diminuir a invasão celular *in vitro* e quando avaliada *in vivo* (BISCAIA, 2016) resultou na diminuição de 60% do volume tumoral.

Fucogalactanas de cogumelos já foram avaliadas quanto a seu efeito biológico, apresentando atividade antinociceptiva (KOMURA *et al.*, 2010, RUTHES *et al.*, 2012), e apresentando bioatividade sobre célula tumoral (BISCAIA, 2012).

Uma fucogalactana obtida de *Agaricus brasiliensis* (KOMURA *et al.*, 2010), quando avaliada por Biscaia (2012) em células B16F10, foi capaz de reduzir a viabilidade celular apenas na maior dose testada (250 µg/mL) em 24 h

de tratamento. A autora correlaciona a diminuição da viabilidade com o processo de apoptose induzido pela molécula. Além disto, este composto alterou a morfologia celular das células que não morreram pela ação deste polissacarídeo.

De acordo com Zong, Cao e Wang (2012), estudos sugerem que os polissacarídeos podem inibir o crescimento tumoral através dos seguintes mecanismos: (1) a prevenção da tumorigênese pelo consumo oral de polissacarídeos; (2) atividade anticancerígena direta, como a indução da apoptose das células tumorais; (3) atividade de imunopotenciação em combinação com quimioterapia; e (4) a inibição da metástase tumoral. Segundo o autor, vários estudos mostraram que algumas macromoléculas biológicas não tóxicas, incluindo polissacarídeos e complexos de polissacarídeos e proteínas, possuem atividades anticancerígenas ou podem aumentar a eficácia de drogas convencionais de quimioterapia.

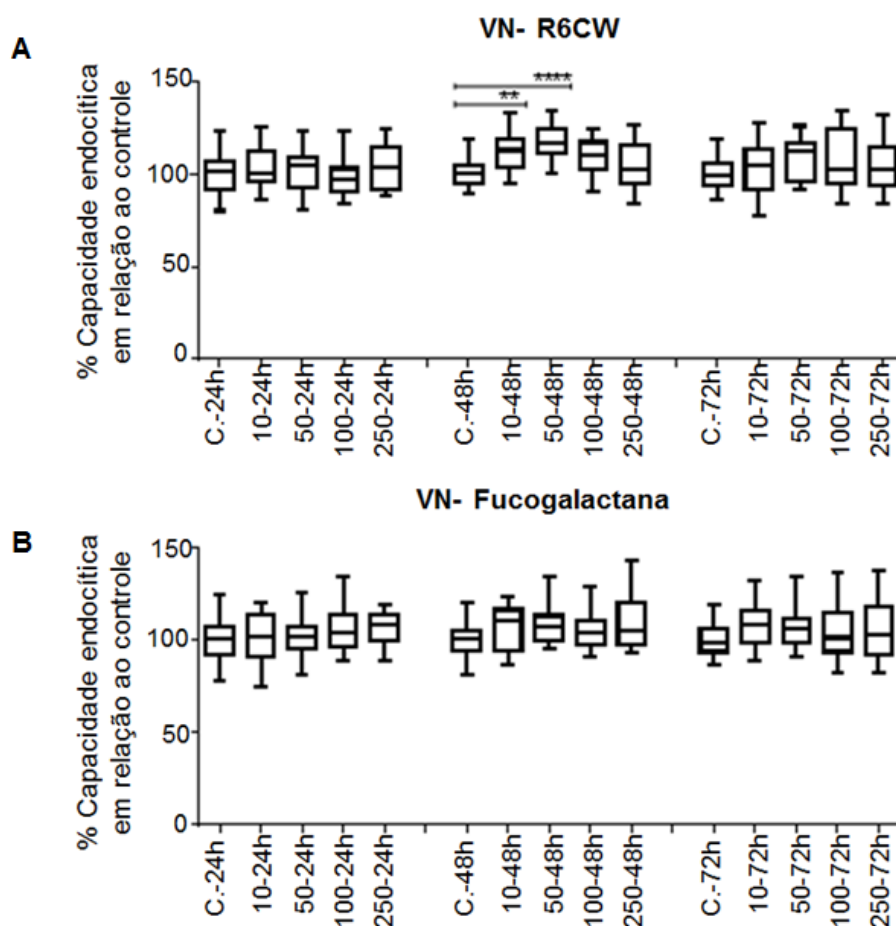
Conforme Kocyigit e colaboradores (2016) os agentes citotóxicos e antitumorais não são seletivos para células tumorais e matam também as células saudáveis do organismo. Devido a isto, a identificação de compostos específicos é uma área de impulso na triagem e descoberta de drogas visando compostos que atuam sobre as células tumorais de forma mais eficiente e seletiva, com efeitos tóxicos mínimos em células normais.

