

JULIANA CRISTINA DOS SANTOS NEVES



**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO
BASIDIOMA DE *Pleurotus ostreatus* variedade *florida***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Colaboradora: Dra. Elaine R. Carbonero

CURITIBA

2007

JULIANA CRISTINA DOS SANTOS NEVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO
BASIDIOMA DE *Pleurotus ostreatus* variedade *florida***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Colaboradora: Dra. Elaine R. Carbonero

CURITIBA

2007

Ao meu marido Luiz, pelo apoio prestado em todos os momentos desta caminhada e principalmente, por estar presente em minha vida.

Aos meus amados pais, Lourdes e Paulo, pelo
carinho e incentivo e por estarem sempre
presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e proteção e por permitir a realização de todos os meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Sasaki, por ter permitido o meu ingresso no laboratório e pela orientação.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini, pelos ensinamentos e pelas palavras amigas.

Aos meus pais, Lourdes e Paulo, obrigado pelo carinho, pelas palavras de apoio e incentivo constantes e pelas orações, vocês são um exemplo de dedicação aos seus filhos, eu sou muito feliz de tê-los como pais.

Ao meu marido Luiz, por seu amor e carinho, pela companhia e amizade, por me ouvir quando precisei simplesmente desabafar, mas, sobretudo por entender a minha ausência em tantos momentos.

Aos meus irmãos Paulo e Guilherme, pelas conversas e ótimos momentos que passamos em Toledo nos últimos tempos. Ao Guilherme em especial, por seu carinho e admiração.

À minha irmã Ana Claudia, pelo carinho, pelas visitas, pelos passeios e pelo bom papo, gostaria que estes fossem mais freqüentes.

Ao meu enteado Juninho, pelos passeios e risadas e por estar sempre por perto.

À minha avó Terezinha Orsatto Foiato (*in memorian*), com saudades, pelas nossas conversas, em especial a última que me fez repensar muitas coisas.

À minha mãe postiça Alvina Rosa (*in memorian*), com saudades, eu sei que onde estiver deve estar feliz por mim.

A uma pessoa muito especial, minha grande amiga Maria Izabel, pela imensa amizade que conseguimos cultivar. Apesar dos momentos de preocupações e incertezas, estamos chegando ao final desta etapa. Obrigada por tudo, que a nossa amizade possa continuar.

Em especial a amiga Elaine Carbonero, pela amizade, paciência, pela disponibilidade em ajudar, por todos os ensinamentos, pelas correções e principalmente por tornar este trabalho possível. Muito Obrigada!

Às meninas da sala 247, Carol, Lucimara, Maria Luiza, Andrea e Izabel por fazerem dela um local tão agradável e descontraído. Agradeço ao Eduardo (Cabelinho) por não se importar quando inúmeras vezes me apossei da sua bancada.

Às amigas Andrea e Dirce, pela amizade, apoio técnico, disposição em ajudar a qualquer momento e pelas horas de descontração.

À Caroline Mellinger, pelas palavras amigas, pela calma e tranquilidade que você transmite.

Aos colegas Ricardo, Ana Helena, Fernanda, Viviane e Marianna (raposinha), pelas dicas, ajuda e colaboração.

A Graciele e ao Rodrigo Faria, pela ajuda e amizade desde o início do trabalho.

À Dayane pelas visitas e momentos agradáveis.

A todos os colegas dos laboratórios 247, E-1 e 252 e laboratórios anexos, pelos momentos de convivência e colaboração.

Aos colegas de turma (por ordem) Amanda, Caroline, Francine, Heide, Izabel, Luciana, Marco, Vanessa e Viviane, por compartilharmos os primeiros passos da caminhada.

Aos Professores Dr. Guilherme L. Sasaki e Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela realização das análises de RMN.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Profa. Leda Satie Chubatsu e Prof. Miguel Nosedá pela dedicação prestada ao crescimento e reconhecimento deste curso.

À Dona Marilza pela presença alegre e prestativa.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pelos ensinamentos e por sua dedicação à arte de ensinar.

Aos pós-graduandos e funcionários do Departamento, pela colaboração e amizade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

A todos que participaram na realização deste trabalho o meu muito obrigado!

"Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:

Tempo para nascer, e tempo para morrer;

Tempo para plantar, e tempo para arrancar o que foi plantado;

Tempo para matar, e tempo para sarar;

Tempo para demolir, e tempo para construir;

Tempo para chorar, e tempo para rir;

Tempo para falar, e tempo para calar;

Tempo para amar, e tempo para odiar;

Tempo para a guerra, e tempo para a paz."

Eclesiastes 3,1-4; 7-8

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS | ix |
| RESUMO | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 BASIDIOMICETOS | 3 |
| 1.2 GÊNERO <i>Pleurotus</i> | 5 |
| 1.3 PRODUÇÃO COMERCIAL DE COGUMELOS | 6 |
| 1.4 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS | 8 |
| 1.4.1 Homopolissacarídeos | 9 |
| 1.4.2 Heteropolímeros | 12 |
| 1.4.3 Polissacarídeos de Basidiomicetos com Atividade Biológica | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 MATERIAL DE ESTUDO | 20 |
| 3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO | 20 |
| 3.2.1 Extração Aquosa à Temperatura Ambiente | 20 |
| 3.2.2 Extração Aquosa com Água Fervente | 21 |
| 3.2.3 Extração Alcalina | 21 |
| 3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS | 21 |
| 3.3.1 Separação dos polissacarídeos por Congelamento e degelo | 22 |
| 3.3.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling | 22 |
| 3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas | 23 |
| 3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS | 23 |
| 3.4.1 Hidrólise Ácida Total | 23 |
| 3.4.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise | 23 |
| 3.4.3 Análise de metilação das Frações Polissacarídicas | 24 |
| 3.4.4 Degradação Controlada de Smith | 25 |
| 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS | 25 |
| 3.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) | 25 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.5.2 | Determinação da Homogeneidade por Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS)..... | 26 |
| 3.5.3 | Ressonância Magnética Nuclear | 26 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 4.1 | EXTRATO AQUOSO A FRIO (EXTRATO AQUOSO I) | 29 |
| 4.2 | EXTRATO AQUOSO A QUENTE (EXTRATO AQUOSO II)..... | 35 |
| 4.3 | EXTRATO ALCALINO A 2% (EXTRATO ALCALINO) | 45 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 56 |
| | REFERÊNCIAS | 57 |

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

| | |
|----------------------------|---|
| ~ | - Aproximadamente |
| ^{13}C | - Carbono treze |
| Ac | - Acetil |
| Ac_2O | - Anidrido acético |
| ~ | - Aproximadamente |
| ^{13}C | - Carbono treze |
| Ac | - Acetil |
| Ac_2O | - Anidrido acético |
| Gal | - Galactose |
| GC-MS | - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| Glc | - Glucose |
| HMQC | - |
| | Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy |
| HPSEC-MALLS | - Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS) |
| IR | - Índice de refração |
| kDa | Kilodaltons |
| KOH | - Hidróxido de potássio |
| M | - Molar |
| Man | - Manose |
| Me | - Metil |
| Me_2SO | - Dimetilsulfóxido |
| $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ | - Dimetilsulfóxido deuterado |
| MeOH | - Metanol |
| NaB^2H_4 | - Boroidreto de sódio deuterado |
| NaBH_4 | - Boroidreto de sódio |
| NaIO_4 | - Periodato de sódio |
| NaN_3 | - Azida de sódio |
| NaNO_2 | - Nitrito de sódio |
| NaOH | - Hidróxido de sódio |
| ρ | - Piranosídico |
| p/v | - Peso/volume |
| ppm | - Partes por milhão |
| RMN | - Ressonância Magnética Nuclear |
| rpm | - Rotações por minuto |
| TFA | - Ácido trifluoracético |
| v/v | - Volume/volume |
| Xyl | - Xilose |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1 | - Desenho esquemático das estruturas do corpo de frutificação dos basidiomicetos..... | 3 |
| FIGURA 2 | - Foto dos basidiomas de <i>P. ostreatus</i> (A), <i>P.ostreatoroseus</i> (B), <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> (C), <i>Pleurotus eryngii</i> (D) e <i>P. citrinopileatus</i> (E), respectivamente..... | 5 |
| FIGURA 3 | - Técnicas de produção de basidiomas por cultivo em substratos..... | 7 |
| FIGURA 4 | - Esquema da estrutura da glucana encontrada em basidiomicetos..... | 9 |
| FIGURA 5 | - Estrutura da β -glucana (1 \rightarrow 6) (1 \rightarrow 3) de <i>Agaricus blazei</i> (DONG et al., 2002). | 11 |
| FIGURA 6 | - Estrutura da glucana, com configuração α e β , de <i>P. florida</i> (ROUT et al., 2005). | 12 |
| FIGURA 7 | - Esquema da estrutura da heterogalactana comum à maioria dos basidiomicetos..... | 13 |
| FIGURA 8 | - Estrutura da fucomanogalactana de <i>L sulphureus</i> (ALQUINI et al., 2004). | 13 |
| FIGURA 9 | - Esquema da estrutura descrita em <i>Pleurotus ostreatus</i> "florida" e <i>P. ostreatoroseus</i> (ROSADO et al., 2003). | 14 |
| FIGURA 10 | - Estrutura proposta para a heterogalactana de <i>P. florida</i> (ROUT et al., 2006). | 14 |
| FIGURA 11 | - Esquema da estrutura da fucoxilomanana de <i>Polyporus pinicola</i> (AXELSSON; BJÖRNAL; LINDBERG, 1969)..... | 15 |
| FIGURA 12 | - Estrutura do heteropolissacarídeo de <i>P. sajor-caju</i> (PRAMANIK et al., 2005). | 16 |
| FIGURA 13 | - Foto do cultivo em substrato (palha de trigo) de <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 20 |
| FIGURA 14 | - Fluxograma geral das etapas de extrações dos polissacarídeos a partir do corpo de frutificação de <i>P. florida</i> | 27 |
| FIGURA 15 | - Fluxograma geral das etapas de purificação dos extratos brutos W, W2 e K2..... | 28 |
| FIGURA 16 | - Esquema de purificação do extrato aquoso a frio de <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 29 |
| FIGURA 17 | - Espectro de RMN- ¹³ C (A) e DEPT (B) da fração precipitado de Fehling (PFW) obtida por extração aquosa a frio de <i>P. var. florida</i> , em D ₂ O a 70°C. | 31 |
| FIGURA 18 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração sobrenadante de Fehling (SFW) em D ₂ O a 70°C..... | 33 |
| FIGURA 19 | - Espectros de RMN- ¹³ C, em D ₂ O a 70°C, da fração retida (MRSFW) (A) e da fração eluída (MESFW) (B) em diálise em membrana de limite de exclusão de 1000 kDa..... | 34 |
| FIGURA 20 | - Esquema de purificação do extrato aquoso a quente de <i>P.ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 35 |
| FIGURA 21 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração SFW2, em D ₂ O a 70°C. | 37 |
| FIGURA 22 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração MESFW2, em D ₂ O a 70°C..... | 38 |
| FIGURA 23 | - Espectro de RMN- ¹³ C (A) e RMN- ¹³ C-DEPT (B) da fração MRSFW2, em D ₂ O a 70°C. | 39 |
| FIGURA 24 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração 1DSMR, em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C. | 41 |
| FIGURA 25 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração 2DSMR, em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C. | 42 |
| FIGURA 26 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração 3DSMR, em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C. | 43 |
| FIGURA 27 | - Estrutura proposta para a fração MRSFSW2 obtida de <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 44 |
| FIGURA 28 | - Esquema de purificação do extrato alcalino K2 | 45 |

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 29 | - Espectro da fração em precipitado de congelamento/degelo (PK2) do extrato alcalino 2%..... | 47 |
| FIGURA 30 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração precipitado de Fehling (PFK2) em DMSO, do extrato alcalino a 2%..... | 48 |
| FIGURA 31 | - Espectro de RMN- ¹³ C da fração SFK2 obtida do extrato alcalino a 2%.. | 49 |
| FIGURA 32 | - Espectro de RMN da fração sSFK2, obtida do extrato alcalino 2%..... | 50 |
| FIGURA 33 | - Espectros de RMN- ¹³ C (A) e de RMN- ¹³ C DEPT(B) da fração pSFSK2 obtida do extrato alcalino 2% em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C..... | 51 |
| FIGURA 34 | - Espectro de 1H, ¹³ C HMQC da fração pSFK2 isolada de <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 52 |
| FIGURA 35 | - Espectro de RMN- ¹³ C do material (DSpSFK2) resistente a degradação de Smith..... | 54 |
| FIGURA 36 | - Estrutura proposta para o polissacarídeo presente na fração pSFK2..... | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | - Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas do extrato aquoso a frio..... | 30 |
| TABELA 2 | - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFW) obtida de <i>P.ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 32 |
| TABELA 3 | - Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas do extrato aquoso a quente de <i>P.ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 36 |
| TABELA 4 | - Análise por metilação da fração MRSFSW2 obtida de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 40 |
| TABELA 5 | - Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas a partir do extrato alcalino..... | 46 |
| TABELA 6 | - Assinalamentos de ¹ H e ¹³ C da β-D-glucana (1→3) (1→6) (fração pSFSK2) isolada de <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | 53 |
| TABELA 7 | - Análise de metilação da fração pSFK2 e material degradado(DSpSFK2) | 54 |

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a elucidação da estrutura química dos polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. O cogumelo foi submetido a extrações aquosas (25°C e 100°C) e alcalina (KOH 2%). As frações brutas W-Pf, W2-Pf e K2-Pf foram submetidas ao tratamento de purificação por congelamento e degelo, resultando frações insolúveis (PW, PW2 e PK2) e solúveis em água fria (SW, SW2 e SK2). As frações solúveis foram tratadas com solução de Fehling, originando precipitados (PFW, PFW2 e PFK2) e sobrenadantes de Fehling (SFW, SFW, SFK2). A fração PFW mostrou-se similar a PFW2 em relação à composição monossacarídica, apresentando Man, Gal e 3-O-Me-Galp como constituintes monossacarídicos. Análises espectroscópicas e de metilação sugerem que o polissacarídeo presente nesta fração consiste de uma manogalactana parcialmente metilada, a qual apresenta cadeia principal constituída por unidades de α -D-Galp e 3-O-Me- α -D-Galp ligadas (1→6), sendo parte destas unidades substituídas em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp. As frações SFW e SFW2 foram submetidas a diálises em membrana com limite de exclusão de 1000 kDa resultando as frações MRSFW, MESFW, MRSFW2 e MESFW2. Destas, MRSFW, MESFW e MESFW2 apresentaram-se heterogêneas não foram caracterizadas. A fração MRSFW2 foi submetida às análises de GC-MS, RMN-¹³C, DEPT, metilação e degradação de Smith. De acordo com os dados obtidos, esta fração consiste em uma glucana com configuração α e β , a qual apresenta uma cadeia principal formada por unidades α -Glc p (1→3)-ligadas, parcialmente substituídas em O-6, principalmente, por unidades de terminais não redutores de β -Glc p ou, em menores proporções, por cadeias laterais constituídas por unidades de β -Glc p com ligações do tipo (1→3). A fração PK2 constituída principalmente por Glc, quando analisada por RMN-¹³C apresentou espectro com sinais correspondentes a duas moléculas, relativos a uma α -glucana linear com ligações do tipo (1→3) e a uma β -glucana contendo ligações do tipo (1→3) (1→6). Pelas análises de RMN-¹³C e GC-MS da fração PFK2, pode-se inferir que se trata de uma glucana com cadeia principal ligada por β -(1→6) e com poucas ramificações em O-3 por unidades de α -Glc p. A fração SFK2 foi submetida a um processo de purificação por congelamento e degelo seguido de centrifugação a baixas temperaturas, originando as frações sSFK2 e pSFK2 que se mostraram constituídas principalmente por glucose. A sSFK2 mostrou-se heterogênea por HPSEC-MALLS e não foi caracterizada. De acordo com os dados reunidos pelas análises de RMN-¹³C, DEPT, HMQC, metilação e degradação de Smith da fração pSFSK2, sugere-se como uma provável estrutura uma β -glucana com cadeia principal formada por unidades de β -Glc p ligadas (1→3), substituídas em O-6 por unidades únicas de β -Glc p numa relação molar de 4:1. Pelos dados apresentados no trabalho, foi possível realizar a caracterização de uma manogalactana a qual havia sido descrita de literatura no gênero *Pleurotus*. Além desta, duas glucanas que não constam na literatura foram caracterizadas, uma β -glucana com ramificação α e uma glucana apresentando configuração α e β .

1 INTRODUÇÃO

Por séculos, a população de países como China e Japão, utiliza os cogumelos comestíveis para manter a saúde e aumentar a longevidade. As frações solúveis em água quente, na forma de decoctos e essências eram usadas como medicamento pelos povos antigos.

Nas últimas décadas, os cogumelos têm sido consumidos em grandes quantidades pelo seu sabor e valor nutricional e principalmente por apresentarem valores medicinais. Recentemente, os polissacarídeos isolados de cogumelos surgiram como uma classe importante de substâncias biologicamente ativas. Estudos científicos indicam que os polissacarídeos presentes nestes organismos, constituem uma importante classe de substâncias bioativas, as quais atuam como modificadores de resposta biológica. Muitas propriedades medicinais e terapêuticas são atribuídas aos polissacarídeos dos basidiomicetos, tais como, atividade hipoglicemiante, antitrombótica, antibiótica, sendo a atividade antitumoral a mais evidente.

Um dos maiores exemplos de atividade antitumoral mostrado por basidiomicetos é dado pelo cogumelo *Agaricus blazei*, conhecido por Cogumelo do Sol. Este teve seu efeito descoberto a partir da observação da população da cidade de Piedade no interior de São Paulo, onde as pessoas que consumiam freqüentemente este cogumelo apresentavam baixos índices de doenças como câncer e diabetes. Este cogumelo foi patenteado e atualmente é comercializado na forma de cápsulas de extrato seco, com o nome comercial de AG-500 e muitos são os relatos de melhora física alcançada pelos pacientes pela ingestão deste produto.

Como os casos de câncer vêm crescendo em grandes proporções a cada dia, aumenta o interesse por outros basidiomicetos, que possam conter diferentes substâncias químicas que poderão ser utilizadas na prevenção e no tratamento desta doença.

Levando em consideração que a caracterização estrutural dos polissacarídeos é grande importância para se entender os efeitos biológicos apresentados por esta classe de polímeros. A elucidação química destas macromoléculas torna-se necessária, considerando que na literatura a maioria

dos trabalhos a respeito de atividade biológica é realizada com extratos brutos e uma minoria destes detalha a estrutura fina dos polissacarídeos.

Na presente pesquisa foi realizada a caracterização dos polissacarídeos presentes na espécie *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*, espécie de cogumelo que vem se tornando popular devido a seu sabor que é altamente apreciado na culinária. Esta espécie foi selecionada, pois até a presente data, poucos trabalhos foram realizados em relação aos seus componentes químicos. Além disso, outras espécies do gênero *Pleurotus*, já foram estudadas em relação aos seus polissacarídeos e quando estes foram testados apresentaram certa atividade biológica.

1.1 BASIDIOMICETOS

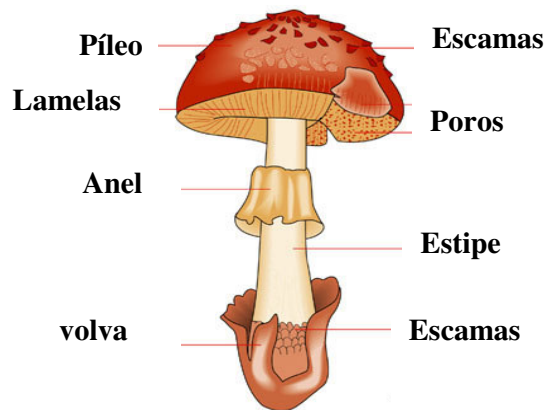
O reino Fungi inclui quatro filós: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*.

