



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS CATALÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

GRACY KELLY FARIA OLIVEIRA

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE HETEROGALACTANAS PARCIALMENTE
METILADAS OBTIDAS DE *Grifola frondosa* (“Maitake”) E
Pleurotus ostreatus (“Shimeji”)**

**CATALÃO - GO
2013**

GRACY KELLY FARIA OLIVEIRA

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE HETEROGALACTANAS PARCIALMENTE
METILADAS OBTIDAS DE *Grifola frondosa* (“Maitake”) E
Pleurotus ostreatus (“Shimeji”)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química da Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão, como requisito para o Exame de Defesa Final.

Área de concentração: Química

Linha de Pesquisa: Produtos Naturais e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Co-orientadora: Dra. Andrea Caroline Ruthes

**CATALÃO - GO
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BSCAC/UFG**

O48e Oliveira, Gracy Kelly Faria.
Elucidação estrutural de heterogalactanas parcialmente metiladas obtidas de *Grifola frondosa* (“Maitake”) e *Pleurotus ostreatus* (“Shimeji”) [manuscrito] / Gracy Kelly Faria Oliveira. - 2013.

XIV, 75 f.: il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero; Co-orientadora: Dra. Andrea Caroline Ruthes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, Departamento de Química, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndice.

1. Cogumelos medicinais. 2. *Grifola frondosa*. 3. *Pleurotus ostreatus*. 4. Heterogalactana. 6. Estrutura química. I. Título.

CDU: 635.82/.83 : 641.1

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de
Dissertação de Mestrado da candidata **Gracy Kelly Faria Oliveira**, realizada em 18
de julho de 2013.*

Elaine Rosecher Carbonero

Profa. Dra. Elaine Rosecher Carbonero

Caroline Mellinger da Silva

Dra. Caroline Mellinger da Silva

Vanessa G. Pasqualotto Severino

Profa. Dra Vanessa Gisele P. Severino

Aos meus pais José Vanderley e Grazia que me educaram para ser uma pessoa com caráter e honestidade. E ensinaram-me que a educação é o melhor presente que um pai e uma mãe pode dar a seu filho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais essa existência e por me proporcionar oportunidades de evoluir.

À Jesus por me acolher nos momentos em que mais precisei, por fortalecer a minha fé e mostrar-me que posso acreditar nos sonhos, pois eles são reais desde que façamos a nossa parte.

Ao meu esposo pela compreensão, amor, companheirismo e por cuidar de mim. Por entender os momentos de ausência e acreditar no meu potencial.

Aos meus amados pais pela educação que me deram, pelo exemplo de vida, por me ensinarem que não podemos ter vergonha de quem somos e que devemos sempre buscar sermos pessoas melhores a cada dia. Como minha mãe sempre diz: “Não faça aos outros o que não gostaria que fizessem a você”. E como diz meu querido pai: “A gente nunca perde em ser honesto e correto no que fazemos”.

À minha orientadora Profa. Dra. Elaine R. Carbonero pelos ensinamentos transmitidos durante esses dois anos e por ter tornado possível esse trabalho. Por abdicar do tempo com seus filhos para estar ao meu lado, analisando resultados e corrigindo minha dissertação. Muito Obrigada.

Às minhas amadas tias (Glenda e Jorcelina) por incentivarem meus estudos, por me fortalecer nos momentos difíceis. À tia Jô pelos “puxões de orelha” e cobranças que me fizeram correr atrás de ser quem eu sou hoje e à tia Glenda por ser meu ombro amigo, pelos conselhos, por ajudar-me a amadurecer.

Aos meus irmãos Wanderley e Wendell por me apoiarem, torcerem pelo meu sucesso e pela amizade.

À Co-orientadora Dra. Andrea C. Ruthes por todos os experimentos realizados e pelas colaborações.

À profa. Dra. Vanessa G. P. Severino pelos ensinamentos, principalmente na área de espectrometria.

À profa. Dra. Richele P. Severino por proporcionar melhores condições, no laboratório, para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (Prof. Dr. Marcello Iacomini) pelas análises de RMN.

Aos amigos de pesquisa Estefânia e Renan, por todos os momentos que compartilhamos juntos, pelas conversas e amizade.

Aos amigos de laboratório, Leonardo, Afif, Jordana, Marquinho, Michelle Machado, Michele Nauara, Marina, João e Luciana pelos momentos de descontração e amizade.

À amiga Sandra, pela força, amizade e torcida pelo meu sucesso.

Ao Coordenador do programa de Pós-Graduação em Química, prof. Dr. Alberthmeiry Teixeira de Figueiredo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo, e posso evitar que ela vá à falência. / Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.
/ É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. / É saber falar de si mesmo. / É ter coragem para ouvir um "não". / É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. / Pedras no caminho? / Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

Fernando Pessoa

RESUMO

Heterogalactanas parcialmente metiladas foram isoladas dos basidiomas dos cogumelos medicinais *Pleurotus ostreatus* (manogalactana) e *Grifola frondosa* (manofucogalactana), através de sucessivas extrações aquosas a frio, seguidas de fracionamento por congelamento e degelo, precipitação com solução de Fehling e diálises em membranas com diferentes limites de exclusão (MWCO: 50, 100 e 500 kDa). As estruturas químicas foram determinadas por meio das análises de composição monossacarídica, metilação e RMN (mono e bidimensionais). A manogalactana ($M_w = 50,7 \times 10^3$ g.mol⁻¹) apresentou uma cadeia principal constituída por unidades de α -D-Galp e 3-O-Me- α -D-Galp (1→6) ligadas, sendo ambas parcialmente substituídas em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp. A outra foi uma manofucogalactana ($M_w = 15,9 \times 10^3$ g.mol⁻¹), a qual apresentou uma cadeia principal similar, sendo uma parte das unidades de α -D-galactopiranosil substituídas em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil e em menor proporção com terminais não redutores de α -L-Fucp. Recentemente, as heterogalactanas têm sido reconhecidas pelas suas ações biológicas relevantes, como a atividade antitumoral, imunomodulatória, antinociceptiva e/ou anti-inflamatória. Sendo assim, as heterogalactanas isoladas de *G. frondosa* e *P. ostreatus* podem apresentar-se como bons candidatos a serem avaliados quanto ao seu potencial biológico.

Palavras chave: Cogumelos medicinais; *Grifola frondosa*; *Pleurotus ostreatus*; heterogalactana; estrutura química.

ABSTRACT

Partially methylated heterogalactans were isolated from the fruiting bodies of the medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (mannogalactan) and *Grifola frondosa* (mannofucogalactan), via successive cold aqueous extraction, followed by fractionation through freeze-thawing, precipitation with Fehling solution of soluble material, and dialysis using membranes with different exclusion limits (MWCO: 50, 100, and 500 kDa). Their chemical structures were established based on monosaccharide composition, methylation analysis and NMR studies. The mannogalactan ($M_w = 50.7 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) had a main chain of (1→6)-linked α -D-galactopyranosyl and 3-O-methyl- α -D-galactopyranosyl units, both of which are partially substituted at O-2 by β -D-mannopyranosyl non-reducing ends. The other was a mannofucogalactan ($M_w = 15.9 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), which had a similar main-chain, being a part of the galactopyranosyl units substituted at O-2 mainly by 3-O- α -D-mannopyranosyl- α -L-fucopyranosyl groups and in a minor proportion with α -L-Fucp single-unit side chains. Recently, the heterogalactans are also recognized for their relevant biological activities, such as antitumor, immunomodulatory, anti-inflammatory and antinociceptive effects. Thus, the heterogalactans obtained from *G.frondosa* and *P. ostreatus* could present itself as a good candidate to be evaluated for its biological potential.

Keywords: Medicinal mushrooms; *Grifola frondosa*; *Pleurotus ostreatus*; heterogalactans; chemical structure.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Estrutura do corpo de frutificação	1
FIGURA 1.2 – Esquema da estrutura da β -glucana comumente encontrada em basidiomicetos.....	4
FIGURA 1.3 – Principais estruturas observadas em heterogalactanas de basidiomicetos.....	5
FIGURA 3.1 – Fotos dos basidiomas de <i>P. ostreatus</i> (A) e de <i>G. frondosa</i> (B)	13
FIGURA 3.2 – Esquema representativo da formação dos acetatos de alditóis para a análise de composição monossacarídica.....	16
FIGURA 3.3 – Esquema representativo da oxidação de polissacarídeos com periodato de sódio seguida por metilação	18
FIGURA 4.1 – Esquema do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos dos basidiomas de <i>P. ostreatus</i>	23
FIGURA 4.2 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis (B ₁ : fucose; B ₂ : manose; B ₃ : 3-O-Me-Gal; B ₄ : galactose; B ₅ : glucose) obtidos após derivatização química (acetilação) da fração CW-Po.....	24
FIGURA 4.3 – Perfis de eluição das frações obtidas a partir do extrato aquoso dos basidiomas de <i>P. ostreatus</i> em cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS:–) e índice de refração (IR:–) (HPSEC-MALLS).....	28
FIGURA 4.4 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados (A ₁ : 2,3,4,6-Me ₄ -Man; A ₂ :	

2,3,4-Me₃-Gal; A₃: 3,4-Me₂-Gal) obtidos após derivatização química (metilação) da fração QEPF-Po..... 29

FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ¹³C da fração QEPF₂-Po obtida dos basidiomas de *P. ostreatus*, em D₂O a 70 °C..... 32

FIGURA 4.6 – Espectro de HSQC-TOCSY da fração QEPF-Po obtida dos basidiomas *P. ostreatus* em D₂O a 50 °C..... 32

FIGURA 4.7 – Espectro de HSQC da fração QEPF-Po obtida dos basidiomas de *P. ostreatus* (A), em D₂O a 50 °C, com inserto de C-6 do HSQC-DEPT (B) 33

FIGURA 4.8 – Principais estruturas observadas na manogalactana isolada dos basidiomas de *P. ostreatus*..... 37

FIGURA 4.9 – Esquema do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos dos basidiomas de *G. frondosa* 38

FIGURA 4.10 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis (B₁: fucose; B₂: manose; B₃: 3-O-Me-Gal; B₄: galactose; B₅: glucose) obtidos após derivatização química (acetilação) da fração CW-Gf..... 39

FIGURA 4.11 – Perfis de eluição das frações obtidas a partir do extrato aquoso dos basidiomas de *G. frondosa* em cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS:–) e índice de refração (IR:–) (HPSEC-MALLS)..... 41

FIGURA 4.12 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃-Fuc; A₂: 2,3,4,6-Me₄-Man; A₃: 2,4-Me₂-Fuc; A₄: 2,3,4-Me₃-Gal; A₅: 3,4-Me₂-Gal) obtidos após derivatização química (metilação) da fração QEPF-Gf..... 42

- FIGURA 4.13** – Espectro de RMN de ^{13}C da manofucogalactana (fração QEPF-Gf) de *G. frondosa*, analisada em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$ 45
- FIGURA 4.14** – Espectro de HSQC da manofucogalactana de *G. frondosa* (A), analisada em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$, com insertos ampliados da região de C-6 de Man ρ , Gal ρ (B1) e de Fuc ρ (B2) obtidos do HSQC-DEPT 45
- FIGURA 4.15**– Espectro de COSY da fração QEPF-Gf obtida dos basidiomas de *G. frondosa*, analisada em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$ 46
- FIGURA 4.16** – Espectro de HSQC-TOCSY da fração QEPF-Gf de *G. frondosa*, analisada em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$ 46
- FIGURA 4.17** – Principais estruturas observadas na manofucogalactana isolada dos basidiomas de *G. frondosa* 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Heterogalactanas isoladas dos corpos de frutificação de basidiomicetos.....	6
TABELA 1.2 – Polissacarídeos isolados de <i>G. frondosa</i> (Maitake)	10
TABELA 1.3 – Polissacarídeos isolados de <i>P. ostreatus</i> (Shimeji)	11
TABELA 4.1 – Composições monossacarídicas das frações obtidas a partir do extrato aquoso de <i>P. ostreatus</i>	27
TABELA 4.2 – Análise por metilação da fração QEPF- <i>Po</i> isolada dos basidioma de <i>P. ostreatus</i>	30
TABELA 4.3 – Principais correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ observadas no espectro de HSQC-TOCSY da heterogalactana (fração QEPF- <i>Po</i>) obtida de <i>P. ostreatus</i>	35
TABELA 4.4 – Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da heterogalactana isolada de <i>P. ostreatus</i> ^a	36
TABELA 4.5 – Composições monossacarídicas das frações obtidas a partir do extrato aquoso de <i>G. frondosa</i>	40
TABELA 4.6 – Análise por metilação da fração QEPF- <i>Gf</i> isolada dos basidiomas de <i>G. frondosa</i>	44
TABELA 4.7 – Principais correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ observadas no espectro de HSQC-TOCSY da fração QEPF- <i>Gf</i> obtida de <i>G. frondosa</i>	48
TABELA 4.8 – Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da heterogalactana isolada de <i>G. frondosa</i> ^a	48

LISTAS DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SIGLAS

α -D-Galp	- Alfa-D-Galactopiranoze
α -D-Manp	- Alfa-D-Manopiranoze
β -D-Manp	- Beta-D-Manopiranoze
α -L-Fucp	- Alfa-L-Fucopiranoze
3-O-Me- α -D-Galp	- 3-O-metil-alfa-D-Galactopiranoze
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
COSY	- <i>Correlation spectroscopy</i>
Da	- Dalton
DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
Fuc	- Fucose
g	- Gramas
Gal	- Galactose
Gf	- <i>Grifola frondosa</i>
Glc	- Glucose
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
IR	- Índice de refração
J	- Constante de acoplamento
LS	- Espalhamento de luz
M	- Molar
Man	- Manose
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
m/v	- Razão massa/volume
m/z	- Razão massa/carga
M_w	- Massa molar média
MWCO	- Peso molecular de corte
p	- Piranoze
Po	- <i>Pleurotus ostreatus</i>
ppm	- Partes por milhão
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RMN	- Ressonância magnética nuclear
r.p.m.	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoacético
TMS	- Tetrametilsilano
TOCSY	- <i>Total correlation spectroscopy</i>
T_R	- Tempo de retenção
v/v	- Razão volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BASIDIOMICETOS	1
1.2 IMPORTÂNCIA DOS BASIDIOMICETOS	2
1.3 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS.....	3
1.4 <i>Grifola frondosa</i>	9
1.5 <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	13
3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	13
3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	14
3.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo	14
3.3.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling	14
3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálises em Membranas	15
3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	15
3.4.1 Composição monossacarídica	15
3.4.1.1 Hidrólise ácida Total	17
3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise	17
3.4.2 Oxidação com periodato de sódio	17
3.4.3 Metilação dos Polissacarídeos	19
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	19
3.5.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM) 20	
3.5.2. Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS	20
3.5.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	21

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA HETEROGALACTANA DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	22
4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA HETEROGALACTANA DE <i>Grifola frondosa</i>	38
5. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	58

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - BASIDIOMICETOS

O grupo microbiano apresenta um cenário de biodiversidade bastante abrangente e existem inúmeros estudos científicos que comprovam a eficiência dos representantes desse grupo em setores tais como: a medicina, o controle biológico, agricultura, setores alimentícios, dentre outros.

Dentro deste variado grupo, encontram-se os fungos, os quais podem ser classificados, segundo Alexopoulos et al. (1996) nos seguintes reinos: Reino Protista, Reino Stramenopila e Reino Fungi. Este último inclui quatro filas: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, sendo que o filo dos *Basidiomycota* agrupa o que há de mais evoluído entre os organismos do Reino Fungi (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

Os fungos pertencentes ao filo *Basidiomycota* são comumente denominados de basidiomicetos, constituindo um grupo bastante diverso, sendo os cogumelos, bolores e orelhas-de-pau, as formas mais conhecidas (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

Segundo Chang e Miles (1992), os cogumelos são macrofungos com distinto corpo de frutificação que é grande o suficiente para ser visto a olho nu e ser pego com as mãos. Maki (2006) explica que a existência do corpo de frutificação está intimamente associada a um sinal ambiental ou mecânico.

Com relação à estrutura física estes apresentam em sua maioria uma frutificação macroscópica, constituída por hifas modificadas que formam pseudo-tecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva, conforme Figura 1.1 (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

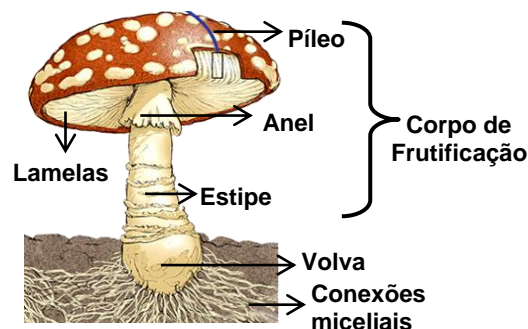


FIGURA 1.1 – Estrutura do corpo de frutificação

Fonte: Adaptado de <http://www.carlson-art.com/lifescienceV2/mushroom-cycle.html>

De acordo com Wasser (2011) esta classe de fungos abrange cerca de 150.000 espécies de cogumelos no mundo, no entanto, somente 10% (cerca de 15.000) são conhecidas, sendo que esse valor pode ser superior, considerando que muitas espécies ainda não foram descritas. Além disso, espécies semelhantes morfológicamente estão reunidas em um mesmo grupo, quando deveriam estar classificadas como espécies biológicas diferentes. Estudos de compatibilidade e sequências moleculares entre esses fungos mostram que uma única “espécie” pode agrupar 20 espécies distintas.

Dentre as espécies mais conhecidas mundialmente encontram-se: *Agaricus bisporus* (Champignon), *Agaricus brasiliensis* (Cogumelo do sol), *Boletus edulis* (Porcini), *Ganoderma lucidum* (Lingzhi ou Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Grifola frondosa* (Maitake), *Pleurotus ostreatus* (Shimeji), entre outras.

Por outro lado, das mais de 6.000 espécies de cogumelos identificadas apenas cerca de 30 são cultivadas, sendo *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *L. edodes* e *P. ostreatus* os cogumelos mais cultivados comercialmente no Brasil (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

1.2 - IMPORTÂNCIA DOS BASIDIOMICETOS

Os cogumelos têm sido utilizados tanto por sua importância gastronômica quanto pelo seu valor medicinal, mas o seu emprego como alimento funcional é mais notado nas civilizações orientais, que há milênios mantêm uma forte tradição do seu uso (LINDEQUIST; NIEDERMEYER, JULICH, 2005; ZHANG et al., 2007; WASSER, 2011).

Estes fungos apresentam altos valores nutricionais, sendo uma ótima fonte de carboidratos, fibras dietéticas, moderadas quantidades de proteínas com a presença de muitos aminoácidos essenciais, além de vitaminas, minerais e baixo teor de lipídeos (CROAN, 2004).

Além do alto valor nutricional, os cogumelos são importantes fontes de substâncias bioativas, como os polissacarídeos, os quais têm demonstrado atuar como modificadores de resposta biológica. Dentro deste contexto, os cogumelos representam uma fonte alternativa, pouco explorada, para isolamento de polissacarídeos, pois, além de apresentarem altos teores,

estes organismos apresentam polímeros com uma ampla diversidade estrutural (WASSER, 2011). Estas moléculas bioativas podem ser obtidas do corpo de frutificação, do micélio em cultivo submerso e do meio de cultura líquido cultivado do basidiomiceto (WASSER, 2002, 2011; ZHANG et al., 2007).

No total são reconhecidas cerca de 126 propriedades medicinais atribuídas aos polissacarídeos, incluindo efeito antitumoral, imunomodulador, antioxidante, cardiovascular, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antidiabético, anti-inflamatório, entre outros (MIZUNO, 1996; BORCHERS et al., 1999; WASSER; WEIS, 1999; TZIANANBOS, 2000; GAO et al., 2004; ZHANG et al., 2007; WASSER, 2010, 2011).

Segundo Wasser (2002) os efeitos farmacológicos apresentados por estes carboidratos estão relacionados com sua estrutura. Desta maneira, a caracterização química fina é requisito importante para a avaliação da estrutura dos polissacarídeos como marcadores de qualidade de produtos e sua influência nestas respostas biológicas.

1.3 - POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Os carboidratos são, provavelmente, as mais abundantes moléculas orgânicas, estando presente nas células de todos os organismos vivos. Eles podem ser divididos em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, sendo estas moléculas polares as quais apresentam alta diversidade no tamanho molecular, no tipo de ligação glicosídica e função celular (SANZ; MARTÍNEZ-CASTRO, 2007).

De acordo com Sanz e Martínez-Castro (2007), os carboidratos são sempre constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, mas alguns contêm outros elementos como o nitrogênio, enxofre, fósforo, dentre outros. Eles são caracterizados por conter várias hidroxilas, mas os grupos funcionais adicionais tais como, carbonila, carboxila, amino, entre outros, podem estar presentes. Os carboidratos também podem se associar com peptídeos, proteínas ou lipídeos formando os glicoconjugados, como os peptideoglicano, glicoproteínas e lipopolissacarídeos ou glicolipídeos, respectivamente.

Nos basidiomicetos, os polissacarídeos podem ser encontrados na forma de homopolímeros, heteropolímeros (GOW; GADD, 1995), ou seja,

estes podem ser constituídos por um ou mais tipos de monossacarídeos, respectivamente.

Estima-se que, aproximadamente, 651 espécies de 182 gêneros já foram estudadas quanto aos seus carboidratos (WASSER, 2002), sendo as glucanas e as heterogalactanas as estruturas comumente encontradas (MIZUNO, 1999; WASSER; WEIS, 1999; ZHANG et al., 2007).

As glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas, solúveis ou insolúveis em água, e apresentar diferentes configurações, ligações glicosídicas e massa molar (ZHANG et al., 2007).

Já foram descritas α , β e α/β glucanas, sendo a β -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e substituições em O-6 por uma unidade de β -D-Glcp, a estrutura comumente descrita para diversos basidiomicetos (Figura 1.2, p. 4). Algumas destas glucanas purificadas vêm sendo comercializadas, pois apresentam atividade imuno-estimulatória (grifolana), antitumoral (lentinana), antiviral e antimicrobiana (esquizofilana), sendo essas moléculas isoladas, primeiramente de *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes* e *Schizophyllum commune*, respectivamente.

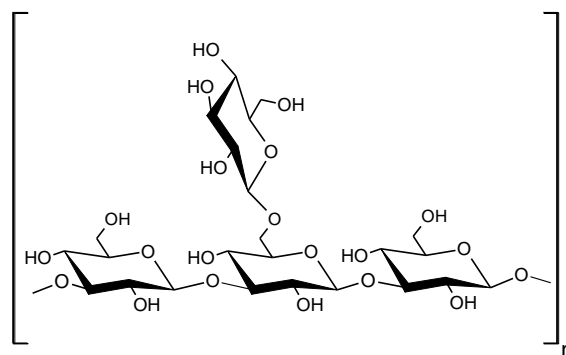


FIGURA 1.2 – Esquema da estrutura da β -glucana comumente encontrada em basidiomicetos

Dentre os heteropolissacarídeos mais comuns em basidiomicetos estão as heterogalactanas, sendo a maioria formada por uma cadeia principal de α -D-Galp-(1 \rightarrow 6) (A) as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2 por diferentes substituintes, como os terminais não redutores de α -L-fucose (B), α - ou β -D-manose (C e D, respectivamente), β -D-galactose (E) e o dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil (F), principalmente. Além

da substituição em O-2, alguns destes polímeros podem conter grupos metil ligados ao C-3 das unidades de galactose da cadeia principal (G e H). De acordo com as cadeias laterais e a proporção destes substituintes, estes são denominados de fucogalactanas, glucogalactanas, manogalactanas, manofucogalactanas, fucomanogalactanas, entre outros (Tabela 1.1, p. 6; Figura 1.3).

