

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RUBERNEY DA SILVA DE OLIVEIRA

Avaliação química de polissacarídeos e propriedades antimelanoma da heterogalactana proveniente do macrofungo *Hypsizygus marmoreus*

CATALÃO - GO

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

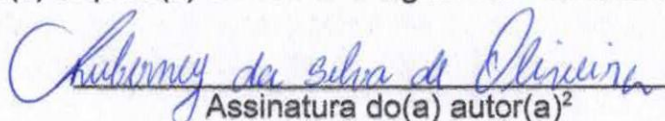
Nome completo do autor: Ruberney da Silva de Oliveira

Título do trabalho: **Avaliação química de polissacarídeos e propriedades antmetanoma da heterogalactana proveniente do macrofungo *Hypsizygus marmoreus***


3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 13 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Avaliação química de polissacarídeos e propriedades antimelanoma da heterogalactana proveniente do macrofungo *Hypsizygus marmoreus*

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

Área de concentração: Química. Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elaine R. Carbonero.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

DA SILVA DE OLIVEIRA, RUBERNEY

Avaliação química de polissacarídeos e propriedades antimelanoma da heterogalactana proveniente do macrofungo *Hypsizygus marmoreus* [manuscrito] / RUBERNEY DA SILVA DE OLIVEIRA. - 2019.

C, 100 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Elaine Rosecherer Carbonero.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Química, Catalão, 2019.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Hypsizygus marmoreus*. 2. Macrofungo. 3. polissacarídeos. 4. caracterização estrutural. 5. atividade antitumoral. I. Rosecherer Carbonero, Elaine, orient. II. Título.

CDU 54

Relatório de Defesa de Dissertação
 Candidato(a): **Ruberney da Silva de Oliveira**

Aos 28/02/2019 às 13:30 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: **“Avaliação química de polissacarídeos e propriedades antimelanoma da heterogalactana provenientes do macrofungo Hypsizygus marmoreus”** apresentada pelo candidato(a): **Ruberney da Silva de Oliveira**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	Função	Instituição
Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero	Presidente	UFG – Catalão
Profa. Dra. Lorena Ramos de Freitas	Titular	UFG – Catalão
Profa. Dra. Maria Carolina Di-Medeiros Leal	Titular	(UFG-Samambaia)

Resultado Final: APROVADA.

Parecer da Comissão Julgadora:

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu João Pedro Rocha de Carvalho, representante do Programa de Pós-Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Profa. Dra. Lorena Ramos de Freitas

Profa. Dra. Maria Carolina Di-Medeiros Leal

Representante do PPG João Pedro Rocha de Carvalho
 Assistente em Administração

Não houve alteração no título.

Houve. O novo título passa a ser:

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todos os dias por me dar forças para lutar, pela esperança de alcançar e pela perseverança de continuar perseguindo este grande sonho. Por me guiar sempre pelos melhores caminhos, mesmo quando eu penso estar dando tudo errado, por me dar discernimento de lutar por minha vida profissional.

Aos meus pais Reniltom Ribeiro de Oliveira e Ivonete da Silva de Oliveira, por sempre lutarem por mim, que nunca me deixaram desistir dos meus objetivos, sempre me dando forças para continuar mesmo nos momentos difíceis.

Agradeço à Professora Elaine Rosechrer Carbonero, que me acolheu com paciência, dedicação e muita disposição, e com quem aprendi muito sobre a química e Bioquímica e também sobre a vida, trabalhando sempre com muito profissionalismo e ética, sinto por você uma enorme admiração.

Ao corpo docente e técnicos do Departamento de Química da UFG Regional Catalão. Em especial aos professores Dr. Lincoln L. Romualdo pelo auxílio com o CG-EM, à Profa. Dra. Richele P. Severino pelos ensinamentos em Química Orgânica, e à Profa. Dra. Lorena Ramos de Freitas pelos ensinamentos em Química Orgânica e Métodos Espectroscópicos (MECO).

À empresa Yuki Cogumelos (Proprietário: José Francisco Ramos F. Viana), Araçoiaba da Serra, SP, pelo fornecimento do cogumelo.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Moraes do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás pelas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e a Dra. Stellee Marcela Petris Biscaia, ambos do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

À CAPES pela bolsa concedida.

“Tente uma, duas, três vezes se possível tente a quarta a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz”

Bill Gates

RESUMO

Hypsizygus marmoreus, conhecido popularmente no Japão como “*Bunashimeji*”, é um cogumelo comestível altamente valorizado pelas suas propriedades medicinais. Diversos efeitos terapêuticos foram reportados para esta espécie tais como: imunomodulatório, antitumoral, antiviral, citotóxico, antifúngico, anti-hipertensivo, antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo, regulação da obesidade e da resistência à insulina, antiaterosclerótico, os quais têm sido atribuídos aos extratos brutos, frações e/ou compostos isolados (proteínas, lipídeos, polissacarídeos, oligopeptídeo e metabólitos secundário), obtidos dos basidiomas e/ou do micélio e filtrado provenientes do cultivo submerso. Tendo em vista a diversidade de polissacarídeos presentes em cada espécie fúngica, bem como a sua importância na modificação da resposta biológica, o cogumelo *H. marmoreus* encontra-se inexplorado nesta área, representando uma espécie importante a ser estudada. Para isto, foram realizadas as extrações aquosas e alcalinas para obter os extratos polissacarídicos, os quais foram purificados por congelamento/degelo e precipitação com solução de Fehling. A determinação estrutural foi realizada por espectroscopia de RMN, análise de composição monossacarídica e metilação por CG-EM e hidrólise parcial. A partir do extrato aquoso a frio foi isolado uma fucomanogalactana (fração *Hm*-PF₂AF, *Hm*-FMG; $M_w = 17.670$ Da) composta por uma cadeia principal de α -D-Galp ligada (1→6), parcialmente substituída em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp e β -Manp; uma α -glucana ramificada com ligações glicosídicas do tipo (1→4) e (1→6) (*Hm*-MRSF₂) com estrutura similar ao glicogênio e uma β -glucana ramificada, com cadeia principal de Glcp ligada em (1→3), substituída parcialmente em O-6 por terminais não redutores de β -Glcp (*Hm*-S₂AF). O fracionamento da fração solúvel em água fria obtida do extrato alcalino (*Hm*-SK) resultou em duas frações contendo glicogênio e uma β -glucana (*Hm*-SFK e *Hm*-PFK) distinta da citada anteriormente. Após eliminação do glicogênio por tratamento com amilase, as frações obtidas (*Hm*-TASFK e *Hm*-TAPFK, respectivamente) consistem, provavelmente, em β -glucanas ramificadas contendo uma cadeia principal constituída por β -Glcp ligadas (1→6), as quais se apresentam

parcialmente substituídas em O-3. Análises adicionais de caracterização estrutural (RMN 2D, metilação, degradação parcial de Smith, entre outras) deverão ser realizadas para confirmar a estrutura das β -glucanas isoladas e das demais frações obtidas neste estudo. Com a finalidade de comprovar os efeitos dos polissacarídeos como modificadores de resposta biológica, as frações purificadas (fucomanogalactana e β -glucanas) de *H. marmoreus* foram enviadas para avaliação da atividade, em colaboração com o Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e Dra. Stelée M. P. Biscaia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. Resultados preliminares da fucomanogalactana (*Hm-FMG*) demonstraram que a heterogalactana não foi citotóxica, nem alterou a morfologia celular, mas foi capaz de reprogramar as células de melanoma murino B16-F10, modificando a capacidade de formação de colônias e a migração celular, sem alterar a proliferação celular. Diante dos promissores efeitos antimelanoma *in vitro* do polissacarídeo *Hm-FMG*, pode-se sugerir que estes polímeros são responsáveis por parte das propriedades terapêuticas conferidas por este macrofungo. Para comprovar estes achados, ensaios adicionais deverão ser realizados para comprovar a possível ação antitumoral das demais frações purificadas, bem como o mecanismo de ação destes compostos.

Palavras-chave: *Hypsizygus marmoreus*, macrofungos, polissacarídeos, caracterização estrutural, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Hypsizygus marmoreus, popularly known as "Bunashimeji" in Japan, is an edible mushroom highly valued for its medicinal properties. Several therapeutic effects have been reported for this species as immunomodulatory, antitumor, antiviral, cytotoxic, antifungal, antihypertensive, antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative, regulation of obesity and insulin resistance, antiatherosclerotic, which have been attributed to crude extracts, fractions and/or isolated compounds (proteins, lipids, polysaccharides, oligopeptides and secondary metabolites) obtained from the basidiocarp and/or mycelium and filtered from the submerged culture. Considering the diversity of polysaccharides present in each fungal species, as well as their importance in modifying the biological response, the *H. marmoreus* mushroom is unexplored in this area, representing an important species to be studied. For this, the aqueous and alkaline extractions were performed to obtain the polysaccharide extracts, which were purified by freezing/thawing and precipitation with Fehling's solution. The structural determination was performed by NMR spectroscopy, monosaccharide composition analysis and methylation by GC-MS and partial hydrolysis. From the cold aqueous extract was isolated a fucomannogalactan (fraction *Hm*-PF2AF, *Hm*-FMG; $M_w = 17,670$ Da) contained α -(1 \rightarrow 6)-linked galactopyranosyl main chain, partially substituted at O-2 with non-reducing ends of α -L-Fucp and β -Manp; a branched α -glucan with glycosidic bonds of the type (1 \rightarrow 4) and (1 \rightarrow 6) (*Hm*-MRSF2) with a glycogen-like structure and a branched β -glucan with a Glcp-(1 \rightarrow 3)-linked backbone, partially substituted at O-6 by non-reducing ends of β -Glc p (*Hm*-S₂AF). Fractionation of the cold water soluble fraction obtained from the alkaline extract (*Hm*-SK) resulted in two fractions containing glycogen and a β -glucan (*Hm*-SFK and *Hm*-PFK) distinct from that previously mentioned. After elimination of glycogen by amylase treatment, the fractions obtained (*Hm*-TASFK and *Hm*-TAPFK, respectively) probably consist of branched β -glucans containing a main chain of β -Glc p (1 \rightarrow 6)-linked, which are partially substituted in O-3. Further analysis of structural characterization (2D NMR, methylation, partial degradation of Smith, among others) should be performed to confirm the structure of β -glucans isolated and other fractions

obtained in this study. In order to prove the effects of polysaccharides as biological response modifiers, the purified fractions (fucomannogalactan and β -glucans) of *H. marmoreus* were submitted to evaluation of the antitumoral activities, in collaboration with Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade and Dr. Stellee M. P. Biscaia from the Cell Biology Department of the Federal University of Paraná. Preliminary results of fucomannogalactan (*Hm*-FMG) demonstrated that heterogalactan was not cytotoxic, nor altered cell morphology, but was able to reprogram B16-F10 murine melanoma cells by modifying colony formation ability and cell migration, without changing cellular proliferation. In view of the promising in vitro antimelanoma effects of the *Hm*-FMG polysaccharide, it can be suggested that these polymers are responsible for part of the therapeutic properties conferred by this macrofungus. To confirm these findings, additional assays should be performed to prove the possible antitumor effects of purified fractions and the mechanism of action of these compounds.

Keywords: *Hypsizygus marmoreus*, macrofungi, polysaccharides, structural characterization, antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Figura esquemática da estrutura típica de um cogumelo	1
FIGURA 1.2 - Diversidade de corpos de frutificação dos macrofungos	2
FIGURA 1.3 - Os principais passos na formação de uma metástase	11
FIGURA 1.4 - Estimativa da incidência mundial padronizada por idade de melanoma cutâneo em homens e mulheres em 2012.....	13
FIGURA 1.5 - Basidiomas de <i>Hypsizygus marmoreus</i> (A : linhagem “marrom”; B : linhagem “branca”)	16
FIGURA 3.1 - Foto do macrofungo <i>H. marmoreus</i> (linhagem branca).....	23
FIGURA 3.2 - Esquema do processo de obtenção dos polissacarídeos de <i>H. marmoreus</i> , através de extrações aquosas e alcalinas.	27
FIGURA 3.3 - Esquema do fracionamento de polissacarídeos de <i>H. marmoreus</i> através da técnica de congelamento/degelo	28
FIGURA 3.4 - Esquema do fracionamento de polissacarídeos de <i>H. marmoreus</i> , por precipitação com sulfato de cobre em meio alcalino	29
FIGURA 3.5 - Esquema do fracionamento da fração <i>Hm-SF₂AF</i> obtida de <i>H. marmoreus</i> , por diálise em membrana	30
FIGURA 3.6 - Esquema do tratamento com amilase de frações polissacarídicas obtidas de <i>H. marmoreus</i>	30
FIGURA 3.7 - Representação esquemática da conversão de polissacarídeos em acetatos de alditóis.....	31
FIGURA 4.1 - Cromatogramas, obtidos por CG-EM, das frações <i>Hm-AF</i> , <i>Hm-AQ</i> e <i>Hm-K</i> isoladas do cogumelo <i>H. marmoreus</i>	42
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de ¹³ C da fração <i>Hm-S₂AF</i> , realizado em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70 °C (125 MHz).....	45
FIGURA 4.3 - Estrutura química das unidades monossacarídicas constituintes das β-glucanas (1→3) (1→6), comumente encontradas em macrofungos.	45
FIGURA 4.4 - Representação esquemática da β-glucana (1→3) e (1→6) isolada de <i>H. marmoreus</i>	46
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de ¹³ C da fração <i>Hm-SF₂AF</i> , realizado em D ₂ O a 70 °C (125 MHz).....	48

FIGURA 4.6- Espectros de RMN de ^{13}C das frações <i>Hm</i> -MRSF ₂ (A) <i>Hm</i> -MESF ₂ (B), realizados em D ₂ O a 70 °C (125 MHz)	50
FIGURA 4.7 - Cromatograma da fração <i>Hm</i> -PF ₂ AF obtido por HPSEC-RID ...	51
FIGURA 4.8 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações <i>Hm</i> -PF ₂ AF, realizados em D ₂ O a 70 °C (125 MHz)	52
FIGURA 4.9 - Região anomérica do espectro de RMN de ^1H da fração <i>Hm</i> -PF ₂ AF, realizado em D ₂ O a 50 °C (500 MHz)	52
FIGURA 4.10 - Mapa de contorno HSQC-DEPT da fração <i>Hm</i> -PF ₂ AF, realizado em D ₂ O a 50 °C (125 MHz)	53
FIGURA 4.11 - Espectro de HSQC-TOCSY da fração <i>Hm</i> -PF ₂ AF, realizado em D ₂ O a 50 °C (125 MHz)	54
FIGURA 4.12 - Estrutura química das unidades monossacarídicas constituintes da fucomanogalactana	57
FIGURA 4.13 - Cromatograma (A) e espectros de massa (B a E) referentes a análise de metilação da fração <i>Hm</i> -Pf ₂ AF (<i>Hm</i> -FMG).....	59
FIGURA 4.14 - Espectro de RMN de ^{13}C do produto resistente à hidrólise ácida branda (fração <i>Hm</i> -HPPF ₂), realizado em D ₂ O a 70 °C (125 MHz).....	61
FIGURA 4.15 - Representação esquemática do heteropolissacarídeo isolado de <i>Hypsizygyus marmoreus</i>	62
FIGURA 4.16 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração <i>Hm</i> -SK, realizado em D ₂ O a 70 °C (125 MHz).....	63
FIGURA 4.17 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações <i>Hm</i> -TAPFK (A) e <i>Hm</i> -TASFK (B), realizados em D ₂ O a 70 °C (125 MHz)	64
FIGURA 4.18 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações <i>Hm</i> -TAPFK (A) e <i>Hm</i> -TASFK (B), realizados em D ₂ O a 70 °C (125 MHz)	65
FIGURA 4.19 - Avaliação da viabilidade e densidade celular da fucomanogalactana de <i>H. marmoreus</i> (<i>Hm</i> -FMG) frente às células B16-F10	68
FIGURA 4.20 - Avaliação da morfologia das células melanômicas B16-F10 tratadas com a fucomanogalactana de <i>H. marmoreus</i> (<i>Hm</i> -FMG).....	70
FIGURA 4.21 - Efeito do polissacarídeo <i>Hm</i> -FMG na formação de colônias...	71
FIGURA 4.22 - Análise da migração celular (células B16-F10) após exposição ao polissacarídeo <i>Hm</i> -FMG.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Estrutura química dos monossacarídeos comumente encontrados em macrofungos	12
TABELA 1.2 - Avaliação química e biológica de extratos, frações e/ou compostos obtidos de <i>Hypsizygos marmoreus</i>	19
TABELA 4.1 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas brutas (<i>Hm-AF</i> , <i>Hm-AQ</i> e <i>Hm-K</i>) obtidas de <i>H. marmoreus</i> ...	43
TABELA 4.2 - Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas pelo fracionamento por congelamento e degelo.....	44
TABELA 4.3 - Composição monossacarídica e rendimento das frações resultantes da precipitação da fração <i>Hm-SAF</i> com solução de Fehling	47
TABELA 4.4 - Composição monossacarídica e rendimento das frações resultantes da precipitação da fração <i>Hm-SAF</i> com solução de Fehling	48
TABELA 4.5 - Assinalamentos de ¹³ C e ¹ H da fucomanogalactana de <i>Hypsizygos marmoreus</i>	57
TABELA 4.6 - Principais correlações ¹³ C/ ¹ H observadas no espectro de HSQC-DEPT para a fucomanogalactana isolada de <i>H. marmoreus</i>	58
TABELA 4.7 - Análise por metilação da fucomanogalactana (<i>Hm-FMG</i>) isolada de <i>Hypsizygos marmoreus</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
δ	Deslocamento químico em ppm
α -	Configuração glicosídica do tipo alfa
β -	Configuração glicosídica do tipo beta
°C	Graus Celsius
^{13}C	Carbono 13
^1H	Hidrogênio (Próton)
Ara	Arabinose
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
D ₂ O	Água deuterada
Da	Dalton
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>f</i>	Furanose
Fuc	Fucose
g	Gramma
Gal	Galactose
Glc	Glucose
h	Hora
<i>Hm</i>	<i>Hypsizigus marmoreus</i>
<i>Hm-AF</i>	Extrato água fria obtido de <i>H. marmoreus</i>
<i>Hm-AQ</i>	Extrato água quente obtido de <i>H. marmoreus</i>
<i>Hm-FMG</i>	Fucomanogalactana de <i>Hypsizigus marmoreus</i>
<i>Hm-K</i>	Extrato alcalino obtido de <i>H. marmoreus</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	Cromatografia de exclusão estérica de alto desempenho
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
L	Litro
M	Molar
m	Metro
m/v	Razão massa/volume

<i>m/z</i>	Razão massa/carga
Man	Manose
Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MHz	Mega-Hertz
min	Minuto
mL	Microlitro
mm	Milímetro
MTT	<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide; Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> (Massa molecular de corte)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
<i>p</i>	Pirnose
PBS	Tampão fosfato-salino
ppm	Parte por milhão
Rha	Raminose
Rib	Ribose
RMN	Ressonância magnética nuclear
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Ácido trifluoroacético)
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
<i>T_R</i>	Tempo de retenção
VN	Vermelho neutro
Xyl	Xilose

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURA E SIGLAS	IV
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. O QUE SÃO COGUMELOS?	1
1.2. ESTIMATIVAS E NÚMEROS DE ESPÉCIES DE MACROFUNGOS.....	3
1.3. IMPORTÂNCIA DOS MACROFUNGOS	4
1.4. APLICAÇÃO BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS DE MACROFUNGOS	5
1.4.1 Polissacarídeos de Macrofungos com Ação Antitumoral	9
1.5. O QUE É O CÂNCER?.....	10
1.5.1. Melanoma.....	12
1.6. MATRIZ EXTRACELULAR(MEC)	14
1.7. <i>Hypsizygus marmoreus</i>	16
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	23
3.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS DE CONSUMO	23
.....	34
3.3. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	26
3.4. PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	27
3.4.1. Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo	27
3.4.2. Precipitação de Polissacarídeos com sulfato de cobre em meio alcalino	28
3.4.3. Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas	29
3.4.4. Tratamento com Amilase.....	30
3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS.....	31

3.5.1. Determinação da Composição Monossacarídica.....	31
3.5.2. Determinação do Tipo de Ligação Glicosídica dos Polissacarídeos por Metilação.....	33
3.5.3. Hidrólise Ácida Parcial.....	34
3.5.4. Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração (HPSEC-RID)	35
3.5.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
3.6. AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA FUCOMANOGALACTANA PURIFICADA de <i>H. marmoreus</i> (Hm-FMG).....	35
3.6.1. Linhagem e Cultivo Celular	35
3.6.2. Métodos do Vermelho Neutro e Cristal Violeta	36
3.6.3. Método do MTT	37
3.6.4. Avaliação da Formação de Colônias	38
3.6.5. Avaliação da Morfologia Celular por Microscopia Confocal.....	39
3.6.6. Avaliação da Migração Celular.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1. PURIFICAÇÃO e CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS de <i>H. marmoreus</i> por EXTRAÇÃO AQUOSA a 10 °C (Hm-AF).....	44
4.1.1. Isolamento e Caracterização Química Parcial da β -D-Glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6).....	44
4.1.2. Fracionamento e Identificação de Glicogênio.....	47
4.1.3. Purificação e Caracterização Química da Heterogalactana	50
4.2. FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE β-GLUCANAS DO EXTRATO ALCALINO	62
4.3. AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA FUCOMANOGALACTANA ISOLADA DE <i>H. marmoreus</i> (Hm-FMG).....	66
4.3.1. Citotoxicidade e/ou viabilidade e densidade celular.....	67
4.3.2. Morfologia celular	69
4.3.3. Avaliação da capacidade de formação de colônias.....	70
4.3.4. Avaliação da migração celular.....	72
5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	74

REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE A.....	85
APÊNDICE B	86
APÊNDICE C	88
APÊNDICE D	89
APÊNDICE E	90

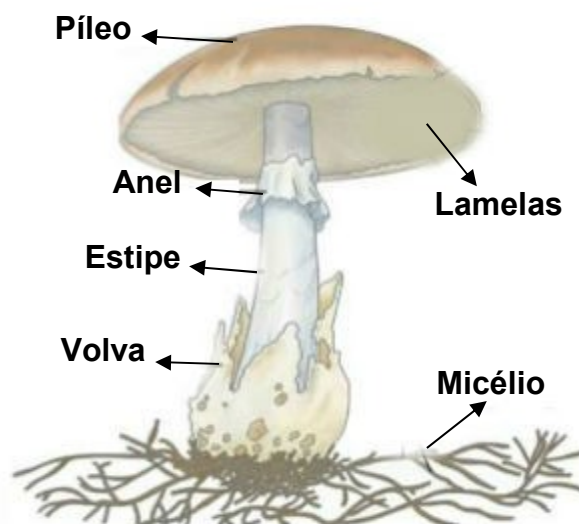
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O QUE SÃO COGUMELOS?

A etimologia da palavra cogumelo vem do latim - *cucumellum*, dim. de *cucūma,ae* e significa caldeirão ou tacho grande (FIDALGO & FIDALGO 1967). O termo cogumelo é amplamente utilizado para denominar os fungos que apresentam uma forma típica constituída, basicamente por estipe e píleo (FIGURA 1.1) ou aos grandes fungos com “textura carnosa”, que em sua maioria pertencem à classe Basidiomycetes Whittaker (syn. Agaricomycetes Doweld). Uma utilização mais restrita deste termo popular é para denominar apenas os fungos maiores que são comestíveis e/ou de valor medicinal (CHANG & MILES, 2004).

Devido a essas divergências, Chang e Miles (2004) propôs uma definição mais ampla para estes fungos, ou seja: “*cogumelo é um macrofungo com corpo de frutificação distinto e grande o suficiente para ser visto a olho nu e pego com as mãos, que pode crescer acima (epigeo) ou abaixo do solo (hipogeo)*”.

Figura 1.1 – Figura esquemática da estrutura típica de um cogumelo

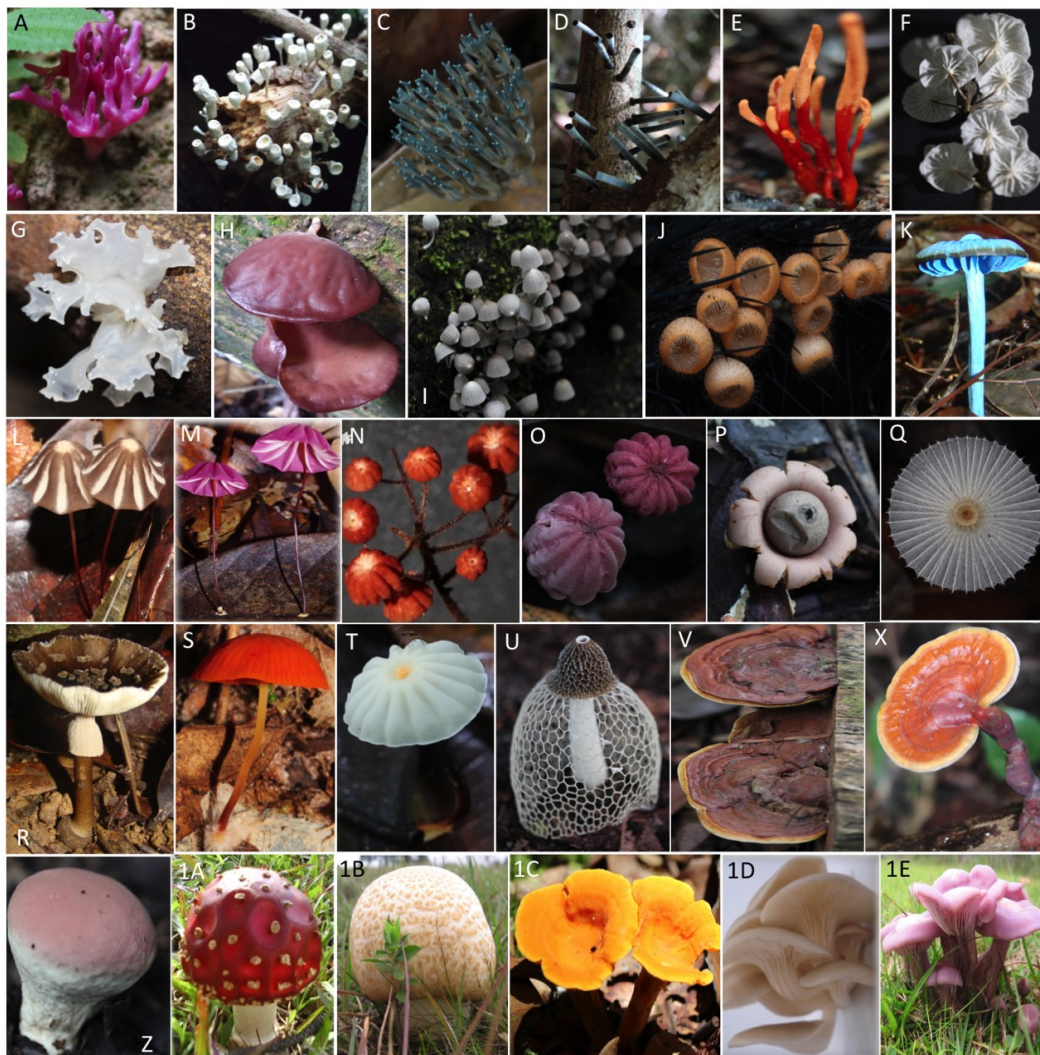


Fonte: Modificado de CHANG, S.; MILES, 2004.

Assim, cogumelo, orelha-de-pau, ferrugem, urupês, estrela-da-terra, são nomes populares para denominar diversos fungos macroscópicos ou macrofungos, os quais podem apresentar uma ampla diversidade estrutural, possuindo diferentes tamanhos, formas e colorações (Figura 1.2, p. 2)

A maior parte dos macrofungos ou fungos formadores de cogumelos encontra-se no filo Basidiomycota e em Ascomycota. Desta maneira a estrutura conhecida como cogumelo compreende apenas ao corpo de frutificação (basidioma ou ascoma, para as espécies pertencentes ao filo Basidiomycota ou Ascomycota, respectivamente) do fungo, correspondendo a parte reprodutiva destes organismos (KIRK et al., 2008).

Figura 1.2 - Diversidade de corpos de frutificação dos macrofungos



Ascomycota: D- *Camillea leprieurii*, J- *Cookeina tricholoma*, E- *Cordyceps* em aranha,
Basidiomycota: A- *Clavaria* sp., B- *Caripia montagne*, C- *Ramaria cyanocephalla* (syn. *Phaeoclavulina cyanocephala*, F- *Marasmiellus* sp., G- *Tremella* sp., H- *Auricularia fuscossuccinea* (orelha de cutia), I- *Coprinellus* cf. *disseminatus*, K- *Entoloma* sp., L, M, N, O – *Marasmius* spp., P- *Geastrum* sp. (estrela-da-terra), Q- *Crinipellis galeropsidoides*, R- *Amanita* cf. *campinaranae*, S- *Marasmius ruber*, T- *Marasmius castellanoi*, U- *Phallus* sp. , V, X- *Ganoderma* spp., Z- *Calvatia*, 1A- *Amanita muscaria*, 1B- *Agaricus* sp., 1C- *Cantharellus* sp., 1D- *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, 1E- *Lepista sordida*. Obs.: As imagens não estão em proporções reais entre elas. Imagens de D.L. Komura.

1.2 ESTIMATIVAS E NÚMEROS DE ESPÉCIES DE MACROFUNGOS

O número estimado total de fungos é muito controverso entre os micologistas, podendo variar de 500.000 a quase 10 milhões de espécies. Dentre as inúmeras estimativas, a mais aceita foi descrita por Hawksworth (1991) com 1,5 milhões de espécies fúngicas (KIRK et al., 2008), a qual foi revisada pelo autor em 2017, adequando-a em 2,2 a 3,8 milhões (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017). Dentro deste vasto número de exemplares, apenas 120.000 foram identificadas, correspondendo a 8% ou 3%, respectivamente, se considerarmos as estimativas preditas por estes pesquisadores (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017).

Similarmente ao exposto acima, o número de espécies especificamente para macrofungos, também é divergente, visto que o mesmo é dado em relação a totalidade de espécies fúngicas, perfazendo aproximadamente 10% destes organismos (ROSSMAN, 1994, citado por MULLER et al., 2007). Segundo Muller e colaboradores (2007), há aproximadamente 53.000-110.000 macrofungos no mundo, sendo este valor inferior ao estipulado por Hawksworth (1991), ou seja, 150.000. No entanto, se considerarmos a hipótese mais recente (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017), este valor poderá ser superior, atingindo em torno de 220.000 a 380.000 exemplares.

Comparando o número de macrofungos identificados, ou seja 22.000 (MULLER et al., 2007), e o estimado pelos micologistas, pode ser observado que a maioria destes encontram-se inexplorados, representando uma potencial fonte de alimentos com elevado valor nutritivo, substâncias bioativas, enzimas de interesse biotecnológico (ex: lacases, fenol oxidases, esterases, hidrolases, etc), matéria-prima para a indústria de cosméticos, entre outras finalidades.

1.3 – IMPORTÂNCIA DOS MACROFUNGOS

Os macrofungos são considerados um dos grupos mais diversificados de espécies biológicas adaptadas para viver em condições ambientais extremas em toda a Terra. Durante séculos, muitas espécies de cogumelos foram usadas como fontes excepcionais de alimentos (PETRE, 2016) e/ou de substâncias com propriedades terapêuticas.

A partir do desenvolvimento e melhoramento das técnicas de cultivo destes fungos, foi possível fazer a bioconversão da biomassa lignocelulósica, proveniente dos resíduos agroindustriais, em produtos de elevado valor agregado (PEREIRA, 2015)

A eficiência dos macrofungos na reciclagem destes resíduos deve-se ao potencial enzimático destes organismos, os quais são capazes de produzir uma ampla gama destes catalisadores biológicos como as lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases, entre outras (HALBWACHS, SIMMEL, BÄSSLER, 2016).

Além de serem importantes para os processos de conversão de resíduos lignocelulósicos, estes fungos são de relevante importância para a biorremediação, solucionando desta maneira os problemas da poluição ambiental gerados pelo imenso descarte de resíduos agroindustriais e de compostos tóxicos na natureza (HALBWACHS, SIMMEL, BÄSSLER, 2016).

Embora sua utilização para fins culinários tenha sido relatada há milhares de anos, o consumo de cogumelos tem aumentado, principalmente devido à crescente conscientização de que uma dieta estável e equilibrada exerce um papel fundamental no funcionamento normal do corpo e na manutenção da saúde. Consumidos por sua textura, aroma e sabor, os cogumelos são uma excelente escolha tanto pelo seu valor nutricional, pois possuem aminoácidos essenciais, proteínas, ácidos graxos insaturados, carboidratos, vitaminas, e minerais, quanto pelas suas propriedades medicinais, as quais tem sido atribuídas, principalmente, à presença de carboidratos bioativos (REIS et al., 2017; SAJON et al., 2018).

Dentre os macrofungos mundialmente conhecidos pelas propriedades medicinais, os mais estudados correspondem aos cultivados em substratos (ex: toras de madeira, resíduos lignocelulósicos, etc) e comercializados, como *Agaricus bisporus* (“*Champignon de Paris*”), *Lentinus edodes* (= *Lentinula edodes*; “*Shitake*”), *Pleurotus* spp. (“*Cogumelos ostras*”), *Grifola frondosa* (“*Maitake*”), *Ganoderma lucidum*, *Hypsizygus marmoreus* (“*Bunashimeji*”), entre outros.

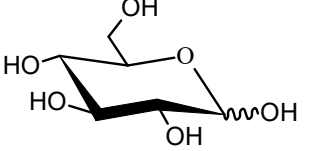
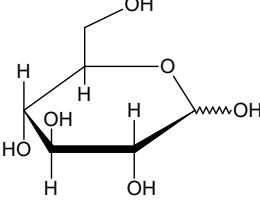
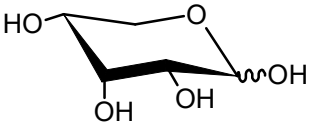
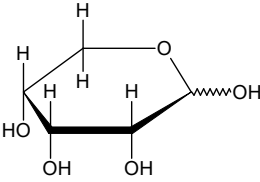
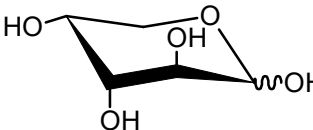
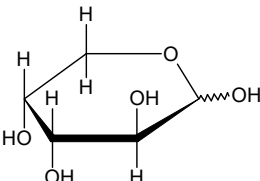
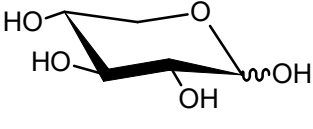
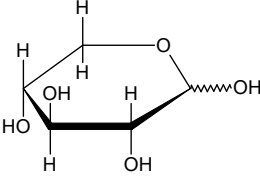
1.4. APLICAÇÃO BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS DE MACROFUNGOS

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra. A cada ano, a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas métricas de CO₂ e H₂O em celulose e outros produtos vegetais. Alguns carboidratos (sacarose e amido) são os principais elementos da dieta em muitas partes do mundo, e sua oxidação é a principal via de produção de energia na maioria das células não fotossintéticas. Os polímeros de carboidratos (também são chamados de glicanos) agem como elementos estruturais e protetores nas paredes celulares bacterianas e vegetais e também nos tecidos conectivos animais (NELSON & COX, 2014).

O nome carboidrato, significa literalmente "hidratos de carbono", resulta da sua composição química, que é geralmente (CH₂O)_n, em que $n > 3$. A unidade básica dos carboidratos são os chamados monossacarídeos. Muitos desses compostos são sintetizados a partir de substâncias simples em um processo denominado gluconeogênese (VOET & VOET, 2013). A partir da união dos monossacarídeos são formados os oligossacarídeos (2 a 10 unidades) e os polissacarídeos (> 10 unidades) Os monossacarídeos mais abundantes nos macrofungos são: raminose, fucose, arabinose, xilose, ribose, manose, galactose e glucose (Tabela 1.1, p. 6).

Tabela 1.1 – Estrutura química dos monossacarídeos comumente encontrados em macrofungos.

DESOXI-HEXOSE			
Nomenclatura	Conformação cadeira (forma piranosídica)	Projeção de Fisher	Perspectiva de Haworth (forma piranosídica)
L-Fucose (L-Fuc)			
L-Raminose (L-Rha)			
HEXOSES			
D-Manose (D-Man)			
D-Galactose (D-Gal)			

D-Glucose (D-Glc)		$ \begin{array}{c} \text{H} \quad 1 \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \quad 2 \quad \text{OH} \\ \\ \text{HO} \quad 3 \quad \text{H} \\ \\ \text{H} \quad 4 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 5 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 6 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $	
PENTOSES			
D-Ribose (D-Rib)		$ \begin{array}{c} \text{H} \quad 1 \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \quad 2 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 3 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 4 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 5 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $	
D-Arabinose (D-Ara)		$ \begin{array}{c} \text{H} \quad 1 \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \\ \text{HO} \quad 2 \quad \text{H} \\ \\ \text{H} \quad 3 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 4 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 5 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $	
D-Xilose (D-Xyl)		$ \begin{array}{c} \text{H} \quad 1 \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \quad 2 \quad \text{OH} \\ \\ \text{HO} \quad 3 \quad \text{H} \\ \\ \text{H} \quad 4 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \quad 5 \quad \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $	

As espécies de cogumelos comestíveis são constituídos de uma boa fonte de carboidratos, principalmente por que contém quitina e β -glucanas, que cumpre o papel de fibra alimentar. Eles são uma valiosa fonte de proteínas contendo aminoácidos essenciais e, portanto, podem ser considerados uma alternativa a outros alimentos com alto valor proteico (MUSZYŃSKA et al., 2018).

Os polissacarídeos são constituintes essenciais de todos os seres vivos, são organismos que estão associados à uma variedade de funções vitais. Eles são encontrados mais abundantemente em algas, plantas e fungos (CHO et al., 1998).