No filo *Basidiomycota* está reunido o que há de mais evoluído dentre os organismos do Reino Fungi, os fungos macroscópicos (cogumelos), as orelhas-de-pau, as ferrugens, os carvões, os mofos e os bolores. Devido a grande variedade deste grupo torna-se difícil identificar qualquer característica morfológica que seja única e constante (GRIFFIN, 1994).

A característica distintiva do filo é a produção de basídios. Cada basídio produz basidiosporos (esporos sexuais) sendo este o principal meio de reprodução nos basidiomicetos (RAVEN; EVERT; EICHEHORN, 1996).

A maioria das espécies forma uma estrutura macroscópica conhecida por basidioma ou corpo de frutificação formada de por filamentos conhecidos como hifas e ao conjunto de hifas denomina-se micélio. O basidioma é constituído de estipe, píleo e lamelas (Figura 1). Esta estrutura emerge do substrato, apresenta curta durabilidade, sendo necessária para a dispersão dos esporos. Além disso, as características macroscópicas do corpo de frutificação como tamanho, formato e coloração, juntamente com os aspectos microscópicos são utilizados para identificar as espécies (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL, 1996).

Figura 1 – Desenho esquemático das estruturas do corpo de frutificação dos basidiomicetos



O micélio representa a fase vegetativa dos basidiomicetos e é formado por filamentos septados, chamados de hifas. Esta estrutura pode ser simples ou possuir estruturas características denominadas de conexão em gancho, *clamp connections*, cuja função, possivelmente, seja a de garantir que cada célula possua um par de núcleos. Alguns basidiomicetos formam uma estrutura de resistência, o esclerócio, que possibilita que estes fiquem em estado de latência por períodos longos de tempo (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL, 1996).

Na literatura é amplamente aceita a definição do termo cogumelo, feita por Chang e Miles (1992):

"Um macrofungo com corpo de frutificação distinto, que pode ser tanto hipogeo quanto epigeo, grande o bastante para ser visto a olho nu e ser pego com as mãos".

Atualmente, o número total de espécies de cogumelos é estimado em 140.000, sendo que desse total somente 14.000 são conhecidas. Dentre as mundialmente conhecidas estão o *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), o *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Lentinus edodes* (shiitake), generos *Pleurotus* e *Ganoderma*. (KÜES; LIU, 2000, WASSER, 2002).

Os cogumelos têm chamado a atenção por serem uma ótima fonte de carboidratos, possuem alto teor de fibras dietéticas, moderadas quantidades de proteínas com muitos dos aminoácidos essenciais, além de vitaminas e minerais (CROAN, 2004). Em relação às fibras dietéticas, pode ser considerado alimento fonte, pois 100g de cogumelo pode apresentar até 62% do Valor Diário de Referência (VDR) recomendado desse nutriente (FLORIAN, 2006, MASSARO, 2006).

Além dos aspectos nutricional e medicinal, os fungos basidiomicetos tornaram-se importantes em decorrência de alguns aspectos, tais como ampla difusão como possibilidade de produzirem nutrientes através de processos de fermentação; atuarem como agentes de conservação para determinados alimentos e possibilidade de serem utilizados como agentes de biorremediação.

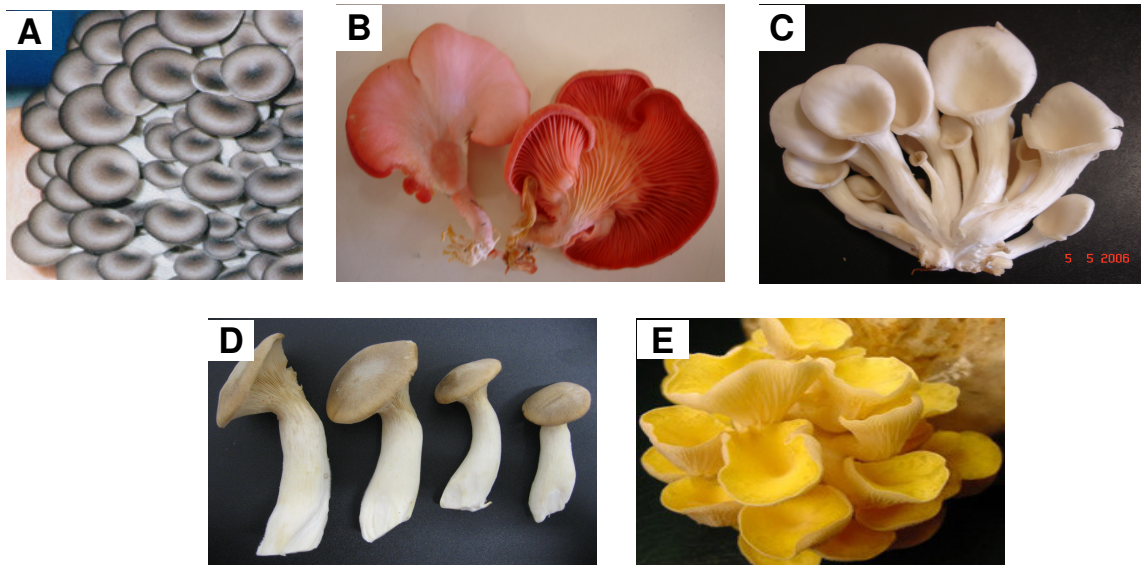
1.2 GÊNERO *Pleurotus*

Mais de 1.000 espécies de *Pleurotus* sp. foram descritas no mundo, no entanto apenas 50 destas são reconhecidas como válidas para este gênero. As dificuldades quanto à identificação taxonômica, deve-se a grande variedade de espécies e sua ampla distribuição no mundo (GUZMAN, 2000).

Os cogumelos *Pleurotus*. são popularmente chamados de ostras e pertencem à ordem Agaricales e à família Pleurotaceae. Suas espécies e linhagens oferecem uma variedade de cores como cinza-escuro, branco, marrom, amarelo, salmão entre outras.

Dentre espécies mais conhecidas estão *Pleurotus ostreatus* (shimejii), *P. ostreatoroseus* (salmão), *P. ostreatus* variedade *florida* (branco), *P. eryngii* (eryngii), *P. citrinopileatus* (amarelo) (Figura 2 A, B, C, D e E, respectivamente). Destas o *P.* amarelo é utilizado na medicina e as demais são amplamente usadas na culinária devido à suas texturas e sabores agradáveis. (KÜES; LIU, 2000, SOUZA, 2006; URBEN, 2006).

FIGURA 2 - Foto dos basidiomas de *P. ostreatus* (A), *P.ostreatoroseus* (B), *P. ostreatus* variedade *florida* (C), *Pleurotus eryngii* (D) e *P. citrinopileatus* (E), respectivamente.



FONTE: figuras A e E obtidas no site www.mycokokey.com/AAU/Mycology/Staff/MC, acessado em: 23/11/2006.

Algumas espécies de cogumelos, tais como *Pleurotus ostreatus*, *P. florida*, *P. citrinopileatus*, *P. salmoneo-stramineus*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes* e *Grifola frondosa* são capazes de realizar a lise e absorção dos compostos constituintes das fibras vegetais em toda a sua integridade. A biodegradação da lignina é um processo oxidativo, que pode ser realizado por um grupo de basidiomicetos, conhecidos por fungos da "podridão branca". Esses fungos recebem este nome pela coloração que a madeira adquire após ser colonizada e são os únicos organismos capazes de converter a lignina em CO₂ e H₂O. Estes cogumelos possuem enzimas extracelulares como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases, que podem modificar e degradar a lignina, desta forma possuem a capacidade de crescer em troncos de árvores vivas ou mortas (MARTINEZ et al., 2001; CROAN, 2004; SOUZA, 2006).

1.3 PRODUÇÃO COMERCIAL DE COGUMELOS

Os resíduos agroindustriais como as cascas de café, palhas de trigo, arroz e milho, bagaço de cana-de-açúcar, folhas de bananeira, entre outros, representam a fonte mais abundante de materiais orgânicos renováveis. O cultivo de cogumelos a partir destes resíduos tem se revelado uma alternativa para o aproveitamento destes, visto que quando não têm uma utilização adequada acabam sendo queimados (BONATTI et al., 2003).

Para a produção comercial de corpos de frutificação, utiliza-se a técnica de cultivo em substrato, usando gramíneas, serragem, restos de madeira, toras de madeira e outros resíduos agroindustriais como matéria-prima (Figura 3). Este cultivo pode ser realizado em frascos, sacos plásticos e em toras de madeira (CROAN, 2004; SOUZA, 2006, URBEN, 2006).

Ao final do cultivo obtêm-se um produto de elevado valor comercial (o cogumelo), e por outro lado, um resíduo com maior potencial de aplicação em ração animal, uma vez que foi observado que este material tem uma melhor digestibilidade quando comparado ao material não colonizado pelo fungo (MATILA; SUONPÄÄ; PIIRONEN, 2000, BONATTI et al., 2003).

FIGURA 3 – Técnicas de produção de basidiomas por cultivo em substratos



A = cultivo de *P.ostreatus* em vidros; **B** = cultivo *Lentinus edodes* em tora de castanheira; **C** = cultivo *Lentinus edodes* em saco plástico; **D** = cultivo de *Agaricus bisporus* em saco plástico.
FONTE:Figuras A, B e C www.mycology.com/AAU/Mycology/Staff/MC, acessado em: 23/11/2006

Nas últimas décadas, o cultivo comercial de cogumelos se expandiu por todo o mundo e representa uma importante atividade comercial devido ao seu valor gastronômico e medicinal. São produzidos, anualmente, quatro milhões de toneladas e os maiores produtores são Estados Unidos, França, Holanda, China e Japão. Dentre as espécies mais cultivadas estão *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, e *Pleurotus sp.* (KÜES; LIU, 2000; MASSARO, 2006).

No Brasil, a produção de cogumelos está basicamente restrita as regiões Sul e Sudeste do país. A produção anual em 2004 foi de 28.000 toneladas, sendo deste total 13.500 representada pelo cultivo de *Agaricus blazei* e *Agaricus bisporus* (MATILA; SUONPÄÄ; PIIRONEN, 2000; URBEN, 2006).

O cultivo comercial do gênero *Pleurotus*, iniciou-se nos Estados Unidos por volta de 1900 e nos anos seguintes foi introduzido na Índia e Europa. As primeiras espécies do gênero cultivadas foram *P. eryngii*. e *P. florida* em 1958, *P. flabellatus* em 1962, *P. cystidiosus* em 1969, *P. sajor-caju* em 1974, e *P. citrinopileatus* em 1981. Assim que o cultivo foi iniciado, estes se

transformaram em uma história de sucesso (KÜES; LIU, 2000). Uma das razões para a alta produção é o cultivo relativamente simples destes cogumelos, a fácil adaptação a diferentes substratos e a sua alta produtividade. Crescem em temperaturas entre 20 e 25°C, consideradas ideais para o cultivo no sul do país e dispensam a compostagem, necessária ao cultivo de alguns fungos como os do gênero *Agaricus* (GUNDE-CIMERMAN, 1999, KÜES; LIU, 2000; SOUZA, 2006).

Apesar da produção dos cogumelos estar em expansão e destes organismos serem utilizados mundialmente, há séculos, como alimentos e medicamentos, os brasileiros ainda não possuem o hábito de consumir este tipo de produto. Este fato estaria relacionado com a falta de informação sobre o produto, o custo um tanto elevado e o desconhecimento das técnicas de preparo e formas de utilização dos cogumelos e ao fator cultural (DUPRAT; SOUZA, 2003). O consumo per capita no país ainda é muito baixo, apenas 30 gramas por ano, contra 4 quilos na França e 1,3 na Itália (DUPRAT; SOUZA, 2003).

1.4 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Os polissacarídeos representam uma classe de macromoléculas estruturalmente diversas, constituídas por unidades monossacarídicas unidas através de ligações glicosídicas. Apresentam estruturas heterogêneas e de propriedades individuais, alguns são utilizados em setores industriais, como farmacêutico, alimentício, cosmético, químico, têxtil dentre outras como substâncias emulsificantes, texturizantes, estabilizantes e espessantes.

Dentre os componentes químicos presentes nos basidiomicetos, os mais importantes são os polissacarídeos. Estes podem ser isolados do corpo de frutificação, do micélio ou provenientes das culturas puras destes organismos em laboratório na forma de exopolissacarídeos. Nas últimas décadas, os polissacarídeos têm sido amplamente estudados, principalmente, pelas atividades biológicas que apresentam como ação antitumoral, imunomoduladora, antiinflamatória, anticoagulante entre outras (KAWAGASHI et al., 1989, SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002, ZAIDMAN et al., 2005).

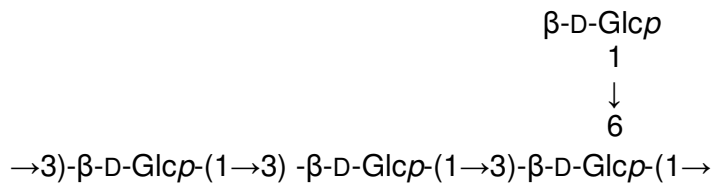
Com relação aos polissacarídeos do corpo de frutificação, as glucanas (homopolissacarídeos) e as heterogalactanas (heteropolissacarídeos) são as mais comumente encontradas (WASSER, 2002; BORCHERS, KEEN, GERSHWIN, 2004; ZHANG et al., 2007).

1.4.1 Homopolissacarídeos

Em relação aos homopolissacarídeos, as glucanas são as estruturas mais abundantes em basidiomicetos. Estas moléculas são classificadas em α , β e α/β glucanas e podem ser encontradas intracelularmente, como constituintes da parede celular e na forma de exopolissacarídeos (RUIZ-HERRERA, 1991). Dentre as glucanas que já foram descritas para basidiomicetos, as β -D-glucanas são as mais comuns, apresentam-se tanto lineares como ramificadas, com diferentes pesos moleculares.

O polissacarídeo comumente encontrado apresenta estrutura química, formada por uma cadeia principal constituída por unidades de β -glucose ligadas (1 \rightarrow 3), pode apresentar substituições em O-6 por uma única unidade de β -glucose, a cada três unidades da cadeia principal (Figura 4).

FIGURA 4 - Esquema da estrutura química do polissacarídeo mais comumente encontrado em basidiomicetos.



Esta estrutura de polissacarídeo (Figura 4) foi isolada em diversos basidiomicetos tais como: *Sclerotium glucanicum* (scleroglucan) (JOHNSON et al., 1963), *Boletus erythropus* (CHAUVEAU et al., 1996), *Ganoderma applanatum* (USUI; IWASAKI; MIZUNO, 1981), *Grifora frondosa* (MIZUNO et al., 1986), *G. umbellata*, *Schizophyllum commune* (schizophyllan) (TABATA;

ITO; KOJIMA, 1981), *Pleurotus ostreatoroseus*, *P. eryngii* (CARBONERO et al., 2006), *Lentinus edodes* (lentinan) (SASAKI; TAKASURA, 1976).

Há um grande interesse neste tipo de polissacarídeo, devido, principalmente, a atividade antitumoral (SASAKI; TAKASURA, 1976; JONG; DONOVICK, 1989) e antiinflamatória apresentada por estas moléculas (HARA et al., 1982).

Estruturas similares foram descritas para outros basidiomicetos, mas com diferentes graus de ramificação. Da espécie *Volvariella volvacea*, foi isolado e caracterizado um polissacarídeo com estrutura moderadamente ramificada. A cadeia principal é similar à descrita anteriormente, as cadeias laterais são representadas por unidades únicas de β -Glc_p ligadas à cadeia principal por ligações (1→6), que estão presentes a cada cinco ou seis unidades da cadeia principal (KISHIDA; SONE; MISAKI, 1989).

Do corpo de frutificação de *Auricularia aurricula-judae*, foi isolada, uma estrutura semelhante, só que neste caso a substituição ocorre em duas unidades de cada três unidades da cadeia principal (MISAKI et al., 1981). Para este mesmo basidiomiceto foi caracterizada uma glucana insolúvel em água, a qual apresenta estrutura mais ramificada, a cadeia principal é formada de unidades de β -D-Glc_p-(1→6), esta apresenta substituições em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glc_p ou por cadeias curtas de β -D-Glc_p-(1→6) ligadas (SONE; KAKUTA; MISAKI, 1978).

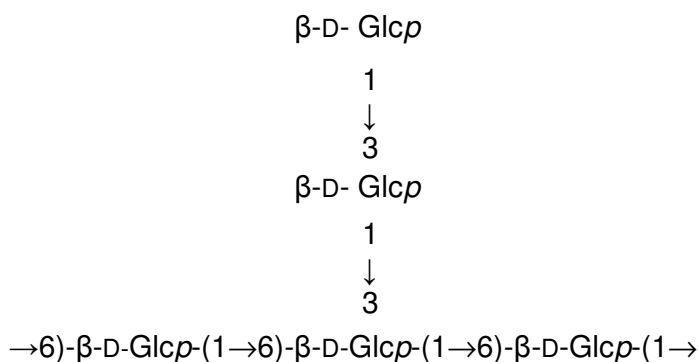
No exopolissacarídeo de *Pleurotus ostreatus*, um polímero com estrutura similar foi isolado, sendo denominado de pleurana. Este se apresentou constituído por cadeia principal formada por unidades de β -Glc_p-(1→3), sendo parte destas substituídas em O-6 por ramificações de β -Glc_p que se encontram a cada quatro unidades da cadeia principal. A estrutura também apresentava pequenas proporções de ligações (1→6) e (1→4), porém não é relatada a localização exata destas ramificações (KARACSNONYI; KUNIAK, 1994). A partir do basidioma de *Pleurotus ostreatus* (YOSHIOKA et al., 1985) e de *Flammulina velutipes* (SMIDERLE et al., 2006) foi caracterizado a mesma glucana, porém esta apresentou somente ramificações em O-6 por terminais não redutores de β -Glc_p.

A partir das espécies *Ganoderma japonicum* e *Pleurotus tuber-regium* (UKAI et al., 1982) (CHENGHUA et al., 2000), foram isoladas glucanas insolúveis em água com cadeia principal constituída por unidades de β -Glc p -(1 \rightarrow 3), possuindo cadeias laterais de uma única unidade de β -Glc p -(1 \rightarrow 6), que aparecem a cada 30 unidades da cadeia principal.

Estruturas de β -glucanas com cadeias principais (1 \rightarrow 6), apresentando diferentes tipos de ligação e diferentes graus de substituição, também já foram descritas para basidiomicetos.

Em *Agaricus blazei* foi isolado do corpo de frutificação uma β -D-Glc p -(1 \rightarrow 6), substituídas em O-3 por cadeias laterais de β -D-Glc p -(1 \rightarrow 3). (Figura 5) (DONG et al., 2002).

FIGURA 5 – Estrutura da β -glucana (1 \rightarrow 6) (1 \rightarrow 3) de *Agaricus blazei* (DONG et al., 2002).



Além das estruturas citadas anteriormente para *Agaricus blazei*, foi isolada uma estrutura que apresenta ácidos urônicos, trata-se de uma β -glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) contendo cerca de 4% de ácido glucurônico (MIZUNO et al.; 1990a). Além desta espécie outras apresentaram estruturas contendo ácidos urônicos, como *Grifola frondosa* (MIZUNO et al., 1986).

