



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

ESTEFÂNIA VIANO DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO DE CARBOIDRATOS ISOLADOS DO MICÉLIO DO
COGUMELO MEDICINAL *Grifola frondosa* (“Maitake”)**

**CATALÃO - GO
2014**

ESTEFÂNIA VIANO DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO DE CARBOIDRATOS ISOLADOS DO MICÉLIO DO
COGUMELO MEDICINAL *Grifola frondosa* (“Maitake”)**

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: Produtos Naturais e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Co-orientadora: Dra. Andrea Caroline Ruthes

CATALÃO - GO

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Silva, Estefânia Viano da
ESTUDO QUÍMICO DE CARBOIDRATOS ISOLADOS DO MICÉLIO
DO COGUMELO MEDICINAL Grifola frondosa ("Maitake") [manuscrito]
/ Estefânia Viano da Silva. - 2014.
xi, 101 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero; co-orientadora
Dra. Andrea Caroline Ruthes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional
Catalão, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão,
2014.

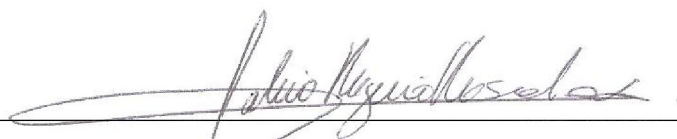
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Cogumelos medicinais . 2. Grifola frondosa. 3. Maitake. 4.
heteropolissacarídeos. 5. beta-glucanas. I. Carbonero, Elaine
Rosechrer, orient. II. Ruthes, Andrea Caroline, co-orient. III. Título.

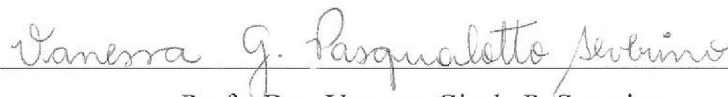
*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de
Dissertação de Mestrado da candidata **Estefânia Viano da Silva**, realizada em 26 de
junho de 2014.*



Prof.a. Dra. Elaine Rosecher Carbonero



Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado



Prof.a. Dra. Vanessa Gisele P. Severino

A minha avó Helena M. Neiva, uma pessoa abençoada por Deus
que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos,
sendo um pai, uma mãe e amiga. Amor eterno!
Ao meu noivo Peter Sebastião pelo amor incondicional,
incentivo e paciência.

Obrigada por fazerem parte desta realização!

À Profa. Dra. Elaine R. Carbonero que assumiu o papel de mãe
em muitos momentos da minha vida, obrigada por TUDO!

Graças a você consegui concluir mais uma etapa!

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo aconchego em teus braços a cada turbulência, medo e angústia. Obrigada pela saúde, paciência, sabedoria e força.

À minha amada avó Helena M. Neiva pela dedicação, amor e orações. Sempre ensinando que a cada trajetória as dificuldades surgirão e para superá-las basta fé, perseverança e paciência. Não importa nada o que aconteça ela está ali para dizer: “Você já é vitoriosa”.

Ao meu noivo Peter Sebastião da Silva pela grande compreensão, amor e por estar presente em todos os momentos. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e ajudar realizá-los. Você me faz a cada dia querer ser uma pessoa melhor!

À minha orientadora Elaine R. Carbonero pelo incentivo, dedicação e amizade. Obrigada por acreditar no meu potencial e estar sempre buscando o melhor de mim. Você é uma grande profissional e mãe, ao seu lado aprendi que na vida tudo se consegue só basta querer!

À minha sogra Rosângela Maria S. Silva pelo apoio incondicional, amizade, conselho e incentivo.

À minha tia Norma de Fátima C. Neiva pelas inúmeras conversas e carinho.

Aos meus queridos amigos de laboratório Evandro, João Gabriel e Leonardo. Obrigada por estarem durante este tempo ao meu lado proporcionando momentos de alegria, paz, carinho, incentivo e coragem. Vou levar comigo cada momento que passamos, lembrando sempre das risadas do João Gabriel, das brincadeiras do Evandro e do meu grande amigo Leonardo que sempre acreditou no meu potencial.

À Michelle Nauara pela companhia durante os finais de semanas no laboratório no período pré-defesa, as experiências compartilhadas, a disposição em ajudar e palavras amiga.

À todos os colegas de laboratório: Renan, Luciana, Michele Machado, Antônia pelos momentos de convivência, colaboração, descontração e amizade.

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

À profa. Dra. Vanessa G. P. Severino pelos ensinamentos durante meu início como professora, pela disposição em ajudar e palavras de incentivo.

À profa. Dra. Richele P. Severino pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa e contribuição na minha formação.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira), ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia (Prof. Dr. Luciano Morais Lião) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (Prof. Dr. Marcello Iacomini) pelas análises de RMN.

À todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, por ter proporcionado o meu crescimento.

À Coordenadora do programa de Pós-Graduação em Química, Profa. Dr. Luciana Melo Coelho.

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

A SABEDORIA NA VIDA

Toda sabedoria vem do Senhor Deus,
ela sempre esteve com ele.

Ela existe antes de todos os séculos.

Quem pode contar os grãos de areia do mar,
as gotas de chuva, os dias do tempo?

Quem pode medir a altura do céu,
a extensão da terra, a profundidade do abismo?

Quem pode penetrar a sabedoria divina, *anterior a tudo?*

A sabedoria foi criada, antes de todas as coisas,
a inteligência prudente existe antes dos séculos!

*O verbo de Deus nos céus é fonte de sabedoria,
seus caminhos são os mandamentos eternos.*

A quem foi revelada a raiz da sabedoria?

Quem pode discernir os seus artificios?

A quem foi mostrada e revelada a ciência da sabedoria?

Quem pode compreender a multiplicidade de seus caminhos?

Somente o Altíssimo, criador onipotente,
rei poderoso e infinitamente temível,

Deus dominador, sentado no seu trono;
foi ele quem o criou no Espírito Santo,

quem a viu, numerada e medida;

ele a espargiu em todas as suas obras,
sobre toda a carne, à medida que repartiu-a,
e deu-a àqueles que a amavam.

RESUMO

Os cogumelos têm sido usados como alimentos e remédios por milhares de anos. Entre eles, o “Maitake” (*Grifola frondosa*) pode ser um dos cogumelos medicinais mais versáteis e promissores para o uso como um suplemento dietético. Além do valor nutricional elevado, eles são uma boa fonte de compostos, como os carboidratos, que podem agir como modificadores de resposta biológica. Neste trabalho, foram isolados do micélio (cultivado em meio sólido) de *G. frondosa* as β -D-glucanas (frações PSF₂K-GfM e MRSF₂K-GfM) e heteropolissacarídeos (frações MePF₃CW-GfM e PF₂K-GfM) não comumente encontrados na literatura, por sucessivas extrações aquosas e alcalinas, seguido por fracionamento através do processo de congelamento/degelo, precipitação das frações solúveis em água com solução de Fehling e diálise em membranas com limite de exclusão de 1000 kDa. A estrutura química foi determinada através das análises de composição mossacarídica, oxidação com periodato de sódio, metilação, HPSEC-MALLS e RMN. As β -D-glucanas (GLC) isoladas foram similares àquelas previamente descritas para este fungo, as quais contém uma cadeia principal formada por unidades de 3-O- β -D-Glcp, podendo ser substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -Glcp (1 ramificação a cada três unidades da cadeia principal), distinguindo-as quanto à solubilidade em água e tamanho (massa molar). Além destas, foram obtidos novos heteropolímeros. Um deles foi uma fucomanogalactana (FMG-GfM), com uma massa molar de $175 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, a qual possui um *core* constituído por unidades de 6-O- α -D-Galp e 6-O-(3-O-Me- α -D-Galp), sendo ambas parcialmente substituídas em O-2 por 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp. O outro heteropolissacarídeo isolado consiste em uma fucoxilomanana (FXM-GfM) ($M_w 202 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$) formada por unidades de α -D-Manp unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3) as quais se encontram ramificadas em O-4 principalmente pelo dissacarídeo 4-O- α -L-Fucp- β -D-Xylp. Considerando os efeitos terapêuticos apresentados por moléculas similares descritas para macrofungos, estes podem ser bons candidatos para avaliação do efeito biológico.

Palavras-chave: Cogumelos medicinais; *Grifola frondosa*; Maitake; heteropolissacarídeos; β -glucanas; estrutura química.

ABSTRACT

The mushrooms have been used as food and medicine for thousands of years. Among them, *Grifola frondosa* (“Maitake”) may be on the most versatile and promising medicinal mushrooms for use as a dietary supplement. Besides the high nutritional value, they are a good source of compounds such as carbohydrates that can act as biological response modifiers. In this work, β -D-glucans (PSF₂-GfM and MRSF₂K-GfM fractions) and heteropolysaccharides unusual in the literature (MEPF₃CW-GfM and PF₂K-GfM fractions) were isolated from the mycelium, grown in solid culture, of the *G. frondosa*, by successive aqueous and alkaline extractions, followed by fractionation through freeze-thawing, precipitation of soluble material with a Fehling solution, and dialysis using a membrane with an exclusion limit of 1000 kDa. The chemical structures were established based on monosaccharide composition, periodate oxidation, methylation analysis, HPSEC-MALLS and NMR studies. The branched β -D-glucans (GLC-GfM) found were similar to those previously described for the fungus, which contains a (1 \rightarrow 3)- linked β -Glc_p main-chain, substituted at O-6 by single-unit β -Glc_p side-chains, on the average of one to every third residues of the backbone, but with different molar masses and water solubility. In addition, novel heteropolymers were obtained. One was a fucomannogalactan (FMG-GfM), with a molar mass of $175 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, was shown to have a main chain of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-Gal_p and 3-O-Me- α -D-Gal_p, both of which are partially substituted at O-2, principally, by 3-O- α -D-Man_p- α -L-Fuc_p groups. The other was a fucoxylomannan (FXM-GfM) (M_w $202 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), which consisted of backbone of (1 \rightarrow 3)-linked α -D-Man_p units, totally substituted at O-4 mainly by 4-O- α -L-Fuc_p- β -D-Xyl_p disaccharide. Thus, the polymers obtained from *Grifola frondosa* may could be good candidates for evaluation of its biological effect, considering the results obtained for others similar mushrooms polysaccharides.

Keywords: Medicinal mushroom; *Grifola frondosa*; Maitake; heteropolysaccharides; β -glucans; chemical structure.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura do basidioma	02
FIGURA 1.2 - Representação esquemática da β -glucana comumente isolada de cogumelos (1 substituição à cada 3 unidades da cadeia principal, ou seja, 1:3)	04
FIGURA 1.3 - β -glucana isolada de <i>Ganoderma resinaceum</i>	05
FIGURA 1.4 - Representação esquemática da β -glucana isolada do <i>P. citrinopileatus</i> (I) e do cogumelo híbrido de <i>P. florida</i> e <i>Lentinula edodes</i> (pfle1v) (II).....	06
FIGURA 1.5 - Representação esquemática dos principais fragmentos presentes nas moléculas isoladas de cogumelos	09
FIGURA 1.6 - Representação esquemática da glucogalactana isolada dos basidiomas de <i>P. ostreatus</i>	12
FIGURA 1.7 - Representação esquemática da fucoglucogalactana isolada de <i>Hericium erinaceus</i>	12
FIGURA 1.8 - Representação esquemática da estrutura das xilomananas isoladas de <i>Armillaria mellea</i> (A), <i>Polyporus tumulosus</i> (B) e <i>Flammulina velutipes</i> (C).....	19
FIGURA 1.9 - Representação esquemática das estruturas das fucoxilomananas isoladas de <i>Polyporus pinicola</i> (A), <i>Fomes annosus</i> (B) e <i>Ganoderma lucidum</i> (C).....	20
FIGURA 1.10 - Foto do basidiomiceto <i>Grifola frondosa</i>	23
FIGURA 1.11 - Suplementos dietéticos, provenientes de <i>Grifola frondosa</i> (“Maitake”), comercializados pela empresa “Mushroom Wisdom”	24
FIGURA 1.12 - Estrutura representativa do heteropolissacarídeo ácido (GFPS1b) isolado do micélio em cultivo líquido de <i>G. frondosa</i>	26

FIGURA 3.1 - Esquema geral dos métodos de obtenção, purificação e caracterização dos polissacarídeos do micélio de <i>G. frondosa</i>	33
FIGURA 3.2 - Esquema das extrações aquosas (10 e 96 °C) e alcalinas (KOH a 96 °C) dos polissacarídeos dos micélios de <i>G. frondosa</i>	35
FIGURA 3.3 - Esquema do processo de obtenção dos acetatos de alditóis, a partir de polissacarídeos, para a análise em CG-EM (composição monossacarídica).....	38
FIGURA 3.4 - Esquema do processo de obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados para a análise em CG-EM para identificação dos tipos de ligações glicosídicas	40
FIGURA 3.5 - Esquema do processo de oxidação e degradação dos polissacarídeos ..	41
FIGURA 4.1 - Estrutura dos monossacarídeos presentes nos extratos polissacarídeos obtidos do micélio de <i>G. frondosa</i> (<i>GfM</i>)	45
FIGURA 4.2 - Cromatogramas dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM, para as frações: CW- <i>GfM</i> (A); HW- <i>GfM</i> (B) e K- <i>GfM</i> (C).....	47
FIGURA 4.3 - Espectros e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM, para as frações: CW- <i>GfM</i> (A); HW- <i>GfM</i> (B) e K- <i>GfM</i> (C).....	48
FIGURA 4.4 - Esquema da purificação dos polissacarídeos obtidos dos micélios de <i>G. frondosa</i> , por extração aquosa a frio (CW)	51
FIGURA 4.5 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (<i>HPSEC-MALLS</i>), da fração SCW- <i>GfM</i>	52
FIGURA 4.6 - Espectros de RMN de ¹³ C dos sobrenadantes de Fehling [SFCW- <i>GfM</i> (A) e SF ₂ CW- <i>GfM</i> (B)] de <i>G. frondosa</i> , analisados em D ₂ O a 70 °C	53

FIGURA 4.7 - Espectros de RMN de ^{13}C dos precipitados de Fehling [PFCW-GfM (A), PF₂CW-GfM (B), PF-SFCW-GfM (C), PF₃CW-GfM (D)] de *G. frondosa*, analisados em D₂O a 70°C 54

FIGURA 4.8 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS), das frações SFCW-GfM, PFCW-GfM, SF₂CW-GfM, PF₂CW-GfM, SF-PFCW-GfM, PF-SFCW-GfM, SF-PF₂CW-GfM, PF₃CW-GfM 56

FIGURA 4.9 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS), das frações MRPF₃CW-GfM e MEPF₃CW-GfM 57

FIGURA 4.10 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações MEPF₃CW-GfM (A) e MRPF₃CW-GfM (B) de *G. frondosa*, analisadas em D₂O a 70 °C 58

FIGURA 4.11 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração MEPF₃CW-GfM (FMG-GfM) após derivatização química (metilação) 59

FIGURA 4.12 - Espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (I: 2,4-Me₂Fuc; II: 2,3,4,6-Me₄Man; III: 2,3,4-Me₃Gal; IV: 3,4-Me₂Gal) obtidos após derivatização química (metilação) da fração MEPF₃CW-GfM (FMG-GfM) 60

FIGURA 4.13 - Representação dos constituintes monossacarídeos da fração MEPF₃CW-GfM (FMG-GfM)^a 62

FIGURA 4.14 - Esquema da purificação dos polissacarídeos obtidos dos micélios de *G. frondosa*, por extração alcalina (K) 64

FIGURA 4.15 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS), das frações SK-GfM, PFK-GfM, SFK-GfM, PF-SFK-GfM, SF₂K-GfM, PF₂K-GfM, SF-PFK-GfM 66

- FIGURA 4.16** - Cromatograma obtido por CG-EM da fração (A) PF₂K-*GfM* (FXM-*GfM*) após derivatização química (metilação)..... 67
- FIGURA 4.17** - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃Xyl; A₂: 2,3,4-Me₃Fuc; A₃: 2,4-Me₂Xyl; A₄: 2,3-Me₂Xyl; A₅: 2,3,4,6-Me₄Man; A₆: 4-MeXyl; A₇: 2,6-Me₂Man) obtidos após derivatização química (metilação) da fração PF₂K-*GfM* (FXM-*GfM*) 67
- FIGURA 4.18** - Espectro de RMN de ¹³C da fração PF₂K-*GfM* (FXM) de *G. frondosa*, analisada em D₂O a 70 °C 71
- FIGURA 4.19** - Espectros de RMN de ¹³C da fração 1DS-FXM-*GfM* de *G. frondosa*, analisadas em Me₂SO-*d*₆ a 70 °C 73
- FIGURA 4.20** - Principais fragmentos da fucoxilomanana isolada do micélio de *G. frondosa*..... 74
- FIGURA 4.21** - Espectros de RMN de ¹³C das frações SSF₂K-*GfM* (A) e PSF₂K-*GfM* (B) de *G. frondosa*, analisadas em D₂O (A) ou Me₂SO-*d*₆ (B), respectivamente, ambas a 70 °C..... 75
- FIGURA 4.22** - Espectros de RMN de ¹³C das frações MESF₂K-*GfM* (A) e MRSF₂K-*GfM* (B) de *G. frondosa*, analisadas em D₂O (A) ou Me₂SO-*d*₆ (B), respectivamente, ambas a 70 °C..... 77
- FIGURA 4.23** - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (*HPSEC-MALLS*), das frações SF₂K-*GfM*, PSF₂K-*GfM*, SSF₂K-*GfM*, MRSF₂K-*GfM*, MESF₂K-*GfM* 78
- FIGURA 4.24** - Cromatograma obtido por CG-EM (A) da fração MRSF₂K-*GfM* (GLC-*GfM*) após derivatização química (metilação)..... 79

FIGURA 4.25 - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4,6-Me₄Glc; A₂: 2,4,6-Me₃Glc; A₃: 2,4-Me₂Glc) obtidos após derivatização química (metilação) da fração MRSF₂K-*GfM* (GLC-*GfM*) 80

FIGURA 4.26 - Principais fragmentos da β-glucana (1→3) e (1→6) (frações PSF₂K e MRSF₂K) GLC isolada do micélio de *G. frondosa*..... 82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - β -Glucanas (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) isoladas do basidioma de basidiomicetos....	07
TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos	13
TABELA 1.3 - Heteromananas isoladas de basidiomicetos	22
TABELA 1.4 - Polissacarídeos isolados de <i>Grifola frondosa</i> (“Maitake”)	27
TABELA 3.1 - Condições de análises utilizadas no CG-EM.....	43
TABELA 4.1 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas brutas obtidas do micélio de <i>G. frondosa</i>	46
TABELA 4.2 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações polissacarídicas obtidas do micélio de <i>G. frondosa</i>	57
TABELA 4.3 - Análise por metilação da fucomanogalactana (FMG-GfM) isolada dos micélios de <i>G. frondosa</i>	62
TABELA 4.4 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações obtidas do micélio de <i>G. frondosa</i>	65
TABELA 4.5 - Análise por metilação da fucoxilomanana (FXM-GfM) isolada dos micélios de <i>G. frondosa</i> , e dos produtos resistentes à oxidação com periodato de sódio (Ox-FXM-GfM).....	71
TABELA 4.6 - Análise da composição monossacarídica das frações Ox-FXM, 1DS-FXM e 2DS-FXM-GfM.....	73
TABELA 4.7 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações obtidas do micélio de <i>G. frondosa</i>	78

TABELA 4.8 - Análise por metilação da glucana MRSF ₂ K- <i>GfM</i> (GLC2- <i>GfM</i>), isolada do micélio de <i>G. frondosa</i> , e da fração DS-GLC2- <i>GfM</i> , obtida após degradação controlada de Smith.....	81
--	----

