# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



CURITIBA

### MARIA PAULA FERNANDES BONALDI



#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bonaldi, Maria Paula Fernandes Caracterização estrutural de polissacarídeos do cogumelo *Lactarius quieticolor /* Maria Paula Fernandes Bonaldi. – Curitiba, 2021.
1 recurso on-line : PDF.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).
Orientador: Prof.º Dr. Marcello Iacomini.
1. Cogumelos. 2. Polissacarídeos. 3. beta-Glucanas. 4.
Extração (Química). I. Iacomini, Marcello, 1947-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

#### **TERMO DE APROVAÇÃO**

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de MARIA PAULA FERNANDES BONALDI initiulada: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DO COGUMELO Lactarius quietícolor, sob orientação do Prof. Dr. MARCELLO IACOMINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 28 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica 04/04/2022 19:40:12.0 MARCELLO IACOMINI Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 12/04/2022 18:29:12.0 THALES RICARDO CIPRIANI Availador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica 04/04/2022 15:41:05.0 FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS Availador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

#### DEDICATÓRIA

Seja por barreiras sociais, culturais ou econômicas, muitas eram as forças que não favoreciam a minha continuidade no meio acadêmico. Conquistar a graduação já era considerado um feito e tanto. Entretanto, aliado à minha teimosia, alcançar o mestrado só foi possível devido ao conjunto de políticas públicas que me forneceram suporte financeiro nesses mais de 2 anos de pesquisa; bem como pela presença de pessoas fundamentais no decorrer da minha trajetória de vida.

Dedico este trabalho a minha família: minha mãe, Márcia, e meu pai, Guido; os quais mesmo não entendendo meu posicionamento político, ideais ou mesmo o meu desejo em continuar estudando, sempre se mantiveram ao meu lado. Nada feito por vocês foi em *vão*. Sou grata pela educação que recebi e espero algum dia retribuir sendo motivo de orgulho e alegria (entendível por vocês dois).

Aos meus 6 irmãos: Franciane, Verônica, Maria Eloiza, Jorge, Maria Vitória e Luiz Henrique; motivos de tanto estresse e de muitíssimo orgulho. De maneira especial, à minha irmã mais velha, madrinha e melhor amiga, Fran, que mesmo longe sempre se faz presente. Sou feliz por poder contar com o apoio, ensinamento e inspiração de cada um de vocês em todas as minhas aventuras. Eu nada seria se não fosse vocês!!! De maneira muitíssimo carinhosa, dedico ao meu falecido avô, Luiz Gonzaga Fernandes, que em momento algum duvidou da minha capacidade e, quando na ausência de meus pais, sempre foi suporte incondicional. Nordestino, forte, batalhador, que me ensinou muito com sua história de vida. Onde quer que sua alma esteja a repousar, ao lado do Pai, espero que chegue a seu saber que todos os filhos da Márcia sempre terão orgulho de serem lembrados como "netos(as) de Seu Luiz Gonzaga"! Também à minha falecida madrinha, Maria Ernestina, vítima de Covid, exemplo de mulher batalhadora, pessoa íntegra, justa e professora. Que Deus a tenha ao Seu lado.

Por fim, mas não menos importante, dedico a todos os professores que direta ou indiretamente agregaram para a minha formação científica-docente. Egressa de instituições públicas de ensino, esta pesquisa também carrega um pouco do esforço de cada um daqueles que não desistiram de alunos como eu. A jornada de um novo mestre só é possível pelos ensinamentos e inspiração de tantos outros antecessores a ele. Todo e qualquer mérito aqui depositado também é compartilhado.

#### AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por cuidar de mim nesse tempo longe de casa (no meio de uma pandemia) e me cercar sempre de pessoas de bem. Gratidão imensa por tudo que vivi e por poder concluir mais esta etapa.

Ao meu orientador, professor Marcello Iacomini, pela confiança, oportunidade e ensinamentos. Mesmo durante o período de pandemia, com a impossibilidade de reunião presencial, se fez presente em todo progresso desta pesquisa. Sou muitíssimo grata por todo aprendizado.

À Shayane da Silva Milhorini, minha "irmã-científica" ou "irmã-que-Curitiba-me-deu", a pessoa responsável por me introduzir e guiar nesta jornada rumo ao mundo dos cogumelos. Sou grata por toda tutoria de bancada, pelo convívio diário e por dividir comigo os melhores (e piores) momentos do mestrado. Sou muito feliz e grata a Deus pela amizade construída.

Á Laís, Vanessa Schneider, Philippe e Giuliana pela parceria e amizade. Ao Kevin e a Genilza por salvarem minhas amostras durante o período que não pude comparecer ao laboratório, em razão do isolamento obrigatório por Covid. Também ao Matheus pela colaboração nas análises de metilação.

Ao grupo de "Química de Carboidratos" da UFPR: E1, 247, 250 e 252. Agradeço por todo aprendizado no decorrer desses anos, pelos vários momentos de descontração e por muitas vezes tornarem meus dias mais leves.

À Juliana Danna Kulik, pela coleta do material estudado e também pela companhia durante as caçadas aos cogumelos.

À minha irmã caçula talentosíssima, Maria Vitória (Vivi), pela arte e desenho digital dos "cogumelindos"!

À minha companheira de RU, irmã-macapaense e futura arquiteta, Ravena, a qual tive o prazer de partilhar momentos incríveis nos meus primeiros meses em Curitiba. Também ao Emanoel, Nikolas e Bianca pela amizade construída no pensionato. Minha estadia em Curitiba teria sido horrível sem vocês!!!

Aos professores do ensino médio: Prof. Sérgio Tramujas, por me apresentar e contagiar com o amor pela Biologia; e a Prof.<sup>a</sup> Carolina Molina pelas inesquecíveis palavras de incentivo.

Aos professores da graduação (UNESPAR, Campus Paranaguá): Prof.ª Josiane, Fabrícia e Yara por exercerem forte influência na minha formação acadêmica; ao Prof. Luís Fernando Roveda, constituinte da minha banca avaliadora no TCC, por me encorajar a continuar na pesquisa.

Aos professores da Pós-Graduação, em especial ao Prof. Thales Ricardo Cipriani pelas correções do projeto e relatório. Também a Prof<sup>a</sup> Fernanda Simas pela disponibilidade e por aceitar contribuir com este trabalho como constituinte da banca avaliadora.

Aos professores do grupo de "Química de Carboidratos", em especial a Prof<sup>a</sup> Lucimara Cordeiro e Guilherme Sassaki pelos ensinamentos e contribuições.

Ao pós-doutorando Daniel do PPG em Biologia Celular (UFPR) pela disponibilidade e colaboração em realizar os experimentos biológicos (em desenvolvimento) de frações deste trabalho.

Ao Centro de RMN da UFPR e ao LCE pelas análises de RMN, HPSEC e composição monossacarídica; bem como aos técnicos Arquimedes, Keila e Rosane: muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ao Setor de Ciências Biológicas e a comunidade UFPR pela acolhida.

Às agências de fomento CAPES e CNPq. Em especial, à CAPES-PROEX pela concessão da bolsa e prorrogação dos prazos em razão da pandemia. Sem investimento, nada disso seria possível. Muito muito muito obrigada.

Agradeço também a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho que, direta ou indiretamente, colaboraram para tornar tudo isso possível (e que provavelmente esquecerei de mencionar aqui): MUITÍSSIMO OBRIGADA (de coração)!

"[...] Eu ainda não acabei. Eu não desisto. Eu jamais voltarei atrás na minha palavra, porque essa é a minha conduta ninja!"

Uzumaki Naruto

#### RESUMO

Os cogumelos representam uma importante fonte nutricional e possuem compostos bioativos de interesse farmacêutico e cosmético. Dentre essas biomoléculas, destacam-se os polissacarídeos. Esses constituem uma classe de polímeros diversos, com rearranjos estruturais aos quais já foram atribuídos efeitos antitumorais, variáveis, anti-inflamatórios, imunomoduladores, entre outros. Portanto, diferentes frações polissacarídicas foram obtidas do cogumelo Lactarius quieticolor, o qual não havia sido estudado até momento. Foram realizadas extrações (água em temperatura ambiente, água fervente e com solução alcalina), purificação de frações (congelamento e descongelamento, tratamento enzimático, solução de Fehling, centrifugações e diálises) e caracterização química (GC-MS, NMR, HPSEC-MALLS, degradação de Smith). Três extratos brutos solúveis (Lq-CW, Lq-HW e Lq-N5) foram obtidos por meio das extrações sequenciais. O primeiro, apresentou predominância de glicogênio, seguido de uma heterogalactana. O segundo, por sua vez, mostrou a heterogalactana como componente principal. Enquanto o último, possuía uma mistura de β-glucanas com glicogênio. A partir do extrato obtido em temperatura ambiente foram adquiridas 2 frações (SFS-CW e SFI-CW), sendo a última totalmente purificada neste trabalho. Experimentos de RMN (C<sup>13</sup>, HSQC e DEPT) sugerem que a fração SFI-CW é composta predominantemente por unidades de glucose, com sinais típicos de  $\beta$ -D-glucana com ligações do tipo  $(1\rightarrow 3)$ ,  $(1\rightarrow 6)$ . Adicionalmente, a mesma mostrou perfil de eluição homogêneo em HPSEC. A fração SFS-CW, apesar de possuir predominantemente uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), ainda possui resíduos de galactose. O presente trabalho relata, pela primeira vez, a variedade estrutural dos polissacarídeos que podem ser obtidos do cogumelo Lactarius quieticolor, os quais, podem ser futuramente estudados em pesquisas sobre suas propriedades biológicas.

Palavras-chave: *Lactarius quieticolor*; Polissacarídeos; β-Glucanas; Extração; Purificação; Caracterização.

#### ABSTRACT

Edible mushrooms represent an important nutritional source, due to the presence of bioactive compounds, which might be pharmacological and industrial effects. Once polysaccharides comprehend an extent structural diversity, it also has been reported different biological properties from these molecules, such as anti-tumoral, anti-inflammatory, and immunomodulate effects. Therefore, in order to study L. quieticolor polysaccharides, the aim of this study was to release the extraction (in water and NaOH 5% buffer solution), isolation (freezing-thawing, enzymatic treatment, Fehling solution, centrifugations, and dialysis), and chemical characterization (GC-MS, NMR, HPSEC-MALLS, Smith controlled degradation) of L. quieticolor. Soluble crude extracts (Lq-CW, Lq-HW e Lq-N5) were obtained by sequential extractions. First has shown glycogen and heterogalactan contents. Second, the heterogalactans as the main compound. Third, the  $\beta$ -D-glucan and glycogen are mixed. Moreover, two fractions were obtained from cold water extracts (SFS-CW e SFI-CW), and SFI-CW was totally purified. NMR spectra (C13, HSQC e DEPT) has suggested SFI-CW is formed by glucose units, with commonly signals attributed to  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) structure. Also, SFI-CW had a homogenous profile in HPSEC-IR analysis. Although SFS-CW has β-D-Glcp as a major component, the purification experiments are required to achieve complete isolation. This is the first structural report of polysaccharides from Lactarius quieticolor, which will contribute to biological studies in the future.