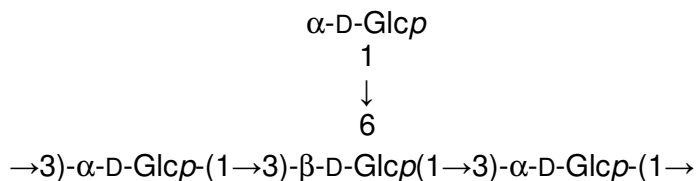
As glucanas lineares também foram encontradas em basidiomicetos, sendo a glucana linear β -D-Glc p -(1 \rightarrow 6) descrita para *Agaricus blazei* uma das mais importantes, devido à atividade antitumoral apresentada por este tipo de molécula (KAWAGASHI et al., 1989; BORCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004; ZAIMAN et al., 2005, ZHANG et al., 2007). Entretanto os polissacarídeos

(glucanas) mais freqüentemente encontrados são os com estruturas de β -D-Glcp(1 \rightarrow 3). Estes foram isolados dos cogumelos *Armillaria mellea* (FRASER; LINDBERG, 1967), *Ganoderma tsugae* (WANG et al., 1993), *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI et al., 2004) e *Termitomyces eurhizus* (CHAKRABORTY et al., 2006).

Além das β -glucanas, estruturas com configuração tipo α foram descritas para basidiomicetos. A partir de *Grifola frondosa* foi isolada uma glucana α -D-Glcp(1 \rightarrow 4), com substituição em O-6 por α -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal. Uma α -D-Glcp(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 4) foi descrita para *Agaricus blazei* (MIZUNO et al., 1990b) e para *Tricholoma giganteum* (MIZUNO et al., 1995).

Glucanas apresentando configurações α e β estão presentes na literatura. Em *Astraeus hygrometricus* foi observado um polímero linear apresentando unidades alternadas de α e β -D-Glcp unidas, respectivamente, através de ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) (CHAKRABORTY et al., 2004). Recentemente, de *Pleurotus variedade florida* foi isolada uma glucana com configurações α e β , a qual apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de α -D-Glcp e β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3) (numa proporção de 2:1), sendo que algumas unidades de β -D-Glcp apresentam-se substituídas em O-6 por uma unidade de α -D-Glcp (Figura 6) (ROUT et al., 2005).

FIGURA 6 – Estrutura da glucana, com configuração α e β , de *P.variedade florida* (ROUT et al., 2005).

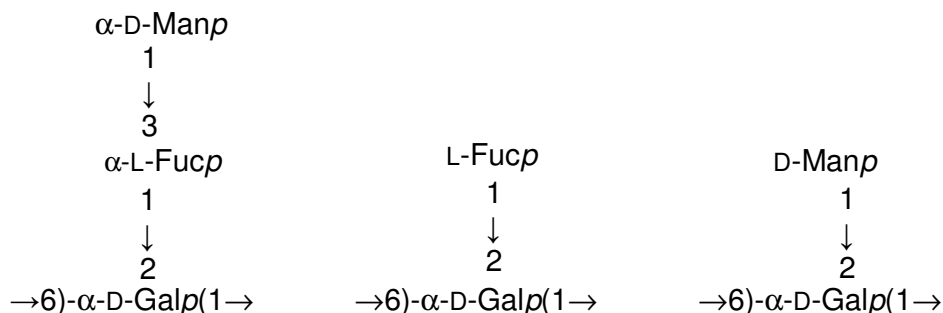


1.4.2 Heteropolissacarídeos

Quanto aos heteropolissacarídeos, as heterogalactanas representam os polímeros mais comumente encontrados. Estes polissacarídeos apresentam uma estrutura comum consistindo de uma cadeia principal de unidades α -D-

Galp ligadas (1→6), parte da qual se encontra substituída em O-2 por unidades de D-Manp, L-Fucp e também por 3-O-α-Manp-L-Fucp (Figura 7).

FIGURA 7 – Esquema da estrutura da heterogalactana comum à maioria dos basidiomicetos.

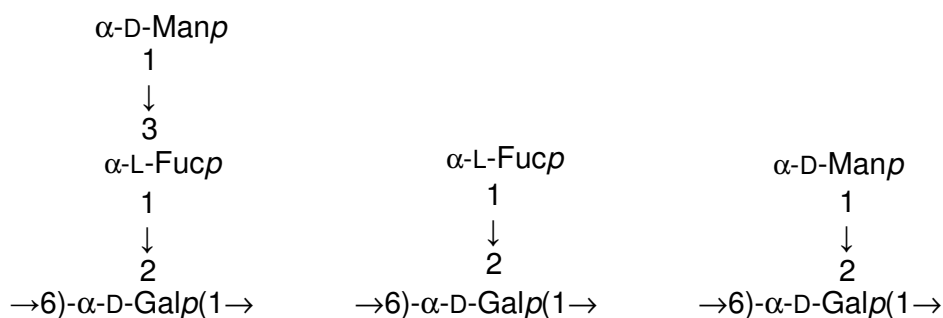


Algumas heterogalactanas podem conter outras cadeias laterais adicionais como 4-O-Ac-Fucp, 6-O-(3-O-Me-α-D-Galp)-D-Galp, unidades únicas de Galp, ou cadeias curtas compostas por unidades de α-D-Galp ligadas (1→2) e (1→3).

Um dos primeiros trabalhos relatando a presença de heterogalactanas foi realizado com o basidiomiceto *Polyporus giganteus*, neste foi isolado um polissacarídeo com cadeia principal de α-D-Galp (1→6), sendo substituída em O-2 por 3-O-β-D-Manp-β-L-Fucp (BRAVANANDAN; BOUVENG; LINDBERG, 1964). Posteriormente, foi observado em *Polyporus fomentarius* e *Polyporus igniarius*, heterogalactanas com o mesmo tipo de cadeia principal, porém estas apresentam substituições em O-2 por unidades de terminais não redutores de L-Fucp e D-Galp (BJÖRNDAL; LINDBERG, 1969).

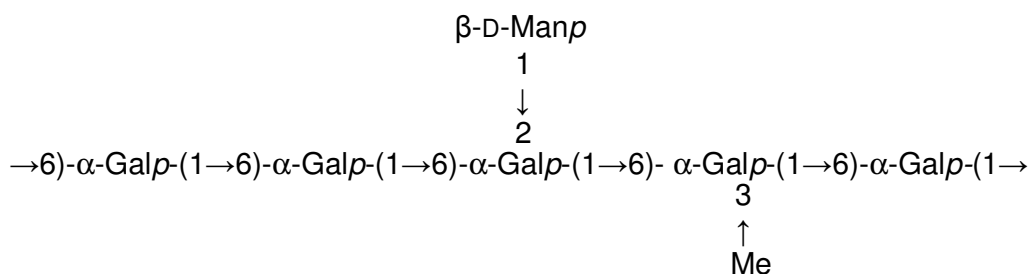
Da espécie *Laetiporus sulphureus* foi isolada uma fucomanogalactana, que apresentou cadeia principal formada de unidades de galactose unidas por ligações glicosídicas α-(1→6). Esta estrutura é similar à cadeia das outras heterogalactanas presentes em basidiomicetos, no entanto difere das demais nas suas estruturas de cadeia laterais, formadas por unidades de α-L-Fucp, α-D-Manp e 3-O-α-manose-L-fucose (Figura 8) (ALQUINI et al., 2004).

FIGURA 8 – Estrutura da fucomanogalactana de *L. sulphureus* (ALQUINI et al., 2004).



No gênero *Pleurotus*, as espécies *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* variedade *florida* e *P. ostreatus*, apresentaram heterogalactanas, com cadeia principal formada por unidades de $\alpha\text{-D-Galp}$ e $3\text{-O-Me-}\alpha\text{-D-Galp}$ ligadas (1 \rightarrow 6), sendo parte destas unidades substituídas em O-2 por unidades de $\beta\text{-D-Manp}$ (Figura 9) (ROSADO et al., 2003; JAKOVLJEVIĆ et al., 1998). Heterogalactanas contendo cadeia principal similar a encontrada neste gênero foi observada apenas em *Armillaria mellea*, porém as cadeias laterais são distintas (FRASER; LINDBERG, 1967).

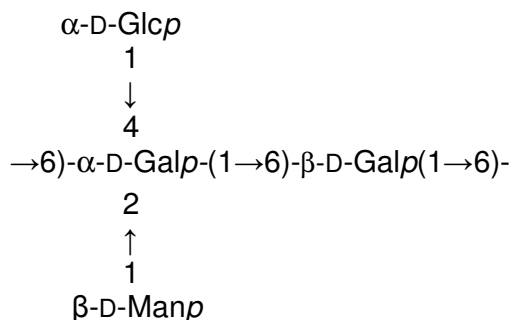
FIGURA 9 - Esquema da estrutura descrita em *Pleurotus ostreatus* variedade *florida* e *P. ostreatoroseus* (ROSADO et al., 2003).



Recentemente, foi isolada a partir de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida* uma heterogalactana. O polissacarídeo foi isolado através de extração aquosa do corpo de frutificação e foi utilizada como processo de purificação solução salina (NaCl.1%). A heterogalactana caracterizada apresentou-se formada por cadeia principal de unidades alternadas de $\alpha\text{-D-Galp}$ e $\beta\text{-D-Galp}$

ligadas (1→6), sendo as unidades de α -D-Galp substituídas em O-2 e O-4 por β -D-Manp e α -D-Glcp, respectivamente. (Figura 10) (ROUT et al., 2006).

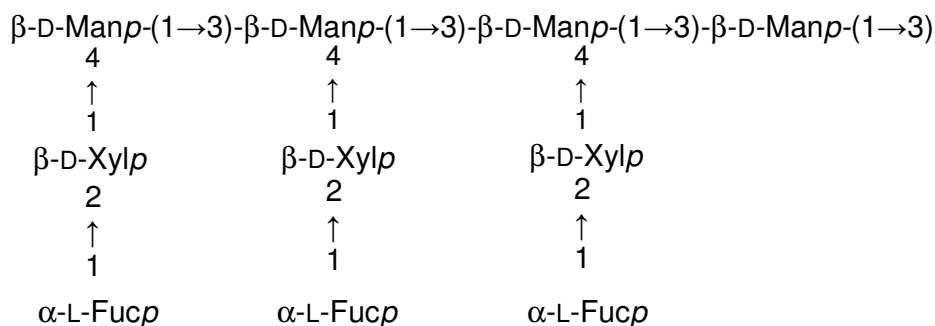
FIGURA 10 – Estrutura proposta para a heterogalactana de *P. florida* (ROUT et al., 2006).



Além das heterogalactanas, foi relatada a presença de outros heteropolissacarídeos, como as xilomananas e as fucoxilomananas. Estas apresentam uma cadeia principal de unidades de manose podendo apresentar, principalmente, ligações do tipo β -(1→3) ou α -(1→3), as quais podem ser substituídas em O-4 por diferentes cadeias laterais.

A partir de *Polyporus pinicola* e *Fomes annosus*, foi descrita uma fucoxilomanana que apresentou cadeia principal formada de unidades de β -D-Manp ligadas (1→3), sendo substituídas em O-4 por 2-O- α -L-Fucp- β -D-Xylp (AXELSSON; BJÖRNAL; LINDBERG, 1969) (Figura 11). Fucoxilomana, apresentando o mesmo tipo de cadeia lateral, foi observada em *Ganoderma lucidum*, porém esta apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de D-Manp (1→4), sendo estas substituídas em O-3 (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1981).

FIGURA 11 – Esquema da estrutura da fucoxilomanana de *Polyporus pinicola* (AXELSSON; BJÖRNAL; LINDBERG, 1969).



Dentre os polissacarídeos de basidiomicetos que atuam como agentes antitumorais, as glucanas são as que apresentam maior atividade, possuem cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp-(1→3), ramificadas em O-6 por unidades únicas de β -D-Glcp e também como glucanas lineares com ligações do tipo β -(1→6) (MIZUNO, 1999, WASSER; WEISS, 1999; WASSER, 2002; BORCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

Como exemplos de β -D-Glcp-(1→3) (1→6) com ação antitumoral, encontram-se, principalmente, a “lentinana” isolada de *Lentinus edodes* (MIZUNO; MINATO; TSUCHIDA, 1996; HOBBS, 2000) e a “schizophyllan” de *Schizophyllum commune* (TABATA: ITO; KOJIMA, 1981), ambas foram patenteadas e são utilizadas comercialmente. Com relação às β -D-glucanas (1→6), àquela isolada de *Agaricus blazei* é a que se apresenta mais eficaz.

Dentre estas moléculas, a lentinana foi o polissacarídeo mais estudado, mostrando proeminente atividade antitumoral sobre diferentes tipos de tumores, como a utilização no tratamento de câncer de estômago recorrente. Apesar de até o momento não se conhecer qual seria o mecanismo de ação destas substâncias, sabe-se que a lentinana não é tóxica às células tumorais, mas inibe o crescimento do mesmo por estimular o sistema imunológico (MIZUNO; MINATO; TSUCHIDA, 1996). A lentinana apresentou maior efeito antitumoral quando comparada aos polissacarídeos derivados de outros fungos (incluindo líquens) e de plantas superiores (WASSER, 2002).

Polissacarídeos com ação antiviral foram isolados do corpo de frutificação e do micélio de *Antrodia camphorata*, os quais exibiram efeito contra o vírus da hepatite B, sendo que alguns destes apresentaram-se mais eficientes do que os medicamentos atualmente usados no tratamento da doença (LEE et al., 2002).

Dentre os polissacarídeos obtidos do gênero *Pleurotus* que apresentam atividade biológica encontram-se a α -glucana de *P. ostreatus*, que inibiu a proliferação de células cancerígenas no colo de útero em modelo animal (LAVI et al. 2006). O extrato seco e uma β -glucana isolada deste mesmo cogumelo, os quais apresentaram efeito redutor sobre os níveis de colesterol total quando testado em ratos (BOBEK; OZDIN; KUNIAK, 1997).

A partir do corpo de frutificação de *Pleurotus pulmonaris*, 16 frações polissacarídicas demonstraram diferentes níveis de atividade antitumoral (ZHUANG et al., 1993; ZAIDMAN et al., 2005).

Kim e colaboradores (2006) observaram que o extrato bruto de *Pleurotus eryngii*, aumenta o metabolismo ósseo com a estimulação na formação de osteoblastos em ratos com osteoporose, no entanto, as substâncias responsáveis por esta ação não foram descritas.

Ainda dentro do gênero *Pleurotus*, os polissacarídeos presentes em *P. citrinopileatus* (amarelo), apresentaram ação hipoglicemiante (HU et al., 2006) e hepatoprotetora.

Em relação à espécie *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*, que é o material de estudo do trabalho, não há relatos na literatura de testes de atividade biológica envolvendo a espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar a caracterização estrutural dos polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento deste objetivo geral, o trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- a) Extrair os polissacarídeos do basidioma, através de extrações aquosas e alcalina com hidróxido de potássio a 2 %;
- b) Purificar as frações polissacarídicas obtidas, utilizando diferentes metodologias ;
- c) Caracterizar estruturalmente as frações polissacarídicas, utilizando métodos químicos e técnicas analíticas de RMN-¹³C e ¹H e GC-MS.
- d) Comparar as estruturas dos polissacarídeos obtidos no trabalho, com as estruturas descritas para basidiomicetos presentes na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

O corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatus* variedade. *florida* foi obtido no Mercado Municipal de Curitiba, em maio de 2006.

O cogumelo foi cultivado pela técnica de cultivo em substrato em sacos plásticos, utilizando palha de trigo como matéria prima (Figura 13). Este foi realizado pela Empresa Makoto Yamashita localizada na cidade de São José dos Pinhais, PR.

FIGURA 13 - Foto do cultivo em substrato (palha de trigo) de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*



3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO

O material foi limpo e liofilizado, obtendo-se um peso seco de 196,0 g e após trituração foi submetido aos processos seqüenciais de extração e purificação conforme descritos a seguir.

3.2.1 Extração Aquosa à Temperatura Ambiente

O material limpo, primeiramente, foi submetido a extração aquosa (3 L) a temperatura ambiente, sob agitação mecânica por 6 h (3 x). Após cada etapa, o material foi centrifugado para a separação do extrato aquoso (extrato aquoso I)

e do material residual (9000 r.p.m., 15 min., 25°C). O extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida até pequeno volume e precipitado com etanol (3:1 v/v). O precipitado etanólico (fração W-Pf), foi dialisado contra água corrente por 48 horas e liofilizado.

3.2.2 Extração Aquosa com Água Fervente

O resíduo da extração aquosa a frio (Material Residual I) foi submetido a extração aquosa, sob refluxo em banho com água fervente por 6 horas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após o tempo de extração, o material foi filtrado e o extrato aquoso a quente obtido foi concentrado, sob pressão reduzida, até pequeno volume. Com a finalidade de obter os polissacarídeos, o extrato aquoso I foi tratado com etanol (3:1 v/v), sendo o precipitado etanólico (fração W2-Pf) dialisado e liofilizado.

3.2.3 Extração Alcalina

O material residual da extração anterior foi tratado com solução aquosa de hidróxido de potássio a 2% (KOH 2%), sob refluxo em banho com H₂O fervente, na presença de boroidreto de sódio (NaBH₄) para evitar degradação das cadeias polissacarídicas (6 x). O extrato alcalino obtido foi filtrado, neutralizado com ácido acético, dialisado e liofilizado, resultando na fração denominada K2-Pf.

3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Com a finalidade de purificação dos polissacarídeos, as frações obtidas através das extrações realizadas (W-Pf, W2-Pf e K2-Pf) foram submetidas aos processos de fracionamento, tais como congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984), precipitação com solução de Fehling (precipitação por

formação de complexo solúvel e insolúvel em Cu^{2+}) (JONES; STOODLEY, 1965) e diálises em membranas de 1000 kDa.

3.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

As frações W-Pf, W2-Pf e K2-Pf foram fracionadas, através do processo de purificação por congelamento e degelo. Cada fração foi solubilizada em água destilada e a seguir submetida ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. Os precipitados insolúveis em água fria (PW, PW2 e PK2, respectivamente) foram separados dos demais componentes solúveis (SW, SW2 e SK2, respectivamente) por centrifugação (9000 r.p.m., 15 min, 25°C). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante aquoso não apresentasse material insolúvel em água fria (GORIN; IACOMINI, 1984).

3.3.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling

Os sobrenadantes do processo de congelamento e degelo (SW, SW2 e SK2) foram submetidos a precipitação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste de duas soluções (A e B), sendo a solução A composta por tartarato de sódio e potássio e KOH (173 g + 125 g / H_2O q.s.p. 500 mL, respectivamente), enquanto que a B consiste de sulfato de cobre 5. H_2O (CuSO_4) (55,7 g / H_2O q.s.p. 500 mL).

Às frações solúveis em água fria (SW, SW2 e SK2), que foram dissolvidas em água destilada (30 - 50 mL) suficiente para solubilizá-las, adicionou-se igual volume da solução de Fehling (A + B). Após vigorosa agitação com barra magnética, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas.

Decorrido o tempo, os complexos cúpricos insolúveis formados foram separados por centrifugação (9000 r.p.m., 15 min, 25°C). As frações obtidas, precipitados (PFW, PFW2 e PFK2) e sobrenadantes de Fehling (SFW, SFW2 e SFK2), foram neutralizadas com ácido acético (HOAc), dialisadas contra água corrente (~ 48 h) e então deionizadas por resinas Dowex na forma catiônica.

Após diálises, os materiais foram concentrados em rotaevaporador e liofilizados.

3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálises em Membranas

As frações que se mostraram heterogêneas após tratamento com solução de Fehling foram submetidas a diálises em membranas com limite de exclusão de 1000 kDa (Spectra/Por[®]).

A purificação destes polissacarídeos foi realizada por diálise fechada, contra água destilada, sendo o material a ser dialisado mantido sob agitação magnética. O processo foi interrompido quando a água de diálise apresentou reação negativa para carboidratos por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Hidrólise Ácida Total

Uma alíquota de cada fração (1 - 2 mg) foi tratada com 1 mL de TFA 1 M (ácido trifluoroacético) (12-15 horas) ou com TFA 2 M (8 horas) em estufa a 100°C. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação a temperatura ambiente. Os produtos hidrolisados foram levados a redução e acetilação como explicado no item 3.4.2.