LISTAS DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SIGLAS

<i>p</i>	- Piranose
<i>f</i>	- Furanose
D-Glc	- D-Glucose
D-Gal	- D-Galactose
L-Fuc	- L-Fucose
D-Man	- D-Manose
D-Xyl	- D-Xilose
Ara	- Arabinose
3- <i>O</i> -Me-D-Galp	- 3- <i>O</i> -metil-D-Galactose
α	- Alfa
β	- Beta
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
kDa	- Quilodalton
g	- Gramas
<i>Gf</i>	- <i>Grifola frondosa</i>
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz
IR	- Índice de refração
LS	- Espalhamento de luz
L	- Litro
M	- Molar
mol	- Molaridade
m	- Metros
μm	- Micrometro
μL	- Microlitro
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
min	- Minuto
$^{\circ}\text{C}$	- Celsius

m/v	- Razão massa/volume
<i>m/z</i>	- Razão massa/carga
M_w	- Massa molar média
MWCO	- Peso molecular de corte
mm	- Milímetro
ppm	- Partes por milhão
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RMN	- Ressonância magnética nuclear
rpm	- Rotações por minuto
<i>TFA</i>	- Ácido trifluoacético
TMS	- Tetrametilsilano
T_R	- Tempo de retenção
v/v	- Razão volume/volume
%	- Porcentagem
~	- Aproximadamente
MHz	- Megahertz
δ	- Deslocamento químico em partes por milhão
AcOH	- Ácido Acético
Me ₂ SO	- Dimetilsulfóxido
Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 BASIDIOMICETOS	1
1.2 IMPORTÂNCIA DOS BASIDIOMICETOS.....	2
1.3 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS	3
1.3.1 Homopolissacarídeos Isolados de Cogumelos	4
1.3.2 Heteropolissacarídeos Isolados de Cogumelos.....	9
1.3.2.1 Heterogalactanas.....	9
1.3.2.2 Heteromananas	19
1.4 <i>Grifola frondosa</i>	23
1.4.1- Polissacarídeos de <i>Grifola frondosa</i>	24
1.4.2 Atividade Biológica de <i>Grifola frondosa</i>	31
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	33
3.2.1 Extração Aquosa à Frio	33
3.2.2 Extração Aquosa à Quente	34
3.2.3 Extração Alcalina	34
3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	35
3.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo.....	36
3.3.2 Purificação por Precipitação com Solução de Fehling	36
3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos por Diálises em Membranas.....	37
3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	37
3.4.1 Hidrólise Ácida Total, Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise	37
3.4.2 Metilação dos Polissacarídeos	39
3.4.3 Oxidação dos Polissacarídeos com Periodato de Sódio	40
3.4.3.1 Degradação controlada de Smith.....	41
3.4.3.2 Degradação Total de Smith	42
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	42
3.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)	42

3.5.2 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar (M_w) por Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS)	43
3.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO CW-GfM.....	51
4.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO K-GfM	64
4.2.1 Caracterização Estrutural do Polissacarídeo da Fração PF ₂ K-GfM	66
4.2.2 Caracterização estrutural dos polissacarídeos da fração SF ₂ K-GfM	75
5. CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE	91

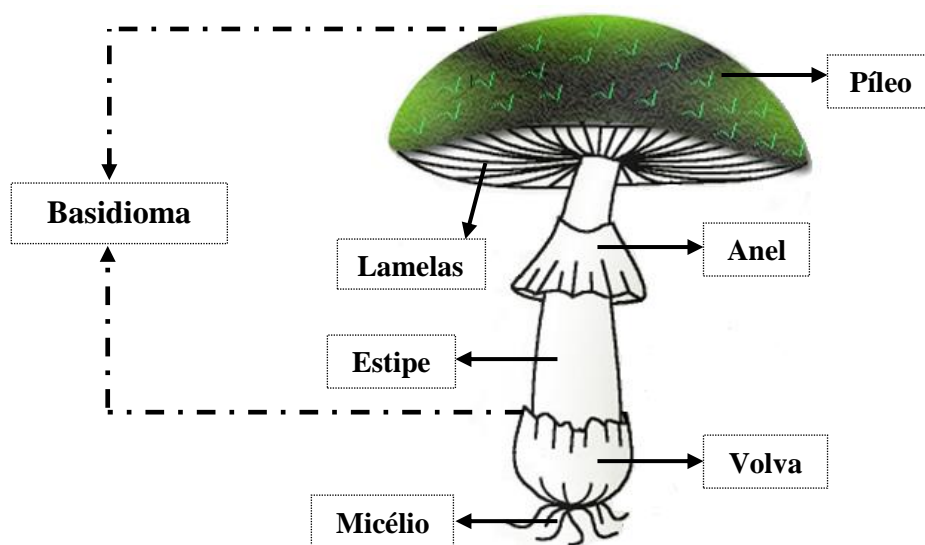
1. INTRODUÇÃO

1.1 – BASIDIOMICETOS

O reino dos fungos compreende cinco principais filos, denominados, Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Eles diferem-se entre si principalmente, em relação à ontogênese, filogenia, tipo de reprodução (sexuada e assexuada), modo de produção de esporos, constituição da parede celular, entre outras.

Os fungos pertencentes ao reino Fungi apresentam células eucariontes, reprodução por esporos e são heterotróficos, ou seja, não produzem seu próprio alimento. O corpo do fungo (“talo”) é constituído por uma única célula ou por uma estrutura filiforme, denominada de hifa. O entrelaçamento de inúmeras hifas constitui o micélio, que geralmente, dá origem às células produtoras de esporos chamadas de basídio, asco e conidióforos. Na maioria dos fungos, as células produtoras de esporos fazem parte da estrutura composta por hifas, chamada de corpo de frutificação (= esporocarpo, basidioma, basidiocarpo). Embora haja uma grande variação da forma, tamanho e coloração destes corpos de frutificação, estes se mantêm praticamente constantes em cada grupo de fungos (MORADALI et al., 2007).

Os fungos que apresentam um corpo de frutificação observável a olho nu são chamados popularmente de cogumelos. Estes fungos macroscópicos também são conhecidos como “macromicetos”, incluindo os representantes do filo Basidiomycota e alguns do Ascomycota (MORADALI et al., 2007). No caso dos fungos pertencentes ao filo Basidiomycota (= basidiomicetos), a maioria apresenta uma estrutura diferenciada para produção de esporos que é constituída por hifas modificadas que formam pseudotecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (Figura 1.1, p. 2).

FIGURA 1.1 - Estrutura do basidioma

Fonte: Modificado: <http://www.infoescola.com/reino-fungi/cogumelo>

Estima-se que o número de fungos na terra é de aproximadamente 500.000 a 10 milhões de espécies, porém apenas 100.000 já foram descritas. Os basidiomicetos constituem 150.000, sendo que apenas 15.000 foram identificadas (WASSER, 2011). Destas cerca de 2.000 são comestíveis e 700 espécies são conhecidas por possuir propriedades farmacológicas significativas (RESHETNIKOV, WASSER, TAN, 2001; WASSER, 2002).

1.2 - IMPORTÂNCIA DOS BASIDIOMICETOS

Nas últimas décadas, os cogumelos têm sido consumidos em grande quantidade pelo seu sabor e valor nutricional e principalmente por apresentarem propriedades medicinais (MANZI et al., 1999; CHIANG, YEN, MAU, 2006; KALÁČ, 2009; WASSER, 2011), as quais são atribuídas principalmente a presença de carboidratos (MORADALI et al., 2007; WASSER, 2010).

Neste contexto, os basidiomicetos compõem uma fonte ainda inexplorada de novos produtos farmacológicos (CHANG, 1999; RESHETNIKOV, WASSER, TAN, 2001; WASSER, WEIS, 1999; WASSER, 2011; ZHANG et al., 2007), pois apenas 5% das espécies descritas são conhecidas por possuir propriedades terapêuticas, provavelmente, devido à carência de estudos que comprovam o potencial destes organismos. Além da falta de estudos, os teores altos e a diversidade estrutural ampla

dos carboidratos presentes nestes fungos, torna-os candidatos promissores na busca de substâncias bioativas.

Dentre as inúmeras ações reportadas, cabe ressaltar a atividade hipoglicemiante, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, imunomodulatória, antiviral e principalmente antitumoral (DIDUKH, WASSER, NEVO, 2003; GAO et al., 2003; GAO et al., 2004; SULLIVAN, SMITH, ROWAN, 2006; ZHANG et al., 2007 DAÍ et al., 2009, ROUPAS et al., 2012).

Trabalhos preliminares evidenciam que há uma correlação entre a estrutura (solubilidade, massa molecular, ramificações e conformação) e os efeitos farmacológicos destes carboidratos, sendo assim, o conhecimento da estrutura química fina desses polissacarídeos torna-se imprescindível quando se deseja aplicá-los para fins terapêuticos (WASSER, 2011).

1.3 - POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Os polissacarídeos pertencem a uma classe estruturalmente diversa de macromoléculas, em que os resíduos de monossacarídeos são unidos uns aos outros por ligações glicosídicas (WASSER, 2002). Em comparação com proteínas e ácidos nucleicos, estes polímeros oferecem maior capacidade para o transporte de informação biológica, pois apresentam ampla variabilidade estrutural (OHNO, 2005).

Estas macromoléculas podem ser lineares ou ramificadas e de acordo com sua composição são divididas em duas classes, ou seja, os homopolissacarídeos, constituídos por apenas um tipo de monossacarídeo, e os heteropolissacarídeos que são formados por 2 ou mais monômeros distintos (REN, PERERA, HEMAR, 2012).

Na busca por estas moléculas, vários cogumelos têm sido estudados e a partir destes foram isolados polímeros distintos, tais como as glucanas (WASSER, 2002; ZHANG et al., 2007), galactanas (CARBONERO et al., 2008a), heterogalactanas, heteromananas, entre outros (WASSER, 2002; ZHANG et al., 2007). Com exceção das galactanas, todos os demais polissacarídeos descritos para estes fungos apresentaram-se como estruturas lineares e/ou ramificadas (WASSER, 2002; ZHANG et al., 2007). Comumente, estas macromoléculas são obtidas do basidioma e do micélio ou exopolissacarídeos provenientes das culturas em laboratório (= cultivo submerso, ou cultivo líquido).

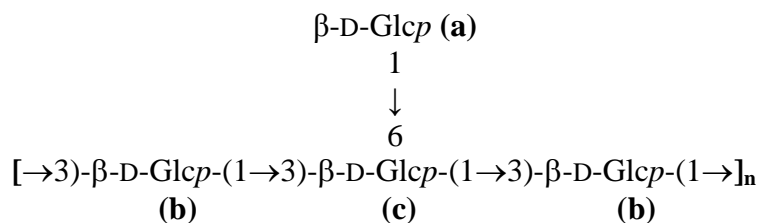
1.3.1 - Homopolissacarídeos Isolados de Cogumelos

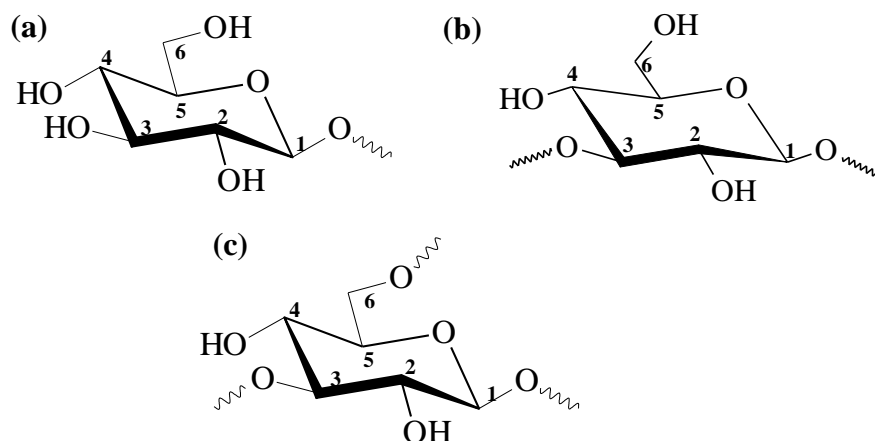
Diversos carboidratos têm sido isolados de cogumelos, no entanto, os homopolissacarídeos formados apenas por glucose, ou seja, as glucanas são os mais estudados devido à sua atuação como modificadores de resposta biológica. Várias glucanas foram descritas para estes organismos, podendo apresentar cadeias lineares ou ramificadas com diferentes massas moleculares, configuração glicosídica α - e/ou β - e ligações glicosídicas principalmente do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) (Tabela 1.1, p. 7).

Dentre as glucanas isoladas de basidiomicetos, aquelas formadas por unidades de glucose com configuração glicosídica do tipo β , conhecidas como β -glucanas, são as comumente encontradas. Dentro desta classe de moléculas, as β -glucanas contendo uma cadeia principal de β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-6 por terminais não-redutores de β -D-Glcp são as mais relatadas, diferenciando-as apenas na proporção de ramificação e na massa molar (Tabela 1.1, p. 7).

Este tipo de glucana tem sido isolada dos basidiomas de *Boletus erythropus* (CHAUVEAU et al., 1996), *Pleurotus ostreatoroseus* e *P. eryngii* (CARBONERO et al., 2006), entre outras, apresentando uma ramificação a cada três resíduos da cadeia principal (Figura 1.2). Além deste grau de substituição, foram isoladas moléculas com proporções diferentes a partir de *Flammulina velutipes* e *Pleurotus florida* (1:4 unidades da cadeia principal) (SMIDERLE et al., 2006; SANTOS-NEVES et al., 2008, respectivamente), *Pleurotus sajor-caju* (2:3 unidades da cadeia principal) (CARBONERO et al., 2012), *Amanita muscaria* (1:2,4 unidades da cadeia principal) (RUTHES et al., 2013a), entre outras (Tabela 1.1, p. 7).

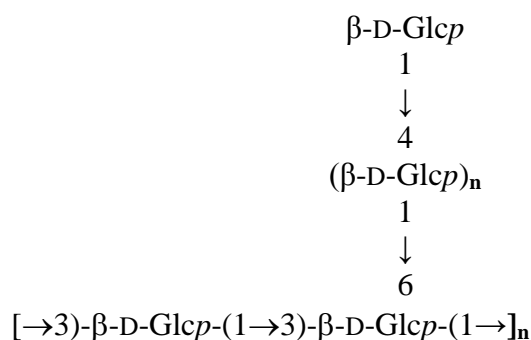
FIGURA 1.2 - Representação esquemática da β -glucana comumente isolada de cogumelos (1 substituição a cada 3 unidades da cadeia principal, ou seja, 1:3)



Legenda:(a) β -D-Glcp-(1 \rightarrow (b) \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (c) \rightarrow 3,6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 

As β -glucanas contendo a mesma cadeia principal, porém, com ramificações distintas das citadas anteriormente também foram isoladas e caracterizadas, sendo estas muito variáveis, tanto no tamanho quanto nos tipos de ligações glicosídicas (ZHANG, 2007). Como a descrita para *Ganoderma resinaceum*, esta pode ser substituídas em O-6, principalmente, por cadeias laterais de β -D-Glcp 4-*O*-substituídas, em uma média de 1:2 unidades da cadeia principal (AMARAL et al., 2008) (Figura 1.3).

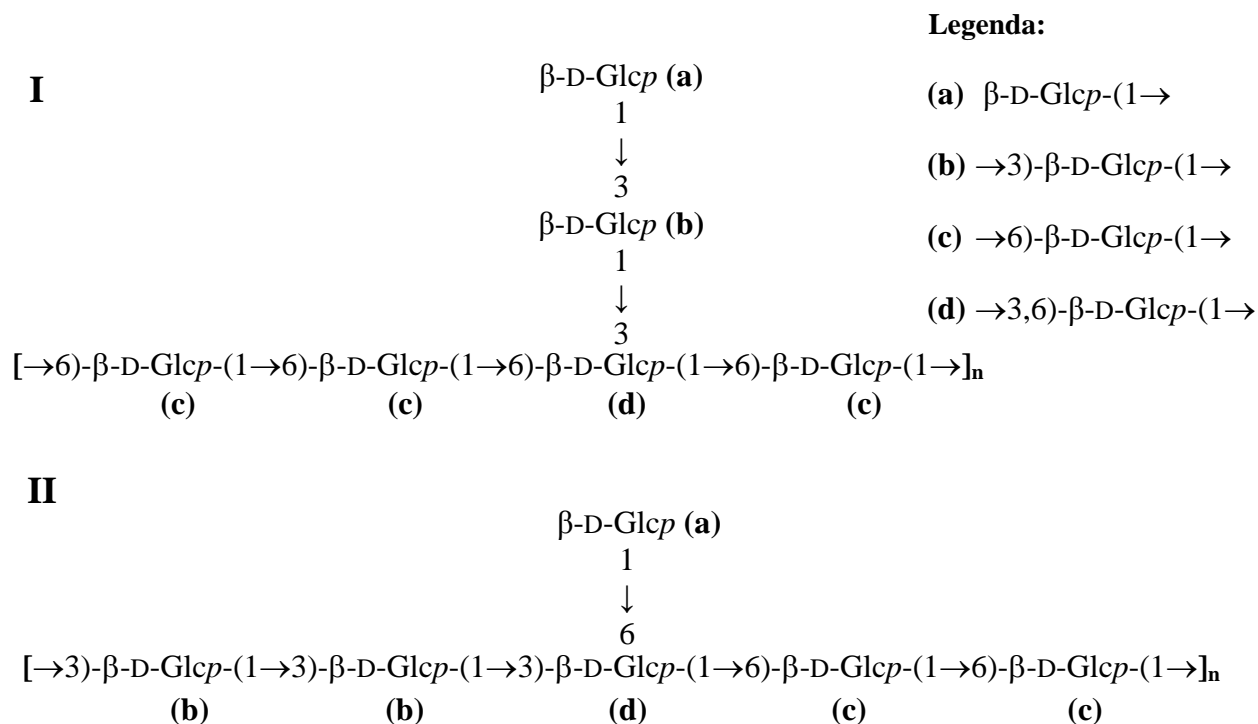
FIGURA 1.3 - β -glucana isolada de *Ganoderma resinaceum*



Apesar das β -glucanas com cadeia principal constituída por β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)- ligadas e parcialmente substituídas em O-6 serem as mais descritas, em algumas espécies foram isoladas outras possuindo apenas ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6) ou com ambas, ou seja, contendo (1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 6)- em seu *core* (Figura 1.4, p. 6), sendo algumas destas isoladas de *Pleurotus citrinopileatus*, a qual apresenta em O-3 o dissacarídeo 3-*O*- β -D-Glcp- β -D-Glcp como grupo lateral (Figura 1.4-I, p. 6) (LIU et al., 2012) e da linhagem híbrida de *Pleurotus florida* e *Lentinula edodes* (Figura 1.4-II, p.

6), ambas contendo unidades de β -D-Glcp como substituintes em O-6 (MAJI et al., 2013).

FIGURA 1.4 - Representação esquemática da β -glucana isolada do *P. citrinopileatus* (I) e do cogumelo híbrido de *P. florida* e *Lentinula edodes* (pfle1v) (II)



Além das glucanas, foram isolados homopolímeros contendo apenas galactose, os quais são conhecidos como galactanas, sendo estes isolados apenas de cogumelos pertencentes ao gênero *Pleurotus*. A partir dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* e *P. eryngii* foram obtidas lineares α -D-galactanas (1 \rightarrow 6)- ligadas, as quais são parcialmente metiladas, em uma relação molar de 3:1, respectivamente (CARBONERO et al., 2008a).