Keywords: *Lactarius quieticolor*. Polysaccharides.  $\beta$ -Glucans. Extraction. Isolation Characterization.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	MORFOLOGIA GERAL DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE UM BASIDIOMICETO	17
FIGURA 2 –	O FILO BASIDIOMYCOTA APRESENTA VARIADOS ESTILOS DE VIDA	18
FIGURA 3 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS POLÍMEROS ENCONTRADOS NA PAREDE CELULAR DE FUNGOS	21
FIGURA 4 –	CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE L. quieticolor	24
FIGURA 5 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE L. quieticolor	27
FIGURA 6 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO RLQ-CW, OBTIDA EM EXTRATO FRIO DE <i>L. quieticolor</i>	29
FIGURA 7 –	PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES BRUTAS RLQ-CW, RLQ- HW E LQ-EA	36
FIGURA 8 –	ESPECTROS BIDIMENSIONAIS 1H/13C HSQC E RMN-DEPT DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>L. quieticolor</i>	37
FIGURA 9 –	ESPECTROS BIDIMENSIONAIS 1H/13C RMN-HSQC DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS BRUTAS DE L. quieticolor	40
FIGURA 10 –	ESPECTROS MONODIMENSIONAIS RMN-13C DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS BRUTAS DE <i>L. quieticolor</i>	41
FIGURA 11 –	PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS BRUTAS DE L. quieticolor	43

FIGURA 12 –	ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS 1H/13C RMN-HSQC DA FRAÇÃO S-CW	45
FIGURA 13 –	ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS 1H/13C RMN-HSQC DA FRAÇÃO I-CW	46
FIGURA 14 –	ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS 1H/13C HSQC E RMN-13C DA FRAÇÃO SFS-CW DE L. quieticolor	48
FIGURA 15 –	PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO 2SFS-CW DE L. quieticolor	49
FIGURA 16 –	ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS 1H/13C-HSQC E RMN-13C DA FRAÇÃO SFI-CW DE <i>L. quieticolor</i>	51
FIGURA 17 –	ESPECTROS MONODIMENSIONAL HSQC-DEPT DA FRAÇÃO SFI-CW DE <i>L. quieticolor</i>	52
FIGURA 18 –	PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO R2SFI-CW DE L. quieticolor	52

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15				
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16				
2.1	REINO FUNGI: FILO BASIDIOMICOTA	16				
2.2	POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR EM FUNGOS 1					
2.3	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS	21				
2.3.1	Estrutura e propriedades biológicas de glucanas de cogumelos	22				
2.4	Lactarius sect. Deliciosi	23				
3.	OBJETIVOS	25				
3.1	OBJETIVO GERAL	25				
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25				
4.	METODOLOGIA	26				
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	26				
4.2	OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	26				
4.2.1	Extração aquosa em temperatura ambiente	27				
4.2.2	Extração aquosa com água fervente	27				
4.2.3	Extração alcalina	28				
4.2.4	Obtenção dos extratos solúveis	28				
4.3	PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO	28				
4.3.1	Congelamento e descongelamento	29				
4.3.2	Diálises e centrifugações	29				
4.3.3	Tratamento com α-amilase	30				
4.3.4	Tratamento com solução de Fehling	30				
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	31				
4.4.1	Análises colorimétricas	31				
4.4.2	Composição monossacarídica	32				
4.4.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	33				
4.4.4	Determinação da homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica					
	acoplada à detecção por índice de refração (HPSEC-RI)	33				
4.4.5	Degradação de Smith	34				
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35				
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS SOLÚVEIS	35				

5.2	CARACTERIZAÇÃO DE UMA GLUCANA OBTIDA A PARTIR DE	
	EXTRATO AQUOSO FRIO (Lq-CW)	44
6.	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO	62

#### 1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são moléculas bioativas presentes nos organismos, com diversas funções e potencial para aplicações medicinais, farmacêuticas e industriais (4). Os fungos representam uma importante fonte de nutrientes, sendo que alguns de seus polissacarídeos foram reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias (37), antinociceptivas (46), reológicas (1, 4), capazes de comprometer o desenvolvimento de células tumorais (42) e estimular a proliferação de determinados microrganismos (11).

São encontrados em cogumelos selvagens e comestíveis os homo- e heteropolissacarídeos (57). Os homopolissacarídeos são representados pelas glucanas (1, 4, 45), galactanas (81) e mananas (16); e os heteropolissacarídeos: manogalactanas (37), fucogalactanas (42), manogalactanas (55), galactomananas (75).

*Lactarius* sect. *Deliciosi* (ou seção *Deliciosi*) (filo Basidiomycota, família Russulaceae) compreende um vasto grupo com cogumelos denominados ectomicorrízicos, isto é, fungos capazes de se associar externamente a raízes de plantas específicas. Espera-se que cerca de 59 espécies desse gênero sejam comestíveis ou apresentem propriedades medicinais (79). Sua distribuição é considerada cosmopolita, com espécies registradas na China (48), Coreia do Sul (41), Europa (47), Nova Zelândia (32), Bélgica (19), Espanha e Portugal (29).

Alguns polissacarídeos já foram obtidos de *Lactarius deliciosus* Gray, espécie filogeneticamente próxima a *Lactarius quieticolor*, assim como evidenciado o seu potencial para atividades biológicas. Utilizando as colunas DEAE-Celulose e Sephadex G-100, um heteropolissacarídeo (Mw 1.1 x $10^4$  Da) foi isolado, composto de L-manose e D-xilose (3:1) (21). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa também isolou um novo heteropolissacarídeo composto por D-galactose com ramificações de D-glucose e D-galactose (Mw 16 kDa) (35). Recentemente, uma fração purificada foi obtida de *L. deliciosus* Gray, a qual se tratava de uma molécula de peso igual à  $9.8 \times 10^5$  Da (16); porém, não foram mencionadas proporções ou composição monossacarídica da estrutura isolada. Em todos as condições de teste, os polissacarídeos demonstraram induzir respostas biológicas promissoras, com propriedades antitumoral (21) e imunomoduladora (16, 35). Todavia, algumas espécies como o *Lactarius quieticolor* não haviam sido, até o momento, estudadas a respeito de seus polissacarídeos. O objetivo do presente trabalho foi realizar a obtenção de polissacarídeos da espécie *Lactarius quieticolor* e caracterizar as estruturas isolada.

#### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 REINO FUNGI: FILO BASIDIOMICOTA

Ainda hoje não há um consenso bem definido sobre a sinapomorfia do Reino Fungi, isto é, a presença de característica – celular, molecular ou bioquímica – que seja comum a todos os organismos pertencentes a esse grupo (54). Sua biodiversidade está estimada em 5,1 milhões de espécimes, os quais grande parte ainda permanece desconhecida (6). Para a maioria dos grupos o delineamento taxonômico e o nível de espécie tem sido alcançado por meio do sequenciamento da região espaçadora "ITS" (*Internal Transcribed Spacer*) do RNAr nuclear (7, 41). Assim, com base nas análises filogenéticas, os modelos taxonômicos atuais propõem 8 filos (Cryptomycota, Microsporidia, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Ascomycota, Basidiomycota), 12 subfilos e 46 classes (73).

Inseridos no sub-reino Dikarya, os filos Asco- e Basidiomycota são os mais bemsucedidos evolutivamente, correspondendo a grupos monofiléticos coerentes (33). O filo Basidiomycota muitas vezes se destaca pela presença de espécies formadoras de estruturas visíveis a olho nu, chamados de corpos de frutificação ou "cogumelo" (53) (Figura 1). De maneira geral, os basidiomicetos podem apresentar variados estilos de vida como os saprófitos, simbiontes, promotores de crescimento vegetal, patógenos de plantas ou animais (17).

O filo Basidiomycota também compreende organismos considerados ecologicamente fundamentais para degradação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (73). São classificados como "Fungos da Podridão Branca" (fpb) aqueles capazes de despolimerizar substratos vegetais por meio da liberação de enzimas extracelulares que consequentemente resultam no branqueamento da matriz degradada (23). Embora a composição da parede celular de plantas varie de acordo com as diferentes linhagens e estágios de crescimento, todas apresentam uma matriz com microfibrilas de celulose, pectinas, hemicelulose, lignina e proteínas estruturais (39). A degradação fúngica ocorre devido a presença de maquinaria enzimática lignocelulolítica (incluindo celulases, pectinases, xilanases, lacases e peroxidases) apropriada para atuar sobre os principais componentes da madeira (34, 40). A considerável baixa especificidade desse complexo enzimático facilita a ligação com poluentes ambientais como substrato alternativo, os quais podem vir a se assemelhar com polímeros vegetais complexos como a lignina (24). O basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* foi pioneiro em estudos de biorremediação que, em condições de pH e temperatura ótima, demonstrou alta capacidade de degradar pesticidas e corantes têxteis (18, 28). Algumas espécies tradicionalmente cultivadas para o consumo humano, tais como *Pleurotus* spp., *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler e *Auricularia* spp., também apresentam tais enzimas que são produzidas principalmente em substratos pobre em nitrogênio (8).



#### FIGURA 1 – MORFOLOGIA GERAL DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE UM BASIDIOMICETO

Em (A) anatomia do píleo "chapéu" e eixo de sustentação; (B) distribuição do micélio – vegetativo e reprodutivo. FONTE: Maria Vitória Bonaldi (2022).

Espera-se que a maior diversidade de fungos seja encontrada no solo ou associados a plantas, nos quais os prolongamentos de hifas podem atuar como intermediários entre plantanutriente ou interagir com bactérias fixadoras (7). É chamada micorriza (*myco*: fungo; *rhizae*: raiz) o sistema de troca nutricional entre fungos e plantas, o qual pode envolver o transporte de fosfato (P), potássio (K), enxofre (S), água e fotoassimilados (26). Dentre as principais associações, destacam-se as micorrizas arbusculares (AM) e ectomicorrizas (ECM), ambas benéficas para plantas e fungos.



FIGURA 2 – O FILO BASIDIOMYCOTA APRESENTA VARIADOS ESTILOS DE VIDA

FONTE: a autora (2022).