3.4.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

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

Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac_2O) e piridina (1:1 v/v) (WOLFROM; THOMPSON, 1963b) a temperatura ambiente formando os acetatos de alditóis, os quais foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida com solução de sulfato de cobre 5%. Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após secar, os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

3.4.3 Análises de Metilação das Frações Polissacarídicas

As frações polissacarídicas puras (2 - 5mg) foram metiladas pelos métodos de CIUCANU e KEREK (1984) ou HAWORTH (1915).

No primeiro método, uma alíquota da fração polissacarídica (2-5 mg) foi dissolvida em 1 mL de dimetilsulfóxido (Me_2SO). Após a solubilização, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) seco e triturado (4:1 de carboidrato). A solução foi mantida sob agitação e, então, foi adicionado iodeto de metila (CH_3I) na proporção (1:200:50) em gramas $\text{CH}_3\text{I}/\text{NaOH}/\text{carboidrato}$ recomendada pelo laboratório. Após 24 horas, a amostra foi neutralizada com ácido acético, dialisada, exaustivamente, contra água corrente, liofilizada (2 x).

No segundo método, uma alíquota do material (10 mg) foi solubilizada em água destilada, tratada com boridreto de sódio (~12 h), dialisada contra água corrente e liofilizada. Em seguida esta foi solubilizada em 3 mL de uma solução aquosa de NaOH 40% (p/v), a qual foi mantida sob agitação constante, sendo adicionados 0,5 mL de dimetilsulfato (DMS) a cada 30 min. Terminada a adição de DMS, a reação foi mantida sob agitação *overnight*. Decorrido o tempo, o material foi dialisado e liofilizado.

Os polissacarídeos parcialmente O-metilados foram hidrolisados com H_2SO_4 50 % (v/v; 0,5 mL) e deixados sob refrigeração por 1 hora, a seguir foram diluídos até 5,5% (v/v) com adição de 4,0 mL de água destilada. O material foi mantido a 100°C por 12-18 horas, seguido por neutralização com BaCO_3 (SAEMAN et al., 1954), o qual foi removido por centrifugação. Os

produtos hidrolisados foram reduzidos com boroidreto de sódio deuterado (NaB^2H_4) (~12 h) e acetilados como citado no item 3.4.2.

Os derivados metilados foram analisados na forma de acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados por GC-MS, e seus perfis de espectros de eletro impacto comparados com aos derivados descritos na literatura (JANNSON et al., 1976; CARPITA; SHEA, 1987, SASSAKI et al., 2005a; SASSAKI et al., 2005b).

3.4.4 Degradação Controlada de Smith

Alíquotas dos polissacarídeos foram dissolvidas em água e acrescidas de periodato de sódio (NaIO_4) até atingir uma concentração final de 0,05 M. Cada solução foi mantida por 72 ou 96 horas sob ausência de luz. Decorrido o tempo, o material oxidado, após neutralização com HOAc, foi dialisado contra água corrente (~24 h). A solução foi reduzida com NaBH_4 (pH 9-10) por 24 horas (ABDEL-AKHER et al., 1952) e dialisada contra água corrente por 48 horas.

Os polissacarídeos previamente oxidados com NaIO_4 foram submetidos à hidrólise ácida parcial com TFA, pH 2,0 por 30 minutos, sob refluxo em banho com água fervente. A solução foi neutralizada e submetida à diálise fechada, em membranas com limite de exclusão de 2 kDa.

Na análise da fração MRSFW2, esta foi submetida a três ciclos de Degradação Controlada de Smith, os materiais obtidos foram denominados de 1DSMR, 2DSMR e 3DSMR, respectivamente. Quando estes foram hidrolisados e dialisados, as águas de diálise denominadas de HD-1DS e HD-2DS foram concentradas e analisadas em GC-MS.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300

acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800 e Varian Saturn 2000R, equipados com colunas capilares de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestidas DB-225 ou DB 23. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50°C (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de 40°C.min⁻¹ até 215°C (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou 220°C (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL. min⁻¹.

3.5.2. Determinação da Homogeneidade por Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS)

Para as análises de homogeneidade, as amostras foram solubilizadas em um solução de nitrito de sódio (NaNO₂) contendo azida (NaN₃) para uma concentração final de 1 mg /mL, e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm (Millipore). Estas foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10⁶, 4×10⁵, 8×10⁴ e 5×10³.

3.5.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN-¹³C, RMN-¹³C-DEPT e, ¹H, ¹³C HMQC foram realizados em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400.

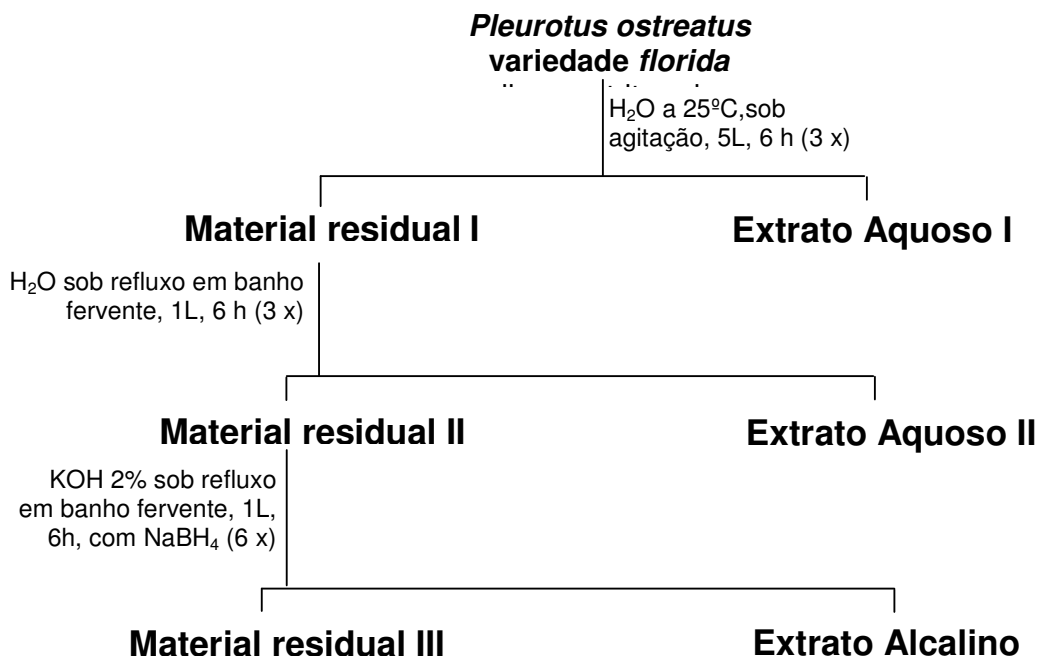
As análises foram realizadas a 50°C ou 70°C, com as amostras de polissacarídeos (~ 40 mg), solubilizadas em D₂O (óxido de deutério) ou Me₂SO-*d*₆, dependendo da sua solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D₂O foram expressos em ppm (δ) relativos aos sinais de ¹³C e ¹H da acetona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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho de pesquisa foram estudados os polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*.

Conforme descrito anteriormente (Material e Métodos), o cogumelo foi submetido a um processo seqüencial de extração aquosa (25°C e água fervente) e alcalina com solução de hidróxido de potássio a 2% (Figura 14), resultando em extratos brutos denominados de Extrato aquoso I (W), Extrato aquoso II (W2) e Extrato alcalino (K2).

FIGURA 14 – Fluxograma geral das etapas de extração dos polissacarídeos a partir do corpo de frutificação de *P. ostreatus* variedade *florida*



Os extratos brutos aquoso I, aquoso II e alcalino foram purificados (Figura 15) e fracionados, (Figuras 16, 20 e 28), através das metodologias descritas em material e métodos.

Os extratos brutos (W, W2 e K2), foram submetidos ao processo de congelamento e degelo, resultando em precipitados (PW, PW2 e PK2) e

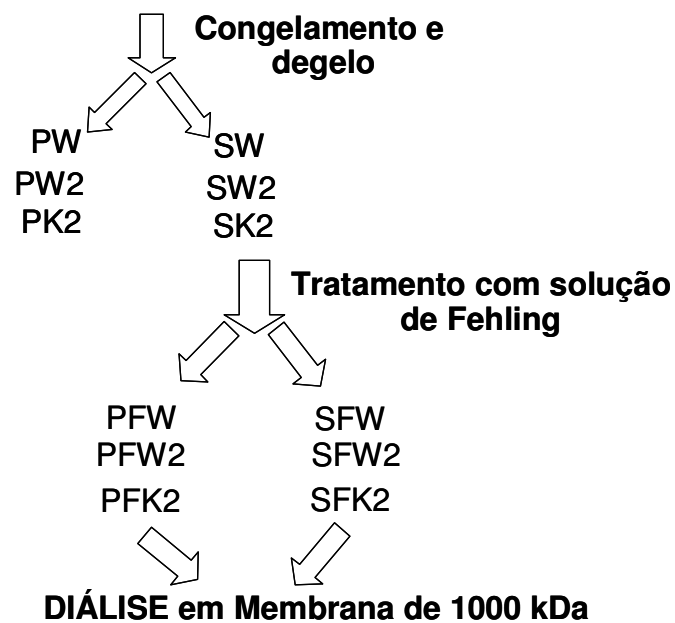
sobrenadantes (SW, SW2 e SK2) de congelamento e degelo. Os sobrenadantes foram tratados com solução de Fehling, formando precipitados (PFW, PFW2 e PFK2) e sobrenadantes de Fehling (SFW, SFW2 e SFK2). Quando o uso destas duas metodologias não se mostrou suficiente para promover a purificação das frações, estas foram dialisadas em membranas de 1000 kDa. Para melhor entendimento cada extrato será discutido em detalhes posteriormente.

.FIGURA 15 – Fluxograma geral das etapas de purificação dos extratos brutos W, W2 e K2.

W → Extrato Aquoso I

W2 → Extrato Aquoso II

K2 → Extrato Alcalino

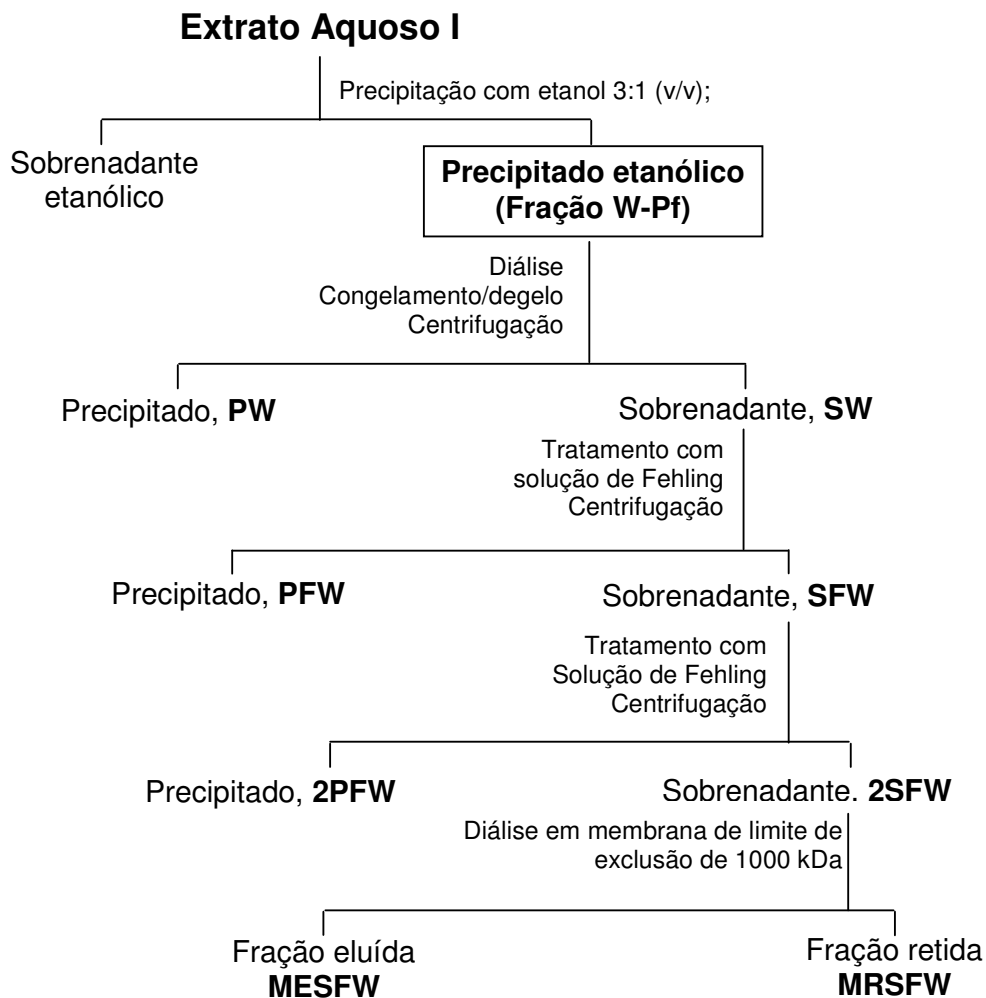


4.1 EXTRATO AQUOSO A FRIO (EXTRATO I)

O cogumelo liofilizado foi submetido a extrações aquosas a temperatura ambiente por seis horas (três vezes) (Figura 14).

O extrato aquoso resultante desta etapa foi precipitado com etanol 3:1(v/v), originando a fração denominada W-Pf (rendimento de 4,6%) que apresentou manose (16,0%), 3-O-Me-Galactose (3,0%), galactose (21,0%) e glucose (60,0%) como constituintes monossacarídicos (Tabela 1).

FIGURA 16 – Esquema de purificação do extrato aquoso a frio de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*.



Como citado anteriormente, a fração (W-Pf) foi submetida ao processo de purificação por congelamento e degelo, resultando uma fração insolúvel (PW rendimento: 0,45%), que se apresentou constituída por Man (5,4%). Gal (3,7%) e Glc (90,9%), e outra solúvel em água fria (SW rendimento: 2,04%) formada por manose, galactose e glucose (Tabela 1). A fração solúvel foi tratada com solução de Fehling, resultando em um precipitado de Fehling (PFW; rendimento: 1,00%) e um sobrenadante de Fehling (SFW; rendimento: 0,07%), estes foram separados por centrifugação (Figura 16).

A fração PFW apresentou Man (39,0%), Gal (55,2%) e 3-*O*-Me-Gal (6,0%) como constituintes monossacarídicos, sendo o último confirmado pela presença dos fragmentos 130 e 190 *m/z* observados por GC-MS após hidrólise, redução com boroidreto de sódio deuterado (NaB²H₄) e acetilação.

TABELA 1 – Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas do extrato aquoso a frio

| COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol %) ^b | | | | | |
|---|------------------------------|---------------------------------|------|------|------|
| FRAÇÕES | Rendimento (g%) ^a | 3- <i>O</i> -MeGal ^c | Man | Gal | Glc |
| W-Pf | 4,60 | 3,0 | 16,0 | 21,0 | 60,0 |
| SW | 2,04 | - | 14,0 | 11,0 | 75,0 |
| PW | 0,45 | - | 5,4 | 3,7 | 90,9 |
| PFW | 1,00 | 6,0 | 39,0 | 55,2 | - |
| SFW | 0,07 | - | 14,0 | 11,0 | 75,0 |
| MRSFW | 0,02 | - | 3,4 | 4,6 | 92,0 |
| MESFW | 0,40 | - | 13,1 | 8,4 | 78,5 |

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (196,0 g)

^b Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

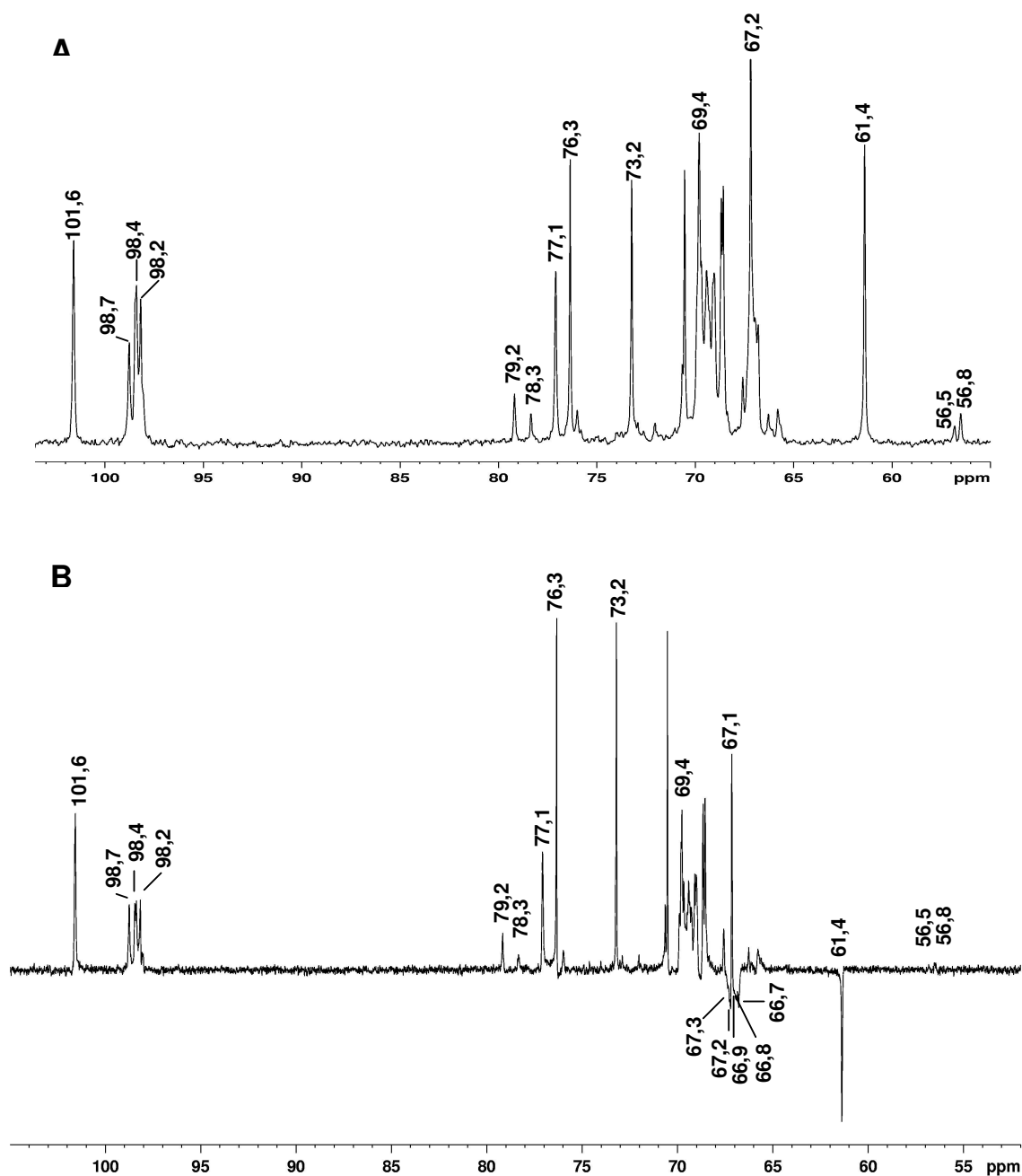
^c Confirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190 após redução com NaB²H₄.

O espectro de RMN-¹³C desta fração (PFW; Figura 17 A) apresentou na região anomérica quatro sinais principais. O sinal δ 101,6 foi atribuído aos terminais não redutores de β -D-Man_p e os demais 98,7; 98,4 e 98,2 às unidades da cadeia principal formada por α -D-Gal_p e 3-*O*-Me-Gal_p, estando estas 6-*O* e 2,6-di-*O*-substituídas.

Os cinco sinais δ 67,3; 67,2; 66,9; 66,8 e 66,7 que apareceram provavelmente devido a grande variedade de ambientes químicos, sugerem a presença de ligação do tipo (1 \rightarrow 6). Esta foi confirmada por inversão dos correspondentes sinais de $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ na análise RMN- ^{13}C -DEPT (Figura 17 B).