TABELA 1.1 - β -Glucanas (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) isoladas do basidioma de basidiomicetos

BASIDIOMICETO/ NOME DA FRAÇÃO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<i>Boletus erythropus</i> (Fração: N1)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:3*	$M_w = 1000$ kDa Dados de metilação: β -Glcp: 3- <i>O</i> -Glcp: 3,6-di- <i>O</i> -Glcp em uma proporção molar de 0,8:1,9:1,0, respectivamente	Não avaliada	CHAUVEAU et al., 1996.
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (Fração: IEPW-PO)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:3*	Dados de metilação: β -Glcp (26%), 3- <i>O</i> -Glcp (49%) e 3,6-di- <i>O</i> -Glcp (25%), ou seja, proporção molar de \sim 1:2:1, respectivamente	Não avaliada	CARBONERO et al., 2006.
<i>Pleurotus eryngii</i> (Fração: IEPW-PE)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:3*	Dados de metilação: β -Glcp (26%), 3- <i>O</i> -Glcp (49%) e 3,6-di- <i>O</i> -Glcp (25%), ou seja, proporção molar de \sim 1:2:1, respectivamente	Não avaliada	
<i>Flammulina velutipes</i> (Fração: PK2)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:4*	Dados de metilação: β -Glcp (20%), 3- <i>O</i> -Glcp (58%) e 3,6-di- <i>O</i> -Glcp (19%), ou seja, proporção molar de \sim 1:3:1, respectivamente	Não avaliada	SMIDERLE et al., 2006.
<i>Pleurotus florida</i> (Fração: ISK2)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:4*	$M_w = 1,2 \times 10^6$ g/mol Dados de metilação: β -Glcp (20,4%), 3- <i>O</i> -Glcp (59,5%) e 3,6-di- <i>O</i> -Glcp (20,1%), ou seja, proporção molar de \sim 1:3:1, respectivamente	Não avaliada	SANTOS et al., 2008.
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fração: SGHW)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 2:3*	$M_w = 9,75 \times 10^{-5}$ g/mol Dados de metilação: β -Glcp (40,1%), 3- <i>O</i> -Glcp (19,4%) e 3,6-di- <i>O</i> -Glcp (40,5%), ou seja, proporção molar de \sim 2:1:2, respectivamente	Imunomodulatória	CARBONERO et al., 2012.

*Frequência de substituição em relação à cadeia principal.

TABELA 1.1 - β -Glucanas (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) isoladas do basidioma de basidiomicetos

(Conclusão)

BASIDIOMICETO/ NOME DA FRAÇÃO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<i>Amanita muscaria</i> (Fração: FSK2)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:2,4*	$M_w = 16,2 \times 10^3$ g/mol Dados de metilação: β -Glcp (29,9%), 3-O-Glcp (40,3%) e 3,6-di-O-Glcp (29,8%), ou seja, proporção molar de ~ 1:1,4:1, respectivamente	Anti-inflamatória e antinociceptiva	RUTHES et al., 2013.
<i>Ganoderma resinaceum</i> (Fração: DESSK5)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 pelo dissacarídeo 4-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp	$M_w = 2,6 \times 10^4$ g/mol Dados de metilação: Glcp (24,7 %), 3-O-Glcp (26,8 %), 4-O-Glcp (28,5 %), 3,6-di-O-Glcp (20,0 %)	Não avaliada	AMARAL et al., 2008.
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Fração: PCP-W1)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)	Substituição em O-3 pelo dissacarídeo 3-O- β -D-Glcp- β -D-Glcp	$M_w = 45$ kDa Dados de metilação: β -Glcp: 3-O-Glcp: 6-O-Glcp: 3,6-di-O-Glcp, em uma proporção molar de 1:1:3:1, respectivamente	Não avaliada	LIU et al., 2012.
Cogumelo híbrido de <i>Pleurotus florida</i> e <i>Lentinus edodes</i> (cepa pfl1v) (Fração: PS-1)	β -Glcp (1 \rightarrow 3) e β -Glcp (1 \rightarrow 6)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp	$M_w = \sim 215$ kDa Dados de metilação: β -Glcp: 3-O-Glcp: 6-O-Glcp: 3,6-di-O-Glcp, em uma proporção molar de 1:2:2:1, respectivamente. $[\alpha]_D^{30} + 12^\circ$	Imunomodulatória	MAJI et al., 2013.

*Frequência de substituição em relação à cadeia principal.

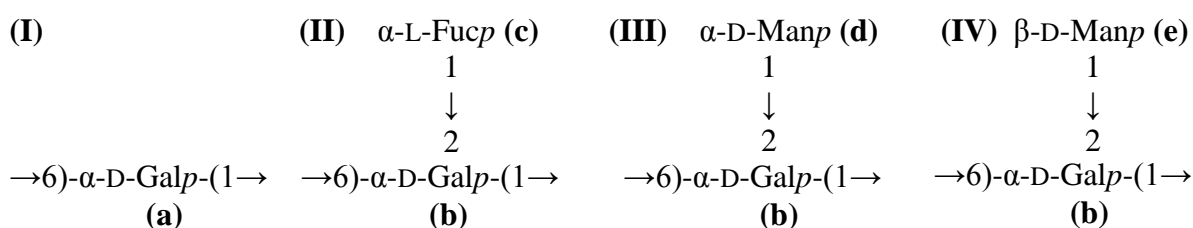
1.3.2 - Heteropolissacarídeos Isolados de Cogumelos

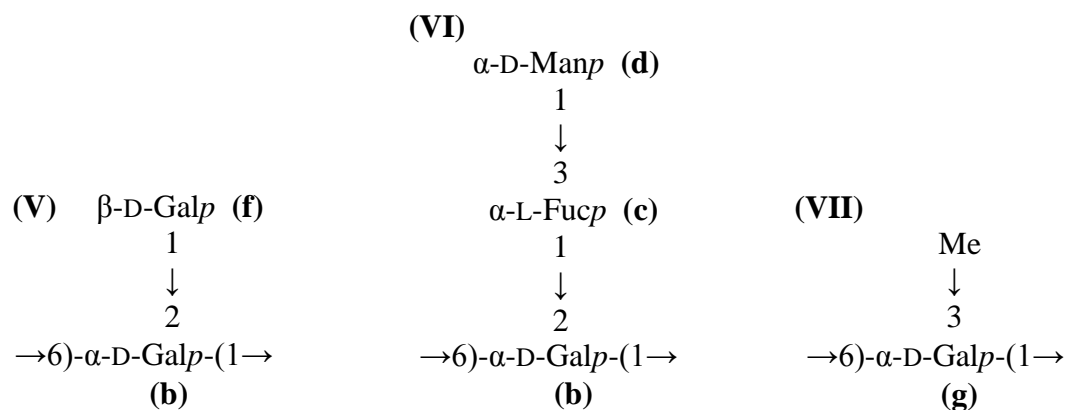
Embora as β -glucanas sejam os polímeros mais estudados, devido principalmente aos efeitos terapêuticos atribuídos a estas moléculas, os heteropolissacarídeos têm recebido atenção, pois muitos destes podem atuar como modificadores de resposta biológica (MORADALI et al., 2007). Dentre estes, pode-se destacar aqueles contendo altos teores de galactose ou manose, as quais são denominadas de heterogalactanas e as heteromananas, respectivamente.

1.3.2.1 - Heterogalactanas

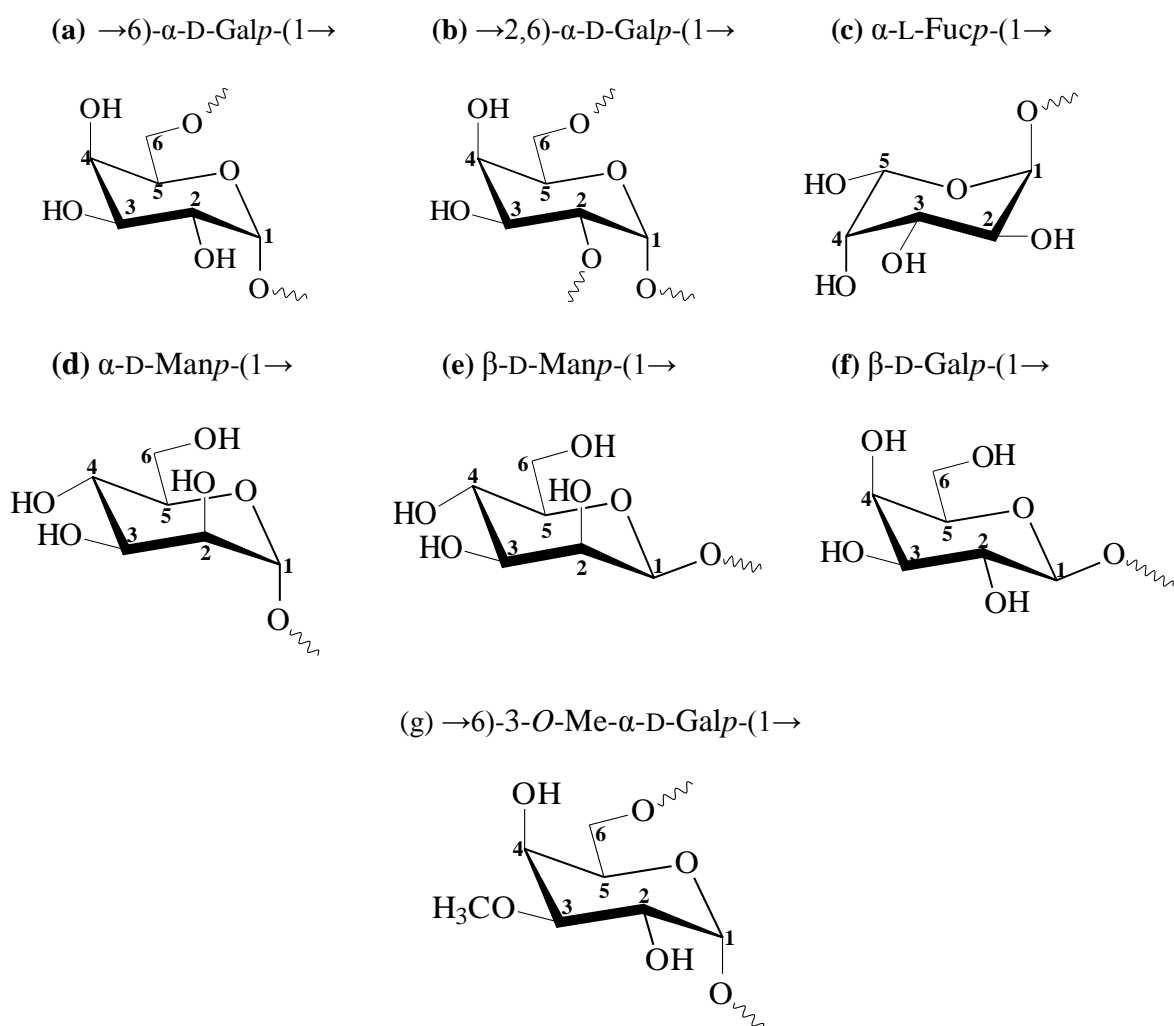
Com relação às heterogalactanas provenientes destes fungos, as mais conhecidas apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de α -Galp ligadas (1 \rightarrow 6) (Figura 1.5-I), as quais são parcialmente substituídas em O-2 por diferentes grupos laterais, podendo ser terminais não redutores de α -L-Fucp (Figura 1.5-II), α - ou β -D-Manp (Figura 1.5-III e IV, respectivamente), β -D-Galp (Figura 1.5-V) e pelo dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil (Figura 1.5-VI), principalmente. Alguns destes heteropolissacarídeos podem conter na cadeia principal unidades de galactose com substituição em O-3 por grupos metil, ou seja, possuem o monossacarídeo 3-O-metil-galactose (3-O-Me-Galp) (Figura 1.5-VII), sendo denominadas de heterogalactanas parcialmente metiladas (Tabela 1.2, p. 13).

FIGURA 1.5 - Representação esquemática dos principais fragmentos presentes nas heterogalactanas isoladas de cogumelos





Legenda:



As heterogalactanas contendo únicas unidades de α -L-Fucp como cadeias laterais são conhecidas como fucogalactanas nestes organismos. Estas foram isoladas dos basidiomas de *Polyporus ovinus* (AXELSSON, BJÖRNDAL, 1969), *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971), *Agaricus brasiliensis* (KOMURA et al., 2010), *Lactarius rufus* (RUTHES et al., 2012). Nos basidiomas de *Ganoderma applanatum*,

esta heterogalactana é constituída por grupos acetil ligados aos terminais não redutores de α -L-Fucp (USUI, IWASARI, MIZUNO, 1981) (Tabela 1.2, p. 13).

As fucogalactanas parcialmente metiladas têm sido isoladas dos basidiomas de *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (KOMURA et al., 2010) e *Agaricus bisporus* (RUTHES et al., 2012; RUTHES et al., 2013b), distinguindo-as das anteriormente citadas, tanto na presença de grupos 3-O-Me- α -D-Galp na cadeia principal quanto pela adição de unidades de β -D-Galp como grupos laterais (Tabela 1.2, p. 13).

Algumas destas heterogalactanas podem conter apenas unidades de β -D-Manp como cadeias laterais, sendo denominadas de manogalactanas. Estas foram isoladas apenas de *Pleurotus* spp., como *P. ostreatus* (JAKOVLJEVIĆ et al., 1998), *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* var. *florida* (ROSADO et al., 2003), *P. pulmonarius* (SMIDERLE et al., 2008a), *P. sajor-caju* (SILVA, 2011) e *P. geesteranus* (ZHANG et al., 2013), todas contendo uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp e 3-O-Me- α -D-Galp unidas por ligações glicosídicas do tipo (1→6), podendo ser ambas, parcialmente, substituídas em O-2.

As estruturas complexas contendo, principalmente, terminais não redutores de α -L-Fucp, D-Galp, D-Manp e/ou o dissacarídeo 3-O-D-Manp-L-Fuc como grupos laterais, têm sido isoladas de vários basidiomicetos, sendo denominadas de fucomanogalactanas ou manofucogalactanas de acordo com a proporção de resíduos de fucose e manose.

Com exceção da manofucogalactana isolada do basidioma da linhagem “cinza” de *Grifola frondosa*, a qual apresenta uma cadeia principal constituída por α -D-Galp e 3-O-Me- α -D-Galp unidas através de ligações do tipo (1→6) (OLIVEIRA, 2013) (Tabela 1.2, p. 13), todas as demais apresentam apenas D-Galp (1→6)- ligadas em seu core (Tabela 1.2, p. 13).

As manofucogalactanas, ou seja, as heterogalactanas com teores menores de manose em relação aos de fucose, foram caracterizadas de *Armillaria mellea* (BOUVENG, FRASER, LINDBERG, 1967; FRASER, LINDBERG, 1967), *Polyporus fomentarius*, *P. igniarius* (BJÖRNDAL, LINDBERG, 1969), *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO, YAMAGUCHI, 1977; SMIDERLE et al., 2008b), *Ganoderma applanatum* (USUI, IWASARI, MIZUNO, 1981), *Fomitella fraxinea* (CHO et al., 1998, 2011), entre outros (Tabela 1.2, p. 13).

TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Fucogalactana <i>Polyporus ovinus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp	$[\alpha]_{578}^{20} + 85^\circ$ Composição monossacarídica = Fuc: Gal, numa proporção de molar de 1,0:3,6 Dados de metilação: Fucp (20,0%), Galp (1,5%), 6-O-Galp (55,0%), 2,6-di-O-Galp (23,5%)	Não avaliada	AXELSSON, BJÖRNDAL, 1969.
Fucogalactana <i>Fomes annosus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores α -L-Fucp	$[\alpha]_{578} + 78^\circ$ Composição monossacarídica: Fuc: Gal, na proporção molar de 1,0:2,5 Dados de metilação: Fucp (25,0%), Galp (7,0%), 6-O-Galp (42,0%), 2,6-di-O-Galp (26,0%)	Não avaliada	AXELSSON et al., 1971.
Fucogalactana (Fração: EPF-Ab) <i>Agaricus brasiliensis</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por únicas unidades de α -L-Fucp	$M_w = 19,4 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc (13,9%) e Gal (86,1%) Dados de metilação: Fucp (14,2%), 6-O-Galp (71,8%), 2,6-di-O-Galp (14,0%)	Antinociceptiva	KOMURA et al., 2010.
Fucogalactana (Fração: RFP-Lr) <i>Lactarius rufus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores α -L-Fucp	$M_w = 1,4 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc (29,0%) e Gal (71,0%) Dados de metilação: Fucp (26,9%), 6-O-Galp (46,0%), 2,6-di-O-Galp (27,1%)	Antissepse	RUTHES et al., 2012.
Fucogalactana (Fração: F-IIaP) <i>Ganoderma applanatum</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores α -L-Fucp. Contém grupos acetil	$[\alpha]_D + 108^\circ$ Composição monossacarídica: Gal: Fuc, numa proporção molar de 3:1 Dados de metilação: Fucp, 2-O-Galp, 6-O-Galp, 2,3-di-O-Galp, 2,6-di-O-Galp, numa proporção molar de 1,0:0,1:2,2:0,1:0,9, respectivamente	Não avaliada	USUI, IWASARI, MIZUNO, 1981.

TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Fucogalactana (Fração: <i>RFP-Ab</i>) <i>Agaricus bisporus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3- <i>O</i> -Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 unidades únicas de α -L-Fucp e β -D-Galp	$M_w = 43,8 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc (6%), Gal (84%) e 3- <i>O</i> -Me-Gal (10%) Dados de metilação: Fucp (2,8%), Galp (14,5%), 6- <i>O</i> -Galp (64,8%), 2,6-di- <i>O</i> -Galp (17,9 %)	Antissepse	RUTHES et al., 2012.
Fucogalactana (Fração: <i>EFP-Ah</i>) <i>Agaricus bisporus</i> <i>var. hortensis</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3- <i>O</i> -Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp e em menor proporção por β -D-Galp	$M_w = 31,1 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc (16,8%), 3- <i>O</i> -Me-Gal (15,4%) e Gal (67,8%) Dados de metilação: Fucp (14,8%), Galp (2,5%), 6- <i>O</i> -Galp (64,8%), 2,6-di- <i>O</i> -Galp (17,9%)	Anti-inflamatória	KOMURA et al., 2010.
Fucogalactana (Fração: <i>EFP-Ab</i>) <i>Agaricus bisporus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3- <i>O</i> -Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp e em menor proporção por β -D-Galp	$M_w = 37,1 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc (11,2%), Gal (74,2%) e 3- <i>O</i> -Me-Gal (14,6%) Dados de metilação: Fucp (13,1%), Galp (3,9%), 6- <i>O</i> -Galp (65,6%), 2,6-di- <i>O</i> -Galp (17,4 %)	Antissepse Antinociceptiva Anti-inflamatória	RUTHES et al., 2013.
Manogalactana <i>Pleurotus ostreatus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3- <i>O</i> -Me- α -D-Galp- (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 188$ kDa Composição monossacarídica: Gal: Man: 3- <i>O</i> -Me-Gal, numa proporção molar de 3:2:0,9, respectivamente	Não avaliada	JAKOVLJEVIC et al., 1998.
Manogalactana (Fração: EFP) <i>Pleurotus ostreatus var.</i> <i>florida</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3- <i>O</i> -Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 46$ kDa Composição monossacarídica: Man: 3- <i>O</i> -Me-Gal: Gal, numa proporção molar de 39,0:5,8:55,2, respectivamente Dados de metilação: Manp (38,6%), Galp (0,6%), 6- <i>O</i> -Galp (21,2%), 2,6-di- <i>O</i> -Galp (39,6%)	Não avaliada	ROSADO et al., 2003.

TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Manogalactana (Fração: EFP) <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3-O-Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 45$ kDa Composição monossacarídica: Man: 3-O-Me-Gal: Gal, numa proporção molar de 36,3:9,8:53,9, respectivamente Dados de metilação: Manp (37,2%), Galp (0,5%), 6-O-Galp (24,3%), 2,6-di-O-Galp (38,0%)	Não avaliada	ROSADO et al., 2003.
Manogalactana (Fração: MG) <i>Pleurotus pulmonarius</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3-O-Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 2,39 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: Man (32%), 3-O-Me-Gal (13%) e Gal (55%) Dados de metilação: Manp (36%), 6-O-Galp (29%), 2,6-di-O-Galp (35%)	Antinociceptiva	SMIDERLE et al., 2008b.
Manogalactana (Fração: 50RPFCW-Ps) <i>Pleurotus sajor-caju</i> Basidioma	α -Galp (1→6) e 3-O-Me- α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 das unidades de α -Galp por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 2,94 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: Man (23,3%), Gal (66,8%), 3-O-Me-Gal (9,41%), Glc (0,51%) Dados de metilação: Manp (30,1%), Galp (1,7%), 6-O-Galp (36,6%), 2,6-di-O-Galp (31,3%)	Não avaliada	SILVA, 2011.
Manogalactana (Fração: PGPB-1) <i>Pleurotus geesteranus</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3-O-Me- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 das unidades de α -Galp por terminais não redutores de β -D-Manp	$M_w = 13$ kDa Composição monossacarídica: Man:Gal: 3-O-Me-Gal, numa proporção molar de ~1:1:1 Dados de metilação: Manp: 6-O-Galp:2,6-di-O- Gal, numa relação molar de 1:1,14:0,94	Não avaliada	ZHANG et al., 2013.
Manofucogalactana** <i>Armillaria mellea</i> Exopolissacarídeos	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp-L-Fucp e únicas unidades de L-Fucp	$[\alpha]_{5780} + 97^\circ$ Composição monossacarídica: Gal: 3-O-Me-Gal: Fuc: Man, numa proporção molar de 6:2:2:1, respectivamente Dados de metilação: Galp, Manp, Fucp, 6-O-Galp, 6-O-Manp ou 2-O-Manp, 3-O-Manp, 3-O-Fucp, 2,6-di-O-Galp, 2,6-di-O-Manp, Galp (3-O-Me-Gal)	Não avaliada	BOUVENG, FRASER, LINDBERG, 1967.