As micorrizas arbusculares (AM) caracterizam-se por um tipo de endossimbiose e correspondem a hifas que se rearranjam no espaço intercelular da epiderme e o córtex radicular (56). "Arbúsculo" é o nome dado a estrutura formada a partir de invaginações, no qual o fungo é capaz de envolver a membrana da célula vegetal, sem rompê-la, promovendo o aumento da superfície de contato entre planta-fungo (5). As AM prevalecem entre os glomeromicetos (atual filo Mucoromycota) e ocorrem entre 70-90% das plantas terrestres, tendo como principal especialidade a absorção de fosfato e água – em troca de carboidratos dos tecidos vegetais (50). Já as ectomicorrizas (*ecto* + *myco* + *rhyzae* = externo, fungo, raiz) (ECM) são associações no qual é formado um manto micelial que se estende pela raiz da planta, ocorrendo predominantemente entre árvores florestais (famílias Pinaceae e Fagaceae) (74). Para as ECM as interações com bactérias são fundamentais para as funções de degradar poli-carboidratos por enzimas lignocelulósicas e no consumo de compostos orgânicos voláteis (13). Acredita-se que a história evolutiva de fungos ectomicorrízicos resultou na perda dos componentes enzimáticos lignocelulolíticos e no surgimento de proteínas que interagem com o sistema de defesa das plantas (73). Plantas mono- e dicotiledôneas podem produzir inibidores enzimáticos de

pectinases e xilanases, porém, enzimas resistentes podem ocorrer principalmente entre fungos fitopatogênicos (39).

O sucesso evolutivo do Reino Fungi dá-se em parte pela presença de componentes estruturais importantes que possibilitam a estabilidade a nível molecular e celular, resultando em respostas efetivas para estímulos do meio ambiente. Contextualizando, a parede celular compreende uma rede complexa de microfibrilas que desempenha papel fundamental nos mecanismos de infecção por fungos patogênicos e, consequentemente, nas respostas imunológicas de seus respectivos hospedeiros.

#### 2.2 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR EM FUNGOS

Os polissacarídeos podem ser classificados de acordo com seus tipos de ligações glicosídicas, organização estrutural (cadeia linear ou ramificada) e composição monossacarídica (homo- ou heteropolissacarídeos) (49). O comportamento dos polissacarídeos em solução pode variar de acordo com as condições do meio, massa molecular, solubilidade, tipos e grau de ramificação. Associados às possíveis ligações presentes na estrutura, a configuração anomérica  $\alpha$ - ou  $\beta$ - afeta diretamente a solubilidade e a conformação tridimensional (20). Tais características favorecem a variedade de rearranjos estruturais que, consequentemente, resultam em diferentes propriedades físico-química e biológicas.

O estudo de polissacarídeos geralmente inclui técnicas de extração, purificação e caracterização química-estrutural das unidades monoméricas (63). A etapa de purificação pode ser considerada trabalhosa, uma vez que estas estruturas tendem a interagir e formar complexos intermoleculares difíceis de isolar (45). Considerando a diversidade estrutural dos polissacarídeos, o estudo de suas estruturas geralmente requer o uso conjunto de métodos químicos (hidrólises totais ou hidrólises parciais como a degradação Smith, derivatização para alditóis acetatos), aliados a tecnologias analíticas (NMR, GC-MS, HPSEC-MALLS) (63).

Os monossacarídeos mais abundantes em fungos são: glucose (Glc), manose (Man) e galactose (Gal); enquanto que fucose (Fuc) e xilose (Xyl) ocorrem com menor recorrência. Esses podem constituir os homo- (polímeros formados de uma mesma unidade monossacarídica) ou heteropolissacarpídeos (polímeros formados por dois ou mais tipos de unidades monossacarídicas). Uma vez que desempenham funções de reserva e estruturais importantes, os polissacarídeos podem ser agrupados tanto no espaço inter- ou extracelular (denominados exopolissacarídeos depositados no meio), bem como anexados à parede celular.

Apesar de haver diferenças na distribuição dos polissacarídeos nos estágios de crescimento e entre grupos taxonômicos, sabe-se que a parede celular de fungos é composta predominantemente por glicoproteínas e polissacarídeos (57). Tal estrutura é considerada única e dinâmica, sendo responsável por promover resistência, plasticidade, integridade, adesão e maior interação do fungo com o ambiente (25).

De maneira geral, os principais constituintes estruturais da parede celular de fungos são representados pela quitina e glucanas (Figura 3), embora polissacarídeos contendo galactose, manose e proteínas acessórias também estejam presentes (25). Os processos enzimáticos relacionados a biossíntese dos polímeros de parede não são totalmente elucidados, entretanto, ambos polímeros são gerados por complexos enzimáticos associados a membrana plasmática (9). Glucanas lineares ou ramificadas, como os homopolissacarídeos do tipo  $\beta$ -D-Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6), constituem até 60% da parede celular de fungos (78). Deleções ou modificações induzidas *in vitro* em áreas preservadas no genoma, relativas à expressão de genes responsáveis pela biossíntese enzimática dos componentes de parede, evidenciam o comprometimento de funções e a incapacidades de adaptações potencialmente vitais (78).

Além das glucanas (20, 68, 72) outros polissacarídeos estruturais são tipicamente encontrados em cogumelos comestíveis como as galactanas (55), e os heteropolissacarídeos do tipo manogalactanas (38) e fucogalactanas (37, 42).

#### FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS POLÍMEROS ENCONTRADOS NA PAREDE CELULAR DE FUNGOS



FONTE: adaptado de Free (2013).

#### 2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS

Os cogumelos são notoriamente reconhecidos por produzirem compostos bioativos, derivados do metabolismo primário ou secundário, com propriedades potenciais para aplicações biotecnológicas. A literatura dispõe de um vasto acervo de registros que atribuem aos polissacarídeos de cogumelos as propriedades anti-inflamatórias (38), antinociceptivas (46), hipocolesterolêmica (45), reológicas (72) e modificadores da microbiota intestinal (11, 61).

#### 2.3.1 Estruturas e propriedades biológicas de glucanas de cogumelos

Os cogumelos apresentam glucanas de diferentes estruturas, as quais podem possuir configuração  $\alpha$ - ou  $\beta$ -, serem lineares ou ramificadas, possuírem distintos graus de ramificação e massa molecular, bem como se diferenciarem quanto a sua solubilidade em água (63).

Sabe-se que um dos polissacarídeos mais abundantes em fungos são as  $\beta$ -glucanas (44). Dentre essas, a mais recorrente possui uma cadeia principal de  $\beta$ -D-glucose ligada (1 $\rightarrow$ 3), ramificada na posição *O*-6 por resíduos de  $\beta$ -D-glucose ou por cadeias laterais de  $\beta$ -D-glucose (63).

A lentinana, uma  $\beta$ -glucana  $(1\rightarrow 3)$ ,  $(1\rightarrow 6)$ , é a principal biomolécula extraída de *Lentinus edodes* (shiitake). Esse, foi um dos primeiros macrofungos populares a serem investigados por seu potencial biotecnológico. Em ensaios *in vivo* e *in vitro*, a lentinana mostrou propriedades antitumorais, imunomoduladoras, antivirais e antioxidantes (45). Uma molécula com estrutura similar, obtida do cogumelo *Cookeina tricholoma*, apresentou atividade antinociceptiva (46), enquanto, tal  $\beta$ -glucana isolada da *Amanita muscaria* (L.:Fr), apresentou efeito antiproliferativo sobre células de melanoma murino B16-F10 (81).

Adicionalmente, uma série de outras  $\beta$ -glucanas, e também  $\alpha$ -glucanas, foram isoladas de diferentes espécies de cogumelos, conforme relatado na Tabela 1.

Cadeia	Ramificações	Massa	Espécie	Propriedade	Referência
principal		molecular		biológica	
β-D-Glcp	Ausente	$2,9 \times 10^{4}$	Agaricus	Imunomoduladora	70
(1→6)		g/mol	brasiliensi		
			S		
		$4,5 \times 10^{4}$			
		g/mol	Agaricus		
			blazei		
β-D-Glcp	Ausente	6,0x104	Pleurotus	Anti-inflamatório	66
(1→3)		g/mol	sajor-caju		
β-D-Glcp	Substituída	16,2x103	Amanita	Antinociceptivo	59
(1→3)	em O-6 por	g/mol	muscaria		

	uma unidade				
	de β-D-Glc <i>p</i>				
	ou por				
	oligossacaríde				
	os de β-D-				
	Glcp				
β-D-Glcp	Substituída	100 kDa	Albatrellu		64
(1→6)	em O-3 por		s ovinus		
	uma unidade				
	de β-D-Glc <i>p</i>				
β-D-Glcp	Substituída	145 kDa	Calocybe		77
(1→6)	em O-4 por		gambosa		
	uma unidade				
	de β-D-Glc <i>p</i>				
β-D-Glcp	Substituída	2,6 x 10 <sup>4</sup>	Ganoderm		3
(1→3)	em <i>O</i> -6 por	g/mol	а		
	unidades de β-		resinaceu		
	D-Glcp $(1\rightarrow 4)$		т		
a-D-Glcp	Ausente		Lentinula	Hipocolesterolêmic	45
(1→3)			edodes	o, anti-inflamatório	

#### 2.4 Lactarius sect. Deliciosi

*Lactarius* sect. *Deliciosi* (ou seção *Deliciosi*) (filo Basidiomycota, família Russulaceae) compreende basidiomicetos selvagens, sendo esse o principal grupo taxonômico para esse gênero (Figura 4). São caracterizados como basidiomicetos ectomicorrízicos, selvagens e/ou comestíveis ectomicorrízicos; frequentemente encontrados em florestamentos de *Pinus* sp e *Eucalyptus* sp. Dados macromorfológicos (coloração do látex) e ecológicos (presença de coníferas) muitas vezes facilitam o reconhecimento desse gênero em campo (32). Entretanto, a identificação acurada de *Lactarius* spp. é melhor estabelecida pela combinação de técnicas baseadas na morfologia, ecologia e sequenciamento de DNA (41). Apesar de sua ocorrência estar restrita principalmente a presença de coníferas, a distribuição é considerada cosmopolita e espécies já foram registradas na China, Coreia do Sul, Europa, Nova Zelândia, Bélgica, Espanha, Portugal e Brasil (19, 29, 32, 41, 47 e 48).

FIGURA 4 – CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE L. quieticolor



FONTE: Shayane da Silva Milhorini e Julio César de Araújo Amatuzi (2019).

#### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 **OBJETIVO GERAL**

• Extrair, purificar e caracterizar a estrutura química de polissacarídeos do basidiomiceto *Lactarius quieticolor*.

# **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obter os polissacarídeos por meio de diversos métodos de extração, tanto com água a (temperatura ambiente e fervura) e solução alcalina (NaOH, 5 %, 96 °C).
- Purificar polissacarídeos de *L. quieticolor* por meio de congelamento e descongelamento, ultrafiltração, diálises e precipitação por solução de Fehling.
- Elucidar a estrutura molecular dos polissacarídeos purificados por meio de experimentos de hidrólise total, degradação Smith, GC-MS, RMN e HPSEC-MALLS.