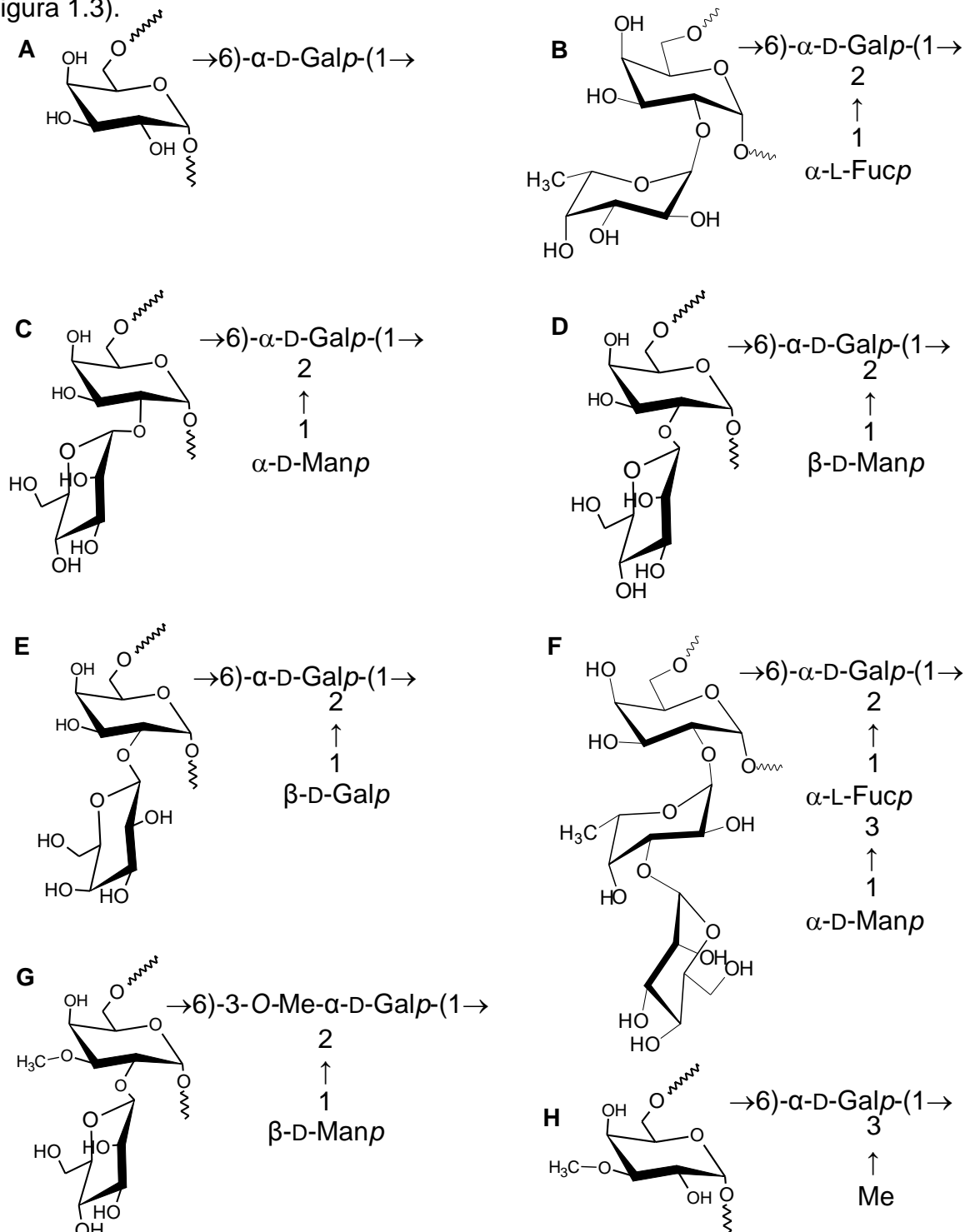


FIGURA 1.3 – Principais estruturas observadas em heterogalactanas de basidiomicetos

TABELA 1.1 – Heterogalactanas isoladas dos corpos de frutificação de basidiomicetos

Tipo de polissacarídeo/material biológico	Cadeia principal	Cadeia lateral	Características estruturais	Atividade biológica	Referências
Fucogalactana (fração EFP-Ab) <i>Agaricus bisporus</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por únicas unidades de α -L- Fucp e β -D-Galp	$M_w = 37,1 \times 10^4$ g.mol ⁻¹ Composição monossacarídica: Fucose (11,2%), galactose (74,2%) e 3-O-Me-galactose (14,6%)	Antissepse; Antinociceptiva; Anti-inflamatória	RUTHES et al., 2013.
Fucogalactana (fração EPF-Ab) <i>Agaricus brasiliensis</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por únicas unidades de α -L- Fucp	$M_w = 19,4 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fucose (13,9%) e galactose (86,1%)		KOMURA et al., 2010.
Fucogalactana (fração EFP-Ah) <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>hortensis</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp- (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp e em menor proporção β -D-Galp.	$M_w = 31,1 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fucose (16,8%), 3-O-Me-galactose (15,4%) e galactose (67,8%)		KOMURA et al., 2010.
Fucogalactana (fração F-IIaP) <i>Ganoderma applanatum</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp. Contém grupos acetil	Composição monossacarídica: Galactose:fucose numa proporção molar de 3:1		USUI; IWASARI, MIZUNO; 1981.
Fucogalactana (fração RFP-Lr) <i>Lactarius rufus</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp.	$M_w = 1,4 \times 10^4$ g.mol ⁻¹ Composição monossacarídica: Fucose (29%) e galactose (71%).	Antissepse	RUTHES et al., 2012.
Fucogalactana (fração RFP-Ab) <i>Agaricus bisporus</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp- (1→6)	Substituições em O-2 unidades únicas de α -L- Fucp e β -D-Galp.	$M_w = 43,8 \times 10^4$ g.mol ⁻¹ Composição monossacarídica: Fucose (6%), galactose (84%) e 3- O-Me-galactose (10%)	Antissepse	RUTHES et al., 2012.
Fucogalactana <i>Polyporus ovinus</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp.	Composição monossacarídica: Fucose:galactose numa proporção molar de 1:3,6		AXELSSON; BJÖRNDAL, 1969.
Manofucogalactana/ <i>Flammulina velutipes</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp e α -D- Manp e em menor proporção por α -L-Fucp.	Composição monossacarídica: Fucose (20%), manose (16%) e galactose (64%)		SMIDERLE et al., 2008a.

TABELA 1.1 – Heterogalactanas isoladas dos corpos de frutificação de basidiomicetos

(continuação)

Fucomanogalactana (fração EFP-Ls)/ <i>Laetiporus sulphureus</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp e α -D- Manp e em menor proporção por α -L-Fucp.	$M_w = 2,8 \times 10^4$ kDa Composição monossacarídica: Fucose (21%), manose (28%) e galactose (51%)		ALQUINI et al., 2004.
Manofucogalactana (<i>Fomitellana A</i>) <i>Fomitella fraxinea</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp	$M_w = 1,5 \times 10^4$ kDa Composição monossacarídica: galactose, manose e fucose em uma proporção molar de 3:1:1	Efeito mitogênico; Imunomodulatória	CHO et al., 1998, 2011.
Manofucogalactana <i>Armillaria mellea</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp e únicas unidades de L-Fucp	Composição monossacarídica: Galactose:fucose:manose numa proporção molar de 6,5:2:1.		FRASER; LINDBERG, 1967.
Manofucogalactana <i>Polyporus fomentarius</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp. e unidades únicas de α -L-Fucp e D- Galp.	Composição monossacarídica: Galactose:manose:fucose numa proporção molar de 5,8:1,0:1,2.		BJÖRNDAL; LINDBERG, 1968.
Manofucogalactana <i>Polyporus ignarius</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp. e unidades únicas de α -L-Fucp e D- Galp.	Composição monossacarídica: Galactose:manose:fucose numa proporção molar de 6,0:1,0:1,4.		BJÖRNDAL; LINDBERG, 1968.
Manofucogalactana (fração F-IlaG) <i>Ganoderma applanatum</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp. e pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp. Contém grupos acetil.	Composição monossacarídica: Galactose:fucose manose numa proporção molar de 2,4:1,3:1,0		USUI; IWASARI; MIZUNO, 1981.
Manofucogalactana <i>Flammulina vefutipes</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D- Manp- α -L-Fucp e por α -L- Fucp.	Composição monossacarídica: Galactose:manose:fucose numa proporção molar de 12:3:4		MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1977.
Manofucogalactana <i>Polyporus giganteus</i>	β -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- β -D- Manp- β -L-Fucp.	Composição monossacarídica: Galactose:manose:fucose numa proporção molar de 2,6:1:1		BHAVANANDAN et al., 1964.

TABELA 1.1 – Heterogalactanas isoladas dos corpos de frutificação de basidiomicetos

(conclusão)

Fucomanogalactana (fração FMG-Le) <i>Lentinus edodes</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp e β -D-Manp	$M_w = 16,2 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fucose (11%), manose (21%) e galactose (68%)	Anti-inflamatória; Antinociceptiva	CARBONERO et al., 2008.
Fucoglucogalactana <i>Hericium erinaceus</i>	Galp (1→6)	Substituição em O-2 por Gal-(1→4)-Fuc-(1→, [Glc-(1→3)] ₂ -Glc-(1→ e por Gal-(1→6)-(Glc) ₂ -Glc-(1→	Composição monossacarídica: Glucose:galactose:fucose numa proporção molar de ~ 1:2,1: 0,4		WANG; LUO; LIANG, 2004.
Manogalactana (PGPB-1) <i>Pleurotus geesteranus</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp-(1→6)	Substituições em O-2 das unidades de α -Galp por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 1,3 \times 10^4$ Da Composição monossacarídica: Galactose:3-O-Me-galactose: manose numa proporção molar de 1:1:1, aproximadamente		ZHANG et al., 2013.
Manogalactana <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp-(1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 4,5 \times 10^4$ Da Composição monossacarídica: Manose:3-O-Me-galactose: galactose numa proporção molar de 36,3:9,8:53,9		ROSADO et al., 2003.
Manogalactana <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp-(1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 4,6 \times 10^4$ Da Composição monossacarídica: Manose:3-O-Me-galactose: galactose numa proporção molar de 39,0:5,8:55,2		ROSADO et al., 2003.
Manogalactana <i>Pleurotus pulmonarius</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp-(1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 2,39 \times 10^4$ g.mol ⁻¹ Composição monossacarídica: Manose (32%), 3-O-Me-galactose (13%) e galactose (55%)	Antinociceptiva	SMIDERLE et al., 2008b.
Manogalactana <i>Pleurotus ostreatus</i>	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp-(1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 188$ kDa Composição monossacarídica: Galactose: manose (32%), 3-O-Me-galactose numa proporção molar de 3:2:0,9		JAKOVLJEVIC et al., 1998
Glucogalactana <i>Pleurotus ostreatus</i>	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Glcp	$M_w = 2,4 \times 10^4$ Da Composição monossacarídica: Galactose e glucose numa proporção molar de 2:1	Imunomoduladora	SUN; LIU, 2009.

1.4 - *Grifola frondosa*

Grifola frondosa, conhecido popularmente como “Maitake”, é um cogumelo comestível originário do Japão, o qual pertence à ordem Aphyllophorales e a família Polyporaceae (MIZUNO et al., 1986).

Este cogumelo tem sido utilizado, principalmente no Japão, China e Coréia, para fins nutricionais e medicinais, sendo uma das fontes naturais de compostos biologicamente ativos (BOH; BEROVIC, 2007; GU et al., 2007), tais como os polissacarídeos (SVAGELJ et al., 2008).

A partir deste cogumelo foram isolados vários polissacarídeos tanto do corpo de frutificação quanto do cultivo submerso (exopolissacarídeos e micélio). Dentre as estruturas determinadas, a β -glucana contendo ligações (1→3) e (1→6), denominada *grifolana*, é a mais importante devido a sua ação imunomoduladora. Esta glucana tem sido comercializada, na forma de cápsulas, em países como China e Japão, porém, no Brasil esta prática não é permitida pela ANVISA, devido principalmente à escassez de estudos científicos que garantam a eficácia destes produtos.

Diversas ações biológicas têm sido reportadas para as frações polissacarídicas brutas ou carboidratos isolados deste fungo como atividade antitumoral (BORCHERS et al., 1999), antioxidante (CHEN et al., 2012), anti-hiperlipidêmica, imunomoduladora (MAYELL, 2001).

Devido aos efeitos terapêuticos destes polímeros, principalmente aqueles com ação antitumoral e imunomoduladora, vários polissacarídeos isolados de *G. frondosa* foram patenteados no Japão (BOH; BEROVIC, 2007).

Dentre os polissacarídeos caracterizados, as glucanas são os principais polímeros encontrados, sendo alguns destes representados na Tabela 1. 2 (p. 10). Cabe ressaltar que, a maioria dos trabalhos não desenvolve a determinação da estrutura química dos mesmos, ou seja, avalia apenas a ação biológica das frações polissacarídicas brutas. Portanto, é de fundamental importância avaliar quimicamente estas moléculas, buscando correlacionar os efeitos biológicos com a estrutura química.

TABELA 1.2 – Polissacarídeos isolados de *Grifola frondosa* (Maitake)

Estrutura		Atividade Biológica	Referências
Cadeia Principal	Ramificações		
β -D-Glc-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp, a cada três resíduos	Atividade antitumoral	TADA et al., 2009.
α -D-Glcp-(1→4)	Substituição em O-6 por unidades de α -D-Glcp, a cada 3 unidades da cadeia principal	Algumas estruturas apresentam atividade antitumoral	MIZUNO et al., 1986
β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp		
α -D-glucana ácida	Estrutura não especificada		
β -D-glucana ácida	Estrutura não especificada		
β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp a cada 3 unidades da cadeia principal		KATO et al., 1983.

1.5 - *Pleurotus ostreatus*

Os cogumelos do gênero *Pleurotus*, popularmente chamados de “Cogumelos ostras”, pertencem à ordem Agaricales e à família Pleurotaceae. As espécies desse gênero possuem ampla distribuição mundial (PUTZKE; WARTCHOW, 2008), as quais se apresentam com uma variedade de cores como cinza-escuro (*P. ostreatus*), branco (*P. ostreatus* variedade *florida*), amarelo (*P. citrinopileatus*), salmão (*P. ostreatoroseus*), dentre outras.

Estima-se que existam mais de 1.000 espécies de *Pleurotus* descritas no mundo, no entanto, apenas 50 destas são reconhecidas como válidas para este gênero devido às dificuldades quanto à identificação taxonômica (GUZMÁN, 2000).

Dentre as espécies mais conhecidas estão: *P. ostreatoroseus*; *P. ostreatus* var. *florida*; *P. eryngii*; *P. citrinopileatus*; *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*.

Estes têm sido utilizados para fins nutricionais e terapêuticos, sendo algumas espécies amplamente cultivadas e comercializadas. O alto teor proteico, vitamínico e de carboidratos, e o baixo teor de gordura tornam os cogumelos do gênero *Pleurotus* apropriados para incorporação na dieta (SILVA; COSTA; CLEMENTE, 2002; MAITY et al., 2006)

Dentre as diversas espécies deste gênero, *Pleurotus ostreatus* é uma das mais cultivadas e comercializadas, devido às suas propriedades nutricionais e aos efeitos medicinais benéficos, tais como antitumoral, imunomodulatório, antiviral, anti-inflamatório, dentre outros (WANG; GAO; NG, 2000; SARANGI et al., 2006). Este fungo é rico em vitaminas, aminoácidos e minerais, e, além disso, participam significativamente em processos de desintoxicação humana (VAMANU, 2012).

Vários trabalhos sugerem que os polissacarídeos estão relacionados aos efeitos terapêuticos atribuídos a este basidiomiceto, sendo alguns destes listados na Tabela 1.3.

TABELA 1.3 – Polissacarídeos isolados de *Pleurotus ostreatus* (Shimeji)

Estrutura		Atividade Biológica	Referências
Cadeia Principal	Ramificações		
β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por Glc-(1→4)-Gal-(1→ e por Gal-(1→4)-Man-(1→3)-Glc-(1→	Antitumoral	TONG et al., 2009
β -D-Glcp-(1→6) e β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-3 por terminais não redutores de α -D-Galp e α -D-Glcp		MAITY et al., 2011.
β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por β -D-Glcp, a cada três unidades da cadeia principal		YOSHIOKA et al., 1985.
β -D-Glcp-(1→3)	Substituição por unidades de manose, galactose e açúcares ácidos (estrutura não definida)		YOSHIOKA et al., 1975.
β -D-Glcp-(1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -Glcp. Contém pequenas proporções de ligações (1→6)- e (1→4)- no interior das unidades.		KARÁCSONYI; KUNIAK, 1994.
α -D-Galp-(1→6)	Substituição em O-2 por terminais não redutores de β -D-Glcp	Imunomoduladora	SUN; LIU, 2009
α -D-Galp-(1→6) e 3-O-Me-Galp	Substituição em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp		JAKOVLJEVIC et al., 1998

Entretanto, pouco se sabe a respeito do polímero envolvido nestas respostas, pois são poucos os trabalhos que purificam e avaliam quimicamente estas biomoléculas.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Caracterizar a estrutura fina das heterogalactanas obtidas dos basidiomas (= corpo de frutificação ou basidiocarpo) dos cogumelos *P. ostreatus* e *G. frondosa*.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extrair os polissacarídeos dos basidiomas de *P. ostreatus* e *G. frondosa* através de extrações aquosas a frio;
- b) Purificar as frações polissacarídicas;
- c) Caracterizar estruturalmente os polímeros obtidos, utilizando métodos químicos e técnicas analíticas de RMN, CG-EM e HPSEC-MALLS.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL BIOLÓGICO

Os basidiomas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Figura 3.1-A) e *Grifola frondosa* (Dicks) Gray (Figura 3.1-B) foram fornecidos, respectivamente, pelas empresas Makoto Yamashita (Miriam Harumi Yamashita), localizada em São José dos Pinhais/Paraná, e YURI Cogumelos (Iwao Akamatsu), sediada em Sorocaba/São Paulo.

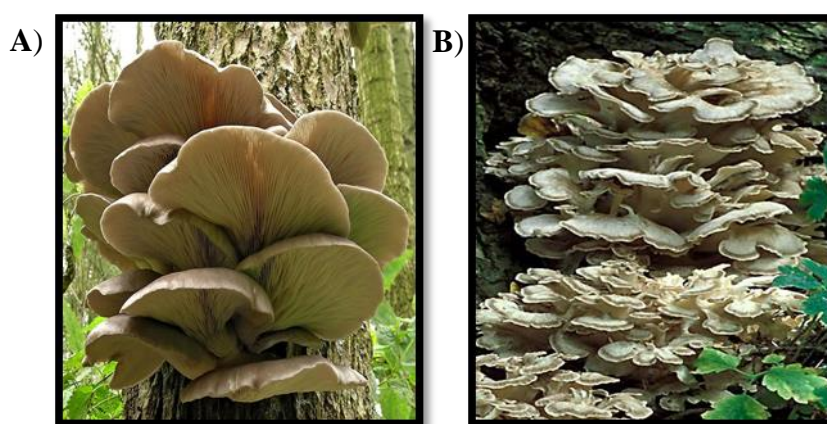


FIGURA 3.1 – Fotos dos basidiomas de *P. ostreatus* (A) e de *G. frondosa* (B)

Fonte: www.mycobank.org

3.2 - OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os basidiomas de *P. ostreatus* (*Po*; massa seca = 500,0 g) e de *G. frondosa* (*Gf*; massa seca = 209,6 g) foram submetidos a sucessivas extrações aquosas a 4 °C, sob agitação mecânica por, aproximadamente, 6 horas (6x para ambas as espécies). Após cada extração, os materiais foram filtrados para a separação dos extratos aquosos. Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida até pequeno volume e precipitados com etanol (3:1, v/v). Os precipitados etanólicos, separados por centrifugação (3000 rpm, 30 min, 25 °C), foram dialisados (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente por 48 horas e liofilizados, resultando nas frações CW-*Po* e CW-*Gf*, respectivamente (Figura 4.1, p. 23; Figura 4.9, p. 38).

3.3 - PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As frações polissacarídicas *CW-Po* e *CW-Gf* foram purificadas por meio das seguintes técnicas: congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984), precipitação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965) e diálises em membranas com diferentes limites de exclusão (CARBONERO, 2005). A purificação foi acompanhada pelo perfil de eluição obtido por meio de análises de HPSEC-MALLS.

3.3.1 - Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

Primeiramente, as frações *CW-Po* e *CW-Gf* foram, separadamente, submetidas ao processo de purificação por congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984). Cada fração foi solubilizada em água destilada e submetida ao processo de congelamento, seguido por descongelamento à temperatura ambiente, resultando em frações solúveis (*SCW-Po* e *SCW-Gf*, respectivamente) e insolúveis em água fria (*ICW-Po* e *ICW-Gf*, respectivamente), as quais foram separadas por centrifugação (3000 rpm, 30 min, 25 °C). Esse processo foi repetido diversas vezes até que os sobrenadantes aquosos não apresentassem mais material insolúvel.

3.3.2 - Purificação por Precipitação com Solução de Fehling

As frações solúveis em água fria (*SCW-Po* e *SCW-Gf*), originadas a partir do processo de congelamento e degelo, foram submetidas ao tratamento com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste da combinação de duas soluções (A e B). A solução A é composta por hidróxido de potássio (KOH) e tartarato de sódio e potássio, enquanto a solução B consiste de sulfato de cobre (CuSO₄).

Às frações *SCW-Po* e *SCW-Gf*, que foram dissolvidas em volume de água suficiente para solubilizá-las, adicionou-se igual volume da solução de Fehling: A+B (1:1), sendo estas mantidas sob agitação por 12 horas. Decorrido o tempo, os complexos cúpricos insolúveis (*PFCW-Po* e *PFCW-Gf*) foram separados dos solúveis (*SFCW-Po* e *SFCW-Gf*) por centrifugação (3000 rpm,

30 min, 25 °C), neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa; ~ 48 horas). Após diálise, estas foram tratadas com resina catiônica, com a finalidade de remover o cobre. Devido à formação de precipitado após adição da resina, algumas frações foram centrifugadas antes de serem novamente dialisadas (MWCO: 12-14 kDa; ~ 24 horas). Após diálise, os materiais solúveis após adição da resina (sPF-*Po* e sPF-*Gf*) foram concentrados sob pressão reduzida e liofilizados. Este procedimento foi repetido para as frações sPF-*Po* (1 x) e sPF-*Gf* (2 x), resultando nos insolúveis complexos cúpricos PF₂-*Po* e PF₃-*Gf*, respectivamente (Figura 4.1, p. 23; Figura 4.9, p. 38).

3.3.3- Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas

As frações PF₂-*Po* e PF₃-*Gf* foram submetidas a diálises em membranas (Spectra/Por®) com diferentes limites de exclusão (MWCO: 50, 100 e 500 kDa para a fração PF₂-*Po*; MWCO: 500 kDa para a fração PF₃-*Gf*) (CARBONERO, 2005). A diálise, contra água destilada, foi realizada por meio de um processo fechado, sendo o material a ser dialisado mantido sob refrigeração. O processo foi repetido diversas vezes, até que a fração eluída (= água de diálise) não apresentasse coloração (Figura 4.1, p. 23; Figura 4.9, p. 38).