** Manofucogalactana ou manofucogalactana + 3-O-Me-galactogalactana.

TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Manofucogalactana <i>Armillaria mellea</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp-L-Fucp e únicas unidades de L-Fucp	$[\alpha]_{5780}^{+} 98^{\circ}$ Composição monossacarídica: Gal:Fuc:Man, numa proporção molar de 6,5:2:1. Dados de metilação: Galp (3,7 %), Manp (9,6 %), Fucp (9,2 %), 3-O-Fucp (9,7 %), 6-O-Galp (43,2 %), 2,6-di-O-Galp (19,2 %)	Não avaliada	FRASER, LINDBERG, 1967.
Manofucogalactana <i>Polyporus fomentarius</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp-L-Fucp e únicas unidades de α -L-Fucp e D-Galp	$[\alpha]_{5780}^{+} 114^{\circ}$ Composição monossacarídica: Gal:Fuc:Man, numa proporção molar de 5,8:1,2:1,0. Dados de metilação: Galp (5,1 %), Manp (11,4%), Fucp (4,9%), 3-O-Fucp (11,3%), 6-O-Galp (40,5%), 2,6-di-O-Galp (20,7%)	Não avaliada	BJÖRNDAL, LINDBERG, 1969.
Manofucogalactana <i>Polyporus igniarius</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp-L-Fucp e únicas unidades de α -L-Fucp e D-Galp	$[\alpha]_{578}^{+} 119^{\circ}$ Composição monossacarídica: Fuc:Man:Gal, numa proporção molar de 1,4:1,0:6,0. Dados de metilação: Galp (7,7%), Manp (10,5%), Fucp (5,4%), 3-O-Fucp (10,6%), 6-O-Galp (36,5%), 2,6-di-O-Galp (22,8%)	Não avaliada	
Manofucogalactana <i>Flammulina velutipes</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp e por α -L-Fucp	$M_w = 9,5 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc:Man:Gal, numa proporção molar de 4:3:12 Dados de metilação: Fucp (1,1 %), Manp (2,8 %), 3-O-Fucp (2,8 %), 6-O-Galp (8,0 %), 2,6-di-O-Galp (3,8 %) $[\alpha]_D^{23} + 54^{\circ}$	Não avaliada	
Manofucogalactana (Fração:30E) <i>Flammulina velutipes</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp e α -D-Manp e em menor proporção por α -L-Fucp	Composição monossacarídica: Fuc (20%), Man (16%) e Gal (64%) Dados de metilação: Fucp (7,0%), Manp (14,0%), Galp (3,0%), 3-O-Fucp (12,0%), 6-O-Galp 37,0 %), 2,6-di-O-Galp (27,0%)	Não avaliada	SMIDERLE et al., 2008a.

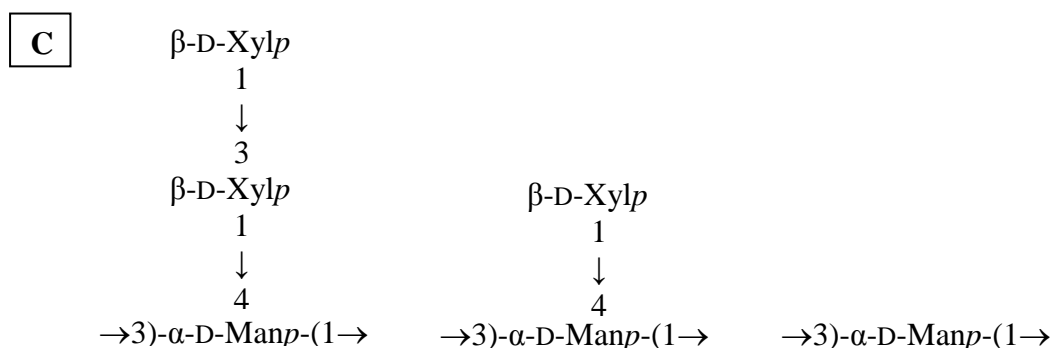
TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Manofucogalactana (Fração: F-IIaG) <i>Ganoderma applanatum</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por α -L-Fucp.e pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp. Contém grupos acetil.	$[\alpha]_D + 87^\circ$ Composição monossacarídica: Fuc:Man:Gal:, numa proporção molar de 1,3:1,0:2,4. Dados de metilação: Fucp (0,1%), Manp (1,0%), 3-O-Fucp (1,1%), 2-O-Galp (0,1%), 6-O-Galp (1,3%), 2,3-di-O-Galp (0,1%), 2,6-di-O-Galp (1,1%)	Não avaliada	USUI, IWASARI, MIZUNO, 1981.
Manofucogalactana (<i>Fomitellana A</i>) <i>Fomitella fraxinea</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp	$M_w = 1,5 \times 10^4$ kDa Composição monossacarídica: galactose, manose e fucose em uma proporção molar de 3:1:1. Dados de metilação: Manp (16,2%), Fucp (18,9%), Galp (1,5%), 6-O-Galp (44,1%), 2,6-di-O-Galp (19,3%) $[\alpha]_D + 90^\circ$	Efeito mitogênico; Imunomodulatória.	CHO et al., 1998; CHO et al., 2011.
Fucomanogalactana (Fração: EFP-Ls) <i>Laetiporus sulphureus</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp e α -D-Manp e em menor proporção por α -L-Fucp.	$M_w = 2,8 \times 10^4$ kDa Composição monossacarídica: Fuc (21%), Man (28%) e Gal (51%) Dados de metilação: Fucp (2,3%), Manp (28,5%), Galp (0,4%), 3-O-Fucp (18,5%), 6-O-Galp (18,0%), 2,6-di-O-Galp (32 %)	Não avaliada	ALQUINI et al., 2004.
Fucomanogalactana (Fração: FMG-Le) <i>Lentinus edodes</i> Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp e β -D-Manp	$M_w = 16,2 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc (11%), Man (21%) e Gal (68%) Dados de metilação: Fucp (11,0%), Manp (21,0%), Galp (1,0%), 6-O-Galp (34,0%), 2,6-di-O-Galp (33,0%)	Anti-inflamatória; Antinociceptiva	CARBONERO et al., 2008.

TABELA 1.2 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos

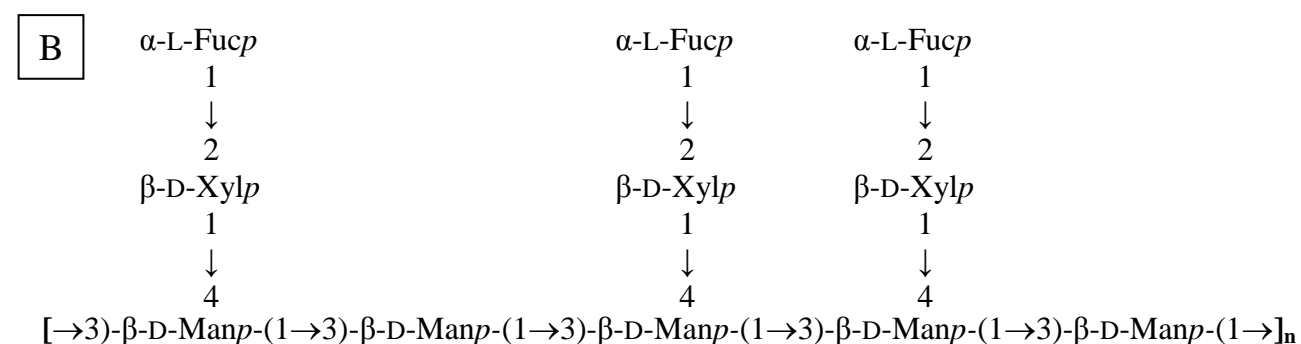
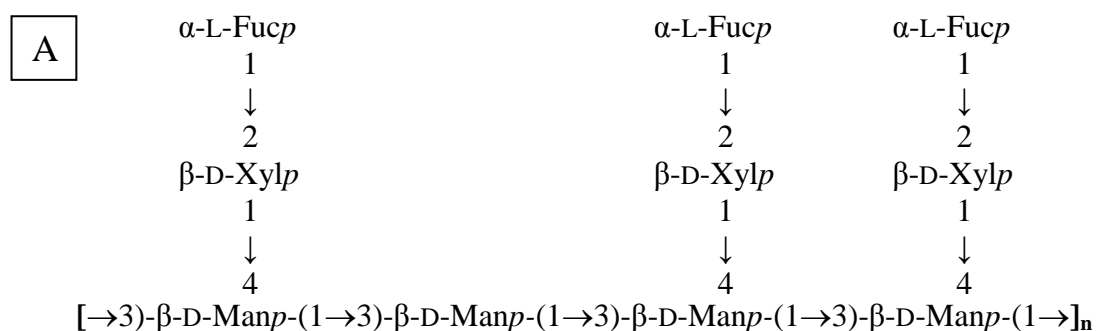
(Conclusão)

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Fucomanogalactana (Fração: R-FPHW) <i>Amanita muscaria</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por unidades de β -D-Manp e menor proporção por α -L-Fucp	$M_w = 25,5 \times 10^3$ g/mol Dados de metilação: Fucp (21,6%), Manp (8,9%), 6-O-Galp (37,6%), 2,6-di-O-Galp (31,9%)	Anti-inflamatória e antinociceptiva	RUTHES et al., 2013.
Manofucogalactana <i>Polyporus giganteus</i> Basidioma	β -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- β -D-Manp- β -L-Fucp.	$[\alpha]_D + 65^\circ$ Composição monossacarídica: Fuc:Man:Gal, numa proporção molar de 1:1:2,6 Dados de metilação: Manp (24,5%), 6-O-Galp (36,5%), 2,6-di-O-Galp (23,7%), 3-O-Fucp (36,5%)	Não avaliada	BHAVANANDAN, BOUVENG, LINDBERG, 196.
Fucogluco galactana (Fração: HPA) <i>Hericium erinaceus</i> Basidioma	Galp (1→6)	Substituição em O-2 pelo dissacarídeo 4-O-Gal-Fuc e pelo tri- e tetrassacarídeo formado por Glc unidos por ligações (1→3) e (1→6), respectivamente.	$M_w = 50$ kDa Composição monossacarídica: Glc:Gal:Fuc numa proporção molar de 1,0:2,1:0,4, respectivamente Dados de metilação: Galp:Glc: 4-O-Fucp: 3-O-Glc: 6-O-Glc:6-O-Gal: 2,6-di-O-Gal em proporção molar de ~ 0,43:0,25:0,09:0,36:1,59:1,88:1,00. $[\alpha]_D + 64^\circ$	Não avaliada	WANG, LUO, LIANG, 2004.
Glucogalactana (fração: POP) <i>Pleurotus ostreatus</i> Basidioma	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β -D-Glc	$M_w = 24$ kDa Composição monossacarídica: Gal e Glc, numa proporção molar de 2:1 Dados de metilação: Glc (20%), 6-O-Galp (21%), 2,6-O-Galp (19%),	Imunomodulatória	SUN, LIU, 2009.



As heteromananas contendo fucose, xilose e manose encontradas em *Polyporus pinicola* (Figura 1.9-A) (AXELSSON et al., 1969) e *Fomes annosus* (Figura 1.9-B) (AXELSSON et al., 1971) apresentam uma cadeia principal similar constituída por $\beta\text{-D-Manp}$ ligadas (1 \rightarrow 3) e parcialmente substituídas em O-4 pelo dissacarídeo 2-O- $\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}\beta\text{-D-Xylp}$ (Tabela 1.3, p. 22). A partir do basidioma de *Ganoderma lucidum* foi obtida uma fucoxilomanana distinta das anteriores, sendo formada por unidades de D-Manp unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4) e substituídas em O-3 pelo dissacarídeo 4-O-L-Fucp-D-Xylp (Figura 1.9-C, p. 21) (MIYAZAKI et al., 1982) (Tabela 1.3, p. 22).

FIGURA 1.9 - Representação esquemática das estruturas das fucoxilomananas isoladas de *Polyporus pinicola* (A), *Fomes annosus* (B) e *Ganoderma lucidum* (C)



C

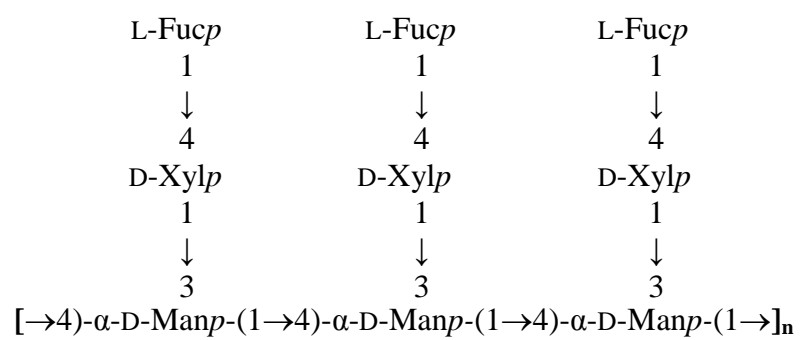


TABELA 1.3 - Heteromananas isoladas de basidiomicetos

FRAÇÃO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Xilomanana <i>Armillaria mellea</i> Micélio (cultivo líquido)	α -Manp (1→3)	Substituições em O-4, pelo dissacarídeo 4- <i>O</i> -D-Xylp-D-Xylp	Composição monossacarídica: Man (75%) e Xyl (25%) Dados de metilação: Xylp (21,3%), Manp (4,0%), 3- <i>O</i> -Manp (31,1%), 4- <i>O</i> -Xylp (20,1%), 3,4-di- <i>O</i> -Manp (20,7%) e tri- <i>O</i> -Manp (3,0%) $[\alpha]_{5780} + 71^\circ$	Não avaliada	BOUVENG, FRASER, LINDBERG, 1967.
Xilomanana (Fração: C) <i>Polyporus tumulosus</i> Micélio (cultivo líquido)	α -Manp (1→3)	Substituições em O-4, pelo dissacarídeo 4- <i>O</i> -D-Xylp-D-Xylp e únicas unidades de D-Xylp	Composição monossacarídica: Man (54,5%) e Xyl (45,5%) Dados de metilação: Xylp (2,3,4-Me ₃ Xyl), Manp (2,3,4,6-Me ₄ Man), Manp (2,4,6-Me ₃ Man), Xylp (2,3-Me ₂ Xyl), Manp (2,6-Me ₂ Man) $[\alpha]_D + 56^\circ$	Não avaliada	ANGYAL, BENDER, RALPH, 1974.
Xilomanana (Fração: XM) <i>Flammulina velutipes</i> Basidioma	α -Manp (1→3)	Substituições em O-4, principalmente por únicas unidades de β -Xylp dissacarídeo 3- <i>O</i> - β -D-Xylp- β -D-Xylp e	$M_w = 30,8 \times 10^4$ g/mol Composição monossacarídica: 40 % Xyl e 60 % Man numa proporção molar de 3,0:1,0 Dados de metilação: Xylp (31%), 3- <i>O</i> -Xylp (6%), 4- <i>O</i> -Xylp (1%), 2- <i>O</i> -Xylp (1%), 3,4-di- <i>O</i> -Xylp (1%), 3- <i>O</i> -Manp (28%), 3,4-di- <i>O</i> -Manp (32%)	Não avaliada	SMIDERLE et al., 2006.
Fucoxilomanana <i>Polyporus pinicola</i>	β -D-Manp (1→3)	Substituições em O-4, pelo dissacarídeo 2- <i>O</i> - α -L-Fucp- β -D-Xylp	Composição monossacarídica: Fuc:Xyl:Man na proporção molar de 0,8:0,7:1,0, respectivamente. Dados de metilação: Fucp (30,2%), 2- <i>O</i> -Xylp (29,5%), 3- <i>O</i> -Manp (9,7%), 3,4-di- <i>O</i> -Manp (30,6%) $[\alpha]_{578}^{20} - 42^\circ$	Não avaliada	AXELSSON et al., 1969.
Fucoxilomanana <i>Fomes annosus</i> Basidioma	β -D-Manp (1→3)	Substituições em O-4, pelo dissacarídeo 2- <i>O</i> - α -L-Fucp- β -D-Xylp	Composição monossacarídica: Fuc:Xyl:Man na proporção molar de 1,0:1,0:2,5, respectivamente. Dados de metilação: Fucp (22,0%), 2- <i>O</i> -Xylp (22,0%), 3- <i>O</i> -Manp (34,0%), 3,4-di- <i>O</i> -Manp (22,0%) $[\alpha]_{578} - 10^\circ$	Não avaliada	AXELSSON et al., 1971.
Fucoxilomanana <i>Ganoderma lucidum</i> Basidioma	D-Manp (1→4)	Substituições em O-3, pelo dissacarídeo 4- <i>O</i> -L-Fucp-D-Xylp	$M_w = 38,0 \times 10^3$ g/mol Composição monossacarídica: Fuc:Xyl:Man na proporção molar de 1,0:1,0:1,0, respectivamente. Dados de metilação: Fucp, 4- <i>O</i> -Xylp, 4- <i>O</i> -Manp, 3,4-di- <i>O</i> -Manp $[\alpha]_D^{20} - 0,06^\circ$	Antitumoral	MIYAZAKI et al., 1982.

1.4 - *Grifola frondosa*

Grifola frondosa (Figura 1.10), pertencente à ordem Aphyllophorales e família Polyporaceae, tem sido comercializado, principalmente, na China e Japão como um fungo comestível e medicinal (ILLANA-ESTEBAN, 2008). Este é conhecido, popularmente, no Japão como “maitake”, ou seja, cogumelo (= “take”, em japonês) dançarino (= “mai”, em japonês) (MAYELL, 2001).

FIGURA 1.10 - Foto do basidiomiceto *Grifola frondosa*



Fonte: <http://marcelomin.photoshelter.com>

O cultivo comercial deste cogumelo teve início apenas em 1980, sendo este voltado principalmente para a alimentação. Atualmente, este também vem sendo utilizado para diferentes fins, porém o que vem se destacando é a aplicação como suplemento dietético, podendo ser o mais versátil e promissor, embora menos conhecido do que o de *Lentinus edodes* (nome popular: “shiitake”) e *Ganoderma lucidum* (nome popular: “reishi”) (MAYELL, 2001).

A utilização deste fungo como suplemento dietético deve-se a presença de polissacarídeos bioativos e aos seus constituintes de alto valor nutricional, sendo a matéria seca formada por 21,9% de proteína, 59,9 % de carboidratos e 3,9 % de lipídios, além das vitaminas (B1, B2, B6, C, D e ácido fólico) e minerais como o fósforo, magnésio, sódio, ferro e cálcio (ZHUANG, WASSER, 2004; ILLANA-ESTEBAN, 2008). Estes são comercializados por empresas como a “Mushroom Wisdom” a qual produz tanto os basidiomas triturados (Figura 1.11-A, p. 24) quanto às frações purificadas, fração D (Figura 1.11-B e -C, p. 24) e fração SX (Figura 1.11-D, p. 24), provenientes do corpo de frutificação deste fungo.