De acordo com Pavlova e Thompson (2016) e Kalyanaraman (2017), o tratamento seletivo pode ser alcançado com compostos que atuem sobre a reprogramação celular, uma vez que existem diferenças entre o metabolismo de células cancerígenas e das células normais, pois as células modificadas sofrem reprogramação metabólica, alterando seu metabolismo de glucose, ácidos graxos e aminoácidos, facilitando o seu desenvolvimento e proliferação, características ausentes em células normais e que podem ser tidos como alvo terapêutico.

Considerando isto, pode ser vantajoso utilizar a fucogalactana purificada quando comparado a fração bruta R6CW, pois a molécula isolada não leva à morte celular, podendo resultar em menores efeitos colaterais quando avaliada *in vivo*. Entretanto, para comprovar esta hipótese, ambas as frações serão avaliadas em outros parâmetros *in vitro*, para verificar se as mesmas são capazes de alterar a reprogramação: morfologia, capacidade de

migração e invasão das células. Sendo estes resultados promissores, as frações serão direcionadas para a realização de experimento *in vivo*.

FIGURA 36- ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR, ATRAVÉS DO MÉTODO DO VERMELHO NEUTRO. AS CÉLULAS B16F10 FORAM EXPOSTAS A FRAÇÃO R6CW (A) E A FUCOGALACTANA (B), NAS CONCENTRAÇÕES DE 10, 50, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 24, 48 OU 72h. ESTES ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM QUADRUPLOCATA, TRÊS VEZES INDEPENDENTES. OS ENSAIOS FORAM SUBMETIDOS À ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E PÓS-TESTE DE TUKEY, DETERMINANDO A SIGNIFICÂNCIA À \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  E \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



#### 5.4.2- Avaliação da proliferação celular

Após a avaliação da viabilidade celular, as células foram avaliadas quanto a sua densidade, relativo a proliferação celular, pelo método de cristal violeta, em que, quanto maior o número de células, maior a absorvância obtida por espectrofotometria, indicando aumento da capacidade proliferativa. Por

outro lado, quanto menor o número de células, menor será a absorvância obtida, sugerindo alteração negativa na capacidade de proliferação.

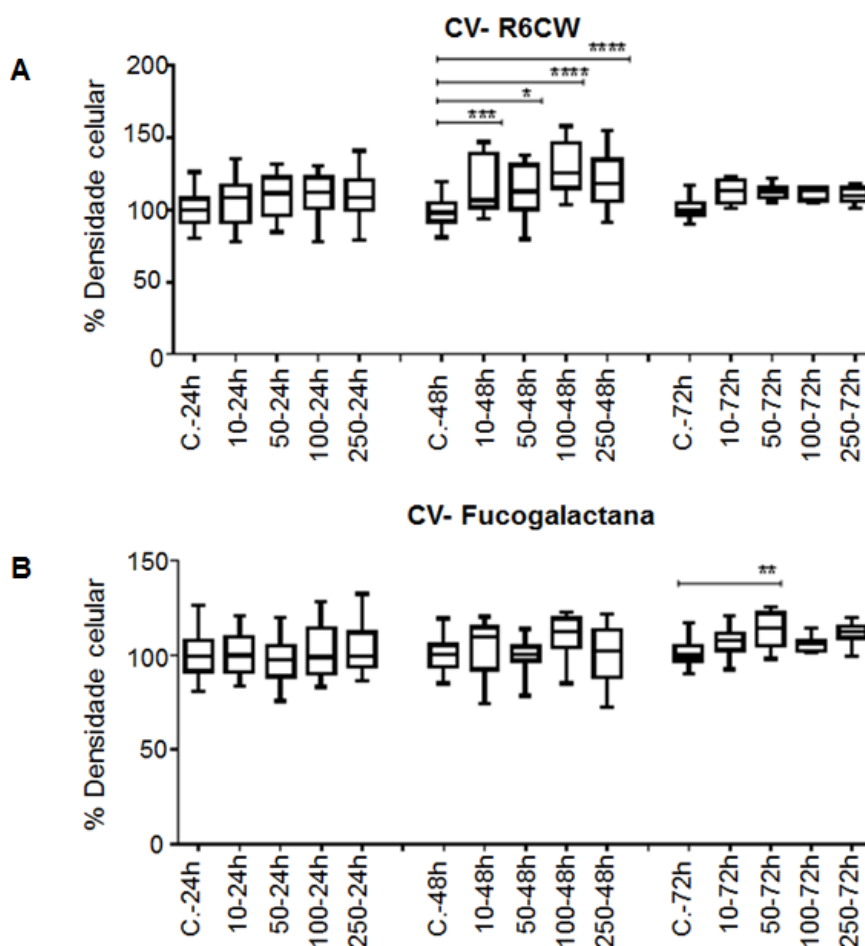
Na figura 37A, demonstra-se que a fração R6CW, provocou aumento da densidade celular no período de 48h de tratamento em todas as concentrações avaliadas (10, 50, 100 e 250 µg/mL).