3.4 - ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 - Composição Monossacarídica

A composição monossacarídica dos polissacarídeos foi realizada em CG-EM após hidrólise, redução e acetilação (Figura 3.2, p. 16). Os monossacarídeos foram identificados pelos seus respectivos tempos de retenção e perfis de fragmentação.

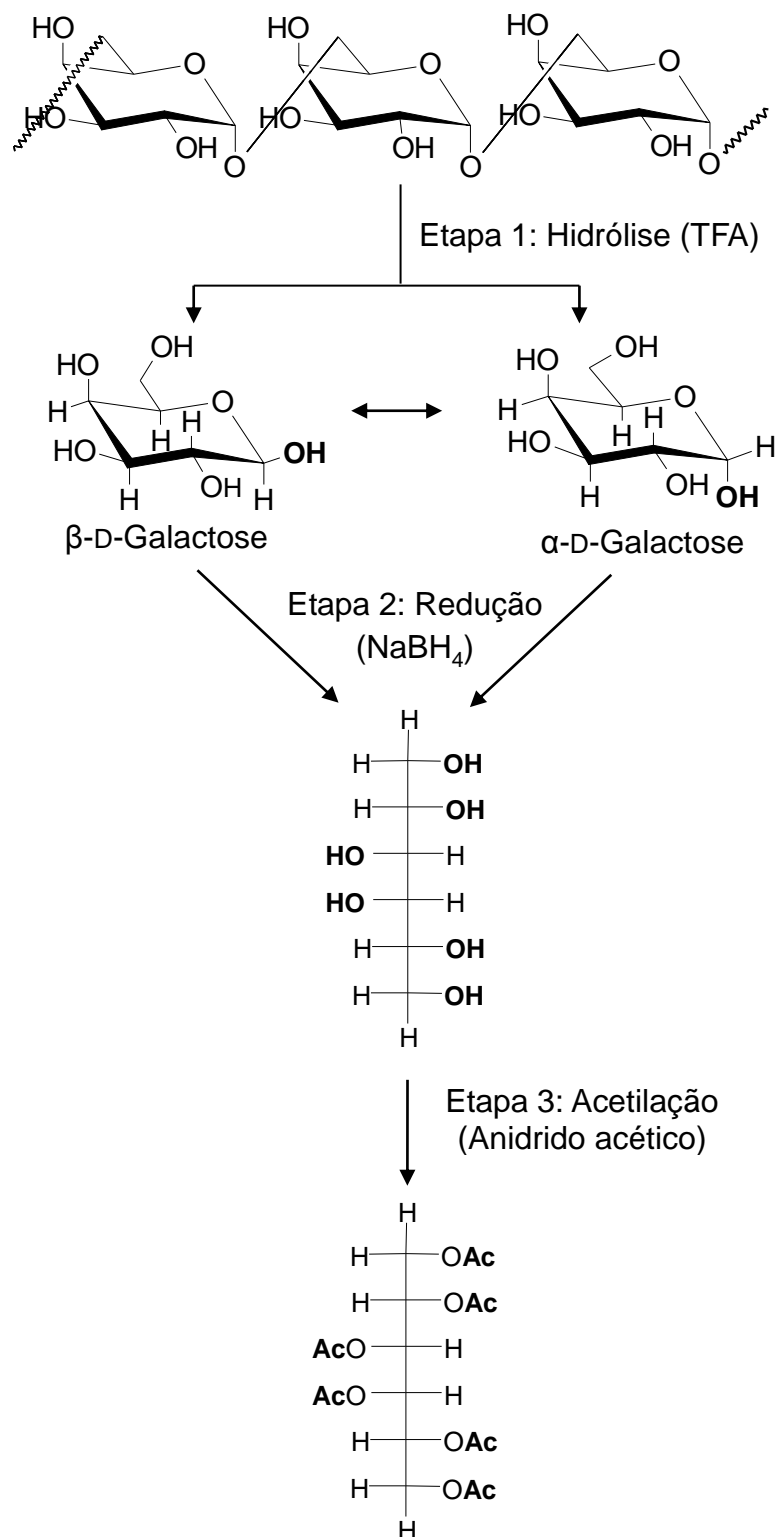


FIGURA 3.2 – Esquema representativo da formação dos acetatos de alditóis para a análise de composição monossacarídica

3.4.1.1 - Hidrólise ácida total

Uma alíquota de cada fração (~1,0 mg) foi tratada com 1,0 mL de TFA (ácido trifluoracético) 2 M, durante 8 horas, a 100 °C, ou TFA 1 M a 100 °C, *overnight* (12-15h) (Figura 3.2 - Etapa 1, p. 16). Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras por evaporação até *secura* à temperatura ambiente, sendo em seguida, submetidas à redução e acetilação.

3.4.1.2 - Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com NaBH₄ (borohidreto de sódio) ou NaBD₄ (borohidreto de sódio deuterado) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a) em temperatura ambiente, pH 9-10, por aproximadamente 12 horas (Figura 3.2 - Etapa 2, p. 16). Após este período, os materiais foram neutralizados (pH 7,0) com resina catiônica (forma H⁺), filtradas em algodão e levadas à *secura* sob pressão reduzida. 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 (Ac₂O)/piridina (1:1, v/v) em temperatura ambiente por 12 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963b) (Figura 3.2 - Etapa 3, p. 16). Os acetatos de alditóis formados foram extraídos com clorofórmio e a piridina residual foi removida por complexação com sulfato de cobre 5 % (m/v). Após completa remoção da piridina, o clorofórmio foi evaporado e os acetatos de alditóis analisados por CG-EM.

3.4.2- Oxidação dos Polissacarídeos com Periodato de Sódio

A fração QEPF-Po (80 mg) foi dissolvida em água destilada (30 mL) e acrescida de periodato de sódio (NaIO₄) até atingir uma concentração final de 0,05 M, sendo a mesma mantida por 72 horas sob ausência de luz. Decorrido o tempo, o material oxidado, após neutralização com ácido acético, foi dialisado contra água corrente (~ 24 h). Em seguida, este foi reduzido com NaBH₄ (pH 9,0-10,0) por 16 h, e, posteriormente, neutralizado com ácido acético e dialisado (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente, originando a

fração Ox-QEPF-Po (HAY; LEWIS; SMITH, 1965). Uma alíquota (2 mg) do material oxidado foi retirada para análise de composição monossacarídica (conforme item 3.4.1), e o restante foi analisado por metilação (item 3.4.3) (Figura 3.3).

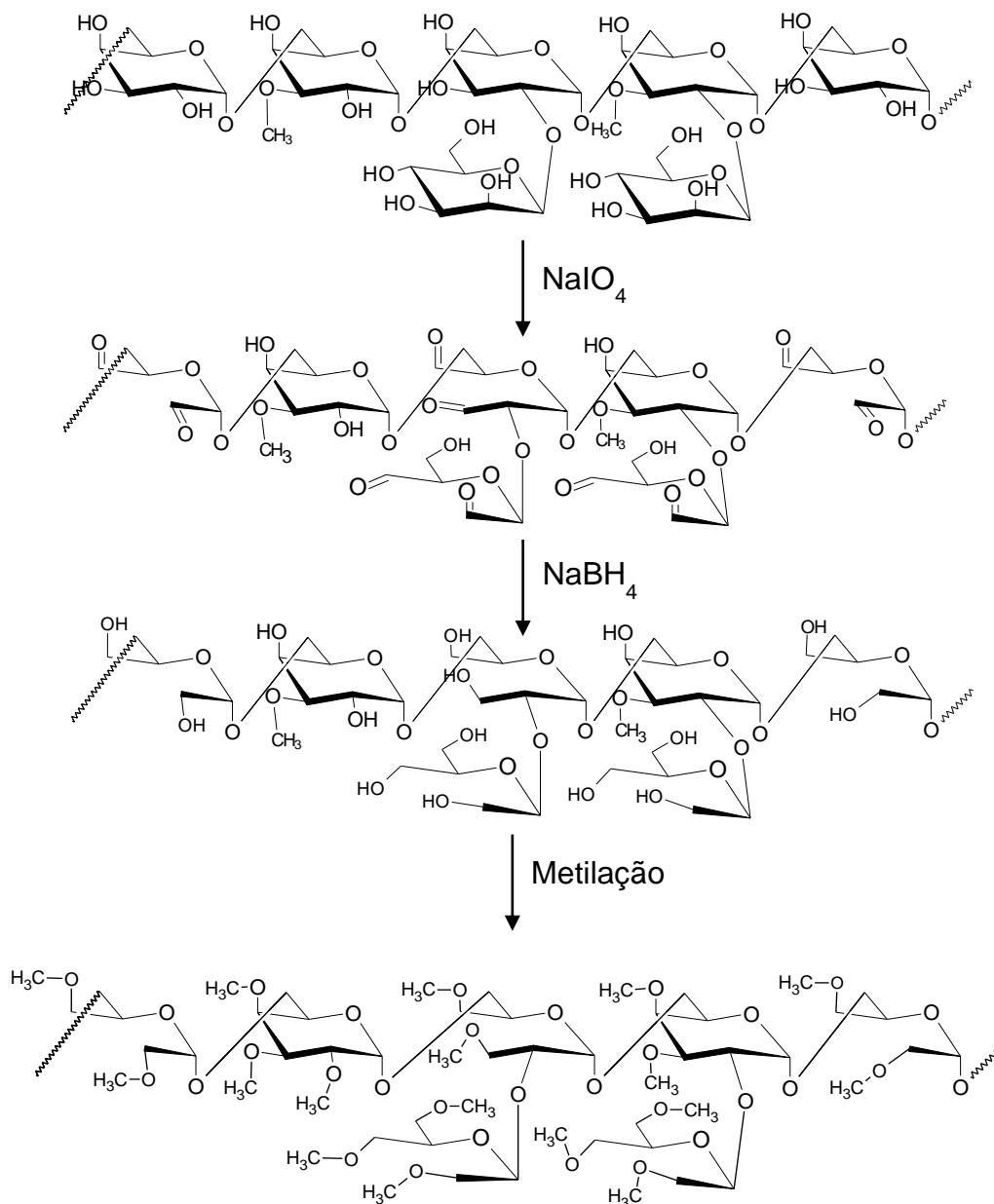


FIGURA 3.3 – Esquema representativo da oxidação de polissacarídeos com periodato de sódio seguida por metilação

3.4.3- Metilação dos Polissacarídeos

As frações polissacarídicas QEPF-*Po*, QEPF-*Gf* e Ox-QEPF-*Po* foram metiladas pelo método de Ciucanu e Kerek (1984) com a finalidade de determinar os tipos de ligações glicosídicas. Para a metilação, alíquotas dos polissacarídeos (~ 15 mg) foram solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (Me₂SO). Após a solubilização, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) desidratado e triturado (4:1 de carboidrato) e iodeto de metila (CH₃I, 1 mL), sendo a mistura reacional submetida a agitação vigorosa em vórtex por ~ 30 minutos.

Após 24 horas em repouso, as amostras foram neutralizadas com ácido acético (HOAc) e os produtos O-metilados foram extraídos com CHCl₃, e após secura, submetidos a hidrólise ácida total com 1 mL de ácido fórmico 45% à 100 °C, durante 8 horas para a fração QEPF-*Po*, 15 horas para a fração QEPF-*Gf* e 12 horas para a fração Ox-QEPF-*Po* (STORTZ; CASES; CEREZO, 1997) (Figura 3.3, p. 18).

Decorrido o tempo necessário para hidrólise, o ácido foi evaporado e o material residual foi reduzido com NaBD₄, e acetilado como citado anteriormente (item 3.4.1.2). Os derivados metilados foram analisados na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados por CG-EM e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (Figura 4.4, p. 29 e Figura 4.12, p. 42).

3.5 - MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises estruturais dos polissacarídeos foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcello Iacomini do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR, e Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP.

3.5.1 - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

Os monossacarídeos, já devidamente convertidos em seus respectivos derivados voláteis (acetatos de alditóis), foram analisados por CG-EM, da marca Varian, modelo Saturn 2000R. A detecção por massas foi feita por ionização eletrônica (70 eV), com analisador do tipo Ion Trap. A coluna utilizada na separação dos componentes foi uma coluna capilar DB-225-MS e hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. Durante a injeção da amostra a temperatura do injetor foi de 250 °C e a da coluna de 50 °C, sendo programada para aumentar 40 °C/min, até atingir a temperatura de 230 °C, sendo mantida, isotermicamente, até o final da análise.

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

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, para uma concentração final de 1 mg.mL^{-1} , sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro equivalente a $0,22 \mu\text{m}$. Em seguida, foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo NaN_3 $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ mL/min}$, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração em relação à concentração (dn/dc) foi determinada para as amostras com perfil homogêneo, com o intuito de determinar a massa molar. Para tanto, foi preparada uma solução mãe na concentração de 1 mg.mL^{-1} (em NaNO_2 contendo NaN_3), que foi filtrada em membrana com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$ e diluída nas concentrações de $0,2$, $0,4$, $0,6$ e $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$.

3.5.3- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram realizados em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular -UFPR) e Avance III 400 (Departamento de Química - UFSCar).

Os polissacarídeos (~ 40 mg) foram solubilizados em D₂O (óxido de deutério) e as análises foram realizadas a 50 ou 70 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ), de acordo com o padrão interno tetrametilsilano (TMS; $\delta_{C/H} = 0,0$).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foram estudadas as heterogalactanas obtidas do corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatus* e *Grifola frondosa*. Conforme descrito, anteriormente, na seção Material e Métodos. Para cada espécie de fungo realizou-se os processos de extração e purificação, sendo adotadas as siglas *Po* para *P. ostreatus* e *Gf* para *G. frondosa*.

4.1 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA HETEROGALACTANA DE *P. ostreatus*

Com a finalidade de obter os polissacarídeos, os basidiomas de *P. ostreatus* foram submetidos a sucessivas extrações aquosas a frio (4 °C), sendo os polissacarídeos extraídos recuperados por precipitação etanólica (3:1, v/v), originando a fração CW-*Po* (24,3 g) conforme Figura 4.1 (p. 23).

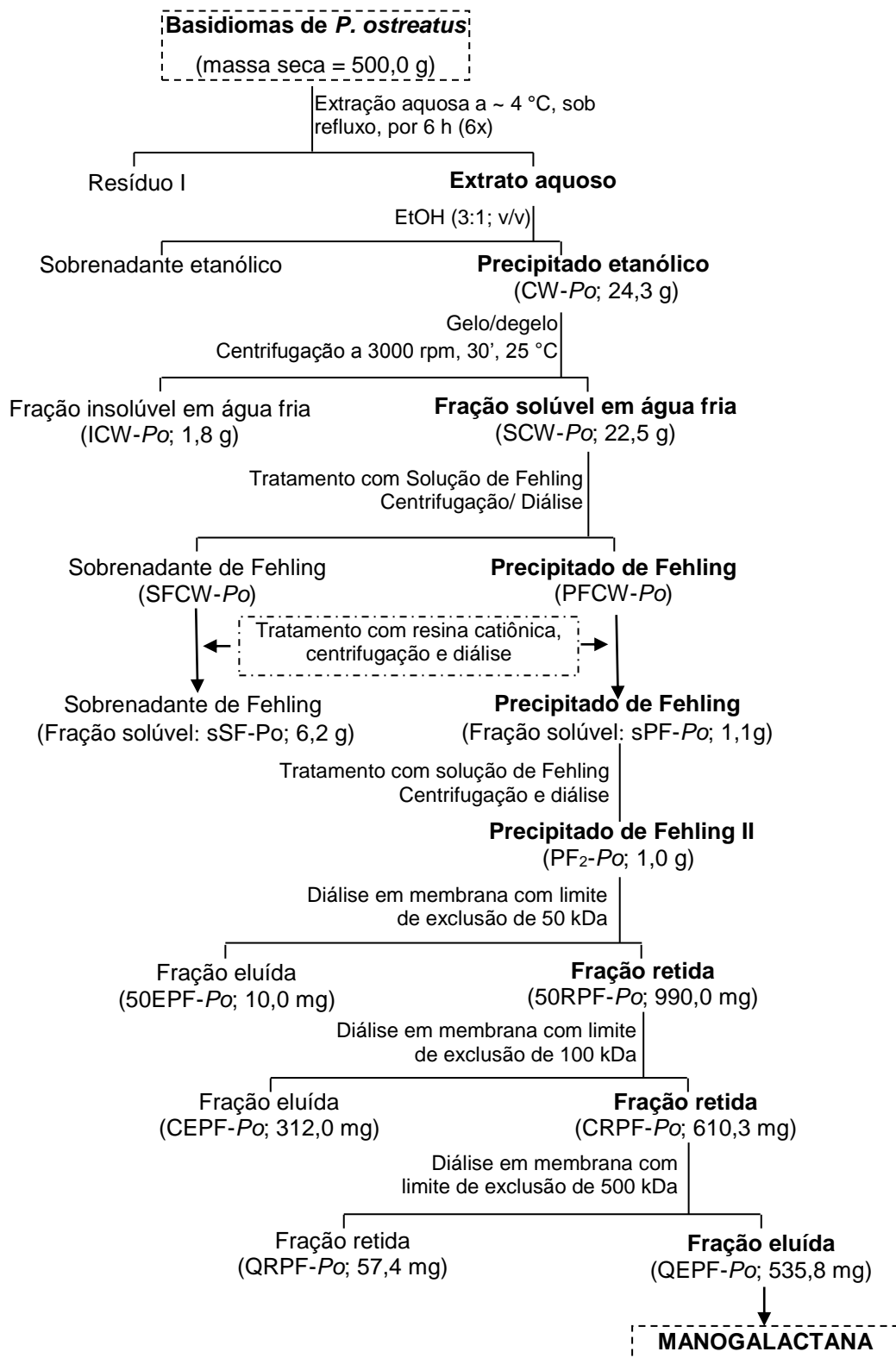
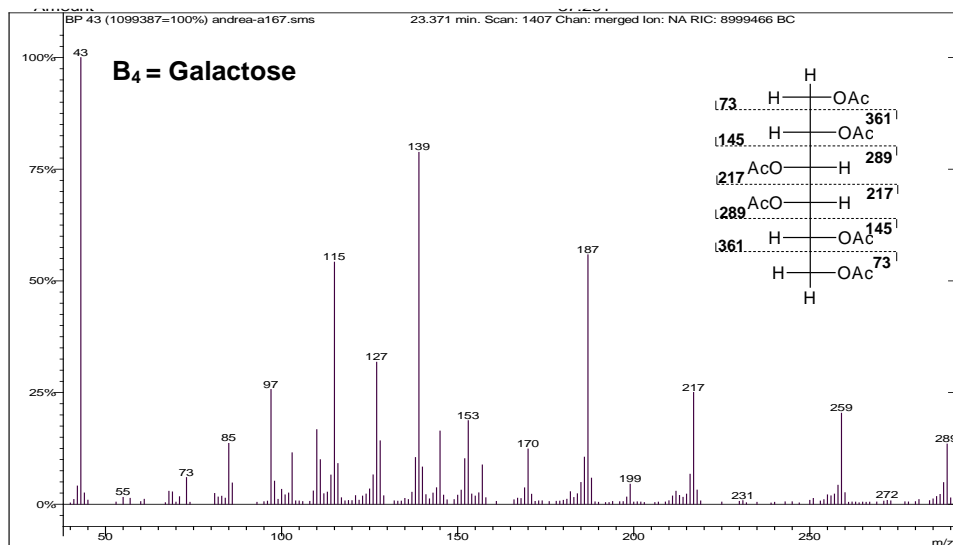
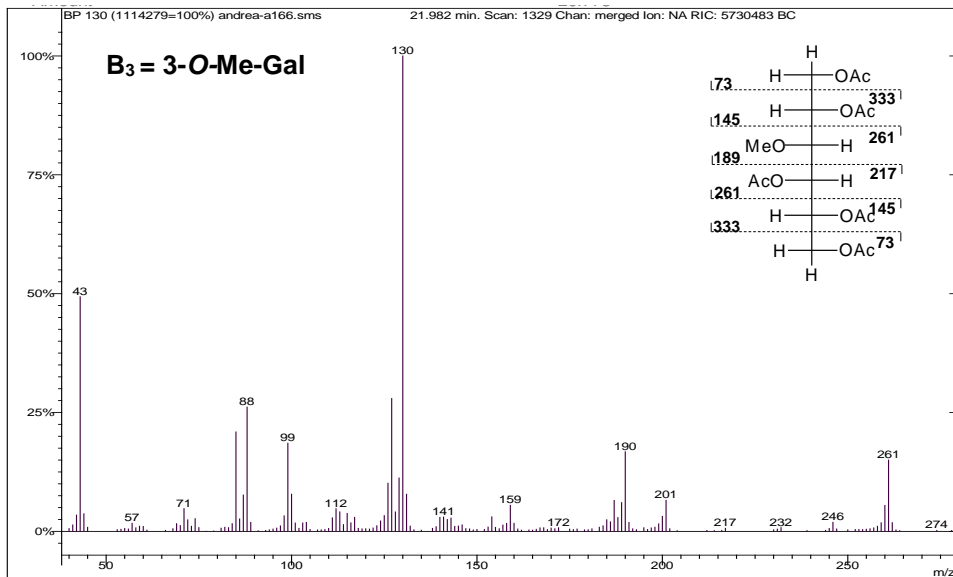
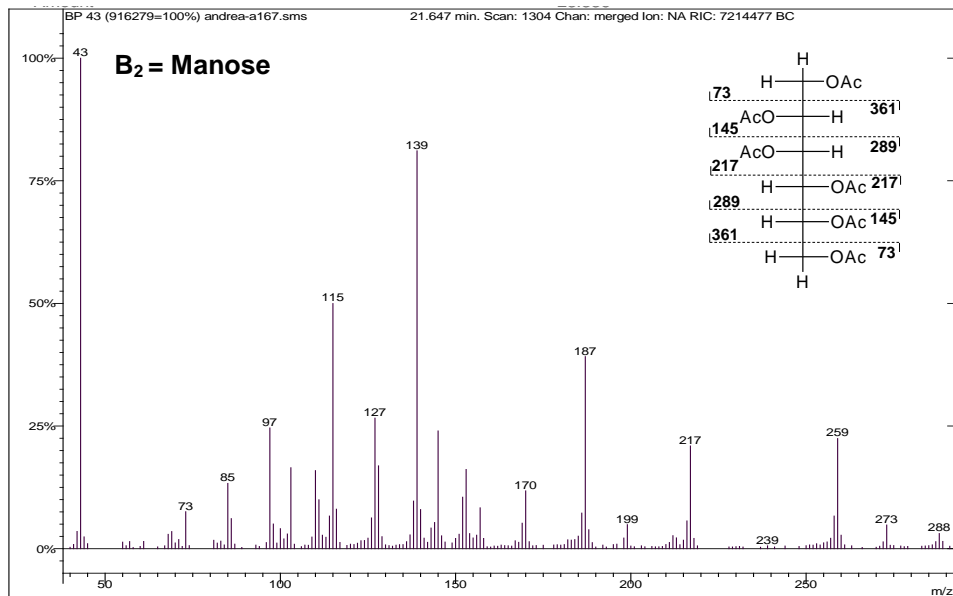


FIGURA 4.1 – Esquema do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos dos basidiomas de *P. ostreatus*



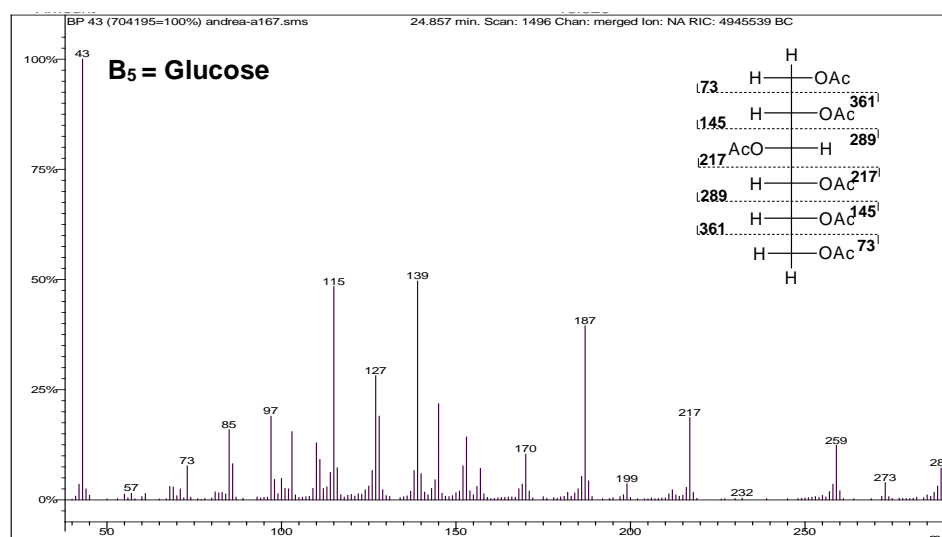


FIGURA 4.2 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis (B₁: fucose; B₂: manose; B₃: 3-O-Me-Gal; B₄: galactose; B₅: glucose) obtidos após derivatização química (acetilação) da fração CW-Po

Primeiramente, a fração CW-Po foi submetida ao processo de fracionamento por congelamento e degelo, resultando em uma fração insolúvel (ICW-Po; 1,8 g) e outra solúvel em água fria (SCW-Po; 22,5 g) (Figura 3.2, p. 16), distintas entre si quanto à composição monossacarídica (Tabela 4.1, p. 27).