FIGURA 1.11 - Suplementos dietéticos, provenientes de *Grifola frondosa* (“Maitake”), comercializados pela empresa “Mushroom Wisdom”



Fonte: <http://www.mushroomwisdom.com>

Com a finalidade de comprovar cientificamente os vários efeitos biológicos atribuídos a este fungo, bem como as moléculas envolvidas nestas ações, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o basidioma e o micélio, proveniente do cultivo submerso, da linhagem cinza deste basidiomiceto. A partir destes estudos foram reportadas diversas substâncias bioativas, no entanto, como na maioria dos outros cogumelos, os polissacarídeos são os principais polímeros envolvidos nesta resposta.

1.4.1- Polissacarídeos de *Grifola frondosa*

Diversos polissacarídeos provenientes do basidioma e micélio (cultivo submerso) do fungo medicinal *G. frondosa* foram isolados através de diferentes métodos de extração e purificação. Dentre estes, encontram-se as glucanas, heterogalactanas e heteropolissacarídeos complexos.

A primeira molécula isolada deste basidiomiceto foi uma β -glucana com M_w 140 kDa, a qual foi obtida do basidioma por extração com solução aquosa de cloreto de zinco 10%. Esta é constituída por uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3), as quais se apresentam parcialmente substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp, a cada três unidades da cadeia principal (KATO et al., 1983). Estruturas similares foram isoladas do basidioma por extração alcalinas as quais foram denominadas de CF-5, PF-5 e CF-7 (OHNO et al., 1984), grifolana-7N (LINO et al., 1985), GFPBW1 (FANG et al., 2012) ou por extração aquosa, sendo chamada de fração FI₀-a- β ₁ (MIZUNO et al., 1986). Além do basidioma, este

homopolímero também tem sido isolado do micélio, sendo esta conhecida por grifolana-LE (fração GRN-LE) (TADA et al., 2009) (Tabela 1.4, p. 27).

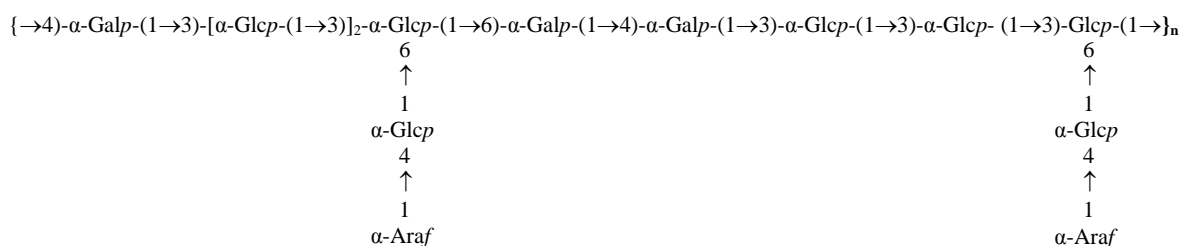
A partir do micélio e do basidioma de *G. frondosa* também foi isolada uma fração bioativa, denominada fração D, a qual possui, como componente principal um polissacarídeo ligado à proteína (80:20, respectivamente) contendo uma massa molecular de $1,0 \times 10^6$ Da. A porção polissacarídica desta fração é composta por glucanas contendo tanto cadeia principal com ligações glicosídicas do tipo (1→6) e ramificadas em O-3 quanto cadeias ligadas (1→3) e substituídas em O-6. Após etapas adicionais de purificação, foi obtida a fração MD (U.S. Patent 5,854,404) (MAYELL, 2001), que também é um complexo glucana-proteína, porém em uma relação de 99:1, respectivamente (Tabela 1.4, p. 27).

Além destas, foram isoladas glucanas lineares contendo ligações do tipo β -(1→6) e/ou α -(1→4) (denominadas de CF-1 e PF-1, respectivamente) (OHNO et al., 1984), α -D-glucanas contendo ligações glicosídicas do tipo (1→4) as quais podem estar substituídas em O-6 por α -D-Glcp e α - (fração FA-1-a- α) e β -D-glucanas ácidas (FA-1-a- β_1) (MIZUNO et al., 1986) (Tabela 1.4, p. 27).

MIZUNO e colaboradores (1986) isolaram, além das glucanas (fração FI_o-a- β_1 , FA-1-a- α , FA-1-a- β_1), uma xiloglucana ácida (fração FII-3) composta por ácido glucurônico (GlcA, 16,6 %), xilose (37,6 %) e glucose (45,8 %). De acordo com os dados de metilação, os autores sugeriram que a mesma possui uma cadeia principal formada por glucose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1→3) e substituídas em O-2 e O-6 por unidade de D-Glcp, porém, não relataram o modo de ligação das unidades de xilose e ácido glucurônico.

O heteropolissacarídeo ácido também foi isolado por extração aquosa à quente, do micélio de *G. frondosa* GF9801, o qual foi denominado GFPS1b. A fração GFPS1b (M_w de 21 kDa) foi composta por 4,3% de ácido urônico, 16,6% de proteína e pelos monossacarídeos neutros D-glucose, D-galactose e L-arabinose em uma proporção molar de 4:2:1, respectivamente. Este polímero contém uma cadeia principal constituída por unidades de 4-O- α -D-Galp, 6-O- α -D-Galp e 3-O- α -D-Glcp, sendo as últimas parcialmente substituídas em O-6 por cadeias laterais compostas de 4-O- α -L-arabinofuranosil- α -D-glucopiranosose (Figura 1.12, p. 26; Tabela 1.4, p. 27) (CUI et al. 2007).

FIGURA 1.12 - Estrutura representativa do heteropolissacarídeo ácido (GFPS1b) isolado do micélio em cultivo líquido de *G. frondosa*



Na sequência, MASUDA e colaboradores (2009) descreveram o heteropolímero neutro, denominado MZF (fração Z de *Maitake*), com uma M_w de 23 kDa, o qual foi isolado do basídioma por extração aquosa à quente. Este contém os monossacarídeos Gal, Man, Fuc e Glc em uma relação molar de 1,24: 1,00: 0,95: 0,88, respectivamente. Os dados de metilação indicaram tratar-se de uma molécula complexa constituída por uma cadeia principal formada por 6-*O*-α-D-Galp, 3-*O*-α-L-Fucp, 6-*O*-α-D-Manp e 3-*O*-β-D-Glcp, as unidades de β-D-Glp ligada em (1→3) apresenta-se substituída em O-6 por terminais não redutores de α-D-Manp (Tabela 1.4, p. 27).

Foram isoladas as heterogalactanas, fração QEPF-*Gf* (OLIVEIRA, 2013) e GFPW (WANG et al., 2014), a partir dos extratos aquosos obtidos do basídioma deste fungo medicinal (Tabela 1.4, p. 27). A manofucogalactana isolada (fração QEPF-*Gf*), com M_w 15,9 kDa, contém uma cadeia principal composta por unidades de 6-*O*-α-D-Galp e 6-*O*-(3-*O*-α-D-Me-Galp), as quais podem apresentar ramificações em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-*O*-α-D-Manp-α-L-Fucp e em menor proporção por terminais não redutores de α-L-Fucp (OLIVEIRA, 2013). A heterogalactana presente na fração GFPW (M_w 15,7 kDa) mostrou-se similar a QEPF-*Gf*, diferenciando principalmente quanto à presença do derivado parcialmente metilado e de terminais não redutores de α-L-Fucp presentes apenas em QEPF-*Gf* (Tabela 1.4, p. 27).

TABELA 1.4 - Polissacarídeos isolados de *Grifola frondosa* (“Maitake”)

POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	REFERÊNCIAS
Glucana Basidioma	β -Glc _p (1→3)	Substituições em O-6 por únicas unidades de β -Glc _p (1:3 unidades da cadeia principal)	$M_w = 140$ kDa Composição monossacarídica: Glc= 92% (baixos teores de D-Man, D-Xyl e L-Ara) Dados de metilação: Glc _p : 3- <i>O</i> -Glc _p :3,6-di- <i>O</i> -Glc _p , numa proporção molar de ~ 1,0:2,0:1,1 $[\alpha]_D + 7,9^\circ$	Não avaliada	KATO et al., 1983.
Glucanas (<i>CF-5</i> , <i>PF-5</i> e <i>CF-7</i>) Basidioma	β -Glc _p (1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glc _p (1:3 unidades da cadeia principal)	Não descrita.	Antitumoral	OHNO et al., 1984.
Glucana (<i>Grifolana-7N</i>) Basidioma	β -Glc _p (1→3)	Substituições em O-6 por únicas unidades de β -Glc _p (1:3 unidades da cadeia principal)	$M_w = 1200$ kDa	Não avaliada	LINO et al., 1985.
Glucana (<i>GFPBW1</i>) Basidioma	β -D-Glc _p (1→3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glc _p (1:3 unidades da cadeia principal)	$M_w = 300$ kDa Dados de metilação: Glc _p : 3- <i>O</i> -Glc _p :3,6-di- <i>O</i> -Glc _p , numa proporção molar de 1,0:1,8:1,0 $[\alpha]_D + 23^\circ$	Antitumoral	FANG et al. 2012.
Glucana (Fração <i>FI_{o-a}</i> - β _i) Basidioma	β -Glc _p (1→3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glc _p	$M_w = 1000$ kDa Dados de metilação: Glc _p :3- <i>O</i> -Glc _p : 3,6-di- <i>O</i> -Glc _p , numa relação molar de 1:3:1, aproximadamente $[\alpha]_D + 9^\circ$	Antitumoral	MIZUNO et al., 1986.

TABELA 1.4 - Polissacarídeos isolados de *Grifola frondosa* (“Maitake”)

POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	REFERÊNCIAS
Glucana (Fração GRN-LE, <i>Grifolana 7N</i>) Exopolissacarídeo	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por unidades de β -D-Glcp, a cada três resíduos (1:3 três unidades da cadeia principal)	Não descrita	Antitumoral	TADA et al., 2009.
Glucanas (Fração D) Micélio e Basidioma	Mistura de glucanas contendo cadeia principal constituída por unidades de β -Glcp (1 \rightarrow 3) ou por β -Glcp (1 \rightarrow 6)	Podem apresentar substituintes em O-6 ou O-3, respectivamente. Porém não há informações a respeito da constituição destes grupos laterais	Componente principal: polissacarídeo ligado à proteína ($M_w = 1000$ kDa), Relação carboidrato: proteína = 80:20	Antitumoral	NANBA, KUBO, 1998; MAYELL, 2001.
Glucanas (Fração MD) Micélio e Basidioma	Relação carboidrato: proteína = 99:01 Originada a partir da fração D, porém não há informações a respeito da estrutura.			Antitumoral	
Glucana (Fração <i>CF-I</i>) Basidioma	β -(1 \rightarrow 6) e/ou α -(1 \rightarrow 4)	Estrutura não especificada	Composição monossacarídica: Glc (70%) Contém 25% de proteína Dados de metilação: Glcp: 6- <i>O</i> -Glcp ou 4- <i>O</i> -Glcp, numa relação molar de 1,0:4,7.	Antitumoral	OHNO et al., 1984.
Glucana (Fração <i>PF-I</i>) Basidioma	β -(1 \rightarrow 6) e/ou α -(1 \rightarrow 4)	Estrutura não especificada	Composição monossacarídica: Glc (81%) Contém 15% de proteína Dados de metilação: Similar à fração <i>CF-I</i>	Não apresentou atividade antitumoral	
Glucana (Fração: FI _o -a- α) Basidioma	α -Glcp(1 \rightarrow 4)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de α -D-Glcp	$M_w = 1000$ kDa [α] _D + 156°	Não apresentou atividade antitumoral (Sarcoma 180)	MIZUNO et al., 1986.

TABELA 1.4 - Polissacarídeos isolados de *Grifola frondosa* (“Maitake”)

POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	REFERÊNCIAS
Glucana (Fração FA-1-a- β_1) Basidioma	β -D-glucana ácida	Estrutura não especificada	$M_w = 500$ kDa Composição monossacarídica: GlcA (8,8%) e Glc (82,4%) Contém 1,2% de proteína $[\alpha]_D + 5^\circ$	Antitumoral	MIZUNO et al., 1986.
Glucana (Fração FA-1-a- α) Basidioma	α -D-glucana ácida	Estrutura não especificada	$M_w = 5,0 \times 10^5$ Da Composição monossacarídica: Glc (84,8%) e GlcA (8,4%) Contém 0,7% de proteína $[\alpha]_D + 108^\circ$	Não apresentou atividade antitumoral	
Xiloglucana ácida (Fração: FII-3) Basidioma	β -Glc $p(1 \rightarrow 3)$	Substituição em O-2 e O- 6 por terminais não reduzores de D-Glc p Não foi definido o modo de ligação da Xyl e do GlcUA	$M_w = 50$ kDa Composição monossacarídica: GlcA (16,6%), Xyl (37,6%) e Glc (45,8%) Dados de metilação: Glc p : 3-O-Glc p : 2,3- di-O-Glc p : 3,6-di-O-Glc p , numa relação molar de 1,0:0,6:0,8:0,6, respectivamente $[\alpha]_D + 56^\circ$	Atividade Antitumoral	
Heteropolissacarídeo ácido (Fração GFPS1b) Micélio (cultivo líquido)	Composta por: 4-O- α -D- Gal p , 3-O- α -D-Glc p , 6-O- α -D-Glc p , 4-O- α -D- Gal p e 3,6-di-O- α -D-Glc p	Substituição em O-6 pelo dissacarídeo 4-O- α -L-Araf- α -D-Glc p	$M_w = 21$ kDa 4,3% ácido urônico e 16,6% proteína Composição monossacarídica: Glc:Gal:Ara numa relação molar de 4:2:1 Dados de metilação: Araf: Araf: 4-O- Glc p : 3-O-Glc p : 4-O-Gal p : 6-O-Gal p : 3,6- di-O-Glc p , numa relação molar de 1,6:0,1:1,2: 2,5:1,2:0,5:1,0	Antitumoral	CUI et al., 2007.
Heteropolissacarídeo (Fração MZF) Basidioma	6-O- α -D-Gal p (36,2%), 3-O- α -L-Fuc p (14,5%), 6-O- α -D-Man p (9,4 %), 3-O- β -D-Glc p (10,1%) e 3,6-di-O- β -D-Glc p (6,5 %) Não está definida	Substituição em O-6 nas unidades de 3-O- β -D-Glc p por terminais não reduzores de α -D-Man p (23,2%) Não está definida	$M_w = 23$ kDa Composição monossacarídica: Fuc:Man: Gal:Glc, numa relação molar de 0,95:1,00:1,24:0,88, respectivamente Dados de metilação: Man p (23,2%), 6-O-Gal p (36,2%), 3-O-Fuc p (14,5%), 6-O-Man p (9,4%), 3-O-Glc p (10,1%), 3,6-di-O-Glc p (6,5%)	Antitumoral	MASUDA et al., 2009.

TABELA 1.4 - Polissacarídeos isolados de *Grifola frondosa* (“Maitake”)

(Conclusão)

POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	REFERÊNCIAS
Manofucogalactana (Fração QEPF- <i>Gf</i>) Basidioma	α -D-Galp (1→6) e 3-O- α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -L- Fucp- α -D-Manp e em menor proporção por unidades de α -L-Fucp	$M_w = 15,9$ kDa Composição monossacarídica: Fuc (20%); Man (10%), 3-O-Me-Gal (7%) e Gal (63%). Dados de metilação: Fucp (3,8 %), Manp (16,6 %), 3-O-Fucp (13,3 %), 6-O-Galp (29,2 %), 2,6-di-O-Galp (37,1 %)	Não avaliada	OLIVEIRA, 2013.
Fucomanogalactana (Fração GFPW) Basidioma	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -L-Fucp- α -D-Manp	$M_w = 15,7$ kDa Composição monossacarídica: fucose, manose e fucose (23,8%, 22,2% e 54,0%) Dados de metilação: Manp (19,5), 3-O-Fucp (22,0%), 6-O-Galp (28,6%), Galp 2,6-di-O-Galp (19,7%)	Anti-angiogenese	WANG et al., 2014.

1.4.2 - Atividade Biológica de *Grifola frondosa*

Grifola frondosa está entre as mais promissoras fontes naturais de substâncias com propriedades medicinais, principalmente, com ação imunoterapêutica. Diversas substâncias têm sido isoladas e avaliadas quanto aos efeitos terapêuticos, sendo os carboidratos os responsáveis pela maioria das ações atribuídas a este fungo.

Dentre os polissacarídeos isolados, a fração D e a MD são os principais modificadores de resposta biológica descritos para este basidiomiceto. Ambas frações apresentaram atividade antitumoral frente às células cancerígenas MM-46 (células de carcinoma mamário de ratos), mas a MD mostrou-se mais efetiva na inibição do crescimento do tumor em relação à fração de origem, ou seja, a fração D (U.S. Patente 5,854,404). Cabe ressaltar, que a principal diferença entre estas frações está no percentual de carboidrato e proteína, sendo a porção polissacarídica da fração MD superior à da fração D (80% e 99%, respectivamente), reforçando que os polissacarídeos são os responsáveis por esta ação (NANBA, KUBO, 1998; MAYELL, 2001).

Devido aos efeitos antitumorais evidenciados para as frações D e MD, ambas vêm sendo utilizadas em países como o Japão e a China, principalmente, como coadjuvantes no tratamento de câncer, as quais podem proteger as células saudáveis, prevenir a metástase, retardar ou cessar o crescimento das células cancerígenas, além de reduzir os efeitos colaterais causados pela quimioterapia convencional, como a queda de cabelo, dor e náuseas (MAYELL, 2001).

Cabe ressaltar que, ambas possuem uma toxicidade baixa frente às células sadias (NANBA, KUBO, 1998; MAYELL, 2001; AL ALI ZIDAN, ALNEAMEH, 2014), conseqüentemente, em fevereiro de 1998 a U.S. Food and Drug Administration aprovou uma investigação (IND 54589) para pesquisadores conduzir em um estudo piloto de fase II sobre os efeitos da D-fração no câncer de mama e de próstata (MAYELL, 2001).

Além da utilização como coadjuvantes no tratamento de câncer, devido a sua ação imunoestimulatória, estes extratos de glucanas (fração D e MD) também têm se mostrado benéficos no tratamento da hiperlipidemia, hipertensão, diabete, hepatite e SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (MAYELL, 2001; AL ALI ZIDAN, ALNEAMEH, 2014).

CHEN e colaboradores (2012) verificaram através de diferentes ensaios realizados *in vitro*, incluindo a habilidade de capturar radicais livres como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), hidroxil e superóxido, o poder redutor, a ação quelante dos íons ferrosos (Fe^{+3}) e a capacidade de inibição da oxidação de lipídeos, que as frações polissacarídicas GFP-1, GFP-2 e GFP-3 provenientes de *G. frondosa*, especialmente GFP-2, possuem atividades antioxidantes eficazes. Desta maneira, os polissacarídeos de *G. frondosa* podem ser usados como uma fonte facilmente acessível de antioxidantes naturais, como um suplemento alimentar ou nas indústrias farmacêuticas e médicas.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química de polissacarídeos isolados do micélio de *Grifola frondosa* (“Maitake”), obtido por cultivo em substrato lignocelulósico.