#### 4. METODOLOGIA

#### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico foi coletado na Universidade Federal do Paraná, *Campus* Jardim Botânico (latitude: 25°26'49.1" S; longitude: 49°.14'16.4" W; altitude: 932 m), localizado em uma área de reflorestamento de *Pinus* sp., em junho de 2019, na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. Os corpos de frutificação foram identificados *in situ* como *Lactarius* sp. e cedidos gentilmente pela Dra. Shayane da Silva Milhorini, da Universidade Federal do Paraná, *Campus* Centro Politécnico. Posteriormente, a identificação molecular do espécime foi realizada pela empresa *GoGenetic*, por meio da ampliação da região ITS, utilizando-se os primers ITS-1 e ITS-2. Assim, foram estabelecidas a sequência e a árvore filogenética do DNA isolado (ANEXO I), o qual mostrou-se 99% (704/705 pdb) compatível com a espécie *Lactarius quieticolor* (Filo: Basidiomycota; Classe: Agaricomycetes).

#### 4.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os corpos de frutificação de *L. quieticolor* foram limpos, liofilizados e triturados. A obtenção das frações brutas de polissacarídeos ocorreu após delipidificação, por meio de extrações aquosas (em temperatura ambiente e fervura) e em solução alcalina (NaOH, 5%, 96 °C); as quais foram realizadas com o cogumelo já delipidificado (Figura 5).

#### 4.2.1 Delipidificação

A remoção dos compostos apolares foi realizada com solução de clorofórmio - metanol (2:1, v:v). Os corpos de frutificação triturados foram solubilizados e mantidos por 3 horas à 60 °C (71). O processo foi repetido três vezes, intercaladas por filtração e nova adição de solvente. O produto final consistiu de (1) extrato lipídico e (1) resíduo delipidificado. O resíduo delipidificado foi evaporado para a completa remoção do solvente, pesado e submetido as extrações aquosas descritas a seguir.

#### FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE L. quieticolor



FONTE: a autora (2022)

#### 4.2.2 Extração aquosa em temperatura ambiente

O resíduo delipidificado passou por sucessivas extrações aquosas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). O material foi solubilizado em água destilada e mantido sob agitação mecânica. Após 6 horas, extrato aquoso e resíduo foram separados por filtração. Esse processo foi repetido três vezes, posteriormente, os extratos foram então reunidos, concentrados até pequeno volume e precipitados com etanol (3:1, v/v). O precipitado etanólico foi dialisado em água corrente por 2 dias, em membranas com limite de exclusão 6-8 kDa; posteriormente, o material retido foi concentrado,liofilizado e denominado RLQ-CW.

#### 4.2.3 Extração aquosa com água fervente

O resíduo da extração aquosa a frio (resíduo I) foi submetido a extração aquosa sob refluxo constante em banho com água fervente (96 °C). Após 6 horas, extrato aquoso e resíduo foram separados por filtração. Esse processo foi repetido três vezes, posteriormente, o extrato aquoso quente foi reunido, concentrado até pequeno volume e precipitados com etanol (3:1,

v/v). O precipitado foi dialisado em água corrente por dois dias (6-8 kDa); o material retido foi concentrado, liofilizado e denominado RLQ-HW.

#### 4.2.4 Extração alcalina

O resíduo da extração em água fervente (resíduo II) foi submetido a extração com hidróxido de sódio (NaOH, 5%, p/v) sob refluxo em banho-maria a 96 °C (3x). Com a finalidade de evitar a degradação das cadeias polissacarídicas, o procedimento foi realizado na presença de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). Após 6 horas, extrato e resíduo alcalino foram separados por filtração e neutralizados com ácido acético. O extrato alcalino foi concentrado até pequeno volume e dialisado por 2 dias em água corrente (6-8 kDa); o material retido foi concentrado, liofilizado e denominado EA-LQ.

#### 4.2.4 Obtenção dos extratos solúveis

Visando obter as moléculas solúveis em água presentes nos diferentes extratos obtidos, uma alíquota de 300 mg de cada um dos extratos (RLQ-CW, RLQ-HW e EA-LQ), foi solubilizada em água destilada na concentração de 5 mg/mL (*overnight*, sem temperatura). Posteriormente, cada material foi centrifugado (8.000 rpm, 20 minutos), os sobrenadantes foram então coletados, liofilizados e denominados Lq-CW, Lq-HW e Lq-N5, respectivamente.

#### 4.3 **PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO**

O extrato aquoso a temperatura ambiente (RLQ-CW) foi submetido a diferentes processos de purificação, conforme esquematizado na Figura 6. Os procedimentos realizados foram detalhados a seguir.

#### FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO RLQ-CW, OBTIDA EM EXTRATO FRIO DE *L. quieticolor*



FONTE: a autora (2022)

#### 4.3.1 Congelamento e descongelamento

A fração (RLQ-CW) foi fracionada pelo procedimento de congelamento e descongelamento (31). Portanto, a amostra foi solubilizada em água destilada, congelada e subsequentemente descongeladas em temperatura ambiente (3x). Posteriormente, foi centrifugada (8.000 rpm, 20 minutos), originando um precipitado (I-CW) e sobrenadante (S-CW), os quais foram separados, congelados e liofilizados.

#### 4.3.2 Diálises e centrifugações

Em diferentes etapas, as frações foram submetidas à dialise com membranas de 2 kDa, 6-8 kDa e 100 kDa [*Spectra/POR Biotech Membranes: Symmetric Regenarated Cellulose (RC); Symmetric Regenarated Ester* (CE)]. Foram realizadas diálises abertas (contra água corrente) e fechadas (contra água destilada, sob agitação magnética), sendo esta última interrompida após reação negativa em experimento com fenol-ácido sulfúrico (22). As centrifugações foram realizadas nos equipamentos *HERMLE-Z* 446 ou *HERMLE-Z326K*.

#### 4.3.3 Tratamento com α-amilase

A remoção de glicogênio se deu por meio do tratamento enzimático com  $\alpha$ -amilase de *Bacillus lincheniformis* (Sigma A3403-500KU). De acordo com sugestões do fabricante, foi preparada uma solução tampão fosfato 0.08 M (pH: 6.2), no qual foram dissolvidos 1,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dissódico) e 8,4 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anidro) em 1 L de água destilada. Utilizando-se dos espectros de HSQC, foram selecionados e integrados sinais em  $\delta$  100.4 - 99.9 (C1), potencialmente indicados pela literatura como constituintes de unidades  $\alpha$ -D-Glc*p* da molécula de glicogênio (38, 42). Assim, foram estipulados os percentuais aproximados correspondentes a polímeros de  $\alpha$ -glucose nas frações.

Inicialmente, a frações (RLQ-CW, SFS-CW e SFI-CW) foram solubilizadas em solução tampão fosfato e, proporcional ao percentual de glicogênio estimado (RLQ-CW: 5.4 %), foram adicionadas alíquotas de α-amilase (RLQ-CW: 1000 uL). As amostras foram mantidas sob agitação, a temperatura igual a 40 °C, por 4-6 horas. Adicionalmente, foi realizada a dosagem de açúcares redutores por meio do método colorimétrico de DNS (51), no qual o aumento de açúcares redutores indicou a extensão da atividade enzimática durante o experimento. Por fim, o material foi precipitado com etanol (3:1, v:v), condicionado em freezer (24 horas) e, posteriormente, submetido a centrifugação (8.000 rpm, 20 minutos). Os precipitados etanólicos (LqA-CW, 2SFS-CW, 2SFI-CW) foram dialisados em água corrente (24 horas), concentrados, congelados e liofilizados.

#### 4.3.4 Tratamento com solução de Fehling

Segundo adaptações (36), a solução de Fehling foi preparada a partir de duas soluções: (1) solução A, composta por tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (116,12 g) + hidróxido de potássio (125 g); e (2) solução B, por sulfato de cobre pentahidratado (43,57 g). Ambas preparadas separadamente e diluídas em 500 mL de água destilada.

Inicialmente, as frações (S-CW e I-CW) foram mantidas sob agitação na solução A (por 4-6 horas) e em seguida centrifugadas (8.000 rpm, 20 minutos). A fração I-CW originou um material insolúvel na solução A, correspondente ao precipitado, o qual foi neutralizado com ácido acético, dialisado contra água corrente (6-8 kDa, 24 horas) e liofilizado. O material solúvel na solução A, por sua vez, foi recuperado no sobrenadante, sobre o qual um volume

igual da solução B foi adicionado. Essa mistura foi mantida em agitação (1 hora) e depois condicionada sob refrigeração (12 horas). Posteriormente, foi realizada nova centrifugação, no qual o precipitado (PFP-CW e PFS-CW) e sobrenadante de Fehling (SFS-CW e SFI-CW) foram fracionados, neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente (6-8 kDa, por 48 horas). O complexo cúprico formado foi removido por adição de resina catiônica e o pH foi reestabelecido (pH: 7) com solução de NaOH 5%. Por fim, o precipitado (PFS-CW e PFI-CW) e sobrenadante de Fehling (SFS-CW e SFI-CW) foram dialisados contra água corrente (6-8 kDa, 24 horas), concentrados, congelados e liofilizados separadamente.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A caracterização dos extratos e das frações polissacarídicas foi realizada por meio de análises colorimétricas; experimentos de composição monossacarídica (GLC ou GC-MS); Ressonância Magnética Nuclear (RMN); homogeneidade e massa relativa (HPSEC-MALLS); e degradação controlada de Smith. Tal investigação forneceu informações sobre homogeneidade, tipos de ligação e peso molecular. Os procedimentos foram realizados conforme descrito a seguir.

#### 4.4.1 Análises colorimétricas

As dosagens de proteínas (10), fenólicos (67) e açúcares redutores (51) foram realizadas nas concentrações 1 a 3 mg/mL das amostras, por meio de métodos colorimétricos adaptados para leitura em microplaca de 96 poços. Foram utilizadas curvas padrão, em diferentes concentrações, obedecendo a linearidade estabelecida para cada ensaio. Todos os experimentos foram realizados utilizando-se de controles positivo (água + amostra), negativo (água + agente colorimétrico) e em triplicada (3 poços para cada concentração de padrão, controle e amostra). Posteriormente, foram conduzidas as leituras de absorbância (BIOTEK, EPOCH), nos comprimentos de onda indicados para cada ensaio. Obtiveram-se as médias dos valores de absorbância e, a partir da curva de calibração, a equação da reta ( $R^2 > 0.95$ ). Então, os valores foram convertidos e expressos em percentagem (%).

A concentração de proteínas nas frações (Lq-CW, Lq-HW, Lq-N5 e R2SFP-CW) foram obtidas pelo método de Bradford, sendo: 50 μL (amostra, padrão ou controles) e 250 μL (reagente de Bradford - SIGMA) em cada poço. A *Albumina Bovina Serum* (BSA - Sigma) foi

utilizada como padrão nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. Após 5 minutos de reação, a leitura foi realizada em 595 nm.