Devido ao perfil heterogêneo, por HPSEC-MALLS, da fração SCW-Po (Figura 4.3, p. 28), a mesma foi submetida à precipitação com solução de Fehling, originando as frações sobrenadante (SFCW-Po) e precipitado de Fehling (PFCW-Po) (Figura 4.1, p. 23), as quais após descomplexação com resina catiônica foram centrifugados para a remoção de precipitado, fornecendo as frações solúveis sSF-Po (6,2 g) e sPF-Po (1,1 g), respectivamente (Figura 4.1, p. 23). Estas frações, apesar de apresentarem similares composições monossacarídicas (Tabela 4.1, p. 27), mostraram-se distintas quanto aos seus perfis de eluição (Figura 4.3, p. 28).

TABELA 4.1 – Composições monossacarídicas das frações obtidas a partir do extrato aquoso de *P. ostreatus*

FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) ^a				
	Fuc ^b	Man ^b	3-O-Me-Gal ^{b,c}	Gal ^b	Glc ^b
CW-Po	1,4	24,2	17,2	38,7	17,5
SCW-Po	-	23,5	14,3	34,8	27,4
ICW-Po^d	6,2	22,1	-	19,0	48,5
sSF-Po	1,1	25,2	21,9	43,5	8,3
sPF-Po	1,2	27,7	15,7	54,0	1,4
PF₂-Po	1,1	30,8	13,1	54,2	0,8
50RPF-Po	1,1	24,7	12,8	60,0	1,4
50EPF-Po	1,8	25,5	11,2	58,5	3,0
CRPF-Po	3,4	24,9	14,7	57,0	-
QRPF-Po	1,0	25,9	14,0	55,2	1,0
QEPF-Po	0,9	27,0	14,8	56,4	0,9

^a Analisado em CG-EM após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Fuc: fucose; Man: manose; 3-O-Me-Gal: 3-O-metil-galactose; Gal: galactose e Glc: glucose.

^c Confirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190 após redução com NaBD₄.

^d Apresenta 4,2% de xilose.

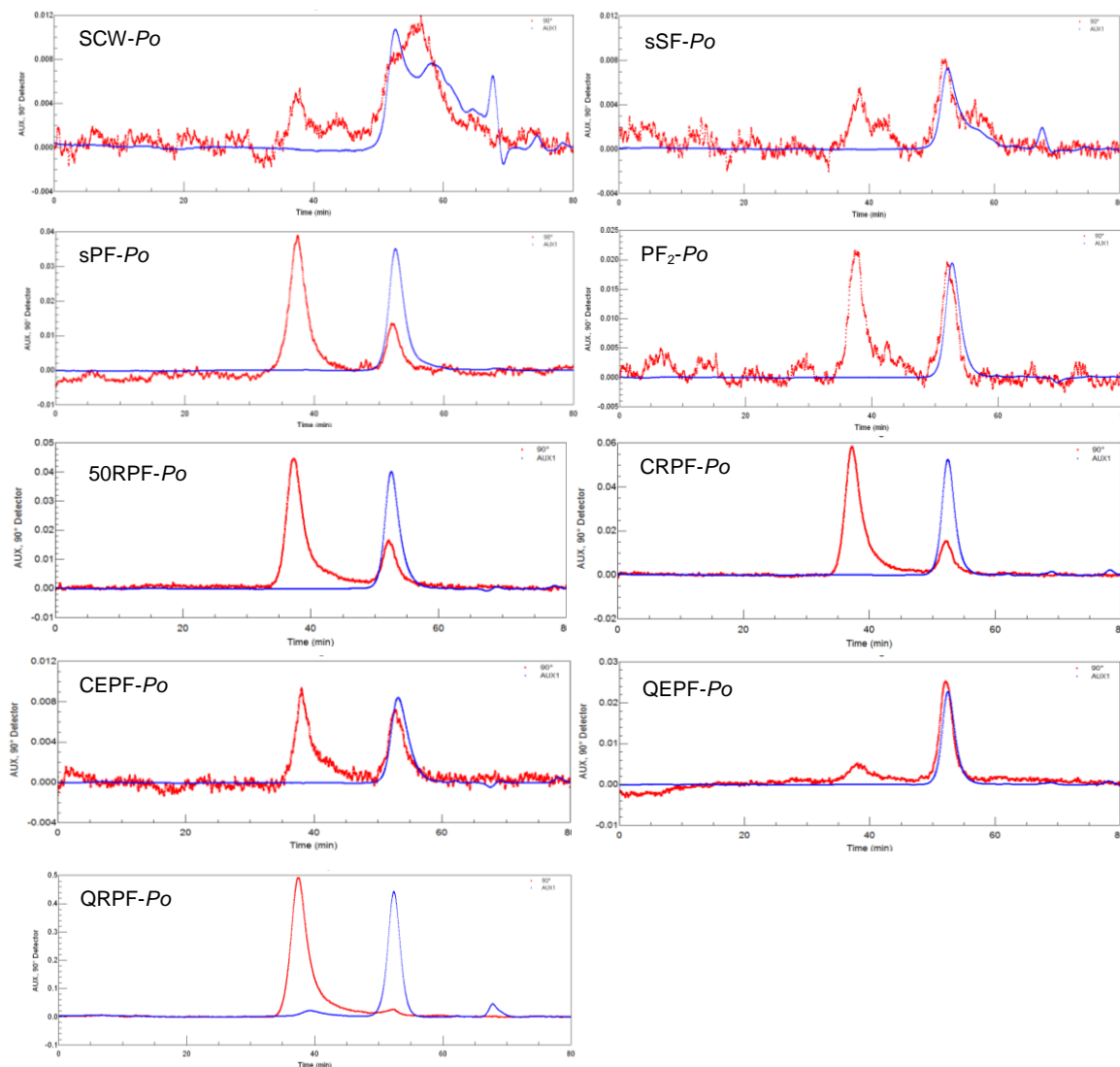


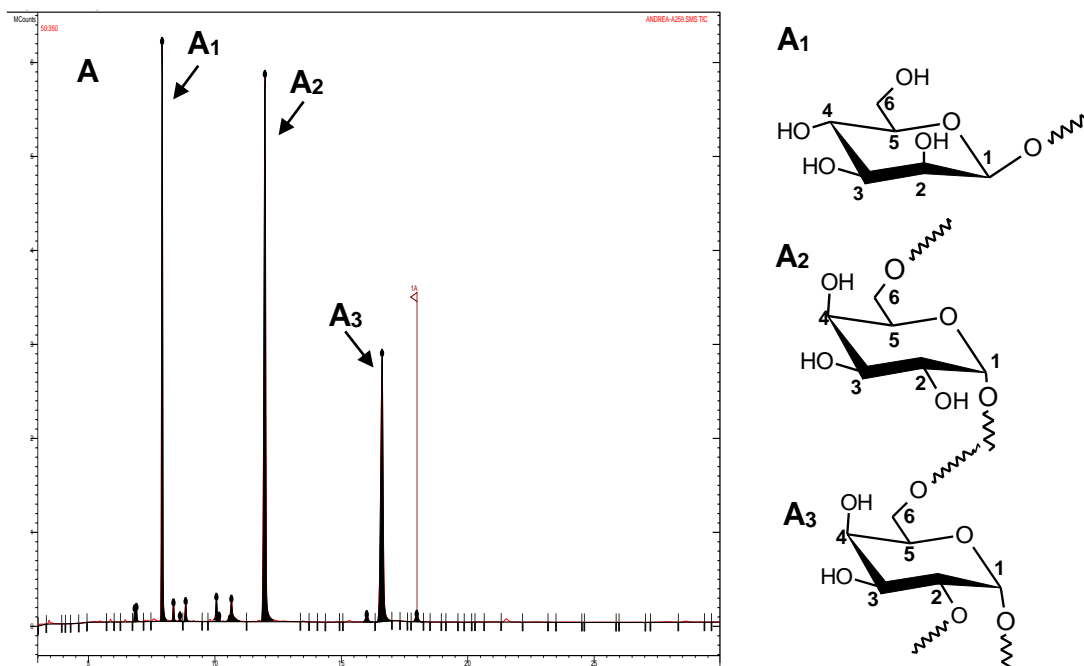
FIGURA 4.3 – Perfis de eluição das frações obtidas a partir do extrato aquoso dos basidiomas de *P. ostreatus* em cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: —) e índice de refração (IR: —) (HPSEC-MALLS)

O tratamento com solução de Fehling foi repetido para a fração sPF-*Po* para garantir melhor separação por esse procedimento, resultando a fração PF₂-*Po* (1,0 g) (Figura 4.1, p. 23), composta, principalmente, por Man (30,8%), 3-O-Me-Gal (13,1%) e Gal (54,2%) (Tabela 4.1, p. 27). Devido a heterogeneidade (HPSEC-MALLS) desta fração, esta foi submetida a diálises sequenciais, em membranas com limites de exclusão de 50, 100 e 500 kDa, resultando nas frações retidas (50RPF-*Po*, CRPF-*Po* e QRPF-*Po*, respectivamente) e eluídas (50EPF-*Po*, CEPF-*Po* e QEPF-*Po*, respectivamente) (Figura 4.1, p. 23).

Estas frações mostraram-se similares a fração de origem (PF2-*Po*) através das análises de RMN de ^{13}C e composição monossacarídica (Tabela 4.1, p. 27), sugerindo que elas podem apresentar o mesmo polissacarídeo, mas com diferentes massas molares, como evidenciados por HPSEC-MALLS (Figura 4.3, p. 28).

Cabe ressaltar que, apenas a fração QEPF-*Po* apresentou um perfil homogêneo por HPSEC com uma massa molar de $50,7 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ ($dn/dc = 0,153 \text{ mL.g}^{-1}$), sendo, assim, as análises adicionais para a caracterização estrutural deste polímero foram realizadas somente para esta fração.

Com a finalidade de determinar o tipo de ligação glicosídica presente neste polímero, uma alíquota desta fração foi submetida à análise de metilação, a qual indicou a presença de uma estrutura altamente ramificada devido à presença de altos teores de terminais não redutores de Man α (2,3,4,6-Me $_4$ -Man; 28,3%). Além deste, foram observados os derivados correspondentes à cadeia principal constituída por unidades de Gal β e 3-O-Me-Gal β 6-O- (2,3,4-Me $_3$ -Gal; 42,9%) e 2,6-di-O- substituídas (3,4-Me $_2$ -Gal; 28,8%) (Figura 4.4, p. 29; Tabela 4.2, p. 30).



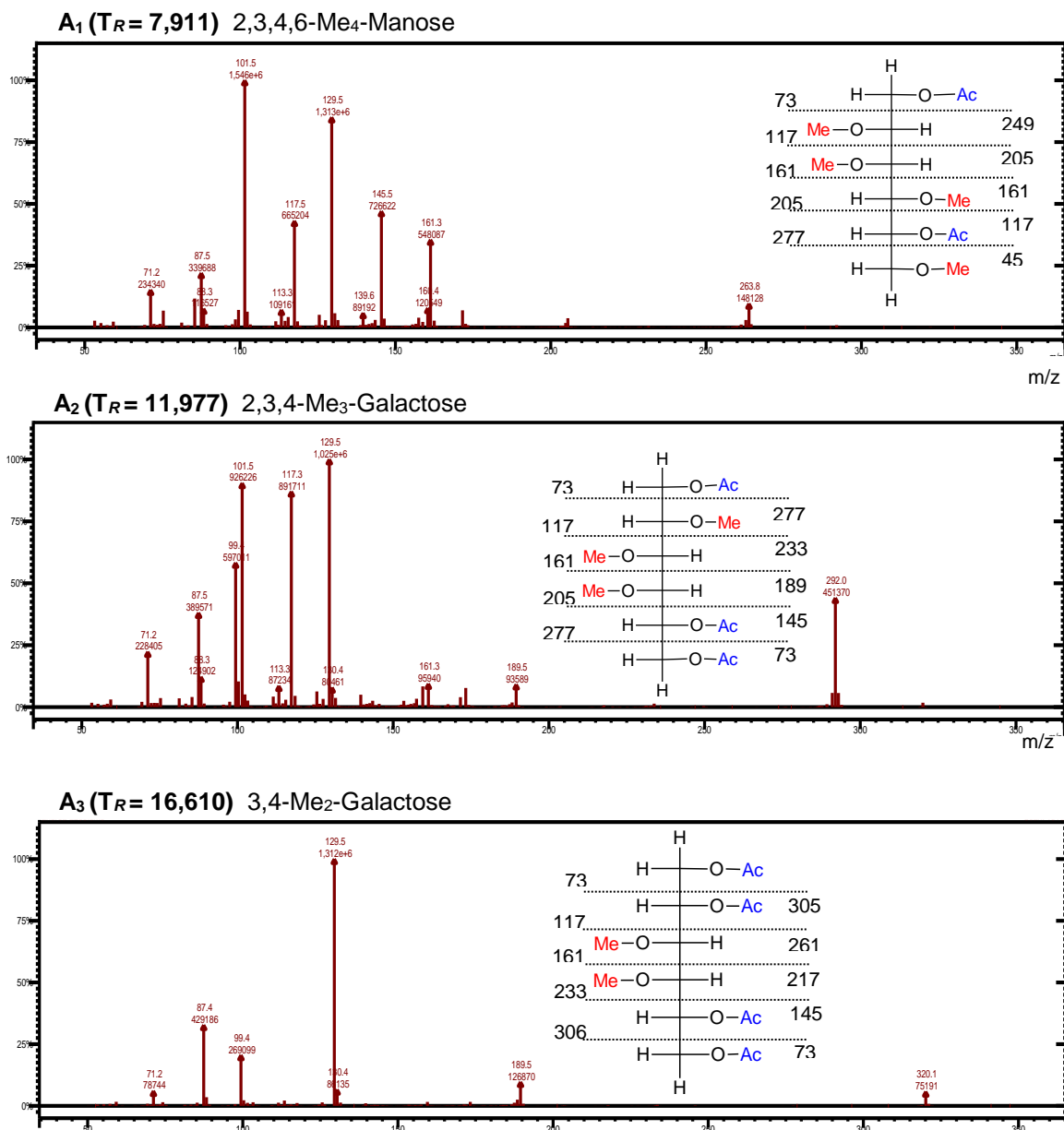


FIGURA 4.4 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação m/z acetatos de alditóis parcialmente O-metilados (A₁: 2,3,4,6-Me₄-Man; A₂: 2,3,4-Me₃-Gal; A₃: 3,4-Me₂-Gal) obtidos após derivatização química (metilação) da fração QEPF-Po

TABELA 4.2 – Análise por metilação da fração QEPF-Po, isolada dos basidiomas de *P. ostreatus*

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ^a	T _R ^b	mol%	Tipo de ligação ^c
2,3,4,6-Me ₄ -Man	7,911	28,3	Manp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal	11,977	42,9	6→)-Galp (1→
3,4-Me ₂ -Gal	16,610	28,8	2,6→)-Galp-(1→

^a Analisado em CG-EM (coluna DB 225) após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaBD₄) e acetilação.

^b Tempo de retenção (minutos).

^c Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

Levando em consideração que as substituições em O-2 podem estar ocorrendo tanto nas unidades de Galp, como nas de 3-O-Me-Galp, uma alíquota da amostra QEPF-Po (80 mg) foi submetida a oxidação com periodato de sódio (NaIO₄), seguida de redução com borohidreto de sódio (NaBH₄). Esse procedimento, quando seguido de uma hidrólise branda, degrada moléculas que apresentam hidroxilas vicinais, como é o caso de polissacarídeos com ligações (1→2), (1→4) e (1→6). Entretanto, a molécula em estudo apresenta, em sua cadeia principal, algumas unidades de galactose substituída por um grupo metil na posição O-3, o qual é resistente à oxidação com NaIO₄, sendo confirmado por CG-EM após hidrólise ácida total do material oxidado. Em decorrência desta propriedade, optou-se por fazer uma metilação seguida por hidrólise, redução com NaBD₄ e acetilação em uma alíquota da amostra oxidada e reduzida (Ox-QEPF-Po) para análise em CG-EM (DONG et al., 2002). Esse procedimento permitiu observar que 32,5% das unidades de 3-O-Me-Galp estavam substituídas em O-2 por terminais não redutores de manose, ou seja, a proporção de Me-Gal não substituída: Me-Gal substituída neste polímero é de, aproximadamente, 2:1.

Por meio das análises espectroscópicas realizadas [RMN de ¹H, RMN de ¹³C (Figura 4.5, p. 32), HSQC (Figura 4.7-A, p. 33), HSQC-DEPT (Figura 4.7-B, p. 33), HSQC-TOCSY (Figura 4.6, p. 32; Tabela 4.3, p. 35) e COSY] foi possível fazer o assinalamento dos átomos de carbonos (¹³C) e hidrogênios (¹H), levando a caracterização estrutural fina deste polímero (Tabela 4.4, p. 36).

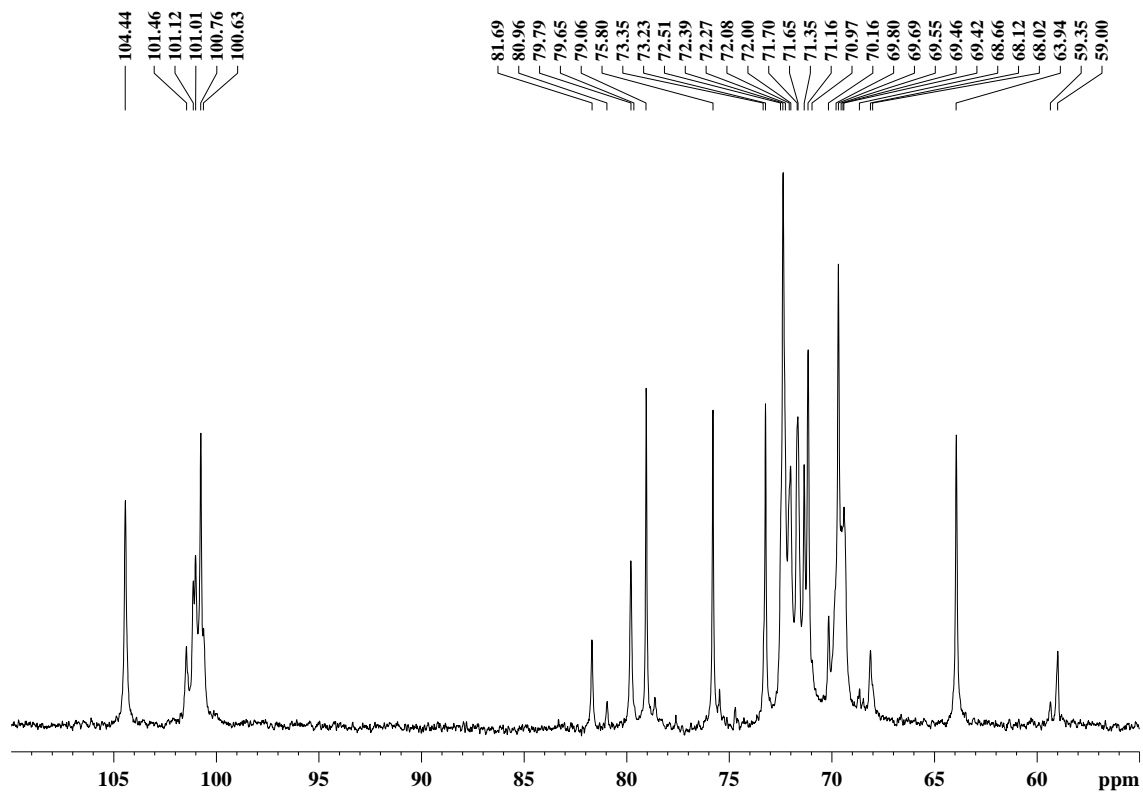


FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração QEPF-*Po* obtida dos basidiomas de *P. ostreatus*, em D_2O a $70\text{ }^\circ\text{C}$