Em países asiáticos como a China e o Japão, os polissacarídeos são extraídos de cogumelos e têm desempenhado um papel importante, sendo utilizado como alimento e agente medicinal para o tratamento contra o câncer (MENG; LIANG; LUO, 2016).

Polissacarídeos são polímeros de carboidratos que podem ser encontrados em abundância na parede celular dos fungos. Tem sido descrito diferentes tipos de polissacarídeos com propriedades imunomoduladoras, antitumorais, entre outras, em sua composição química, como as glucanas (α , β ou mista contendo ambas configurações glicosídicas), heteroglucanas, heterogalactanas, heteromananas, complexos α -mano- β -glucana. Dentre estes, as β -glucanas são os polissacarídeos mais importantes com atividade imunomoduladora e antitumoral, principalmente, sendo encontrada em teores elevados nestes organismos (MORADALI et al., 2007). Estas vêm sendo consumidas por décadas através do consumo diário de cogumelos ou como fórmulas farmacêuticas (cápsulas, comprimidos, extratos alcoólicos, etc), no entanto, a eficácia destes polímeros para o tratamento do câncer em doses prescritas permanece em debate (PANG, WANG, ZHANG, 2018).

Nos últimos anos, os polissacarídeos isolados de macrofungos têm atraído cada vez mais atenção devido à sua ampla variedade de atividades farmacológicas, como antitumoral, imunomoduladora, anti-oxidante e efeitos anti-inflamatórios, principalmente (YU et al., 2018). Os polissacarídeos representam uma das principais classes de compostos bioativos encontrados nos cogumelos e têm sido relatados que na maioria das vezes são considerados seguros para serem consumidos, ou seja, os comestíveis (ELSAYED et al., 2014).

1.4.1. Polissacarídeos de Macrofungos com Ação Antitumoral

Muitos polissacarídeos isolados de cogumelos foram extensivamente estudados por suas propriedades antitumorais (SINGDEVSACHAN et al., 2016). Os polissacarídeos antitumorais diferem grandemente em sua estrutura química e propriedades físicas, devido a ampla variedade de tipos e número dos resíduos de monossacarídeos que os constituem. A estrutura primária de um polissacarídeo é definida pela composição dos monossacarídeos, posição das ligações glicosídicas e pela sequência dos monômeros. Esses três fatores resultam na maior variabilidade estrutural e potencial biológico destes polímeros, podendo contribuir para a ampla variedade de aplicações biológicas conferidas a estas biomoléculas. Em geral, há numerosos relatos a respeito das propriedades imunomoduladoras e antitumorais dos polissacarídeos extraídos de cogumelos (MENG, LIANG, LUO, 2016).

Nesse contexto, tem sido relatado um grande número de polissacarídeos isolados de macrofungos com atividades antitumorais, atuando diretamente nas células malignas, induzindo aprisionamento do ciclo celular, apoptose e diminuição da migração e invasão, ou através da imunomodulação, promovendo maior imunocompetência do sistema imunológico do paciente (TONG et al., 2009; ZONG, CAO, WANG, 2012; WANG et al., 2014; FU, LIU, ZHANG, 2016; REN et al., 2016; BISCAIA et al., 2017; MILHORINI et al., 2018).

No entanto, diversos estudos têm comprovado a influência da estrutura química sobre a atividade biológica apresentada por estas moléculas (WASSER, 2002), ou seja, fatores como solubilidade em água, massa molecular e conformação estão diretamente ligados aos efeitos farmacológicos atribuídos aos polissacarídeos (OHNO, 2005; CHEN, SEVIOUR, 2007), justificando assim a necessidade de estudos sobre a estrutura química fina destas biomoléculas.

1.5. O QUE É O CÂNCER?

O câncer não é uma doença nova, pelo fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (metástase) (INCA, 2011). Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, sendo específica aos tumores malignos (INCA, 2018).

Um relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostrou que cerca de 12,7 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer em todo o mundo e cerca de 8,8 milhões de pessoas morreram em 2015, globalmente, quase 1 em cada 6 mortes é devido ao câncer, ocorrendo principalmente em países de baixa e média renda. Segundo estimativas deste relatório, mais de 21 milhões de novos casos de câncer e 13 milhões de mortes são esperadas até 2030 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

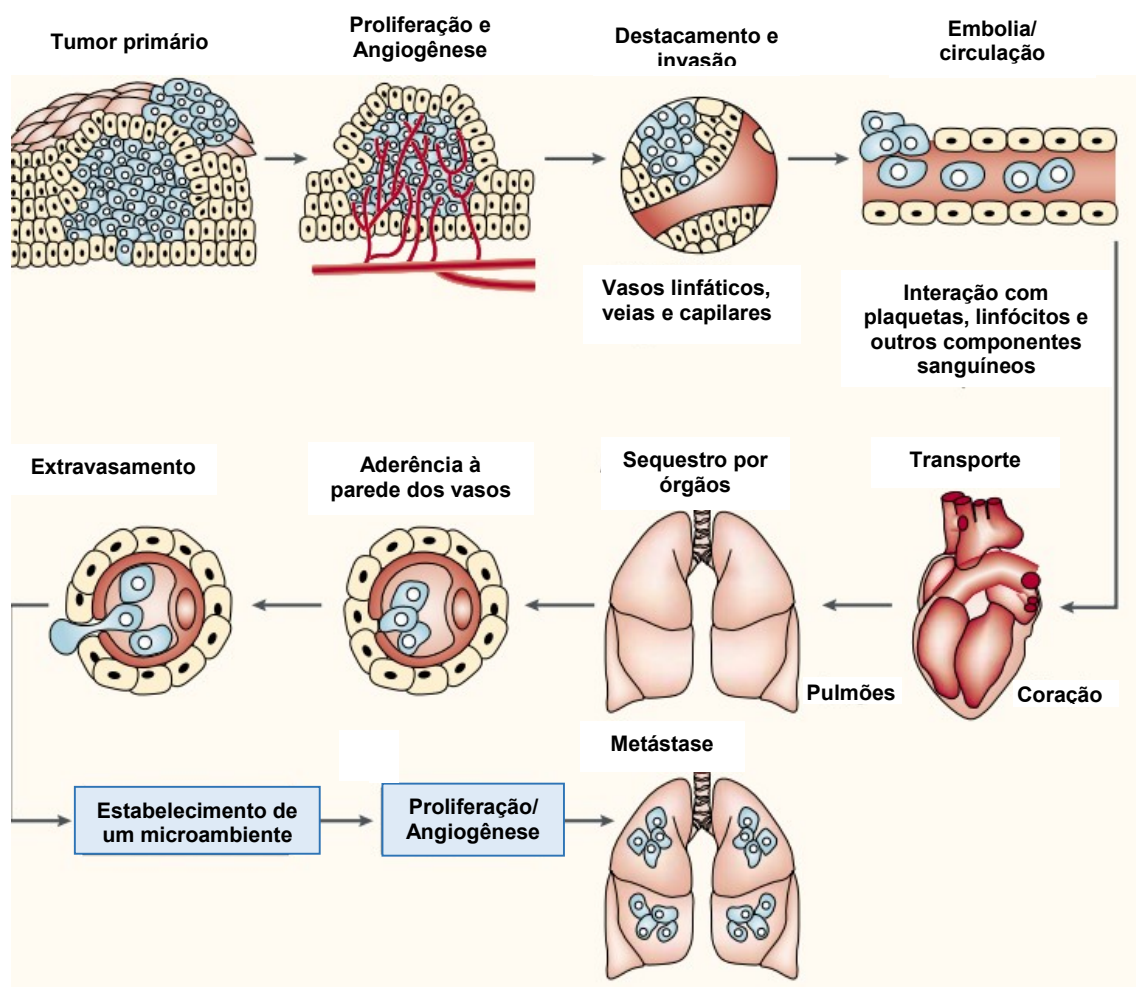
O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Atualmente, é a segunda causa de morte nos Estados Unidos e deve superar as doenças cardíacas como principal causa de morte nos próximos anos (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2015). Sendo uma das principais ameaças à saúde humana em todo o mundo, com milhões de novos casos a cada ano, entre os quais: câncer de pulmão, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de próstata, fígado e estômago são os mais comuns, com taxas mais altas de morte (PANG, WANG, ZHANG, 2018).

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anaplásicas, que tendem a invadir os tecidos circundantes e metastatizam para outros tecidos e órgãos. As alterações celulares são resultados de uma mutação no DNA cromossômico de uma célula normal, que pode ser desencadeada por fatores externos como: tabaco, álcool, substâncias químicas, agentes infecciosos e radiação e fatores internos: hormônios, condições imunológicas, mutações herdadas e mutações que ocorrem em metabolismo (ZONG et al., 2012; TORRE et al., 2015).

A metástase que ocorre em células cancerosas é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer. O desenvolvimento da metástase consiste em múltiplas etapas, nos quais as células cancerígenas migram do local primário do tumor, invadindo os tecidos circundantes, onde se movem através do sangue ou do sistema linfático para tecidos distantes, extravasam a vasculatura e eventualmente proliferam para formar tumores secundários em novos locais. Assim, a inibição de qualquer um desses processos pode ser utilizado para tratamentos contra o câncer (ABU et al., 2015).

O processo de metástase do câncer consiste em uma longa série de etapas sequenciais e inter-relacionadas. Cada um destes pode ser limitante da taxa, pois uma falha ou uma insuficiência em qualquer uma das etapas pode interromper todo o processo (Figura 1.3, p. 7) (FIDLER, 2003).

Figura 1.3 - Os principais passos na formação de uma metástase



Fonte: Modificado de FIDLER, 2003

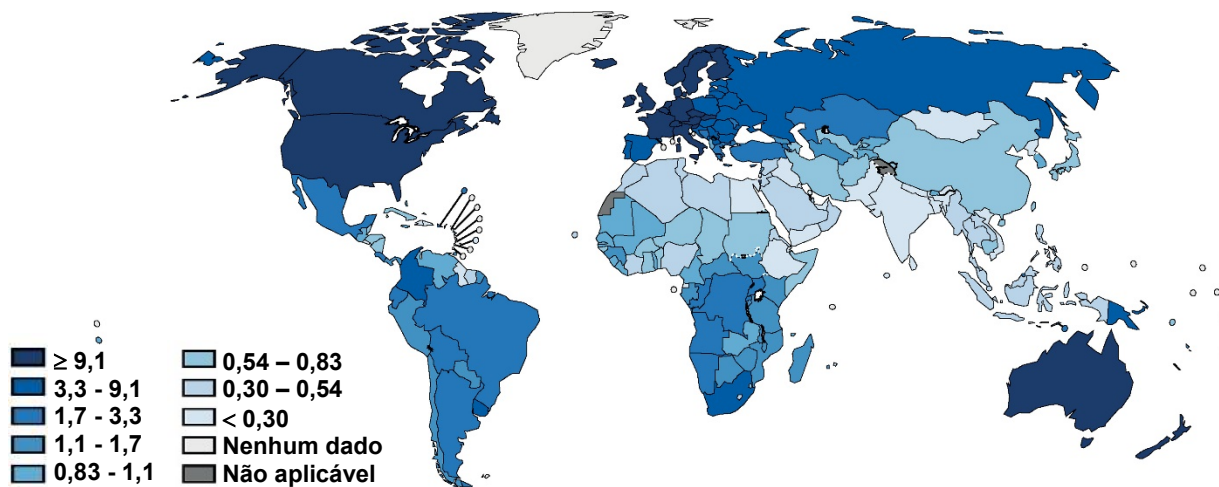
A metástase é um processo complexo que consiste em várias etapas e resulta das interações entre as células tumorais e o microambiente tecidual (FIGUEIREDO et al., 2018). Portanto, o microambiente dos tecidos desempenha um papel crítico na sobrevivência e crescimento celular e provavelmente contribui para a transformação celular e o desenvolvimento do tumor. As interações celulares com o estroma e com outras células fornecem sinais fundamentais que controlam a parada ou a divisão celular, a sobrevivência ou a morte, e entram ou saem de um estado quiescente (BEDOGNI & POWELL, 2009).

As habilidades para invadir e metastatizar são as características definidoras de um câncer. Após a transformação de uma célula normal em uma célula maligna via mutação genética, as células cancerígenas proliferam rapidamente, invadem os tecidos circundantes, separam-se do nódulo, migram pelo corpo através do sistema sanguíneo ou linfático, e estabelecem focos secundários de câncer em locais distantes à metástase, sendo responsável por 90% das mortes causadas por câncer (ZONG et al., 2012).

1.5.1. Melanoma

Em todo o mundo, cerca de 1,7% (232.100) dos casos de todos os tipos de câncer malignos primários recentemente diagnosticados (excluindo câncer da pele não melanoma) correspondem ao melanoma cutâneo, e cerca de 55.500 mortes por câncer anualmente (0,7%) são devido ao melanoma cutâneo. As taxas de incidência e mortalidade referentes ao melanoma cutâneo diferem amplamente por país. Em 2012, a incidência de melanoma cutâneo padronizado por idade (população padrão mundial) variou de 0,2 por 100.000 pessoas-ano no sudeste da Ásia a 7,7 por 100.000 pessoas-ano nas Américas. As incidências foram maiores na Nova Zelândia (35,8 por 100.000 pessoas-ano) e na Austrália (34,9 por 100.000 pessoas-ano). A incidência foi de 10,2 por 100.000 pessoas/ano nos Estados Unidos e 13,8 por 100.000 pessoas/ano na América do Norte (Figura 1.4, p. 13) (SCHADENDORF et al., 2018).

Figura 1.4 - Estimativa da incidência mundial padronizada por idade de melanoma cutâneo em homens e mulheres em 2012.



Fonte: Modificado de SCHADENDORF et al., 2018

A alta capacidade invasiva e metastática e a consequente rápida progressão ao óbito são características do melanoma, 5º tipo de câncer mais incidente em homens e 6º tipo mais incidente em mulheres nos Estados Unidos (IARC, 2014). Os tratamentos hoje disponíveis para esse tipo de câncer são apenas paliativos, aumentando a sobrevida dos pacientes, além de apresentar grande quantidade de efeitos colaterais, sugerindo assim a necessidade da busca de novos tratamentos para o melanoma bem como outros tipos de cânceres, sendo os polissacarídeos de macrofungos considerados promissores para a prevenção e tratamento destas doenças (MAVERAKIS et al., 2015),

Muitas destas biomoléculas tem mostrado atuar sobre a invasão celular e metástase, ou seja, os marcadores do melanoma e de outros tipos de cânceres. Ambos os eventos ocorrem após alterações da matriz extracelular, criando um microambiente favorável ao desenvolvimento da doença. Assim, são desejáveis novas abordagens terapêuticas que bloqueiam a ativação de invasão e metástase, com o objetivo de prolongar a vida livre do tumor e reduzir a formação de metástase (BISCAIA et al., 2017).

1.6. MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Nos últimos 20 anos, a biologia do câncer e a biologia do desenvolvimento convergiram pelo mesmo caminho, e ambos os campos se beneficiaram bastante no progresso de pesquisa de cada um. Fazendo uma breve retrospectiva, tal convergência é inevitável, pois muitos dos comportamentos celulares são processos essenciais para o desenvolvimento embrionário e também são indispensáveis para a progressão do câncer (LU, WEAVER, WERB, 2018).

A matriz extracelular (MEC) é um conjunto de macromoléculas, formado por uma rede supramolecular altamente dinâmica, que é continuamente remodelada por uma série de enzimas de degradação, durante processos normais e condições patológicas. Estes componentes da MEC estão interligados uns aos outros, e também podem fazer ligações com os receptores celulares formando uma grande rede entre as células e os tecidos. A MEC é dinâmica, isto é, está em constante reorganização, e também pode contribuir para desencadear sinais para as células a partir de sua ligação aos receptores. Desta maneira, ela regula uma diversidade de funções celulares como a sobrevivência, migração e diferenciação, bem como a manutenção da homeostase celular (THEOCHARIS et al., 2016)

A matriz extracelular é um componente essencial que está presente nos tecidos dos organismos multicelulares. Sendo criticamente importante para muitos processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação, sobrevivência e morfogênese. A MEC consiste em uma montagem complexa de muitas proteínas como o colágeno, laminina, elastina (RODRÍGUEZ & OSKARSSON, 2016) e a fibronectina (GILLETTE et al., 2011), e outras moléculas como as glicoproteínas, proteoglicanos (LU, WEAVER, WERB, 2018) e polissacarídeos, sendo sua composição variável de tecido para tecido (CLAUSE & BARKER, 2013). Juntos, esses grupos distintos de moléculas da MEC fornecem uma enorme capacidade e complexidade funcional (ROZARIO & DeSIMONE, 2010), os quais desempenham funções estruturais e de suporte para manter a integridade e sustentabilidade dos tecidos. Isso é importante para o desenvolvimento embrionário e a geração de novas estruturas teciduais, bem

como a manutenção da arquitetura e da homeostase de tecidos adultos (OSKARSSON, 2013).

A desregulação da adesão celular da MEC é observada nos estágios da tumorigenicidade, resultando em hiperproliferação, invasão local, disseminação metastática e colonização para órgãos distantes (HAMIDI, PIETILÄ, IVASKA, 2016). Esta desregulação da MEC gera poros nos vasos, e a invasão celular e conseqüentemente, metástase para locais distantes. Nestes novos locais, expressam enzimas de remodelamento da MEC e criam seus novos nichos metastáticos (LU, WEAVER, WERB, 2012).

A angiogênese é um processo complexo, exigindo coordenação de muitas atividades celulares. Assim, além de guiar a migração e ramificação de células endoteliais, a MEC e seus fragmentos podem estar envolvidos na sobrevivência e proliferação de células endoteliais para suprir os blocos de construção celulares para o crescimento dos vasos (SWEET et al., 2011).

Além disso, os componentes da MEC estão envolvidos na morfogênese celular, incluindo a formação do lúmen do vaso e outros aspectos da tubulogênese durante a angiogênese tumoral (NEWMAN et al., 2011). As propriedades biomecânicas da MEC parecem desempenhar um papel especialmente importante nesse processo. De fato, redes vasculares com padrões de ramificação marcadamente distintos têm sido observadas quando células endoteliais são cultivadas em matriz com elasticidade diferente (MYERS et al., 2011).

Desta forma, são utilizados alguns marcadores de malignidade para avaliação da capacidade invasiva das células tumorais, pois são características comuns no desenvolvimento do câncer, como o sinal de proliferação ativa, evitar supressores de crescimento, induzir a angiogênese, sobrevivência celular, imortalização, sendo que a capacidade de migração é uma das mais importantes neste contexto, como primeiro passo para a metástase (HANAHAN, WEINBERG, 2000, 2011).

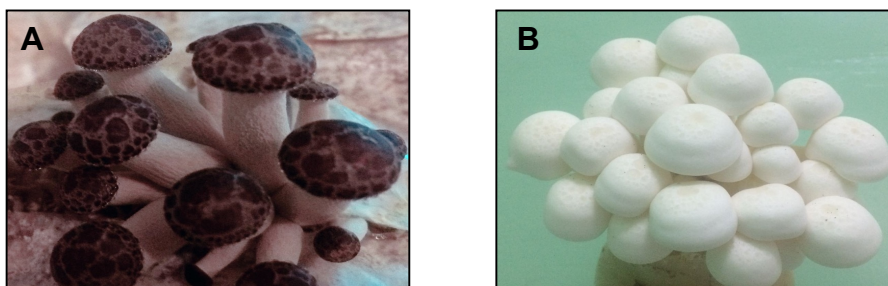
1.7. *Hypsizygos marmoreus*

O gênero *Hypsizygos* pertencente ao filo Basidiomycota, ordem Agaricales e família Lyophyllaceae (MYCOBANK DATABASE, 2017), foi proposto por Singer em 1947 utilizando *Pleurotus tessulatus* (Bull. ex Fr) como basônimo para a nova combinação - *Hypsizygos tessulatus*. Atualmente o gênero compreende seis espécies, ou seja, *Hypsizygos circinatus*, *Hypsizygos elongatipes*, *Hypsizygos ligustri*, *Hypsizygos marmoreus*, *Hypsizygos tessulatus*, *Hypsizygos ulmarius* (MYCOBANK DATABASE, 2017),

A espécie *H. marmoreus* (Peck) H. E. Pigelow, conhecida popularmente no Japão como “*Bunashimeji*” (LEE, JIAN, & MAU, 2009), caracteriza-se por possuir crescimento cespitoso, píleo hemisférico à plano (2-7 cm), de coloração castanho escuro a marrom-acinzentado quando maduro e aparência “manchada” ou “marmorizada” semelhantes a “pontos de água”. A sua estipe é espessa, central ou excêntrica, muitas vezes afinando em direção à base, com comprimentos variáveis dependendo do método de cultivo (STAMETS, 2010) (Figura 1.3 A).

Além desta linhagem “*marrom*”, foi descrita outra de coloração “*branca*”, a qual possui píleo e estipe com estrutura idêntica a citada anteriormente, diferindo apenas na coloração (Figura 1.5 B). Estas têm sido cultivadas e comercializadas, principalmente, nos países Asiáticos para fins culinários e medicinais. No Brasil, a produção é recente, concentrando-se no estado de São Paulo, onde é cultivado apenas a linhagem “*branca*”.

Figura 1.5 - Basidiomas de *Hypsizygos marmoreus* (A: linhagem “*marrom*”; B: linhagem “*branca*”)



Fonte: Imagens de Sthefany R. F.Viana.

De acordo com Lee, Jian e Mau (2009), os basidiomas de ambas linhagens foram equivalentes quanto ao valor nutricional, pois apresentaram teores similares de carboidratos totais, proteínas, fibras, lipídeos e minerais. Por outro lado, os micélios, provenientes do cultivo submerso, das duas linhagens foram similares entre si quanto à composição centesimal, mas com teores superiores de proteínas e lipídeos em relação aos basidiomas. Neste estudo, também foi analisado os componentes não-voláteis, dos basidiomas e micélios, responsáveis pelo sabor umami destes alimentos (aminoácidos: Glu, glutamato; Asp, aspartato/5'-nucleotídeos: 5'-AMP, 5'-adenosina monofosfato; 5'-GMP, 5'-guanosina monofosfato; 5'-IMP, 5'-inosina monofosfato; 5'-XMP, 5'-xantosina monofosfato), confirmando os relatos sobre o sabor característico desta espécie, principalmente em relação aos basidiomas da linhagem “branca” a qual possui teores mais elevados destas substâncias (LEE, JIAN, MAU, 2009).

Além da sua utilização na gastronomia, devido ao sabor, textura e valor nutricional, este macrofungo tem sido consumido pelos efeitos benéficos a saúde (Tabela 1.2, p. 19-21).

Diversos efeitos terapêuticos foram reportados para esta espécie como imunomodulatório (LEE et al., 2011; ZHANG et al., 2014), antitumoral (IKEKAWA et al., 1992; IKEKAWA, 1995; TSUCHIDA et al., 1995; SHOJI et al., 2000; KRASNOPOLSKAYA et al., 2008; MIZUMOTO et al., 2008; ZHANG et al., 2012; TSAI & MA, 2013; TSAI, MA, WU, 2013), antiviral (LAM & NG, 2001), citotóxico (XU et al., 2007; ZHANG et al., 2015), antifúngico (SUZUKI et al., 2011; OKA et al., 2015), anti-hipertensivo (KANG et al., 2013), antioxidante (FU, SHIEH, HO, 2002; LEE, YEN, MAU, 2007; LIU et al., 2018), anti-inflamatório (CHIEN et al., 2016; LIU et al., 2018), antiproliferativo (LAM & NG, 2001; CHANG et al., 2004; GUAN, WANG, & NG, 2007), regulador da obesidade e da resistência à insulina (IUCHI et al., 2015), antiaterosclerótico (MORI et al., 2008), os quais têm sido atribuídos aos extratos brutos (aquosos, etanólicos, metanólicos, entre outros), frações e/ou compostos isolados, obtidos tanto dos basidiomas quanto do micélio e filtrado provenientes do cultivo submerso (Tabela 1.2, p. 19-21).

Nas pesquisas realizadas foram isolados e caracterizados deste macrofungo diferentes metabólitos, como as proteínas, lipídeos, polissacarídeos, oligopeptídeo e metabólitos secundário (esterol, poli-isopreno poliol, poliacetileno, diterpeno viscidano, entre outros), sendo a maioria deles avaliados biologicamente, “*in vivo*” e/ou “*in vitro*”, frente à distintos efeitos farmacológicos (Tabela 1.2, p. 19-21).

Tendo em vista a diversidade de polissacarídeos presentes em cada espécie fúngica, bem como a sua importância na modificação da resposta biológica, o cogumelo *H. marmoreus* encontra-se inexplorado nesta área, representando uma espécie importante a ser estudada devido ao seu valor medicinal (Tabela 1.2, p. 19-21). Cabe ressaltar que, um único polímero (β -glucana 1 \rightarrow 3) foi isolado a partir dos basidiomas, o qual não foi totalmente caracterizado.

Devido aos inúmeros efeitos biológicos atribuídos aos polissacarídeos de fungos, novas estratégias para a sua produção em larga escala vem sendo realizada, como o cultivo submerso (denominado cultivo em meio líquido) que resulta na liberação de exopolissacarídeos no meio de cultivo e na produção de micélio o qual pode ser utilizado como fonte de obtenção destes polímeros. Com esta finalidade, foram realizados alguns planejamentos experimentais com a espécie em estudo, visando a otimização da produção destes polímeros (ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2014; CHEN et al., 2017). Zhang e colaboradores (2014) descreveram o isolamento de 4 polímeros a partir do filtrado do cultivo submerso (exopolissacarídeos), os quais com exceção da α -glucana (1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6) (fração B-N-I) são incomuns nos basidiomas destes organismos. Além disso, o polímero contendo altos teores de manose (denominada de manana; Fração B-I-I) isolado por estes autores, provavelmente seja proveniente do extrato de levedura adicionado ao meio de cultivo (KOMURA et al., 2010).

Tabela 1.2 - Avaliação química e biológica de extratos, frações e/ou compostos obtidos de *Hypsizygyus marmoreus*

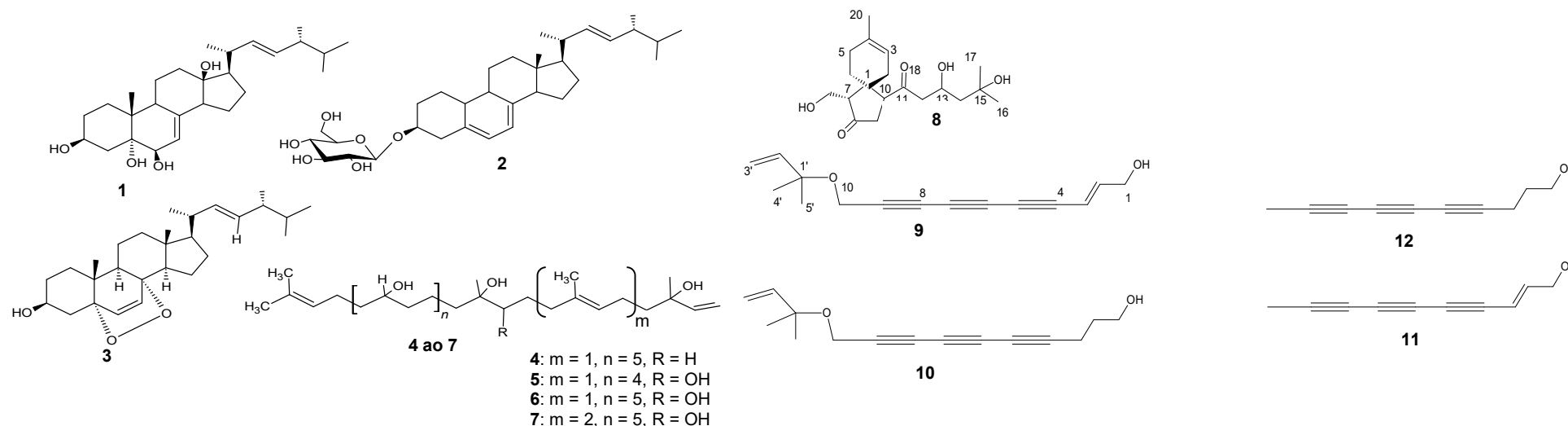
MATERIAL DE ESTUDO	FRAÇÕES/ COMPOSTOS CARACTERIZADOS	AÇÃO BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
	-	Antiaterosclerótica (<i>in vivo</i> ; via redução dos níveis de colesterol total)	MORI et al., 2008.
	EXTRATO AQUOSO: 4 frações polissacarídicas, sendo 1 delas caracterizada como uma β -glucana ligada (1 \rightarrow 3)	Antitumoral (Sarcoma 180)	IKEKAWA et al., 1992.
	EXTRATO METANÓLICO		
	EXTRATO AQUOSO: β -glucana (1 \rightarrow 3); Principais aminoácidos: ácido glutâmico, arginina, ácido aspártico	Antitumoral	IKEKAWA, 1995.
	EXTRATO ETANÓLICO: Compostos fenólicos	Antioxidante	FU, SHIEH, HO, 2002.
	EXTRATO METANÓLICO: Hypsiziprenol A ₉ (4)	Antiproliferativa (Células de hepatocarcinoma humano HepG2)	CHANG et al., 2004.
	Hypsiziprenol A ₉ (4)	Antitumoral (células leucêmicas pró-mielocítica humana HL-60)	MIZUMOTO et al., 2008.
BASIDIOMAS	EXTRATO METANÓLICO:	Citotóxica	XU et al., 2007.
	Esteróis: (22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol (1); ergosterol3-O- β -D-glucopyranoside (2), 5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol (3)	(linhagens de células tumorais humanas: hepatocarcinoma humano HepG2; adenocarcinoma mamário MCF-7; adenocarcinoma de cólon HT-29)	
	Poli-isopreno poliol: hypsiziprenol A ₉ (4), hypsiziprenol AA8 (5), hypsiziprenol AA9 (6) and hypsiziprenol BA10 (7)		
	EXTRATO ETANÓLICO/EXTRATO AQUOSO (Frio e a quente): Compostos fenólicos	Antioxidante	LEE, YEN, MAU, 2007.
	EXTRATO CLOROFÓRMIO/METANOL/ÁGUA (60:35:8, v/v): Glicosilinositolfosfoceramidas (7 compostos: apresentam uma estrutura comum formada por α -Man(1 \rightarrow 2)Ins1-[PO ₄]-Cer; as diferenças entre eles são referentes aos monossacarídeos adicionais, podendo ser Man, Gal e/ou Fuc)	Não avaliada	ITONORI et al., 2008.
	EXTRATO AQUOSO (90 °C)	Imunomodulatória	LEE et al., 2011.
	FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA , proveniente do extrato aquoso	Regulação da obesidade e da resistência à insulina	IUCHI et al., 2015.

Tabela 1.2 - Avaliação química e biológica de extratos, frações e/ou compostos obtidos de *Hypsizygus marmoreus* (Continuação)

MATERIAL DE ESTUDO	FRAÇÕES/ COMPOSTOS CARACTERIZADOS	AÇÃO BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
BASIDIOMAS	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (HMEA)/FRAÇÃO AQUOSA (HMW) , obtidas por partição do extrato etanólico (EtOH 0%): Compostos fenólicos e flavonoides	Anti-inflamatória	CHIEN et al., 2016.
	PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO , denominada HM23 (<i>M_w</i> 23 kDa)	Antitumoral (Carcinoma hepatocelular murino 3LL)	TSUCHIDA et al., 1995.
	PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO , denominada HM41 (<i>M_w</i> 41 kDa)	Antitumoral (Células de hepatocarcinoma murino LL2; células de fibrosarcoma humano HT1080)	SHOJI et al., 2000.
	PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMO termoestável, denominada "Hypsin" (<i>M_w</i> 20 kDa)	Antiviral Antiproliferativa (Células de hepatocarcinoma humano HepG2; células leucêmicas humana HL60; e células linfoblásticas leucêmicas murinas L-1210)	LAM, & NG, 2001.
	RIBONUCLEASE (RNase; <i>M_w</i> 18 kDa)	Antiproliferativa (células leucêmicas L1210)	GUAN, WANG, NG, 2007.
	PROTEÍNA HM-af (<i>M_w</i> 9,5 kDa)	Antifúngica	SUZUKI et al., 2011.
	GLICOPROTEÍNA , denominada HM-3A (<i>M_w</i> 52 kDa; contém galactose como principal monossacarídeo)	Antitumoral (células leucêmicas humanas U937)	TSAI, MA, WU, 2013; TSAI & MA, 2013.
	OLIGOPEPTÍDEO (<i>M_w</i> 567,3 Da)	Anti-hipertensiva (Inibição da enzima conversora de angiotensina I)	KANG et al., 2013.
	LECTINA (Dimérica; <i>M_w</i> unitária= 9,5 kDa)	Não avaliada	SUZUKI et al., 2015.
	CULTIVO SUBMERSO	EXTRATO AQUOSO , proveniente da extração do micélio	Antitumoral (<i>in vivo</i> , utilizando ratos transplantados com células leucêmicas murinas P388)
EXOPOLISSACARÍDEOS: Fração B-N-I: α -glucana (1→4), com ramificações em C-6, <i>M_w</i> = 6,3 kDa; Fração B-I-I: α -manana altamente ramificada, com cadeia principal constituída por α -Manp(1→2), parcialmente substituídas em O-6 por terminais não redutores de α -Manp e pelo dissacarídeo α -Manp(1→3)- α -Manp(1→, <i>M_w</i> = 120 kDa;		Imunomodulatória	ZHANG et al., 2014.

Tabela 1.2 - Avaliação química e biológica de extratos, frações e/ou compostos obtidos de *Hypsizygus marmoreus* (Conclusão)

MATERIAL DE ESTUDO	FRAÇÕES/ COMPOSTOS CARACTERIZADOS	AÇÃO BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
CULTIVO SUBMERSO	EXOPOLISSACARÍDEOS: Frações B-II-I e B-II-II: complexas raminogalacturonanas ramificadas, $M_w = 150$ e 11 kDa, respectivamente.	Imunomodulatória	ZHANG et al., 2014.
	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (partição do filtrado do cultivo submerso): Diterpeno Viscidano: 8-oxoviscida-3,11(18)-diene-13,14,15,19-tetraol (8) Poliacetilenos: (E)-10-(1,1-dimethyl-2-propenyloxy)-2-decene-4,6,8-triyn-1-ol (9); 10-(1,1-dimethyl-2-propenyloxy)deca-4,6,8-triyn-1-ol (10); (E)-2-decen-4,6,8-triyn-1-ol (11); 4,6,8-decatriyn-1-ol (12)	Citotóxica (Compostos I, III e V; linhagens de células tumorais humanas: leucemia promielocítica HL60; carcinoma hepatocelular SMMC-7721; adenocarcinoma de pulmão A-549; adenocarcinoma mamário MCF-7; câncer de cólon retal SW-480)	ZHANG et al., 2015.
	MICÉLIO E FILTRADO: Compostos voláteis Principal composto volátil isolado do filtrado submerso: 2-methylpropanoic acid 2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl) propyl ester, $C_{12}H_{24}O_3$, massa molar = 216 g/mol	Antifúngica (fungos fitopatogênicos)	OKA et al., 2015.
	EXOPOLISSACARÍDEOS	Antitumoral (células de câncer gástrico humano, SGC-7901)	ZHANG et al., 2012.
	EXTRATO AQUOSO (85°C), obtida do micélio: Fração MPS (Polissacarídeo solúvel em água obtido do micélio; $M_w = 1,84$ kDa). Composição Monossacarídica: raminose, fucose, ribose, xilose, manose, galactose e glucose em uma proporção molar de 0,53: 3,93: 0,28: 0,18: 2,23: 12,46: 6,40.	Antioxidante Anti-inflamatória	LIU et al., 2018.



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização química de polissacarídeos do macrofungo *Hypsizigus marmoreus* (linhagem “branca”).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Isolar os polissacarídeos dos basidiomas de *Hypsizigus marmoreus* (linhagem “branca”), através de técnicas de extrações convencionais (aquosas e alcalinas sob agitação mecânica e/ou refluxo);

b) Purificar os polímeros por técnicas de fracionamento, tais como congelamento/degelado, precipitação com solução de Fehling, diálise em membranas, etc.;

c) Caracterizar estruturalmente dos polímeros purificados utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia de exclusão estérica de alto desempenho (HPSEC), técnicas de ressonância magnética nuclear mono (RMN de ^{13}C e de ^1H) e bidimensionais (HSQC-DEPT: *Heteronuclear Single Quantum Coherence - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*; HSQC-TOCSY: *Heteronuclear Single Quantum Coherence - Total Correlation Spectroscopy*, HSQC-NOESY *Heteronuclear Single Quantum Coherence - Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*, entre outras);

d) Avaliação antitumoral da fucomanogalactana purificada de *Hypsizigus marmoreus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os basidiomas (corpo de frutificação ou basidiocarpos) (massa fresca = 2 kg) de *Hypsizygus marmoreus* (Figura 3.1) foram doados, em março 2017, pela Empresa Yuki Cogumelos (Proprietário: José Francisco Viano; Responsável técnica: Msc. Sthefany R. F. Viana), situada em Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil. O cogumelo foi cultivado em substratos constituídos por serragem de eucalipto (70%), farelo de trigo (14%), farelo de milho (16%) e carbonato de cálcio (1%).

Figura 3.1 - Foto do macrofungo *H. marmoreus* (linhagem “branca”)



Fonte: Sthefany R. F. Viana

3.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS DE CONSUMO

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados diversos equipamentos e materiais de consumo, os quais estão descritos a seguir.