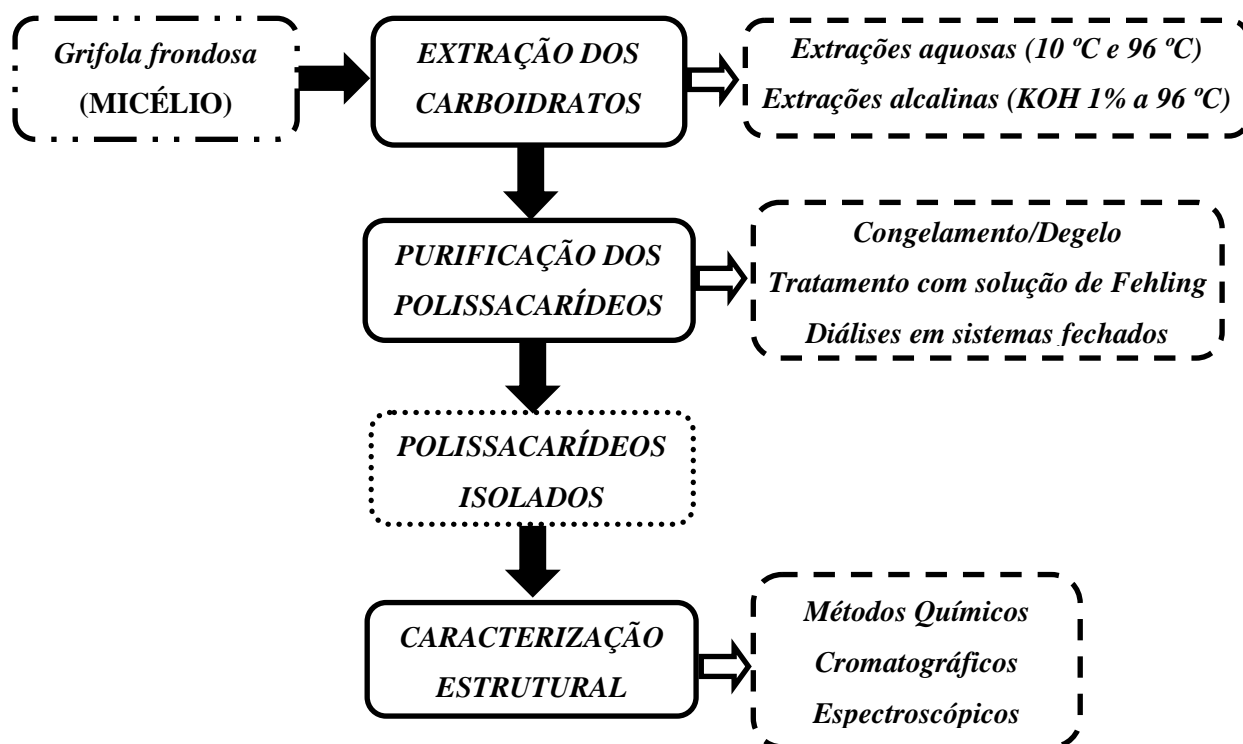
Com esta finalidade, as seguintes estratégias foram propostas:

- a) Extrair os polissacarídeos do micélio de *G. frondosa* através de extrações aquosas e alcalinas;
- b) Purificar as frações polissacarídicas obtidas utilizando diferentes metodologias como congelamento/degelo, precipitação com solução de Fehling e diálise;
- c) Caracterizar estruturalmente os polímeros obtidos utilizando métodos químicos de derivatização, metilação, oxidação com NaIO_4 e degradação controlada de Smith e como técnicas analíticas de RMN, *HPSEC-MALLS* e CG-EM.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos, o micélio de *Grifola frondosa* foi submetido à extrações aquosas e alcalinas para obtenção dos carboidratos. Os extratos polissacarídeos obtidos foram fracionados utilizando metodologias adequadas, e posteriormente realizou-se a caracterização estrutural através de métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos (Figura 3.1, p. 33).

FIGURA 3.1 - Esquema geral dos métodos de obtenção, purificação e caracterização dos polissacarídeos do micélio de *G. frondosa*



3.1 - MATERIAL BIOLÓGICO

Os micélios (= filamentos ou hifas), obtidos por cultivo em substrato lignocelulósico, de *G. frondosa* foram fornecidos em maio de 2010 pela empresa YURI Cogumelos (Proprietário: Iwao Akamatsu), localizada em Sorocaba, SP.

3.2 - EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.1 – Extração Aquosa à Frio

Os micélios frescos de *G. frondosa* (~ 748 g) foram liofilizados, obtendo-se uma massa seca de 229,4 g, triturados e submetidos à extração aquosa a, aproximadamente, 10 °C por 8 h, sob agitação mecânica (7 x, 2 L cada). Após cada etapa, o material foi filtrado para a separação do extrato aquoso (I) e do material residual (I). Os extratos obtidos foram reunidos e concentrados sob pressão reduzida até pequeno volume, precipitados com etanol (3:1, v/v) e centrifugados (5000 rpm, 20 min,

15 °C). O precipitado etanólico I (fração CW-GfM) foi dialisado contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa) por, aproximadamente, 48 horas e liofilizado (Figura 3.2, p. 35).

3.2.2 - Extração Aquosa à Quente

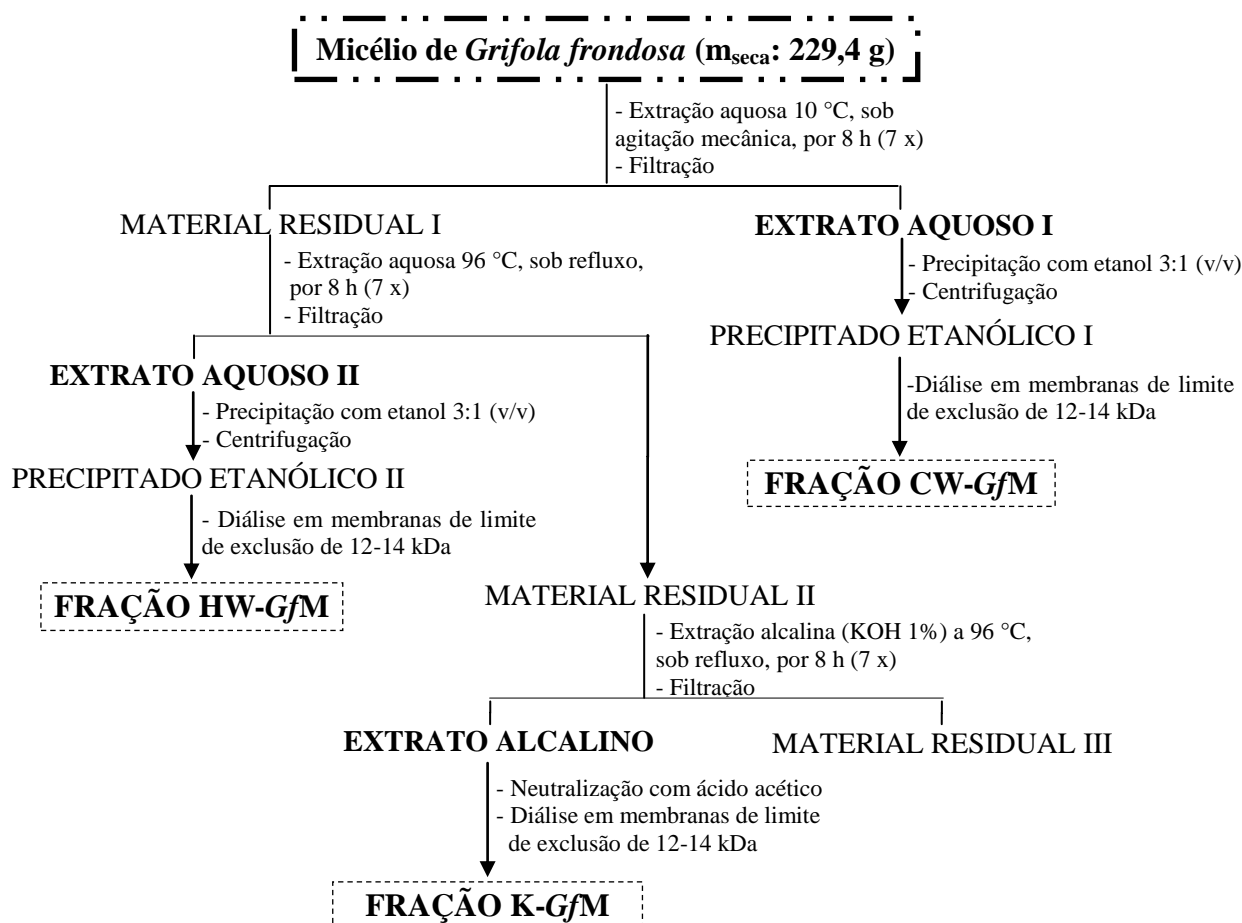
O material residual I foi submetido à extrações aquosas sob refluxo em banho de água fervente (aproximadamente 96 °C, por 8 horas (7 x, 2 L cada). O material obtido a cada extração foi filtrado e reunido, gerando um extrato aquoso II e um resíduo II. Esse extrato foi concentrado, sob pressão reduzida até pequeno volume e precipitado com etanol (3:1, v/v). A fração polissacarídica (precipitado etanólico II) foi recuperada através de centrifugação (5000 rpm, 20 min, 15 °C), dialisada (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente por 36 horas e liofilizada, originando a fração HW-GfM (Figura 3.2, p. 35).

3.2.3 - Extração Alcalina

O material residual II foi tratado com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 1%, sob refluxo em banho com água fervente (96 °C), por 8 horas (7 x, 500 mL), na presença de borohidreto de sódio (NaBH₄) para evitar degradação das cadeias polissacarídicas, originando o extrato alcalino e o material residual III.

O extrato alcalino foi filtrado, neutralizado com ácido acético (AcOH), dialisado (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente por 48 horas, concentrado sob pressão reduzida até pequeno volume e liofilizado, resultando na fração denominada K-GfM (Figura 3.2, p. 35).

FIGURA 3.2 - Esquema das extrações aquosas (10 °C e 96 °C) e alcalinas (KOH a 96 °C) dos polissacarídeos dos micélios de *G. frondosa*



3.3 - PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Com a finalidade de purificação, as frações polissacarídicas CW-GfM, HW-GfM e K-GfM foram submetidas aos processos de fracionamento, tais como congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984), precipitação com solução de Fehling (precipitação por formação de complexos de Cu^{+2} solúveis e insolúveis) (JONES; STOODLEY, 1965) e diálise em sistema fechado utilizando membrana com limite de exclusão de 1000 kDa (CARBONERO, 2005). O fracionamento das amostras solúveis em água foi acompanhado pelo perfil de eluição obtido através de cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS).

3.3.1 - Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

Os polissacarídeos obtidos através das extrações aquosas (frações CW-GfM e HW-GfM) e alcalina (fração K-GfM) foram fracionados pelo método de purificação por congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984). Previamente, as frações CW-GfM, HW-GfM e K-GfM foram solubilizadas em água destilada e submetidas ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. Os precipitados insolúveis em água fria (ICW-GfM, IHW-GfM e IK-GfM, respectivamente) foram separados dos demais componentes solúveis (SCW-GfM, SHW-GfM e SK-GfM, respectivamente) por centrifugação (5000 rpm, 20 min, 15 °C). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes, em todas as frações, até que os sobrenadantes não apresentassem materiais insolúveis em água fria e vice-versa. Após fracionamento, todas as frações originadas foram liofilizadas.

3.3.2 - Purificação por Precipitação com Solução de Fehling

As frações SCW-GfM (Figura 4.4, p. 51) e SK-GfM (Figura 4.14, p. 64) foram submetidas ao processo de precipitação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste em duas soluções (A e B), sendo a solução A composta por tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de potássio (KOH) (173,0 g + 125,0 g / H_2O q.s.p. 500 mL, respectivamente), e a B por sulfato de cobre $5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (CuSO_4) (55,7 g / H_2O q.s.p. 500 mL).

As frações submetidas a este procedimento foram solubilizadas primeiramente na solução A, seguida da adição de igual volume da solução B. Após agitação vigorosa, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas. Decorrido o tempo, os complexos cúpricos insolúveis (PFCW-GfM e PFK-GfM, respectivamente) foram separados dos solúveis (SFCW-GfM e SFK-GfM, respectivamente) por centrifugação (5000 rpm, 20 min, 15 °C). As frações obtidas (precipitado e sobrenadante de Fehling) foram neutralizadas com AcOH e dialisadas contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa; ~ 48 horas). Após diálise, ambas foram deionizadas com resina catiônica fortemente ácida (carregada com H^+) com a finalidade de remover o cobre, filtradas em algodão para remoção da resina e novamente dialisadas contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa; ~ 24 horas). Este procedimento foi repetido para as

frações PFCW-GfM (2 x) e PFK-GfM (1 x), resultando nos complexos cúpricos insolúveis PF₃CW-GfM (Figura 4.4, p. 51) e PF₂K-GfM (Figura 4.14, p. 64), respectivamente. Estes foram descomplexados sob as mesmas condições anteriores, no entanto, foi necessário uma etapa adicional para a fração PF₂K-GfM pois houve a formação de precipitado ao tratá-la com resina, sendo este removido por centrifugação e descartado. Após descomplexação, todas as frações foram concentradas sob pressão reduzida e liofilizadas.

3.3.3 - Purificação dos Polissacarídeos por Diálise em Membranas

As frações PF₃CW-GfM e SSF₂K-GfM foram submetidas à diálise em membrana (Spectra/Por[®]) com limite de exclusão de 1000 kDa (Figura 4.4, p. 51; Figura 4.14, p. 64). Este procedimento foi realizado através de um sistema fechado, contra água destilada, sendo o material a ser dialisado mantido sob refrigeração. O processo foi repetido diversas vezes, até que a fração eluída (= água de diálise) não apresentasse coloração (CARBONERO, 2005).

3.4 - ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

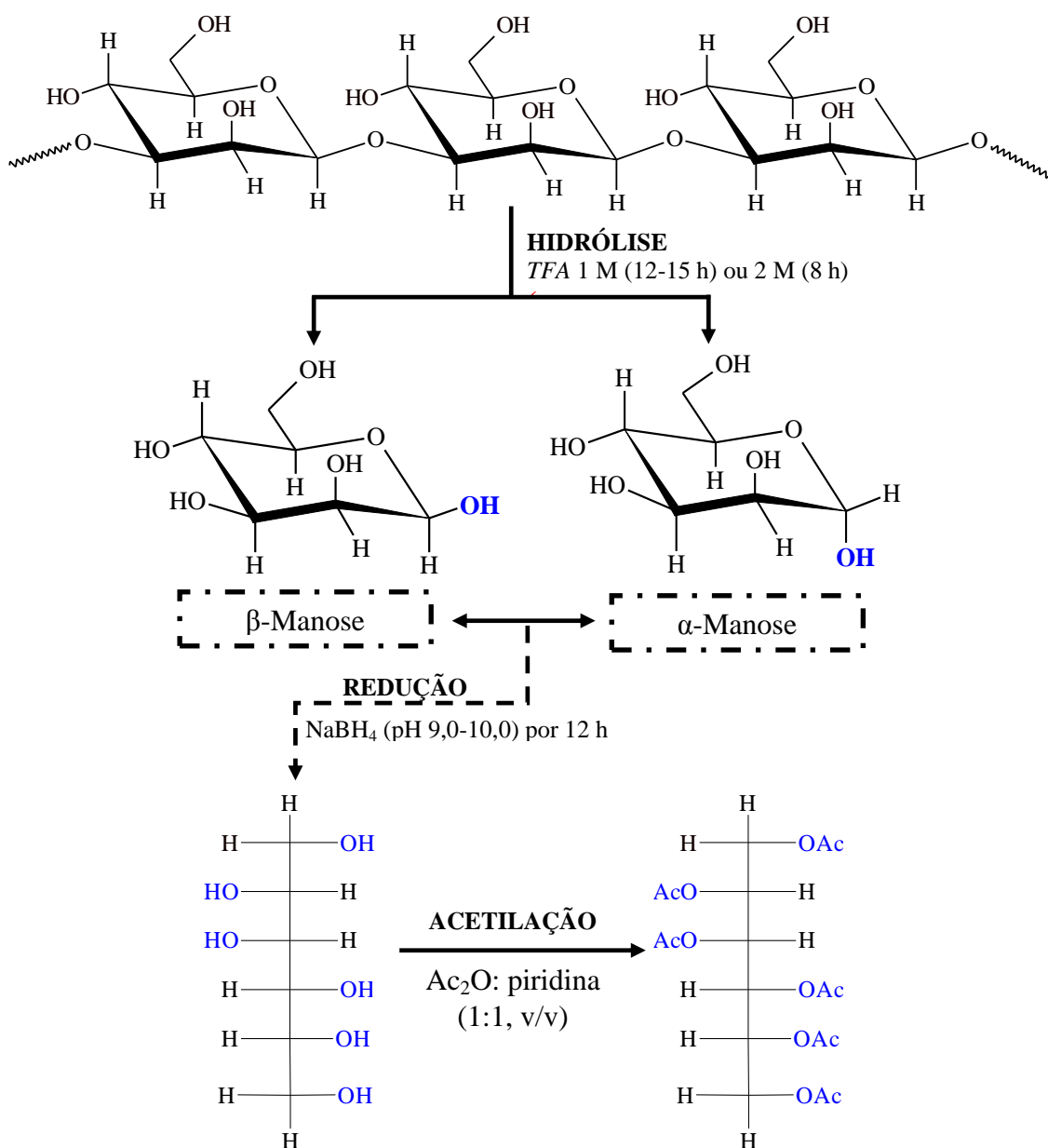
3.4.1 - Hidrólise Ácida Total, Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise

Uma alíquota de cada fração obtida (1-2 mg) foi hidrolisada com 0,5 mL de TFA 1 M (ácido trifluoroacético), *overnight* (12-15 h), ou TFA 2 M durante 8 horas. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação a temperatura ambiente. Os materiais hidrolisados foram, então, reduzidos com NaBH₄ a temperatura ambiente (pH 9,0-10,0) por 12 horas. Após esse período, as amostras reduzidas foram tratadas com resina catiônica (pH 7,0), filtradas e levadas à secura sob pressão reduzida. O ácido bórico (H₃BO₃) formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila [B(OCH₃)₃].

Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac₂O) e piridina (1:1, v/v; 0,5 mL) a temperatura ambiente por 12 horas (WOLFROM, THOMPSON, 1963 a,b). Os acetatos de alditol 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 CHCl_3 foi evaporado e os derivados acetilados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (Figura 3.3; Apêndice A, B e C, p. 91, 92 e 93).

FIGURA 3.3 - Esquema do processo de obtenção dos acetatos de alditóis, a partir de polissacarídeos, para a análise em CG-EM (composição monossacarídica)

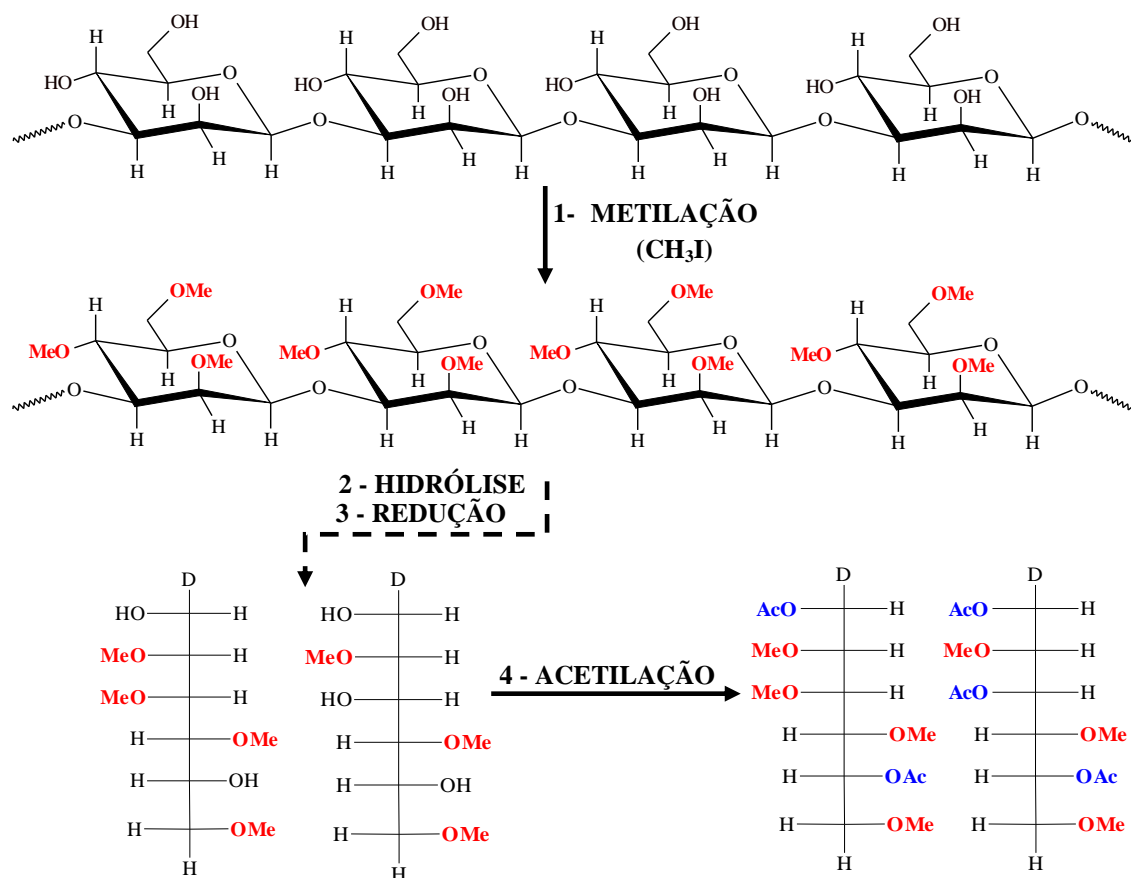


3.4.2 - Metilação dos Polissacarídeos

As frações purificadas $MEPF_3CW-GfM$, PF_2K-GfM e $MRSF_2K-GfM$ foram metiladas pelo método de CIUCANU e KEREK (1984), com a finalidade de definir os tipos de ligações glicosídicas existentes em cada polímero. Para a metilação, uma alíquota destas frações (8-15 mg) foram solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (Me_2SO). Após solubilização, foi adicionado 1 mL de iodeto de metila (CH_3I) e hidróxido de sódio ($NaOH$) seco e triturado (4:1 de carboidratos), 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 $AcOH$, dialisada (MWCO: 8 kDa) e os produtos per-*O*-metilados foram extraídos com $CHCl_3$ e, após evaporação do solvente orgânico, submetidos à hidrólise ácida total.