Outros sinais foram observados em δ 61,4; 56,5 e 56,8 e correspondem ao C-6 não substituído das unidades de Man ρ e aos grupos $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ das unidades de 3-O-Me-Gal ρ , respectivamente.

FIGURA 17 – Espectro de RMN- ^{13}C (A) e DEPT (B) da fração precipitado de Fehling (PFW) obtida por extração aquosa a frio de *P. ostreatus*.variedade.florida, em D_2O a 70°C .



A análise de metilação desta fração (PFW) apresentou os derivados parcialmente *O*-metilados (Tabela 2), coerentes com os dados de RMN ¹³ C (Figuras 17 A e B), confirmando a estrutura proposta (Figura 9).

TABELA 2 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFW) obtida de *P.ostreatus* var. *florida*

| Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^(a) | mol% | Tipo de ligação ^(b) |
|--|-------|--------------------------------|
| 2,3,4,6-Me ₄ Man | 33,5% | Man β -(1→ |
| 2,3,4,6-Me ₄ Gal | 0,5% | Gal β -(1→ |
| 2,3,4-Me ₃ Gal | 34,0% | →6)-Gal β -(1→ |
| 3,4-Me ₂ Gal | 32,0% | →2,6)-Gal β -(1→ |

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

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

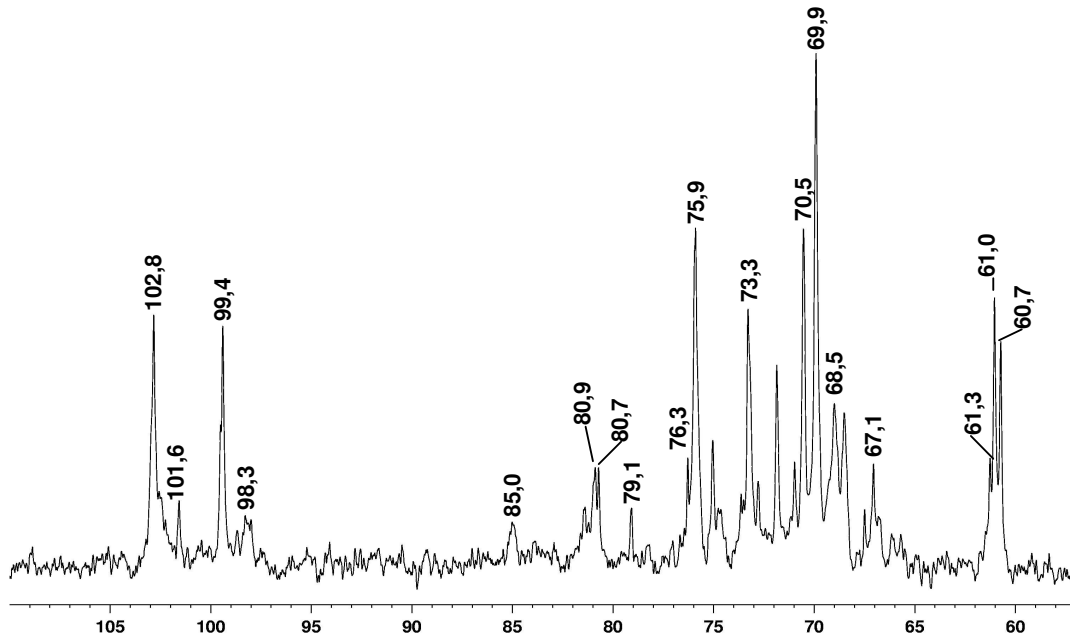
De acordo com os dados obtidos, a fração PFW consiste em uma manogalactana, com cadeia principal formada por unidades de Gal β e 3-*O*-Me-Gal β ligadas (1→6), sendo parcialmente substituídas em *O*-2 por terminais não redutores de β -Man β .

Esta estrutura já havia sido descrita anteriormente por ROSADO et al, 2003, neste mesmo basidiomiceto (*Pleurotus ostreatus* variedade *florida*), que é o foco de estudo do presente trabalho. No trabalho de ROSADO e colaboradores foram seguidas às mesmas metodologias de extração e purificação utilizadas no presente trabalho. A estrutura para o polissacarídeo (Figura 9) é similar àquela encontrada em *P. ostreatoroseus* (salmão) (ROSADO et al., 2003) e *Pleurotus ostreatus* (*shimejii*) (JAKOVLJEVIC et al., 1998).

Com relação à fração SFW, esta apresentou glucose (75,0%) como principal constituinte monossacarídico (Tabela 1).

O espectro de RMN-¹³C desta fração (Figura 18) mostrou dois principais sinais na região anomérica em δ 102,8 e 99,4 correspondentes, respectivamente, as unidades de β -Glc e α -Glc, além dos sinais de C-1 (δ 101,6; 98,7; 98,4 e 98,2) referentes à manogalactana caracterizada anteriormente.

FIGURA 18 - Espectro de RMN-¹³C da fração sobrenadante de Fehling (SFW) em D₂O a 70°C.

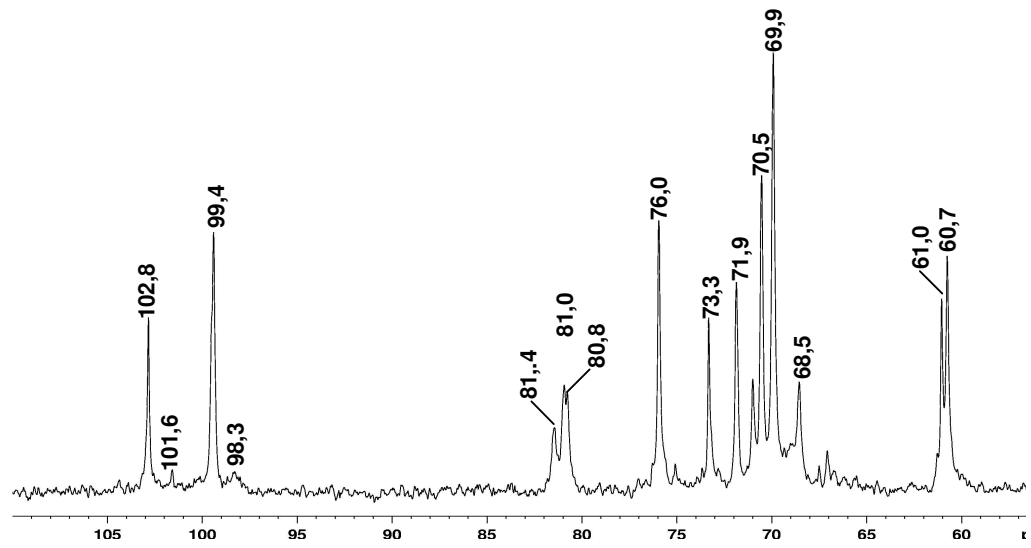


Como as metodologias de Congelamento e degelo e Tratamento com solução de Fehling não foram suficientes para promover a purificação da fração SFW, esta fração foi submetida a um processo adicional de purificação por diálise em membrana (sistema fechado) com limite de exclusão de 1000 kDa. Deste processo originaram-se as frações eluída (MESFW) e retida (MRSFW) (Figura 16). Porém, estas se mantiveram heterogêneas como mostraram os espectros de RMN-¹³C (Figura 19 A e B).

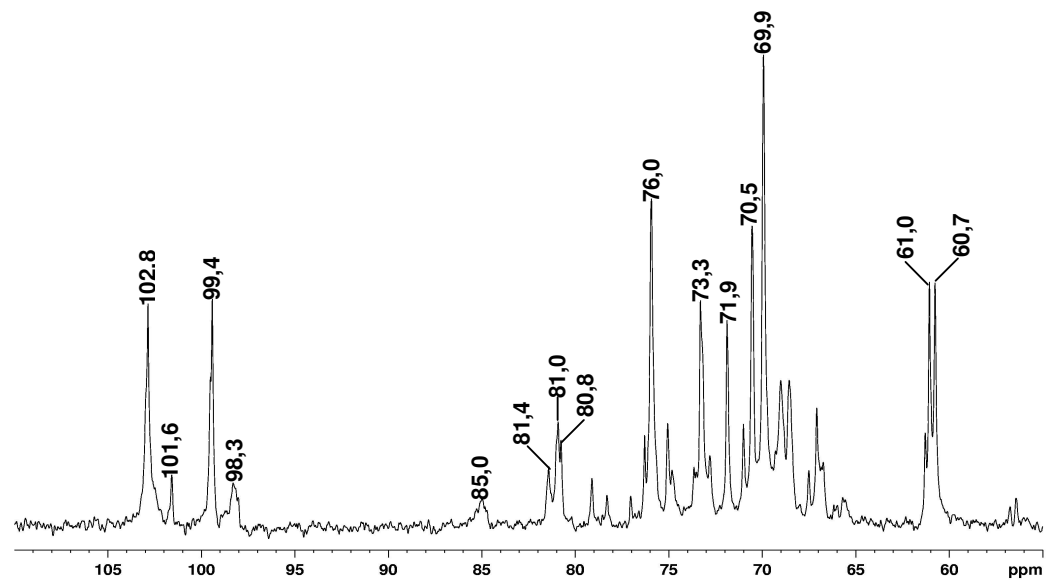
Nos espectros de RMN de ambas as frações, MRSFW e MESFW (Figura 19 A e B, respectivamente), podem ser observados os sinais referentes à manogalactana (fração PFW), porém na fração retida (MRSFW) estes sinais aparecem em menor intensidade.

FIGURA 19 - Espectros de RMN-¹³C, em D₂O a 70°C, da fração retida (MRSFW) (A) e da fração eluída (MESFW) (B) em diálise em membrana de limite de exclusão de 1000 kDa.

A



B

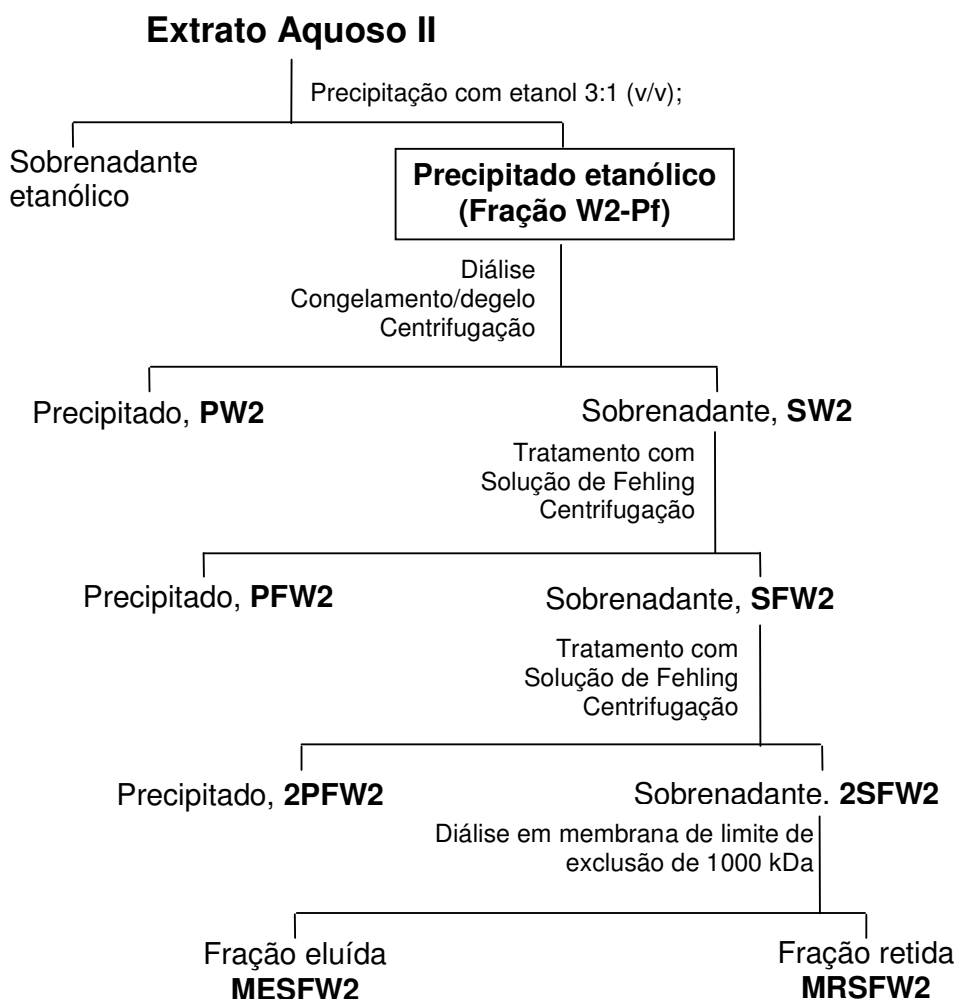


Estes dados estão de acordo com as análises de composição monossacarídica (Tabela 1) a qual apresentou maior teor de glucose (92,0%) para a fração MRSFW. Estas frações (MESFW e MRSFW) apresentaram-se heterogêneas, portanto deverão ser purificadas. Mas, devido à similaridade desta estrutura com àquela obtida a partir da extração aquosa a quente, a qual se apresentou homogênea, esta molécula será detalhada posteriormente.

4.2 EXTRATO AQUOSO A QUENTE (EXTRATO AQUOSO II)

O material residual I, obtido na etapa de extração anterior, foi submetido à extração com água fervente (Figura14). O material foi filtrado e precipitado com etanol 3:1 (v/v), formando a fração W2-Pf (Figura 20).

FIGURA 20 - Esquema de purificação do extrato aquoso a quente de *P.ostreatus* variedade *florida*.



A fração W2-Pf (rendimento: 1,46%) apresentou como componentes monossacarídicos manose (3,8%), galactose (6,4%), 3-O-Me-Gal (2,0%) e glucose (87,8%) (Tabela 3).

Com a finalidade de promover a purificação desta fração, a mesma foi ressuspensa em água destilada e submetida ao fracionamento por congelamento e degelo, deste processo originou-se uma fração solúvel (SW2; rendimento: 0,60 %), constituída por Man (6,0%), Gal (4,0%) e Glc (90,0%) e uma insolúvel em água fria (PW2; rendimento: 0,27 %), composta principalmente por glucose (98,0%) (Figura 20) (Tabela 3).

A fração solúvel (SW2) foi tratada com solução de Fehling, formando um precipitado (PFW2; rendimento: 0,01 %), o qual mostrou similar em relação à composição monossacarídica com a fração PFW e devido ao baixo rendimento não foi estudada. Além de um sobrenadante de Fehling (SFW2; rendimento: 0,30%) (Figura 20), composto principalmente por glucose (99,3%), sugerindo a presença de glucanas (Tabela 3).

TABELA 3 – Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas do extrato aquoso a quente de *P.ostreatus* var. *florida*

| FRAÇÕES | Rendimento (g%) ^a | Composição monossacarídica (mol %) ^b | | | |
|---------|---------------------------------|---|-----|-----|------|
| | | 3-O-MeGal ^c | Man | Gal | Glc |
| W2-Pf | 1,46 | 2,0 | 3,8 | 6,4 | 87,8 |
| PW2 | 0,27 | - | 0,7 | 1,3 | 98,0 |
| SW2 | 0,60 | - | 6,0 | 4,0 | 90,0 |
| SFW2 | 0,30 | - | 0,3 | 0,4 | 99,3 |
| MRSFW2 | 0,10 | - | 0,4 | 0,3 | 99,3 |
| MESFW2 | 0,13 | - | 0,5 | 0,8 | 98,7 |

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (196,0 g)

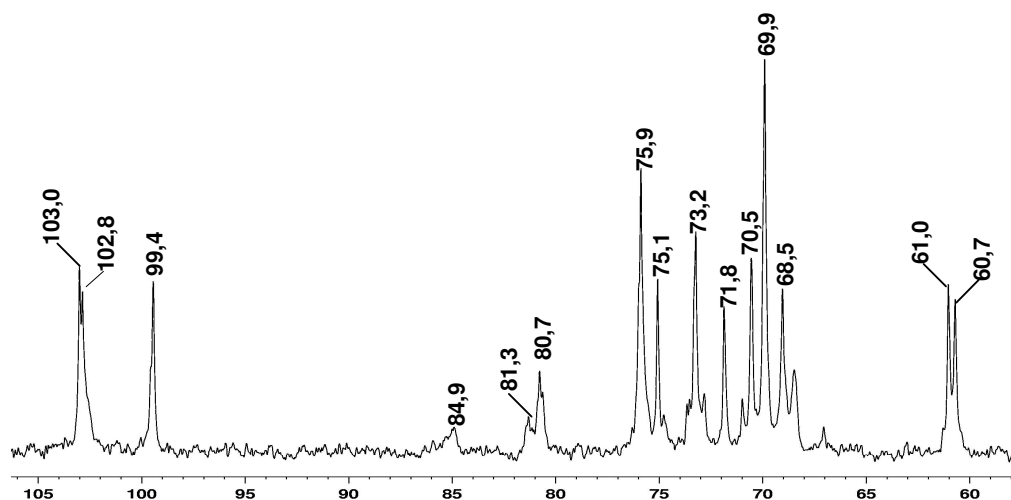
^b Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^c Confirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190 após redução com NaB²H₄.

O espectro de RMN-¹³C da fração SFW2 (Figura 21) mostrou na região de C-1 sinais em δ 103,1; 102,8 e 99,4, os quais foram atribuídos às unidades

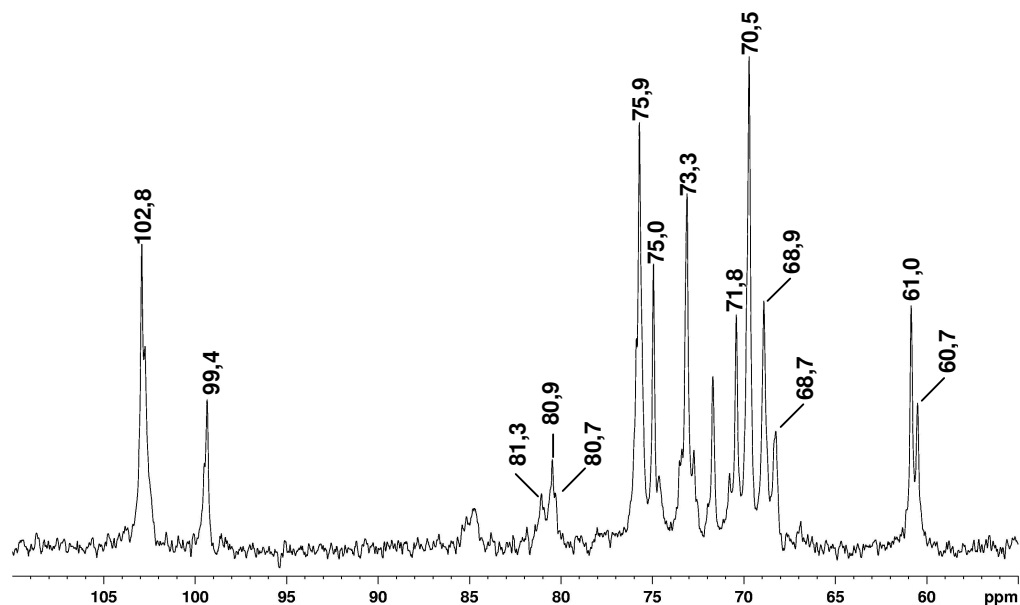
de Glcp em configuração do tipo β e α . Os sinais δ 84,9 e 81,3 e 80,7 são referentes ao C-3 substituído das unidades β -Glcp e α -Glcp.

FIGURA 21 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração SFW2, em D_2O a 70°C .