A fucogalactana, por sua vez, assim como no ensaio de viabilidade, não apresentou o mesmo efeito biológico que a fração bruta R6CW, pois a molécula isolada não causou alteração na proliferação nos tempos de 24 e 48 h. A mesma só mostrou aumento da densidade celular na concentração de 50 µg/mL, quando avaliada por um período de 72 horas. Já as concentrações de 10, 100 e 250 µg/mL não mostraram nenhuma alteração em nenhum tempo testado (FIGURA 37 B). Isto sugere que essas concentrações não ocasionam aumento de proliferação, nem levam à morte celular.

Se por um lado os dados de viabilidade e proliferação celular das células tratadas com a fucogalactana poderiam ser interpretados como resultados negativos, por não apresentar citotoxicidade para a célula tumoral, por outro são extremamente promissores, uma vez que Biscaia (2012) mostrou que uma manogalactana que não alterou a viabilidade e proliferação de células B16F10, foi um potente inibidor do desenvolvimento tumoral *in vivo* (BISCAIA, 2016).

Assim, os próximos passos serão avaliar se tanto a fração bruta (R6CW) como a fucogalactana isolada (E1000), nas concentrações de 100 e 250 µg/mL, quando expostas as células por 72h, são capazes de inibirem os parâmetros de malignidade celular, como migração e invasão.

FIGURA 37- ENSAIO DE DENSIDADE CELULAR, ATRAVÉS DO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA. AS CÉLULAS B16F10 FORAM EXPOSTAS A FRAÇÃO R6CW (A) E A FUCOGALACTANA ISOLADA (B), NAS CONCENTRAÇÕES DE 10, 50, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 24, 48 E 72h. ESTE ENSAIO FOI REALIZADO EM QUADRUPPLICATA, TRÊS VEZES INDEPENDENTES. OS ENSAIOS FORAM SUBMETIDOS À ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E PÓS-TESTE DE TUKEY, DETERMINANDO A SIGNIFICÂNCIA À \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para os extratos aquosos a frio, a quente e alcalino, adquiridos a partir de basidiomas de *Macrocybe titans*, sugerem as seguintes estruturas e atividade:

- a) Extrato a temperatura ambiente: Foi isolada uma fucogalactana, contendo uma cadeia principal composta por  $\alpha$ -D-Galp ligada-(1 $\rightarrow$ 6), ramificada na posição O-2 por terminais não redutores de  $\alpha$ -L-Fucp a cada 2 ou 3 unidades da cadeia principal. Foram também obtidos os carboidratos de reserva trealose e glicogênio.
- b) Extrato com água fervente: A fração SSD não foi purificada com os métodos aplicados até o momento. As análises de composição monossacarídica e RMN-<sup>13</sup>C sugerem a presença de  $\beta$ -D-Glcp,  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -L-Fucp e  $\alpha$ -D-Galp nesta fração.
- c) Extrato alcalino: Foram obtidas  $\beta$ -glucanas do precipitado e do sobrenadante do processo de congelamento e degelo do extrato alcalino. Ambas as glucanas possuem cadeia principal com  $\beta$ -D-Glcp ligada (1 $\rightarrow$ 3) com substituições em O-6. Para a  $\beta$ -glucana obtida do precipitado, as substituições ocorrem na proporção de 1:1, podendo ser tanto por unidades de  $\beta$ -D-Glcp quanto por cadeias laterais de  $\beta$ -D-Glcp ligadas-(1 $\rightarrow$ 6). Foi também obtida uma fração formadora de gel, a qual é composta principalmente por  $\beta$ -D-Glcp, possivelmente ligadas-(1 $\rightarrow$ 3) contendo pequenas proporções de glicogênio.
- d) Efeito biológico: Nas concentrações de 100 e 250  $\mu$ g/mL tanto a fração bruta quanto a fucogalactana não alteraram a viabilidade celular em nenhum tempo testado, devido a isto, estas concentrações foram escolhidas para prosseguir com os estudos biológicos *in vitro*, realizando o ensaio de migração e invasão celular.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 4970-4971, 1952.

ABREU, J. A. S; ROVIDA, A. F. S; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2015.

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

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

ALQUINI, G. **Caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação e cultivo submerso de *Agaricus bisporus***. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ATCC. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/682555E1D2CE45EBBE60F713C2D3B91D.ashx>. Acesso em: 04 jul 2017.