Equipamentos:

- a) Agitador de tubos (Vórtex), marca IKA, modelo Genius 3.
- b) Agitador mecânico, marca IKA, modelo RW 20;
- c) Agitadores magnéticos com aquecimento, marca IKA, modelo RH basic 1;

- d) Balança analítica, marca Adventur™ OHAUS, modelo AR2 140;
- e) Banhos de aquecimento (Banho-Maria), marca Fisaton, modelo 550;
- f) Bombas de vácuo da marca VACUUBRAND (modelo ME 1C) e da Tecnal (modelo TE-0581);
- g) Capela;
- h) Centrífuga refrigerada 5810R (Milipore), 230 v/ 50-60 Hz equipada com rotor fixo de capacidade para 6 tubos de 85 mL, acompanhado de adaptadores para tubos cônicos (15 e 50 mL);
- i) Cromatógrafo de exclusão estérica de alta resolução (HPSEC) (Shimadzu Company, Kyoto, KYT, Japan) equipado com detector de índice de refração (IR; modelo RID 10A), bomba de HPLC (modelo 10AD), uma válvula de injeção manual (Shimadzu) equipada com um *loop* de 200 µL e um sistema de coluna Ultrahydrogel (7,8 x 300 mm) (Waters) com limite de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da dispostas em série (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Presidente Prudente);
- j) Cromatógrafo gasoso (Agilent 7820A) acoplado ao espectrômetro de massas tipo quadrupolo (Agilent 5975E), equipado com injetor para divisão do fluxo *split/splitless*, torre de injeção automática (Agilent G4513A) e colunas capilares de sílica fundida com 0,25 mm x 30 m de dimensões (largura x comprimento) e 0,25 µm de espessura do filme (DB-225-MS: 50%-cianopropilfenil-metilpolisiloxano; HP5-MS: 5% de fenilmetilsiloxano). O software Saturno GC/MS 5.52 workstation e processador de dados MS com biblioteca Agilent MSD Productivity ChemStation for GC and GC/MS Systems data analysis application—(Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás/Regional Catalão);
- k) Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear, modelo Avance III-500 (11,75 Tesla), Marca Bruker (Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás Regional Goiânia, *Campus* Samambaia);
- l) Evaporadores rotativos, marca Fisaton, acoplados a bombas de vácuo VACUUBRAND, modelo ME 1C.

- m) Micropipetas, marca Eppendorf, com capacidades de 20-200 μL , 100-1000 μL e 500-5000 μL ;
- n) Liofilizador, Labconco, modelo FreeZone 4.5;
- o) Purificador de água da marca Merck/Millipore, modelo Milli-Q[®] Integral;
- p) Microscópio confocal (A1R MP+ Nikon laser scanning confocal microscope) (Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular);
- q) Leitor de microplacas (BIOTEK, EPOCH) (Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular);
- r) Estufa de CO₂ (Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular).

Solventes e reagentes:

- a) Solventes e reagentes químicos P.A.: os solventes metanol (CH₃OH), clorofórmio (CHCl₃), dimetilsulfóxido (Me₂SO), etanol (CH₃CH₂OH) e reagentes químicos hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), sulfato de cobre (CuSO₄), borohidreto de sódio (NaBH₄), ácido trifluoroacético (CF₃COOH, TFA), ácido tricloroacético (CCl₃COOH, TCA), iodeto de metila (CH₃I), periodato de sódio (NaIO₄), tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆), anidrido acético (C₄H₆O₃), piridina (C₅H₅N), ácido acético (CH₃COOH), ácido fórmico (CH₂O₂), utilizados foram de grau P.A. de diferentes marcas (Synth, Merck, Panreac, Vetec, Neon, Ohemis etc).
- b) Solventes grau CLAE para injeção de amostras no CG-EM: acetona e hexano, marca Panreac;
- c) Solventes deuterados para as análises de RMN: óxido de deutério (D₂O, 99,9%) e dimetilsulfóxido deuterado (Me₂SO-*d*₆, 99,9%) das marcas Sigma-Aldrich e Acros Organics;
- d) Materiais de consumo utilizados nos ensaios biológicos: meio de cultivo DMEM (Lonza), soro fetal bovino (GIBCO), tampão HEPES (GIBCO), vermelho neutro (SIGMA), MTT - *Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide* (SIGMA), cristal violeta (SIGMA), bicarbonato de sódio, antibióticos penicilina-

estreptomicina, microplacas de 6 e 96 poços (Sarsted); Fluoromon™ (E. M. S), paraformaldeído (Electron Miscroscopy Sciences)

e) Outros: resina trocadora de cátions fortemente ácida (marca DIELAB), papel indicador de pH (marca MACHEREY-NAGEL).

3.3. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Uma alíquota dos basidiomas, liofilizados e triturados, de *H. marmoreus* ($m_{seca} = 100$ g), foi submetida à extração aquosa, na temperatura de aproximadamente 10 °C, sob agitação mecânica por 6 horas (1,2 L). Decorrido o tempo, o material foi filtrado com a finalidade de separar o extrato aquoso do material residual. Esse processo de extração, seguido por filtração, foi repetido por mais 3 vezes para material residual. Os extratos aquosos obtidos a partir dos 3 ciclos de extração foram reunidos, concentrados sob pressão reduzida e submetidos a precipitação com etanol (3:1, v/v). O extrato polissacarídico bruto (precipitado etanólico), separado por centrifugação (9000 rpm, 15 °C, 10 min), foi dialisado em membranas de 12-14 kDa contra água corrente por aproximadamente 24 h e liofilizado, resultando na fração denominada de *Hm-AF*.

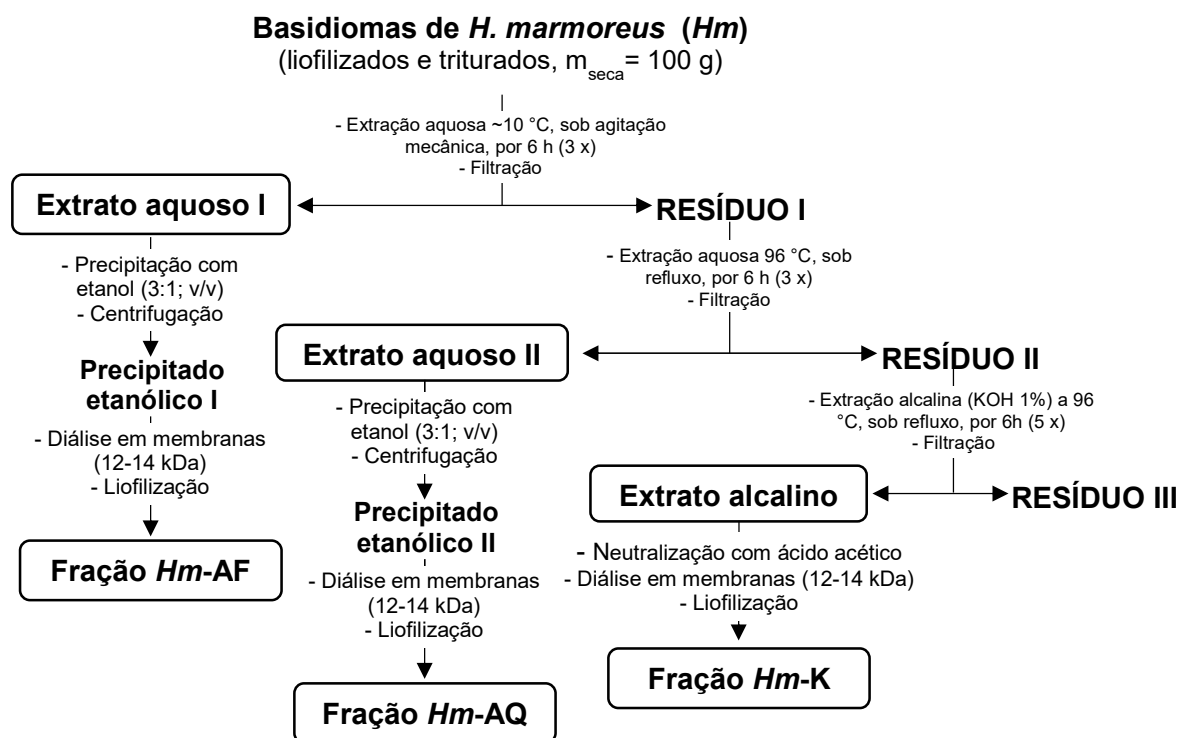
A massa fúngica resultante do procedimento anterior (material residual I) foi submetida à extração aquosa em banho com água fervente (aproximadamente 96 °C) sob refluxo, por 8 horas (1 L; por 3 vezes). Após remoção do resíduo por filtração, os extratos obtidos foram tratadas de forma similar à extração anterior, resultando na fração denominada de *Hm-AQ*.

Após extração exaustiva da massa fúngica com água, o material residual II foi tratado com solução aquosa de hidróxido de potássio 1%, sob refluxo em banho com água fervente (aproximadamente 96°C), por 8 horas (500 mL).

Decorrido o tempo, o extrato alcalino foi separado do material residual por filtração. Este procedimento foi repetido por 5 vezes, sendo os extratos alcalinos reunidos, neutralizado com ácido acético (CH₃COOH), dialisado em membranas de 12-14 kDa contra água corrente por aproximadamente 48

horas, concentrado sob pressão reduzida até pequeno volume e liofilizado, resultando na fração denominada *Hm-K* (Figura 3.2, p. 27).

Figura 3.2 - Esquema do processo de obtenção dos polissacarídeos de *H. marmoreus*, através de extrações aquosas e alcalinas.



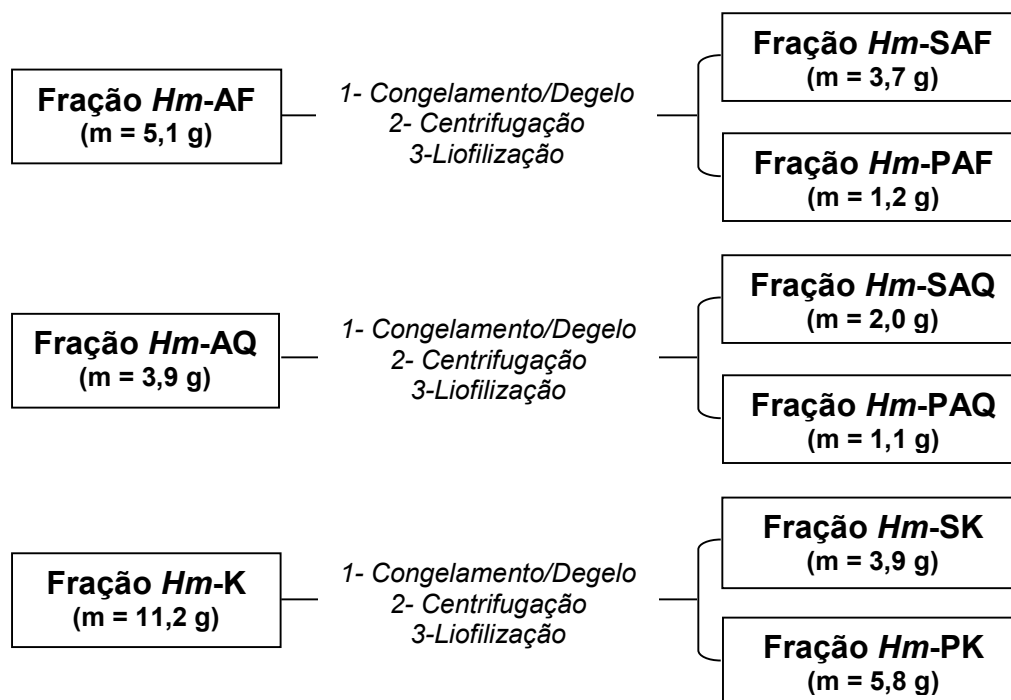
3.4. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1. Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

Os extratos polissacarídicos obtidos (*Hm-AF*, *Hm-AQ* e *Hm-K*) foram submetidos, primeiramente, ao processo de congelamento e degelo, separando-os de acordo com a solubilidade dos mesmos em água a temperaturas baixas (10. Para isto, cada fração polissacarídica, previamente solubilizada em água destilada, foi congelada e posteriormente mantida a temperatura ambiente até o descongelamento, Em seguida, as frações foram centrifugados (9000 rpm, 15 min, 15 °C; ou 9000 rpm, 30 min, 5 °C), fracionando-os em precipitados (*Hm-PAF*, *Hm-PAQ* e *Hm-PK*) e sobrenadantes (*Hm-SAF*, *Hm-SAQ* e *Hm-SK*) de gelo e degelo. Esse processo de purificação

foi repetido diversas vezes até que os sobrenadantes não apresentassem material insolúvel em água fria e vice-versa (Figura 3.3, p. 28).

Figura 3.3 - Esquema do fracionamento de polissacarídeos de *H. marmoreus*, através da técnica de congelamento/degelo



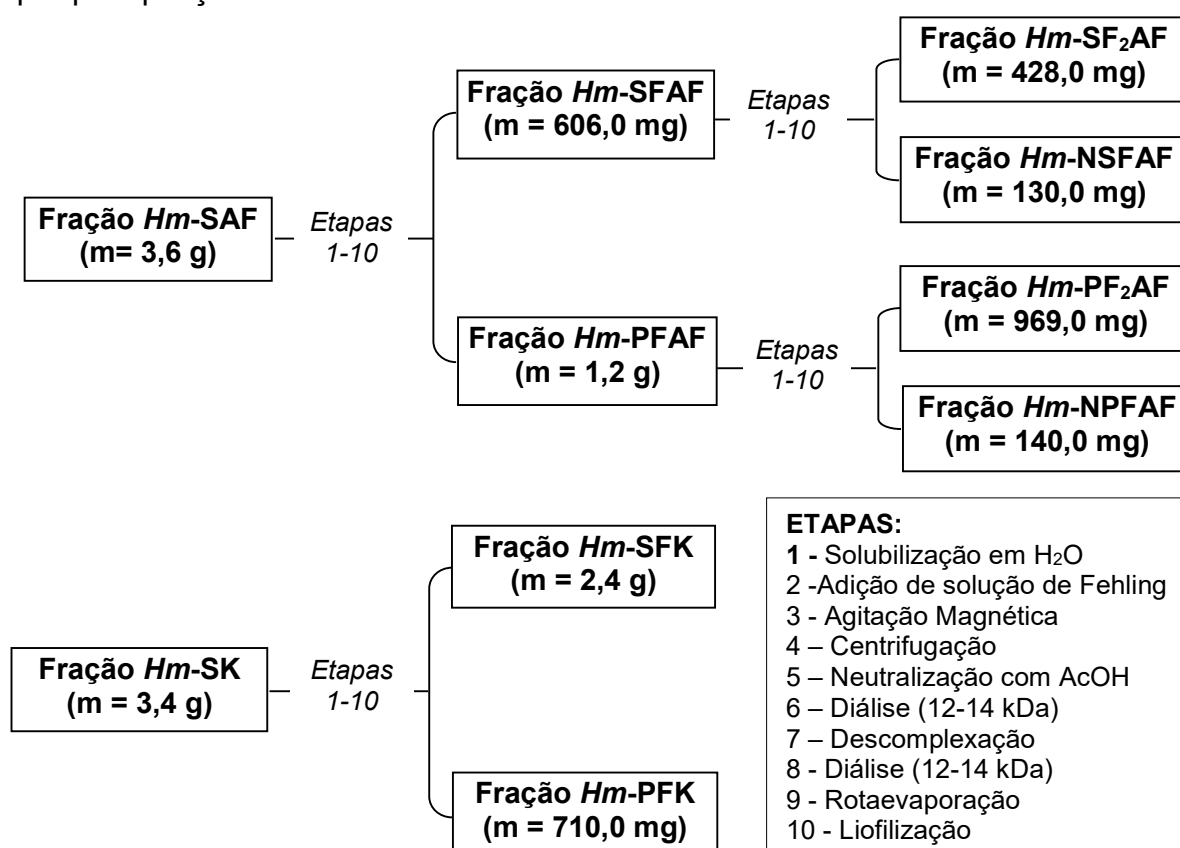
3.4.2. Precipitação de Polissacarídeos com sulfato de cobre em meio alcalino

As frações solúveis em água fria originadas a partir do processo de congelamento e degelo (*Hm-SAF* e *Hm-SK*) foram, separadamente, solubilizadas em água destilada (relação m/v = 1:15, g/mL) e submetidas a precipitação com solução de sulfato de cobre em meio alcalino (solução de Fehling; JONES, STOODLEY, 1965), para isto foi adicionado igual volume da solução de Fehling à fração previamente dissolvida em água.

Após agitação magnética, a solução resultante foi mantida sob refrigeração por aproximadamente 12 h. Decorrido o tempo, a solução resultante foi separada por centrifugação, resultando na formação de complexos cúpricos solúveis (denominados de sobrenadante de Fehling: *Hm-SFAF* e *Hm-SFK*) e insolúveis (denominados de precipitado de Fehling: *Hm-PFAF* e *Hm-PFK*), os quais foram neutralizados com ácido acético e dialisados

contra água corrente em membranas de 12-14 kDa por aproximadamente 24 h. Após a diálise, os mesmos foram tratados com resina catiônica com o objetivo de remover o cobre remanescente, filtrados em algodão e novamente dialisados sob as mesmas condições anteriores. Em seguida, os materiais foram concentrados sob pressão reduzida e liofilizados. Este procedimento foi repetido para as frações *Hm*-PFAF e *Hm*-SFK, resultando nas frações *Hm*-PF₂AF e *Hm*-SF₂AF (Figura 3.4), respectivamente.

Figura 3.4 - Esquema do fracionamento de polissacarídeos de *H. marmoreus*, por precipitação com sulfato de cobre em meio alcalino

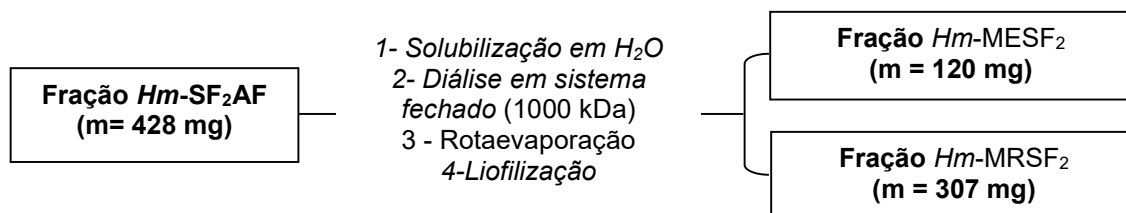


3.4.3. Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas

A fração *Hm*-SF₂AF foi dialisada, sob refrigeração, em membrana com limite de exclusão de 1000 kDa (Spectra/Por[®]), através de um sistema fechado, contra água destilada. A cada 24 h, a fração eluída foi trocada (4 x), até que a fração eluída não apresentasse coloração. Ao final do procedimento, as frações

obtidas (Eluída: *Hm-MESF₂*; Retida: *Hm-MRSF₂*) foram concentradas sob pressão reduzida e liofilizadas (Figura 3.5, p. 30).

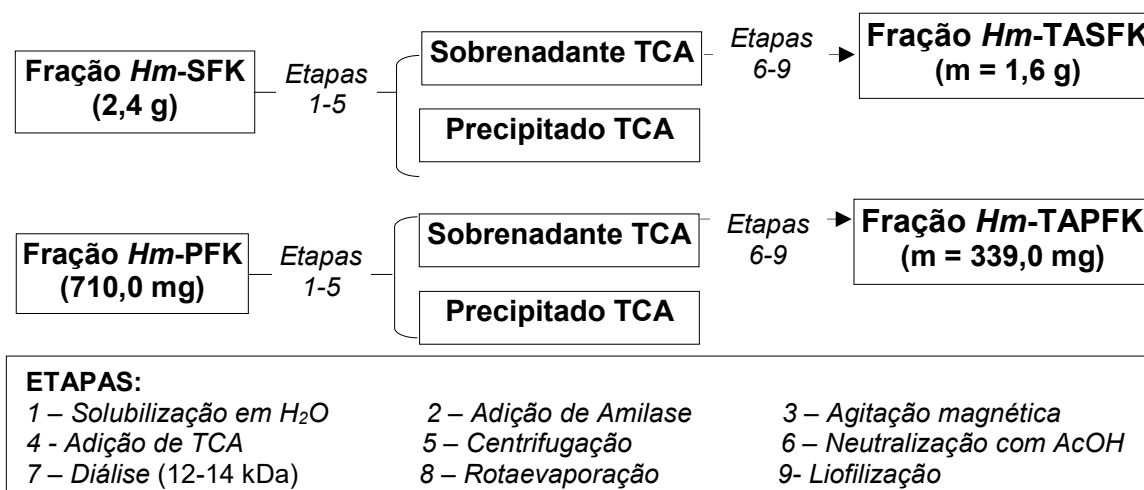
Figura 3.5 - Esquema do fracionamento da fração *Hm-SF₂AF* obtida de *H. marmoreus*, por diálise em membrana



3.4.4. Tratamento com Amilase

As frações *Hm-SFK* (m = 2,4 g) e *Hm-PFK* (m = 710 mg) foram solubilizadas em água destilada e tratadas com amilase sob agitação magnética a temperatura ambiente, por aproximadamente 6 horas. Decorrido o tempo, a enzima foi desnaturada por adição de ácido tricloroacético até concentração igual a 3% e removida por centrifugação (9000 rpm, 15 °C, 10 min). As frações sobrenadantes deste tratamento foram neutralizadas com NaOH, dialisadas (12-14 kDa, aproximadamente 24 h), concentradas sob pressão reduzida e liofilizadas, resultando nas frações *Hm-TASFK* (m = 1,6 g) e *Hm-TAPFK* (m = 339,0 mg), respectivamente (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Esquema do tratamento com amilase de frações polissacarídicas obtidas de *H. marmoreus*

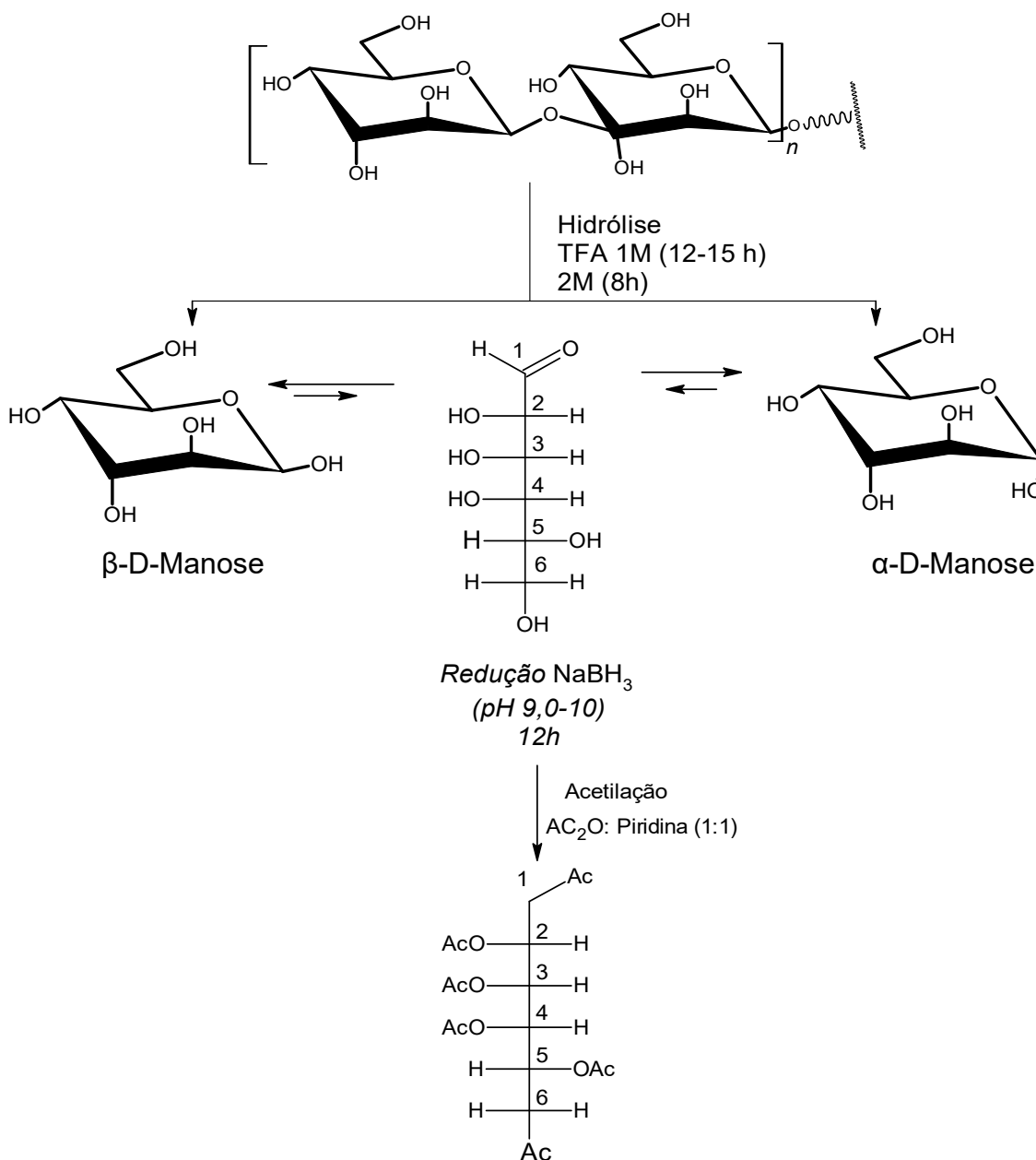


3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

3.5.1 - Determinação da Composição Monossacarídica

A composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas de *H. marmoreus* foi determinada por CG-EM após a conversão das mesmas em acetatos de alditóis (WOLFROM & THOMPSON, 1963 a,b) (Figura 3.7), conforme descrito a seguir.

Figura 3.7 – Representação esquemática da conversão de polissacarídeos em acetatos de alditóis.



Para isto, uma alíquota de cada fração (1-2 mg) foi hidrolisada em estufa à 100 °C com 200-500 µL de TFA 1 ou 2 M, por um período de 12-15 (*overnight*) ou 8 h, respectivamente (APÊNDICE A, p. 85). Decorrido o tempo de hidrólise o ácido foi removido por evaporação com auxílio de um jato de ar suave, produzido por uma bomba de vácuo tecnal, modelo TE-0581.

Os produtos de hidrólise foram suspensos com H₂O destilada (50-100 µL) e reduzidos com NaBH₄ (pH 9,0-10,0) por aproximadamente 12 h. Em seguida, o meio reacional foi neutralizado com resina catiônica fortemente ácida (H⁺), filtrado em algodão e liofilizado. O ácido bórico, formado durante este processo, foi eliminado por co-evaporação com metanol (adição de alíquotas de aproximadamente 50 µL; 4 x) na forma de borato de trimetila [B(OCH₃)₃] (APÊNDICE B, p. 86).

Após remoção do ácido bórico, os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético e piridina (1:1, v/v) sob temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas (APÊNDICE C, p. 88).

Os acetatos de alditóis formados foram extraídos com clorofórmio (CHCl₃) (~1 mL), e a piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por complexação com sulfato de cobre 5 % (m/v). Após a remoção completa da piridina, o CHCl₃ foi evaporado e os derivados acetilados, previamente solubilizados em acetona grau CLAE, foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

As injeções (1 µL) foram feitas no modo *splitless*, com o injetor a 250 °C e detector a 280 °C. Foi utilizada a seguinte programação de temperatura no forno para a análise quantitativa de acetatos de alditóis: 75 °C por 1 min seguida das seguintes rampas de aquecimento de 35 °C/min até 100°C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min) e rampa de 65 °C.min até 240 °C (2 min) (Coluna HP5-MS); 50 °C por 1 min com rampa de 40 °C/min até 220 °C, mantida isotermicamente por 20 min (Coluna DB-225-MS). Hélio ultrapuro foi usado como gás arraste, a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado no modo ionização por Impacto de Elétrons (EI), com voltagem de 70eV.

Os constituintes monossacarídicos foram identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa obtidos para padrões de acetatos de alditóis formados a partir dos monossacarídeos raminose, fucose, arabinose, xilose, ribose, manose, galactose e glucose, por derivatização química (redução com NaBH_4 e acetilação)

3.5.2. Determinação do Tipo de Ligação Glicosídica dos Polissacarídeos por Metilação

As frações purificadas (*Hm-PF₂AF*) foram metiladas pelo método de CIUCANU e KEREK (1984), com a finalidade de definir os tipos de ligações glicosídicas existentes nestes polímeros. Para a metilação, uma alíquota desta fração (~15 mg) foi solubilizada em 1 mL de Me_2SO . Após solubilização, foi adicionado NaOH seco e triturado (4:1 de carboidratos; m/m) e 1 mL de CH_3I , sendo a mistura reacional submetida a agitação vigorosa em vórtex por 30 a 40 min. Após um período de repouso (~ 24 h), a amostra foi neutralizada com CH_3COOH , dialisada (8 kDa) e liofilizada para ser submetida à hidrólise ácida total (APÊNDICE A e E, p. 85 e 100).

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados (alíquota de 1-2 mg) foi realizada em estufa a 100 °C utilizando ácido fórmico (CH_2O_2), por 12 horas. Após o período necessário para hidrólise, o ácido foi evaporado e o material residual foi reduzido com NaBH_4 e acetilado conforme citado anteriormente (seção 3.5.1, p. 31).

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados em CG-EM. Foi utilizada a seguinte programação de temperatura no forno: 75 °C por 1 min seguida das seguintes rampas de aquecimento de 35 °C/ min^{-1} até 100°C (5 min^{-1}), 45 °C/ min^{-1} até 150 °C (5 min^{-1}), 55 °C/ min^{-1} até 200 °C (15 min^{-1}), 65 °C/ min^{-1} até 250 °C (10 min^{-1}) e rampa de 50 °C/ min^{-1} até 270 °C (10 min^{-1}) (Coluna HP5-MS); 50 °C por 1 min^{-1} com rampa de 40 °C/ min^{-1} até 215 °C, mantida isotermicamente por 27 min^{-1} (Coluna DB-225-MS). As demais condições utilizadas para estas análises foram similares a descrita na seção 3.5.1 (p. 31).

A identificação dos acetatos de alditóis parcialmente metilados foi realizada através do tempo de retenção e fragmentação de massa, sendo estes confirmados por comparação com a literatura (SASSAKI et al., 2005). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa de cada derivado.

3.5.3. Hidrólise Ácida Parcial

Na tentativa de eliminar as cadeias laterais do polímero da fração *Hm-PF₂AF*, uma alíquota (70 mg) da mesma foi submetida a hidrólise ácida parcial em condições brandas, ou seja, TFA 0,2 M (1 mL) em estufa a 100 °C por 3 horas. Decorrido o tempo, o meio reacional foi neutralizado com NaOH 1 M, dialisado contra água corrente em membrana com limite de exclusão de 2 kDa por aproximadamente 12 horas e liofilizado, resultando na fração denominada *Hm-HPPF*.

3.5.4. Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração (HPSEC-RID)

A análise da homogeneidade e massa molar das frações polissacarídicas obtidas de *H. marmoreus* foram realizadas em colaboração com as professoras Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva e Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT-UNESP), Presidente Prudente, São Paulo.

A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de NaNO₃ a 0,1 M contendo azida sódica 0,03 %, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Esse eluente também foi utilizado para preparar as amostras para serem analisadas (concentração final de 1 mg. mL⁻¹).

Para a determinação da massa molecular aparente (M_{wapp}) do polímero, foi elaborada uma curva padrão de dextrana com massa molecular de 1400, 1100, 670, 500, 410, 266, 150, 77,8, 72,2, 50, 40,2 e 9,4 kDa.

A análise de dados foi realizada usando o *software* (Data Management) Shimadzu Company, Kyoto, KYT, Japão).

3.5.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Moraes Lião do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia, *Campus Samambaia*.

Para a determinação estrutural dos polímeros, foram utilizadas as seguintes técnicas: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN de ^{13}C), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H), COSY, TOCSY, HSQC-DEPT, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY.

As frações polissacarídicas analisadas por RMN foram solubilizadas em D_2O ou $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ na proporção massa/volume de 40 mg/500 μL e analisadas na temperatura de 50 e/ou 70 $^\circ\text{C}$.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, sendo a calibração dos espectros realizada de acordo com os valores de ^{13}C e ^1H do padrão interno tetrametilsilano (TMS; $\delta_{\text{C/H}} = 0,0$) ou do $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ($\delta^{13}\text{C} = 39,70$; $\delta^1\text{H} = 2,50$), para as amostras solúveis em D_2O ou $\text{DMSO}-d_6$, respectivamente. O processamento dos espectros de RMN foi realizado pelo software *TopSpin*TM, da Bruker, versão 3.5 pl7.

3.6. AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA FUCOMANOGLACTANA PURIFICADA de *H. marmoreus* (Hm-FMG)

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e a Dra. Stellee Marcela Petris Biscaia, ambos do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

3.6.1. Linhagem e Cultivo Celular

A linhagem celular utilizada nesta pesquisa foi a de melanoma murino B16-F10, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas foram cultivadas em frascos de cultura de células (Sarstedt) contendo meio DMEM - alta glucose/piruvato, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1,5 g/L de

bicarbonato de sódio, 0,25 µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% de salina, e então mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C, sob atmosfera úmida. Os experimentos foram realizados com as células em passagens de 1 a 5 e confluência celular entre 70 a 90%.

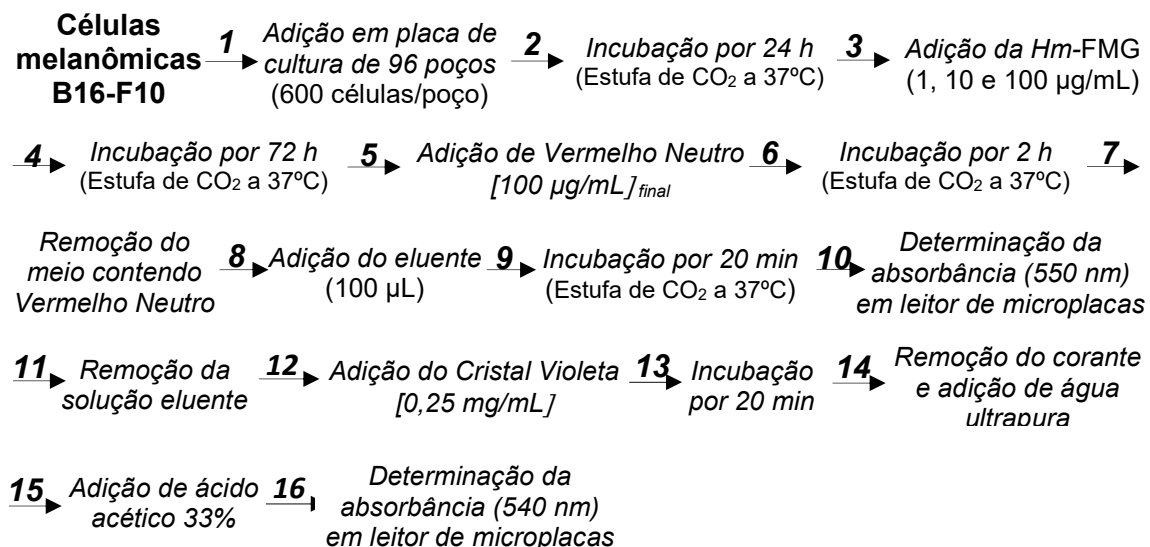
3.6.2. Métodos do Vermelho Neutro e Cristal Violeta

O método de Vermelho Neutro (VN) foi realizado de acordo com as metodologias descritas previamente (ICCVAM, 2006; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009; REPETTO, DEL PESO; ZURITA, 2008). Para o ensaio, as células B16-F10 foram cultivadas e então transferidas para placas de 96 poços, 600 células por poço. Após 24 horas, estas foram tratadas com a fucomanogalactana de *H. marmoreus* (Hm-FMG) nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C por 72 horas.

Duas horas antes do término de exposição do polissacarídeo, foi adicionado em cada poço a solução de vermelho neutro (concentração final de 100 µg/mL). Após o tempo de incubação, o meio contendo vermelho neutro foi removido, e a seguir foi adicionado 100 µL de uma solução eluente (etanol: água ultrapura: ácido acético glacial, 50:50:1). Decorrido o tempo de incubação (20 min), foi realizada a leitura da absorbância (550 nm) em leitor de microplacas.

Após a determinação da absorbância, foi dado prosseguimento a avaliação da densidade celular (BONNEKOH et al., 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011). As células residuais aderidas a microplaca foram coradas com uma solução de cristal violeta 0,25 mg/mL por 20 min, lavadas com água ultrapura (2 x) e então eluídas com uma solução aquosa de ácido acético 33%. A absorbância de cada poço foi determinada com auxílio do leitor de microplacas (540 nm).

Etapas do ensaio de viabilidade celular pelo método do vermelho neutro (etapas 1-10) e da densidade celular através do ensaio por coloração com cristal violeta (etapas 11-16):



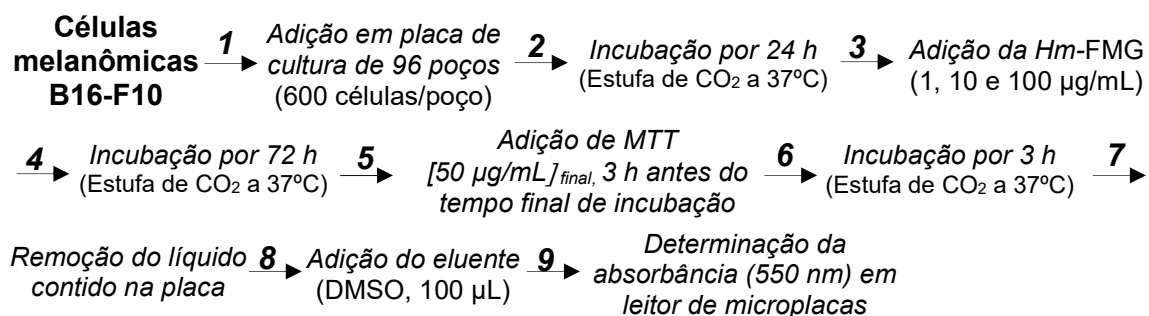
3.6.3. Método do MTT

O ensaio do MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSMANN (1983). Células B16-F10 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, totalizando 600 células por poço. Após 24 horas, estas foram tratadas com a heterogalactana (*Hm-FMG*) nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL por 72 horas.