O teor de compostos fenólicos nas frações (Lq-CW, Lq-HW, Lq-N5 e R2SFP-CW) foram obtidos pelo uso do reagente de Folin (Sigma), sendo: 20  $\mu$ L (amostra, padrão ou controles), 100  $\mu$ L (reagente de Folin-Ciucalteu 10%) e 80  $\mu$ L (carbonato de sódio 7,5%). O ácido gálico foi utilizado como padrão, nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 120  $\mu$ g/mL. A placa foi levemente agitada, protegida da luz por 2 horas e a leitura realizada em 760 nm.

A dosagem de açúcares redutores nas frações (S-CW e I-CW) foram obtidas pelo método do 3,5 dinitrosalicilato (DNS) e realizado em tubos, sendo: 800  $\mu$ L (amostra, padrão ou controles) + 500  $\mu$ L (reagente de DNS). A glucose foi utilizada como padrão, nas concentrações de 0.2, 0.4, 0.8 e 1.0 mg/mL. Os tubos foram aquecidos em banho-maria por 5 minutos, resfriados e acrescentado o volume de 3.75 mL de água destilada. Posteriormente, cerca de 250  $\mu$ L dos tubos foram pipetados em placa e a leitura foi realizada em 540 nm.

#### 4.4.2 Composição monossacarídica

As frações (RLQ-CW, RLQ-HW, LQ-EA, Lq-CW, Lq-HW, Lq-N5, SFS-CW e R2SFI-CW) (3 mg) foram solubilizadas em TFA 2M (200  $\mu$ L) e levadas à estufa (100 °C; 8 h). Posteriormente, o ácido foi totalmente evaporado em soprador de ar. Os monossacarídeos hidrolisados foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH4) (pH 8-9), à temperatura ambiente, *overnight*. A reação foi interrompida e neutralizada com ácido acético (pH: 6-7) (80). O ácido bórico formado foi então evaporado e lavado consecutivas vezes com metanol, intercaladas por períodos no soprador. Os alditóis formados foram acetilados com piridina:anidrido acético (200  $\mu$ L,1:1, v/v), incubados em estufa a 100 °C por 30 minutos. Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio (1 mL), lavados com sulfato de cobre (1 mL; 3x) e água destilada (1 mL). Posteriormente, o clorofórmio residual foi evaporado (a temperatura ambiente). Os derivados acetilados foram solubilizados em acetona e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS).

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás, modelo *Shimadzu QP2020NX*, acoplado a um espectrômetro de massa com detector quadrupolo e coluna capilar VF5-MS (30 m x 0,25). As injeções foram realizadas em temperatura inicial igual à 100 °C, com aumento gradual de 10 °C/minuto (220-250-280 °C), mantidas por 3 minutos. Os dados foram produzidos considerando a ionização do impacto de elétrons com energia de 70 eV à 250 °C. Os cromatogramas e perfis de fragmentação gerados foram analisados pelo software *GCMS Postrun Analisis*, no qual foram feitas a integração dos picos correspondentes a unidades monossacarídicas pela comparação com padrões (Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Glc, Gal) e dados previamente indicados pela literatura (65).

#### 4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As frações foram analisadas por RMN, os quais renderam espectros mono- (RMN-<sup>13</sup>C, -<sup>1</sup>H e DEPT-135), bidimensionais [HSQC (*Heternuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*) e HSQC-DEPT (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy* – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)]. As análises foram realizadas em espectrômetro *BRUKER*, modelo *Avance-DRX-400* ou 600, a 70 °C. Cerca de 30 mg das amostras foram solubilizadas em água deuterada (D<sub>2</sub>O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me<sub>2</sub>SO*d*<sub>6</sub>). Os dados foram interpretados no software *TopSpin* 4.1.1 e os deslocamentos químicos se deram em  $\delta$  (ppm) relativos a  $\delta$  30.2 para (C) e  $\delta$  2.22 (H) para D<sub>2</sub>O;  $\delta$  39,7 (C) e 2,4 (H) para Me<sub>2</sub>-SO-d<sub>6</sub>.

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

A homogeneidade foi feita por análise em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC-MALLS), equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo Waters 2410. Ao todo, 4 colunas de gel permeação Waters com limites de exclusão de  $7x10^6$ ,  $4x10^5$ ,  $8x10^4$  e  $5x10^3$  Da, tiveram como eluente nitrito de sódio 0,1 mol.1<sup>-1</sup> e azida de sódio 0,2 g.1<sup>-1</sup>, com fluxo de 0,6 mL/min, em bomba peristáltica Waters 515. As frações foram mantidas em agitação com nitrito-azida (NaNO<sub>3</sub>), em concentração igual à 1,0 mg/mL<sup>-1</sup> e filtradas em membrana de acetato de celulose 0,22  $\mu$ m (Millipore). Posteriormente, as amostras foram injetadas (100  $\mu$ L) no cromatógrafo e o índice de refração foi determinado, sendo os dados analisados no software *Astra* 4.70.70.

#### 4.4.5 Degradação de Smith

A fração R2SFI-CW (50 mg) foi submetida a oxidação em solução com periodato de sódio (0.05 M, 15 mL), a temperatura ambiente, em ausência de luz. Após o período de 72 horas em agitação, o material oxidado foi então dialisado contra água corrente (2 kDa, 24 horas) e os aldeídos presentes foram reduzidos com acréscimo de borohidreto de sódio (24 horas), neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente (2 kDa) (27). Posteriormente, o material foi submetido a hidrólise ácida parcial com TFA (pH: 2) (30 minutos, 100 °C), sob refluxo, dialisado contra água corrente (2 kDa) e liofilizado. O conteúdo degradado (15 mg) foi analisado em RMN, conforme descrito anteriormente.

#### 5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS SOLÚVEIS

Os corpos de frutificação de *L. quieticolor* (6 kg) foram higienizados, liofilizados e triturados. O material seco correspondeu a 688,4 g (10%) e o resíduo delipidificado foi igual a 662.55 g (99%). Esse último foi submetido a extrações sequenciais e os extratos brutos foram previamente caracterizados por experimentos de RMN (Figura 8 A, B e C), HPSEC (Figura 7) e composição monossacarídica (Tabela 2).

TABELA 2 – RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *L. quieticolor* OBTIDAS EM GLC.

~	COMPOSIÇA			
FRAÇAO	MAN	GAL	GLU	RENDIMENTO (g)
RLQ-CW	79	17.4	3.9	20.8
RLQ-HW	85	11.4	2.7	21.9
LQ-EA	87	6.4	3.6	105.4

<sup>\*</sup>Analisado por GLC (Thermo Trace GC3) após hidrólise ácida total (TFA 2M, 100 °C, 8 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação (piridina : anidrido acético, 100 °C, 30 minutos).

Para todas as frações foram observados sinais de C-1/H-1 em  $\delta$  98.0/4.61 a 98.9/4.72 ( $\alpha$ -D-galp) (38); bem como em  $\delta$  99.5/4.72 a 100.7/4.88 ( $\alpha$ -D-glcp) (45) e  $\delta$  102.8/4.43 a 103.7/4.29 ( $\beta$ -D-glcp) (20).

EA-LD foram observados Para RLD-CW, **RLD-HW** e sinais em δ 86.0/3.4, 86.3/3.38 e 85.5/3.39, respectivamente, revelando a ocorrência de substituições em C-3 (66), os quais futuramente deverão ser confirmadas por análise de metilação. Os deslocamentos químicos em  $\delta$  68.8/3.73, 68.3/3.98 e 68.2/3.81, respectivamente, foram interpretados como indicativos de unidades 6-O ligadas (69). Os sinais em  $\delta$  79.5/3.28, 79.0/3.27 e 79.5/3.19 indicaram a presença de  $\alpha$ -D-Glcp (C-4), característicos do polímero de glicogênio (43). Em RLD-CW e RLD-HW, unidades -CH2 livres são encontradas em δ 60.6/3.54 e 60.9/3.60, respectivamente (72). Adicionalmente, a fração EA-LD foi a única que apresentou sinais nas regiões de  $\delta$  57.5/3.60 e 58.7/3.38, sugerindo a presença de um grupamento metil ligados aos polissacarídeos ou proteínas desta fração (62). As três frações apresentaram perfil de eluição heterogêneo em HPSEC-MALLS (Figura 7), representado por populações de polissacarídeos.



FIGURA 7 – PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES BRUTAS RLQ-CW, RLQ-HW E LQ-EA.

Frações brutas RLQ-CW (retido em água fria: linha preta), RLQ-HW (retido em água fervente: linha roxa) e LQ-EA (extrato alcalino: linha verde). FONTE: este trabalho.



FIGURA 8 – ESPECTROS BIDIMENSIONAIS 1H/13C HSQC E RMN-DEPT DOS EXTRATOS BRUTOS DE L. quieticolor

Os espectros foram obtidos com DMSO [calibração em δ 39.7 (C<sub>13</sub>) e 2.40 (H<sub>1</sub>)], a 70 °C. Em (A) RLQ-CW (retido em água fria), (B) RLQ-HW (retido em água fervente) e (C) LQ-EA (extrato alcalino). FONTE: este trabalho.

Conforme descrito no item 4.2.4, também se buscou estudar os polissacarídeos solúveis obtidos a partir dos extratos brutos, os quais foram adquiridos por meio de centrifugações. O teor de proteínas e compostos fenólicos foram avaliados exclusivamente nos extratos solúveis por meio de métodos colorimétricos (Tabela 3).

TABELA 3 – PERCENTUAL DE SUBSTÂNCIAS SECUNDÁRIAS (PROTEÍNAS E COMPOSTOS<br/>FENÓLICOS) NOS EXTRATOS BRUTOS SOLÚVEIS DE L. quieticolor.

FRAÇÃO	PROTEÍNAS TOTAIS (%)	COMPOSTOS FENÓLICOS (%)
Lq-CW	0,09	Não detectado
Lq-HW	0,12	0,29
Lq-N5	0,16	1,89

As frações solúveis tiveram a sua composição monossacarídica determinada em GC-MS (item 4.4.2) e também foram analisadas por RMN (Figura 9 e 9. A, B e C) e HPSEC-MALLS (Figura 11). A composição monossacarídica das frações solúveis a frio (Lq-CW), a quente (Lq-HW) e alcalina (Lq-N5), demonstravam que estas são compostas por glucose, galactose e manose, respectivamente.

De maneira geral, as frações solúveis exibiram espectros semelhantes aos observados em suas anteriormente. Sinais do carbono anomérico em  $\delta$  99.9/4.72 a 100.2/5.02 ( $\alpha$ -D-Glcp) e  $\delta$  102.6/4.54 a 102.9/4.74 para unidades de  $\beta$ -D-Glcp (Figura. 9 A, B e C). Simultaneamente, substituições em C-3 foram identificadas em  $\delta$  84.9/3.73 a 85.3/3.75; e unidades 6-*O*-ligadas em  $\delta$  68.9/4.19 a 69.1/4.21. Unidades -CH<sub>2</sub> livres ocorreram em  $\delta$  60.8/3.88 a 61.0/3.92 para todas as frações. Entretanto, observou-se a ausência ou baixa intensidade em sinais próximos a  $\delta$  79 (C-4) nas frações solúveis, característicos da molécula de glicogênio, os quais potencialmente foram precipitados durante as centrifugações.