Com a finalidade de purificar a fração, esta fração foi dialisada em membrana com limite de exclusão de 1000 kDa em sistema fechado, originando a fração retida na membrana (MRSFW2) (Figura 23) e a fração eluída (MESFW2) (Figura 22), ambas constituídas principalmente por glucose. A fração eluída manteve-se heterogênea, enquanto que a retida apresentou-se homogênea quando analisadas por HPSEC-MALLS. Os espectros de RMN- ^{13}C (Figura 22 e 22 A, respectivamente) destas frações apresentaram-se distintos.

FIGURA 22 - Espectro de RMN-¹³C da fração MESFW2, em D₂O a 70°C.



A fração MRSFW2 mostrou-se similar à MRSFW em relação à composição monossacarídica e quando analisada por RMN-¹³C apresentou espectro parecido. Devido ao maior rendimento apresentado e ao perfil homogêneo, esta fração (MRSFW2) foi selecionada para a caracterização estrutural.

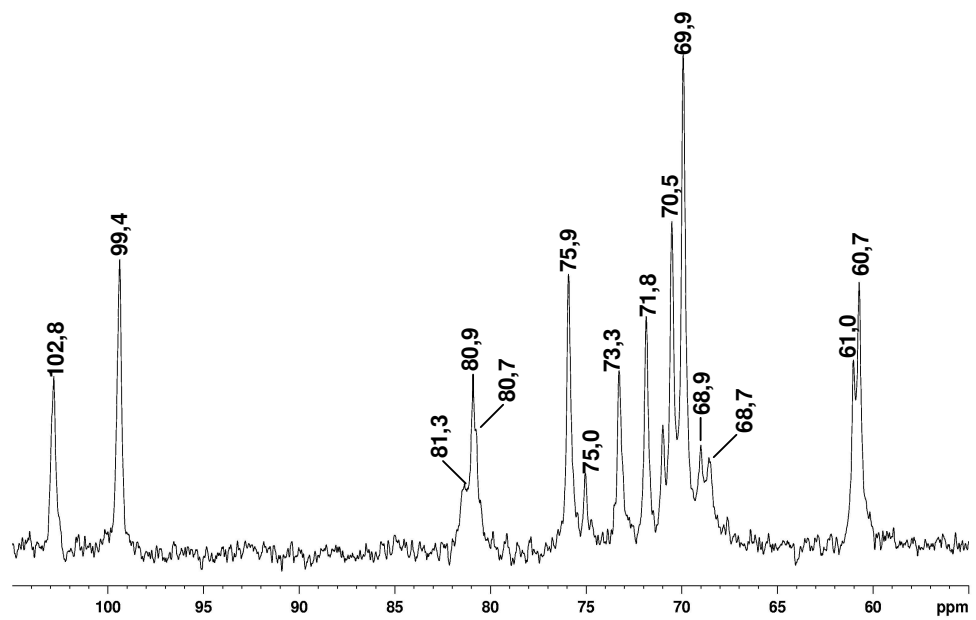
O espectro de RMN -¹³C da fração retida (MRSFW2) (Figura 23 A) apresentou sinais em δ 102,8 e 99,4 sinais na região de C-1 referentes às unidades de glucose com configuração β e α , respectivamente. No espectro de DEPT (Figura 23 B), pode ser observada a sobreposição de sinais na região anomérica, pois neste apareceram quatro sinais de C-1, δ 102,9; 102,8 e 99,5 e 99,4 os quais foram atribuídos às unidades de β -Glc_p e α -Glc_p.

A presença dos sinais δ 81,3; 80,9 e 80,7 são característicos de C-3 substituídos, sugeriam a presença de unidades contendo ligações do tipo (1→3). Além deste tipo de ligação, puderam ser observadas unidades ligadas (1→6) devido aos sinais δ 68,9 e 68,7 presentes na região de C-6, referidos aos C-6 substituídos. Estes foram confirmados por inversão dos mesmos na

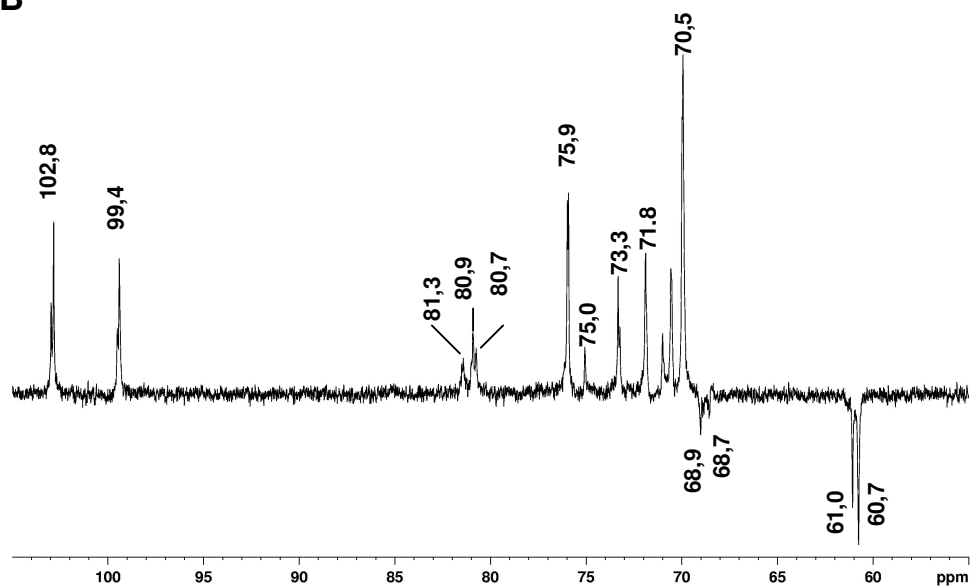
análise de RMN-¹³C-DEPT (Figura 23 B). Neste espectro também pode ser confirmado os C-6 livres pelos sinais δ 61,0 e 60,7 (Figura 23 B).

FIGURA 23 – Espectros de RMN-¹³C (A) e DEPT (B) da fração MRSFW2, em D₂O a 70°C.

A



B



Baseado nos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (Tabela 4), esta estrutura apresentava-se ramificada, pela presença de terminais não redutores (2, 3,4,6-Me₄Glc, 22,2%) e unidades 3-*O*- (2,4,6-Me₃Glc, 55,0%) e 3,6-di-*O*-substituídas (2,4-Me₂Glc, 22,8%) de glucose.

TABELA 4 - Análise por metilação da fração MRSFW2 obtida de *P. ostreatus* variedade *florida*

| Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^a | Frações (mol%) | | | Tipo de ligação ^b |
|---|----------------|-------|-------|------------------------------|
| | MRSFW2 | 1DSMR | 2DSMR | |
| 2,3,4,6-Me ₄ Glc | 22,2 | 7,2 | 4,9 | Glc ρ -(1→ |
| 2,4,6-Me ₃ Glc | 55,0 | 86,3 | 92,1 | →3)-Glc ρ -(1→ |
| 2,4-Me ₂ Glc | 22,8 | 6,5 | 3,0 | →3,6)-Glc ρ -(1→ |

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

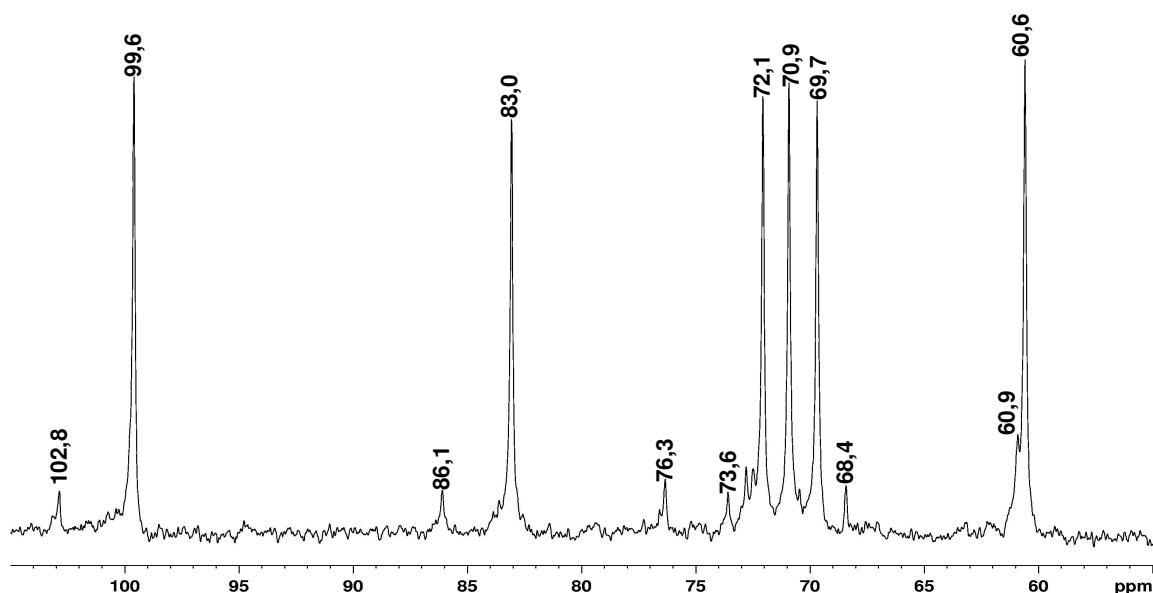
^b Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Estes dados estão de acordo com àqueles observados por RMN, os quais sugerem a estrutura de uma glucana que apresenta ligações do tipo (1→3) e (1→6).

Com a finalidade de esclarecer a estrutura da cadeia principal desta molécula, esta foi submetida ao processo de degradação controlada de Smith (ABDEL-AKHER et al., 1952; HAY et al., 1965), sendo o material resistente a este processo denominado 1DSMR, o qual mostrou ser composto por glucose (100%) por GC-MS.

A fração 1DSMR foi analisada por RMN-¹³C (Figura 24) e apresentou espectro com seis sinais intensos δ 99,6; 83,0; 72,1; 70,9; 69,7 e 60,6 que foram atribuídos aos C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6, respectivamente, sendo estes correspondentes àqueles de uma α -glucana (1→3). Além destes, outros sinais de menor intensidade, como os sinais δ 102,8; 86,1 e 60,9 foram observados, estes foram referidos, respectivamente, ao C-1, C-3 substituído e C-6 não substituído das unidades de β -Glc.

FIGURA 24 - Espectro de RMN-¹³C da fração 1DSMR, em Me₂SO-*d*₆ a 70°C.



Com a finalidade de remover as ramificações remanescentes, o material 1DSMR foi submetido a um segundo ciclo de Degradação de Smith. O material resistente a este processo foi denominado 2DSMR, o qual apresentou apenas glucose como componente monossacarídico.

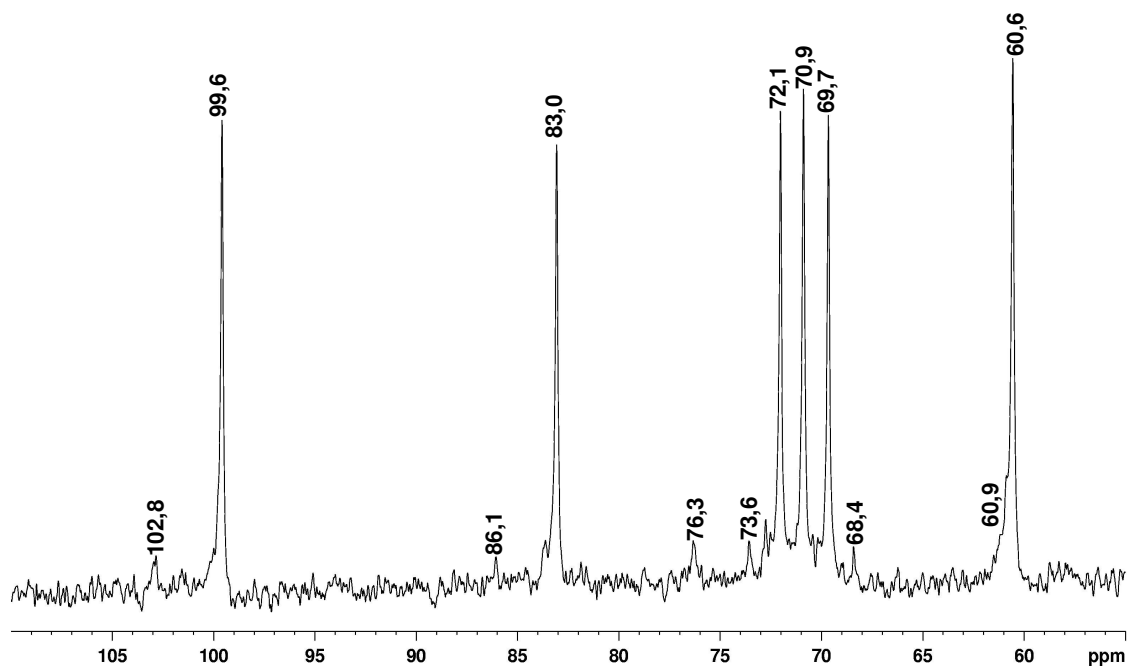
Comparando os espectros de RMN-¹³C das frações MRSFW, 1DSMR e 2DSMR (Figuras 23A, 24 e 25, respectivamente), pode se observado a diminuição dos sinais correspondentes às unidades de β -Glc_p e a intensificação dos seis principais sinais correspondentes à cadeia principal, a qual é constituída por unidades de α -Glc_p-(1→3)-ligadas.

Os resultados de metilação, referentes às frações MRSFW, 1DSMR e 2DSMR (Tabela 4), obtidos concordaram com as análises espectroscópicas, sendo possível observar um decréscimo significativo dos derivados 2,3,4,6-Me₄-Glc e 2,4-Me₂-Glc, assim como um aumento do derivado 2,4,6-Me₃Glc, reforçando a idéia de que a cadeia principal desta estrutura é formada por unidades (1→3)- ligadas.

Além dos materiais resistentes a Degradação Controlada de Smith, as águas de diálises (HD-1DS e HD-2DS) também foram analisadas e mostrou

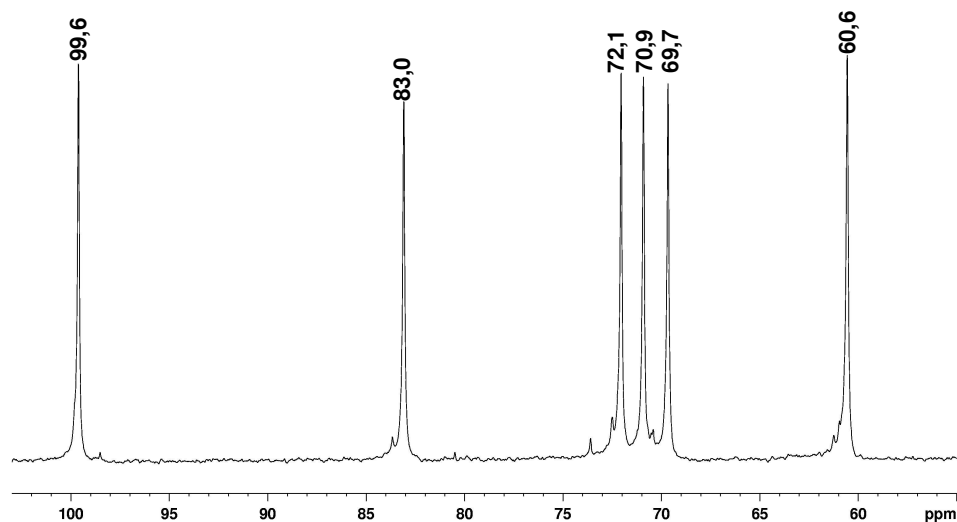
somente a presença de glicerol, o que sugeriu que em cada ciclo de degradação estaria sendo removida uma única unidade mais externa da cadeia lateral e não unidades em blocos.

FIGURA 25 - Espectro de RMN-¹³C da fração 2DSMR, em Me₂SO-*d*₆ a 70°C.



Como os sinais de menor intensidade não foram completamente removidos, o material 2DSMR foi novamente oxidado, resultando o degradado 3DSMR, que foi analisado por RMN-¹³C (Figura 26). O espectro apresentou os seis sinais principais δ 99,6; 83,0; 72,1; 70,9; 69,7 e 60,6 correspondentes àqueles de uma α -glucana (1 \rightarrow 3).

FIGURA 26 - Espectro de RMN-¹³C da fração 3DSMR, em Me₂SO-*d*₆ a 70°C.



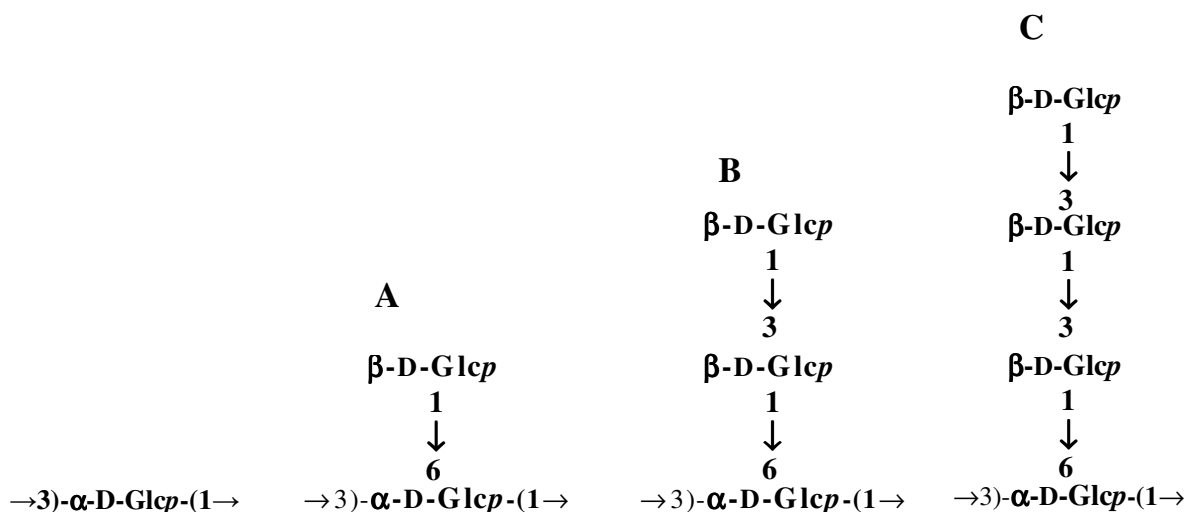
Os dados de composições monossacarídicas, análises de RMN-¹³C e dados de metilação sugerem que a fração MRSFW2, consiste de uma glucana formada por unidades de α -Glc p (1 \rightarrow 3), podendo apresentar substituições em O-6, principalmente por unidades de terminais não redutores de β -Glc p ou em menores proporções por cadeias laterais constituídas por unidades de β -Glc p ligadas (1 \rightarrow 3) (Figura 27). Provavelmente, as cadeias laterais desta estrutura apresentam no máximo três unidades β -Glc p ligadas (1 \rightarrow 3), pois foram necessários três ciclos de oxidação para a remoção completa das mesmas, sendo confirmados pelos dados de metilação.

Em Basidiomicetos, já foi relatada a presença de glucanas apresentando os dois tipos de configuração (α e β). Como exemplo tem o polímero linear encontrado em *Astreus hygrometricus* (CHAKRABORTY et al., 2004) o qual é constituído por unidades alternadas de α e β -D-Glc p unidas através de ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6). Da espécie *Ganoderma lucidum* isolou-se um polímero constituído por altos teores de glucose (Glc:Xyl:Ara) na proporção de 18,8:1,5:1,0) com cadeia principal e laterais constituídas de Glc p contendo ligações α - e β - (1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1981).

Como citado anteriormente, foi isolada de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*, uma glucana com uma cadeia principal constituída por unidades alternadas de α -D-Glcp e β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3), sendo que algumas das unidades de β -D-Glcp apresentam-se substituídas em O-2 por unidades terminais não redutores de α -D-Glcp (ROUT et al., 2005).

Embora já tenham sido descritas glucanas com configurações α e β , a fração isolada no presente trabalho não apresenta similaridade com outras estruturas presentes na literatura.