BABY, S., JOHNSON, A. J., GOVINDAN, B. Secondary metabolites from *Ganoderma*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 66-101, 2015.

BAE, J.; JANG, K.; YIM, H.; JIN, H. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. **Cancer Letters**, v. 218, p. 43-52, 2005.

BARSEGYAN, G. S.; BARAZANI, B.; WASSER, S. P. Medicinal mushrooms with antiphytopathogenic and insecticidal properties. In: PETRE, M. **Mushroom Biotechnology Developments and Applications**. 1. ed. Academic Press, 2016.

BISCAIA, S. M. P. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA “ IN VITRO ” DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS GÊNEROS *PLEUROTUS* , *LENTINUS* E *AGARICUS***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BISCAIA, S. M. P. **MANOGALACTANA PARCIALMENTE METILADA DE *Pleurotus eryngii* POSSUI ATIVIDADE ANTIMELANOMA SEM EFEITO COLATERAL**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, p. 7-9, 1985.

CALONGE, D. F.; MATA, M.; UMAÑA, L. *Macrocybe titans*, um fungo espetacular presente em la Costa Rica, América Central. **Bull. Famm**, v. 32, p. 21-24, 2007.

CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; WAIHRICH, L. G.; AMAZONAS, M. A. L. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMI-NI, M. Further Investigations on the Polysaccharides Obtained from the Stems and Caps of *Macrocybe titans*. **XXXV Reunião Anual da SBBq**, 2006.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; FREITAS, C. S.; KOMURA, D. L.; SANTOS, A.; BAGGIO, C. H.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; FREITAS, C. S.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; DA SILVA, E. V.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 814-819, 2012.

CARDOZO, F. T. G. S. **Caracterização química e avaliação das atividades anti-herpética e citotóxica de polissacarídeos do fungo *Agaricus brasiliensis* Wasser.** 187 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociência)– Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 2. ed. Elsevier Academic Press, 2001.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. Mushroom biology: a new discipline, **Mycologist**, v. 6, n.2, 64–65, 1992.

CHIHARA G, MAEDA Y, HAMURO J, SASAKI T, FUKUOKA F. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **Nature**, v. 222, p. 687 – 688, 1969.

CHUDZIK, G. **EDUCAÇÃO NA ERA DO HIPERTEXTO: uma experiência diferenciada na Biologia**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências Humanas, Sociais e da Natureza) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

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

COIMBRA, V. R. M.; GIBERTONI, T. B. Diversidade de Agaricales (basidiomycota) no campus da UFPE. **XVII Congresso de Iniciação Científica, I Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação**, Pernambuco, 2009.



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

CORRALES, A; LÓPEZ-Q, C. A. *Macrocybe titans* (Bigelow and Kimbr.) Pegler, Lodge, and Nakasone, a new report for Colombia. **Actual Biol.**, v. 27, n. 82, p. 93-97, 2005.

CUI, F., ZAN, X., LI, Y., YANG, Y., SUN, W., ZHOU, Q., YU, S., DONG, Y. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 684-690, 2013.

DELONG, J.; BREWER, M. T. *Macrocybe titans*: Largest Mushroom Species in the Western Hemisphere Found Growing in Georgia. **University of Georgia Extension**, 2013.

DEPCKE, M.; KOPYTOWKI FILHO, J.; AMAZONAS, M. A.; TAVARES, L. B. B. Análise da cinética do crescimento micelial radial de *Macrocybe titans* em diferentes condições. **IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil SICOG**, Caxias do Sul. Anais - Proceedings. Brasília - DF : Embrapa Recursos Genéticos, 2008.

DIÉZ, V. A.; ALVAREZ, A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. **Food Chemistry**, v. 75, p. 417–422, 2001.

DIMATOS, D. C.; DUARTE, F. O.; MACHADO, R. S.; VIEIRA, V. J.; VASCONCELLOS, Z. A. A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R. D. Melanoma cutâneo no Brasil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 38, Suplemento 01, p.14-19, 2009.

DING, X.; HOU, Y-L.; HOU, W-R. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Boletus speciosus* Forst. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 613–618, 2012.

DONKER, H. C. W.; BRAAKSMA, A. Changes in metabolite concentrations detected by <sup>13</sup>C-NMR in the senescing mushroom (*Agaricus bisporus*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 127-134, 1997.

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

ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: Bioprocess and products (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.14, n.3, p. 211–239, 2012.

ELSAYED, E. A.; ENSHASY, H. E.; WADAAN, M. A. M.; AZIZ, R. Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1. ed. Caxias do Sul: Educ, 2004.

FAN, J. M.; ZHANG, J. S.; TANG, Q. J.; LIU, Y. F.; ZHANG, A. Q.; PAN, Y. J. Structural elucidation of a neutral fucogalactana from the mycelium of *Coprinus comatus*. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1130–1134, 2006.