Os dados sugeriram a presença de  $\beta$ -D-glucanas,  $\alpha$ -D-glucanas e um polímero contendo galactose ( $\alpha$ -D-Galp) em todos os extratos solúveis de *L. quieticolor*. Entretanto, nota-se a prevalência na distribuição de alguns destes polímeros a depender de cada extrato, os quais estão intimamente relacionados com as condições de extração e solubilidade dos polissacarídeos. Foram constatadas a predominância de  $\alpha$ -glucanas no extrato frio (Lq-CW);

heterogalactanas no extrato quente (Lq-HW); e proeminência de  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanas no extrato alcalino (Lq-N5). Adicionalmente, o teor de proteínas e compostos fenólicos aumenta de forma gradual do extrato a frio (Lq-CW) ao alcalino (Lq-N5). As análises de composição monossacarídica em GC-MS corroboram com os dados apresentados em espectros de RMN e HPSEC-MALLS.



FIGURA 9 – ESPECTROS BIDIMENSIONAIS 1H/13C RMN-HSQC DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS BRUTAS DE L. quieticolor

Os espectros foram obtidos em em D<sub>2</sub>O [calibração com acetona:  $\delta$  30.2 (C<sub>13</sub>)], a 70 °C. Em (A) Lq-CW (água fria), (B) Lq-HW (água fervente) e (C) Lq-N5 (extrato alcalino). FONTE: este trabalho.



FIGURA 10 – ESPECTROS MONODIMENSIONAIS RMN-13C DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS BRUTAS DE L. quieticolor

Os espectros foram obtidos em D<sub>2</sub>O [calibração com acetona:  $\delta$  30.2 para (C<sub>13</sub>)], a 70 °C. Em (A) Lq-CW (água fria), (B) Lq-HW (água fervente) e (C) Lq-N5 (extrato alcalino). FONTE: este trabalho.

Metodologias foram selecionadas para a obtenção de extratos polissacarídicos do basidiomiceto *Pleurotus eryngii*, na qual obtiveram três extratos (CWEF, HWEF e AEF), correspondentes a mistura de polissacarídeos, por meio das extrações sequenciais: água fria, água quente e em autoclave, respectivamente (2). Por meio da integração dos sinais na região anomérica em espectro de HSQC-DEPT e dados de composição monossacarídica, foi observada a prevalência de manogalactanas em CWEF (89%), enquanto HWEF e AEF demonstravam misturas de polímeros contendo unidades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Glc*p*.

Os métodos tradicionais de extração se baseiam na obtenção dos polímeros de acordo com a sua solubilidade. Alguns heteropolissacarídeos, como manogalactanas e fucogalactanas, solúveis em água fria, podem ser extraídas em água a temperatura ambiente (42, 60, 68, 81). Enquanto algumas glucanas obtidas dos corpos de frutificação de basidiomicetos são insolúveis, sendo, portanto, extraídas em tratamentos exaustivos de alta temperatura ou em soluções alcalinas (como KOH 2% ou NaOH 5%) (2, 11, 12, 45, 59). Considerando que esses últimos são demasiadamente agressivos e podem levar a degradação das cadeias, a utilização de borohidreto de sódio (NaHB<sub>4</sub>) é muitas vezes recomendada com intuito de proteger terminais não-redutores (63).

A escolha da metodologia aplicada nos procedimentos de extração é considerada essencial no que diz respeito ao rendimento, estrutura química e atividade biológica dos polissacarídeos (30). Ao comparar diferentes metodologias para a obtenção de extratos solúveis de *Schizophyllum commune*, foram encontrados polissacarídeos de maior massa molecular em extrato aquoso quente (HWE: 52.2 kDa) e o de menor massa molecular no extrato adquirido em alta pressão (HPE: 15.8 kDa) (14). Logo, variáveis como temperatura, pH e pressão são determinantes ao promover o desprendimento e selecionar polissacarídeos de estruturas químicas distintas, com solubilidade ou pesos moleculares variáveis (76).

As três frações brutas solúveis apresentaram perfil de eluição heterogêneo (Figura 11), demonstrando que as mesmas são compostas por distintas populações de polissacarídeos. Por tratar-se de extratos brutos, tais resultados eram esperados e estão de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de composição monossacarídica e RMN (Figuras 9 e 10).



FIGURA 11 – PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS BRUTAS DE L. quieticolor

Frações fracionadas Lq-CW (extrato aquoso frio: verde), Lq-HW (extrato aquoso quente: vermelho) e Lq-N5 (extrato alcalino em NaOH 5%: roxo). FONTE: este trabalho.

A caracterização química das frações brutas, bem como um ensaio para avaliação do potencial *in vitro* dos extratos solúveis de *L. quieticolor* vêm sendo realizado com células da linhagem B16-F10 (melanoma murino). Os ensaios biológicos estão sendo desenvolvidos em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular (UFPR).

Visando separar polissacarídeos quimicamente distintos, como heteropolisacarídeos e glucanas insolúveis, a fração Lq-CW foi submetida a procedimentos de purificação (tratamento com α-amilase, solução de Fehling e diálises). Os resultados obtidos com a fração Lq-CW serão discutidos a seguir.

# 5.2 CARACTERIZAÇÃO DE UMA GLUCANA OBTIDA A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO A FRIO (Lq-CW)

Como já mencionado, o extrato aquoso frio (Lq-CW) foi concentrado, precipitado com etanol e centrifugado. O precipitado etanólico foi fracionado conforme apresentado na Figura 5. Inicialmente, sinais sugestivos da molécula de glicogênio foram identificados. Portanto, o primeiro procedimento de purificação realizado foi o tratamento enzimático com  $\alpha$ -amilase (item 4.3.3). Posteriormente, foi iniciado o processo de congelamento e descongelamento (31), no qual a fração Lq-CW foi separada em fração solúvel (S-CW) e insolúvel (I-CW) em água fria; correspondentes ao sobrenadante e precipitado, respectivamente.

Foram observadas similaridades a partir dos espectros de RMN entre as frações S-CW (Figura 12. A e B) e I-CW (Figura 13. A e B). Em ambas as frações foram encontrados sinais na região anomérica referentes a unidades de  $\beta$ -D-Glc*p* ( $\delta$  102.4 a 103.3) e  $\alpha$ -D-Gal*p* ( $\delta$  98.2 a 98.5), além da permanência de sinais de  $\alpha$ -D-Glc*p* ( $\delta$  99.9 a 100.7). Apesar disso, a fração solúvel S-CW apresentou maior complexidade de sinais quando comparada a I-CW. Constatouse a proeminência de sinais intensos referentes a unidades  $\alpha$ -D-Gal*p* em S-CW (Figura 12), os quais indicam a presença de heteropolissacarídeos solúveis nesta fração.

Sinais residuais dos heteropolissacarídeos solúveis também foram vistos em I-CW (Figura 13). Contudo, os espectros de I-CW constituem principalmente de sinais típicos de  $\beta$ -D-Glc*p* com possíveis ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6). Além disso, destaca-se que apenas na fração I-CW foram encontrados sinais em  $\delta$  83.3/3.55, indicativos de unidades  $\alpha$ -D-Glc*p*-3-*O*-ligadas. Salienta-se que  $\alpha$ -glucanas ligadas (1 $\rightarrow$ 3) são predominantemente insolúveis, segundo a bibliografia, sendo esperado que sua ocorrência esteja restrita apenas a fração insolúvel (20, 45).



FIGURA 12 – ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS 1H/13C RMN-HSQC DA FRAÇÃO S-CW

Os espectros foram obtidos em DMSO (Me<sub>2</sub>SO- $d_6$ ) [calibração:  $\delta$  37.9 (C<sub>13</sub>) e  $\delta$  2.40 (H<sub>1</sub>)], a 70 °C. FONTE: este trabalho.



FIGURA 13 – ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C RMN-HSQC DA FRAÇÃO I-CW

Os espectros foram obtidos em DMSO (Me<sub>2</sub>SO- $d_6$ ) [calibração:  $\delta$  37.9 (C<sub>13</sub>) e  $\delta$  2.40 (H<sub>1</sub>)], a 70 °C. FONTE: este trabalho.

O tratamento com solução de Fehling frequentemente se utiliza-se de um meio alcalino, com acréscimo de solução de cobre (como sulfato de cobre), no qual polissacarídeos insolúveis podem ser decompostos com o emprego de agentes ácidos. Estudos recentes mostram vantagens na sua utilização, principalmente quando associado a outras metodologias de purificação. O tratamento com solução de Fehling também pode ser utilizado para isolar homopolissacarídeos constituídos por unidades de D-Glc*p* de heteropolissacarídeos, principalmente aqueles provenientes de frações solúveis em gelo-degelo (63). A obtenção de frações puras contendo homo- ou heteropolissacarídeos pela utilização de tratamento com solução de Fehling foi então considerada (37, 55, 69, 72, 81).

Uma vez que sinais sugestivos de glucanas e heterogalactanas persistiram em ambas as frações (S-CW e I-CW), visando separar esses polímeros, as mesmas foram submetidas a tratamento com solução de Fehling. No total, cinco frações foram geradas: sobrenadante de Fehling (SFS-CW e SFI-CW), precipitado de Fehling (PFS-CW e PFI-CW) e precipitado em solução A de Fehling (2PP-CW), conforme indicado na Figura 7.

O sobrenadante de Fehling (SFS-CW), oriundo da fração solúvel em gelo-degelo (S-CW), demonstrou espectros mais límpidos quando comparados com a sua fração anterior, porém, ainda equivalentes a mistura de polissacarídeos (Figura 14). Os sinais em  $\delta$  91.8/4.84 e 96.8/4.82, anteriormente presentes na região anomérica de S-CW (Figura 12. B), não foram mais observados em SFS-CW (Figura 14. B). Uma vez que o Fehling envolve consecutivos tratamentos com ácidos e bases, intercalados por diálises, esperava-se que tais procedimentos eliminariam substâncias secundárias residuais.

Foram observados sinais característicos do carbono anomérico (C-1/H-1) de  $\alpha$ - ( $\delta$  100.5/4.93) e  $\beta$ -D-Glcp ( $\delta$  102.9/4.4.43/4.13) e de polímeros contendo unidades de  $\alpha$ -D-Galp ( $\delta$  98.1/4.61) (Figura 14 A e B).