FIGURA 27 – Estrutura proposta para a fração MRSFSW2 obtida de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*.

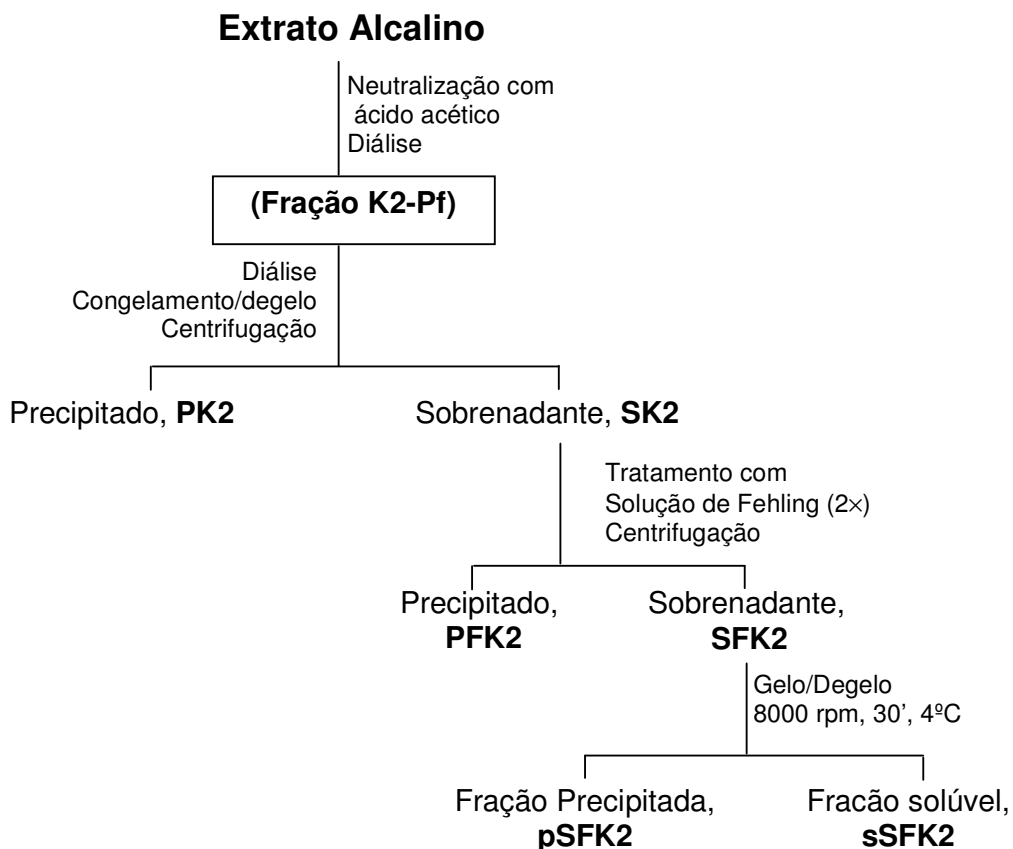


4.3 EXTRATO ALCALINO A 2%

O extrato alcalino 2% obtido (Figura 14), foi neutralizado com ácido acético, dialisado contra água corrente (~ 48 h), concentrado sob pressão reduzida e liofilizado, originando a fração K2-Pf (rendimento 15,3%). Esta foi ressuspensa em água, congelada e então descongelada, resultando uma fração insolúvel (PK2, rendimento: 4,35%) e outra solúvel em água fria (SK2, rendimento 3,90%) (Figura 28).

A fração SK2 que apresentou Man (1,5%), Gal (0,9%) e Glc (97,6%) como componentes monossacarídicos (Tabela 5). Foi submetida ao tratamento de purificação por precipitação com solução de Fehling, resultando na formação de um solúvel (SFK2, rendimento: 2,04%) e um insolúvel complexo cúprico (PFK2; rendimento: 0,20%), que foram separados por centrifugação (9000 r.p.m., 15 min, 25°C).

FIGURA 28 – Esquema de purificação do extrato alcalino obtido de *P. ostreatus* variedade *florida*.



A fração precipitado de Congelamento e Degelo (PK2), ou insolúvel em água fria, apresentou altos teores de glucose (94,5%) (Tabela 5). O espectro da fração (Figura 29) mostrou sinais correspondentes a uma mistura de duas moléculas.

TABELA 5 – Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas a partir do extrato alcalino

| FRAÇÕES | Rendimento g% ^a | Composição monossacarídica ^b (mol%) | | |
|---------|-------------------------------|---|-----|-------|
| | | Man | Gal | Glc |
| K2-Pf | 15,30 | 9,0 | 3,0 | 88,0 |
| PK2 | 4,35 | 5,3 | 0,2 | 94,5 |
| SK2 | 3,90 | 1,5 | 0,9 | 97,6 |
| PFK2 | 0,20 | 1,1 | - | 98,9 |
| SFK2 | 2,04 | 0,3 | 0,1 | 99,6 |
| sSFK2 | 0,14 | - | - | 100,0 |
| pSFK2 | 0,18 | 0,7 | - | 99,3 |

^a Rendimento das frações em relação ao peso seco.

^b Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

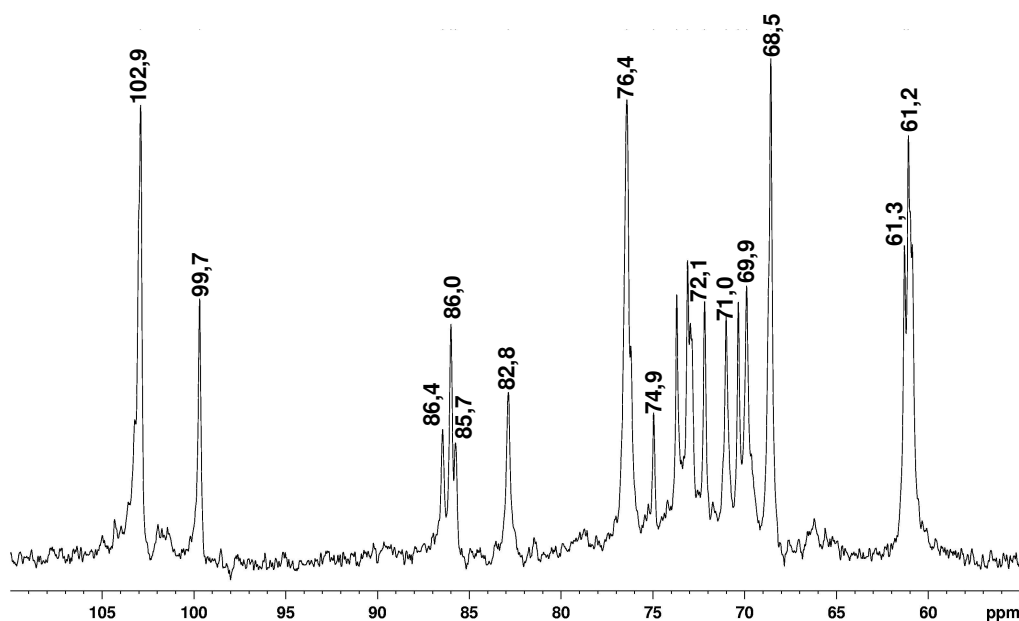
No espectro de RMN desta fração (PK2) (Figura 29) foram observados os sinais δ 99,7; 82,9; 72,2; 71,0; 70,3 e 61,3 que foram atribuídos aos C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6 característicos de uma α -glucana linear formada por ligações do tipo (1→3). As estruturas de α -glucanas (1→3) lineares, foram encontradas em líquens, como em *Dictyonema glabratum*, onde são denominadas de pseudonigeranas (CARBONERO, et al, 2002). Em basidiomicetos foram isoladas das espécies *Amanita muscaria* (KIHO et al., 1994; WASSER, 2002) e *Agaricus blazei*.

Os outros sinais presentes no espectro de RMN-¹³C, são referentes à estrutura de uma β -glucana contendo ligações do tipo (1→3) e (1→6). Polissacarídeos com estruturas similares foram descritas em *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostratoroseus* (CARBONERO et al., 2006). A cadeia principal apresenta-se formada por unidades de β -Glc p ligadas (1→3), sendo estas substituídas em O-6 por uma unidade de β -Glc p a cada três unidades da

cadeia principal. Esta estrutura foi encontrada em outros basidiomicetos, como em *Sclerotium gluconicum* (JONHSON et al, 1963); *Auricularia auricula-judae* (MISAKI; et al., 1981); *Ganoderma applanatum* (USUI et al., 1981); *Grifola frondosa* (MIZUNO et al., 1986), *Schizophyllum commune* (TABATA et al., 1981), *Grifola umbellata* (UENO, et al., 1980).

Atualmente, existe um grande interesse nestas moléculas, visto que muitas destas têm apresentado ação antitumoral e antiinflamatória (JONG; DONOVICK, 1989, WASSER; WEIS, 1999, WASSER, 2000, ZAIDAN et al., 2005).

FIGURA 29 – Espectro da fração em Precipitado de Congelamento/degelo (PK2) do extrato alcalino 2%

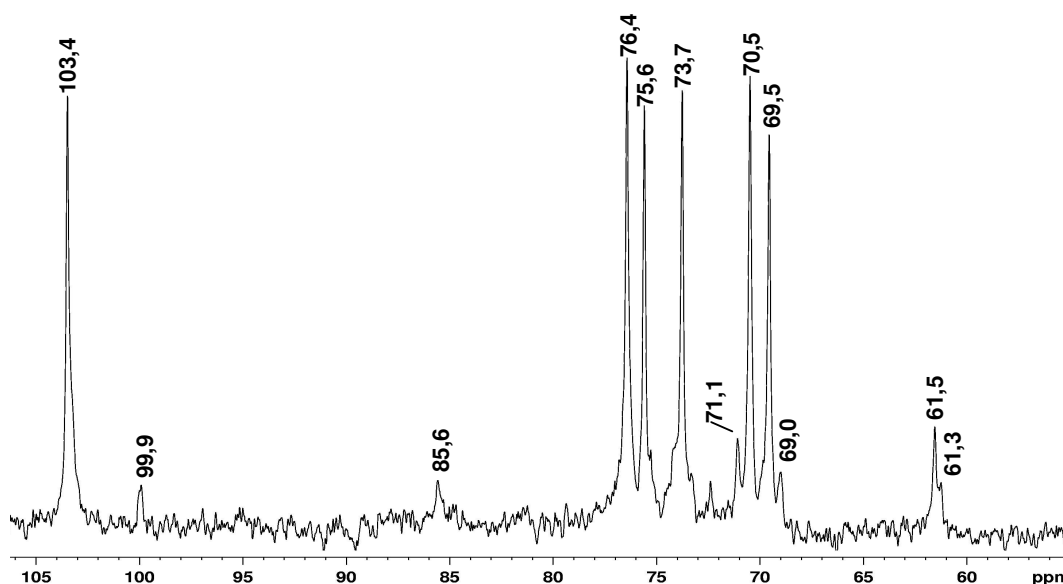


A fração PFK2 (Precipitado de Fehling) apresentou-se constituída por Glc (98,9%) e quando analisada por HPSEC-MALLS, mostrou perfil de eluição homogêneo.

O espectro de RMN-¹³C (Figura 30) desta fração apresentou na região de carbono anomérico sinais em δ 103,4 e 99,9 os quais foram atribuídos aos C-1 das unidades de β - e α -Glc.

O sinal δ 85,6 foi atribuído aos C-3 substituídos das unidades α -Glc. Os sinais δ 76,4; 75,6; 73,7; 70,5; 69,5 correspondem aos C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6 das unidades de β -Glc (MARTINICHEN-HERRERO; CARBONERO; GORIN; IACOMINI, 2005).

FIGURA 30 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração Precipitado de Fehling (PFK2) em DMSO, do extrato alcalino a 2%.

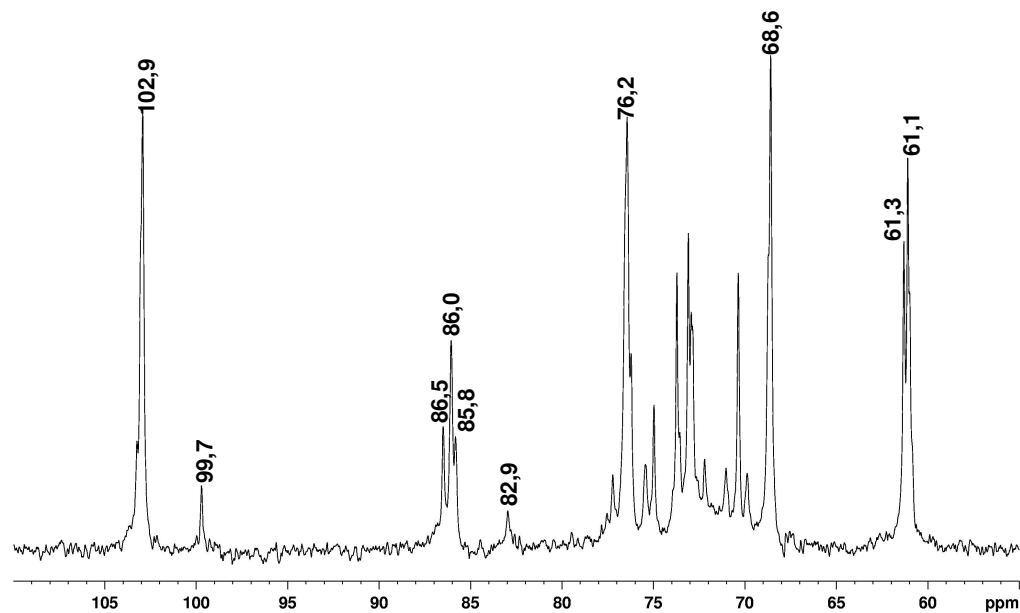


Estruturas similares estão descritas na literatura, mas estas apresentam ramificações por unidades em configuração β e não α como a encontrada. Além disso, cabe ressaltar que a maioria das β -glucanas (1 \rightarrow 6) já descritas apresentam-se insolúveis em água fria, o que dificulta a utilização como modificadores de resposta biológica.

Baseado nestes dados a molécula presente na fração PFK2 trata-se de uma glucana, com cadeia principal ligada por β -(1 \rightarrow 6) e com poucas ramificações de unidades de α -Glc (1 \rightarrow 3). Análises de metilação deverão ser realizadas para a confirmação desta estrutura. Essa estrutura não foi descrita até a presente data para basidiomicetos.

A fração SFK2 (Sobrenadante de Fehling), quando analisada por RMN, mostrou espectro com sinais correspondentes a uma mistura de moléculas (Figura 31).

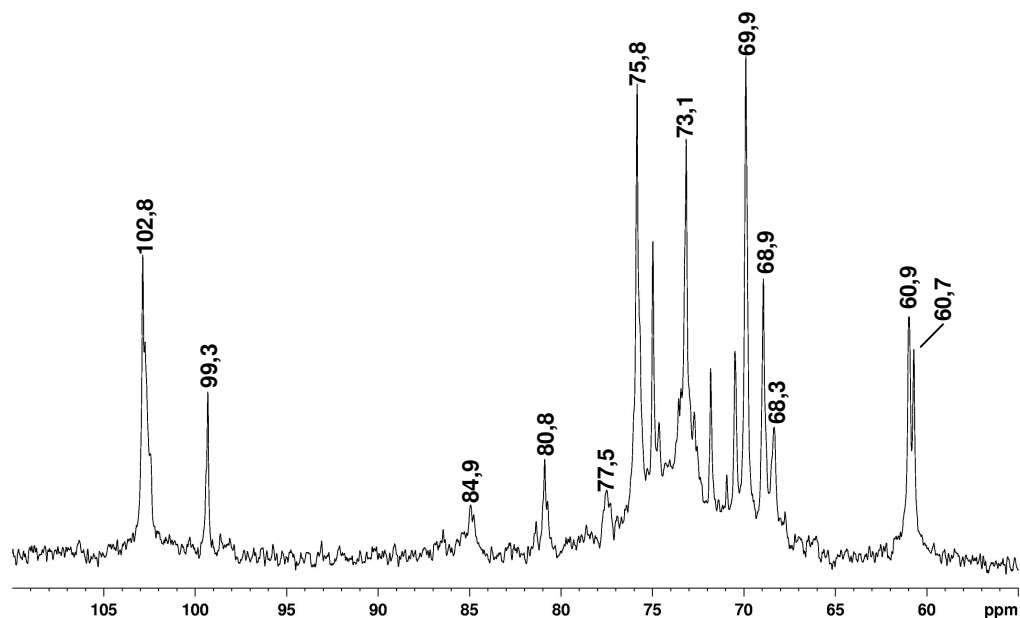
FIGURA 31 - Espectro de RMN-¹³C da fração SFK2 obtida do extrato alcalino 2%



Devido ao perfil heterogêneo desta fração, apresentado por HPSEC-MALLS, esta foi submetida a um adicional processo de purificação. Esta fração foi solubilizada em água destilada e submetida a um processo de congelamento e degelo seguido de centrifugação a baixas temperaturas (9000 r.p.m., 4°C por 30 minutos) (Figura 28). Com este procedimento, foi possível separar uma fração que se apresentava como gel a temperaturas baixas, de outra fração que não apresentava nenhuma viscosidade, as quais foram denominadas de pSFK2 e sSFK2, respectivamente.

Ambas as frações, pSFK2 e sSFK2, mostraram-se compostas principalmente por glucose (Tabela 5). Porém, estas quando analisadas por RMN-¹³C apresentaram espectros distintos (Figuras 32 e 33 A).

FIGURA 32 – Espectro de RMN da fração sSFK2, obtida do extrato alcalino 2%.



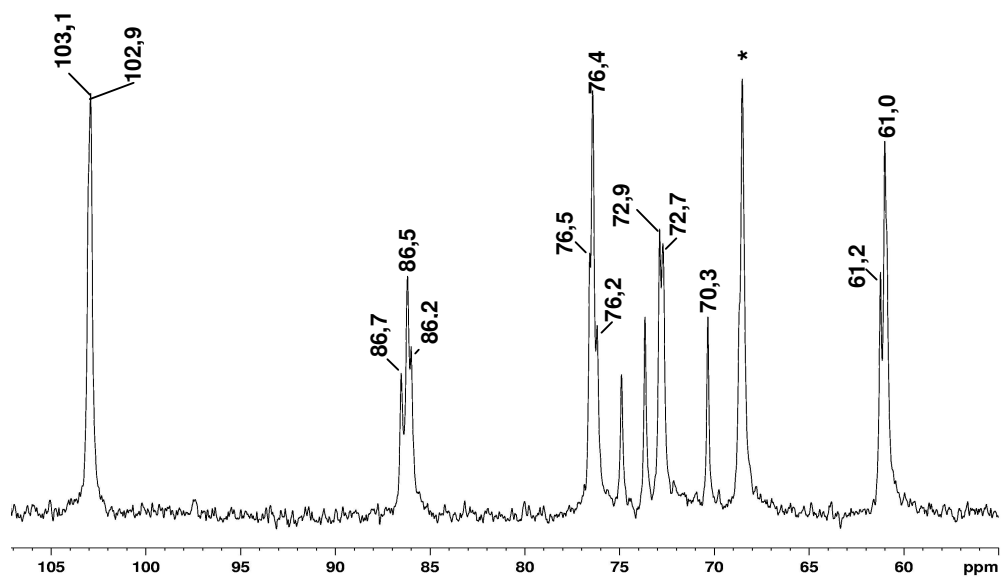
A fração sSFK2 mostrou perfil heterogêneo e necessita de processos adicionais de purificação para poder ser caracterizada.

A fração pSFSK2 que se apresentou composta por Glc (99,3%), seu espectro de RMN-¹³C (Figura 33 A), apresentou na região de carbono anomérico, os sinais δ 103,1 e 102,9 os quais foram atribuídos aos C-1 das unidades β -Glc_p. Os sinais em δ 86,7, 86,5 e 86,2 corresponderam aos C-3 substituídos das unidades β -Glc_p.