FARIAS, C. L. A. **XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V): EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10 IN VITRO**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência-Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

FERREIRA, F. A.; NASCIMENTO, L. F. C.; ROTTA, O. Fatores de risco para câncer da pele não melanoma em Taubaté, SP: um estudo caso-controle. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 431-437, 2011.

FERNANDES, A.; BARREIRA, J. C. M.; ANTONIO, A. L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Effects of gamma irradiation on chemical composition and antioxidante potential of processed samples of the wild mushroom *Macrolepiota procera*. **Food Chemistry**, v. 149, p. 91–98, 2014.

Fisioterapia para todos. **Melanoma da pele**. <http://www.fisioterapiaparatodos.com/p/doencas-da-pele/melanoma-pele/>. Acesso em: 03 jul 2017.

FONSECA, M. D. P.; OLIVEIRA, C. C. L. S.; SOUZA, A. Q. L.; GIBERTONI, T. B.; SOUZA, A. D. L.; RODRIGUES, M. O.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Diversidade de Macrofungos da Família Polyporaceae (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas. OLIVEIRA, L. A.; FERNANDES, O. C.; JESUS, M. A.; BENTES, J. L. S.; ANDRADE, S. L.; SOUZA, A. Q. L.; SANTOS, C. **Diversidade Microbiana da Amazônia**. Editora INPA, 2015.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, p. 109-113, 1986.

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

GRACHER, A. H. P. **Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarrídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidiomicetos**. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) –Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Lavras, Lavras, 2011.

GUO, Z.; HU, Y.; WANG, D.; MA, X.; ZHAO, X.; ZHAO, B.; WANG, J.; LIU, P. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of lentinan and improve the immune effect of ND vaccine, **Vaccine**, v. 27, p; 660–665, 2009.

HAMMOND, J. B. W.; NICHOLS, R. Glycogen in *Agaricus bisporus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 2, 325-369, 1976.

HAN, S. B.; LEE, C. W.; KANG, J.S; YOON, Y.D; LEE, K. H; ; LEE, K.; PARK, S. K; KIM, H. M. Acidic polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits melanoma cell metastasis by blocking cell adhesion and invasion. **International Immunology**, v. 6, p. 697-702, 2006.

HUANG, S. J.; TSAI, S. Y.; LIN, S. Y.; LIANG, C. H., MAU, J. L. Preparation of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13 n. 3, p. 265–272, 2011.

HOMOLKA, L. Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. **Fungal biology**, v. 118, p. 107-125, 2014.

INCA. **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Tais Facin. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva, 2011.

INCA. **O que é câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso em: 27 jul 2017.

INCA. **Pele melanoma**. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma). Acesso em: 03 jul 2017.

INCA. **Pele não melanoma**. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_ao\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma). Acesso em: 03 jul 2017.

Instituto Nacional de Saúde (National Institutes of Health). **What you need know about melanoma and other skin cancers**. U. S. Department of health and human services. NIH Publication, n.10-7625. 2010.

JAMIL, N. A. M.; RAHMAD, N.; RASHID, N. M. N.; YUSOFF, M. H. Y. M.; SHAHARUDDIN, N. S.; SALEH, N. M. LCMS-QTOF Determination of Lentinan-Like  $\beta$ -D-Glucan Content Isolated by Hot Water and Alkaline Solution from Tiger's Milk Mushroom, Termite Mushroom, and Selected Local Market Mushrooms. **Journal of Mycology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

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

JEFF, I. B.; LI, S.; PENG, X.; KASSIM, R. M. R.; LIU, B.; ZHOU, Y. Purification, structural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Fitoterapia**, v. 84, p. 338–346, 2013.

JIRJIS, R. I.; MOORE, D. Involvement of Glycogen in Morphogenesis of *Coprinus cinereus*. **Journal of General Microbiology**, v. 95, p. 348-352, 1976.

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

KALAÇ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 209-218, 2013.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. **Redox Biology**, v. 12, p. 833–842, 2017.

KIM, Y. P., HW.; KIM, JH.; LEE, JY.; MOON, SH.; B, SHIN, CS. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. **Life Sciences**, v. 79, p. 72-80, 2006.

KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STALPERS, J.A. **Dictionary of Fungi**. 10. ed. CABI Publishing, United Kingdom, 2008.

KNAK, M. U.; GUEDES, A.; TAVARES, L. B. B. Atividade citotóxica frente a *Artemia salina* e antioxidante do fungo *Macrocybe titans*. **Dynamis revista tecno-científica**, v. 5, p. 81, 2009.