FIGURA 14 – ESPECTROS MONO- E BIDIMENSIONAIS <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC E RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO SFS-CW DE *L. quieticolor* 

Os espectros foram obtidos em DMSO (Me<sub>2</sub>SO- $d_6$ ) [calibração:  $\delta$ 39.7 (C<sub>13</sub>) e  $\delta$ 2.40 (H<sub>1</sub>)], a 70 °C. FONTE: este trabalho.

É importante considerar que as frações geradas (sobrenadante e precipitado em solução de Fehling) tendem a manter polímeros residuais umas às outras, tornando-se necessária a repetição do mesmo experimento até alcançar a total pureza das frações. Portanto, considerando a persistência dos sinais de unidades  $\alpha$ -D-Galp ( $\delta$  98.1/4.61) na fração SFS-CW, os procedimentos de purificação (tratamento com  $\alpha$ -amilase e solução de Fehling) foram repetidos. Um novo sobrenadante foi obtido, denominado 2SFS-CW, não havendo a formação de novo precipitado. Tal resultado indicou a efetividade do primeiro tratamento por Fehling e a necessidade de novas abordagens metodológicas para a purificação desta fração.

A análise de composição monossacarídica da fração 2SFS-CW mostrou glucose (96.5%) e galactose (3.5%). Entretanto, em experimentos de RMN (dado não mostrado) a

presente fração se mostrou similar a anterior (SFS-CW). Corroborando com os resultados anteriores, o perfil de eluição da fração 2SFS-CW (Figura 15) se mostrou heterogêneo e formado pela mistura de diferentes polímeros. Tais resultados sugerem a presença de heteroou homopolissacarideos (glucanas e/ou galactanas lineares) nessa fração.



FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO 2SFS-CW DE L. quieticolor

Fração 2SFS-CW, derivada do sobrenadante de Fehling e sobrenadante de gelo-degelo. FONTE: este trabalho.

O sobrenadante de Fehling resultante da fração I-CW, por sua vez, foi denominado SFI-CW (Figura 7). Após o tratamento do I-CW com solução de Fehling, sinais de outras biomoléculas, como proteínas, foram predominantemente excluídos dos espectros das frações polissacarídicas. Conforme descrito no item 4.3.4, a fração I-CW solubilizada em solução A, após ser centrifugada originou um precipitado (2PP-CW), sendo esse material também analisado por RMN (dado não mostrado). O espectro obtido mostrou sinais relativos a proteínas ( $\delta$  22-28), sugerindo que essas moléculas permaneceram no precipitado. Portanto, o fracionamento do material insolúvel em solução A se mostrou essencial no isolamento do polissacarídeo de maior interesse neste trabalho.

Assim como em SFS-CW, as análises de RMN da fração SFI-CW (Figura 16. A, C), demonstrou que o mesmo possuía uma quantidade residual de  $\alpha$ -glucanas ( $\delta$  99.7/5.02, 100.3/4.94 e 79.0/3.27) e galactanas ( $\delta$  97.9/4.61). Por isso, os tratamentos com  $\alpha$ -amilase e solução de Fehling também foram repetidos para a fração SFI-CW, seguido de um processo de diálise (100 kDa), originando a fração R2SFP-CW (Figura 16. B, D). Os espectros de RMN referentes a fração SFI-CW e 2SFI-CW (antes e após a repetição de experimentos) estão disponíveis nas Figuras 16 A, B, C, e D.

O espectro da fração 2SFI-CW exibiu claros sinais de uma  $\beta$ -D-Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6) (Figura 16. B e D). Os espectros mono-(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT) e bidimensionais (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC) de R2SFP-CW foram comparados com estruturas semelhantes reportadas pela literatura (2, 11, 12, 20, 45, 63). São observados sinais em  $\delta$  102.8/4.43/4.20, correspondentes ao carbono anomérico;  $\delta$  86.2/3.40, equivalentes a unidades C-3 substituídas;  $\delta$  68.2/3.98 e 68.4/3.45/3.18, relativos à presença de unidades C-6 ligadas;  $\delta$  60.4/3.60 e 60.9/3.38 (C-6/H-6), os quais foram atribuídos a unidades -CH<sub>2</sub> livres. Esse último foi confirmado pela inversão de sinal em  $\delta$  60.9 no experimento RMN-DEPT (Figura 17).







FIGURA 17 - ESPECTROS MONODIMENSIONAL HSQC-DEPT DA FRAÇÃO SFI-CW DE L. quieticolor,

O espectro foi obtido em DMSO (Me<sub>2</sub>SO- $d_6$ ) [calibração:  $\delta$  39.7 (C<sub>13</sub>) e  $\delta$  2.40 (H<sub>1</sub>)], a 70 °C. FONTE: este trabalho.

A fração R2SFI-CW, foi analisada por HPSEC-MALLS (Figura 18) e apresentou perfil de eluição homogêneo.

FIGURA 18 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO R2SFI-CW DE L. quieticolor



Perfil de eluição de R2SFI-CW obtido após diálise fechada com membrana de 100 kDa. FONTE: este trabalho.

Proteínas e compostos fenólicos não foram detectados na fração R2SFI-CW. Corroborando com os dados de RMN (Figura 16 B, C e 17), a análise de composição monossacarídica em GC-MS demonstrou que R2SFI-CW é constituído exclusivamente por unidades de glucose.

Visando elucidar qual a cadeia principal da β-glucana presente na fração R2SFI-CW, a degradação de Smith foi realizada. O princípio básico dessa reação é clivagem seletiva de ligações C-C em grupos de -OH vicinais nas orientações axial-equatorial ou equatorial-equatorial. Após o emprego de solução com periodato de sódio (72 horas, no escuro), os polialdeídos formados pela reação de oxidação são posteriormente reduzidos com NaBH<sub>4</sub>, neutralizados e hidrolisados (27).

Glucanas tipicamente encontradas em fungos, como aquelas do tipo  $\beta$ -D-Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6), quando submetidas a degradação de Smith, apresentam espectros de RMN correspondentes a uma glucana linear (1 $\rightarrow$ 3) ligada, sugerindo que essa é a cadeia principal do polímero (2, 11, 12, 20, 45, 63). Para a fração R2SFI-CW, no entanto, o espectro de <sup>13</sup>C obtido com o material resistente à degradação parcial de Smith, apresentou sinais de C-6 substituído (dado não mostrado), mostrando que o procedimento deverá ser repetido para a total remoção das cadeias laterais do polissacarídeo.

Estudos sobre os polissacarídeos de *Lactarius rufus*, coletados no Estado de Santa Catarina, foram realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa. Por meio de extração com água fervente foram obtidas duas frações com diferentes polissacarídeos, as quais corresponderam a estruturas do tipo  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), sendo: uma insolúvel (IHW) e outra solúvel (FSHW) em água fria. Ambas mostraram efeitos anti-inflamatórios em ensaio *in vivo* pela indução de processo inflamatório com formalina, sendo FSHW também induziu a citotoxicidade *in vitro* em células da linhagem HepG2 (hepatoma humano) e hepatócitos murinos primários (52, 60).

Além disso, fucogalactanas do tipo  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6), substituídas em 2-O por unidades de fucose ( $\alpha$ -L-Fucp) foram extraídas em água fria de *L. rufus* (62). Para o basidiomiceto *Pleurotus* spp., polímeros contendo galactanas e outros heteropolissacarídeos com unidades de galactose ( $\alpha$ -Galp) foram anteriormente reportados, os quais também demonstraram propriedades biológicas (2, 38, 55, 69).

#### 6. CONCLUSÕES

Conclui-se que os extratos adquiridos dos basidiomas de *Lactarius quieticolor* apresentam polissacarídeos formados predominantemente por unidades de  $\alpha$ -D-Galp,  $\alpha$ -D-Glcp e  $\beta$ -D-Glcp. Os extratos solúveis obtidos em água fria (Lq-CW), água quente (Lq-HW) e alcalino (Lq-N5), correspondem a mistura de polímeros que se distribuem em diferentes proporções a depender de cada procedimento de extração. As metodologias abordadas nos processos de extração (temperatura e pH) se mostraram importantes para seleção e concentração de determinados polímeros em cada extrato.

A partir do extrato aquoso obtido a temperatura ambiente, foi isolada uma fração homogênea, denominada R2SFI-CW. A mesma é composta por um polissacarídeo do tipo  $\beta$ -D-glucana, a qual possivelmente possui ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6). O potencial biológico desta fração deverá ser estudado futuramente.

# REFERÊNCIAS

- ABREU, H. et al. Gelling functional property, anti-inflammatory and antinociceptive bioactivities of β-D-glucan from the edible mushroom Pholiota nameko. International Journal of Biological Macromolecules, v. 122, p. 1128–1135, 2019.
- ABREU, H. et al. Polysaccharides from Pleurotus eryngii: Selective extraction methodologies and their modulatory effects on THP-1 macrophages.
   Carbohydrate Polymers, v. 252, p. 117177, 2021.
- 3 AMARAL, Alex E. et al. An unusual water-soluble β-glucan from the basidiocarp of the fungus Ganoderma resinaceum. **Carbohydrate polymers**, v. 72, n. 3, p. 473-478, 2008.
- ASHRAF KHAN, A. et al. Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β–glucan extracted from edible mushrooms Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus and Coprinus attrimentarius. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, v. 11, p. 67–74, 1 jul. 2017.
- 5 BAGO, Berta; PFEFFER, Philip E.; SHACHAR-HILL, Yair. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant physiology**, v. 124, n. 3, p. 949-958, 2000.
- 6 BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? American journal of botany, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.
- 7 BONFANTE, P.; VENICE, F.; LANFRANCO, L. The mycobiota: fungi take their place between plants and bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 49, p. 18–25, 2019.
- 8 BONONI, V. L. R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. In: MELO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. DE (Eds.). Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. p. 243–268.
- 9 BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799–808, 2006.
- 10 BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, v. 75, p. 248–256, 1976.
- 11 CANTU-JUNGLES, T. M. et al. In vitro fermentation of Cookeina speciosa glucans stimulates the growth of the butyrogenic Clostridium cluster XIVa in a targeted way. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 219–229, 2018.
- 12 CARBONERO, E. R. et al. A b-glucan from the fruit bodies of edible mushrooms Pleurotus eryngii and Pleurotus ostreatoroseus. Carbohydrate Polymers, v. 66, p. 252–257, 2006.