Três horas antes do final do período de tratamento, adicionou-se em cada poço MTT, diluído em tampão fosfato-salino (PBS), até atingir a concentração final de 50 µg/mL.

Ao final do tempo de incubação, removeu-se todo o líquido da placa, e os cristais de formazan formados foram eluídos em 100 µL de DMSO. Em seguida, foi realizado a leitura da absorvância (550 nm) em leitor de microplacas.

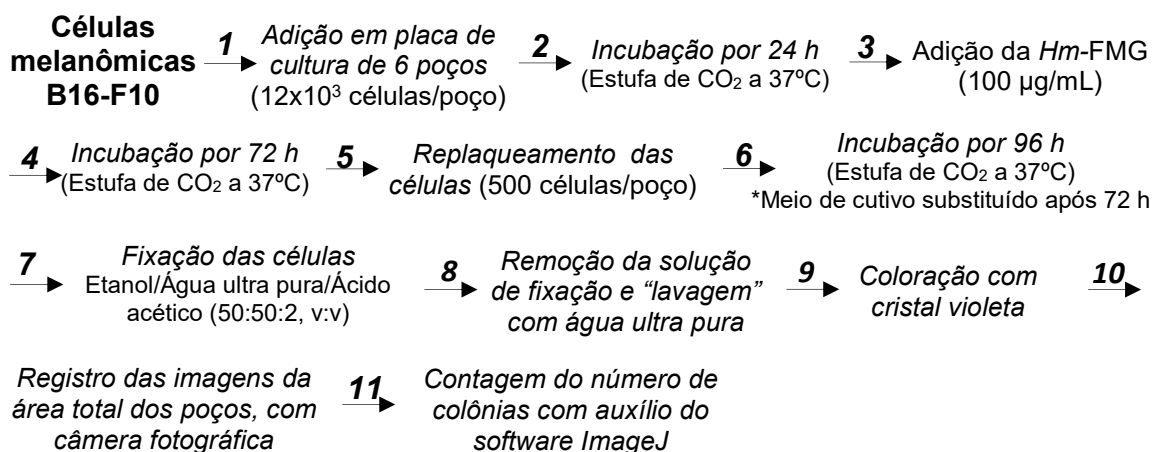
Etapas do ensaio do MTT:



3.6.4. Avaliação da Formação de Colônias

O ensaio de formação de colônia ou clonogênico foi realizado segundo o método descrito por FRANKEN e colaboradores (2006). Para esta avaliação foram plaqueadas 12 mil células em microplacas de 6 poços, as quais foram após 24 h, tratadas com o polissacarídeo Hm-FMG (100 µg/mL) e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C por 72 h. Decorrido o tempo, as células foram replaqueadas (500 células por poço) e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente por 96 h, sendo o meio de cultura substituído após 72 h. Ao final do período de formação de colônias, as células foram fixadas em solução de etanol/água ultra pura/ácido acético (50:50:2, v:v), lavadas com água ultra pura e coradas com cristal violeta. A área total dos poços foi fotografada e as imagens obtidas foram analisadas com o software *ImageJ* para a contagem do número de colônias visíveis formadas.

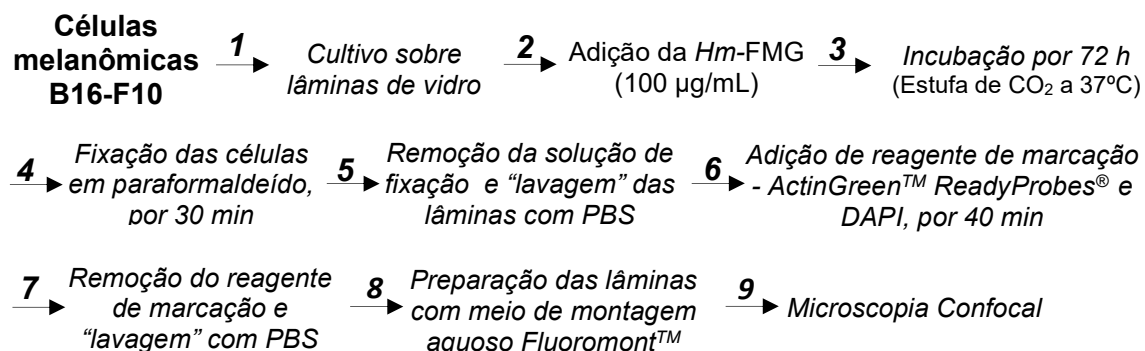
Etapas do ensaio de avaliação da formação de colônias:



3.6.5. Avaliação da Morfologia Celular por Microscopia Confocal

A morfologia celular foi avaliada pelo método de imunomarcação para visualizar filamentos de actina e núcleo celular. Brevemente, as células melanômicas B16-F10 foram cultivadas sobre lâminas de vidro e então tratadas com a heterogalactana (*Hm-FMG*, 100 µg/mL) por 72 h. Após, as células expostas ao polissacarídeo e as controle foram fixadas em paraformaldeído, diluído em PBS (2:100, v/v), por 30 minutos, lavadas e então incubadas com o reagente de marcação - ActinGreen™ ReadyProbes® (1:40) e DAPI (1:1000; em PBS contendo saponina 0,01%) por 40 minutos. Decorrido o tempo, as lâminas foram lavadas, preparadas com o meio de montagem aquoso Fluoromont™ e analisadas em microscópio confocal.

Etapas da avaliação da morfologia celular:



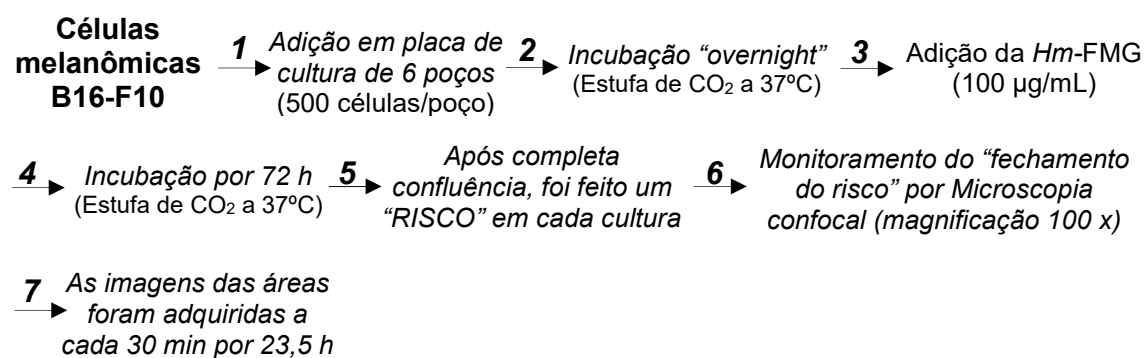
3.6.6. Avaliação da Migração Celular

O protocolo de migração celular foi baseado na metodologia descrita por LIANG, PARK e GUAN (2007). Brevemente, consiste na formação de um risco ("scratch") mecânico em uma monocamada de células aderentes, e então as células que restaram na placa tem o estímulo de migrarem até fechar a abertura realizada, para que possam assim reestabelecer as interações célula-célula.

Para este ensaio, foram plaqueadas 500 células melanômicas B16-F10 por poço em microplacas de 6 poços, as quais foram mantidas "overnight" em

incubadora de CO₂. As células foram tratadas com o polissacarídeo *Hm-FMG* (100 µg/mL) e deixadas em estufa de CO₂ por 72 h. Uma adicional cultura de células sem o tratamento com a heterogalactana foi utilizada como controle. Após reestabelecerem a completa confluência, foi feito um “risco” com uma ponteira estéril de pipetador automático. O fenômeno de “fechamento do risco” foi monitorado por microscopia confocal (magnificação de 100 x), sendo as imagens das áreas adquiridas a cada 30 min por 23,5 h. A porcentagem da área aberta do risco ao longo do tempo foi mensurada com o auxílio do programa *TScratch*.

Etapas da avaliação da migração celular:



4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O macrofungo *Hypsizygus marmoreus* tem se mostrado como uma fonte importante de substâncias bioativas. Embora haja inúmeros relatos a respeito de seus efeitos benéficos à saúde, ainda há poucos estudos relacionados à estrutura química dos compostos responsáveis por estas propriedades.

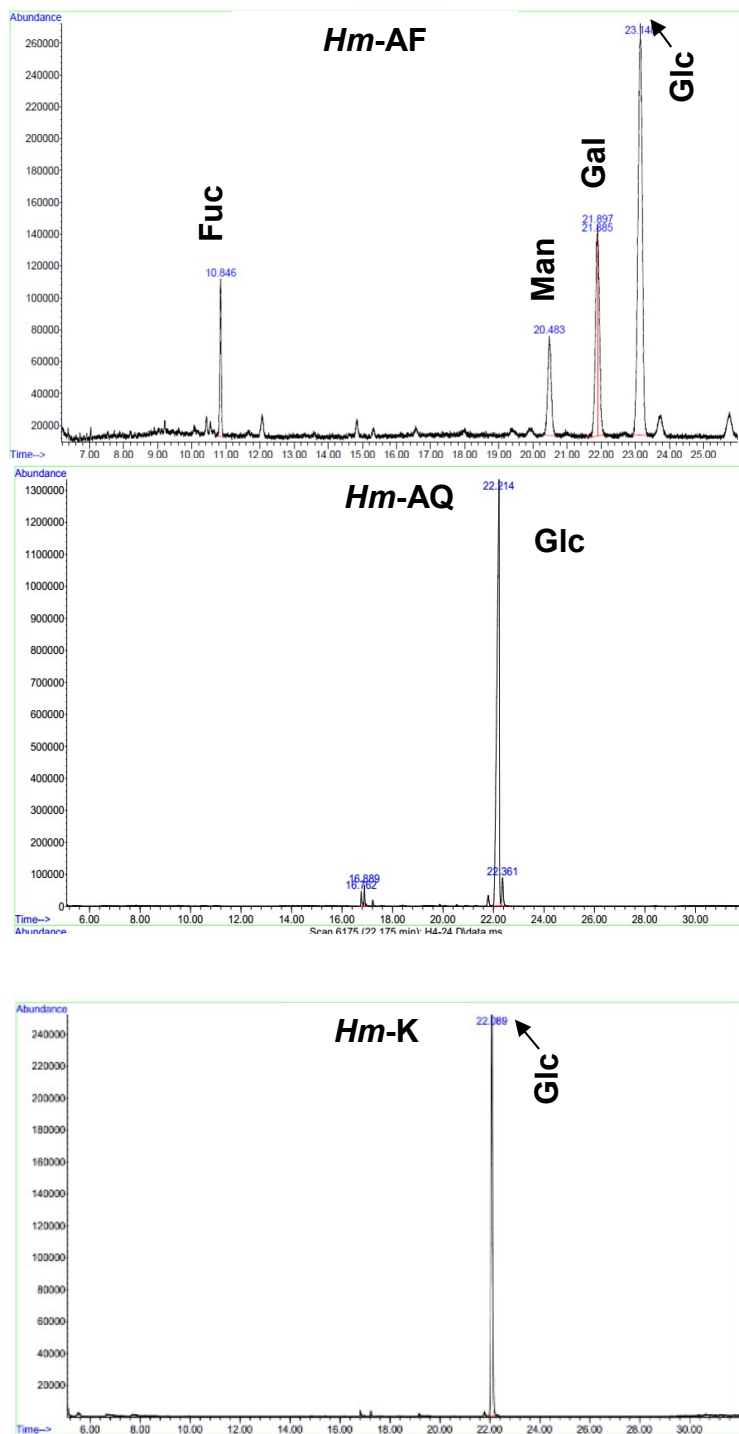
Visando o estudo dos polissacarídeos deste cogumelo, pois são considerados os principais moduladores de resposta biológica nestes organismos, uma alíquota de seus basidiomas (100 g), previamente liofilizados (89% de umidade), foi submetida às extrações aquosas (H₂O a 10 °C, sob agitação mecânica; H₂O a 96 °C, sob refluxo) e alcalinas (KOH 1% a 96 °C, sob refluxo), sucessivamente (Figura 3.2, p. 27). As frações polissacarídicas,

resultantes da precipitação com etanol e/ou diálise (12-14 kDa) dos extratos obtidos, foram liofilizadas e denominadas de *Hm-AF* (5,1 g), *Hm-AQ* (3,8 g) e *Hm-K* (11,2 g), respectivamente.

Com a finalidade de verificar a composição monossacarídica dos polímeros obtidos em cada tipo de extração realizada, uma alíquota (1-2 mg) de cada fração obtida foi analisada em CG-EM como acetatos de alditóis, obtidos por derivatização química (hidrólise ácida, redução com NaBH₄ e acetilação) (Figuras 3.7, p. 31; e Apêndices A, B e C, p. 85-88). Os monossacarídeos foram identificados pelo tempo de retenção e perfil de fragmentação de massa (Apêndice D, 89), por comparação com o padrão contendo os monômeros comumente encontrados nestes fungos (Raminose: Rha; Fucose: Fuc; Ribose: Rib; Arabinose: Ara; Xilose: Xyl; Manose: Man; Glucose: Glc; e Galactose: Gal) (Tabela 1.1, p. 12 e 13).

A partir destas análises foi observado para a fração *Hm-AF*, obtida por extração aquosa a frio, apresenta uma composição distinta em relação às demais (*Hm-AQ* e *Hm-K*) (Tabela 4.1, p. 43). Os polímeros contidos na fração *Hm-AF* mostraram ser constituídos por fucose (8,4%), manose (12,5%), galactose (16,2%) e glucose (62,7%), enquanto os das frações *Hm-AQ* e *Hm-K* foram compostos majoritariamente de glucose. Cabe ressaltar que, apesar da semelhança na composição química das frações *Hm-AQ* e *Hm-K*, é necessário realizar as análises de RMN de ¹³C e/ou de ¹H para verificar se estas contêm os mesmos polímeros.

Figura 4.1 – Cromatogramas, obtidos por CG-EM, das frações *Hm-AF*, *Hm-AQ* e *Hm-K* isoladas do cogumelo *H. marmoreus*



Condições cromatográficas: Foi utilizada a seguinte programação de temperatura no forno: 75 °C por 1 min, seguida das seguintes rampas de aquecimento de 35 °C/min⁻¹ até 100°C (5 min⁻¹), 45 °C/min⁻¹ até 150 °C (5 min⁻¹), 55 °C/min⁻¹ até 200 °C (15 min⁻¹), 65 °C/min⁻¹ até 250 °C (10 min⁻¹) e rampa de 50 °C/min⁻¹ até 270 °C (10 min⁻¹) (Coluna HP5-MS)

Tabela 4.1 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas brutas (*Hm-AF*, *Hm-AQ* e *Hm-K*) obtidas de *H. marmoreus*.

FRAÇÕES	Rendimento (%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b			
		Fuc	Man	Glc	Gal
<i>Hm-AF</i> ^c	1,2	8,4	12,5	62,7	16,2
<i>Hm-AQ</i> ^d	1,1	-	-	100,0	-
<i>Hm-K</i> ^d	5,8	-	-	100,0	-

^a Rendimento em % calculado em relação à massa seca do cogumelo (100 g).

^b Determinada em CG-EM como acetatos de alditóis, obtidos após hidrólise ácida seguida por redução com NaBH₄ e acetilação, utilizando as colunas DB225-MS^c e/ou HP5-MS.^d

Após extração, as frações polissacarídicas brutas (*Hm-AF*, *Hm-AQ* e *Hm-K*), previamente solubilizadas em água destilada, foram submetidas ao processo de fracionamento por congelamento e degelo, separando-as em frações solúveis (*Hm-SAF*, 3,7 g; *Hm-SAQ*, 2,0 g; e *Hm-SK*, 3,9 g; respectivamente) e insolúveis em água fria (*Hm-PAF*, 1,2 g; *Hm-PAQ*, 1,1 g; e *Hm-PK*, 5,8 g; respectivamente).

Apesar das frações obtidas por este procedimento de fracionamento apresentarem características distintas das de origem em relação à solubilidade, as mesmas apresentaram composições monossacarídicas similares às frações precursoras, com exceção daquelas resultantes da fração *Hm-AF* (*Hm-PAF* e *Hm-SAF*) (Tabela 4.2, p. 44).

Conforme observado na Tabela 4.2 (p. 44), o principal constituinte da maioria das frações obtidas foi a glucose, sugerindo a presença de homopolímeros denominados de glucanas. A única exceção foi a fração *Hm-SAF* a qual mostrou ser constituída por fucose (10,7%), manose (15,2%), glucose (38,9%) e galactose (35,1%), consistente com a composição de heteropolissacarídeos pertencentes à classe das heterogalactanas.

Tabela 4.2 - Composição monossacarídica e rendimento das frações obtidas pelo fracionamento por congelamento e degelo

FRAÇÕES	Rendimento (%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b				
		Rha	Fuc	Man	Glc	Gal
<i>Hm-SAF</i>	3,7	-	10,7	15,2	38,9	35,1
<i>Hm-PAF</i>	1,2	3,8	-	8,6	87,4	-
<i>Hm-SAQ</i>	2,0	-	-	-	100,0	-
<i>Hm-PAQ</i>	1,1	-	-	-	100,0	-
<i>Hm-SK</i>	4,0	-	-	-	100,0	-
<i>Hm-PK</i>	5,8	-	-	-	100,0	-

^a Rendimento em % calculado em relação à massa seca do cogumelo (100 g).

^b Determinada em CG-EM como acetatos de alditéis, obtidos após hidrólise ácida seguida por redução com NaBH₄ e acetilação, utilizando a coluna HP5-MS.

Os resultados e discussões referentes aos polímeros isolados e caracterizados a partir das frações de obtidas por extrações aquosas (*Hm-AF* e *Hm-AQ*) e alcalina (*Hm-K*) de *H. marmoreus*, serão apresentados separadamente a seguir.

4.1. PURIFICAÇÃO e CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS de *H. marmoreus* por EXTRAÇÃO AQUOSA a 10 °C (*Hm-AF*)

4.1.1. Isolamento e Caracterização Química Parcial da β -D-Glucana (1→3) (1→6)

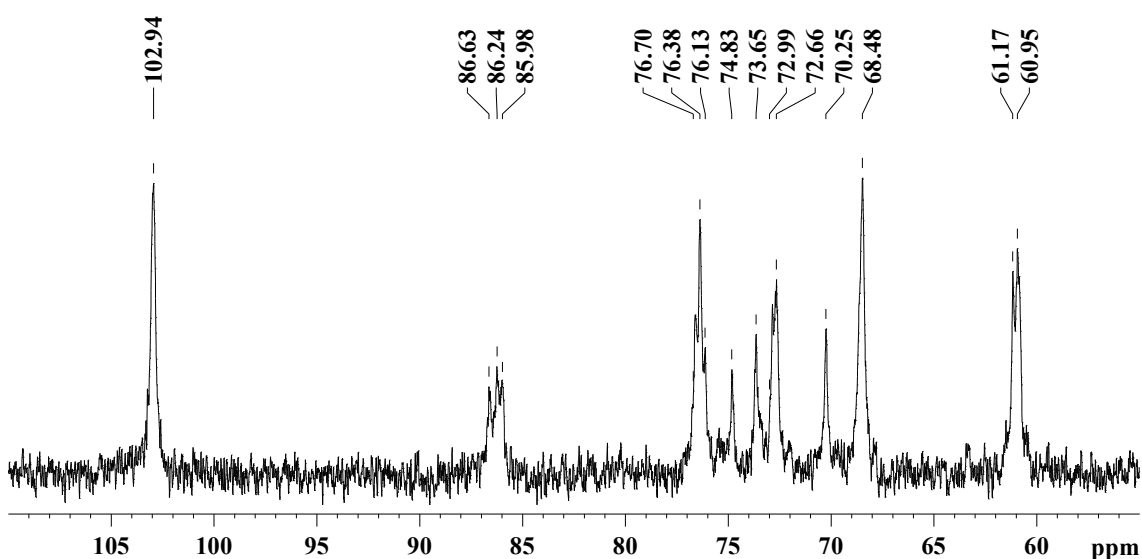
Ao realizar o fracionamento por congelamento e degelo da fração *Hm-AF*, uma parte da mesma tornou-se insolúvel em água em temperaturas baixas, a qual foi denominada de *Hm-PAF*.

Na maioria das vezes, a perda de solubilidade em água de determinadas frações deve-se à formação de complexos, a qual pode ser recuperada após tratamento com soluções alcalinas. Com esta finalidade, a fração *Hm-PAF* foi em solubilizada em NaOH 1 M, neutralizada com ácido acético, dialisada contra água corrente por 24 h (12-14 kDa) e re-submetida ao

processo de congelamento e degelo, sucessivamente, resultando nas frações *Hm-P₂AF* e *Hm-S₂AF*. Este procedimento foi eficiente, pois a maior parte da fração de origem tornou-se solúvel em água fria (*Hm-S₂AF*).

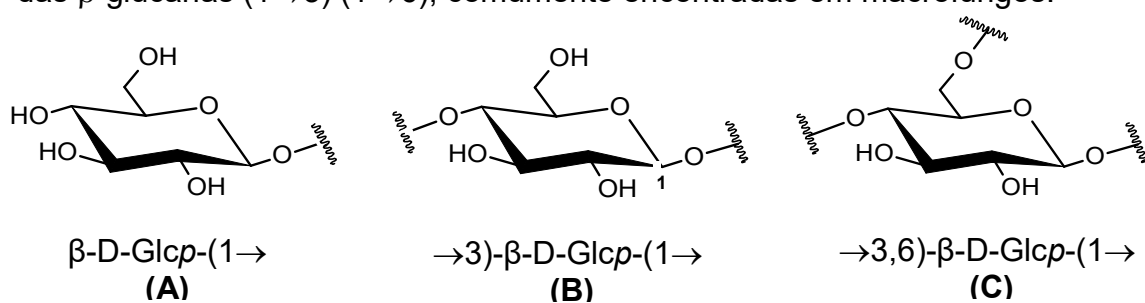
Para verificar o tipo de polímero presente nesta fração solúvel, uma alíquota da mesma (35 mg) foi analisada por RMN de ¹³C, sendo o espectro similar ao da β-glucana contendo ligações glicosídicas do tipo (1→3) e (1→6) (CARBONERO et al., 2012).

Figura 4.2 – Espectro de RMN de ¹³C da fração *Hm-S₂AF*, realizado em Me₂SO-*d*₆ a 70 °C (125 MHz)



Este tipo de polímero é constituído por uma sequência repetitiva formada por três tipos de unidades, ou seja, os terminais não redutores de β-D-Glcp (**A**) e as unidades de β-D-Glcp 3-O- (**B**) e 3,6-di-O-substituídas (**C**).

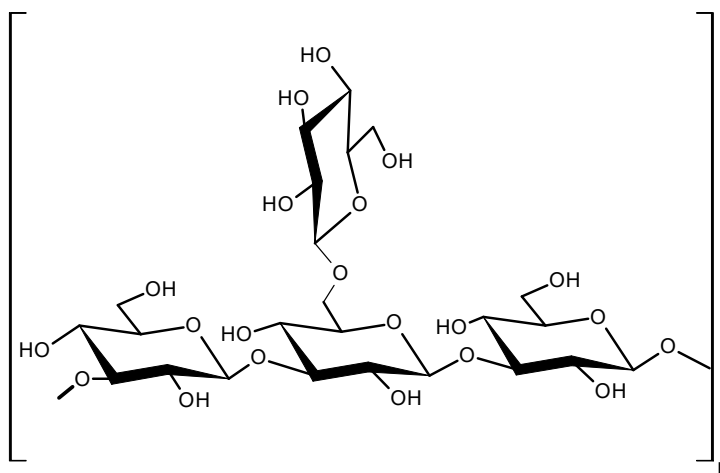
Figura 4.3 - Estrutura química das unidades monossacarídicas constituintes das β-glucanas (1→3) (1→6), comumente encontradas em macrofungos.



Os sinais referentes ao carbono anomérico de cada unidade estão sobrepostos em δ 102,94, indicativo de configuração glicosídica do tipo β . As ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) podem ser confirmadas pelos sinais de C-3 desblindado e C-6 blindado deslocados em δ 86,63; 86,24; 85,98 e δ 68,48, respectivamente (Figura 4.2, p. 45).

Análises adicionais de caracterização estrutural (metilação, degradação de Smith, RMN bidimensionais, entre outras) estão sendo realizadas a fim de confirmar a estrutura proposta, ou seja, β -glucana ramificada contendo uma cadeia principal constituída por unidades de β -D-Glcp ligadas 1 \rightarrow 3, as quais se encontram substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp, em uma relação de 1 unidade de β -Glcp 3-O-substituída para 2 unidades 3,6-di-O-substituídas (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Representação esquemática da β -glucana (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) isolada de *H. marmoreus*



Nestes organismos, β -glucanas similares à isolada de *H. marmoreus* tem sido amplamente descrita, diferenciando-as, principalmente, em relação ao grau de ramificação, massa molecular e solubilidade em água. O crescente interesse por estes polímeros, deve-se aos seus diversos efeitos biológicos, principalmente, antitumoral e imunomodulador.

Embora haja inúmeros estudos sobre a estrutura química e ação biológica deste tipo de molécula, este polímero isolado nesta pesquisa merece

atenção devido a sua solubilidade em água, sendo este um fator decisivo para a aplicação biológica.

4.1.2. Fracionamento e Identificação de Glicogênio

Conforme comentado anteriormente, a fração *Hm-SAF* mostrou-se composta por fucose, manose, galactose e glucose (Tabela 4.2, p. 44). Visando a separação dos polímeros contidos nesta fração, a mesma foi solubilizada em água destilada e tratada com uma solução constituída de CuSO_4 (35,7 g), KOH (173,0 g) e tartarato de sódio e potássio (125,0 g) (solução de Fehling) (JONES, STOODLEY, 1965). Este procedimento resultou na formação de complexos cúprico solúvel e insolúvel, os quais foram denominados de sobrenadante (*Hm-SFAF*, $m = 606,0$ mg) e precipitado de Fehling (*Hm-PFAF*, $m = 1,2$ g), respectivamente. Esta etapa foi repetida para ambas frações, visando a separação eficiente das mesmas, originando duas principais frações denominadas de *Hm-SF₂AF* ($m = 428,0$ mg) e *Hm-PF₂AF* ($m = 969,0$ mg), respectivamente (Figura 4.2, p. 45).

Tabela 4.3 - Composição monossacarídica e rendimento das frações resultantes da precipitação da fração *Hm-SAF* com solução de Fehling

FRAÇÕES	Rendimento (%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b				
		Rha	Fuc	Man	Glc	Gal
<i>Hm-PFAF</i>	1,2	1,0	15,1	18,9	10,1	54,1
<i>Hm-PF₂AF</i>	1,0	-	18,1	19,5	4,05	57,4
<i>Hm-SFAF</i>	0,6	-	1,1	6,2	88,3	3,5
<i>Hm-SF₂AF</i>	0,4	-	2,7	-	84,2	3,1

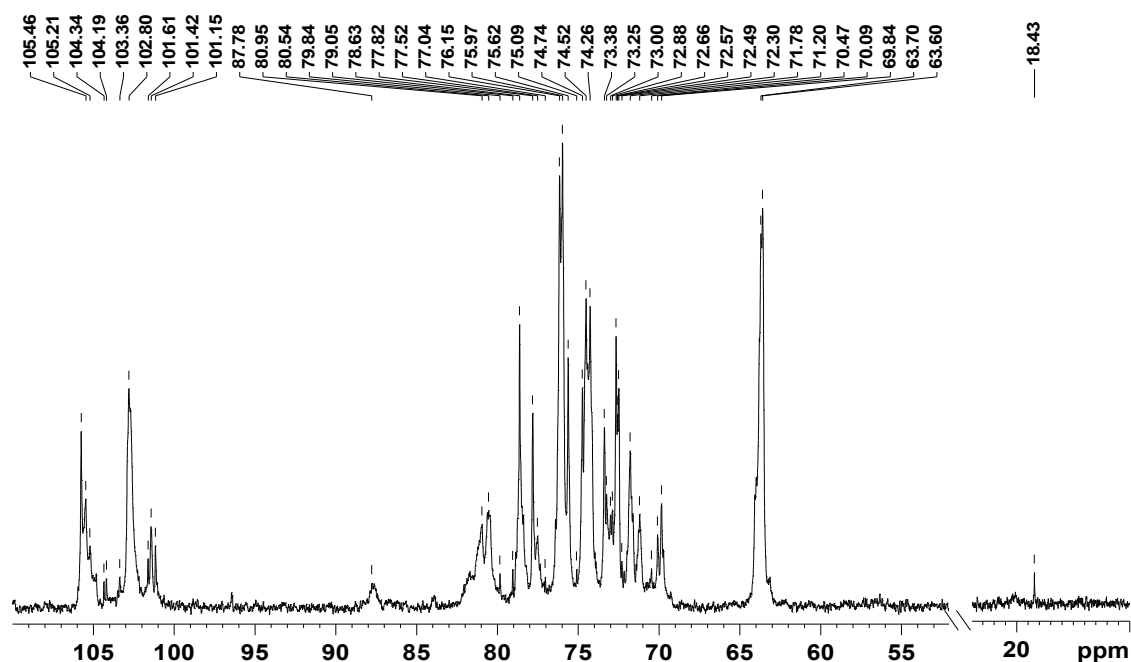
^a Rendimento em % calculado em relação à massa seca do cogumelo (100 g).

^b Determinada em CG-EM como acetatos de alditóis, obtidos após hidrólise ácida seguida por redução com NaBH_4 e acetilação, utilizando as colunas DB225-MS e/ou HP5-MS.

Através das análises de composição monossacarídica, pode ser verificado que o processo de fracionamento com solução cúprica em meio alcalino foi eficiente, pois as frações resultantes mostraram-se distintas. A fração *Hm-SF₂AF* mostrou-se composta majoritariamente por glucose (84,2%), ao contrário da *Hm-PF₂AF* formada principalmente por fucose (18,1%), manose (19,5%) e galactose (57,4%) (Tabela 4.3, p. 47).

Devido aos altos teores de glucose, a fração *Hm-SF₂AF* foi analisada por RMN de ¹³C, sendo o espectro altamente complexo devido à presença de inúmeros sinais, compatível com o de uma fração impura (Figura 4.5, p. 48).

Figura 4.5 – Espectro de RMN de ¹³C da fração *Hm-SF₂AF*, realizado em D₂O a 70 °C (125 MHz)



Com a finalidade de purificá-la, esta foi dialisada em membrana com limite de exclusão de 1000 kDa (sistema fechado), pois a mesma tinha uma consistência gelatinosa em solução aquosa que não pode ser separada pela técnica de congelamento e degelo. Através desta técnica, foi obtida uma fração eluída (*Hm-MESF₂*, m = 120,0 mg) e outra retida (*Hm-MRSF₂*, m = 307,0 mg) na membrana utilizada.

Tabela 4.4 - Composição monossacarídica e rendimento das frações resultantes da precipitação da fração *Hm-SAF* com solução de Fehling.

FRAÇÕES	Rendimento (%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b				
		Ara	Rib	Man	Glc	Gal
<i>Hm-MESF₂</i>	0,1	2,5	-	-	72,9	8,8
<i>Hm-MRSF₂</i>	0,3	1,4	0,8	-	94,8	-

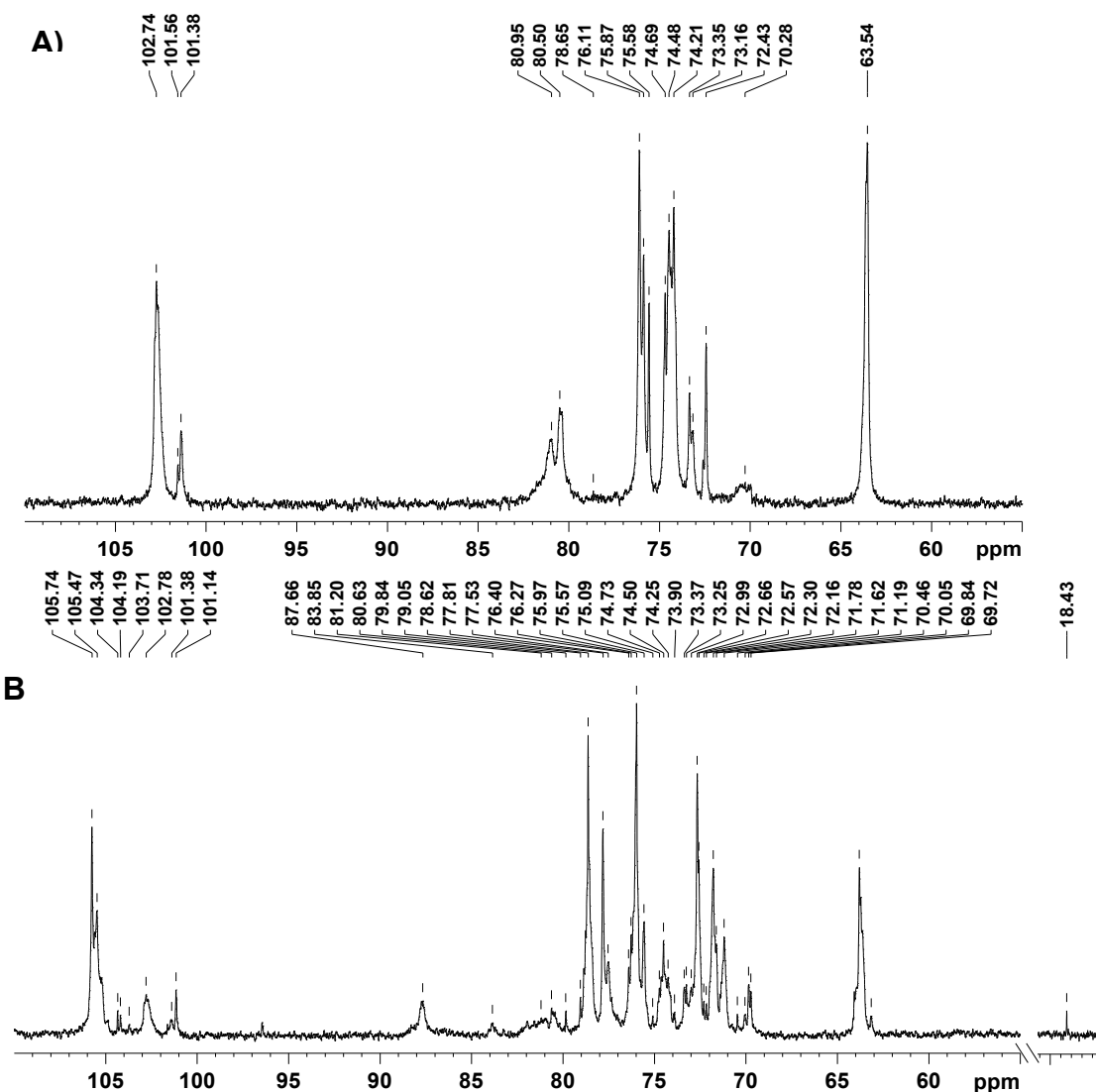
^a Rendimento em % calculado em relação à massa seca do cogumelo (100 g).

^b Determinada em CG-EM como acetatos de alditóis, obtidos após hidrólise ácida seguida por redução com NaBH₄ e acetilação, utilizando as coluna HP5-MS.

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações *Hm-MRSF*₂ e *Hm-MESF*₂ foram distintos (Figura 4.6 A e B, respectivamente; p. 50), sendo o primeiro similar ao do polímero de reserva de fungos, denominado de glicogênio, constituído por unidades de $\alpha\text{-D-Glcp}$ ligadas (1→4) as quais podem ter substituições em O-6 por cadeias laterais constituídas por unidades de $\alpha\text{-D-Glcp}$ 4-O- substituídas, em uma média de 1 ramificação a cada 8 unidades de glucose (Figura 4.6 A, p. 51) (KOMURA et al., 2014). Ao contrário da fração *Hm-MRSF*₂, o espectro da fração eluída (*Hm-MESF*₂) continha sinais característicos de uma $\beta\text{-D-glucana}$ com ligações (1→3) (1→6) em proporções distintas da descrita anteriormente (*Hm-S*₂AF). Esta molécula também foi isolada por extrações alcalinas (*Hm-K*), por isso os detalhes a respeito da estrutura serão abordados posteriormente (seção 4.2, p. 62).

A presença de glicogênio foi confirmada pela formação de um complexo de inclusão termo lábil, de coloração marrom-avermelhada, ao reagir com uma solução constituída por iodo e iodeto de potássio (= Reativo de Lugol).

4.6 – Espectros de RMN de ^{13}C das frações *Hm-MRSF*₂ (A) *Hm-MESF*₂ (B), realizados em D₂O a 70 °C (125 MHz)

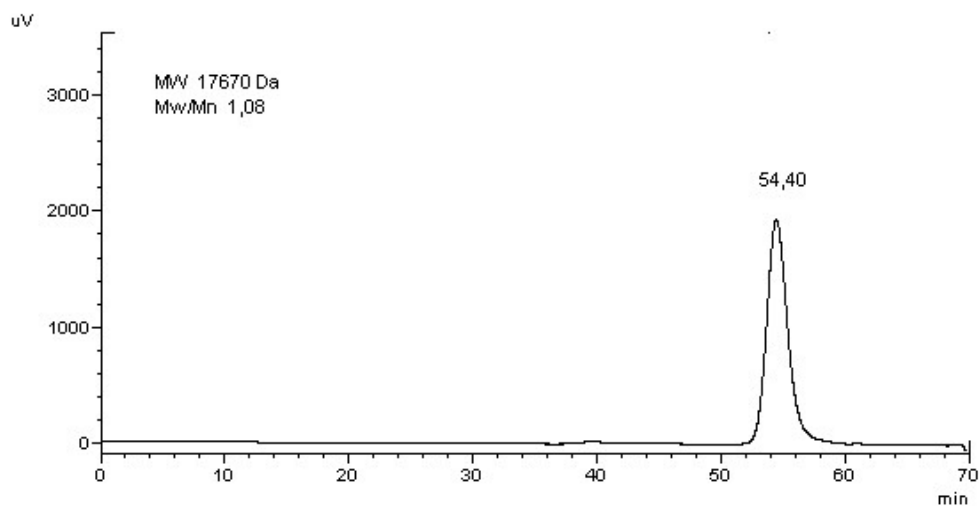


4.1.3. Purificação e Caracterização Química da Heterogalactana

A fração *Hm-PF*₂AF, constituída principalmente por fucose, manose e galactose, apresentou somente um banda simétrica com tempo de retenção de 54,4 min quando analisada por HPSEC-RID, confirmando um perfil homogêneo para esta fração. A massa molecular ponderal média (M_w) do polímero foi de 17.670 Da e o grau de polidispersidade foi de M_w/M_n 1,08 (Figura 4.7, p. 51). De acordo com seus constituintes, este polímero pertence à classe das

hererogalactanas denominadas de fucomanogalactanas, sendo a isolada de *H. marmoreus* chamada de *Hm-FMG*.