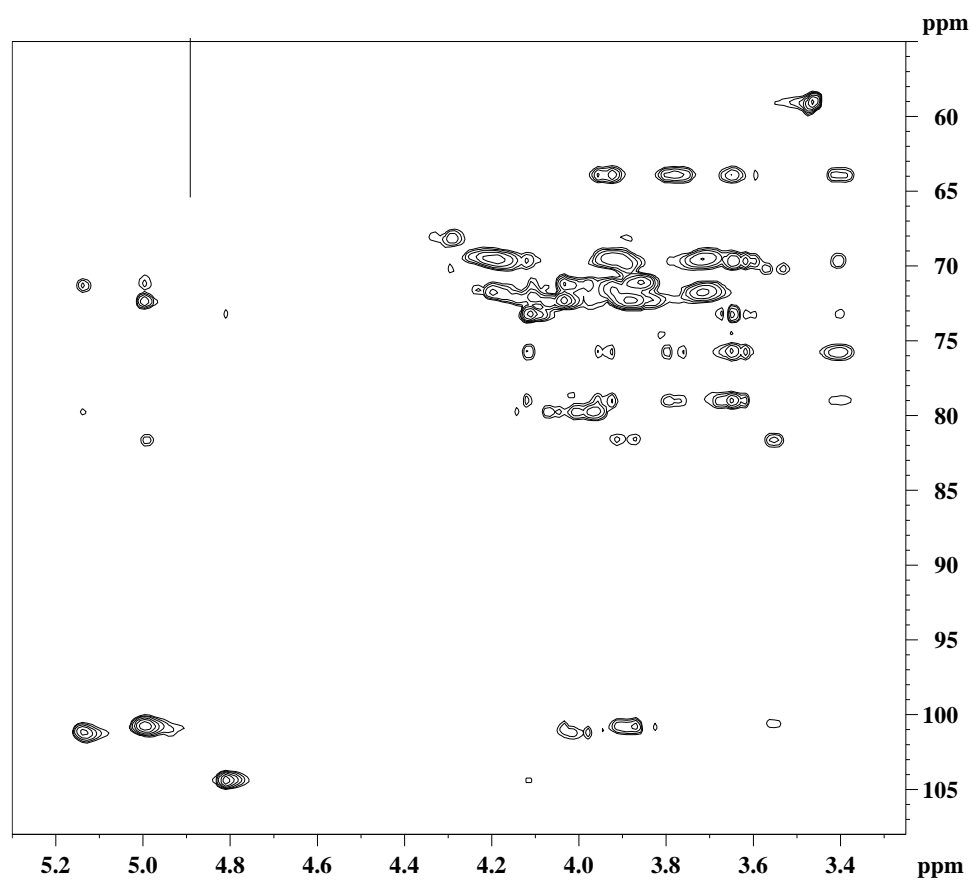
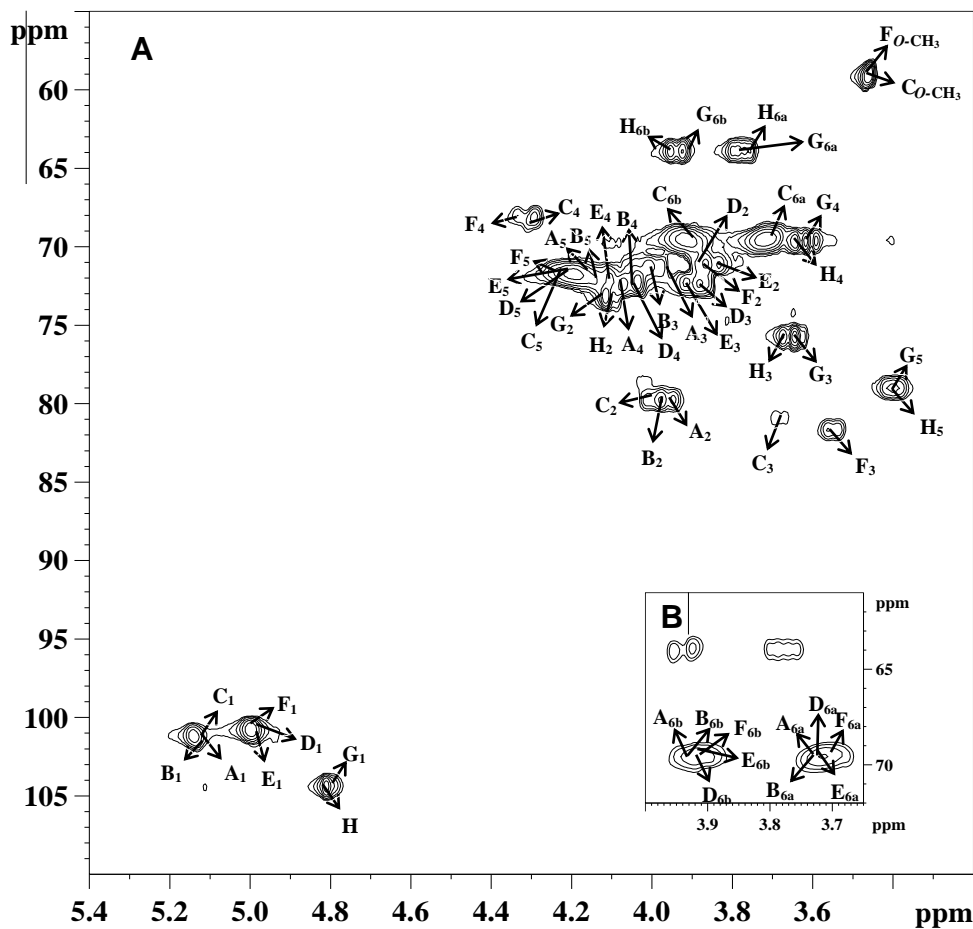


FIGURA 4.6 – Espectro de HSQC-TOCSY da fração QEPF-*Po* obtida dos basidiomas *P. ostreatus*, em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$



A e B = α -Galp 2,6-di-O- substituída; C = 3-O-Me- α -Galp 2,6-di-O- substituída; D e E = α -Galp 6-O- substituída; F = 3-O-Me- α -Galp 6-O- substituída. G e H = terminal não redutor de β -Manp

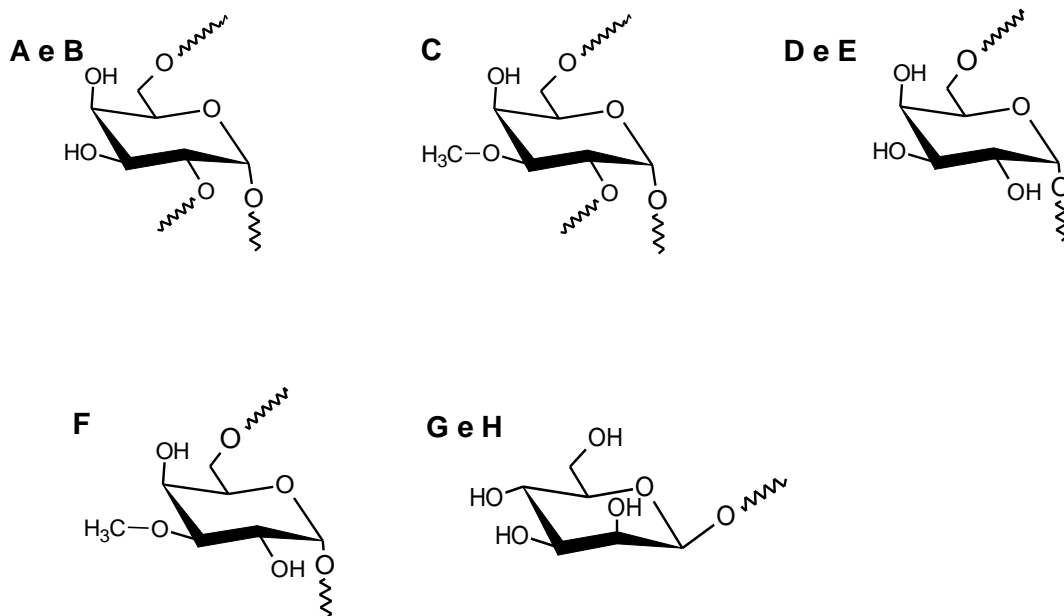


FIGURA 4.7 – Espectro de HSQC da fração QEPF-*Po* obtida dos basidiomas de *P. ostreatus* (A), em D₂O a 50 °C, com inserto da região C-6 do HSQC-DEPT (B)

O espectro de HSQC da fração QEPF-Po (Figura 4.7, p. 33) apresentou sinais na região anomérica (C1/H1) correspondentes aos terminais não redutores de β -D-Manp (δ 104,44/4,811 e δ 104,37/4,790) e as unidades de α -D-Galp (δ 100,76/4,999; 101,01/4,994 e δ 101,12/5,142; 101,46/5,138) e 3-O-Me- α -D-Galp (δ 100,63/4,988 e δ 101,10/5,130) 6-O- e 2,6-di-O-substituída, respectivamente, da cadeia principal. Os monossacarídeos foram designados como A, B, C, D, E, F, G e H, de acordo com o valor decrescente de deslocamento químico do H-1, os quais foram atribuídos aos terminais não redutores de Manp (G: δ 4,811; H: δ 4,790), às unidades de 3-O-Me-Galp 6-O- (F: δ 4,988) e 2,6-di-O-substituídas (C: δ 5,130) e as 6-O- (E: δ 4,994; D: δ 4,999) e 2,6-di-O-substituídas Galp (B: δ 5,138; A: δ 5,142).

As configurações glicosídicas foram confirmadas pelos valores das constantes de acoplamento $J_{C-1,H-1}$, observados no HSQC acoplado, sendo a configuração β para as unidades de manose ($J_{C-1,H-1} = 160$ Hz) e α para as unidades de Galp e 3-O-Me-Galp ($J_{C-1,H-1} = 171$ Hz).

Conforme visto anteriormente, os dados de metilação sugeriram a presença de ligações do tipo (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 2) (Tabela 4.2, p. 30), sendo estas confirmadas pelas análises espectroscópicas. Os sinais de C-2 substituídos foram observados em δ 79,79 (Figuras 4.5, p. 32; Figura 4.7, p. 33), e os sinais de grupos -CH_2 substituídos das unidades da cadeia principal 6-O- (Galp e 3-O-Me-Galp) e 2,6-di-O-substituídas (Galp e 3-O-Me-Galp) em δ 69,80 e δ 69,54; 69,46; 69,38, respectivamente, sendo confirmados pela inversão dos referidos sinais no experimento HSQC-DEPT (Figura 4.7-B, p. 33).

Sinais em δ 59,00 e 59,35 confirmam a presença do grupo -CH_3 na molécula, juntamente com o sinal em δ 81,69 e 80,96 referente ao C-3/H-3 das unidades de 3-O-Me- α -Galp 6-O- e 2,6-di-O- substituídas, respectivamente (Figuras 4.5, p. 32; Figura 4.7, p. 33).

TABELA 4.3 – Principais correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ observadas no espectro de HSQC-TOCSY da heterogalactana (fração QEPF-Po) obtida de *P. ostreatus*

UNIDADES	H/C $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$	Correlações
		$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ (Átomo)
$\rightarrow 2,6$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Resíduo A)	H1 (5,142)	101,12 (C1); 79,79 (C2); 72,39 (C4); 71,45 (C3)
	H5 (4,17)	71,70 (C5)
	H4 (4,07)	79,79 (C2); 72,39 (C4)
	C2 (79,79)	3,95 (H2)
$\rightarrow 2,6$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Resíduo B)	H1(5,138)	101,46 (C1); 79,79 (C2)
	H5 (4,14)	72,00 (C5)
	C2 (79,79)	4,14(H5); 3,98 (H2)
$\rightarrow 2,6$ -3-O-Me- α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Resíduo C)	H1 (5,130)	101,10 (C1); 80,96 (C3); 79,79 (C2); 68,66 (C4)
	H4 (4,31)	79,79 (C2); 68,66 (C4)
	H3 (3,68)	80,96 (C3); 79,79 (C2)
	C3 (80,96)	3,68 (H3); 4,00 (H2)
$\rightarrow 6$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Resíduo D)	H1 (4,999)	100,76 (C1)
	H4 (4,03)	72,36 (C3); 72,27 (C4); 71,16(C2)
	C1 (100,76)	4,03 (H4); 3,88 (H3)
$\rightarrow 6$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Resíduo E)	H1 (4,994)	72,08 (C3); 72,24 (C4); 71,16 (C2)
	H4 (4,10)	72,24 (C3); 72,08 (C4); 71,16 (C2); 69,38 (C6)
	C1 (101,01)	4,10 (H4); 3,91 (H3)
	C5 (71,65)	3,72 (H6a); 3,92 (H6b)
	C2 (71,16)	3,83 (H2); 4,10 (H4); 4,994 (H1)
	C6 (69,46)	4,20 (H5); 4,10 (H4); 3,92 (H6b); 3,72 (H6a)
$\rightarrow 6$ -3-O-Me- α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Resíduo F)	H1 (4,988)	100,63 (C1); 81,69 (C3); 70,16 (C2)
	H4 (4,33)	70,16 (C2); 68,12 (C4)
	H5 (4,29)	81,69 (C3); 70,16 (C2); 68,12 (C4)
	H3 (3,55)	100,63 (C1)
	C3 (81,69)	3,87 (H2); H6b (3,91)
β -D-Manp-(1 \rightarrow) (Resíduo G)	H1 (4,811)	104,44 (C1); 73,23 (C2)
	H2 (4,12)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 73,23 (C2); 69,69 (C4)
	H6a (3,80)/ H6b (3,92)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 69,69 (C4); 63,94 (C6)
	H3/H4 (3,64)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 73,23 (C2); 69,69 (C4); 63,94 (C6)
	H5 (3,40)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 73,23 (C2); 69,69 (C4); 63,94 (C6)
	C1 (104,44)	4,12 (H2)
β -D-Manp-(1 \rightarrow) (Resíduo H)	H1 (4,79)	104,37 (C1); 4,09 (H2)
	H2 (4,09)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 73,35 (C2); 69,69 (C4)
	H6a (3,76)/ H6b (3,95)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 69,69 (C4); 63,94 (C6)
	H3 (3,67)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 73,33 (C2);
	H4 (3,62)	79,06 (C5); 75,80 (C3); 73,35 (C2); 69,69 (C4); 63,94 (C6)
	C1 (104,37)	4,09 (H2)

TABELA 4.4 – Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da heterogalactana isolada de *P. ostreatus*^a

UNIDADES		1	2	3	4	5	6		-O- CH ₃
							6a	6b	
→2,6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo A)	¹³ C	101,12	79,79	71,35	72,39	71,70	69,80		
	¹ H	5,142	3,95	3,98	4,07	4,17	3,73	3,93	
→2,6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo B)	¹³ C	101,46	79,79	71,35	72,51	72,00	69,80		
	¹ H	5,138	3,98	4,00	4,04	4,14	3,73	3,93	
→2,6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→ (Resíduo C)	¹³ C	101,10	79,79	80,96	68,66	71,70	69,80		59,35
	¹ H	5,130	4,00	3,68	4,31	4,17	3,73	3,93	
→6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo D)	¹³ C	100,76	71,16	72,36	72,27	71,65	69,46		
	¹ H	4,999	3,87	3,88	4,03	4,20	3,72	3,92	
→6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo E)	¹³ C	101,01	71,16	72,24	72,08	71,65	69,38		
	¹ H	4,994	3,83	3,91	4,10	4,20	3,72	3,92	
→6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→ (Resíduo F)	¹³ C	100,63	70,16	81,69	68,12	71,54	69,54		59,00
	¹ H	4,988	3,87	3,55	4,29	4,23	3,70	3,91	
β-D-Manp-(1→ (Resíduo G)	¹³ C	104,44	73,23	75,80	69,69	79,06	63,94		
	¹ H	4,811	4,12	3,64	3,64	3,40	3,80	3,92	
β-D-Manp-(1→ (Resíduo H)	¹³ C	104,37	73,35	75,80	69,69	79,06	63,94		
	¹ H	4,790	4,09	3,67	3,62	3,40	3,76	3,95	

^a Os assinalamentos foram realizados de acordo com os resultados obtidos através das seguintes análises espectroscópicas: RMN de ^{13}C , RMN de ^1H , HSQC-DEPT, HSQC, COSY, HSQC-TOCSY.

A partir das análises realizadas, foi determinada a estrutura da heterogalactana isolada dos basidiomas de *Pleurotus ostreatus*, a qual apresenta uma cadeia principal constituída de unidades de α-D-Galp e 3-O-Me-α-D-Galp (1→6) ligadas (A e B, respectivamente), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2 por terminais não redutores de β-D-Manp (C e D, respectivamente) (Figura 4.8, p. 37)

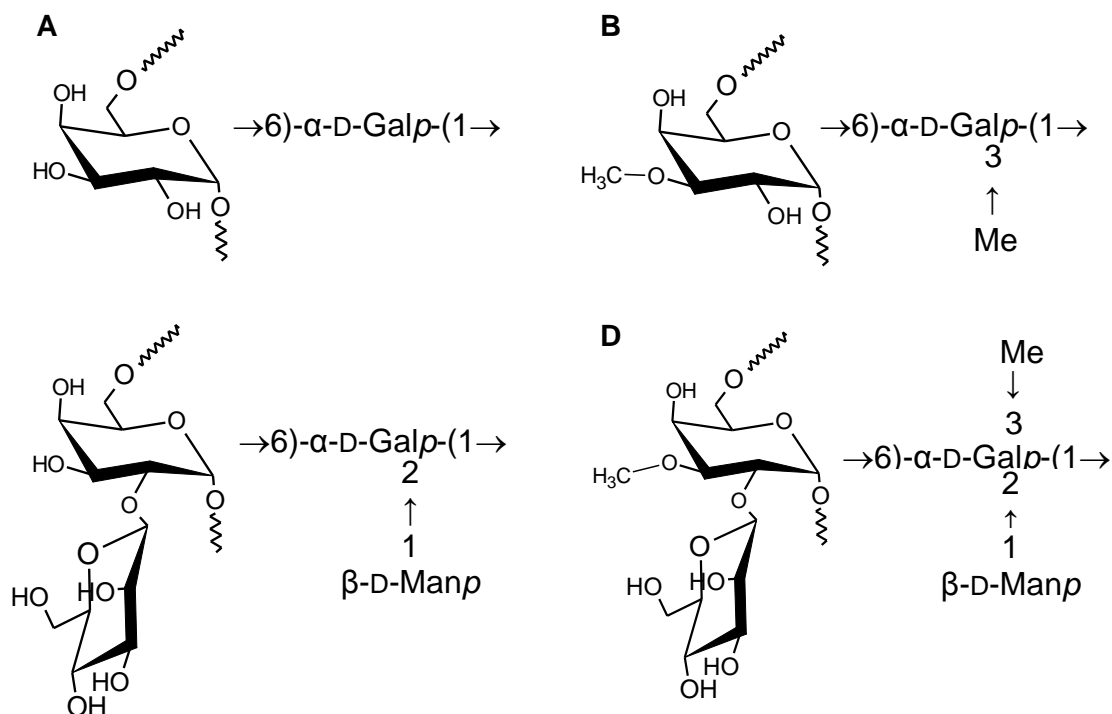


FIGURA 4.8 – Principais estruturas observadas na manogalactana isolada dos basidiomas de *P. ostreatus*

Uma estrutura similar à encontrada neste estudo, já havia sido descrita anteriormente para este fungo, no entanto, os autores não detalharam a estrutura fina desta molécula (JAKOVLEVIĆ et al., 1998). Manogalactanas parcialmente metiladas foram isoladas de outras espécies deste gênero como *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* var. *florida* (ROSADO et al., 2003) e *P. pulmonarius* (SMIDERLE et al., 2008b). Recentemente, foi isolada uma manogalactana, de *P. geesteranus*, similar às encontradas no gênero *Pleurotus*, porém esta contém maior percentual de unidades 3-O-Me-galactose e apenas as unidades de galactose da cadeia principal encontram-se substituídas em O-2 (ZHANG et al., 2013).

Heterogalactanas parcialmente metiladas contendo apenas terminais não redutores de $\beta\text{-Manp}$ como cadeias laterais são polímeros característicos deste gênero em estudo. Estas geralmente apresentam de 10 a 20% do derivado 3-O-Me-galactose, no entanto, além desta descrita no presente trabalho, a fração sSF-Po mostrou conter a mesma estrutura, porém com maior percentual do monossacarídeo naturalmente metilado.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA HETEROGALACTANA DE *Grifola frondosa*

Conforme descrito anteriormente seção experimental deste trabalho, os basidiomas do cogumelo medicinal *G. frondosa* foram submetidos à extrações aquosas a frio (~ 4 °C, sob agitação mecânica), resultando em um extrato aquoso, o qual foi submetido à precipitação com etanol em excesso (3:1; v/v) (Figura 4.9) para a obtenção dos polissacarídeos (fração CW-Gf, 8,0 g). Esta fração bruta apresentou ser constituída, principalmente, por fucose (9,4%), manose (23,7%), galactose (21,3%) e glucose (44,5%) (analisados como acetatos de alditóis em CG-EM) (Tabela 4.5, p. 40; Figura 4.10, p. 39).