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados foi realizada com 0,5 mL de solução de ácido fórmico (CH_2O_2) 45 % a 100 °C por 10 horas para a fração $MEPF_3CW-GfM$, para as frações PF_2K-GfM e $MRSF_2K-GfM$ foi utilizado TFA 1 M a 100 °C por 10 horas e 0,5 M por 7 horas, respectivamente (STORTZ et al., 1997). Após o período necessário para hidrólise, o ácido foi evaporado e o material residual foi reduzido com borohidreto de sódio deuterado (NaB^2H_4), e acetilado como citado anteriormente (item 3.4.1). Os derivados metilados foram analisados na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados por CG-EM e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (Figura 3.4, p. 40; Apêndice D, p. 98).

FIGURA 3.4 - Esquema do processo de obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados para a análise em CG-EM para identificação dos tipos de ligações glicosídicas

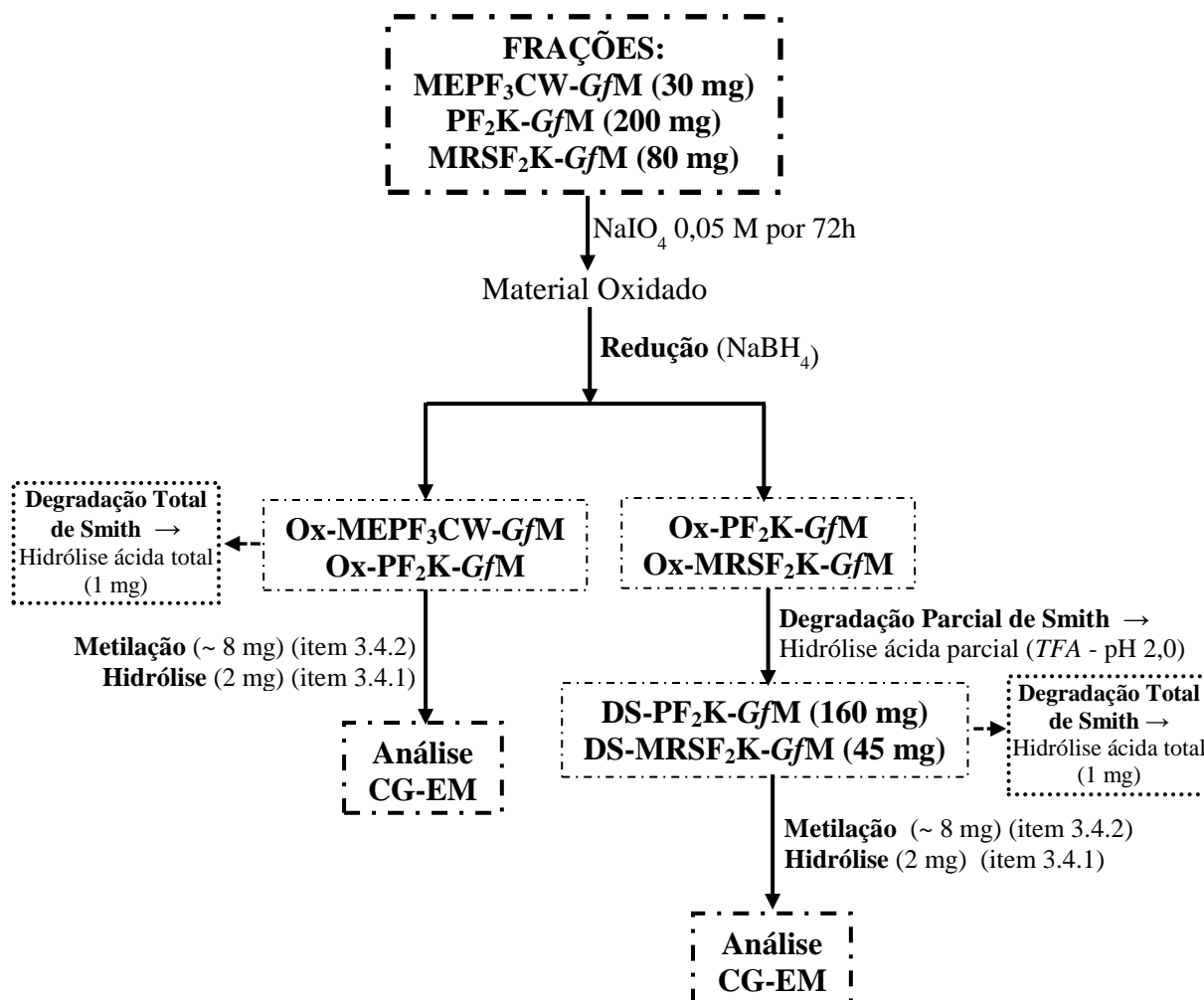


3.4.3 - Oxidação dos Polissacarídeos com Periodato de Sódio

Uma alíquota do polissacarídeo das frações MEPF₃CW-*GfM* (30 mg), PF₂K-*GfM* (200 mg) e MRSF₂K-*GfM* (80 mg), foi dissolvida em água e acrescida de periodato de sódio (NaIO₄) até atingir uma concentração final de 0,05 M. A solução foi mantida entre o período de 72 a 96 horas, sob ausência de luz. Decorrido o tempo, o material oxidado, após neutralização com AcOH, foi dialisado (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente (~ 24 h). Após, a solução foi reduzida com NaBH₄ (pH 9 - 10) por 24 horas (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; GOLDSTEIN et al., 2005; HAY, LEWIS, SMITH, 1965), seguida por neutralização com AcOH e diálise (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente por 48 horas, resultando nas frações denominadas Ox-MEPF₃CW-*GfM*, Ox-PF₂K-*GfM* e Ox-MRSF₂K-*GfM*.

As frações oxidadas obtidas foram submetidas à metilação e/ou à hidrólises ácidas parcial (= degradação parcial de Smith e/ou totais) (Figura 3.5).

FIGURA 3.5 – Esquema do processo de oxidação e degradação de polissacarídeos



3.4.3.1 - Degradação controlada de Smith

Alíquotas das frações polissacarídicas previamente oxidadas com NaIO_4 , Ox-PF₂K-GfM (~ 200 mg) e Ox-MRSF₂K-GfM (~ 60 mg), foram submetidas às hidrólises ácidas parciais com TFA até atingir pH 2,0 (GORIN, HORITSU, SPENCER, 1965), sob refluxo em banho com água fervente por ~ 45 minutos (= degradação controlada de Smith). Decorrido o tempo, a solução foi neutralizada com AcOH e dialisada em membranas com limite de exclusão de 2 kDa.

Os produtos resistentes à oxidação (DS-PF₂K-*GfM* e DS-MRSF₂K-*GfM*, respectivamente) foram submetidos às análises de composição monossacarídica (~1 mg; item 3.4.1), metilação (~ 8 mg; item 3.4.2) e/ou RMN de ¹³C.

3.4.3.2 - Degradação total de Smith

Aproximadamente 1 mg das frações Ox-MEPF₃CW-*GfM*, Ox-PF₂K-*GfM* e Ox-MRSF₂K-*GfM* foi submetido à hidrólise ácida total seguido por redução e acetilação, conforme descrito na seção 3.4.1, fornecendo os acetatos de alditóis que foram analisados por CG-EM.

3.5 - MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises estruturais dos polissacarídeos foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcello Iacomini do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR, Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, e Prof. Dr. Luciano Morais Lião do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG/RG), Regional Goiânia, Goiânia-GO.

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

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo gasoso da marca Varian, modelo 3800, acoplado a espectrômetro de massa, modelo Saturn 2000R (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná) e em cromatógrafo gasoso Agilent Technologies, modelo 7820A, acoplado a espectrômetro de massa Agilent 5975E (Departamento de Química - UFG/Regional Catalão), ambos equipados com coluna capilar de sílica fundida DB-225-MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm) (Tabela 3.1, p. 43), usando fonte de ionização por impacto eletrônico (70 eV) e analisador do tipo *Ion Trap*. A coluna capilar de sílica fundida HP5 (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm) também foi utilizada nas análises realizadas no cromatógrafo gasoso Agilent

Technologies (Tabela 3.1). Gás hélio ultra puro foi usado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

TABELA 3.1 - Condições de análises utilizadas no CG-EM

	COLUNA CAPILAR	
	HP5 (5% de fenilmetilsiloxano)	DB-225-MS (50%-cianopropilfenil)- metilpolisiloxano
Temperatura do injetor	250 °C	250 °C
Temperatura do detector (EM)	280 °C	280 °C
Rampa de eluição	<p>Análise de alditol acetato: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 240 °C (2 min).</p> <p>Análise de alditol acetato parcialmente metilado: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 250 °C (10 min), 50 °C/min até 270 °C (10 min).</p>	<p>Análise de alditol acetato: 50 °C (1 min), 40 °C/min até 220 °C (20 min).</p> <p>Análise de alditol acetato parcialmente metilado: 50 °C (1 min), 40 °C/min até 215 °C (27 min).</p>
Modo de injeção	Split (4:1)	Split (4:1)
Volume de injeção	1 µL	1 µL

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

Para as análises de homogeneidade e a determinação da massa molar (dn/dc), as amostras foram solubilizadas em um solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol.L⁻¹ contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g.L⁻¹ para uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹, e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm (Millipore). As análises de homogeneidade das amostras foram realizadas em HPSEC-MALLS, que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) WATERS acoplado a um detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e conectado em série com um detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY,

modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo NaN_3 $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) foi determinada para as amostras purificadas (MEPF₃CW-GfM e PF₂K-GfM), sendo que para cada amostra foram utilizadas 5 concentrações. Para isto, cada amostra foi dissolvida na fase móvel até atingir uma concentração de 1 mg.mL^{-1} . Após, esta foi filtrada em membrana de tamanho de poro equivalente a $0,45 \mu\text{m}$ eluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg.mL^{-1} .

3.5.3 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros BRUKER, modelos: a) Avance-DRX-400 MHz (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná); b) Avance III-500 MHz (Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia, Campus Samambaia); c) Avance III-400 MHz (Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos).

As análises foram realizadas a 50 ou 70 °C, com as amostras de polissacarídeos (~ 40 mg) solubilizadas em óxido de deutério (D_2O) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$). Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D_2O foram expressos em ppm (δ) relativos aos sinais de ^{13}C e ^1H da acetona em δ 30,20 e 2,22, respectivamente, ou de acordo com o padrão interno tetrametilsilano (TMS; $\delta_{\text{C/H}} = 0,0$) e aos sinais de $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ em δ 39,70 (^{13}C) e 2,40 (^1H), para as amostras solúveis no mesmo.

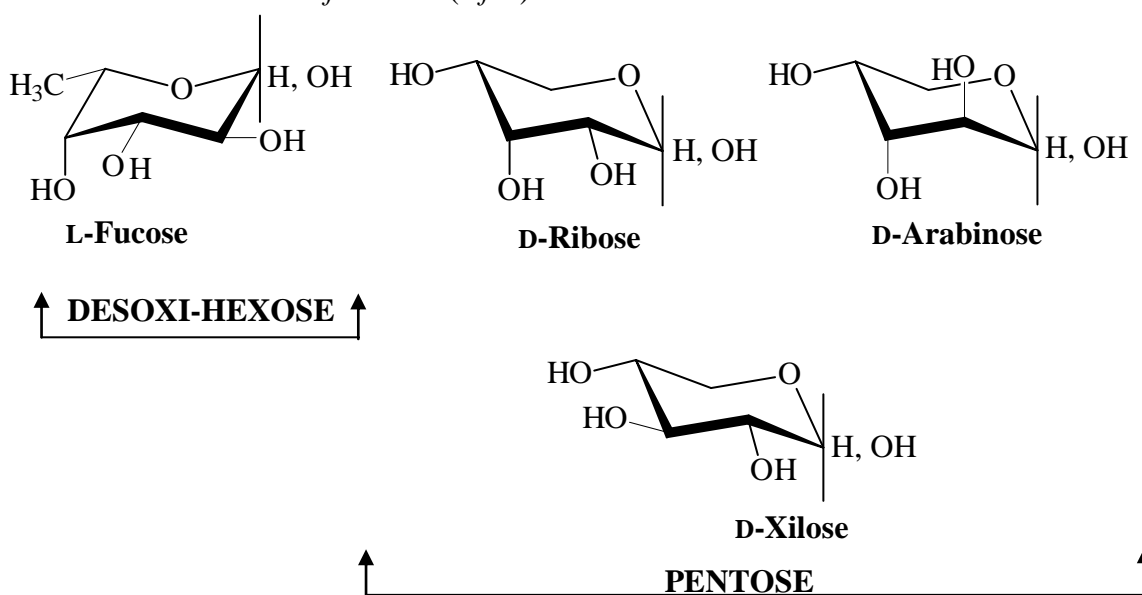
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os micélios de *G. frondosa*, obtidos por cultivos em substratos lignocelulósico, foram analisados quanto aos seus carboidratos em decorrência da diversidade estrutural e dos efeitos biológicos atribuídos a estas macromoléculas isoladas do basidioma e do cultivo líquido (exopolissacarídeos, biomassa micelial).

Com esta finalidade, os micélios foram liofilizados, obtendo um teor de 69,3% de umidade, e submetidos, sucessivamente, a extrações aquosas (10 e 96 °C) e alcalinas (KOH a 96 °C), resultando em extratos polissacarídicos brutos denominados CW-*GfM* (9,5 g), HW-*GfM* (2,5 g) e K-*GfM* (15,0 g), respectivamente (Figura 3.2, p. 35).

As frações CW-*GfM*, HW-*GfM* e K-*GfM* (1 mg), após hidrólise ácida, redução com borohidreto de sódio (NaBH₄) e acetilação, foram analisadas em CG-EM, a fim de determinar os constituintes monossacarídicos (Figura 4.1) dos polímeros presentes nestas frações. Como pode ser observado na Tabela 4.1 (p. 46), estas se apresentaram distintas quanto à composição, sugerindo a presença de diferentes polímeros em cada tipo de extração realizada. A fração CW-*GfM* apresentou, principalmente, fucose (Fuc, 12,6%), manose (Man: 27,0%), 3-*O*-Me-galactose (3-*O*-Me-Gal: 24,7%) (confirmado, por CG-EM, pela presença dos fragmentos 130 e 190 *m/z*, após hidrólise, redução com borohidreto de sódio deuterado e acetilação), galactose (Gal: 10,3%) e glucose (Glc: 17,9%), enquanto que a fração HW-*GfM*, mostrou majoritariamente manose (15,7%) e glucose (61,1%). Por outro lado, foi observado para a fração alcalina, K-*GfM*, altos teores de xilose (19,0%), manose (37,2%) e glucose (39,0%) (Tabela 4.1, p. 46; Figura 4.2, p. 47; Figura 4.3, p. 48).

FIGURA 4.1 – Estrutura dos monossacarídeos presentes nos extratos polissacarídeos obtidos do micélio de *G. frondosa* (*GfM*)



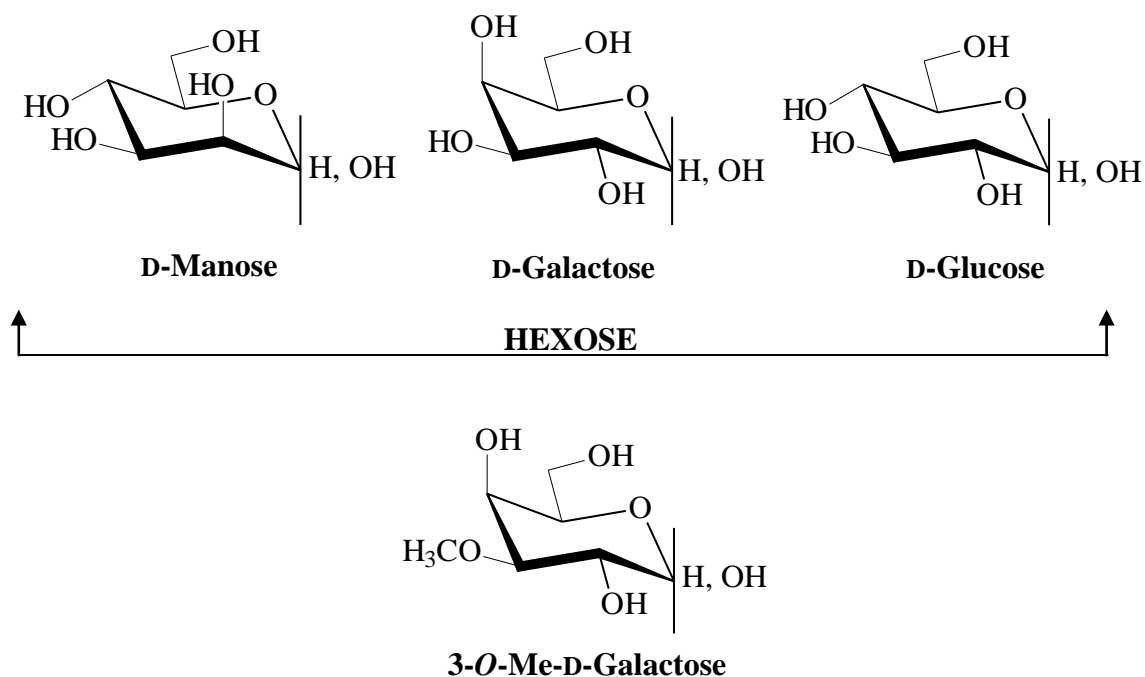


TABELA 4.1 – Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas brutas obtidas do micélio de *G. frondosa*

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (mol %) ^b					
		Fuc ^c	Xyl ^c	Man ^c	3-O-Me-Gal ^{c,d}	Gal ^c	Glc ^c
CW-GfM ^e	4,1	12,6	0,9	27,0	24,7	10,3	17,9
HW-GfM	1,1	6,4	2,6	15,7	8,5	5,8	61,1
K1-GfM	6,5	4,8	19,0	37,2	-	-	39,0

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (229,4 g)