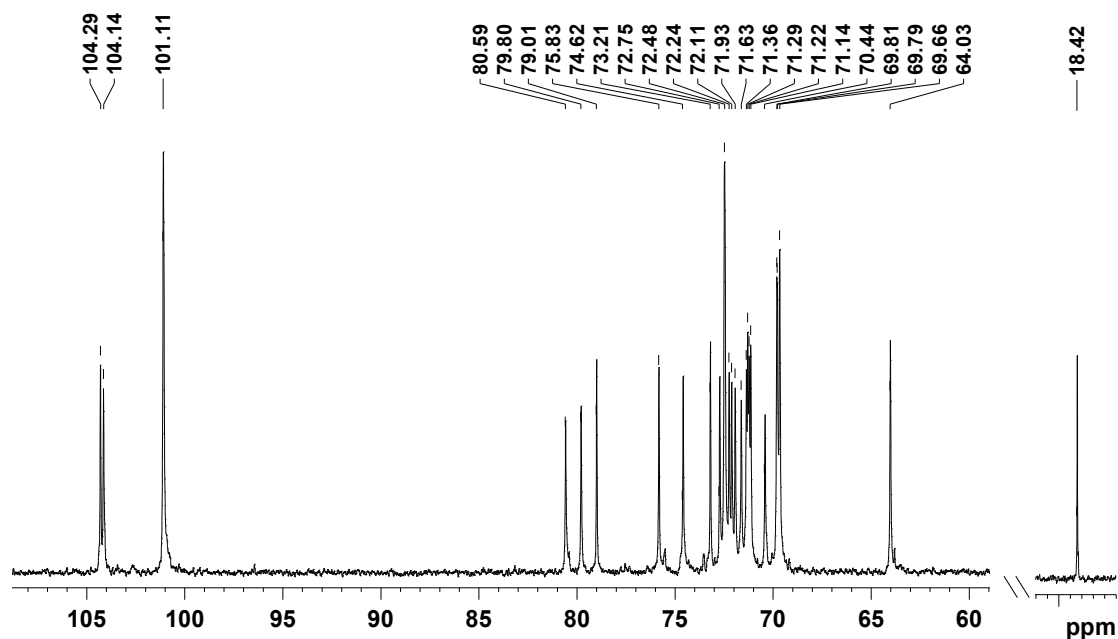
Figura 4.7 – Cromatograma da fração *Hm-PF₂AF* obtido por HPSEC-RID



Para determinar o tipo de configuração e ligação glicosídica, bem como a sequência dos monômeros, uma alíquota da fração *Hm-PF₂AF* (*Hm-FMG*) foi submetida às análises de RMN de ¹³C e de ¹H mono e bidimensionais (HSQC-DEPT, HSQC-TOCSY e HSQC-NOESY).

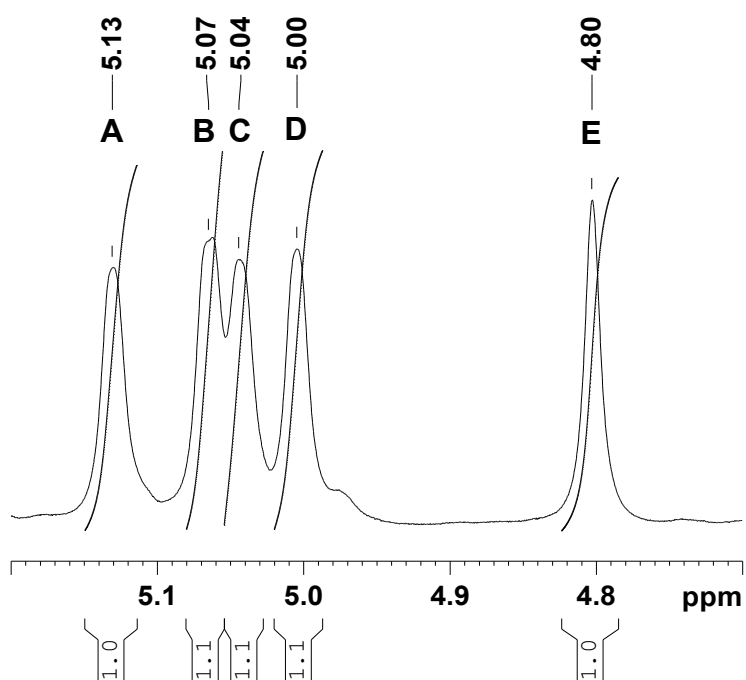
O espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.8, p. 52) apresentou sinais característicos ao da fucomanogalactana isolada de *Lentinus edodes*, a qual é constituída por uma cadeia principal constituída por unidades de α -D-Galp ligadas (1→6), parcialmente substituída em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp e α -L-Fucp (CARBONERO et al., 2008).

Figura 4.8 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração *Hm*-PF₂AF (*Hm*-FMG), realizado em D₂O a 70 °C (125 MHz).

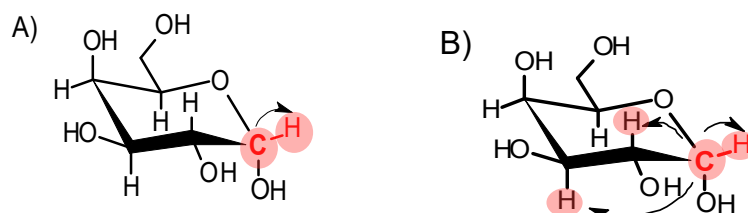


Na região anomérica do espectro de RMN de ^1H foram observados 5 sinais de ^1H (δ 5,13; δ 5,07; δ 5,04; δ 5,00; δ 4,80) os quais foram denominados de A a E de acordo com a ordem decrescente de seus valores.

Figura 4.9 – Região anomérica do espectro de RMN de ^1H da fração *Hm*-PF₂AF (*Hm*-FMG), realizado em D₂O a 50 °C (500 MHz)

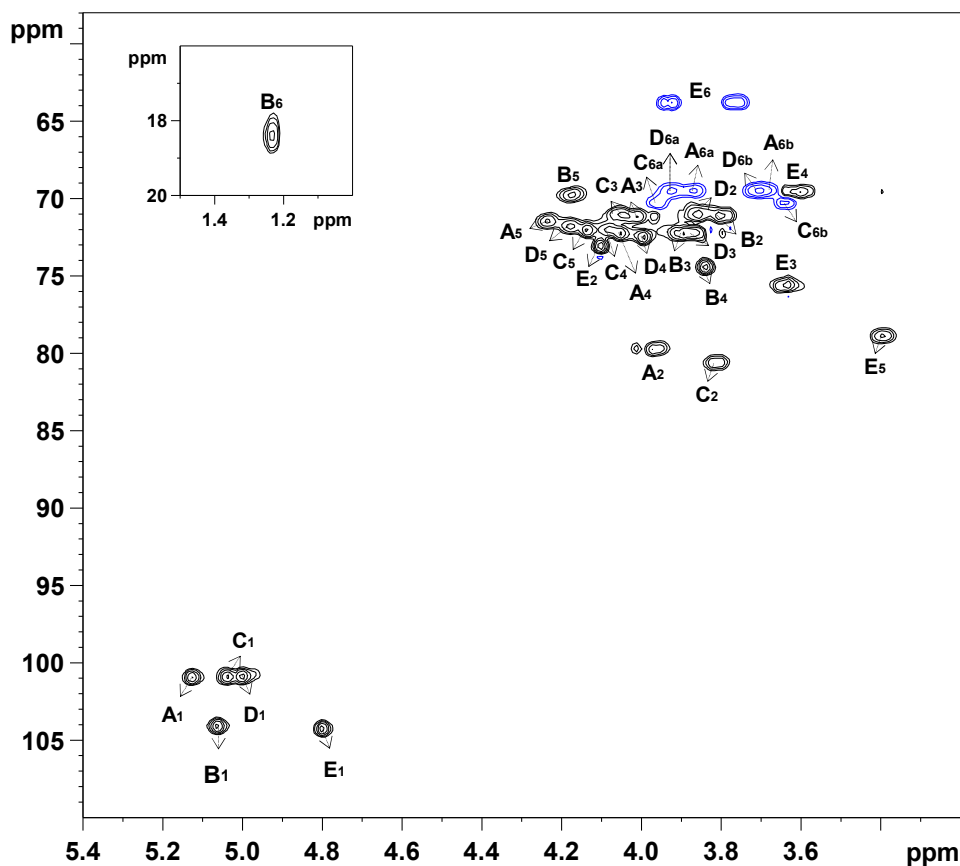


Para identificar as unidades monossacarídicas constituintes deste polímero (A a E), foram realizadas as análises de HSQC-DEPT (Figura 4.10) e HSQC-TOCSY (Figura 4.11, p. 54). Através da análise do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC foi possível assinalar os carbonos e próton(s) conectado(s) diretamente ($^1J_{\text{CH}}$) (A). O HSQC-TOCSY possibilitou sequenciar todos os carbonos de cada monossacarídeo através de seus respectivos hidrogênios (B) (Tabela 4.5, p. 57; Tabela 4.6, p. 58).



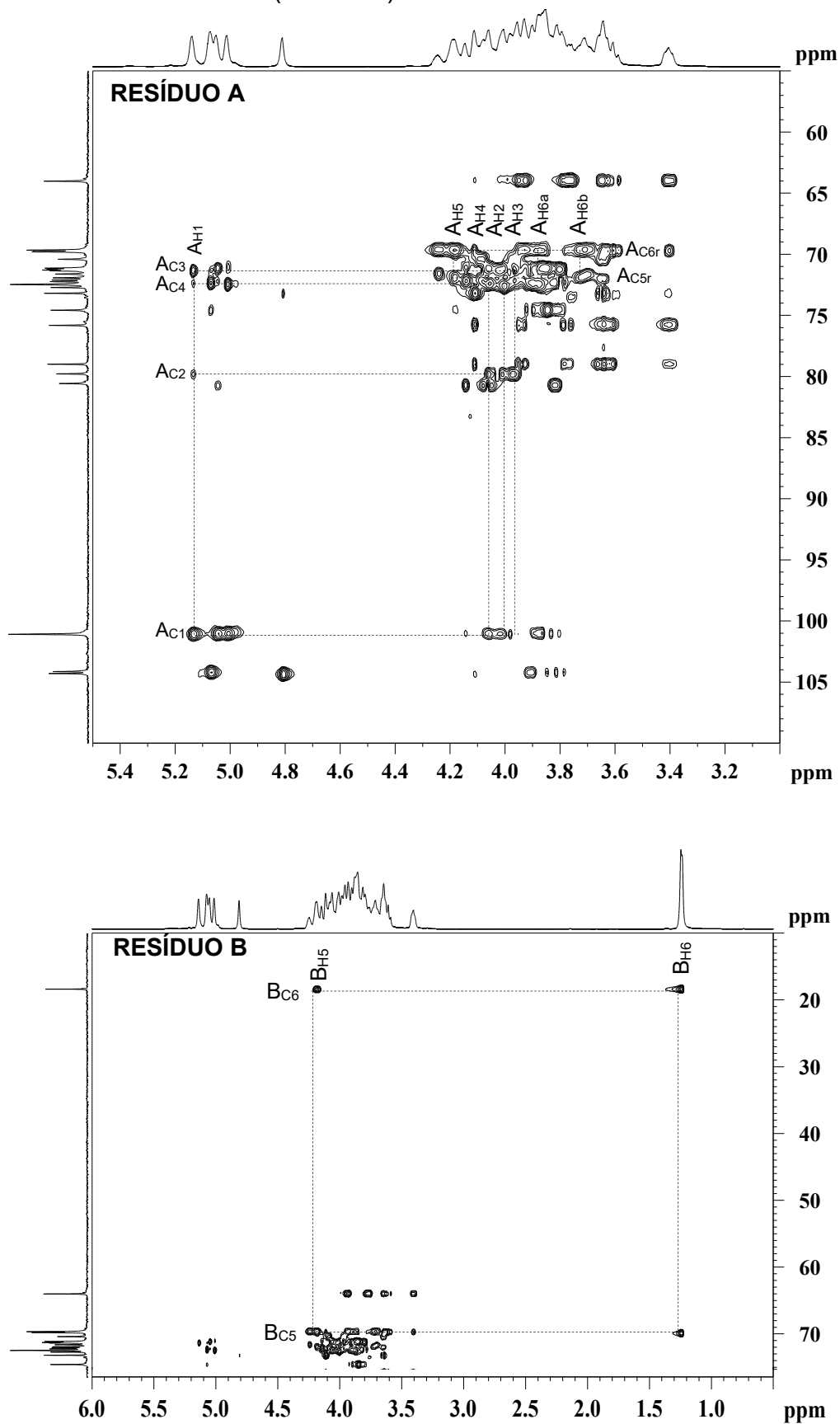
Representação das correlações homo e/ou heteronuclear determinadas nos espectros de HSQC-DEPT (A) e HSQC-TOCSY (B), para o carbono anomérico (C-1) da α -D-Galactose.

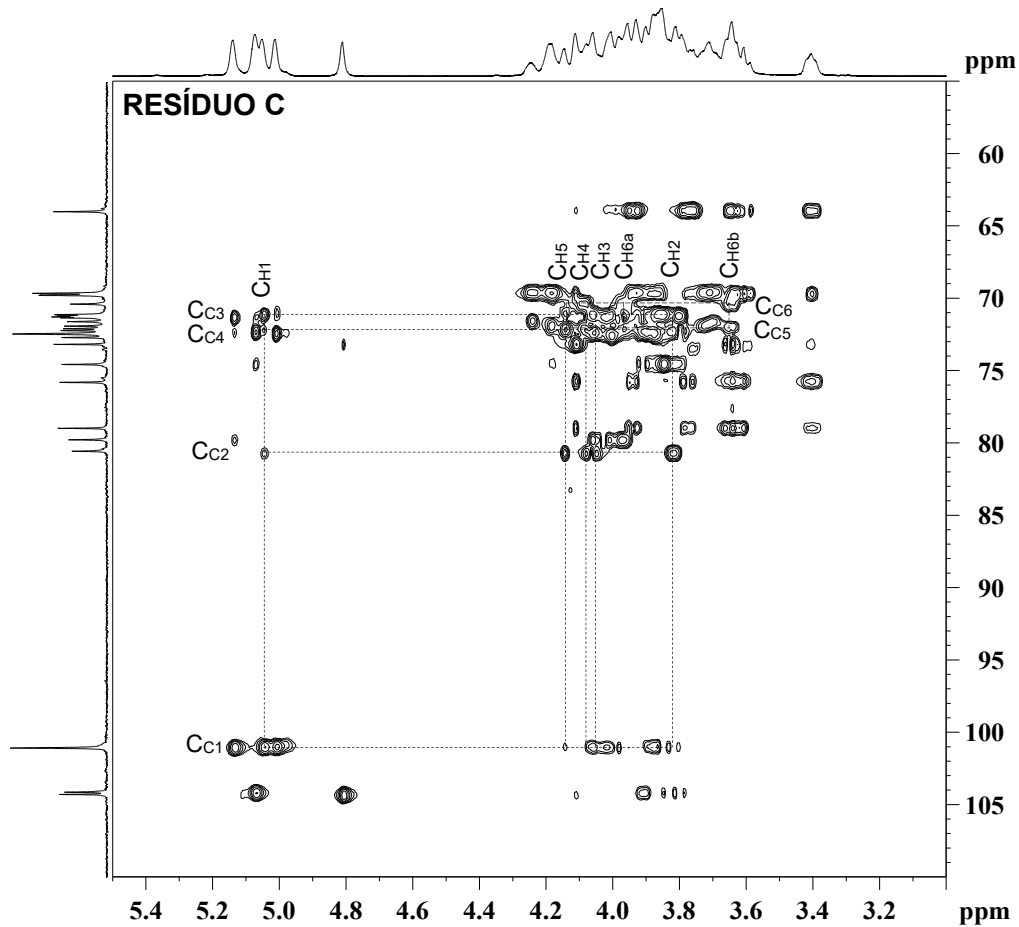
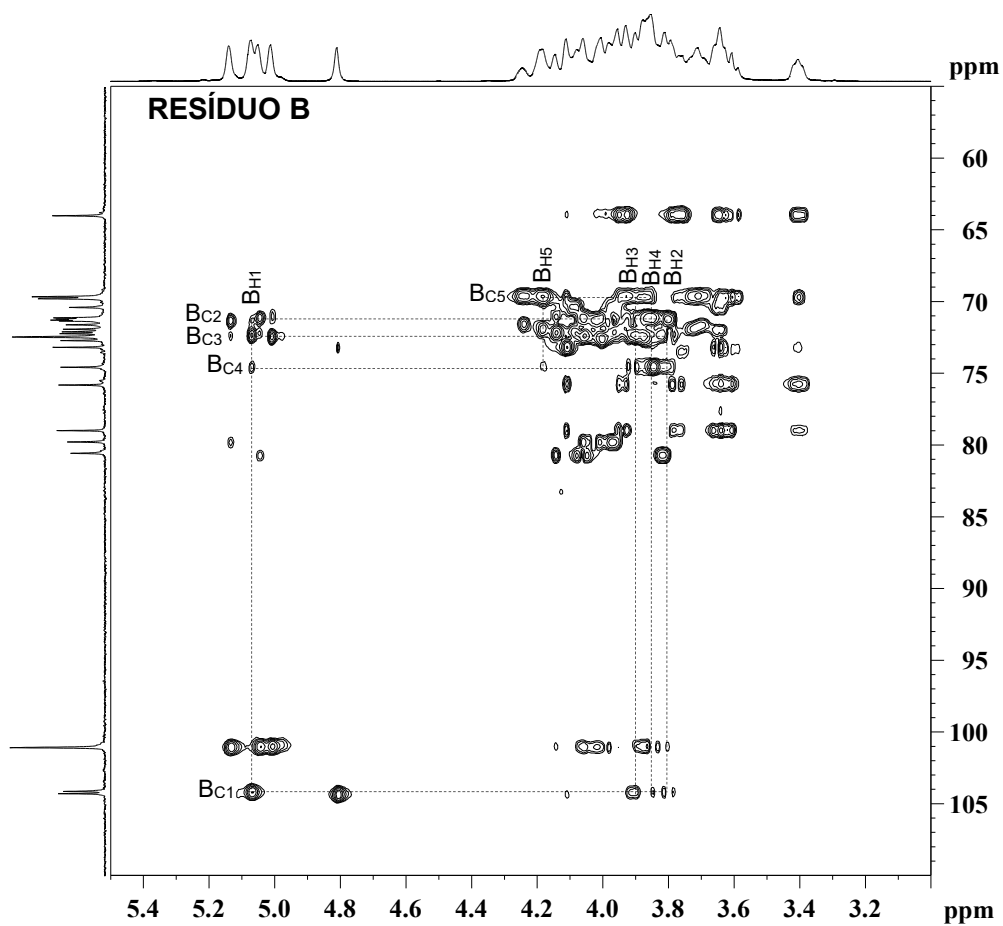
Figura 4.10 – Mapa de contorno HSQC-DEPT da fração *Hm*-PF₂AF (*Hm*-FMG), realizado em D₂O a 50 °C (125 MHz)

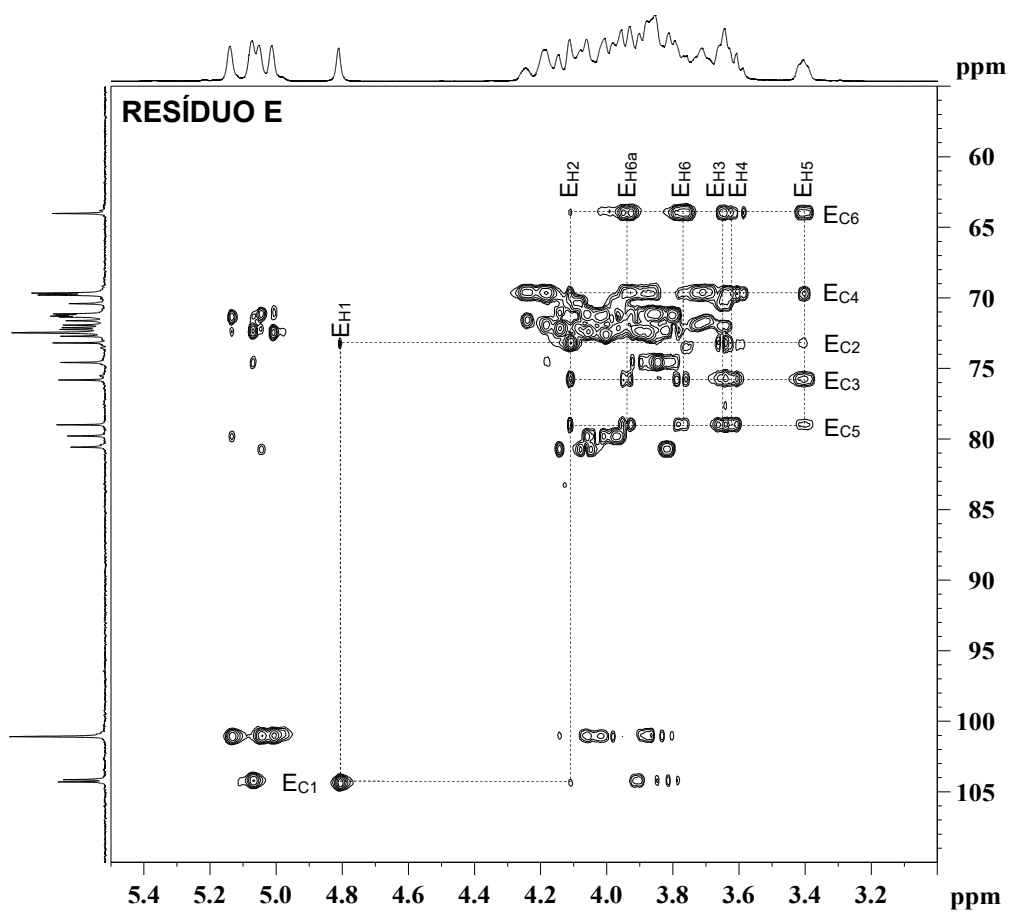
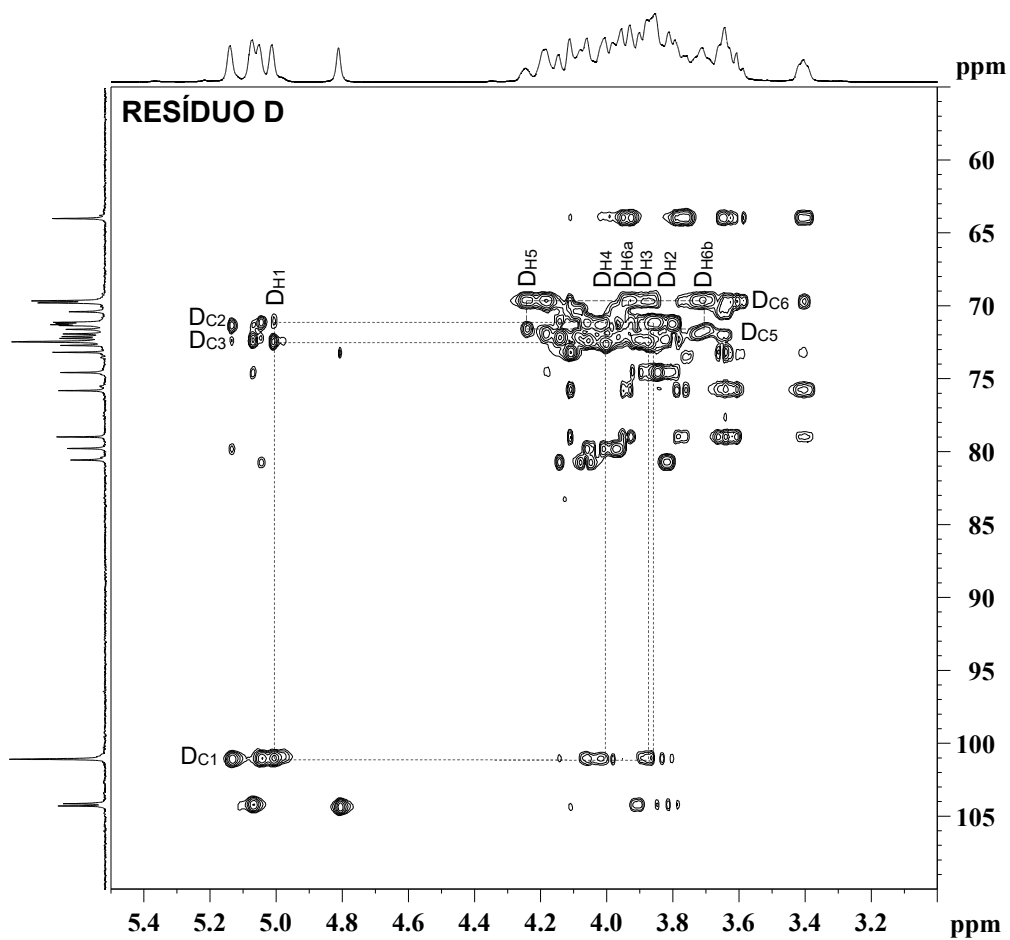


A = α -D-Galp 2,6-di-O-substituída por terminais não redutores de β -Manp; **B** = terminal não redutor de α -L-Fucp; **C** = α -D-Galp 2,6-di-O-substituída por terminais não redutores de α -L-Fucp; **D** = α -D-Galp 6-O-substituída; **E** = terminais não redutores de β -Manp.

Figura 4.11 – Espectro de HSQC-TOCSY da fração *Hm*-PF₂AF (*Hm*-FMG), realizado em D₂O a 50 °C (125 MHz)







Os resíduos A, B, C, D e E foram identificados pelas análises de RMN, correspondendo às unidades de α -Galp 6-O- (D) e 2,6-di-O- substituídas (A e C) e terminais não redutores de α -Fucp (B) e β -Manp (E) (Figura 4.12).

Através do experimento HSQC-NOESY foi confirmado a ligação dos terminais não redutores de β -Manp (E) e de α -Fucp (B) ao C-2 das unidades de α -Galp com H-1 em δ 5,13 (A) e àquelas com H-1 em δ 5,04 (C), respectivamente. A sequência das unidades de α -Galp ligadas 1 \rightarrow 6 da cadeia principal não pode ser definida por esta análise devido às sobreposições de C-1 ou C-6 destes monossacarídeos.

Figura 4.12 – Estrutura química das unidades monossacarídicas constituintes da fucomanogalactana

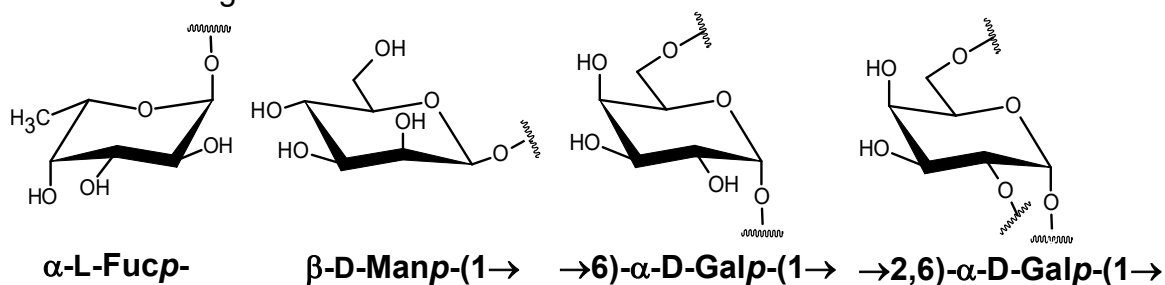


Tabela 4.5 – Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da fucomanogalactana de *Hypsizygos marmoreus* (Hm-FMG) ^a

Resíduos	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						
	1	2	3	4	5	6a	6b
\rightarrow 2,6)- α -Galp-(1 \rightarrow	101,06	79,80	71,25	72,34	71,55	69,6	
(Resíduo A)	5,13	3,97	4,01	4,06	4,24	3,87	3,70
α -Fucp-(1 \rightarrow	104,14	71,20	72,36	74,58	69,81	18,36	
(Resíduo B)	5,07	3,80	3,89	3,85	4,18	1,24	
\rightarrow 2,6)- α -Galp-(1 \rightarrow	101,01	80,67	71,13	72,07	72,10	70,41	
(Resíduo C)	5,04	3,82	4,05	4,08	4,14	3,96	3,64
\rightarrow 6)- α -Galp-(1 \rightarrow	101,00	71,03	72,30	72,55	71,85	69,59	
(Resíduo D)	5,00	3,82	3,87	4,00	4,20	3,93	3,72
β -Manp-(1 \rightarrow	104,29	73,16	75,65	69,64	78,96	63,86	
(Resíduo E)	4,81	4,11	3,64	3,61	3,40	3,94	3,76

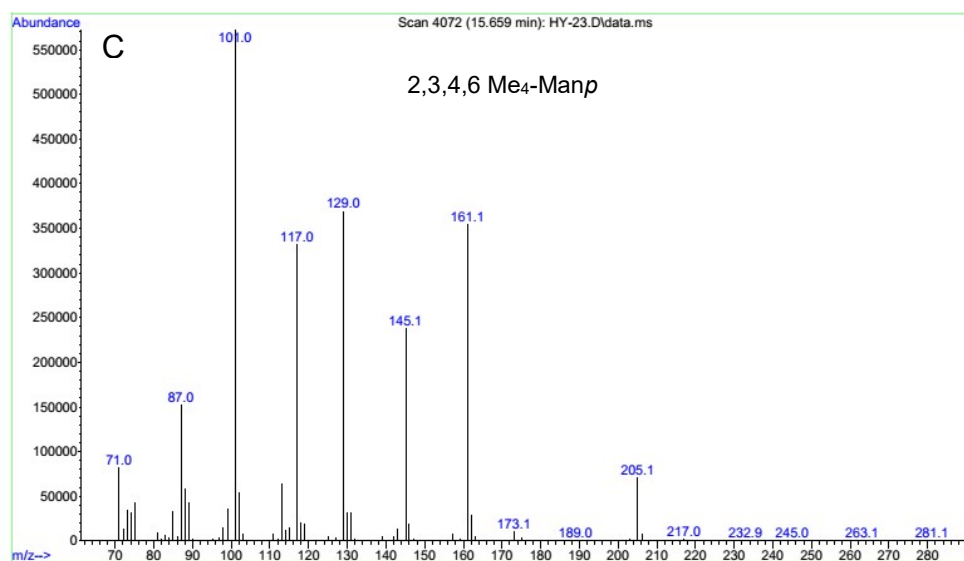
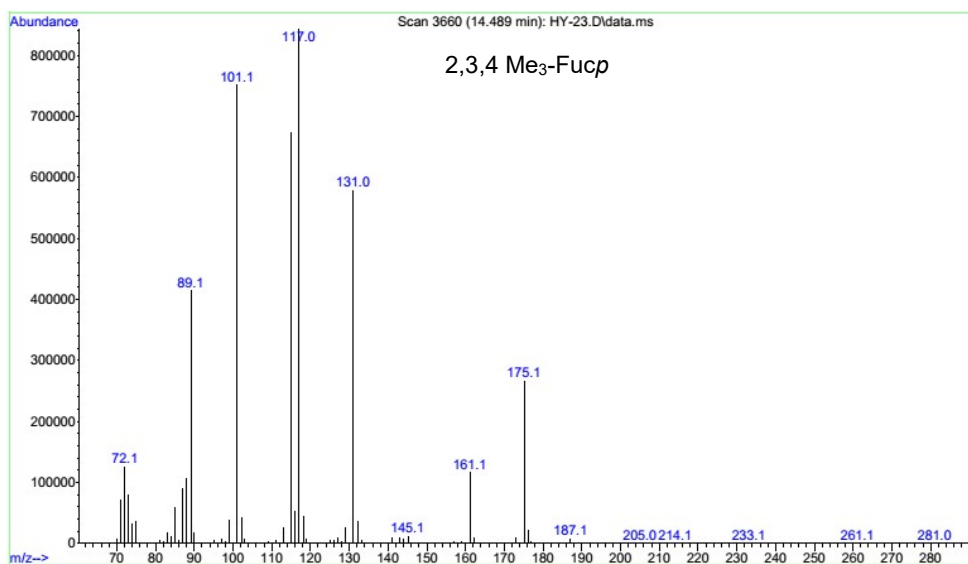
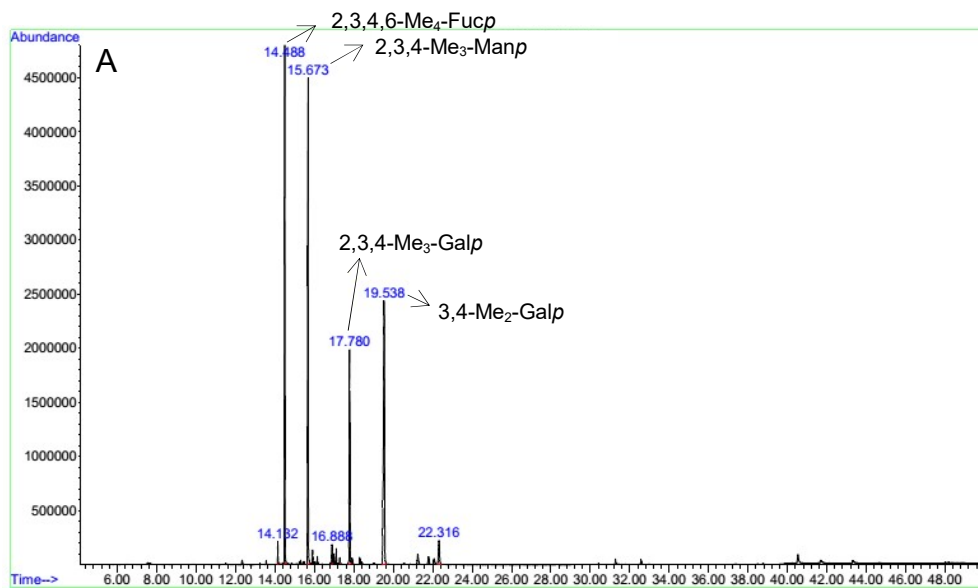
^a Determinado pelas análises dos espectros de RMN de ^{13}C , RMN de ^1H , COSY, HSQC-DEPT e HSQC-TOCSY.

Tabela 4.6 - Principais correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ observadas no espectro de HSQC-DEPT para a fucomanogalactana isolada de *H. marmoreus* (Hm-FMG).

Unidades Monossacarídicas	δ_{C}	Correlações
		δ_{H}
$\rightarrow 2,6\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ (Resíduo A)	C1 (101,06) C2 (79,80) C3 (71,25) C4 (72,34)	H1 (5,13); H2 (3,97); H3 (4,01); H4 (4,06)
	C5 (71,55) C6 (69,6)	H5 (4,24); H6a (3,87); H6a (3,70)
$\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$ (Resíduo B)	C1 (104,14) C2 (71,20) C3 (72,36)	H1(5,07); H2 (3,80); H3 (3,89); H4 (3,85)
	C4 (74,58)	H1 (5,07); H2 (3,80); H3 (3,89); H4 (3,85); H5 (4,18)
	C5 (69,81)	H4 (3,85); H5 (4,18); H6 (1,24)
	C6 (18,36)	H5 (4,18); H6 (1,24)
$\rightarrow 2,6\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ (Resíduo C)	C1 (101,01) C2 (80,67) C3 (71,13) C4 (72,07)	H1(5,04); H2 (3,82); H3 (4,05); H4 (4,08) H5 (4,14)
	C5 (72,10)	H2 (3,82); H3 (4,05); H4 (4,08); H5 (4,14); H6a (3,96); H6b (3,64)
	C6 (70,41)	H4 (4,08); H6a (3,96); H6b (3,64)
$\rightarrow 6\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ (Resíduo D)	C1 (101,00) C2 (71,03) C3 (72,30) C4 (72,55)	H1 (5,00); H2 (3,82); H3 (3,87); H4 (4,00)
	C5 (71,85) C6 (69,59)	H5 (4,20); H6a (3,93); H6b (3,72)
$\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$ (Resíduo E)	C1 (104,29)	H1 (4,81); H2 (4,11)
	C2 (73,16)	H1 (4,81); H2 (4,11); H3 (3,64); H4 (3,61); H5 (3,40)
	C3 (75,65)	H2 (4,11); H3 (3,64); H4 (3,61); H5 (3,40); H6a (3,94); H6b (3,76)
	C4 (69,64)	H2 (4,11); H3 (3,64); H4 (3,61); H5 (3,40); H6b (3,76)
	C5 (78,96)	H2 (4,11); H3 (3,64); H4 (3,61); H5 (3,40); H6a (3,94); H6b (3,76)
	C6 (63,86)	H6b (3,76)

As ligações glicosídicas evidenciadas pelas análises dos espectros de RMN foram confirmadas por CG-EM como acetatos de alditóis parcialmente O-metilados. Os derivados per-O-metilados 2,3,4,6-Me₄-Man e 2,3,4-Me₃-Fuc confirmam a presença de unidades de Manp e Fucp contendo apenas o C-1 ligado, os quais são denominados de terminais não redutores. As unidades de $\alpha\text{-Galp 6-O-}$ e 2,6-di-O- substituídas foram confirmadas pelos derivados 2,3,4-Me₃-Galp e 3,4-Me₂-Galp na análise de metilação (Figura 4.13, p. 59 e 60; Tabela 4.7, p. 60).