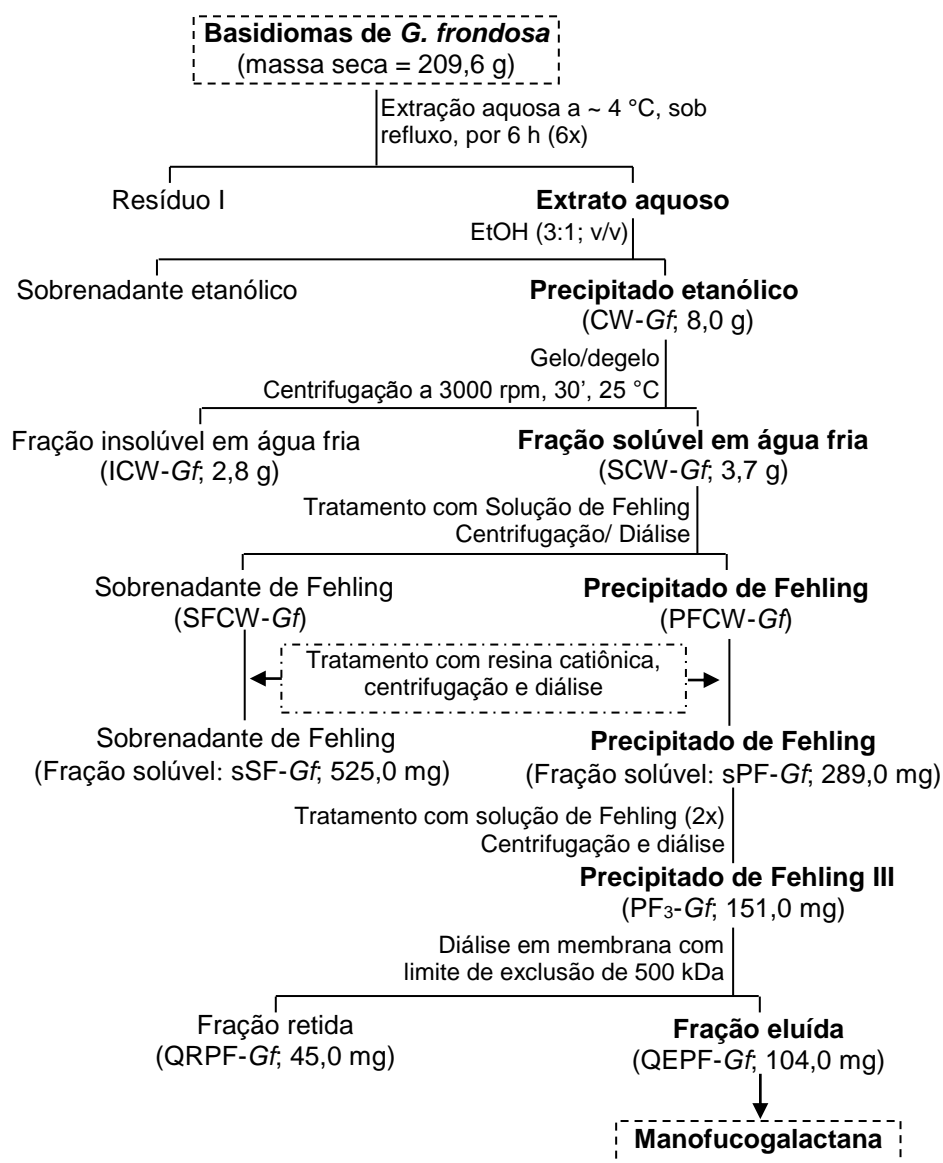
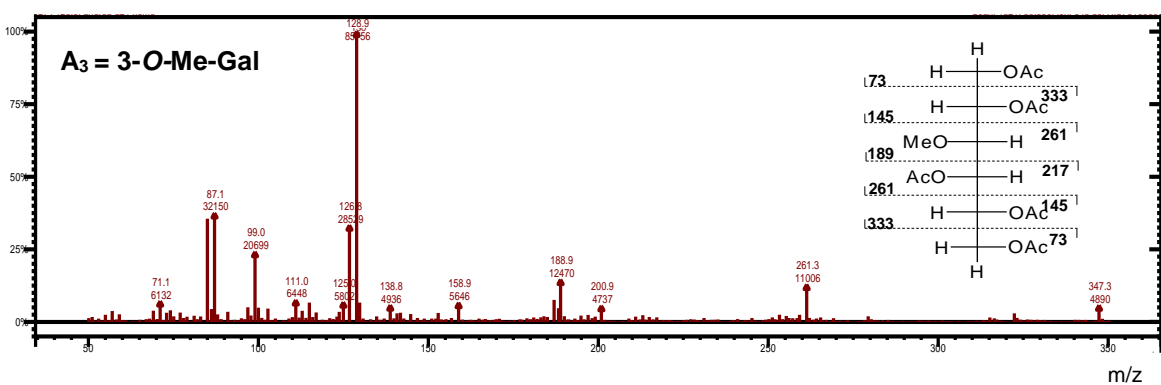
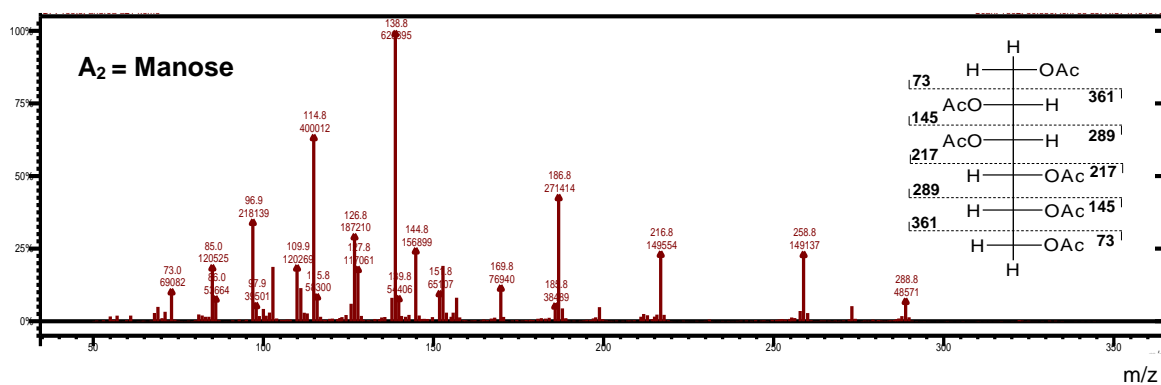
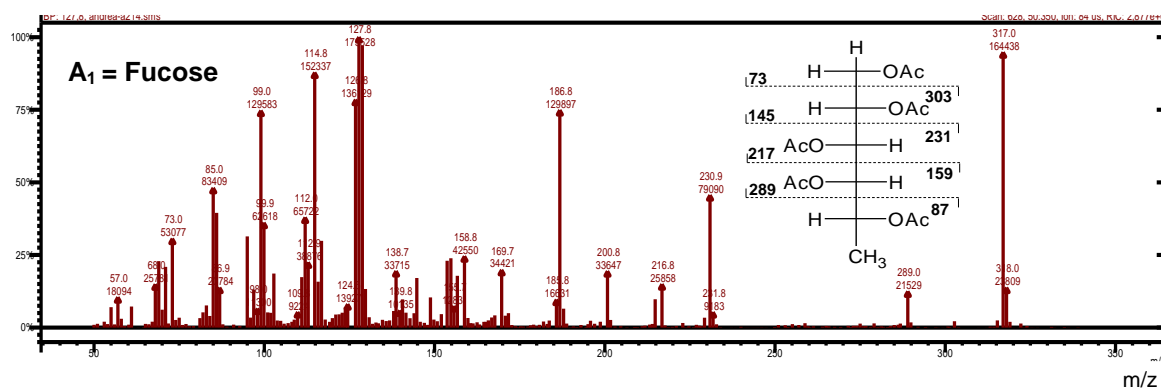
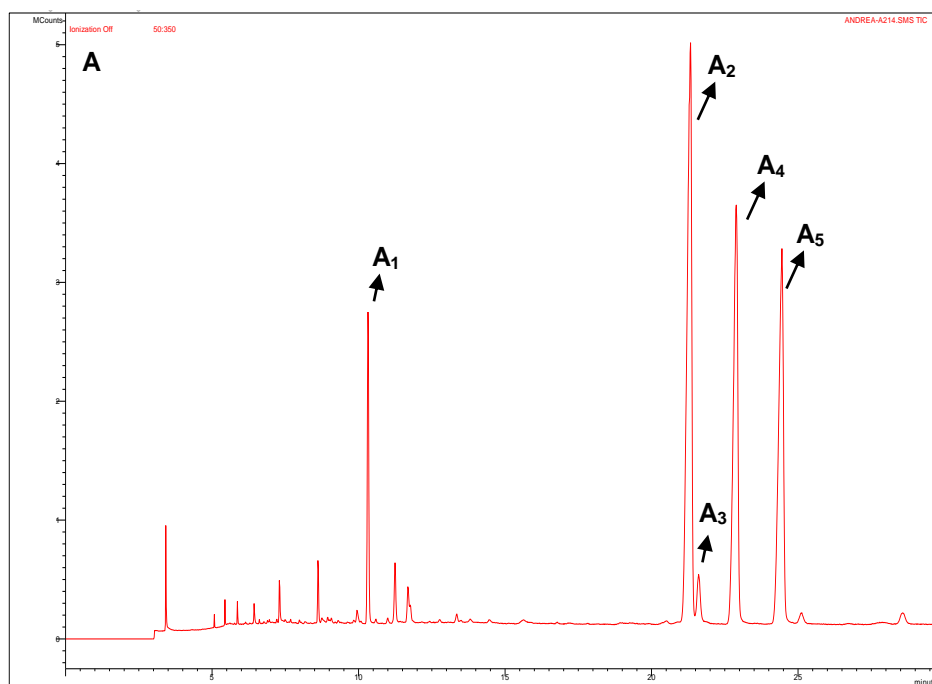


FIGURA 4.9 – Esquema do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos dos basidiomas de *G. frondosa*



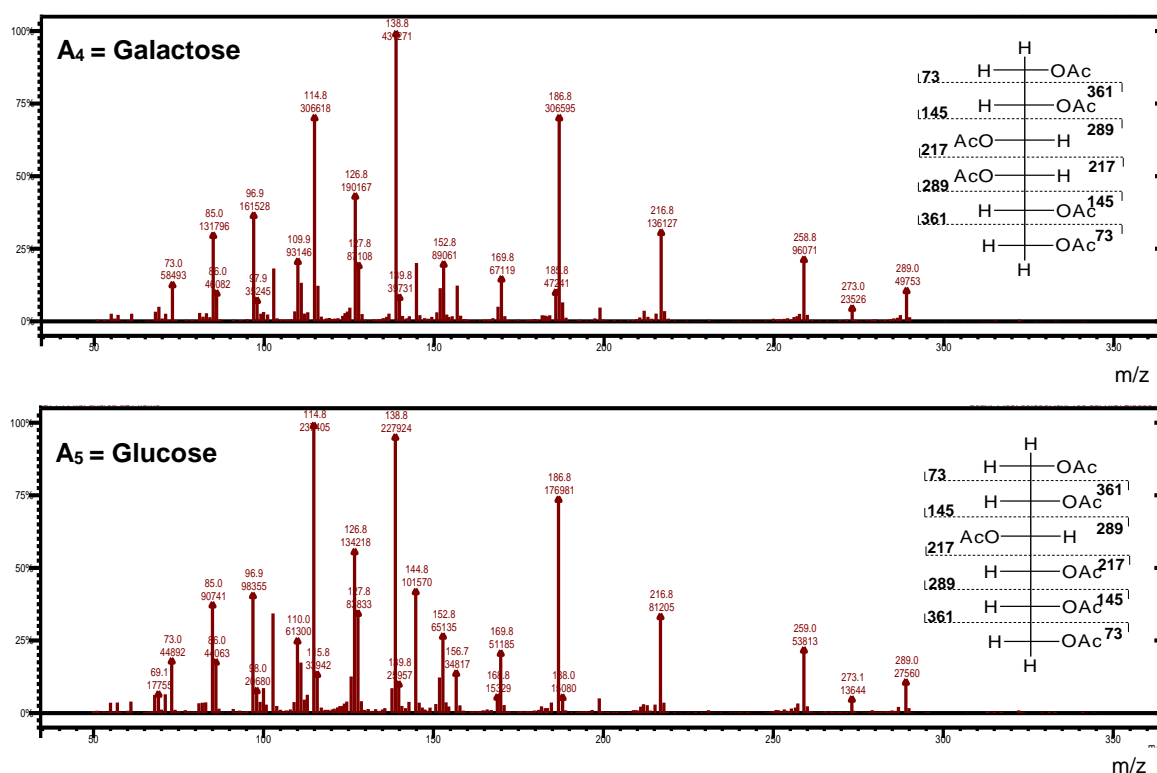


FIGURA 4.10 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis (A₁: fucose; A₂: manose; A₃: 3-O-Me-Gal; A₄: galactose; A₅: glucose) obtidos após derivatização química (acetilação) da fração CW-Gf

TABELA 4.5 – Composições monossacarídicas das frações obtidas a partir do extrato aquoso de *G. frondosa*

FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%) ^a				
	Fuc ^b	Man ^b	3-O-Me-Gal ^{b,c}	Gal ^b	Glc ^b
CW-Gf	9,4	23,7	1,1	21,3	44,5
SCW-Gf	6,7	38,9	1,9	26,7	25,8
ICW-Gf	12,2	21,2	4,4	45,0	17,2
PF ₂ -Gf	19,6	22,2	6,5	50,2	1,5
PF ₃ -Gf	27,8	24,4	8,5	39,3	-
QRPF-Gf	17,5	22,6	6,9	53,0	-
QEPF-Gf	20,0	10,0	7,0	63,0	-

Analisado em CG-EM após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Fuc: fucose; Man: manose; 3-O-Me-Gal: 3-O-metil-galactose; Gal: galactose e Glc: glucose.

^c Confirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190 após redução com NaBD₄.

Com a finalidade de purificação, a fração CW-Gf foi submetida a diversas técnicas, as quais estão ilustradas na Figura 4.9 (p. 38). Como primeira etapa de purificação, este material foi submetido à precipitação por

congelamento e degelo, resultando em uma fração solúvel (SCW-*Gf*, 3,7 g) e outra insolúvel em água fria (ICW-*Gf*, 2,8 g) (Figura 4.9, p. 38).

A fração SCW apresentou, fucose (6,7%), manose (38,9%), 3-*O*-Me-galactose (1,9%) (confirmado por CG-EM por meio dos fragmentos de massa m/z 130 e 190 após redução com NaBD₄ e acetilação), galactose (26,7%) e glucose (25,8%) como monossacarídeos (Figura 4.10, p. 39; Tabela 4.5, p. 40) e um perfil heterogêneo quando analisada por HPSEC-MALLS (Figura 4.11).

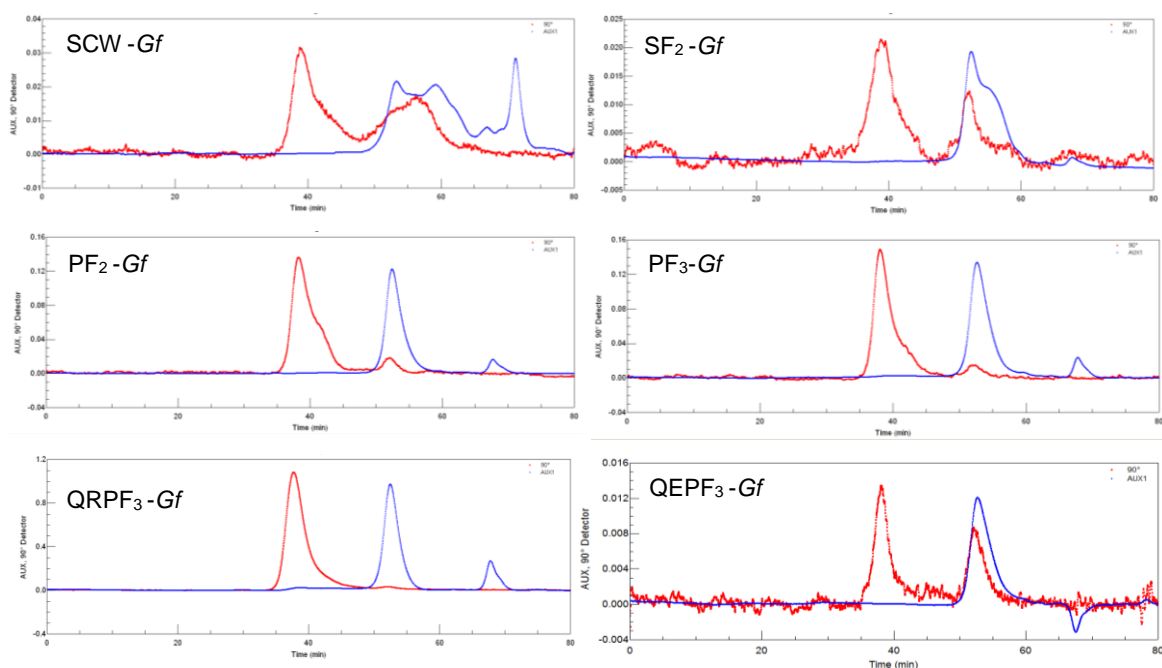


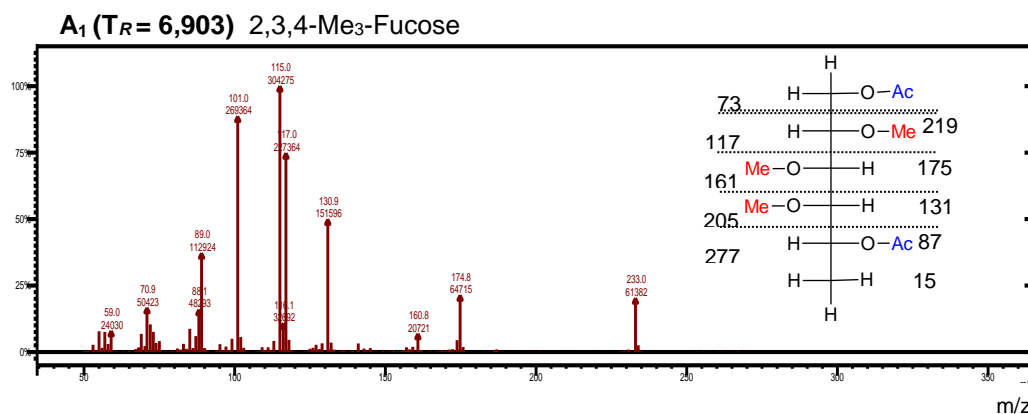
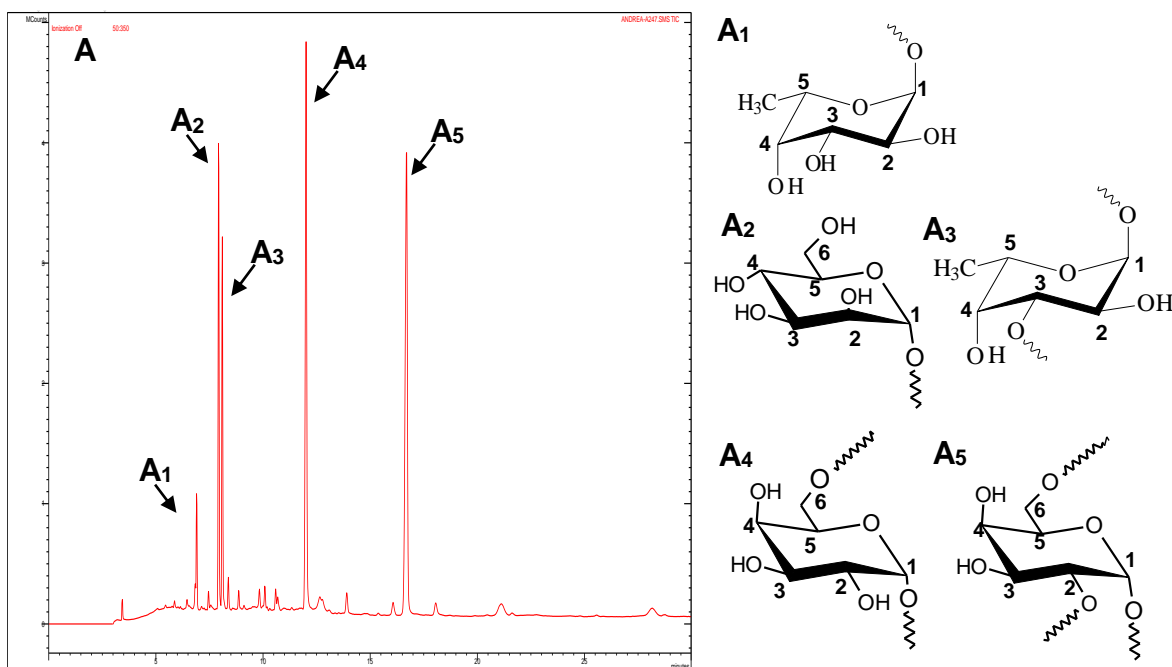
FIGURA 4.11 - Perfis de eluição das frações obtidas a partir do extrato aquoso dos basidiomas de *G. frondosa* em cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: —) e índice de refração (IR: —) (HPSEC-MALLS)

Com a finalidade de purificar esta fração, a mesma foi tratada com solução de Fehling por três vezes sequenciais, originando um precipitado (PF₃-*Gf*, 151 mg), o qual foi purificado por diálise em membranas de MWCO de 500 kDa.

A fração eluída (QEPF-*Gf*, 104 mg) foi homogênea quando analisada por HPSEC-MALLS (Figura 4.11, p. 41), apresentando massa molar média de (M_w) $15,9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ ($dn/dc = 0,147 \text{ mL.g}^{-1}$), composta por fucose

(20%), manose (10%), 3-*O*-metil-galactose (7%) e galactose (63%) como componentes monossacarídeos, sugerindo a presença de uma manufucogalactana.

O tipo de ligação glicosídica, deste polímero, foi evidenciado pela análise de metilação (CIUCANU; KEREK, 1984). Com base nos derivados parcialmente *O*-metilados, o heteropolissacarídeo apresenta uma estrutura ramificada, contendo, principalmente, terminais não redutores de Fucp (2,3,4-Me₃-Fuc) e Manp (2,3,4,6-Me₄-Man), unidades de Galp 6-*O*- e 2,6-di-*O*-substituídas (3,4,6-Me₃-Gal e 3,4-Me₂-Gal, respectivamente) e Fucp 3-*O*-substituídas (Tabela 4.6, p. 44; Figura 4.12, p. 42).



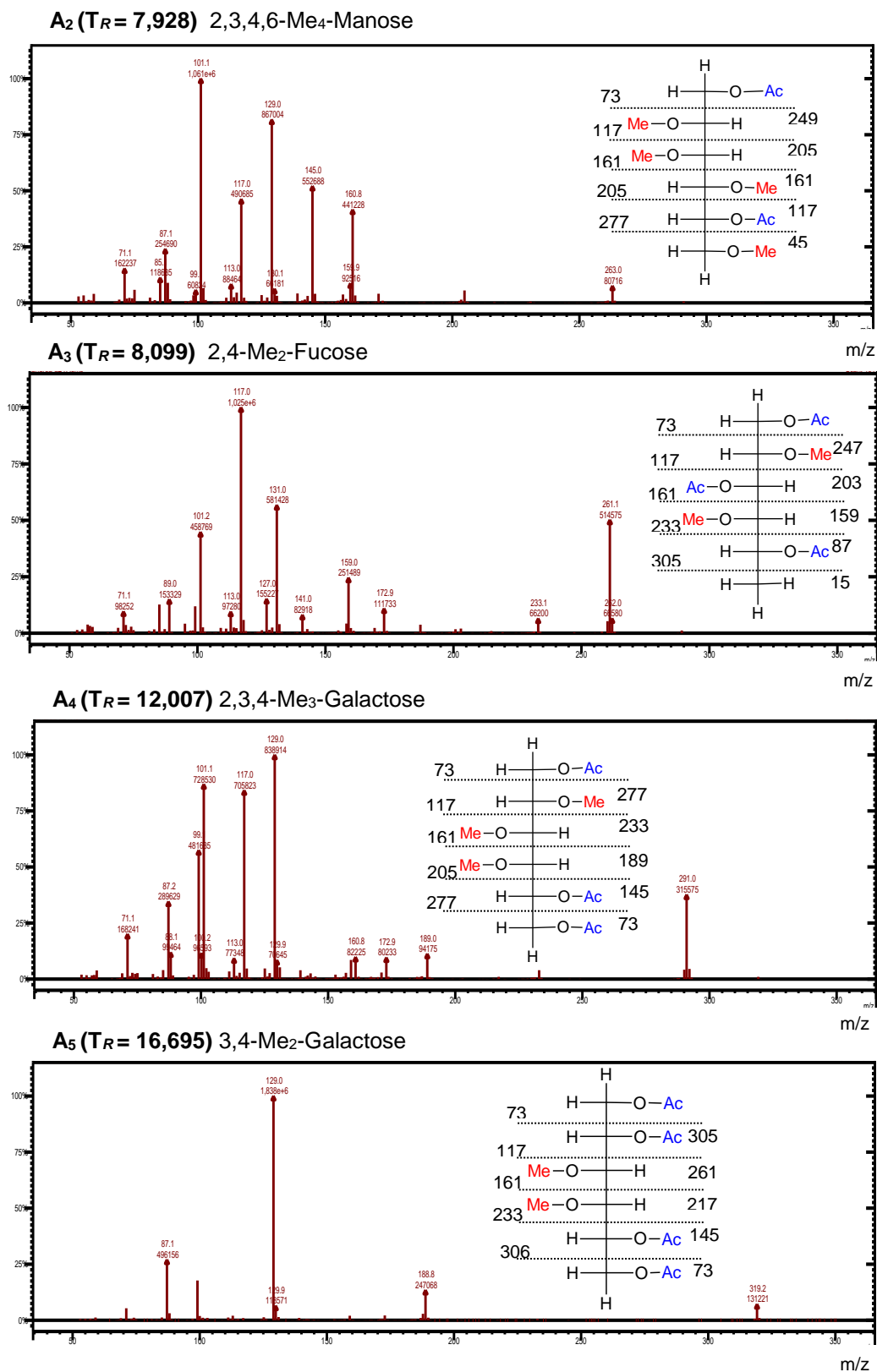


FIGURA 4.12 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃-Fuc; A₂: 2,3,4,6-Me₄-Man; A₃: 2,4-Me₂-Fuc; A₄: 2,3,4-Me₃-Gal; A₅: 3,4-Me₂-Gal) obtidos após derivatização química (metilação) da fração QEPF-Gf

TABELA 4.6 – Análise por metilação da fração QEPF-*Gf* isolada dos basidiomas de *G. frondosa*

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ^a	T _R ^b	mol %	Tipo de ligação ^c
2,3,4-Me ₃ -Fuc	6,903	3,8	Fuc ρ -(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Man	7,928	16,6	Man ρ -(1→
2,4-Me ₂ -Fuc	8,099	13,3	→3)-Fuc ρ -(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal	12,007	29,2	→6)-Gal ρ -(1→
3,4-Me ₂ -Gal	16,695	37,1	→2,6)-Gal ρ -(1→

^a Analisado em CG-EM (coluna DB 225) após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaBD₄) e acetilação.

^b Tempo de retenção (minutos).

^c Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

Análises espectroscópicas [RMN de ¹H, RMN de ¹³C (Figura 4.13, p. 45), HSQC (Figura 4.14-A, p. 45), HSQC-DEPT (Figura 4.14-B, p. 45), COSY (Figura 4.15, p. 46), HSQC-TOCSY (Figura 4.16, p. 46; Tabela 4.7, p. 48), TOCSY e HSQC acoplado] foram fundamentais para elucidar a estrutura da heterogalactana (fração QEPF-*Gf*), sendo através do acoplamento de prótons, observados nos espectros COSY (Figura 4.13, p. 45) e TOCSY, assinalados seus respectivos carbonos no HSQC (Figura 4.12-A, p. 42; Tabela 4.8, p. 48). Estes foram confirmados pelas correlações ¹³C/¹H observadas no espectro de HSQC-TOCSY (Figura 4.7, p. 48).