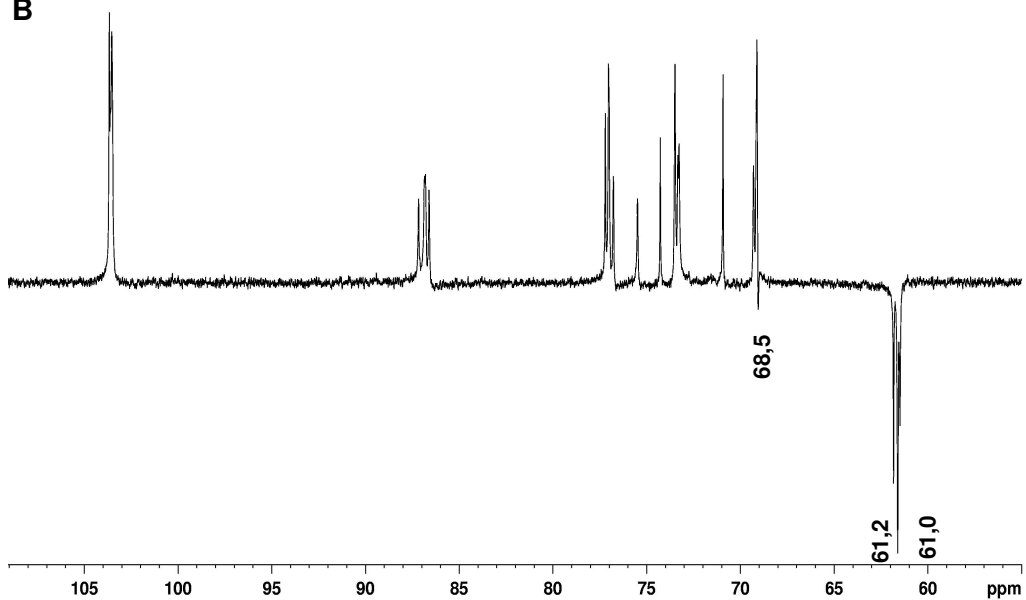
Na região de carbono seis do espectro, os sinais δ 61,2 e 61,0, correspondem aos C-6 livres e o sinal δ 68,5 foi atribuído ao C-6 substituído (Figura 33 A). Este último, o qual sugeriu a presença de ligações do tipo (1→6) na estrutura, apresentava-se sobreposto no espectro de RMN -¹³C e foi confirmado pela presença do sinal $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ invertido no experimento de DEPT (Figura 33 B).

FIGURA 33 - Espectros de RMN-¹³C (A) e de RMN-¹³C DEPT(B) da fração pSFSK2 obtida do extrato alcalino 2% em Me₂SO-d₆ a 70°C.

A

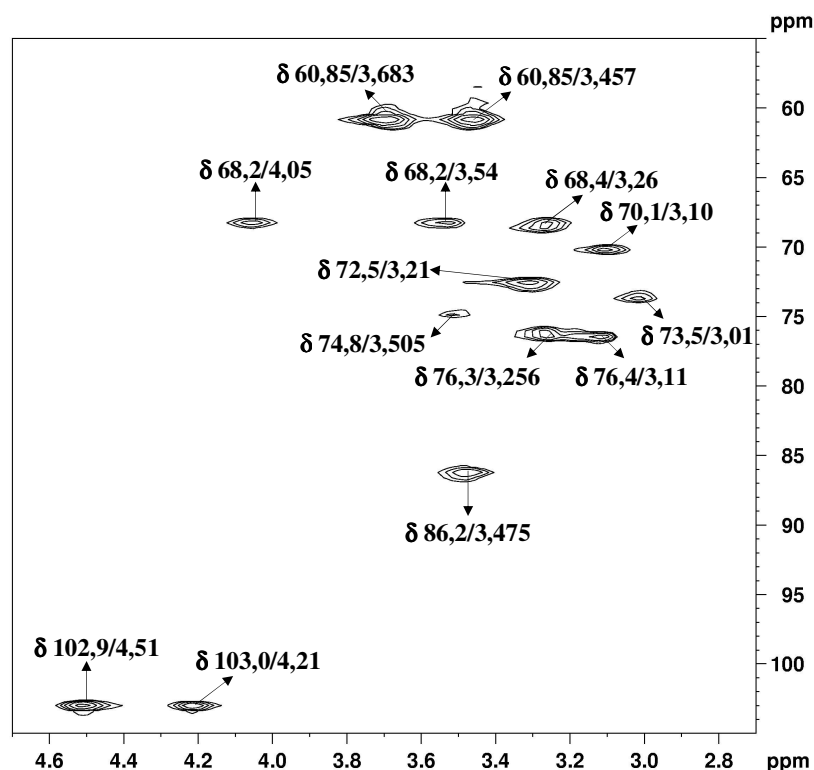


B



Através das análises de RMN¹³C (Figura 33) e HMQC (Figura 34), obtidos usando Me₂SO-*d*₆ como solvente, foi possível observar e assinalar todos os sinais de carbonos do polissacarídeo e seus prótons correspondentes (Tabela 6).

FIGURA 34 - Espectro de RMN¹³C HMQC da fração pSFK2 isolada de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*



O assinalamento do C-1/H-1 δ 103,1/4,21 (Tabela 6) refere-se aos terminais não redutores (A), enquanto que aqueles em δ 102,9/4,51 correspondem às unidades 3-*O*-substituídas (B) e as unidades 3,6-di-*O*-substituídas (C). A β -configuração foi confirmada por sinais de C-1 em campo baixo e sinais de H-1 em campo alto. O sinal δ 76,4 foi atribuído aos C-3 dos terminais não redutores e o sinal δ 86,2 aos C-3 das unidades *O*-3 substituídas e di-*O*-substituídas. Os sinais δ 71,1 e 68,4 apresentados correspondem aos C-4 das unidades A, B e C respectivamente. Assim como, os sinais δ 76,3; 76,3 e 74,8 corresponderam ao C-5 destas mesmas unidades. O sinal δ 60,8 foi

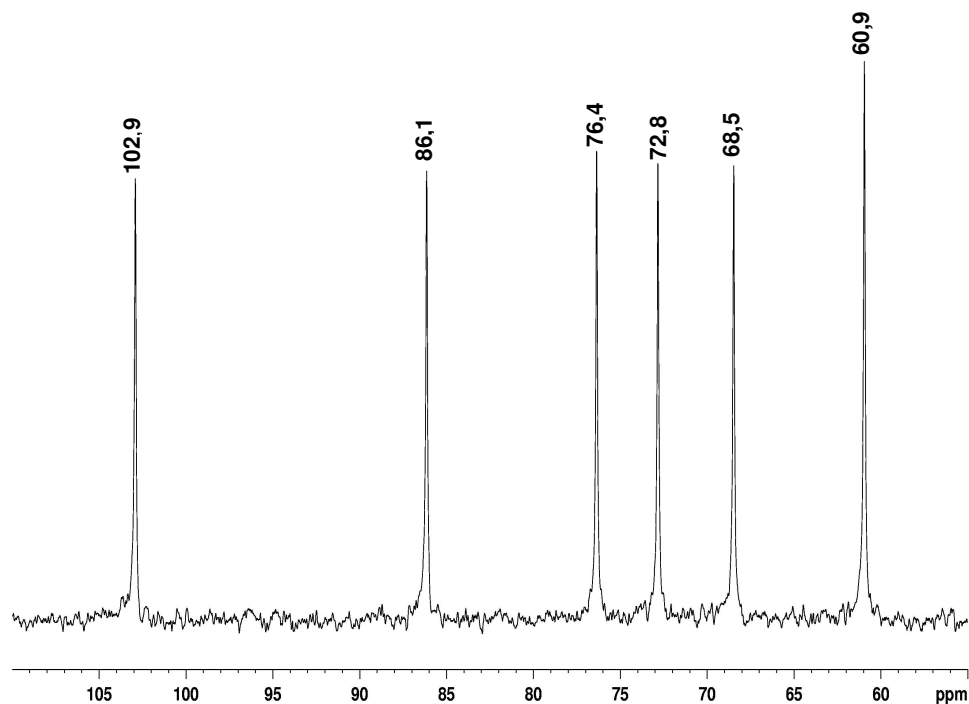
atribuído ao C-6 das unidades de terminais não redutores e o sinal δ 68,4 ao C-6 das unidades O-3 substituídas e di-substituídas. Todos os sinais foram assinalados por comparação com os encontrados na literatura (TABATA; ITO; KOJIMA, 1981, YOSHIOKA; TABETA; SAITO; UEHARA; FUKUOKA, 1985).

Tabela 6 – Assinalamentos de ^1H e ^{13}C da β -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) (fração pSFSK2) isolada de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*

| | UNIDADES | | |
|------------|-------------------------------------|---|---|
| | A (β -D-Glcp \rightarrow) | B [\rightarrow 3)- β -D-Glcp \rightarrow] | C [\rightarrow 3,6)- β -D-Glcp \rightarrow] |
| C-1/H-1 | 103,0/4,21 | 102,98/4,51 | 102,98/4,51 |
| C-2/H-2 | 73,5/3,01 | 72,5/3,21 | 72,5/3,21 |
| C-3/H-3 | 76,4/3,11 | 86,2/3,47 | 86,2/3,47 |
| C-4/H-4 | 70,1/3,10 | 68,4/3,26 | 68,4/3,26 |
| C-5/H-5 | 76,3/3,26 | 76,3/3,26 | 74,8/3,50 |
| C-6/H-6a;b | 60,8/3,46; 3,68 | 60,8/3,46; 3,68 | 68,4/3,54; 4,05 |

A estrutura da cadeia principal da fração foi determinada por Degradação Controlada de Smith (ABDEL-AKHER et al., 1952). O produto desta degradação (DSpSFK2) foi analisado por RMN ^{13}C e o espectro apresentou seis sinais intensos em δ 102,9; 86,1; 76,4;72,8; 68,5 e 60,9. Estes foram atribuídos ao C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6 das unidades de β -Glcp (Figura 35).

FIGURA 35 - Espectro de RMN -¹³C do material (DSpSFK2) resistente a Degradação de Smith



As análises de metilação desta fração, estão coerentes com as análises espectroscópicas, apresentaram os derivados parcialmente *O*-metilados 2,3,4,6- Me₄Glc_p referentes aos terminais não redutores, o derivado 2,4,6- Me₃Glc_p referentes as unidades 3-*O* substituídas e o derivado 2,4-Me₂Glc_p referentes as unidades substituídas em *O*-3 e *O*-6 (Tabela 7)

Tabela 7-Análise de metilação da fração pSFK2 e material degradado (DSpSFK2)

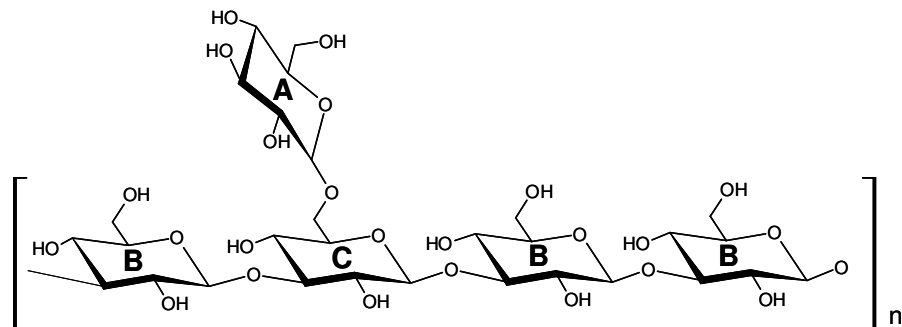
| Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^a | Frações (mol%) | | Tipo de ligação ^b |
|---|----------------|----------|------------------------------|
| | pSFSK2 | DSpSFSK2 | |
| 2,3,4,6-Me ₄ Glc | 16,8 | 2,1 | Glc _p -(1→ |
| 2,4,6-Me ₃ Glc | 66,7 | 97,9 | →3)-Glc _p -(1→ |
| 2,4-Me ₂ Glc | 16,5 | - | →3,6)-Glc _p -(1→ |

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

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

Pelo conjunto dos dados obtidos sugere-se como estrutura provável para a molécula presente na fração pSFK2, uma β -glucana com cadeia principal formada por unidades de glucose ligadas (1 \rightarrow 3), substituídas em O-6 por unidades únicas de β -Glc p em uma relação de 4:1(Figura 36).

Figura 36 - Estrutura proposta para o polissacarídeo presente na fração pSFK2.



Estrutura similar a esta foi descrita em outros basidiomicetos, como em *Boletus erythropus* a qual apresenta ramificações a cada três unidades da cadeia principal (CHAUVEAU et al.,1996) e em *Pleurotus ostreatus* (YOSHIOKA et al., 1985) que apresentou o mesmo grau de substituição apresentada no presente trabalho (4:1).

Na presente pesquisa foi possível atingir o objetivo do trabalho, que foi realizar a caracterização das estruturas químicas dos principais polissacarídeos do basidioma da espécie *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*, conhecida popularmente por *Pleurotus branco*. Como outras espécies deste gênero já foram estudadas em relação aos seus polissacarídeos e como citado na introdução deste trabalho, alguns destes apresentaram atividade biológica. As estruturas dos polissacarídeos caracterizadas neste trabalho de pesquisa poderão ser futuramente testadas em modelos animais a fim de se observar se estas apresentam atividade biológica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para os extratos aquoso I, aquoso II e alcalino provenientes do basidioma de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida*, sugerem as seguintes estruturas para os polissacarídeos isolados:

- a) Manogalactana com cadeia principal formada por unidades de Galp e 3-O-Me-Galp, unidas através de ligações α -(1→6), sendo que parte destas apresentou-se substituída em O-2 por terminais não redutores de β -Manp.
- b) β -Glucana com ligações (1→6), com ramificações de uma única unidade de glucose unidas à cadeia principal por ligação de tipo α -(1→3).
- c) Glucana com configuração α e β , cuja cadeia principal apresentou-se constituída por unidades α -Glc p unidas por ligações (1→3), algumas unidades apresentaram-se O-6 substituídas em grande maioria por unidades de terminais não redutores de β -Glc p e em menores proporções por cadeias laterais formadas por unidades β -Glc p ligadas (1→3).
- d) Duas glucanas, uma α -glucana linear com ligações (1→3) e uma β -glucana contendo ligações (1→3) (1→6).
- e) β -Glucana com cadeia principal constituída por unidades ligadas (1→3), apresentando ramificações em O-6 de β -Glc.

REFERÊNCIAS

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

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

ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, 74-52, 2004.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. Structure of the fucoxylomannan from *Polyporus pinicola* (Fr.). **Acta Chem. Scand.**, v. 23, p.1567-1600, 1969.

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

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

BOBEK, P.; OZDIN, L.; KUNIAK, L. Effect of oyster mushroom and isolated β -Glucan on lipid peroxidation and on the activities in rats fed the cholesterol diet. **Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 469-471, 1997.

BONATTI, M.; KARNOPP, B.; SOARES, B. M.; FURLAN, S. A. Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 4, p. 31-35, 2003.

BORCHERS, A. T; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. **Exp. Biol. Med.**, v. 229, n. 5, p. 393-406, 2004.

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

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A (1→6)-linked β -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4) β -xylan, isolated from the lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 206, p. 175-178, 2002.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydr. Polym.**, v. 66, p. 252-257, 2006.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. (Ed.). **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 157-216.

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

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. A water-insoluble (1→3)- β -D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, n. 18, p. 2990-2993, 2006.

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

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

CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G.; YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A β -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydr. Res.**, v. 328, p. 629-633, 2000.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, n. 2, p.209-217, 1984.

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

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

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

DUPRAT, L. A.; SOUZA, J. V. Análise da Comercialização e do consumo de cogumelos comestíveis no mercado do distrito Federal e Entorno. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 34p., 2003. Disponível em: ><http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp.doc>>. Acesso: 23/11/2006.

FLORIAN, M. C. Vantagens da utilização de cogumelos na alimentação dos brasileiros. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS NO BRASIL E II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 2006, São Paulo, Brasília : EMBRAPA, p. 68-72, 2006

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

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R.; TAKASABURA, E.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; TAKAHARA, H.; MATUMOTO, Y.; NAKASHIMA, H. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the Basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunology Immunotherapy**, V.43, p. 147-159, 1998.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R.; TAKASABURA, E. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the Basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. **Anticancer Research**, v.19, p. 113-118, 1999.

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v.142, p. 119-132, 1984.

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

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal Value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **Internacional Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 1, p. 69-80, 1999.

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

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

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. of Chem. Soc.**, v. 107, p.8-16, 1915.

HOBBS, C. H. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). A literature review. **Internacional Journal of Medicinal Mushrooms** v. 2, p. 287-302, 2000.

HU, S. H.; WANG, J.C.; LIEN, J. L.; LIAW, E.T.; LEE, M.Y. L. Antihyperglycemic effect of polysaccharides from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. **Appl. Microb. and Phys.**, v. 70, p. 107-113, 2006.

JANNSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **J. Chem. Soc. Chem. Commun**, v. 8, p. 1-70, 1976.

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

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

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

JONG, S. C.; DONOVICK, R. Antitumor and antiviral substances of fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 183-262, 1989.

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

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

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

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; SAKASHIMA, M.; KATSURAGAWA, M.; USUI, S.; UKAI, S. A polysaccharide from the fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activity of its carboxymethylated products. *Biol. Pharm. Bull.*, v.17, p. 1460-1462, 1994.

KISHIDA, E.; SONE, Y.; MISAKI, A. Purification of an antitumor-active, branched (1→3)- β -glucan from *Volvariella volvacea*, and elucidation of its fine structure. **Carbohydr. Res.**, v. 193, p. 227-239, 1989.

KÜES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p.141-152, 2000.

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

LEE, I. H.; HUANG, R. L.; CHEN, C. T.; CHEN, H. C.; HSU, W. C.; LU, M. K. *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 209, p. 63-67, 2002.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, 315-318, 2000.

MATTILA, P.; SUONPÄÄ, K.; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, v. 16. p. 7-8, 2000.

MARTINEZ, A. T.; CAMARERO, S.; GUTIERREZ, A.; BOCCHINI, P.; GALLETI, G. C. Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 58, 401-411, 2001.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Antioagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a β -(1→6)-linked glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. **Carbohydr. Polym.**, v.60, p.7-13, 2005.

MASSARO, M. Aspectos nutricionais e importância no consumo e na industrialização. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS NO BRASIL E II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 2006, São Paulo, Brasília : EMBRAPA, p. 73-75, 2006.

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

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

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

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

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

MIZUNO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Preparation and specificity of antibodies to an anti-tumor β-glucan, lentinan. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 39, p. 679-685, 1996.

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

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

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

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

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous

extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 629-636, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHEHORNS, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 206-210, 1996.

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

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ISLAM, S. Chemical analysis of a new (1→3)-, (1→6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2533-2539, 2005.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ISLAM, S. The structure of a polysaccharide from fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 995-1002, 2006.

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

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

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

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: Some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005a.

SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p 223-234, 2005b.

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

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

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

SOUZA, E. Método de cultivo de cogumelos comestíveis no Brasil. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS NO BRASIL E II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 2006, São Paulo, Brasília : EMBRAPA, p. 25-36, 2006.

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

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

URBEN, A. F. Cogumelos cultivados no Brasil pela técnica "Juncao". In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS NO BRASIL E II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 2006, São Paulo, Brasília : EMBRAPA, p. 16-24, 2006.

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

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

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

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

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

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

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

ZAIDMAN, B. YASSIN, M.; MAHAJARA, J.; WASSER, S.P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 453-468, 2005.

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

ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; SHIMADA, A.; ITO, H.; SUZUKI, C.; MAYUZUMI, Y.; OKAMOTO, H.; MA, Y.; LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, p. 901-906, 1993.