- 13 CARRASCO, J.; PRESTON, G. M. Minireview Growing edible mushrooms: a conversation between bacteria and fungi. Environmental Microbiology, v. 22, n. 3, p. 858–872, 2020.
- 14 CHEN, Z. et al. Characterization of physicochemical and biological properties of Schizophyllum commune polysaccharide extracted with different methods. International Journal of Biological Macromolecules, v. 156, p. 1425–1434, 2020.
- 15 CHENG, J. et al. Conformational properties and biological activities of α-Dmannan from Sanghuangporus sanghuang in liquid culture. International Journal of Biological Macromolecules, v. 164, p. 3568–3579, 2020.
- CHENG, X. DU et al. Immunomodulatory effect of a polysaccharide fraction on RAW 264.7 macrophages extracted from the wild Lactarius deliciosus.
   International Journal of Biological Macromolecules, v. 128, p. 732–739, 2019.
- 17 COELHO, M. A. et al. Fungal Sex: The Basidiomycota. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.
- 18 COELHO-MOREIRA, J. S. et al. Degradation of Diuron by Phanerochaete chrysosporium : Role of Ligninolytic Enzymes and Cytochrome P450. BioMed Research International, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- 19 DE GUSSEM, K. et al. Raman spectroscopic study of Lactarius spores (Russulales, Fungi). Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 61, n. 13–14, p. 2896–2908, 2005.
- 20 DE JESUS, L. I. et al. Simple and effective purification approach to dissociate mixed water-insoluble  $\alpha$  and  $\beta$ -D-glucans and its application on the medicinal mushroom Fomitopsis betulina. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 353–360, 2018.
- 21 DING, X.; HOU, Y.; HOU, W. Structure feature and antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from Lactarius deliciosus Gray. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 397–402, 2012.
- 22 DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.
- 23 FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. DE (Eds.). Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004.
- 24 FRATILA-APACHITEI, L. E. et al. Diuron degradation by Phanerochaete chrysosporium BKM- F-1767 in synthetic and natural media. **Biotechology Letters**, v. 21, p. 147–154, 1999.
- 25 FREE, S. J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In: Advances in Genetics. [s.l.] Academic Press Inc., 2013. v. 81p. 33–82.

- 26 GARCIA, K. et al. Take a Trip Through the Plant and Fungal Transportome of Mycorrhiza. **Trends in Plant Science**. Elsevier Ltd, 2016.
- 27 GOLDSTEIN, I. J. et al. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 361–369, 2005.
- 28 GOMAA, O. M.; LINZ, J. E.; REDDY, C. A. Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, Phanerochaete chrysosporium. World J Microbiol Biotechnol, v. 24, p. 2349–2356, 2008.
- 29 GOMES, F. et al. Mycorrhizal synthesis between Lactarius deliciosus and Arbutus unedo L. **Mycorrhiza**, v. 26, n. 3, p. 177–188, 1 abr. 2016.
- 30 GONG, P. et al. Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. **Carbohydrate** research, v. 494, p. 108037, 1 ago. 2020.
- 31 GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens Cetrariu islundica and Ramalina usnea. Carbohydrate research, v. 128, p. 119–132, 1984.
- 32 GUERIN-LAGUETTE, A. et al. Lactarius deliciosus and Pinus radiata in New Zealand : towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. Mycorrhiza, v. 24, p. 511–523, 2014.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.
   Mycological research, v. 111, n. Pt 5, p. 509–547, 2007.
- HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. Biology and Fertility of Soils 2001 33:4, v. 33, n. 4, p. 265–278, 2001.
- HOU, Y. et al. Structure elucidation, proliferation effect on macrophage and its mechanism of a new heteropolysaccharide from Lactarius deliciosus Gray.
   Carbohydrate Polymers, v. 152, p. 648–657, 2016.
- 36 JONES, J. K. L.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. Methods in Carbohydrate Chemistry, v. 5, p. 36–38, 1965.
- KOMURA, D. L. et al. Structure of Agaricus spp. fucogalactans and their antiinflammatory and antinociceptive properties. Bioresource Technology, v. 101, n. 15, p. 6192–6199, 2010.
- 38 KOMURA, D. L. et al. Water-soluble polysaccharides from Pleurotus ostreatus var. florida mycelial biomass. International Journal of Biological Macromolecules, v. 70, p. 354–359, 2014.
- 39 KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. **Annual Review of**

**Phytopathology**, v. 52, p. 427–451, 2014.

- 40 LECHNER, B. E.; PAPINUTTI, V. L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus Lentinus tigrinus on wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 594–598, 2006.
- 41 LEE, H. et al. Taxonomic revision of the genus Lactarius (Russulales, Basidiomycota) in Korea. [s.l.] Springer Netherlands, 2019. v. 95
- MILHORINI, S. DA S. et al. Fucogalactan from the giant mushroom Macrocybe titans inhibits melanoma cells migration. Carbohydrate Polymers, v. 190, p. 50–56, 2018.
- 43 MILHORINI, S. DA S. Polissacarídeos do cogumelo Macrocybe titans: caracterização estrutural e atividade biológica. Universidade Federal do Paraná, 2017.
- 44 MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; KUJAWOWICZ, Karolina; WITKOWSKA, Anna Maria. Beta-glucans from fungi: Biological and healthpromoting potential in the COVID-19 pandemic era. Nutrients, v. 13, n. 11, p. 3960, 2021.
- MORALES, D. et al. Isolation and comparison of α- and β-D-glucans from shiitake mushrooms (Lentinula edodes) with different biological activities.
   Carbohydrate Polymers, v. 229, p. 115521, 2020.
- 46 MORENO, R. B. et al. Structure and antinociceptive effects of β-d-glucans from Cookeina tricholoma. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 220–228, 2016.
- 47 NUYTINCK, J.; VERBEKEN, A. Morphology and taxonomy of the European species in Lactarius sect. Deliciosi (Russulales). Mycotaxon, v. 92, n. April 2005, p. 125–168, 2005.
- 48 NUYTINCK, J.; WANG, X. H.; VERBEKEN, A. Descriptions and taxonomy of the Asian representatives of Lactarius sect. Deliciosi. Fungal Diversity, v. 22, p. 171–203, 2006.
- 49 OSIŃSKA-JAROSZUK, Monika et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. World journal of microbiology and biotechnology, v. 31, p. 1823-1844, 2015.
- 50 PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group, 2008.
- 51 PETKOWICZ, C. L. DE O. et al. **Bioquímica: Aulas Práticas**. 7. ed. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.
- 52 PIRES, A. DO R. A. et al. Cytotoxic effect of Agaricus bisporus and Lactarius rufus β-d-glucans on HepG2 cells. International Journal of Biological Macromolecules, v. 58, p. 95–103, 2013.

- 53 REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. **Food & Function**, v. 3, p. 1118–1130, 2012.
- 54 RICHARDS, T. A.; LEONARD, G.; WIDEMAN, J. G. What Defines the "Kingdom" Fungi? **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, p. 57–77, 2017.
- 55 ROSADO, F. R. et al. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes Pleurotus ostreatus "florida" Berk. and Pleurotus ostreatoroseus Sing. FEMS Microbiology Letters, v. 221, n. 1, p. 119–124, 11 abr. 2003.
- 56 ROTH, R.; PASZKOWSKI, U. Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. **Current Opinion in Plant Biology.** Elsevier Ltd, 2017.
- 57 RUIZ-HERRERA, J. **Biosynthesis of β-glucans in fungi.** Antonie van Leeuwenhoek, v. 60, n. 2, p. 73–81, ago. 1991.
- RUTHES, A. C. et al. Agaricus bisporus fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches. Carbohydrate Polymers, v. 92, n. 1, p. 184–191, 30 jan. 2013c.
- 59 RUTHES, A. C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom Amanita muscaria: Structure and inflammatory pain inhibition. Carbohydrate Polymers, v. 98, n. 1, p. 761–769, 2013a.
- 60 RUTHES, A. C. et al. Lactarius rufus  $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 6)$ -β-d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 129–136, 2013b.
- 61 RUTHES, A. C. et al. Prebiotic potential of mushroom D-glucans: implications of physicochemical properties and structural features. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117940, mar. 2021.
- 62 RUTHES, A. C. et al. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from Agaricus bisporus and Lactarius rufus. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1620–1627, 2012.
- 63 RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. Carbohydrate Polymers, v. 117, p. 753–761, 2015.
- 64 SALTARELLI, Roberta et al. Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of Ganoderma lucidum from Central Italy. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 143-151, 2009.
- 65 SASSAKI, G. L. et al. Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 215–222, 2008.

- 66 SILVEIRA, M. L. L. Caracterição estrutural e ação antinociceptiva e antiinflamatória de polissacarídeos isolados de Pleurotus sajor-caju. **Universidade** Federal do Paraná, 2015.
- 67 SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocateu Reagent. Methods in Enzymology, v. 299, p. 152– 178, 1999.
- 68 SMIDERLE, F. R. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURA DE ALGUNS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NO BASIDIOMA DE Pleurotus pulmonarius E APLICAÇÕES. **Universidade Federal do Paraná**, 2006.
- 69 SMIDERLE, F. R. et al. A 3-O-methylated mannogalactan from Pleurotus pulmonarius: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2731–2736, 2008.
- 70 SMIDERLE, Fhernanda R. et al. Agaricus bisporus and Agaricus brasiliensis  $(1 \rightarrow 6)$ -βd-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 91-99, 2013.
- 71 SMIDERLE, F. R. et al. Exopolysaccharides, proteins and lipids in Pleurotus pulmonarius submerged culture using different carbon sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 368-376, 2012.
- 72 SOVRANI, V. Caracterização estrutural de polissacarídeos do cogumelo Pholiota nameko. **Universidade Federal do Paraná**, 2016.
- 73 SPATAFORA, J. W. et al. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. In: Microbiology Spectrum. [s.l.] American Society for Microbiology, 2017.
- 74 TEDERSOO, L. et al. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza, v. 20, p. 217– 263, 2010.
- 75 TEL-ÇAYAN, G. et al. Isolation, structural characterization, and biological activities of galactomannans from Rhizopogon luteolus and Ganoderma adspersum mushrooms. International Journal of Biological Macromolecules, v. 165, p. 2395–2403, 2020.
- 76 TRYGG, J.; BELTRAME, G.; YANG, B. Rupturing fungal cell walls for higher yield of polysaccharides: Acid treatment of the basidiomycete prior to extraction. Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 57, p. 102206, 1 out. 2019.
- 77 VILLARES, Ana. Polysaccharides from the edible mushroom Calocybe gambosa: structure and chain conformation of a  $(1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 6)$ -linked glucan. **Carbohydrate Research**, v. 375, p. 153-157, 2013.
- 78 WAGENER, J.; STRIEGLER, K.; WAGENER, N. α- and β-1,3-glucan synthesis and remodeling. In: Current Topics in Microbiology and

Immunology. [s.l.] Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2020. v. 425p. 53–82.

- 79 WANG, Y.; CUMMINGS, N.; GUERIN-LAGUETTE, A. Cultivation of Basidiomycete Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Tricholoma, Lactarius, and Rhizopogon. In: [s.l: s.n.]. p. 281–304, 2012.
- 80 WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. Methods in carbohydrate chemistry, v. 2, n. 2, p. 211-215, 1963.
- 81 ZAVADINACK, M. et al. An α-D-galactan and a β-D-glucan from the mushroom Amanita muscaria: Structural characterization and antitumor activity against melanoma. Carbohydrate Polymers, v. 274, 15 nov. 2021.



# ANEXO