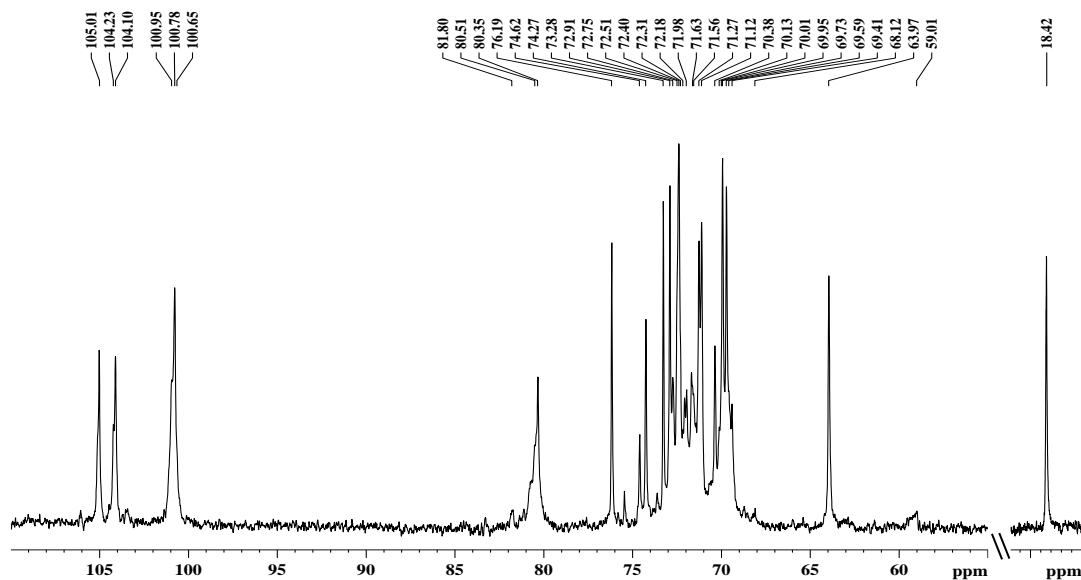
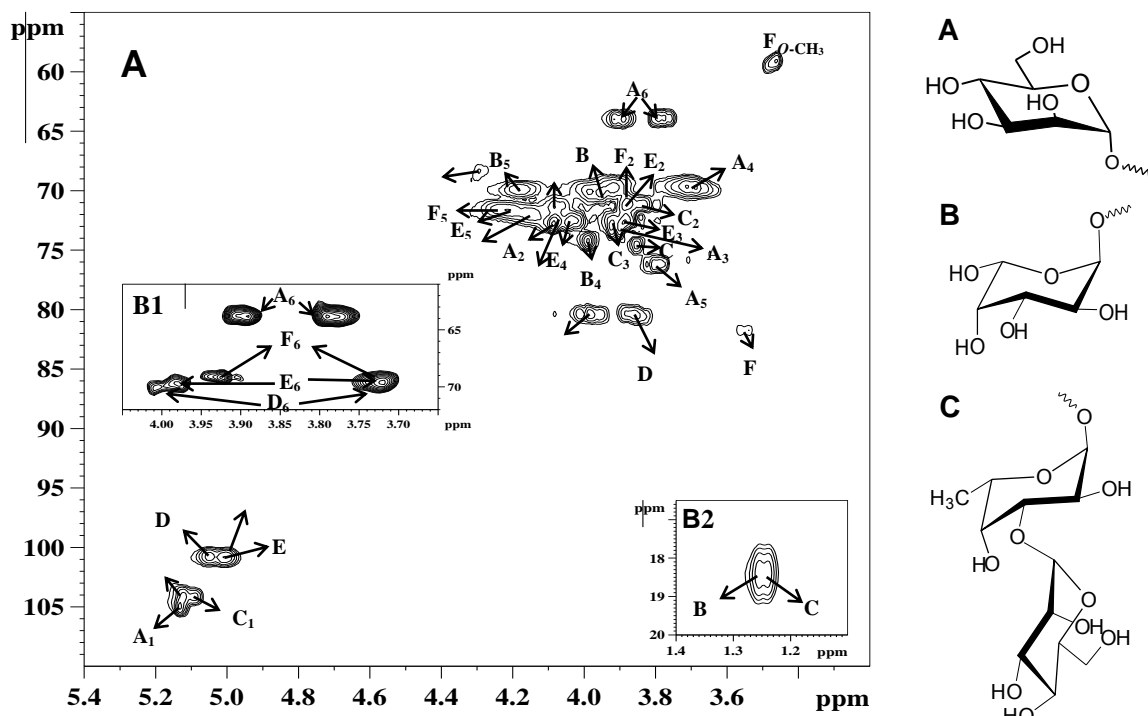


FIGURA 4.13 – Espectro de RMN de ^{13}C da manufucogalactana (fração QEPF-Gf) de *G. frondosa*, analisada em D_2O a 50°C



A= terminal não redutor de $\alpha\text{-Manp}$; B = terminal não redutor de $\alpha\text{-Fucp}$; C = $\alpha\text{-Fucp}$ substituída em O-3 por $\alpha\text{-Manp}$; D = $\alpha\text{-Galp}$ 2,6-di-O- substituída; E = $\alpha\text{-Galp}$ 6-O- substituída; F = 3-O-Me- $\alpha\text{-Galp}$ 6-O- substituída.

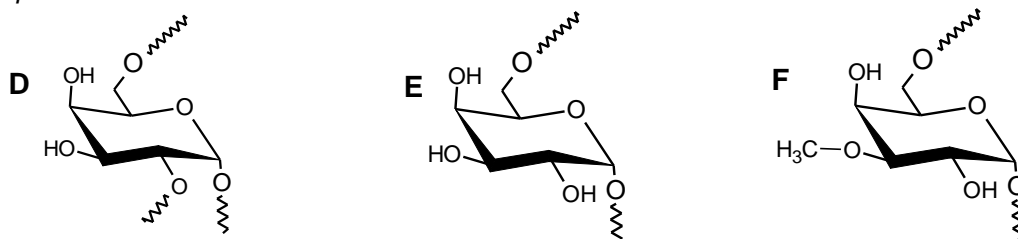


FIGURA 4.14 – Espectro de HSQC da manufucogalactana de *G. frondosa* (A), analisada em D_2O a 50°C , com insertos ampliados da região de C-6 de Manp (B1) e de Fucp (B2) obtidos do HSQC-DEPT

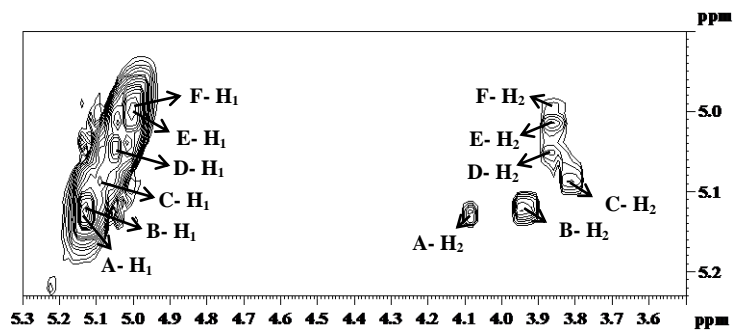


FIGURA 4.15 – Espectro de COSY da fração QEPF-*Gf* obtida dos basidiomas de *G. frondosa*, analisada em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$

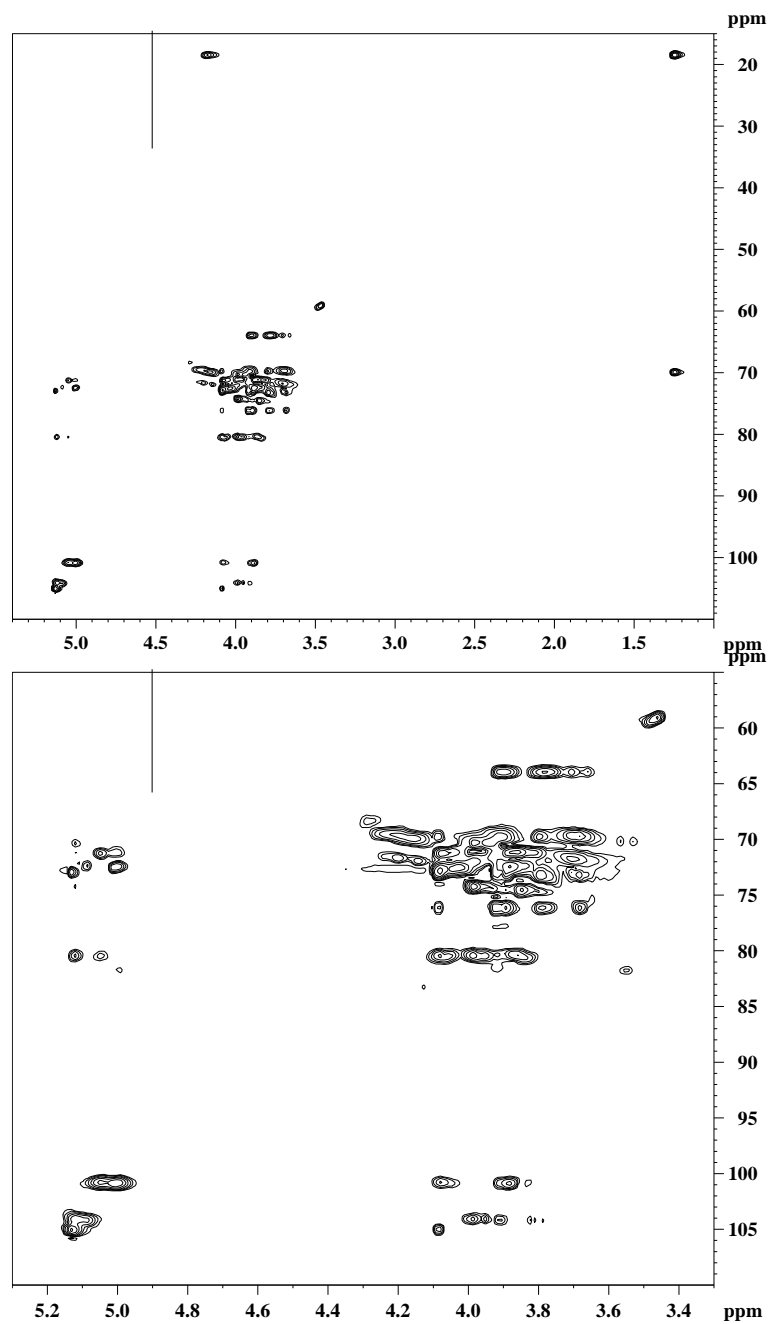


FIGURA 4.16 – Espectro de HSQC-TOCSY da fração QEPF-*Gf* de *G. frondosa*, analisada em D_2O a $50\text{ }^\circ\text{C}$

O espectro de RMN de ^1H apresentou seis sinais principais na região anomérica em δ 5,13, 5,12, 5,09, 5,05, 5,00 e 4,99. Os monossacarídeos foram designados como A, B, C, D, E e F, de acordo com o valor decrescente de deslocamento químico, os quais foram atribuídos aos terminais não redutores de Manp (δ 5,13) e Fucp (δ 5,09), às unidades de Fucp 3-O-substituídas (δ 5,12), 3-O-Me-Galp 6-O-substituídas (δ 4,99) e 6-O- (δ 5,00) e 2,6-di-O-substituídas Galp (δ 5,05).

O espectro de HSQC (Figura 4.14, p. 45) apresentou sinais de C-1/H-1 em δ 105,01/5,13, 104,23/5,09 e 104,10/5,12 correspondentes aos terminais não redutores de Manp e Fucp e às unidades de Fucp 3-O-substituídas, respectivamente. Os sinais (C1/H1) na região anomérica em δ 100,78/5,05 e 100,95/5,00 foram atribuídos às unidades de Galp 6-O- e 2,6-di-O-substituídas, respectivamente, e aquele em δ 100,65/4,99 às unidades de 3-O-Me-Galp 6-O-substituídas. Todas as unidades apresentaram α -configuração devido ao valor da $J_{\text{C-1,H-1}} = 171,6$ Hz encontrada no espectro de HSQC acoplado (PERLIN; CASU, 1969).

A análise de metilação indicou a presença de unidades substituídas em O-3, O-6 e O-2,6 (Tabela 4.6, p. 44), sendo estas confirmadas por meio de análises espectroscópicas. Sinais de C-3 O-substituídos das unidades de Fucp foram assinalados em δ 80,3 (Figuras 4.13, p. 45; Figura 4.14, p. 45) e os grupos $-\text{CH}_2$ substituídos das unidades de Galp e 3-O-Me-Galp 6-O-ligadas e às unidades de Galp 2,6-di-O-substituídas da cadeia principal em δ 69,4 e 69,7, respectivamente, sendo estes confirmados por inversão no espectro de HSQC-DEPT (Figura 4.14 – B, p. 45).

A presença e a posição dos grupos O-metil do heteropolissacarídeo foram confirmados pelos sinais (C/H) em δ 59,03/3,46 e δ 81,80/3,56 correspondentes ao $-\text{O}-\text{CH}_3$ e ao C-3/H-3 O-substituídos, respectivamente (Figura 4.14, p. 45 e Tabela 4.8, p. 48).

Os sinais em δ 72,90/4,09, 73,28/3,92, 69,73/3,69, 76,19/3,80 e 63,97/3,78;3,90 referem-se ao C-2/H-2 a C-6/H-6 das unidades de β -Manp, respectivamente, enquanto aqueles em δ 71,12/3,83, 72,31/3,91, 74,62/3,85, 71,98/4,14 e 18,42/1,24 correspondem ao C-2/H-2 a C-6/H-6 de terminais não redutores de α -Fucp.

TABELA 4.7 – Principais correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ observadas no espectro de HSQC-TOCSY da heterogalactana (fração QEPF-Gf) obtida de *G. frondosa*

UNIDADES	H/C $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$	Correlações
		$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ (Átomo)
$\alpha\text{-D-Manp(1}\rightarrow$ (Resíduo A)	H1 (5,13)	105,01 (C1); 72,90 (C2); 4,09 (H2)
	H2 (4,09)	76,19 (C5); 69,73 (C4)
	C5 (76,19)	3,78/3,90 (H6a/b); 3,92 (H3); 3,69 (H4); 3,80 (H5)
$\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Fucp(1}\rightarrow$ (Resíduo B)	H1 (5,12)	104,10 (C1); 70,38 (C2); 80,35 (C3); 74,27 (C4)
	H6 (1,25)	18,42 (C6); 69,95 (C5); 4,18 (H5)
	H4 (3,99)	70,38 (C2)
$\alpha\text{-L-Fucp(1}\rightarrow$ (Resíduo C)	H1 (5,09)	104,23 (C1); 74,62 (C4); 72,31 (C-3); 3,82 (H2); 3,91 (H3); 3,85 (H4)
	H4 (3,85)	74,62 (C4); 72,31 (C3)
	C3 (72,31)	3,91 (H3)
$\rightarrow\text{2,6)-}\alpha\text{-D-Galp(1}\rightarrow$ (Resíduo D)	H1 (5,05)	100,78 (C1); 80,50 (C2); 72,75 (C4); 71,27 (C3)
	C2 (80,50)	4,08 (H3); 4,07 (H4); 3,87 (H2)
$\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Galp(1}\rightarrow$ (Resíduo E)	H1 (5,00)	100,95 (C1); 72,51 (C4); 72,40 (C3); 71,12 (C2)
	H4 (4,04)	100,95 (C1); 72,51 (C4); 71,12 (C2)
	H5 (4,20)	71,63 (C5); 69,59 (C6)
$\rightarrow\text{6)-3-O-Me-}\alpha\text{-D-Galp(1}\rightarrow$ (Resíduo F)	H3 (3,56)	100,65 (C1); 81,80 (C3); 70,13 (C2)
	H4 (4,29)	70,13 (C2)
	H5 (4,24)	71,56 (C5); 69,41 (C6)

TABELA 4.8 - Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da heterogalactana isolada de *G. frondosa*^a

UNIDADES		1	2	3	4	5	6		-O-CH ₃
							6a	6b	
$\alpha\text{-Manp(1}\rightarrow$ (Resíduo A)	^{13}C	105,01	72,90	73,28	69,73	76,19	63,97	-	-
	^1H	5,13	4,09	3,92	3,69	3,80	3,78	3,90	-
$\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-Fucp(1}\rightarrow$ (Resíduo B)	^{13}C	104,10	70,38	80,35	74,27	69,95	18,42	-	-
	^1H	5,12	3,95	3,98	3,99	4,18	1,25	-	-
$\alpha\text{-Fucp(1}\rightarrow$ (Resíduo C)	^{13}C	104,23	71,12	72,31	74,62	69,95	18,42	-	-
	^1H	5,09	3,83	3,91	3,85	4,18	1,24	-	-
$\rightarrow\text{2,6)-}\alpha\text{-Galp(1}\rightarrow$ (Resíduo D)	^{13}C	100,78	80,50	71,27	72,75	71,98	70,00	-	-
	^1H	5,05	3,87	4,08	4,07	4,14	3,73	4,00	-
$\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-Galp(1}\rightarrow$ (Resíduo E)	^{13}C	100,95	71,12	72,40	72,51	71,63	69,59	-	-
	^1H	5,00	3,86	3,89	4,04	4,20	3,72	3,98	-
$\rightarrow\text{6)-3-O-Me-}\alpha\text{-Galp(1}\rightarrow$ (Resíduo F)	^{13}C	100,65	70,13	81,80	68,12	71,56	69,41	-	59,01
	^1H	4,99	3,86	3,56	4,29	4,24	3,71	3,92	3,46

^a Os assinalamentos foram realizados de acordo com os resultados obtidos através das seguintes análises espectroscópicas: RMN de ^{13}C , RMN de ^1H , HSQC, HSQC-DEPT, COSY, HSQC-TOCSY

De acordo com as análises realizadas, a fração QEPF-*Gf* mostrou ser uma manufucogalactana ramificada, contendo uma cadeia principal composta por unidades de α -D-galactopiranosil (A), parcialmente, substituídas em O-3 por grupos metil (B) ou em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil (C) e em uma menor proporção por terminais não redutores de α -L-Fucp (D) (Figura 4.17). Entretanto, a presença de baixos teores de terminais não redutores de α -D-Manp não foi excluída devido a possível sobreposição de sinais nos espectros de RMN.

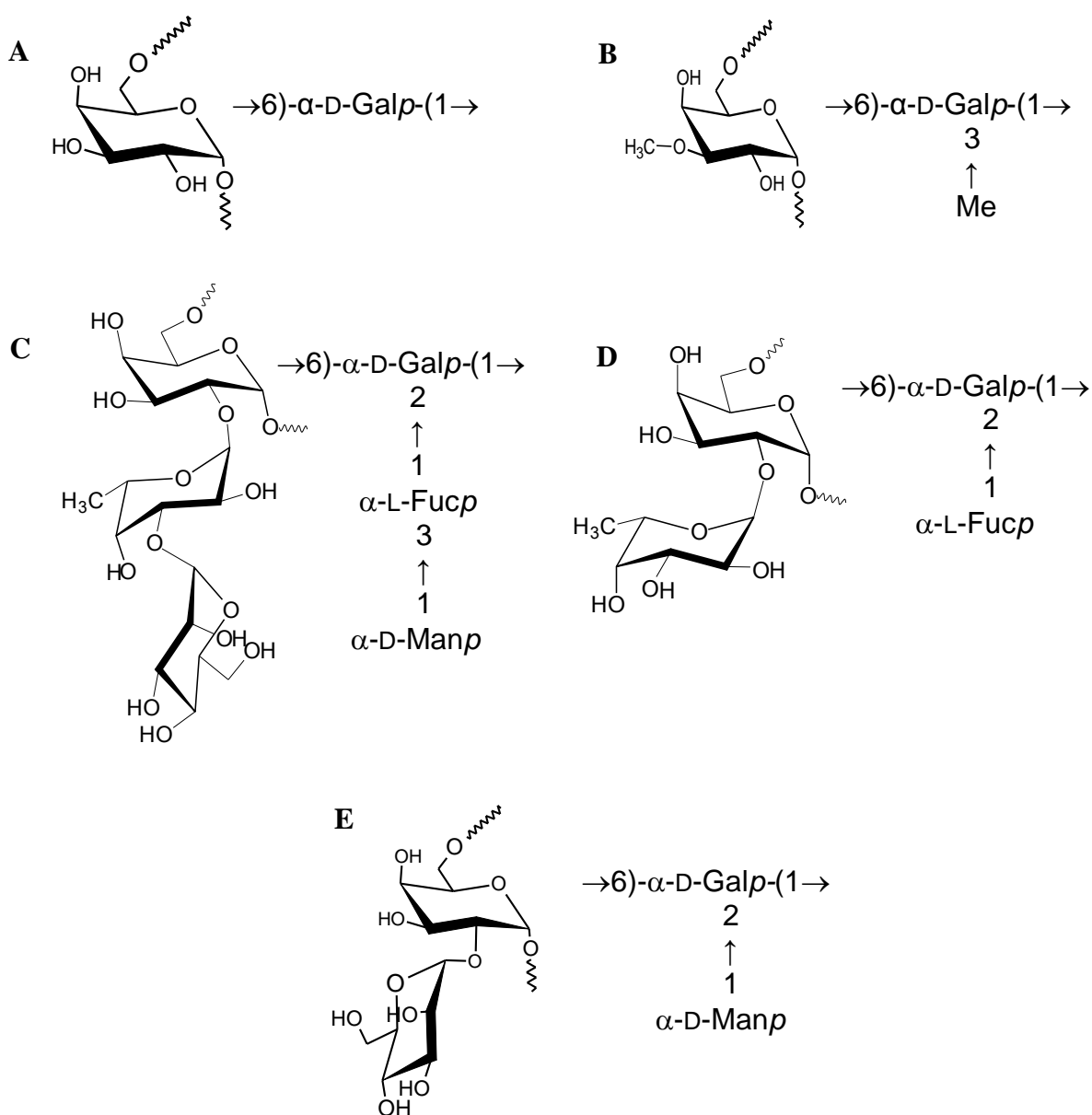


FIGURA 4.17 – Principais estruturas observadas na manufucogalactana isolada dos basidiomas de *G. frondosa*

Diversas heterogalactanas de basidiomicetos têm sido isoladas e caracterizadas, sendo a maioria constituída por uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp (1 \rightarrow 6)- ligadas, as quais se encontram, parcialmente, substituídas em O-2 por diferentes cadeias laterais. Estas são denominadas de fucogalactanas, manogalactanas, manofucogalactanas ou fucomanogalactanas, de acordo com o tipo de cadeia lateral, podendo ser unidades de α -L-Fucp, α - ou β -D-Manp e β -D-Galp e o dissacarídeo 3-O- α/β -D-manopiranosil- α -D-fucopiranosil.