Figura 4.13 – Cromatograma (A) e espectros de massa (B a E) referentes a análise de metilação da fração *Hm*-PF₂AF (*Hm*-FMG)



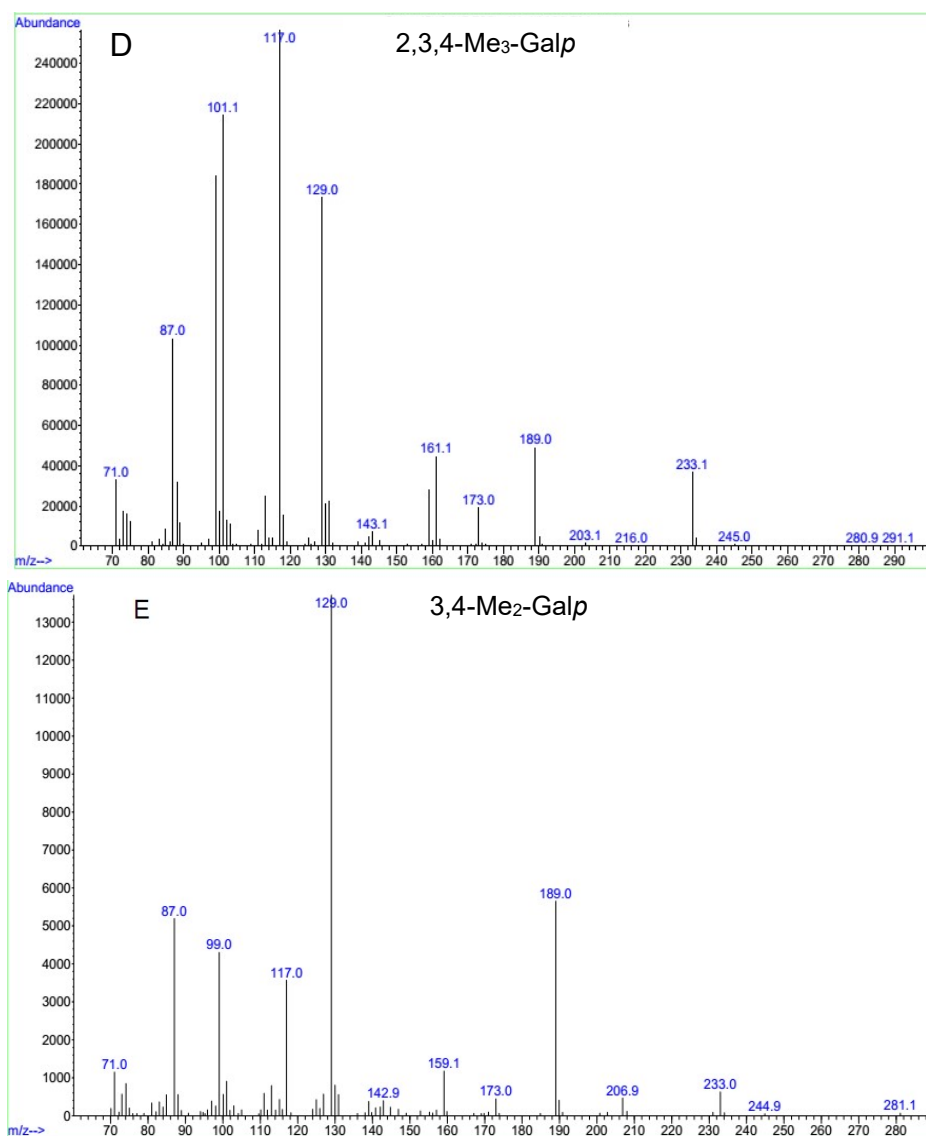


Tabela 4.7 - Análise por metilação da fucomanogalactana (*Hm*-FMG) isolada de *Hypsizygos marmoreus*

Acetatos de alditéis parcialmente O-metilados ^(a)	Tipo de ligação ^(b)	T_R ^(c)	%
2,3,4-Me ₃ Fuc	Fucp-(1→	14,488	14,0
2,3,4,6-Me ₄ Man	Manp-(1→	15,673	18,1
2,3,4-Me ₃ Gal	→6)-Galp-(1→	17,780	19,3
3,4-Me ₂ Gal	→2,6)-Galp-(1→	19,538	34,7

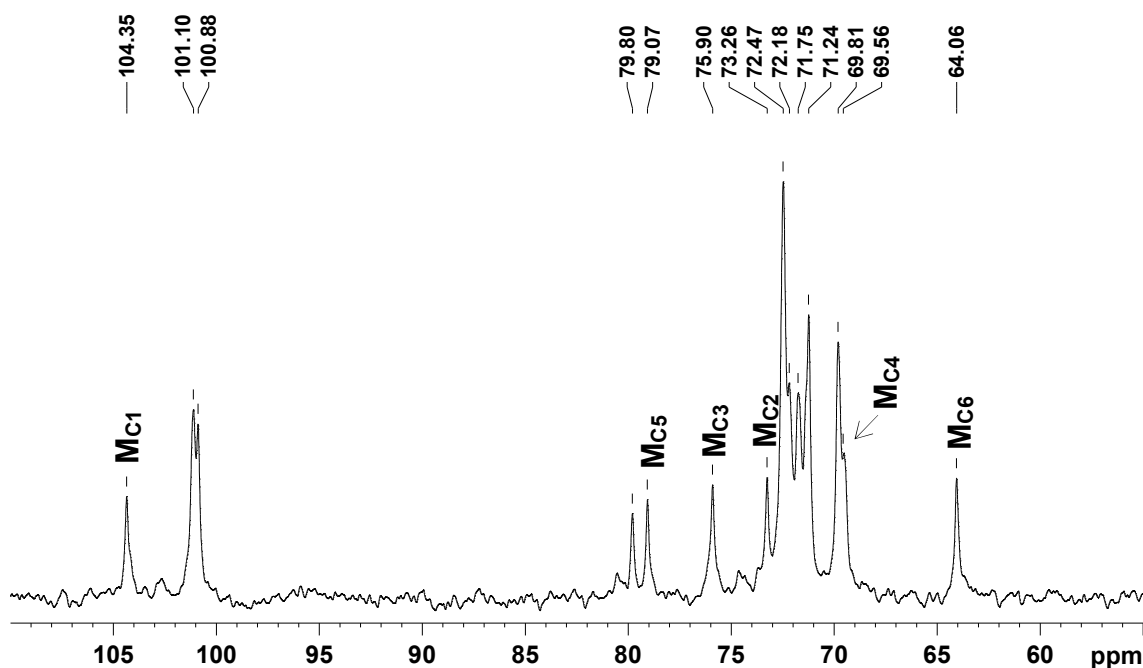
^a Analisado em CG-EM (coluna HP5-MS) após metilação, hidrólise ácida total (ácido trifluoroacético por 12 h), redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilado.

^c Tempo de retenção (min).

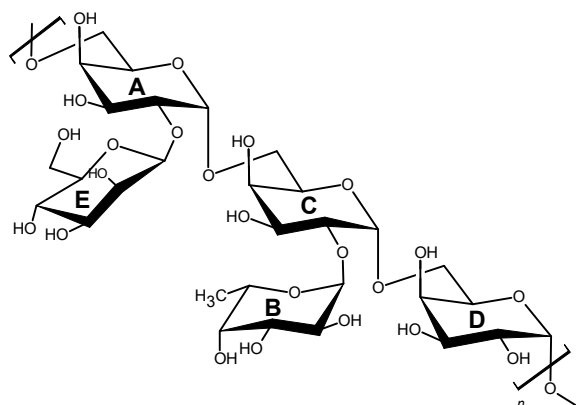
Visando o isolamento da cadeia principal deste heteropolissacarídeo, uma alíquota da fração *Hm*-PF₂AF foi hidrolisada em condições brandas (TFA 0,2 M, 3 h, 100 °C). Após diálise em membranas de 2 kDa, o produto resistente à hidrólise (fração *Hm*-HPPF₂) foi analisado por RMN de ¹³C. Este procedimento eliminou totalmente os resíduos de fucose, devido à ausência dos sinais correspondentes a este monossacarídeo, e parcialmente os de manose (identificados no espectro como M_{C1} a M_{C6}), resultando na intensificação dos sinais referentes aos das unidades da cadeia principal (α -Galp). Devido a remoção parcial das cadeias laterais (α -Fucp e β -Manp) deste polímero, os sinais referentes aos das unidades da cadeia principal (α -Galp) (Figura 4.14, p. 61).

Figura 4.14 – Espectro de RMN de ¹³C do produto resistente à hidrólise ácida branda (fração *Hm*-HPPF₂), realizado em D₂O a 70 °C (125 MHz)



A partir das análises realizadas, o heteropolissacarídeo da fração *Hm*-PF₂AF é constituído por uma cadeia principal de α -D-Galp conectadas através de ligações glicosídicas do tipo (1→6), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp e β -D-Manp (Figura 4.15).

Figura 4.15 – Representação esquemática do heteropolissacarídeo isolado de *Hypsizygus marmoreus*



As heterogalactanas contendo fucose e manose (fucomanogalactanas ou manogalactanas) são polímeros comumente encontrados em basidiomicetos, no entanto a maioria das descritas são substituídas principalmente pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp e por terminais não redutores de α -L-Fucp.

Há poucos relatos sobre heteropolissacarídeos similares ao descrito nesta pesquisa, como os isolados de *Lentinus edodes* (CARBONERO et al., 2008) e *Amanita muscaria* (RUTHES et al., 2013), os quais demonstraram efeitos anti-inflamatórios e/ou antinociceptivos.

Com a finalidade de investigar o potencial biológico deste polímero, uma alíquota da fração *Hm-FMG* foi encaminhada para a avaliação da ação antitumoral, a qual foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e a Dra. Stellee Marcela Petris Biscaia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os resultados obtidos encontram-se descritos na seção 4.3, p. 66.

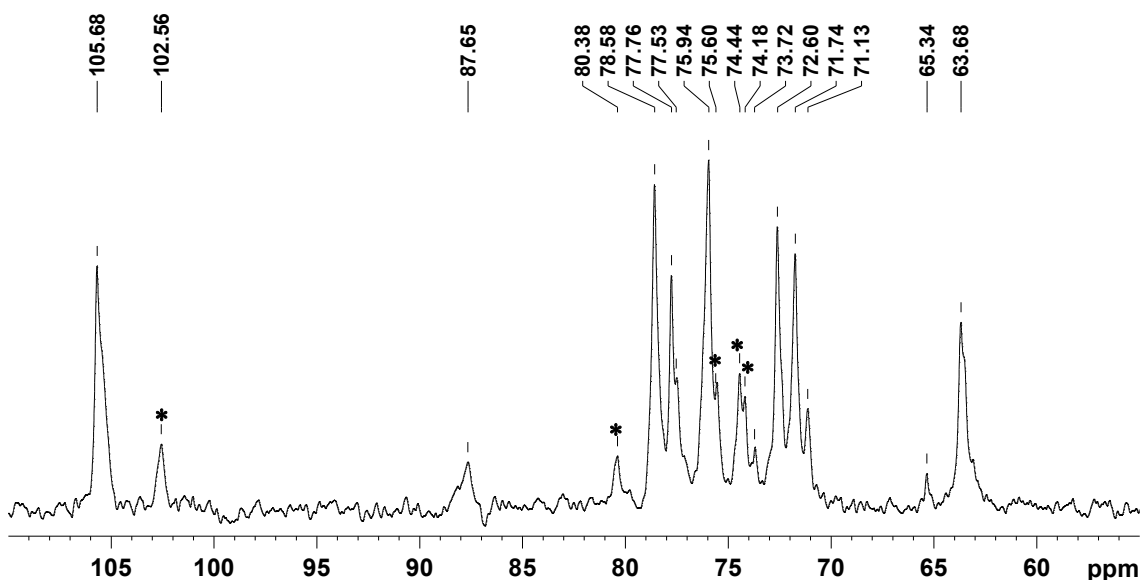
4.2. FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA de β -GLUCANAS do EXTRATO ALCALINO

A fração *Hm-K*, obtida por extrações alcalinas, e às resultantes do processo de fracionamento por congelamento e degelo (*Hm-IK* e *Hm-SK*) (Figura 3.3, p. 28) mostraram ser constituídas principalmente por glucose

(Tabela 4.1, p. 43; Tabela 4.2, p. 44), indicando a presença majoritária de glucanas.

Com a finalidade de verificar o tipo de glucana presente na fração *Hm-SK*, uma alíquota desta fração foi solubilizada em D₂O e analisada por RMN de ¹³C (Figura 4.16, p. 63). O espectro resultante desta análise contém sinais similares ao da fração *Hm-MESF₂* (Figura 4.6 B, p. 50), constituída por β-Glucanas (1→3) (1→6). No entanto, pode ser observado um conjunto de sinais de menor intensidade que podem ser referentes a outro tipo de polímero.

Figura 4.16 - Espectro de RMN de ¹³C da fração *Hm-SK*, realizado em D₂O a 70 °C (125 MHz)



Sendo assim, esta fração foi tratada com solução de Fehling (2 x), resultando na formação de duas frações majoritárias, ou seja, um precipitado (*Hm-PF₂SK*, m = 0,7 g) e um sobrenadante de Fehling (*Hm-SF₂SK*, m = 0,4), os quais foram analisados por RMN de ¹³C (Figura 4.17, p. 64). O espectro da fração *Hm-PF₂SK* apresentou 6 sinais mais intensos correspondentes aos de uma β-glucana contendo principalmente ligação (1→6) (Figura 4.17 A, p. 64). A fração *Hm-SF₂SK* continha os sinais referentes a este homopolímero, no entanto, possuía maiores teores de glicogênio do que a fração anterior (Figura 4.17 B, p. 64), sendo os seus sinais destacados nos espectros.

A presença de glicogênio foi confirmada por reação com lugol, apresentando uma coloração marrom-avermelhada para ambas frações.

Para a remoção do glicogênio, as frações *Hm-TAPFK* e *Hm-TASFK* foram tratadas com amilase, conforme descrito anteriormente (seção 3.4.4, p. 30), e novamente avaliadas por RMN de ^{13}C (Figura 4.18, p. 65).

Figura 4.17 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações *Hm-PF₂SK* (A) e *Hm-SF₂SK* (B), realizados em D_2O a 70 °C (125 MHz)

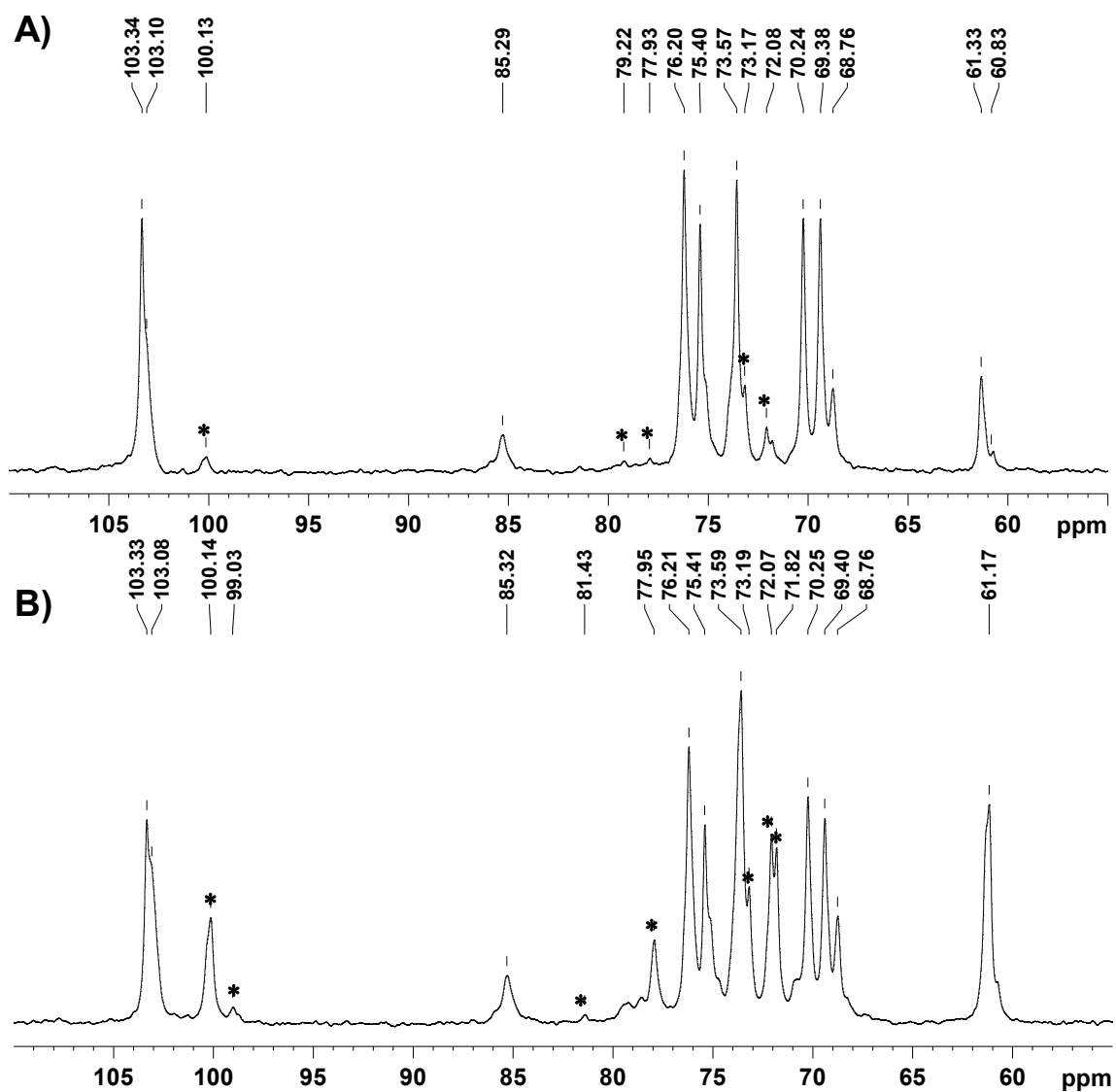
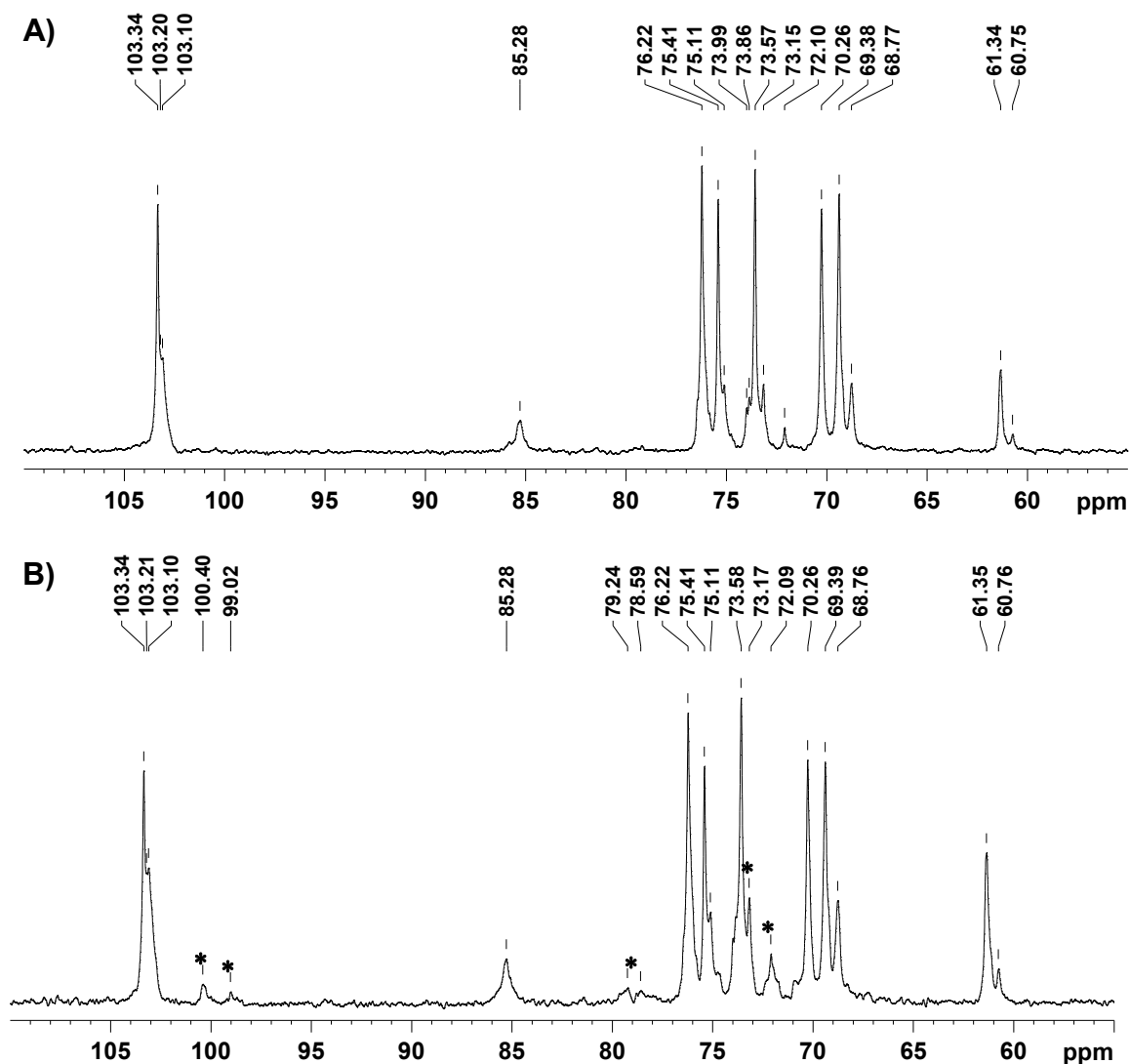


Figura 4.18 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações *Hm-TAPFK* (A) e *Hm-TASFK* (B), realizados em D_2O a 70°C (125 MHz)



*** Sinais característicos do glicogênio.**

A remoção do glicogênio destas frações foi eficiente, sendo evidenciado nos seus espectros de RMN de ^{13}C (Figura 4.18) através da diminuição da intensidade dos sinais referentes a este polímero. No entanto, o tratamento com amilase deverá ser repetido apenas para a *Hm-TASF* para removê-lo totalmente.

Conforme discutido anteriormente, estas frações correspondem às β -glucanas contendo percentuais superiores de ligações 1 \rightarrow 6 em relação às 1 \rightarrow 3.

Através da comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 4.18, p. 65) obtidos para estas frações com àqueles descritos na literatura para polímeros similares (DONG et al., 2002; GE, ZHANG, SUN, 2010; LIU et al., 2012; MAJI et al., 2012), foi possível fazer o assinalamento dos principais sinais de ^{13}C , reforçando a estrutura proposta. Os sinais na região anomérica (C-1) são correspondentes aos terminais não redutores $\beta\text{-D-Glcp}$ (δ 103,20), às unidades de $\beta\text{-Glcp}$ 3-O- e 6-O- substituídas (δ 103,34) e às $\beta\text{-Glcp}$ 3,6-di-O- substituídas (δ 103,10). Os sinais observados em δ 85,28 e δ 69,38, confirmam a presença de ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), respectivamente. Os sinais observados em δ 73,57; 75,41; 70,26 e 76,22 correspondem ao C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente, das unidades de $\beta\text{-Glcp}$ 6-O- ligadas.

De acordo com os dados obtidos, as frações obtidas por extrações alcalinas (*Hm-TASFK* e *Hm-TAPFK*) consistem em β -glucanas ramificadas contendo uma cadeia principal constituída por $\beta\text{-Glcp}$ ligadas (1 \rightarrow 6), as quais se apresentam parcialmente substituídas em O-3.

Análises de RMN bidimensionais e metilação estão sendo realizadas para confirmar o grau de substituição bem como os tipos de cadeia laterais, os quais não podem ser determinados com exatidão apenas com as análises de RMN de ^{13}C .

Devido aos efeitos imunomoduladores da β -glucana similar, isolada do cogumelo híbrido *Pfle1r* (*Pleurotus florida* e *Lentinula edodes*) (MAJI et al., 2012), as frações *Hm-TASFK* e *Hm-TAPFK* foram enviadas para a avaliação biológica junto ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

4.3. AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA FUCOMANOGLACTANA ISOLADA DE *H. marmoreus* (*Hm-FMG*)

Uma das características que definem o câncer é o rápido crescimento de células anormais (WHO, 2016). Nesse contexto, o câncer de pele do tipo melanoma, foco deste trabalho, destaca-se por seu rápido desenvolvimento. O melanoma, quando em estágio avançado, torna-se praticamente incurável, uma

vez que os tratamentos atuais têm baixa resposta e muitos efeitos colaterais, fazendo com que a taxa de sobrevivência do paciente seja muito baixa. Desta forma, justifica-se a busca por novos compostos antitumorais, que sejam mais eficientes e que, principalmente, não apresentem efeitos tóxicos.

Dentre os diversos compostos avaliados, os polissacarídeos isolados de macrofungos têm atraído atenção considerável por possuir importantes efeitos antitumorais, dentre estes destacam-se os heteropolissacarídeos.

Esses polímeros possuem alta capacidade de transportar informações biológicas, pois possuem grande potencial para variabilidade estrutural. Apesar das semelhanças estruturais e funcionais desses polímeros, eles diferem em seus efeitos biológicos.

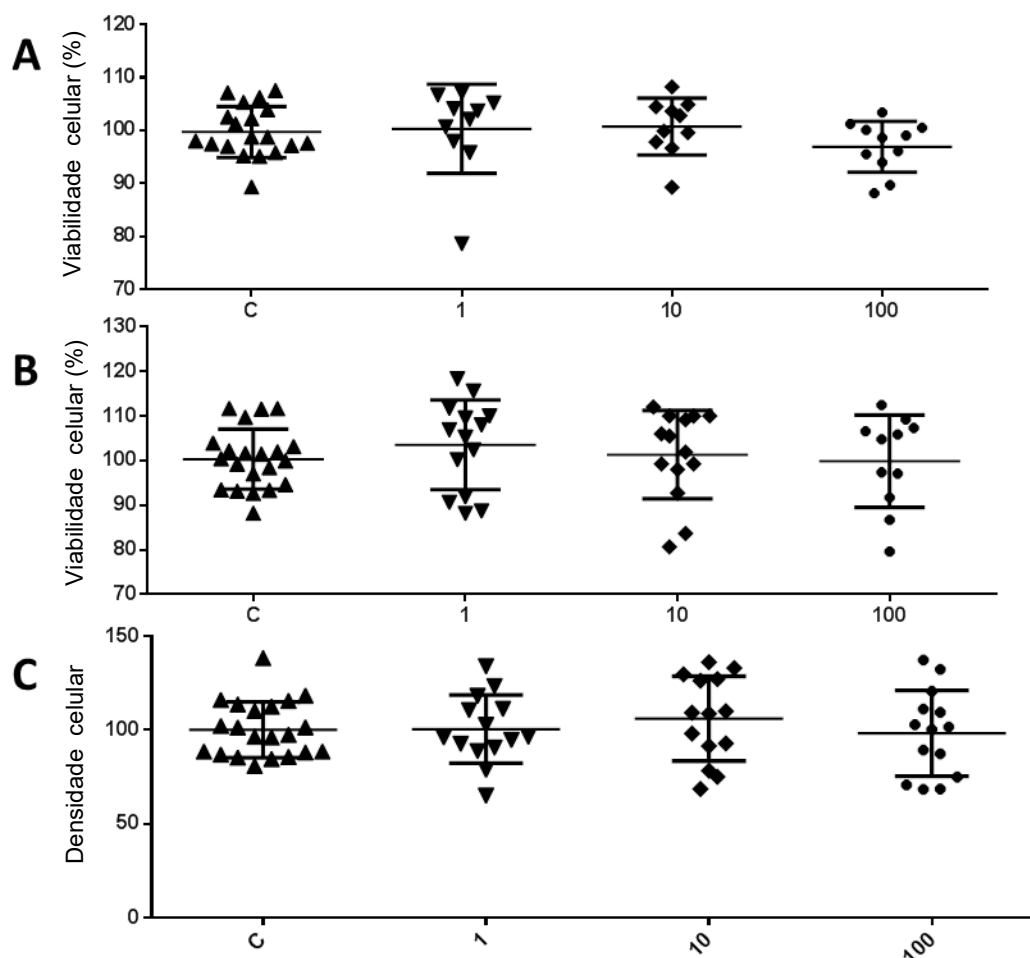
Conforme relatado anteriormente, não há estudos a respeito da ação antitumoral de heterogalactanas com estrutura similar à isolada de *H. marmoreus*. Diante disso, neste trabalho foi avaliado os efeitos antitumorais deste polímero frente às células melanômicas B16-F10, através dos ensaios de citotoxicidade, viabilidade, densidade, morfologia e capacidade de formação de colônias.

4.3.1. Citotoxicidade e/ou Viabilidade e Densidade Celular

Primeiramente, foi investigado a citotoxicidade do heteropolissacarídeo (1, 10 e 100 µg/mL) frente às células B16-F10 através dos ensaios do vermelho neutro e MTT. Como mostrado na Figura 4.19 A e 4.19 B (p. 68), a viabilidade celular após o tratamento com o polissacarídeo não foi significativamente alterada em comparação com células controle não tratadas, demonstrando que o metabolismo celular não foi alterado por este tratamento em relação as células não tratadas utilizadas como controle.

Posteriormente, foi avaliado a ação da heterogalactana (*Hm-FMG*) quanto à capacidade de promover alteração na densidade das células B16-F10, realizada pela técnica do cristal violeta. Como mostrado na Fig. 4.19 C (p. 68), o polissacarídeo não afetou a densidade celular, ou seja, a quantidade de células aderidas, após o tratamento, foi a mesma em relação a células controle que não receberam tratamento.

Figura 4.19 - Avaliação da viabilidade e densidade celular da fucomanogalactana de *H. marmoreus* (Hm-FMG) frente às células B16-F10



Legenda: Células melanômicas tratadas com a fucomanogalactana de *H. marmoreus* (1, 10 e 100 µg/mL) por 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo vermelho neutro (A) e MTT (B) e a densidade celular pelo cristal violeta (C). Os dados foram representados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, análise de variância (ANOVA unifatorial), $p > 0,05$ comparado com o grupo controle (c).

Com estes experimentos, foi possível demonstrar que o polissacarídeo *Hm-FMG* não é tóxico e não altera a densidade celular nas condições testadas.

Dentro deste contexto, vale ressaltar que existem vários trabalhos relatando os efeitos farmacológicos diretos, *in vitro* e *in vivo*, de produtos naturais sobre o melanoma (ALQATHAMA & PRIETO, 2015).

Dentre estes compostos, os polissacarídeos isolados de macrofungos têm apresentado ação antitumoral frente ao melanoma (HUNG et al., 2012) e vários outros tipos de câncer, como o renal (YANG et al., 2013), mamário (NOVAES et al., 2011), etc, a qual está correlacionada, principalmente, com os efeitos citotóxicos diretos, diminuindo a viabilidade e gerando apoptose nas células tumorais (IVANOVA et al., 2014; MA et al., 2014; SRINIVASAHAN & DURAIRAJ, 2015; REN et al., 2016). Por outro lado, há diversos estudos relatando os efeitos antitumorais de polissacarídeos, sem apresentar toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Tal como a manogalactana parcialmente metilada de *Pleurotus eryngii*, que não mostrou alteração na viabilidade celular, mas foi capaz de realizar uma reprogramação celular com a redução do tumor (60%) em apenas 10 dias de tratamento, e não alterou nenhum parâmetro fisiológico dos animais tratados em comparação com o controle (BISCAIA et al., 2017).

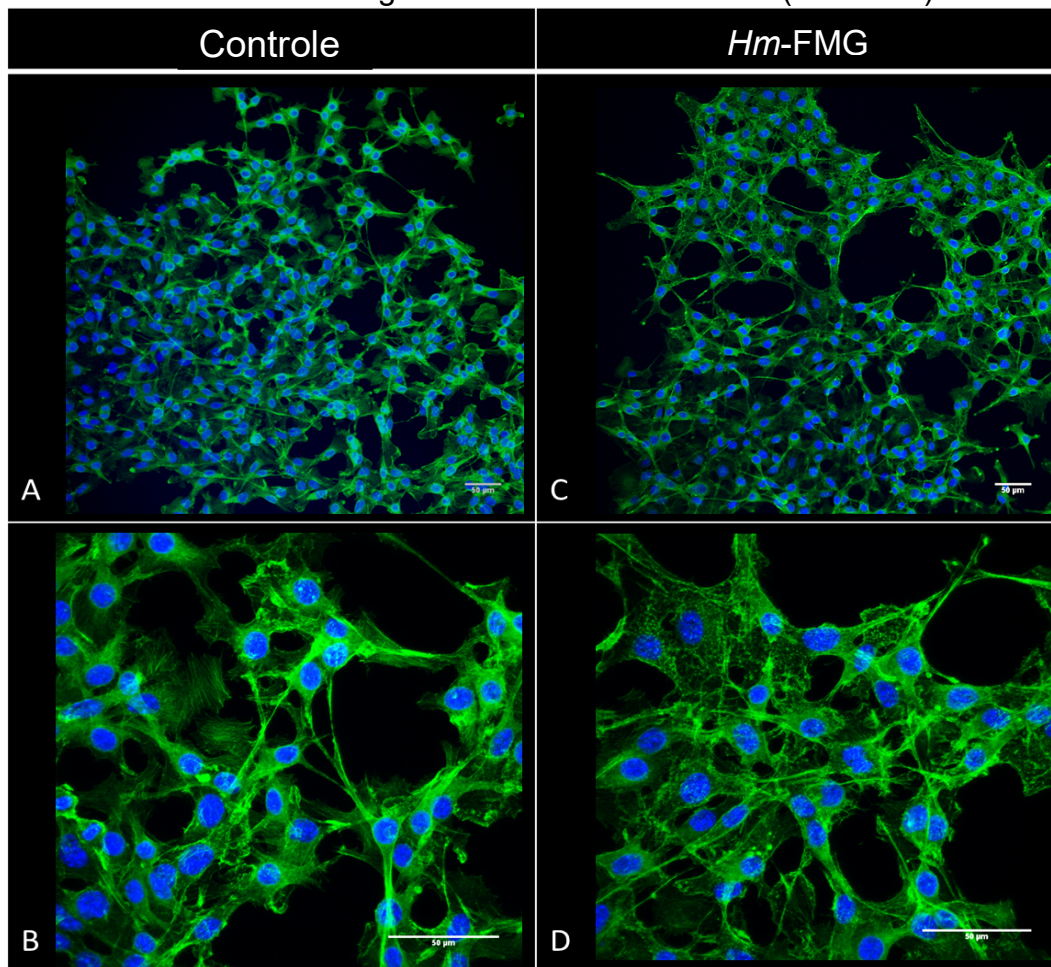
Tong e colaboradores (2009) também demonstraram a ação antitumoral de um polissacarídeo isolado do cogumelo *P. ostreatus* (POPS-1), o qual mostrou baixa toxicidade. De maneira similar, a fucogalactana obtida dos basidiomas de *Macrocybe titans* não foi citotóxica frente às células melanômicas B16-F10, mas reduziu significativamente a migração celular das mesmas, demonstrando assim seus efeitos antitumorais (MILHORINI et al., 2018).

4.3.2. Morfologia Celular

A morfologia é um marcador importante para avaliar o estado da cultura celular, indicando células viáveis ou não.

Após o tratamento com o polissacarídeo *Hm-FMG*, a morfologia das células B16-F10 foi avaliada pela marcação de filamentos de actina (verde) e núcleos (azul). Como mostrado na Figura 4.20 (p. 70), não foi observado nenhuma alteração na morfologia (células fusiformes e epiteliais) entre o grupo controle e o grupo tratado com 100 µg/mL de *Hm-FMG* por 72 horas. As células permaneceram empilhadas uma acima da outra, com o mesmo padrão de espalhamento e a mesma confluência, formando uma monocamada de células.