KOCYIGIT, A.; KOYUNCU, I.; DIKILITAS, M.; BAHADORI, F.; TURKKAN, B. Cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of naringenin-oxime relative to naringenin on normal and cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 872–880, 2016.

KOMURA, D. L. *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*: **Caracterização estrutural de polissacarídeos do micélio e exopolissacarídeos**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KOMURA, D. L.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A.H.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; SANTOS, A.R.S.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6192-6199, 2010.

KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKSIC, M.; JAKOVLJEVIC, D.; HELSPER, J. P. F. G.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*,

*Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1667–1675, 2011.

LAROCHE, C.; MICHAUD, P. (2007). New developments and prospective applications for  $\beta$  (1,3) glucans. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, p. 59–73, 2007.

LAU, B. F.; ABDULLAH, N. Bioprospecting of *Lentinus squarrosulus* Mont., an underutilized wild edible mushroom, as a potential source of functional ingredients: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 116–131, 2017.

LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. **Wspolczesna Onkol**, v. 16, n. 4, p. 285–289, 2012.

LI, B.; DOBRUCHOWSKAB, J. M.; GERWIGB, G. J.; DIJKHUIZENB, L.; KAMERLINGB, J. P. Structural investigation of water-soluble polysaccharides extracted from the fruit bodies of *Coprinus comatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 314–321, 2013.

LI, W.; GU, Z.; YANG, Y.; ZHOU, S.; LIU, Y.; ZHANG, J. Non-volatile taste components of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 143, p. 427–431, 2014.

MAITY, S.; MANDAL, E. K.; MAITY, K.; BHUNIA, S. K.; BEHERA, B.; MAITI, T. K.; MALLICK, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. Structural study of an immunoenhancing polysaccharide isolated from an edible hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. **Bioactive Carbohydrate Dietary Fibre**, v. 1, p. 72–80, 2013.

MAITY, P.; SAMANTA, S.; NANDI, A. K.; SEN, I. K.; PALOI, S.; ACHARYA, K.; ISLAM, S. S. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble  $\beta$ -D-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 140–149, 2014.

MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate Research**, v. 424, p. 30–41, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 434–437, 1998.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.-I.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of

tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 113–121, 2000.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais na em laboratórios de saúde**. Vol. 1, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

MORENO, R. B.; RUTHES, A. C.; BAGGIO, C. H.; VILAPLANA, F.; KOMURA, D. L.; IACOMINI, M. Structure and antinociceptive effects of  $\beta$ -D-glucans from *Cookeina tricholoma*. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 220–228, 2016.

NAME, L. H.; AMAZONAS, M. A.; MARQUES, M.B.; MONTOVANI, A.; NUNES, D.S.; LIMA, I. V.; PAYRETA.M.E. Perfil analítico do macrofungo *Macrocybe titans*. **V Encontro de Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa**, Resumos do V Encontro de Pesquisa da UEPG -PROPESP, 2005. v. 1. p. 1-1, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Organização mundial da saúde (World Health Organization). **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 03 jul 2017.

PARHAM, P. **O sistema imune**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PATEL, S.; GOYAL, A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **3 Biotech**, v. 2, p. 1–15, 2012.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2017.

PEGLER, D. N., LODGE, D. J., NAKASONE, K. K. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494-504, 1998.

PEREIRA, F. C. B. N.; SNAK, A.; SCHEMMER, J. N.; SILVA, S.; TIBÉRIO, A. E. G.; ROSADO, F. R.; FERNANDES, N. L. M. Avaliação do efeito do extrato aquoso de fungos basidiomicetes em larvas de Strongyloidea. **5º Simpósio de Biotecnologia na Agroindústria**, Palotina, 2015.

PIRES, A. R. A.; RUTHES, A. C.; CADENA, S. M. S. C.; ACCO, A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Cytotoxic effect of *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*  $\beta$ -D-glucans on HepG2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 95, 2013.

POLISHCHUK, E. N.; KOVALENKO, A. G. Biological activity of glycopolymers from Basidiomycetes Mushrooms. **Biopolymers and Cell**, v. 25, p. 181-193, 2009.

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

EDUNISC, 1998.

REIS, F. S. D. **Crescimento e caracterização química de fungos micorrízicos e plantas de *Pinus pinaster* na presença e ausência do simbiote.** 85 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2010.

REPETTO, G.; PESO, A. D.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RICHARDS, A. B.; KRAKOWKA, S.; DEXTER, L. B.; SCHMID, H.; A.P.M. WOLTERBEEK, A. P. M.; WAALKENS-BERENDSEN, D. H.; SHIGOYUKI, A.; KURIMOTO, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 871–898, 2002.

ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; CLAUDINO, R.F.; TISCHER, C.A.; KEMMELMEIER, C.; IACOMINI, M. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* "florida" Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, p 119-124, 2003

RÚA, J.; BUSTO, F.; ARRIAGA, D.; SOLER, J. Glycogen in *Phycomyces blakesleeanus*: influence of growth conditions and nutrient limitation. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 217-222, 1993.

RUTHES, A.C.; RATTMANN, Y.D.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural characteriza-tion and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p. 1620-1627, 2012

RUTHES, A. C; CARBONERO, E. R; CÓRDOVA, M. M; BAGGIO, C. H; SASSAKI, G. L; GORIN, P. A; SANTOS, A. R; IACOMINI, M. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 761-769, 2013a.

RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)-β-d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 129-136, 2013b.

RUTHES, A. C.; RATTMANN, Y. D.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. E. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Agaricus bisporus* fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 184-191, 2013c.

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.

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

SAMANTA, S.; NANDI, A. K.; SEN, I. K.; MAITY, P.; PATTANAYAK, M.; DEVI, K. S. P.; KHATUA, S.; MAITI, T. K.; ACHARYA, K.; ISLAM, S. S. Studies on antioxidative and immunostimulating fucogalactan of the edible mushroom *Macrolepiota dolichaula*. **Carbohydrate Research**, v. 413, p. 22-29, 2015.

SÁNCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 2, p. 13-22, 2017

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ALQUINI, G.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A novel branched  $\alpha\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 309–314, 2008.

SANTOS-NEVES, J. C. **Caracterização estrutural dos polissacarídeos obtidos do Basidioma de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida***. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1, p. 215-222, 2008.

SAYKA, R.; PAYRETA.M.E.; MARQUES, M. B.; DELLA V. C.; CARBONERO, E. R.; AMAZONAS, M. A. Composição monossacarídica de Extratos de Píleo e Estipe do Macrofungo *Macrocybe titans*. **XV Encontro de Química da Região Sul**, Ponta Grossa, 2007.

SAYKA, R. A. **Determinação do perfil químico e bioquímico de *Macrocybe titans***. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) –Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008

SAYKA, R.; PAYRET, A.M.E.; MARQUES, M. B.; AMAZONAS, M. A. Atividade antioxidante de extratos aquosos de píleo e estipe do Macrofungo *Macrocybe titans* frente ao radical livre DPPH. **XVI Encontro de química da região sul**, Blumenau, 2008.

SILVA, T. L.; RUTHES, A. C.; SILVA, E. V.; GRACHER, A. H. P.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CARBONERO, E. R. Purificação e caracterização química de uma  $\beta$ -glucana (1→6) solúvel em água isolada do corpo de frutificação de



*Agaricus brasiliensis*. 34<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, 2011.

SILVEIRA, M. L. L. **Caracterização estrutural e ação antinociceptiva e anti-inflamatória de Polissacarídeos Isolados de *Pleurotus sajor-caju***. 196 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) –Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SILVEIRA, M. L. L.; SMIDERLE, F. R.; MORAES, C. P.; BORATO, D. G.; BAGGIO, C. H.; RUTHES, A. C.; WISBECK, E.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; FURLAN, S. A.; IACOMINI, M. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear  $\beta$ -d-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 588-596, 2014.

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

Skin Cancer Foundation. **Melanoma**. Disponível em: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>. Acesso em: 03 jul 2017.

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

SMIDERLE, F. R. **Caracterização estrutural de alguns polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus pulmonarius* e aplicações**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

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

SMIDERLE, F. R.; SASSAKI, G. L.; ARKEL, J. V.; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; GRIENSVEN, L. J. L. D. High Molecular Weight Glucan of the Culinary Medicinal Mushroom *Agaricus bisporus* is an  $\alpha$ -Glucan that Forms Complexes with Low Molecular Weight Galactan. **Molecules**, v. 15, p. 5818-5830, 2010.

SMIDERLE, F. R.; RUTHES, A. C.; VAN A. J.; CHANPUT, W; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; VAN G.; LEO J. L. D. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v. 11, n. 58, p. 1-10, 2011.

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

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

SMIDERLE, F. R.; BAGGIO, C. H.; BORATO, D. G.; SANTANA-FILHO, A. S.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V. Anti-Inflammatory Properties of the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris* Might Be Related to Its Linear (1→3)- $\beta$ -D-Glucan. **Plos One**, v. 9, p. e110266, 2014.

SMIDERLE, F. R.; RUTHES, A. C.; IACOMINI, M. Natural polysaccharides from mushrooms: anti-nociceptive and anti-inflammatory properties. RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. **Polysaccharides**, Springer, 2014.

SOVRANI, V.; JESUS, L. I.; SIMAS-TOSIN, F. F.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M, Structural characterization and rheological properties of a gel-like  $\beta$ -D-glucan from *Pholiota nameko*. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 1–8, 2017.