Polissacarídeos similares à manofucogalactana encontrada na fração QEPF-Gf tem sido previamente descrita para *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI et al., 2004), *Fomitella fraxinea* (CHO et al., 1998, 2011), *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1977; SMIDERLE et al., 2008a), *Polyporus pinicola* (FRASER; KARACSONY; LINDBERG 1967), *Polyporus fomentarius* (BJÖRNAL; LINDBERG, 1968), *Polyporus giganteus* (BHAVANANDAN; BOUVENG; LINDBERG, 1964), *Polyporus squamosus* (BJÖRNDAL; WAGSTROM, 1969). Entretanto, nenhuma destas heterogalactanas tem 3-O-Me-Galp em sua estrutura, diferente do que foi observado neste estudo. A presença do derivado 3-O-Me-Galp tem sido somente encontrado em fucogalactanas, como aquelas obtidas de *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (KOMURA et al., 2010) e *Agaricus bisporus* (RUTHES et al., 2012, 2013), e nas manogalactanas de *Pleurotus* spp.: *P. pulmonarius* (SMIDERLE et al., 2008b), *P. ostreatus* (JAKOVLEVIĆ et al., 1998), *P. ostreatoroseus* e *P. ostreatus* var. *florida* (ROSADO et al., 2003) e *P. geesteranus* (ZHANG et al., 2013).

5 - CONCLUSÃO

A partir dos basidiomas de *P. ostreatus* e *G. frondosa* foram isoladas diferentes heterogalactanas parcialmente metiladas. Ambas apresentaram o mesmo tipo de cadeia principal, diferenciando em relação ao teor de grupos metil e as cadeias laterais. A heterogalactana isolada de *P. ostreatus* apresentou apenas terminais não redutores de β -D-Man_p como cadeias laterais, enquanto que a isolada de *G. frondosa* continha terminais não redutores de α -L-Fuc_p e o dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil, sendo estas denominadas de manogalactana e manofucogalactana, respectivamente.

Levando em consideração as propriedades medicinais destes basidiomicetos e aos efeitos biológicos atribuídos a esta classe de moléculas, as heterogalactanas isoladas neste trabalho podem apresentar-se como bons candidatos a serem avaliados quanto ao seu potencial biológico, especialmente em relação aos efeitos antitumoral, imunomodulatório, antinociceptivo e/ou anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: JOHN WILEY & SONS, Inc., 1996.
- ALQUINI, G.; CARBONERO, E.R.; ROSADO, F.R.; COSENTINO, C. & IACOMINI, M. "Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr". *FEMS Microbiol. Lett.*, 230: 47, **2004**.
- AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H. & LINDBERG, B. "Structure of the fucoxylomannan from *Polyporus pinicola* (Fr.)". *Acta Chem. Scand.*, 23: 1597, **1969**.
- AXELSSON, K. & BJÖRNDAL, H. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus ovinus* (Schaeff.)". *Acta Chem. Scand.*, 23: 1815-1842, **1969**.
- AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; SVENSSON, S. & HAMMARSTRÖM, S. "Polysaccharides elaborated by *Fomes annosus* (Fr.) Cooke". *Acta Chem. Scand.*, 25: 3645, **1971**.
- BHAVANANDAN, V.P.; BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. "Polysaccharides from *Polyporus giganteus*". *Acta Chem. Scand.*, 18: 504, **1964**.
- BJÖRNDAL, H. & LINDBERG, B. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.)". *Carbohydr. Res.*, 10: 79, **1968**.
- BJÖRNDAL, H. & WAGSTROM, B. "A heterogalactan elaborated by *Polyporus squamosus* (Huds.)". *Acta Chem. Scand.*, 23: 3313, **1969**.
- BOH, B. & BEROVIC, M. "*Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S. F. Gray (Maitake mushroom): medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation". *Int. J. Med. Mushrooms*, 9: 89, **2007**.
- BORCHERS, A.T.; STERN, J.S.; HACKMAN, R.M.; KEEN, C.L. & GERSHWIN, M. E. "Mushrooms, tumors and immunity". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 221: 281, **1999**.
- BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L. & GERSHWIN, M.E. "Mushrooms, tumors, and immunity: an update". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 229: 393, **2004**.
- CARBONERO, E.R. Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes Fotobiontes. Curitiba, Programa de pós-Graduação em ciências Biológicas – UFPR, 2005. Tese de doutorado, 120 p.
- CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; KOMURA, D.L.; MARCON, R.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.R.S.; TORRI, G.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "*Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects". *Food Chem.*, 111: 531, **2008**.

CARBONERO, E.R.; RUTHES, A.C.; FREITAS, C.S.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; SILVA, E.V.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*". *Carbohydr. Polym.*, 90: 814, **2012**.

CHANG, S.T. & MILES, P.G. Mushroom biology – a new discipline. *Mycologist*, 6: 64, **1992**.

CHO, S.; KOSHINO, H.; YU, S. & YOO, I. "A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.)". *Carbohydr. Polym.*, 37: 13, **1998**.

CHO, S.; YUN, B.; YOO, I. & KOSHINO, H. "Structure of fomitellan A, a mannofucogalactan from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*". *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 21: 204, **2011**.

CIUCANU, I. & KEREK, F. "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates". *Carbohydr. Polym.*, 131: 209, **1984**.

CROAN, S.C. "Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms". *Forest Prod. J.*, 54: 68, **2004**.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.T. & FANG, J.N. "Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr". *Carbohydr. Res.*, 337: 1417, **2002**.

FRASER, R. N.; KARACSONYI, S. & LINDBERG, B. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus pinicola* (Fr.)". *Acta Chem. Scand.*, 21: 1783, **1967**.

FRASER, R. N. & LINDBERG, B. "Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (TRICHOLOMATACEAE)". *Carbohydr. Res.*, 4: 12, **1967**.

Fungal Databases Nomenclature and Species Banks. International Mycological Association. <[http:// www.mycobank.org/](http://www.mycobank.org/)>. Acesso em: 26/06/2013.

GAO, Y.; LAN, J.; DAI, X.; YE, J. & ZHOU, S.H. "A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) extract in patients with type II diabetes mellitus". *Intern. J. Med. Mushrooms*, 6: 96, **2004**.

GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*". *Carbohydr. Res.*, 128: 119-132, **1984**.

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

GU, C.Q.; LI, J.W.; CHAO, F.; JIN, M.; WANG, X.W. & SHEN, Z.Q. "Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*". *Antiviral Res.*, 75: 250, **2007**.

GUZMÁN, G. "Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses". *Intern. J. Med. Mushrooms*, 2: 95, **2000**.

HAY, G.W.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. "Periodation of polysaccharides: general procedures". *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5: 357, **1965**.

JAKOVLEVIĆ, D.; MILJKOVIĆ-STOJANOVIĆ, J.; RADULOVIĆ, M. & HRANISAVLJEVIĆ-JAKOVLEVIĆ, M. "On the mannogalactan from the fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quél". *J. Serb. Chem. Soc.*, 63: 137, **1998**.

JONES, J.K.N. & STOODLEY, R.J. "Fractionation using copper complexes." *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5: 36, **1965**.

KARÁCSONYI, S. & KUNIAK, L. "Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan". *Carbohydr. Polym.*, 24: 107, **1994**.

KATO, K.; INAGAKI, T.; SHIBAGAKI, H.; YAMAUCHI, R. & OKUDA, K. "Structural analysis of the β -D-glucan extracted with aqueous zinc chloride from the fruit body *Grifola frondosa*". *Carbohydr. Res.*, 123: 259, **1983**.

KOMURA, D.L., CARBONERO, E.R., GRACHER, A.H., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARCON, R., SANTOS, A.R.S., GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties". *Bioresour. Technol.*, 101: 6192, **2010**.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J. & JULICH, W.D. "The pharmacological potential of mushrooms". *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2: 285, **2005**.

LO, H.; TSAI, F.; WASSER, S.P.; YANG, J. & HUANG, B. "Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Rets.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats". *Life Sciences*, 78: 1957, **2006**.

MAITY, K.K.; PATRA, S.; DEY, B.; BHUNIA, S.K.; MANDAL, S.; DAS, D.; MAJUMDAR, D.K.; MAITI, S.; MAITI, T.K. & ISLAM, S.S. "A heteropolysaccharide from aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus ostreatus* cultivar: structural and biological studies". *Carbohydr. Res.*, 346: 366, **2006**.

MAKI, C.S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de Cacao (*Theobroma cacao* L.). Piracicaba, Programa de pós-graduação em Agronomia – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006. Tese de doutorado, 128 p.

MAYELL, M. "Maitake extracts and their therapeutic potential". *Altern. Med. Rev.*, 6: 48, **2001**.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N. & KUBOYAMA, R. "Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from *Maitake*, *Grifola frondosa*". *Agric. Biol. Chem.*, 50: 1679, **1986**.

MIZUNO, T. "A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi". *Foods Ingrid. J. Japan*, 167: 69, **1996**.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H. & TSUCHIDA, H. "Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei MURRILL*". *Biochem. Mol. Biol. Inter.*, 47: 707, **1999**.

MUKUMOTO, T. & YAMAGUCHI, H. "The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing". *Carbohydr. Res.*, 59: 614, **1977**.

PERLIN, A.S. & CASU, B. "Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C". *Tetrahedron Lett.*, 34: 2919, **1969**.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2004.

PUTZKE, J. & WARTCHOW, F. Lista de espécies de Pluteaceae (Agaricales) que ocorrem no Brasil. *Biociências*, 16: 110, **2008**.

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.*, 221: 119, **2003**.

RUTHES, A.C.; RATTMANN, Y.D.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J., & IACOMINI, M. "Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*". *Carbohydr. Polym.*, 87: 1620, **2012**.

RUTHES, A.C.; RATTMANN, Y.D.; MALQUEVICZ-PAIVA, S.M.; CARBONERO, E.R.; CÓRDOVA, M.M.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.E.S.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "Agaricus bisporus fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches". *Carbohydr. Polym.*, 92: 184, **2013**.

SANZ, M.L. & MARTÍNEZ-CASTRO, I. "Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates". *J. Chromatography A*, 1153: 74, **2007**.

SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S.K.; MALLICK, S.K. & MAITI, T.K. "Anti-tumor and immunomodulating effects os *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans". *Intern. Immunopharmacol.*, 6: 1287, **2006**.

SMIDERLE, F.R.; CARBONERO, E.R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes*". *Food Chem.*, 108: 329, **2008a**.

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

SILVA, S.O.; COSTA, S.M.G. & CLEMENTE, E. "Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., substrates and residue after cultivation". *Braz. Arc. Biol. Tech.*, 45: 531, **2002**.

STORTZ, C.A.; CASES, M.R. & CERREZO, A.S. "The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*". *Carbohydr. Polym.*, 34: 61, **1997**.

SUN, Y. & LIU, J. "Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*". *Biores. Technol.*, 100: 983, **2009**.

SVAGELJ, M.; BEROVIC, M.; BOH, B.; MENARD, A.; SIMCIC, S. & WRABER, B. "Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr) S.F. Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra and extracellular β -polysaccharides". *New Biotechnol.*, 25: 150, **2008**.

TADA, R.; ADACHI, Y.; ISHIBASHI, K. & OHNO, N. "An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments". *Carbohydr. Res.*, 344: 400, **2009**.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D. & SUN, X. "Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*". *Biores. Technol.*, 100: 1682, **2009**.

TZIANANBOS, A.O. "Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function". *Clin. Microb. Rev.*, 13: 523, **2000**.

USUI, T.; IWASAKI, Y. & MIZUNO, T. "Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* by employing a column of concanavalin a-sepharose 4B". *Carbohydr. Res.*, 92: 103, **1981**.

VAMANU, E. "Biological Activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms". *J. Biom. Biotechnol.*, 12: 1, **2012**.

WANG, Z.; LUO, D. & LIANG, Z. "Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers". *Carbohydr. Polym.*, 57: 241, **2004**.

WANG, H.; GAO, J. & NG, T.B. "A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275: 810, **2000**.

WASSER, S.P. & WEIS, A.L. "Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives". *Intern. J. Med. Mushrooms*, 1: 31, **1999**.

WASSER, S.P. "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides". *App. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 258, **2002**.

WASSER, S.P. "Medicinal mushrooms science: history, current status, future trends, and unsolved problems". *Intern. J. Med. Mushrooms*, 12: 1, **2010**.

WASSER, S.P. "Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms". *App. Microbiol. Biotechnol.*, 89: 1323, **2011**.

WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. "Reduction with sodium borohydride". *Meth. Carbohyd. Chem.*, 2: 65, **1963a**.

WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. *Meth. Carbohyd. Chem.*, 2: 211, **1963b**.

YOSHIOKA, Y.; EMORI, M.; IKEKAWA, T. & FUKUOKA, F. "Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quél". *Carbohyd. Res.*, 43:305, **1975**.

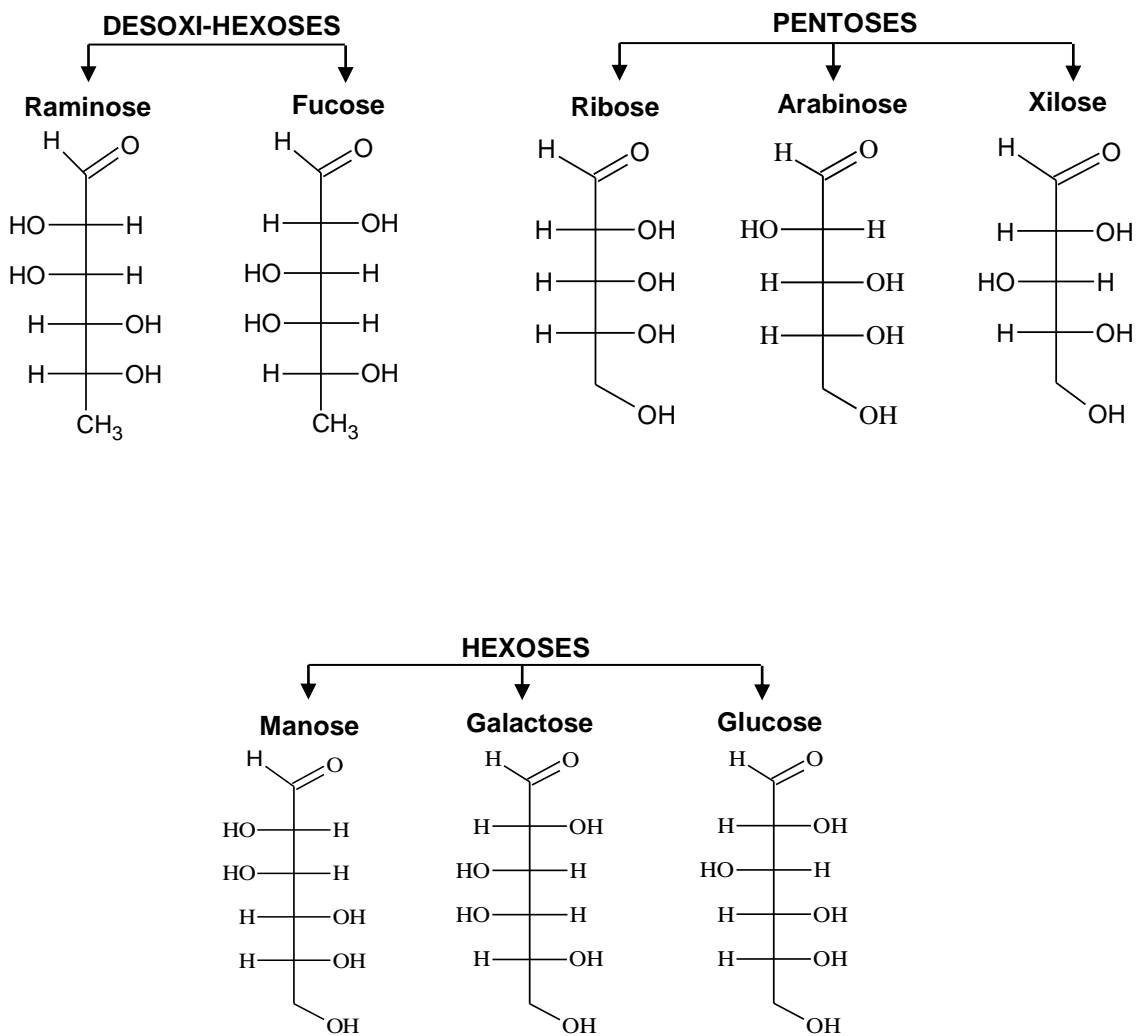
YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITÔ, H.; UEHARA, N. & FUKUOKA, F. "Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Quél.: Isolation and structure of a β -glucan". *Carbohyd. Res.*, 140: 93, **1985**.

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.*, 18: 4, **2007**.

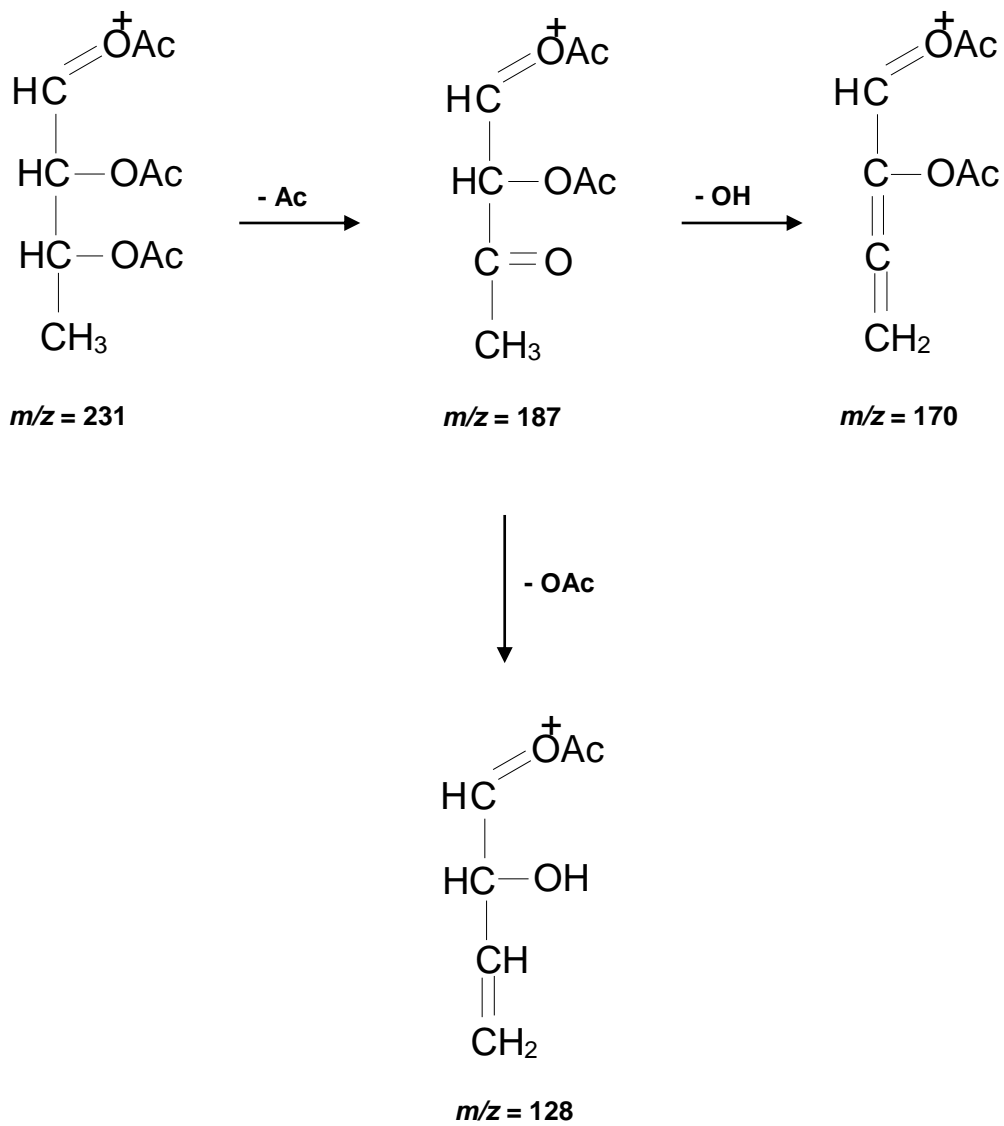
ZHANG, A.Q.; XU, M.; FU, L. & SUN, P.L. "Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*". *Carbohyd. Polym.*, 92: 236, **2013**.

APÊNDICE

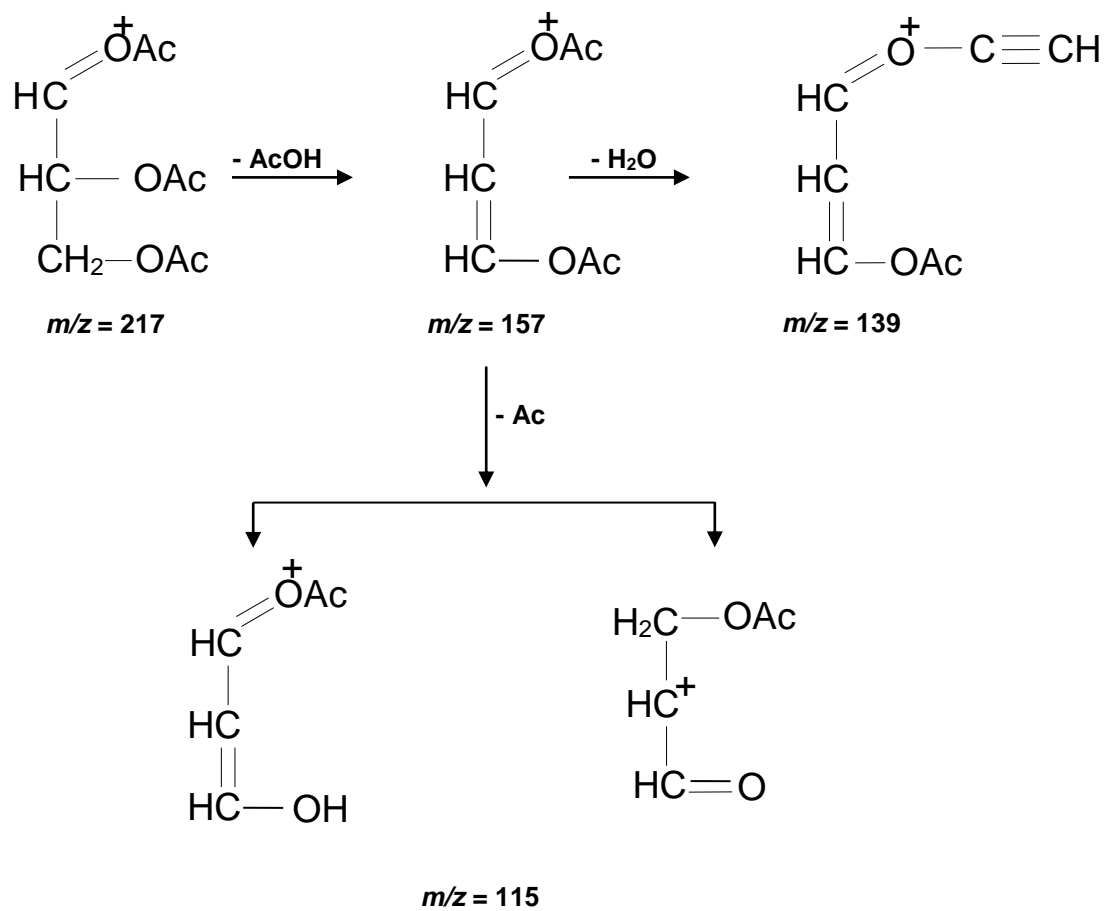
APÊNDICE 1 - Principais Monossacarídeos



APÊNDICE 2 - Principais fragmentos secundários dos acetatos de alditóis das desoxi-hexoses



APÊNDICE 3 - Principais fragmentos secundários dos acetatos de alditóis das hexoses



APÊNDICE 4 - Principais fragmentos secundários dos acetatos de alditóis parcialmente metilados