Figura 4.20 – Avaliação da morfologia das células melanômicas B16-F10 tratadas com a fucomanogalactana de *H. marmoreus* (*Hm-FMG*)



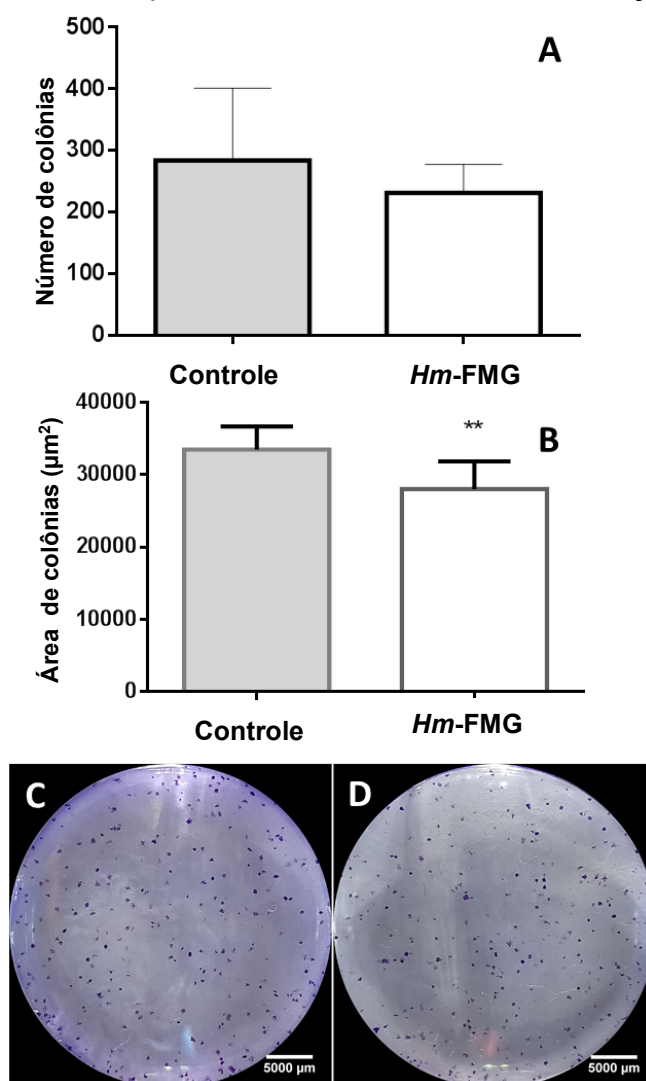
Legenda: Células B16-F10 foram expostas a *Hm-FMG* (100 µg/mL) por 72 h. Estes ensaios foram realizados em triplicata técnica. Microscopia confocal: A, B (controle); C e D (tratado). Barra de escala: 50 µm; coloração azul: DAPI destaca o núcleo; coloração verde: reagente ActinGreen™ ReadyProbes® para visualizar o citoesqueleto de actina.

4.3.3. Avaliação da Capacidade de Formação de Colônias

O ensaio de formação de colônias ou clonogênico permite avaliar a capacidade de uma única célula formar colônias, sem o estímulo de contato das células vizinhas. Pois a proliferação ilimitada é a característica predominante de todas as células tumorais. O suporte da sinalização proliferativa e a supressão de supressores de crescimento são definidos pelo número de células viáveis ou pela manutenção da capacidade proliferativa ao longo do tempo (MENYHÁRT et al., 2016), na presença ou ausência de tratamento.

A capacidade de formar colônias e a área das colônias foram avaliadas usando células B16-F10, tratadas ou não (controle) com o polímero *Hm-FMG* na concentração de 100 µg/mL por 72 h. Após análises, este ensaio demonstrou que o número de colônias permaneceu o mesmo em ambos os grupos (tratado e controle), mas surpreendentemente, no grupo tratado com o polissacarídeo, o tamanho médio das colônias foi diminuído (** $p=0,0022$), como demonstrado na Figura 4.21, p. 71.

Figura 4.21 - Efeito do polissacarídeo *Hm-FMG* na formação de colônias



Legenda: Células B16-F10 foram tratadas com *Hm-FMG* (100 µg/mL) por 72 h, e então re-plaqueadas. Após incubação por 96 h, as colônias foram fixadas, coradas e visualizadas. Dados quantitativos sobre o número (A) e tamanho (B) de cada colônia formada; bem como as imagens do grupo controle (C) e do tratado com polissacarídeo (D) estão mostrados acima. Os dados foram expressos como média ± DP de duas repetições, de cinco experimentos independentes. Os ensaios foram submetidos à análise estatística pelo teste-T com pós-teste de Mann-Whitney (** $p = 0,0022$).

A mudança na formação de colônias causada pela exposição ao *Hm-FMG* pode estar associada a outros efeitos promissores, como demonstrado para o polissacarídeo obtido do fungo *Rhizopus nigricans* o qual foi capaz de diminuir a formação de colônias da linhagem celular BGC-823 de câncer de estômago em concentrações de 200, 400 e 600 µg/mL, através da bloqueio da divisão celular na fase G2/M e da indução da apoptose mediada por mitocôndrias (CHEN et al., 2013).

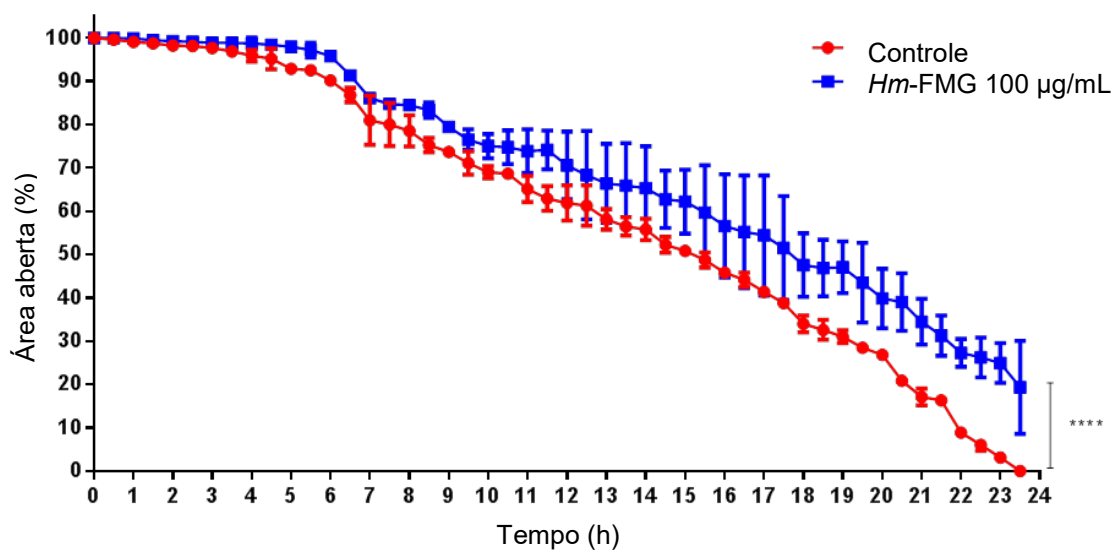
4.3.4. Avaliação da Migração Celular

Após avaliar a citotoxicidade, viabilidade celular, densidade celular e capacidade de formação de colônias de células melanômicas B16-F10 tratadas com o polissacarídeo *Hm-FMG*, foi realizado o ensaio de migração celular. Esta avaliação é de suma importância, uma vez que uma das características definidoras do câncer é o rápido crescimento de células anormais que ultrapassam seus limites de origem e invadem outras partes do corpo em um processo conhecido como metástase, a qual é a principal causa de morte nesses pacientes (WHO, 2016). Para que ocorra a metástase, são necessários vários eventos celulares e extracelulares (ZHOU et al., 2015).

A migração celular é um evento chave na progressão do tumor, definindo a capacidade das células de realizar metástases.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 4.22, p. 73), podemos ver que o grupo de células tratadas com *Hm-FMG*, em relação ao grupo controle (não tratado), reduziu notavelmente a capacidade de migração celular ($p < 0,0001$). Ao final de 23,5 horas, o grupo controle já estava completamente fechado (confluyente), enquanto o grupo tratado ainda apresentava aproximadamente 19,33% de área aberta, mostrando a redução da migração celular pelo polissacarídeo *Hm-FMG*.

Figura 4.22 - Análise da migração celular (células B16-F10) após exposição ao polissacarídeo *Hm-FMG*



Legenda: As monocamadas de células B16-F10 foram incubadas com 100 µg/mL do polissacarídeo *Hm-FMG* ou não (controle), por um período de tratamento de 72 h. Após a retirada das células destacadas, o fenômeno de “fechamento da ferida” foi monitorado por microscopia confocal a cada 30 min, por 23,5 h. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes. Análise estatística: Teste T não pareado (**** $p < 0,0001$).

Estes resultados de redução da migração e formação de colônias são promissores para um novo tratamento antitumoral. Estes dados são consistentes com os efeitos do *Hm-FMG* na morfologia das células B16-F10 (Fig. 4.20, p. 70), avaliada pela técnica de imuno-coloração que tingem os filamentos de actina (verde) e núcleo (azul), o qual não causou nenhuma alteração na morfologia celular entre os grupos tratados (100 µg/mL de *Hm-FMG* por 72 h) e controle.

As células melanômicas mantiveram o empilhamento umas sobre as outras, com o mesmo padrão de disseminação e confluência na formação da camada celular, como mostrado na Figura 4.20 (p. 70). Os resultados aqui demonstrados estão de acordo com esses achados, tendo em vista que a fucomanogalactana testada não causou efeitos tóxicos, nem alterou a morfologia celular, mas foi capaz de reprogramar as células melanômicas, alterando a capacidade de formação de colônias e reduzindo a migração celular, sem alterar a proliferação celular.

Estes dados sugerem que a heterogalactana isolada de *H. marmoreus* é promissora para o tratamento antimelanoma, no entanto, adicionais ensaios devem ser realizados para compreender o efeito antitumoral.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos basidiomas do cogumelo *H. marmoreus* foram isolados e identificados quimicamente os seguintes polissacarídeos:

- Fucomanogalactana (denominada *Hm-FMG*; fração *Hm-PF₂AF*) constituída por uma cadeia principal de α -D-Galp conectadas através de ligações glicosídicas do tipo (1→6), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp e β -D-Manp;

- α -glucana ramificada contendo ligação (1→4) e (1→6), similar ao glicogênio, foi isolada na fração *Hm-MRSF₂*. Esta foi identificada por RMN de ¹³C e pelo reativo de Lugol nas frações *Hm-PF₂SK* e *Hm-SF₂SK*, sendo removida por degradação com amilase.

- β -Glucana ramificada formada por uma cadeia principal constituída por unidades de β -D-Glcp ligadas 1→3, as quais se encontram substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp, em uma relação de 1 unidade de β -Glcp 3-O-substituída para 2 unidades 3,6-di-O-substituídas (fração *Hm-S₂AF*);

- β -glucanas ramificadas contendo uma cadeia principal constituída por β -Glcp ligadas (1→6), as quais se apresentam parcialmente substituídas em O-3 *Hm-TASFK* e *Hm-TAPFK*).

Análises de RMN bidimensionais, metilação, degradação parcial de Smith deverão ser realizadas para confirmar o grau de substituição bem como os tipos de cadeia laterais das β -glucanas isoladas.

Visando a comprovação dos efeitos imunomodulatórios relatados para polímeros similares previamente descritos para outras espécies, a fucomanogalactana e as β -glucanas purificadas neste trabalho foram enviadas para a avaliação biológica junto ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. Os resultados preliminares referentes aos ensaios já realizados para a fucomanogalactana de *H. marmoreus* (*Hm-FMG*)

demonstraram os promissores efeitos antimelanoma *in vitro* do referido polímero, sugerindo desta forma que parte dos efeitos terapêuticos relatados para este macrofungo estão correlacionados aos seus polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

- ABU, R.; JIANG Z.; UENO, M. S. I.; NAKAZONO, S.; OKIMURA, T.; CHO, K.; YAMAGUCHI, K.; KIM, D.; ODA T. "Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma". *Biochemical and Biophysical Research communications*, v. 458, p. 727-732, 2015.
- ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. "Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis". *Natural Product Reports*, v. 32, n. 8, p. 1170-1182, 2015.
- American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2018. Available at: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancerfacts-figures-2018.html>. Acesso em 21 de fevereiro de 2018.
- BEDOGNI, B.; POWELL, M.B. "Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin". *Pigment Cell Melanoma Research*, v.22, p.66-74, 2009.
- BISCAIA, S. M. P.; CARBONERO, E. R.; BELLAN, D. L.; BORGES B. S.; COSTA, C. R.; ROSSI, G. R.; GONÇALVES, J. P.; MELO, C. M.; LÍVERO, F. A. R.; RUTHES, A. C.; ZOTZ, R.; SILVA, E. V.; OLIVEIRA, C. C.; ACCO, A.; NADER, H. B.; CHAMMAS, R.; IACOMINI, M.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE E.S. "Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*". *Carbohydrate Polymers*, v. 178, p. 95-104, 2017.
- BONNEKON, B.; WEVERS, A.; JUGERT, F.; MERK, H.; MAHLE, G. "Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their cristal violet binding capacity". *Archives of Dermatological Research*, v. 281, p. 487-490. 1989.
- 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 Chemistry*, v. 111, p. 531–537, 2008.
- CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; FREITAS, C. S.; UTRILLA, P.; GALVEZ, 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*". *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 814-819, 2012.
- CHANG, J. S.; SON, J. K.; LI, G.; OH, J. E.; KIM, J. Y.; PARK, S. H.; BAE, J. T. KIM, H. J; LEE, I. S; KIM, O. M; KOZUKUE, N.; HAN, J. S.; HIROSE, M.; LEE, K. R. "Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by

- hypsiziprenol A₉, isolated from *Hypsizygus marmoreus*". *Cancer Letters*, v. 212, n. 1, p. 7–14, 2004.
- CHANG, S.; MILES, G. P. "Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effects and environmental impact". 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, p. 6-8, 2004.
- CHEN, G.; ZHANG, P.; HUANG, T.; YU, W.; LIN, J.; LI, P.; CHEN, K. "Polysaccharides from *Rhizopus nigricans* mycelia induced apoptosis and G2/M arrest in BGC-823 cells". *Carbohydrate Polymers*, v. 97, p. 800-808, 2013.
- CHEN, J.; SEVIOUR, R. "Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans". *Mycological Research*, v. 111, p. 635-652, 2007.
- CHEN, Y.; ZHANG, X. Y.; XIAO, G. N.; YANG, H. L. "Efficient production of exopolysaccharide by submerged fermentation of *Hypsizygus marmoreus* using a two-stage pH control strategy". *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 31, n. 4, p. 519–526, 2017.
- CHIEN, R. C.; YANG, Y. C.; LAI, E. I.; MAU, J. L. "Anti-Inflammatory Effects of extracts from the medicinal mushrooms *Hypsizygus marmoreus* and *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes)". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 18, n. 6, p. 477–487, 2016.
- CHO, S. M.; KOSHINO, H.; YU, S. H.; YOO, I. D. "A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.)". *Carbohydrate Polymers*, v. 37, p. 13-18, 1998.
- CIUCANU, I.; KEREK, F. "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates". *Carbohydrate Polymers*, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.
- CLAUSE K. C.; BARKER T. H. "Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair". *Current Opinion in Biotechnology*, v. 4, p. 830-833, 2013.
- 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". *Carbohydrate Research*, v. 15, p. 1417-1421, 2002.
- ELSAYED, A. E.; ENSHASY, H. E.; WADAAN, M. A.; AZIZ R. "Cogumelos: uma fonte natural potencial de compostos anti-inflamatórios para aplicações médicas". *OneFile Acadêmico* **2014**.
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M. E. P. K. "Dicionário Micológico". São Paulo: Instituto de Botânica, p. 53, 1967.
- FIDLER, I.; J. "The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited". *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 453–458, 2003.
- FIGUEIREDO, P. L. B.; PINTO, L. C.; COSTA, J. S.; SILVA, A. R. C.; MOURÃO, R. H. V.; MONTENEGRO, R. C.; SILVA J. K. R.; MAIA, J. G. S. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 232, p. 30-38, 2018.

- FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. "Clonogenic assay of cells in vitro". *Nature protocols*, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.
- FU, H. Y.; SHIEH, D. E.; HO, C. T. "Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms". *Journal of Food Lipids*, v. 9, p. 35-46, 2002.
- FU, Z.; LIU, Y.; ZHANG, Q. "A potent pharmacological mushroom: *Pleurotus eryngii*". *Fungal Genomics & Biology*, v. 6, p. 1-5, 2016.
- GE, Q.; ZHANG, A. Q.; SUN, P. L. "Isolation, purification and structural characterization of a novel water-soluble glucan from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilát". *Journal of Food Biochemistry*, v. 34, p. 1205-1215, 2010.
- GILLETTE B. M.; ROSSEN N. S.; DAS N.; LEONG D.; WANG M.; DUGAR A.; SIA S. K. "Engineering extracellular matrix structure in 3D multiphase tissues". *Biomaterials*, v. 32, n. 32, p. 8067- 8076, 2011.
- GUAN, G. P.; WANG, H. X.; NG, T. B. "A novel ribonuclease with antiproliferative activity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*". *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, n. 12, p. 1593-1597, 2007.
- HALBWACHS, H.; SIMMEL, J.; BÄSSLER, C. "Tales and mysteries of fungal fruiting: How morphological and physiological traits affect a pileate lifestyle". *Fungal Biology Reviews*, v. 30, p. 36-61, 2016.
- HAMIDI, H.; PIETILÄ, M.; IVASKA, J. "The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting". *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 9, p. 1017-1023, 2016.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. "The hallmarks of cancer". *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. "Hallmarks of cancer: The next generation". *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HAWKSWORTH, D. L. "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation". *Mycological Research*, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. "Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species". *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 4, p.1-2, 2017.
- HUNG, C. F.; HSU, B. Y.; CHANG S. C.; CHEN B. H. "Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujube*". *Nutrition*, v. 28, p. 98-105, 2012.
- ICCVAM. Test method evaluation report: In vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests, n. November, 2006.
- IKEKAWA, T.; SAITOH, H.; FENG, W.; ZHANG, H.; LI, L.; MATSUZAWA T.; "Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. I. Antitumor activity of extracts and polysaccharides". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, p. 1954-1957, 1992.

- IKEKAWA, T. "Bunashimeji, *Hypsizygus marmoreus*: antitumor activity of extracts and polysaccharides". *Food Reviews International*, v. 11, p. 207–209, 1995.
- INCA. Disponível em http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322, acessada em agosto de 2018.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). "ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. *Instituto Nacional de Câncer*". 3ª ed.; Rio de Janeiro: Inc, 2011, p. 1.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO10993-5, Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009. Disponível em <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- ITONORI, S.; YAMAWAKI, S.; AOKI, K.; YAMAMOTO, K.; HADA, N.; TAKEDA, T.; DULANEY, J. T.; SUGITA, M. "Structural characterization of glycosylinositolphospholipids with a blood group type B sugar unit from the edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*". *Glycobiology*, v. 18, n. 7, p. 540–548, 2008.
- IUCHI, T.; HOSAKA, T.; SHIROISSEI, M.; ONO, H.; INUKAI, K.; SUMITA, T.; SAKAI, G.; KATAYAMA, S.; AWATA, T. "Influence of treatment with extracts of *Hypsizygus marmoreus* mushroom on body composition during obesity development in KK-Ay mice". *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 61, p. 96-100, 2015.
- IVANOVA, T. S.; KRUPODOROVA, T. A.; BARSHEYN, V. Y.; ARTAMONOVA, A. B.; SHLYAKHOVENKO, V. A. "Anticancer substances of mushroom origin". *Experimental Oncology*, v. 36, n. 2, p. 58-66, 2014.
- JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. "Fractionation using copper complexes." *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, p. 36-38, 1965.
- KANG, M. G.; KIM, Y. H.; BOLORMAA, Z.; KIM, M. K.; SEO, G. S.; LEE, J. S. "Characterization of an antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*". *BioMed Research International*, v. 2013, p.1-6, 2013.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. "Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi", 10th ed. Wallingford: CAB International, p. 396, 474-475, 2008.
- KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; ALQUINI, G.; ROSA, M. C. C.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. "The origin of mannans found in submerged culture of basidiomycetes". *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 1052-1056, 2010.
- KRASNOPOLSKAYA, L. M.; LEONTIEVA, M. I.; AVTONOMOVA, A. V.; ISAKOVA, E. B.; BELITSKII, I. V.; USOV, A. I.; BUKHMAN, V. M. "Antitumor properties of submerged cultivated biomass and extracts of medicinal mushrooms of genus *Hypsizygus* Singer (Agaricomycetidae)". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 10, n. 1, p. 25–35, 2008.
- LAM, S. K.; NG, T. B. "Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of

- the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, p. 1071–1075, 2001.
- LEE, J. S.; OKA, K.; WATANABE, O.; HARA, H.; ISHIZUKA, S. "Immunomodulatory effect of mushrooms on cytotoxic activity and cytokine production of intestinal lamina propria leukocytes does not necessarily depend on β -glucan contents". *Food Chemistry*, v. 126, p. 1521–1526, 2011.
- LEE, Y. L.; JIAN, S.Y.; MAU, J. L. "Composition and non-volatile taste components of *Hypsizigus marmoreus*". *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 594–598, 2009.
- LEE, Y. L.; YEN, M. T.; MAU, J. L. "Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*". *Food chemistry*, v. 104, p. 1-9, 2007.
- LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro". *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIU, J.; SUN, Y.; YU, H.; ZHANG, C.; YUE, L.; YANG, X.; WANG, L.; LIU, J. "Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer)". *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 348-352, 2012.
- LIU, M.; LI, S.; WANG, X.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; LIU, H.; JIA, L. "Characterization, anti-oxidation and anti-inflammation of polysaccharides by *Hypsizygyus marmoreus* against LPS-induced toxicity on lung". *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 111, p. 121-128, 2018.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. "The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression". *The Journal of Cell Biology*, v. 196, n. 4, p. 395-406, 2012.
- MA, G.; YANG, W.; MARIGA, A. M.; FANG, Y.; MA, N.; PEI, F.; HU, Q.; "Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue". *Carbohydrate Polymers*, v.114, p. 297–305, 2014.
- MAJI, P. K.; SEM, I. K.; BEHERA, B.; MAITI, T. K.; MALLICK, P.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. "Structural characterization and study of immunoenhancing properties of a glucan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*". *Carbohydrate Research*, v. 358, p. 110-115, 2012.
- MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. "Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities". *Carbohydrate Research*, v. 424, p. 30-41, 2016.
- MENYHÁRT, O.; HARAMI-PAPP, H.; SUKUMAR, S.; SCHÄFER, R.; MAGNANI, L.; de BARRIOS, O.; GYÖRFFY, B. "Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer". *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1866, p. 300–319, 2016.

- MILHORINI, S.; S.; F.; SMIDERLE, R.; BISCAIA, S. M.; P.; ROSADO, F.; R.; TRINDADE, E.; S.; IACOMINI, M. "Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration". *Carbohydrate Polymers*, v. 190, p. 50–56, 2018.
- MIZUMOTO, H.; OHNOGI, H.; MIZUTANI, S.; ENOKI, T.; ASADA, K.; SUGIMOTO, Y.; KATO, I. "Mechanism of apoptosis induced by polyterpene from Buna-shimeji (*Hypsizygus marmoreus*) in HL-60 cells". *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, v. 55, p. 612–618, 2008.
- MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. "Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)". *Int. Immunopharmacol.*, v.7: p.701, 2007.
- MORI, K.; KOBAYASHI, C.; TOMITA, T.; INATOMI, S.; IKEDA, M. "Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eryngii), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice". *Nutrition Research*, v. 28, n. 5, p. 335–342, 2008.
- MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MULLER, G. M.; SCHMIT, J. P.; LEACOCK, P. R.; BUYCK, B.; CIFUENTES, J.; DESJARDIN, D. E.; HALLING, R. E.; HJORTSTAM, K.; ITURRIAGA, T.; LARSSON, K. H.; LODGE, D. J.; MAY, T. W.; MINTER, D.; RAJCHENBERG, M.; REDHEAD, S. A.; RYVARDEN, L.; TRAPPE, J. M.; WATLING, R.; WU, Q. "Global diversity and distribution of macrofungi". *Biodiversity Conservation*, v. 16, p. 37-48, 2007.
- MUSZYŃSKAA, B.; GRZYWACZ-KISIELEWSKA, A.; KAŁA, K.; GDULA-ARGASIŃSKA, J. "Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review". *Food Chemistry*, v. 243, p. 373–381, 2018.
- MYCOBANK DATA BASE. Disponível em: <http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx> Page=Home acesso: 12/04/2017.
- MYERS, K. A.; APPLGATE, K. T.; DANUSER, G.; FISCHER, R. S.; WATERMAN, C. M. "Distinct ECM mechanosensing pathways regulate microtubule dynamics to control endothelial cell branching morphogenesis". *The Journal of Cell Biology*, v. 192, p. 321–334, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. "Lehninger: Princípios de Bioquímica" 6ª ed.; Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 243.
- NEWMAN, A. C.; NAKATSU, M. N.; CHOUA, W.; GERSHON, P. D.; HUGHES, C. C. W. "The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation". *Molecular Biology of the Cell*, v. 22, n. 20, p. 3791-3800, 2011.
- NOVAES, M. R. C. G.; VALADARES, F.; REIS, M. C.; GONÇALVES, D. R.; MENEZES, M. C. "The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence-based

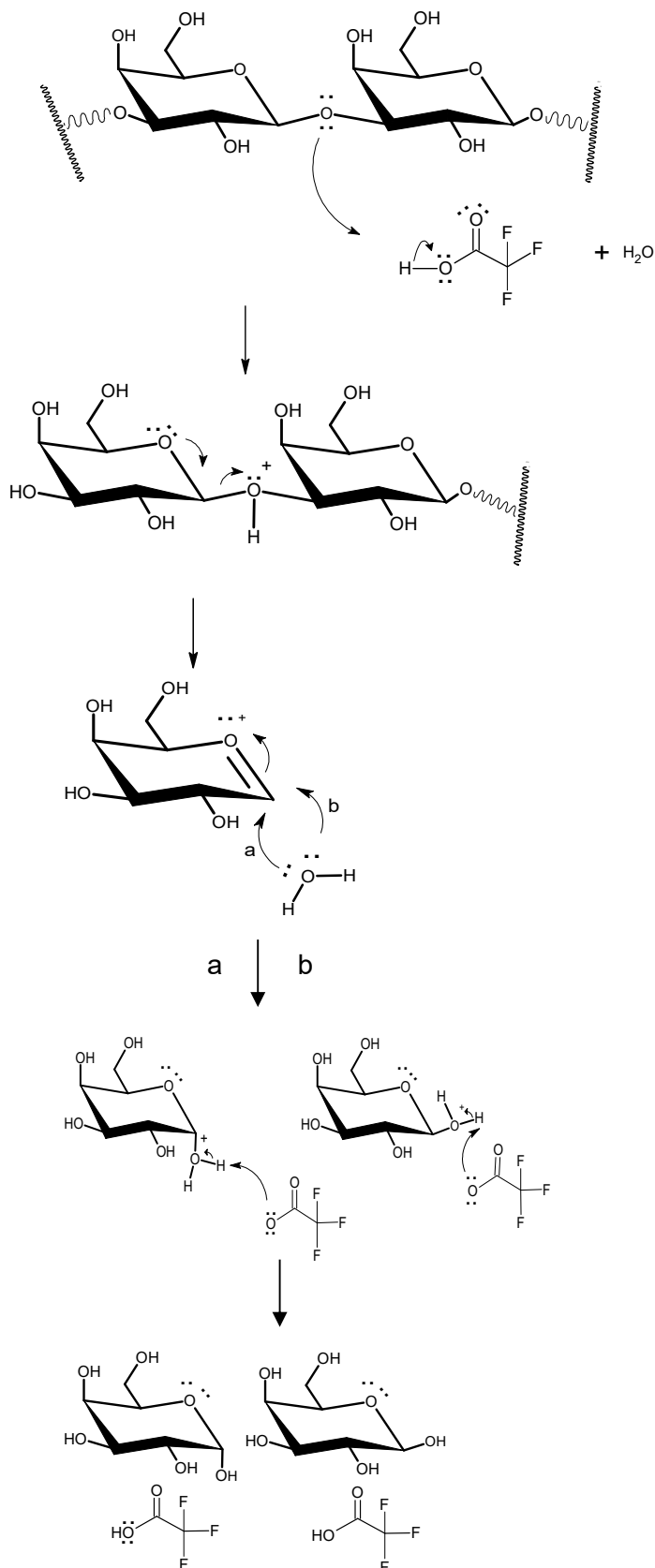
- medicine". *Clinics*, v. 66, p. 2133-2139, 2011.
- OHNO, N. "Structural diversity and physiological functions of β -glucans". *International of Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 7, p. 167-174, 2015.
- OKA, K.; ISHIHARA A.; SAKAGUCHI, N.; NISHINO, S.; PARADA, R. Y.; NAKAGIRI, A.; OTANI, H. "Antifungal activity of volatile compounds produced by an edible mushroom *Hypsizygus marmoreus* against phytopathogenic fungi". *Journal of Phytopathology*, v. 163, p. 987-996, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE OMS. "Fatos importantes". Disponível: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. acesso: Fev/2018.
- OSKARSSON, T. "Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis". *The Breast*, v. 22, n. 2, p.S66-S72, 2013.
- PANG, G.; WANG, F.; ZHANG, L. W. "Dose matters: Direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment". *Carbohydrate Polymers*. v. 195, p. 243-256, 2018.
- PEREIRA, F. C. "Bioconversão de açúcares provenientes de biomassas hidrolisadas a etanol e pré tratamentos de materiais lignocelulósicos com líquido iônico. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. p. 6-9, 2015.
- PETRE, M. "Mushroom biotechnology. Developments and applications". London: Academic Press, 2016. p. XIX.
- QUINTANILLA, D.; M. J.; BICHAKJIAN, C. K. "Management of early-stage melanoma". *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 27, p. 35-42, 2019.
- REIS, F. S.; MARTINS, A.; VASCONCELOS, M. H.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. "Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms". *Trends in Food Science & Technology*, v. 66, p. 48-62, 2017.
- REN, D.; WANG, N.; GUO, J.; YUAN, L.; YANG X. "Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells". *Carbohydrate Polymers*, v. 138, p. 123-133, 2016.
- REPETTO, G.; PESO, D.; ZURITA, J. L. "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability cytotoxicity". *Nature Protocols*, v. 3, p.1125-1131, 2008.
- RODRÍGUEZ, I.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 97, p. 41-55, 2016.
- ROZARIO T.; DeSIMONE D. W. "The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view". *Developmental Biology*, v. 341, p. 126-140, 2010.
- RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; BAGGIO, C. H.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SANTOS, A. R. S.; IACOMINI, M.

- "Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: structure and inflammatory pain inhibition". *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 761-769, 2013.
- SAJON, S. R.; SANA, S.; RANA, S.; RAHMAN, S. M.; NISHI, Z. M. "Mushrooms: Natural factory of anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 7, n. 1, p. 464-475, 2018.
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. "Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation". *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 731-739, 2005.
- SCHADENDORF, D.; van AKKOOI, A. C. J.; BERKING, C.; GRIEWANK, K. G.; GUTZMER, R.; HAUSCHILD, A.; MD.; STANG, A.; ROESCH, A.; UGUREL, S. "Melanoma". *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 971-984, 2018.
- SHOJI, Y.; ISEMURA, M.; MUTO, H.; ISEMURA, S.; AOYAGI, Y. "Isolation of a 41-kDa protein with cell adhesion activity for animal tumor cells from the mushroom *Hypsizigus marmoreus* by affinity chromatography with type IV collagen immobilized on agarose". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 64, n. 4, p. 775-780, 2000.
- SIEGEL R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. "Cancer statistics, 2015". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 65, p.5-29, 2015.
- SINGDEVSACHAN, S. K.; AUROSHREE, P.; MISHRA, J.; BALIYARSINGH, B.; TAYUNG, K.; THATOI, H. "Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review". *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.
- SRINIVASAHAN, V.; DURAIRA, J. B. "In vitro and apoptotic activity of polyssaccharide rich *Morinda citrifolia* fruit on MCF cells". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 8, p. 190-193, 2015.
- STAMETS, P. "Growing gourmet and medicinal mushrooms". 3rd ed. Berkeley: Ten Speed Press, p. 473-483, 2010.
- SUZUKI, T.; ABE, T.; UMEHARA, K.; CHOI, J. H.; HIRAI H.; DOHRA, H.; KAWAGISHI, H. "Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*". *Mycoscience*, v. 56, p. 359-363, 2015.
- SUZUKI, T.; UMEHARA, K.; TASHIRO, A.; KOBAYASHI, Y.; DOHRA, H.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. "An antifungal protein from the culinary-medicinal beech mushroom, *Hypsizygyus marmoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetideae)", *International Journal of Medicinal Mushroom*, v. 13, n. 1, p. 27-31, 2011.
- SWEET, D. T.; CHEN, Z.; WILEY, D. M.; BAUTCH, V. L.; TZIMA, E. "The adaptor protein Shc integrates growth factor and ECM signaling during postnatal angiogenesis". *Blood*, v. 119, p. 1946-1955, 2012.
- THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS S. S.; GIALELI,C.; KARAMANOS, N. K. "Extracellular matrix structure". *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 97, p. 4-27, 2016.

- 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*". *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1682–1686, 2009.
- TORRE, L.; BRAY F.; SIEGEL, R.; FERLAY, J; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. "Global cancer statistics, 2012". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 65, p. 87-108, 2015.
- TSAI, P. F.; MA, C. Y. "Effect of a glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow on growth and differentiation of human leukemic U937 cells". *Food and Chemical Toxicology*, v. 62, n. 2, p. 782–785, 2013.
- TSAI, P. F.; MA, C. Y.; WU, J. S. B. "A novel glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow with growth inhibitory effect against human leukaemic U937 cells". *Food Chemistry*, v. 141, p. 1252–1258, 2013.
- TSUCHIDA, K.; AOYAGI, Y.; ODANI, S.; MITA, T.; ISEMURA, M. "Isolation of a novel collagen-binding protein from the mushroom, *Hypsizygus marmoreus*, which inhibits the Lewis lung carcinoma cell adhesion to type IV collagen". *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 1481–1484, 1995.
- VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. "An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells". *Proceedings of the western Pharmacology Society*, v. 54, p. 10-14, 2011.
- WANG, W.; CHEN, K.; LIU, Q.; JOHNSTON, N.; MA, Z.; ZHANG, F.; 1, ZHENG, X. "Suppression of tumor growth by *Pleurotus ferulae* ethanol extract through induction of cell apoptosis, and inhibition of cell proliferation and migration". *PLoS One*, v.9(7):e102673, 2014.
- WASSER, S. P. "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides". *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.
- WHO. Cancer. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 22 de agosto, 2016.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, "A reduction with sodium borohydride". *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 65-67, 1963a.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. "Acetylation". *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 211-215, 1963b.
- XU, M. L.; CHOI, J. Y.; JEONG, B. S.; LI, G.; LEE, K. R.; LEE, C. S.; WOO, M. H.; LEE, E. S.; JAHNG, Y.; CHANG, H. W.; LEE, S. H.; SON, J. K. "Cytotoxic constituents isolated from the fruit bodies of *Hypsizygus marmoreus*". *Archives of Pharmacal Research*, v. 30, n. 1, p. 28-33, 2007.
- YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; Fu, X.; SHU, T.; BI, Y.; SONG, B. "Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer". *Carbohydrate Polymers*, v. 95, p. 615– 620, 2013.
- YU, Y.; SHENA, M.; SONGA, Q.; XIEA, J. "Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review". *Carbohydrate Polymers*. v. 183, p. 91–101, 2018.

- ZHANG, B. Z.; INNGJERDINGEN, K. T.; ZOUB, Y. F.; RISE, F.; MICHAELSEN, T. E.; YANA, P. S.; PAULSEN, B. S. "Characterisation and immunomodulating activities of exo-polysaccharides from submerged cultivation of *Hypsizygus marmoreus*". *Food Chemistry*, v. 163, p. 120-128, 2014.
- ZHANG, B.; YAN, P.; CHEN, H.; HE, J. "Optimization of production conditions for mushroom polysaccharides with high yield and antitumor activity". *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 4, p. 2569–2575, 2012.
- ZHANG, L.; LI, Z. H.; DONG, Z. J.; LI, Y.; LIU, J. K. "A viscidane diterpene and polyacetylenes from cultures of *Hypsizygus marmoreus*". *Natural Products and Bioprospecting*, v. 5, p. 99-103, 2015.
- ZHOU, L.; YANG, K.; ANDL, T.; WICKETT, R.R.; ZHANG, Y. "Perspective of targeting cancer-associated fibroblasts in melanoma". *Journal of Cancer*, v. 6, p. 717–726, 2015.
- ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources : A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*. v. 90, p. 1395–1410, **2012**.

APÊNDICE A - Proposta de mecanismo para hidrólise ácida de carboidratos



1ª ETAPA: O polissacarídeo atua como um nucleófilo, o par de elétrons do oxigênio abstrai o próton do ácido trifluoroacético, ocorrendo uma clivagem heterolítica.

2ª ETAPA: O par de elétrons do oxigênio do anel forma uma dupla ligação com o carbono anomérico, ocorrendo a clivagem heterolítica para o oxigênio da ligação glicosídica.

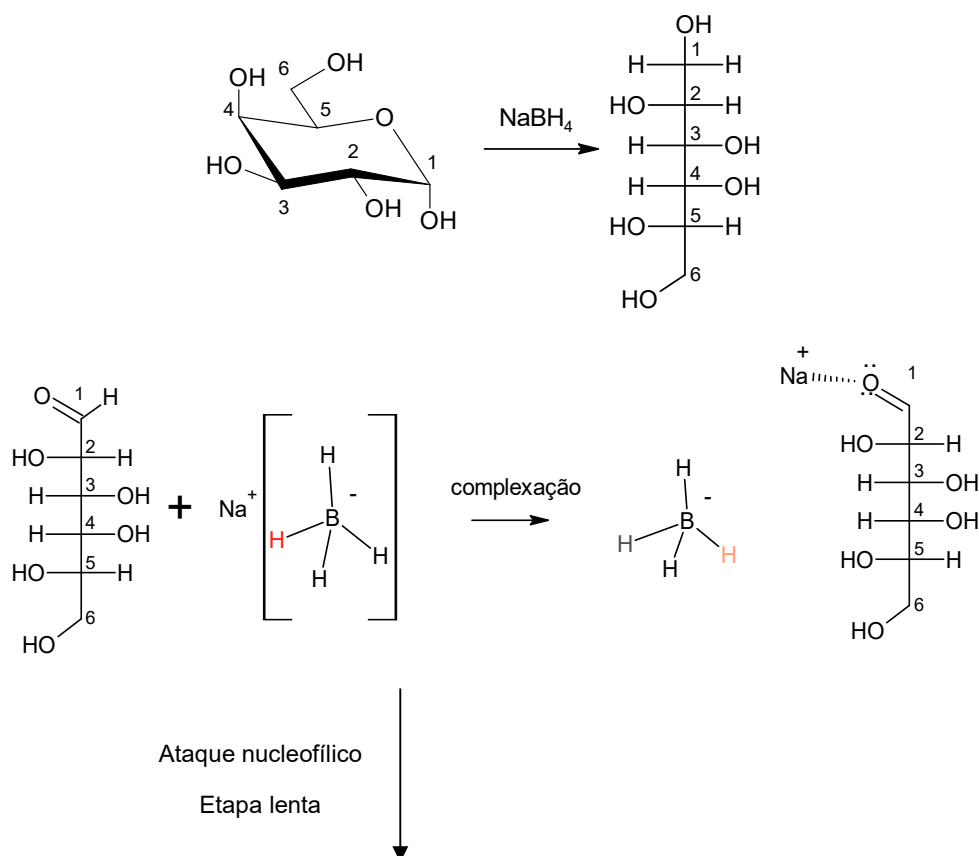
3ª ETAPA: A água em meio reacional agindo como nucleófilo se liga ao carbono anomérico (hibridizado em sp^2) e a dupla ligação é desfeita, onde o par de elétrons dessa ligação desloca para o oxigênio.