STIJVE, T. The tropical giant mushroom *Macrocybe titans* edible and can be cultivated. **AMK Mededelingen**, v. 3, p. 93-94, 2004.

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

SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 983-986, 2009.

SYNYTSYA, A.; MIČKOVA, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKY, I.; SPĚVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘÍKOVÁ, E.; ČOPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 548–556, 2009.

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

TIBÉRIO, A. E. G.; PEREIRA, F. C. B. N.; SILVA, S.; SCHEMMER, J. N.; PAULERT, R.; FERNANDES, N. L. M.; ROSADO, F. R.; CORTEZ, V. G. *Macrocybe titans* (Basidiomycota): Cogumelo com Potencial Biotecnológico e sua Ocorrência no Oeste do Paraná. **IV Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, Londrina, 2014.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TSAI, P. F.; MA, C. Y., WU, J. S. A novel glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow with growth inhibitory effect against human leukaemic U937 cells. **Food Chemistry**, n. 141, p. 1252-1258, 2013.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

VIEIRA, V. A. A. **Caracterização nutricional e bioatividade de cogumelos silvestres: *Lactarius citriolens*, *Lactarius turpis*, *Leucopaxillus candidus* e *Morchella conica***. 108 f. Dissertação de mestrado em farmácia e química de produtos naturais, Instituto Politécnico de Bragança e Universidad de Salamanca, 108 p. 2014.

VILLARES, A. Polysaccharides from the edible mushroom *Calocybe gambosa*: structure and chain conformation of a (1→4),(1→6)-linked glucan. **Carbohydrate Research**, v. 375, p. 153–157, 2013.

VINDRA, K. B.; PRADEEP, C. K.; PRADEEP, N. S.; ABRAHAM, T. K. Agaricales from Western Ghats – II. **Indian Journal of Forestry**, v. 20, n. 4, p. 314-318, 1997.

WANG, D.; SUN, S.-Q.; WU, W.-Z.; YANG, S.-L.; TAN, J.-M. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 127–134, 2014a.

WANG, C. L.; LU, C. Y.; HSUEH, Y. C.; LIU, W. H.; CHEN, C. J. Activation of antitumor immune responses by *Ganoderma formosanum* polysaccharides in tumor-bearing mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9389–9398, 2014b.

WANNET, W. J. B.; CAMP, H. J. M. O. D.; WISSELINK, H. W.; DRIFT, C. V. D.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V.; VOGELS, G. D. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1425, p.177-188, 1998.

WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1323-1332, 2011.

WASSER, S. P. Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences, and Challenges. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 6, p. 345-356, 2014.

WHITTAKER, R.H. New concepts of Kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, p. 150-160, 1969.

WISNIEWSKI, A. C. **Produção de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase por *Macrocybe titans* cultivado em resíduos sólidos agroindustriais**. 129 f. Dissertação (Mestrado de Engenharia ambiental), Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

WISNIEWSKI, A. C.; ALMEIDA, M. A. L.; PALMA, M. B. e TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 8, n. 3, p. 285-293, 2010.

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

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2, p. 211- 215, 1963b.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M., GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry** v. 51, p. 395-402, 1999.

ROMÁN, Y.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R. Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345–352, 2016.

YOSHIDA, O.; NAKASHIMA, H.; YOSHIDA, T.; KANEKO, Y.; YAMAMOTO, I.; MATSUZAKI, K.; URYU, T.; YAMAMOTO, N. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: a novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 15, p. 2887-2981, 1988.

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

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

ZHANG, Y.; XU, X.; ZHANG, L. Gel Formation and Low-Temperature Intramolecular Conformation Transition of a Triple-Helical Polysaccharide Lentinan in Water. **Biopolymers**, v. 89, n. 10, p. 852-861, 2008.

ZHANG, Y.; LI, S.; WANG, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 196-206, 2011.

ZHANG, A.Q.; XU, M.; FU, L.; SUN, P.L. Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p. 236-240, 2013a.

ZHANG, Y.; KONG, H.; FANG, Y.; NISHINARI, K.; PHILLIPS, G. O. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 1, p. 53-71, 2013b.

ZHANG, Y., LIU, Z., NG, T. B., CHEN, Z., QIAO, W., LIU, F. Purification and characterization of a novel antitumor protein with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, n. 99, p. 28-37, 2014.

ZHANG, J; GAO, X; PAN, Y; XU, N; JIA, L. Toxicology and immunology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in Kunming mice and Wistar rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 302–310, 2016.

ZILLY, A.; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO, C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1573–1580, 2012.

ZONG, A.; HONGZHI CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395–1410, 2012.