4ª ETAPA: Para a regeneração do ácido, sua base conjugada abstrai um próton da molécula água ligada.

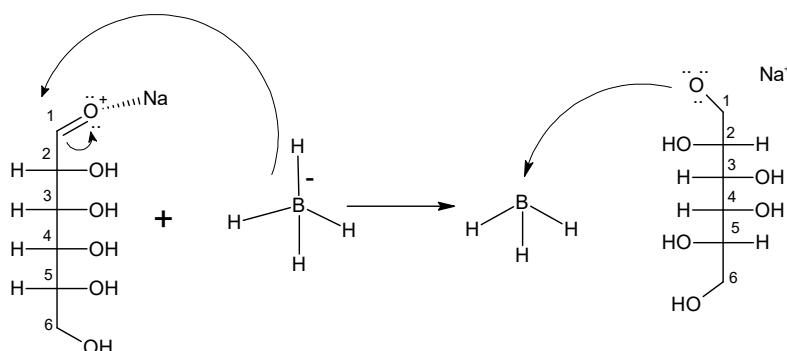
5ª ETAPA: Formação do produto em Alfa e Beta e regeneração do ácido Trifluoroacético.

APÊNDICE B- Proposta de mecanismo de redução com borohidreto

Reação geral:

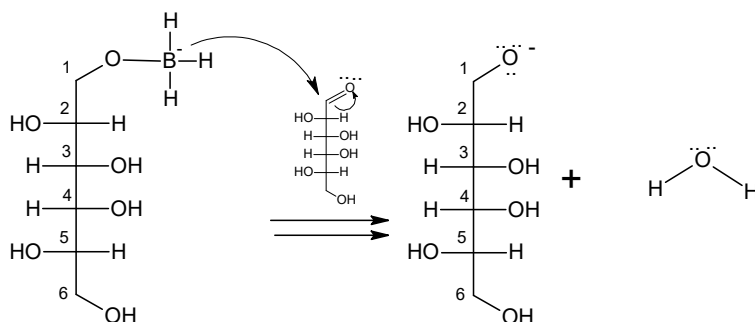


1ª etapa: ocorre a complexação do oxigênio da carbonila com o cátion Na^+ , fazendo com que aumente a eletrofilicidade do carbono (1), essa etapa é rápida, ocorrendo antes da transferência do hidreto (nucleófilo)

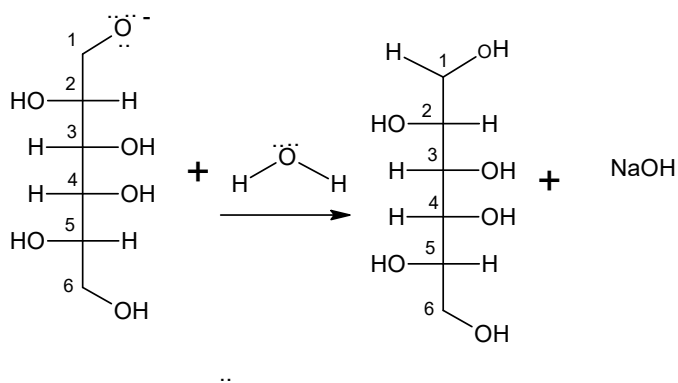


2ª etapa: Posteriormente, um dos hidretos do BH_4 é transferido com seu par de elétrons à carbonila, havendo uma clivagem heterolítica na ligação π da dupla entre o C-O, assim, o oxigênio estará instável e irá atuar como nucleófilo atacando o B com seus respectivos hidrogênios. O alcóxido formado estabiliza

o BH_3 , formando novamente uma espécie tetravalente de boro. Esta reduz outro equivalente de composto carbonílico, até os 4 hidrogênios serem transferidos.



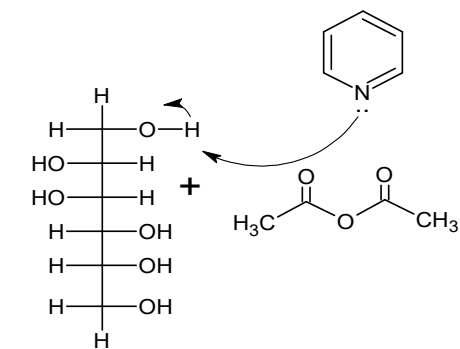
3ª etapa: Ocorrerá a formação do intermediário alcooxi-borohidreto, o qual atua como um intermediário e agente redutor, reduzindo (os hidrogênios que atacam outros C da carbonilas). Os produtos formados, os alcóxidos, são altamente reativos e comportam-se como uma base forte conjugada de um álcool, onde o oxigênio irá abstrair os hidrogênios das moléculas de água.



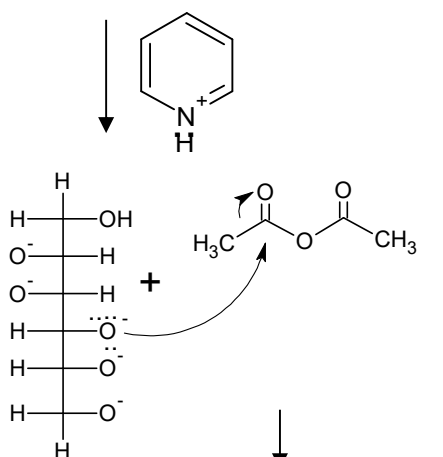
4ª. etapa: Com o termino da redução acarretara o aumento de hidrogênio na molécula, onde a carbonila é reduzida à álcool.

CLAYDEN, J., GREEVES, N., & WARREN, S. G.; Organic chemistry. Oxford: Oxford University Press. 6ª edição, 2012.

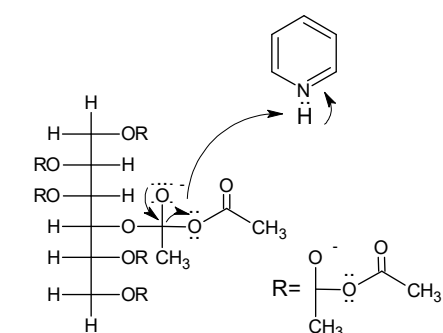
APÊNDICE C - Proposta de mecanismo para acetilação de carboidratos



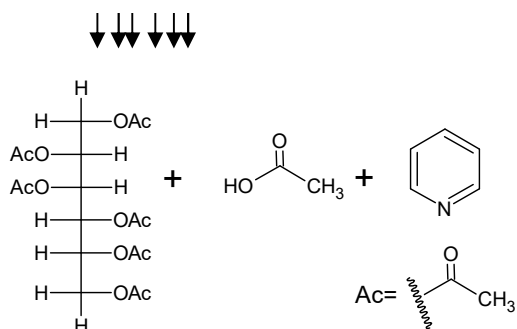
1ª ETAPA: A piridina abstrai o próton das hidroxilas livres, atuando como catalisador para que o oxigênio se torne um bom nucleófilo.



2ª ETAPA: O oxigênio da molécula atua como nucleófilo atacando a carbonila anidrido acético.

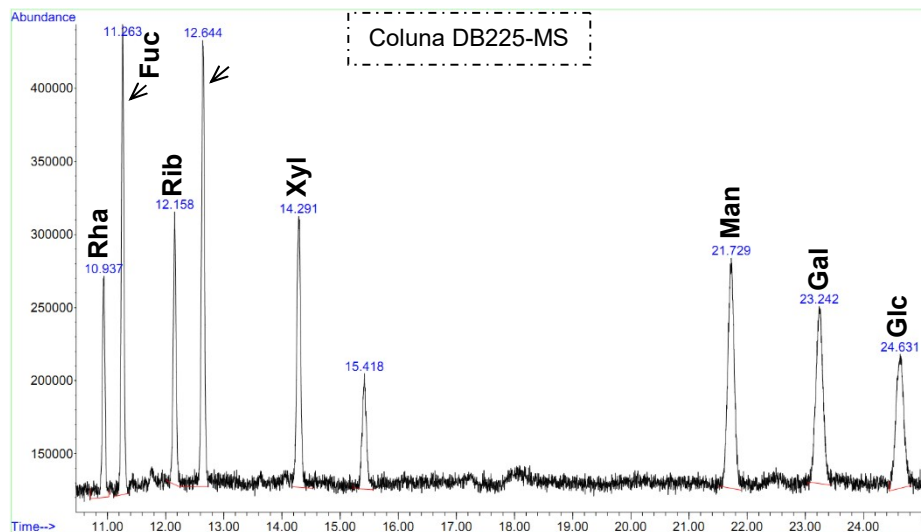


3ª ETAPA: Abstração do próton da piridina para formação do grupo acetil.

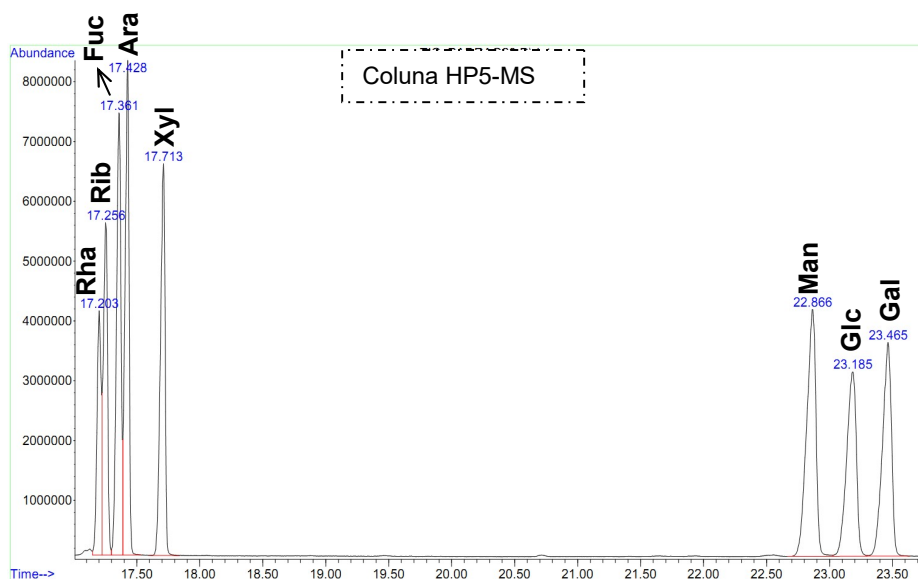


4ª ETAPA: Molécula com todas hidroxilas acetiladas é com formação do grupo acetil e piridina.

APÊNDICE D - Cromatogramas e espectros de massas obtidos por CG-EM, utilizando colunas de sílica fundida DB225-MS e HP5-MS, referentes ao padrão contendo os principais monossacarídeos encontrados em polissacarídeos fúngicos

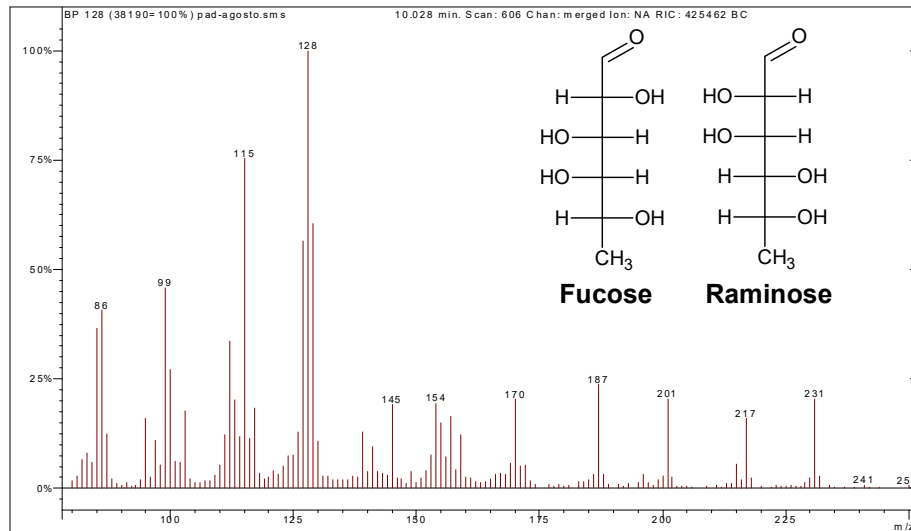


(Coluna DB-225-MS): 50 °C por 1 min com rampa de 40 °C/min até 220 °C, mantida isotermicamente por 20 min.

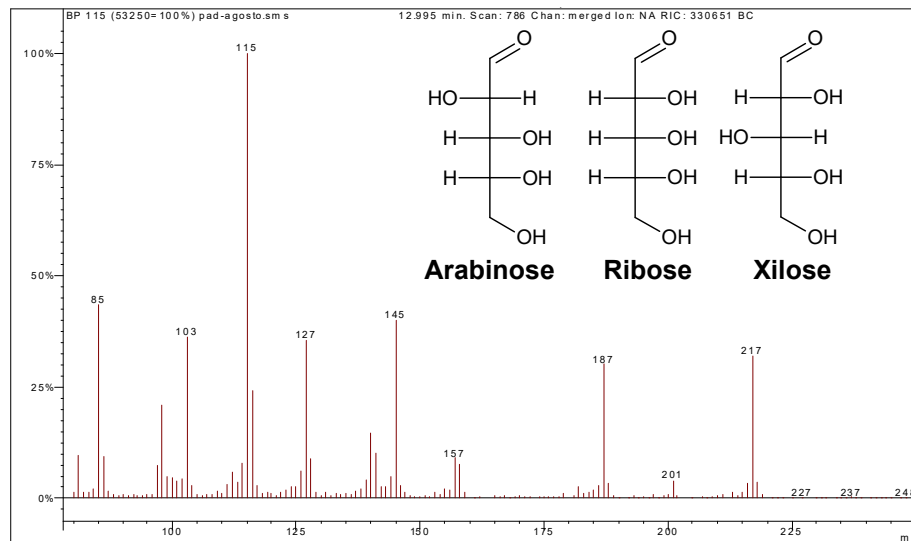


(Coluna HP5-MS): 75 °C por 1 min seguida das seguintes rampas de aquecimento de 35 °C/min até 100°C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min) e rampa de 65 °C.min até 240 °C (2 min)

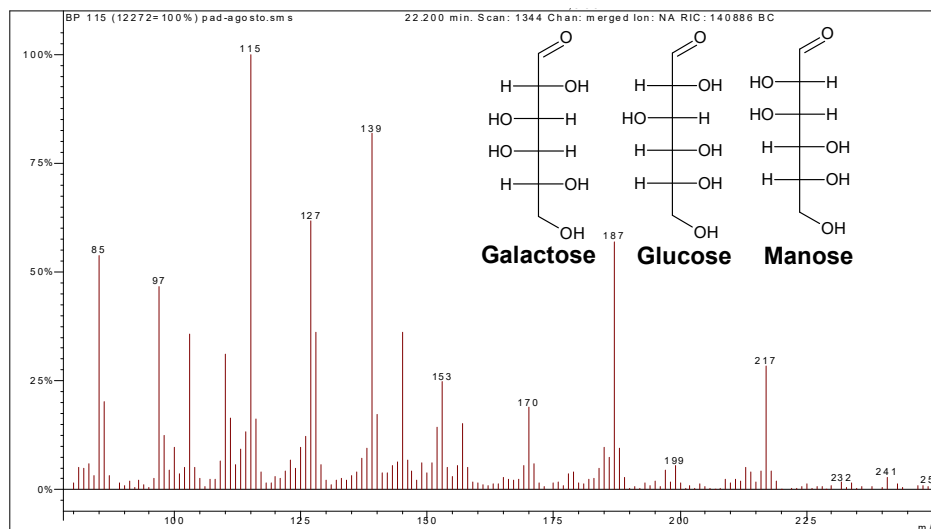
DESOXI-HEXOSES



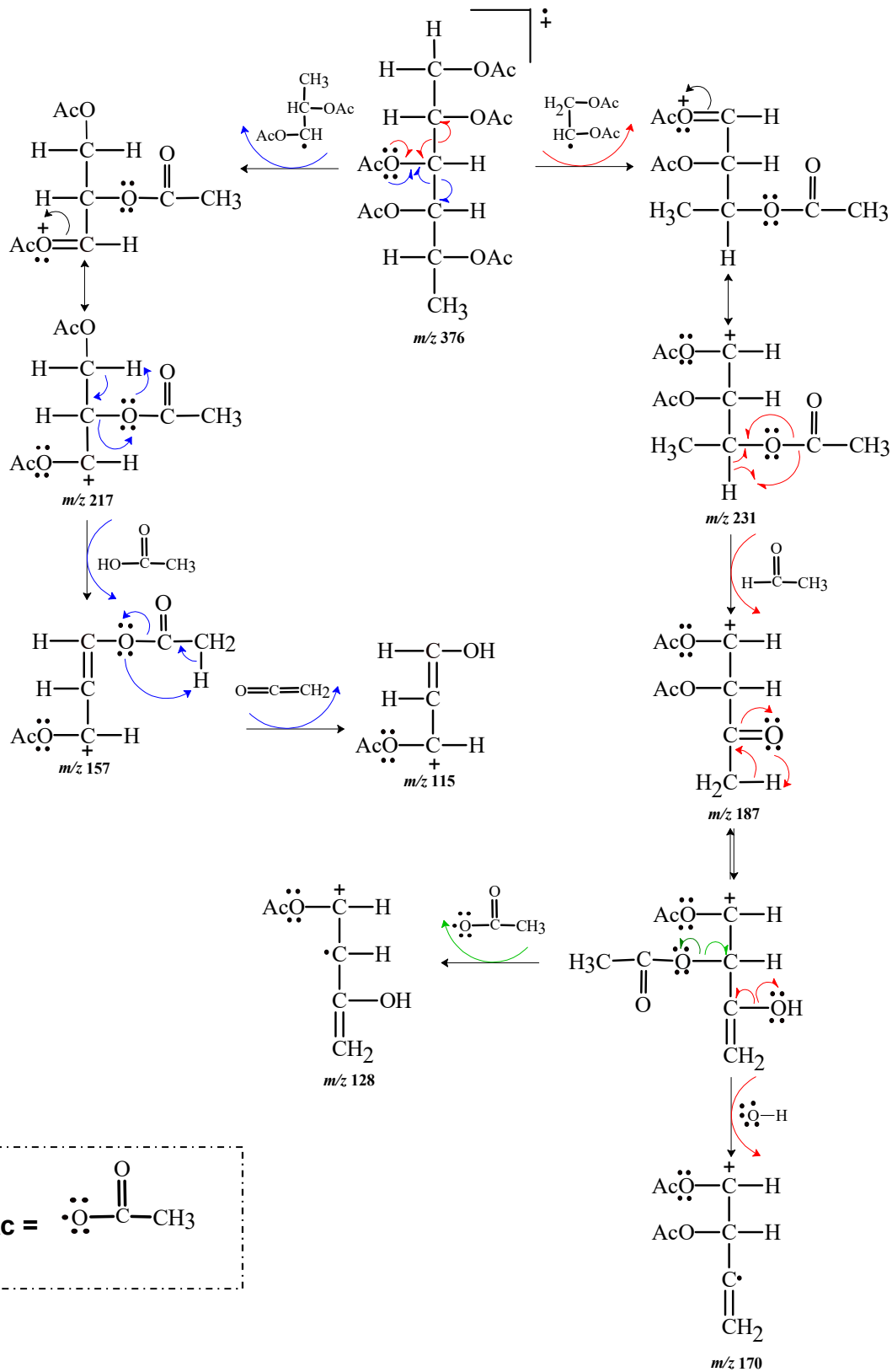
PENTOSES

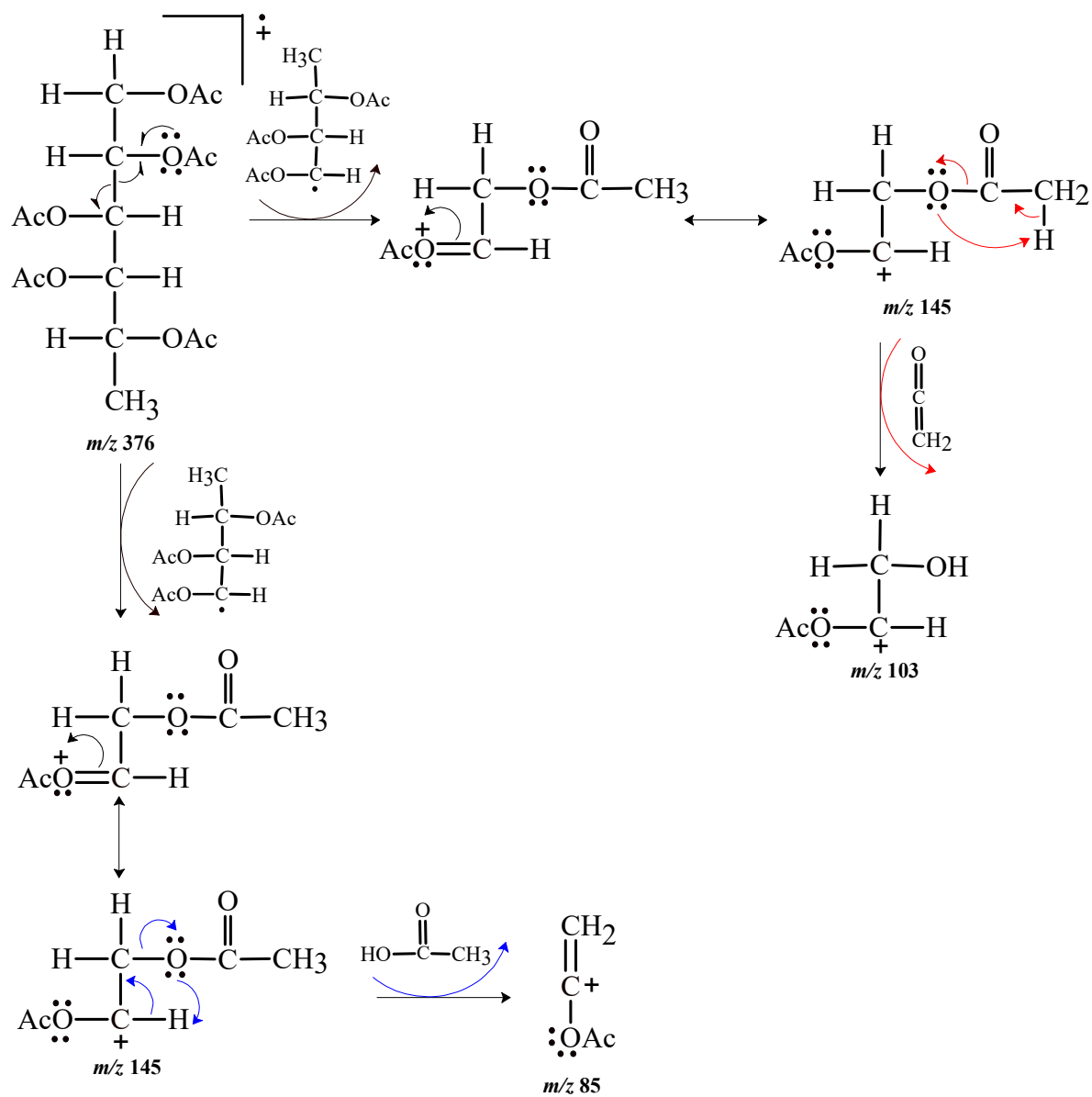


HEXOSES

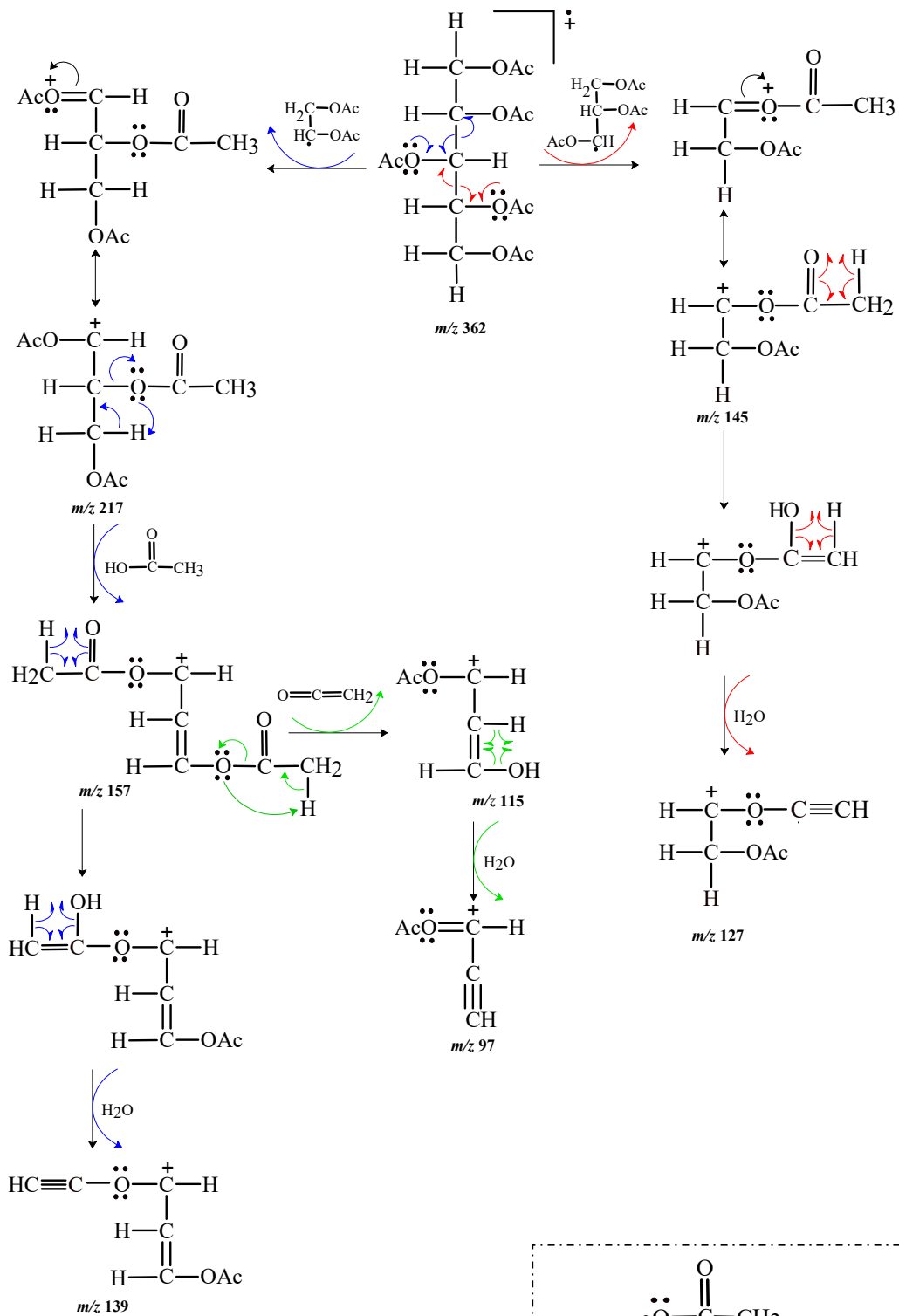


PRINCIPAIS FRAGMENTOS SECUNDÁRIOS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS
DESOXI-HEXOSES (Ex: **Fucose** e **Raminose**)

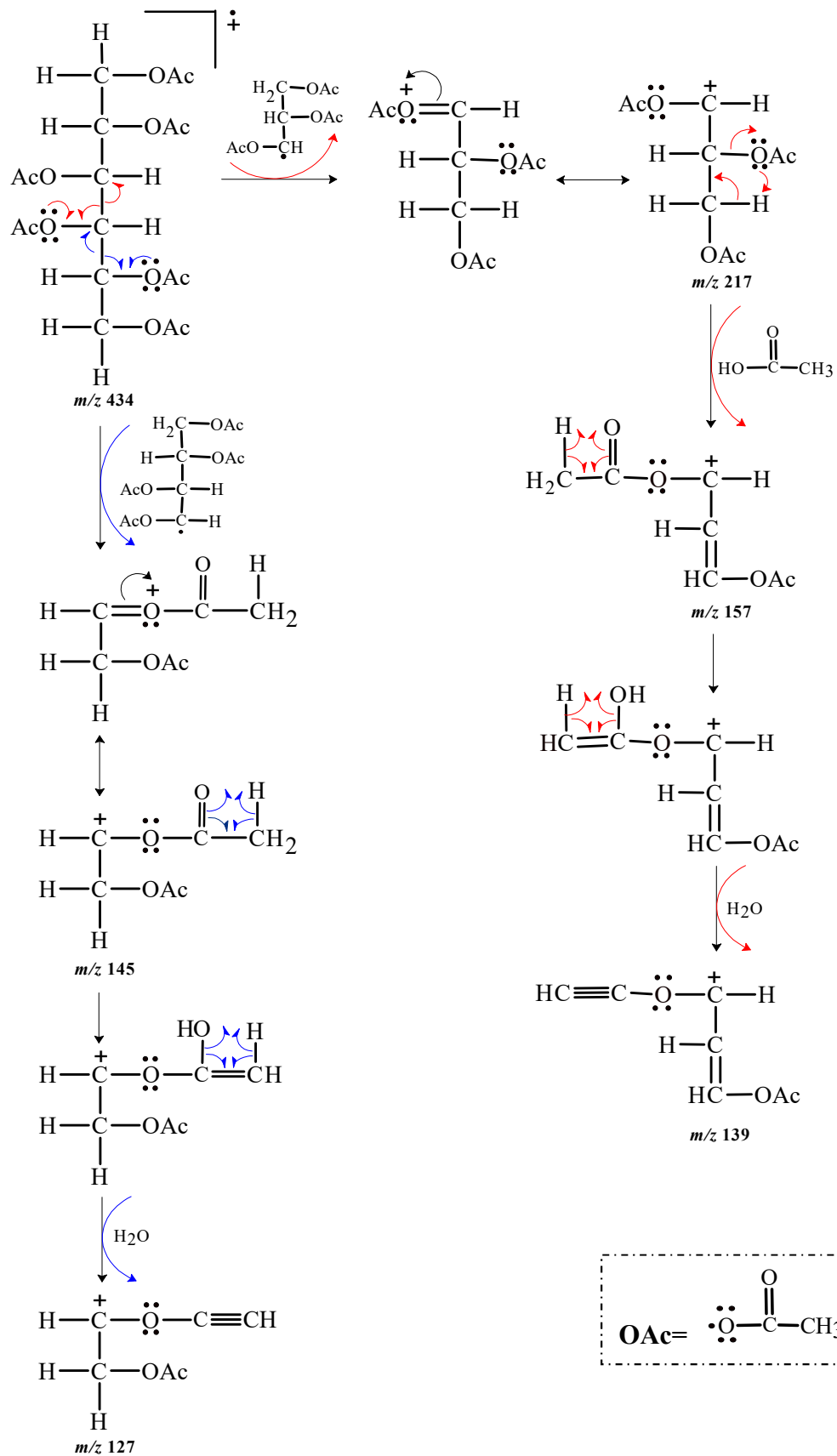


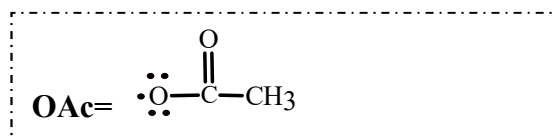
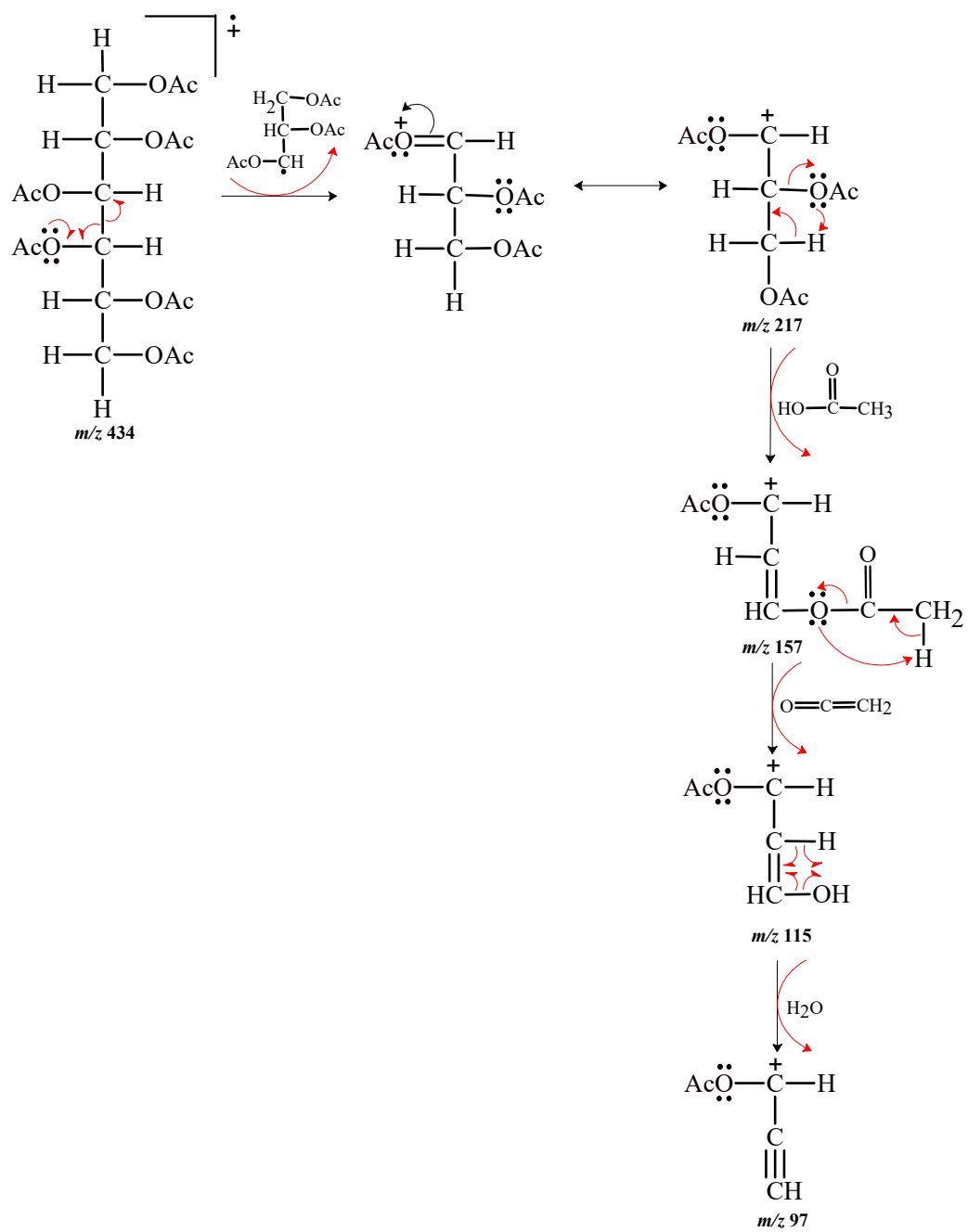


→ PENTOSES (Ex: Arabinose, Xilose e Ribose)

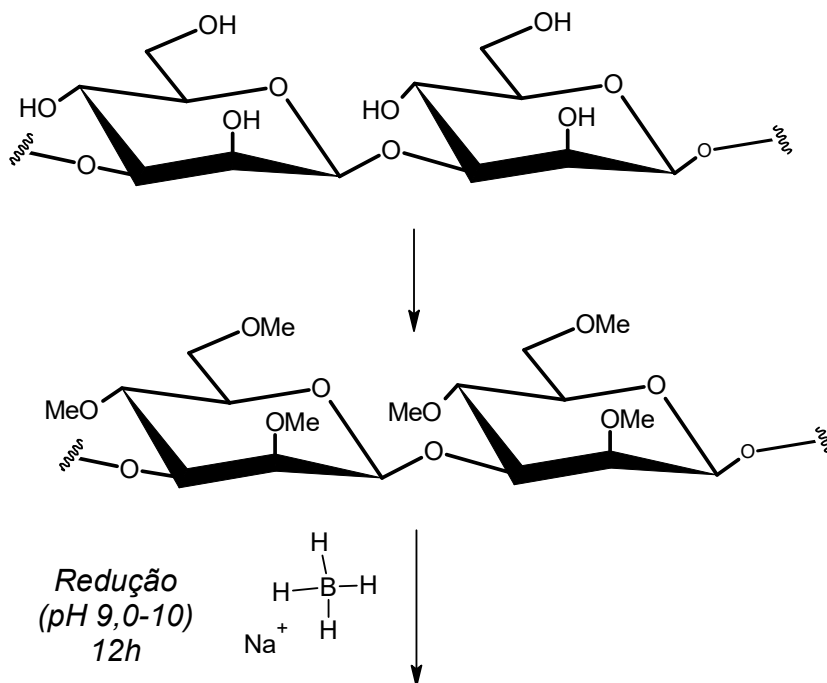


→ HEXOSES (Ex: Manose, Galactose e Glucose)





APÊNDICE E - Esquema do processo de obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados



Hidrólise Ac. Fórmico 45% (12h)