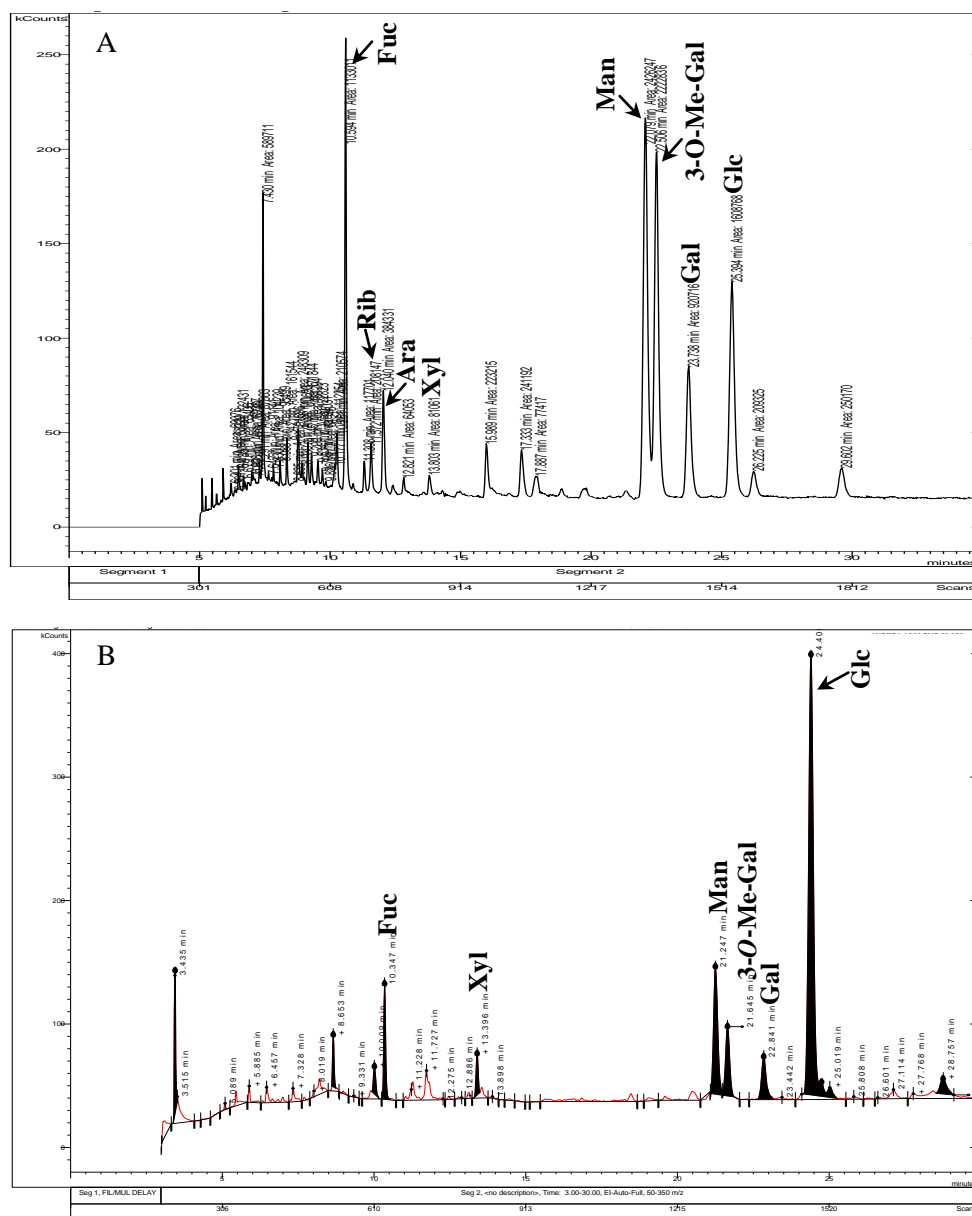
^b Analisado em CG-EM (coluna DB-225-MS) após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

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

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

^e Apresentou 2,3 % de ribose (Rib) e 4,3 % de arabinose (Ara).

FIGURA 4.2 - Cromatogramas dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM, para as frações: CW-GfM (A); HW-GfM (B) e K-GfM (C)



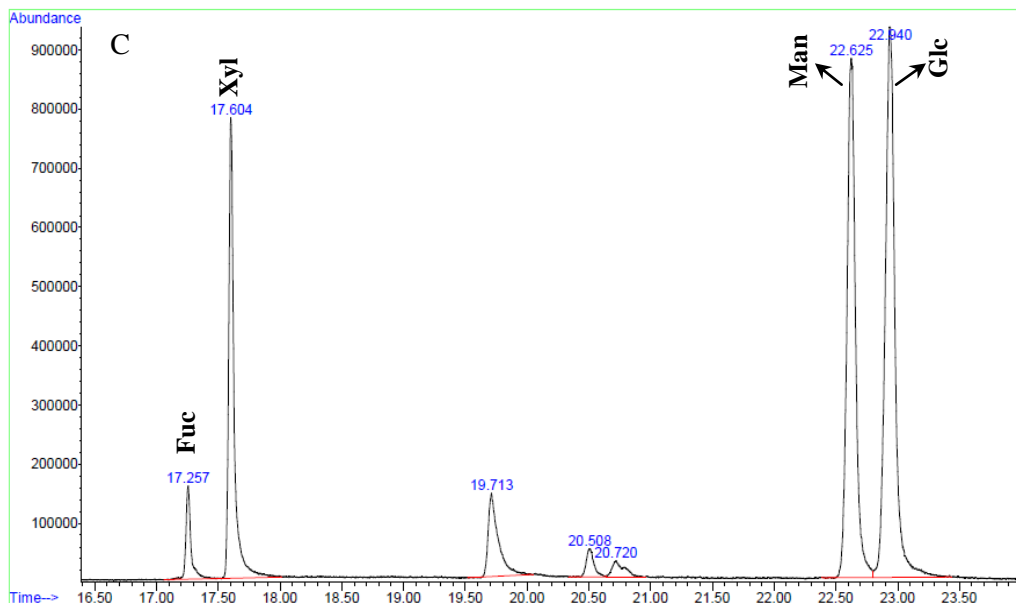


FIGURA 4.3 – Espectros e perfil de fragmentação dos acetatos de alditéis obtidos por CG-EM, para as frações: CW-*GfM* (A); HW-*GfM* (B) e K-*GfM* (C)

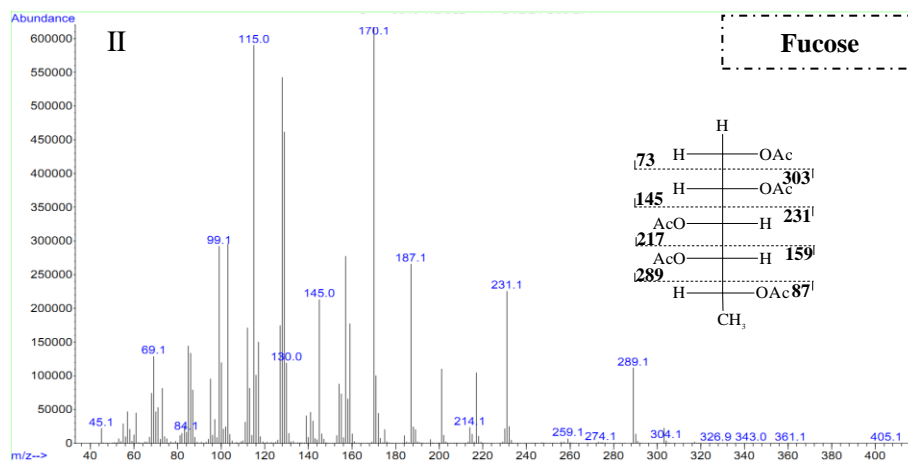
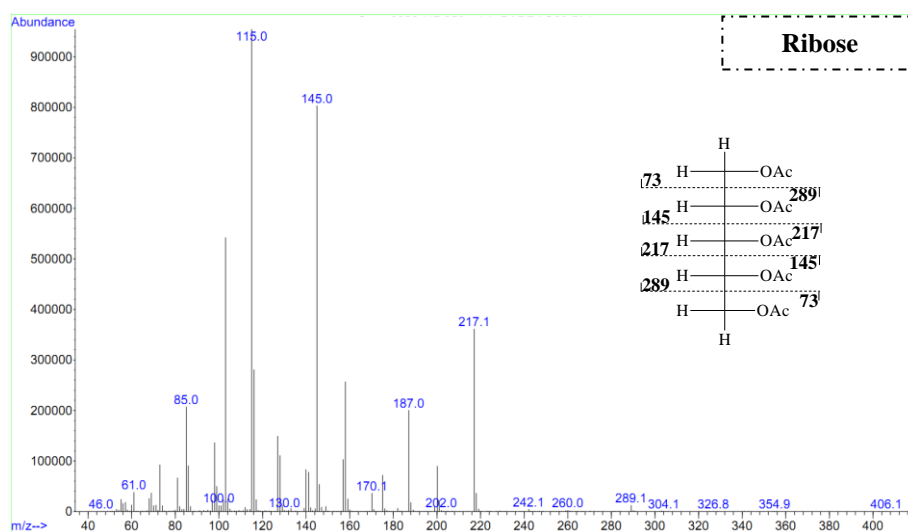


FIGURA 4.3 – Espectros e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM, para as frações: CW-GfM (A); HW-GfM (B) e K-GfM (C) (Continuação)

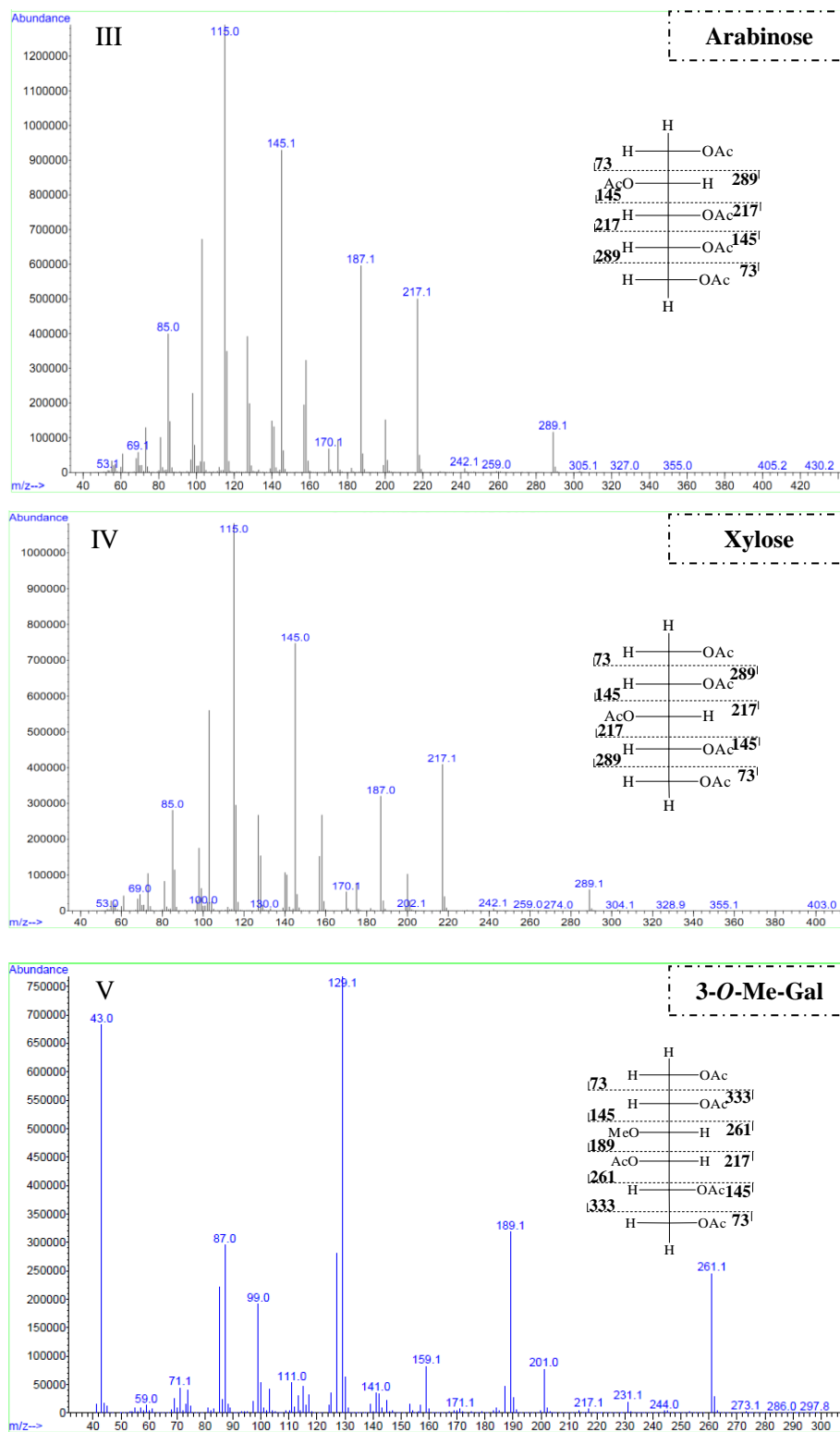
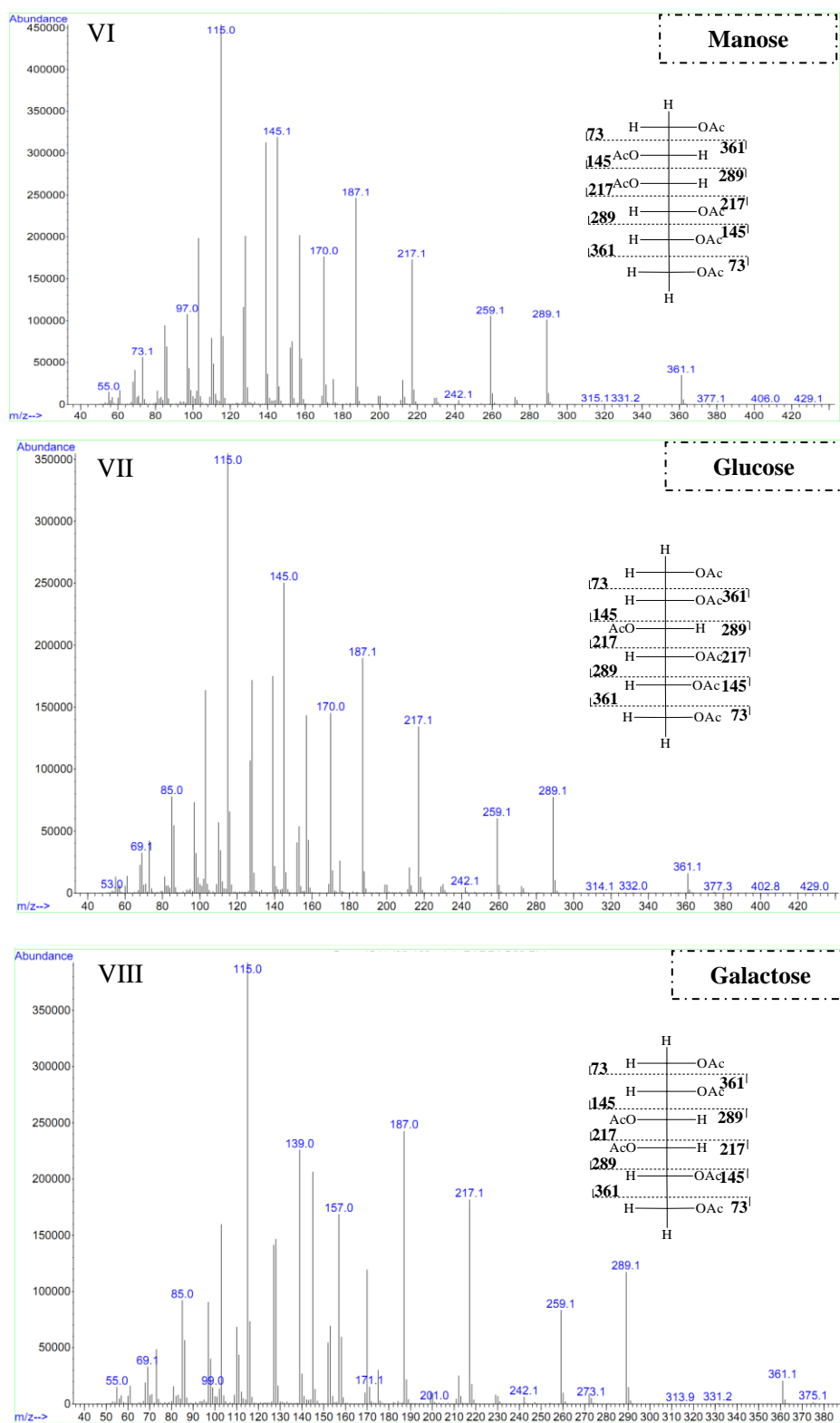


FIGURA 4.3 – Espectros e perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM, para as frações: CW-*GfM* (A); HW-*GfM* (B) e K-*GfM* (C) (Conclusão)

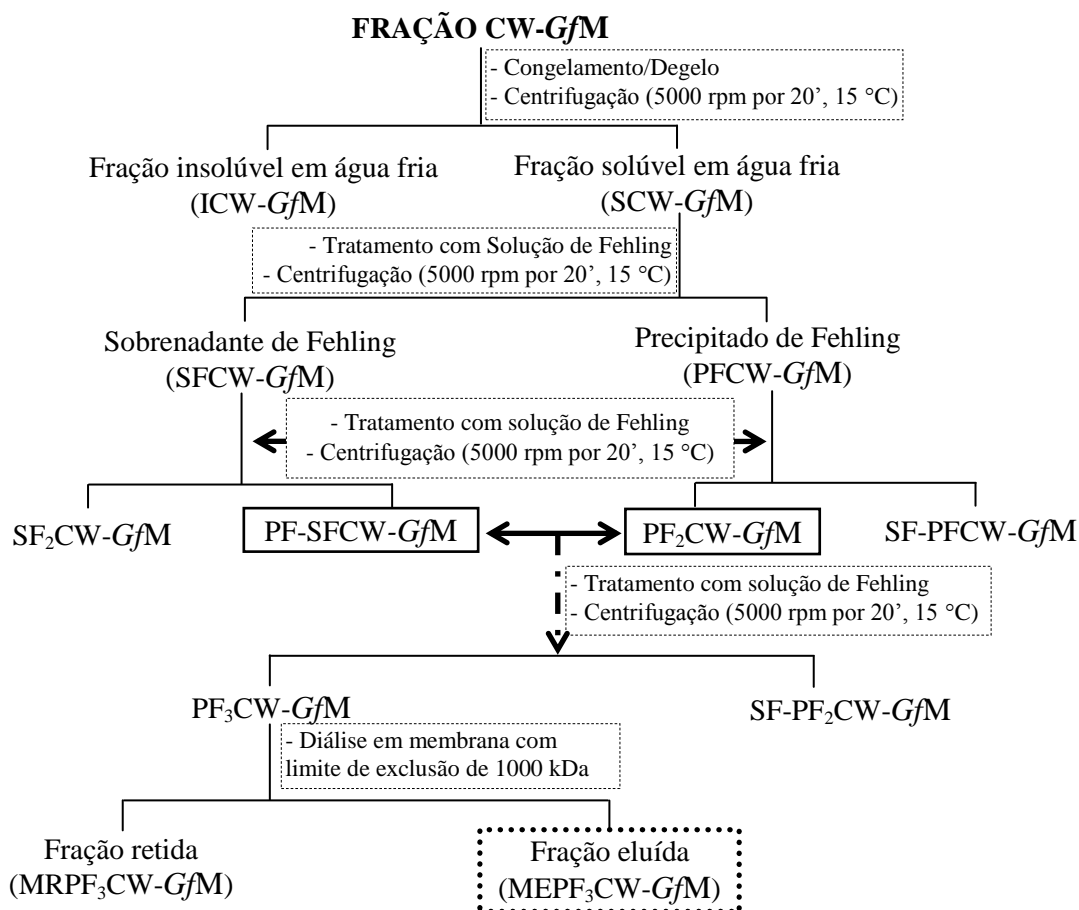


Devido ao maior rendimento e a composição das frações CW-*GfM* e K1-*GfM*, estas foram escolhidas para serem caracterizadas quimicamente. Para isto, estas foram submetidas a sucessivas técnicas de purificação (Figura 4.4, p. 51; Figura 4.14, p. 64, respectivamente).

4.1 - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO CW-*GfM*

Com a finalidade de separar os componentes solúveis em água fria dos insolúveis, a fração CW-*GfM* foi submetida ao processo de purificação por congelamento e degelo, originando um precipitado (ICW-*GfM*, 859 mg) e um sobrenadante (SCW-*GfM*, 8,50 g), os quais foram separados por centrifugação (Figura 4.4). Apesar de estas frações apresentarem características distintas, estas se mostraram similares em relação à composição, sendo compostas por fucose, manose, 3-*O*-Me-galactose, galactose e glucose (Tabela 4.2, p. 57).

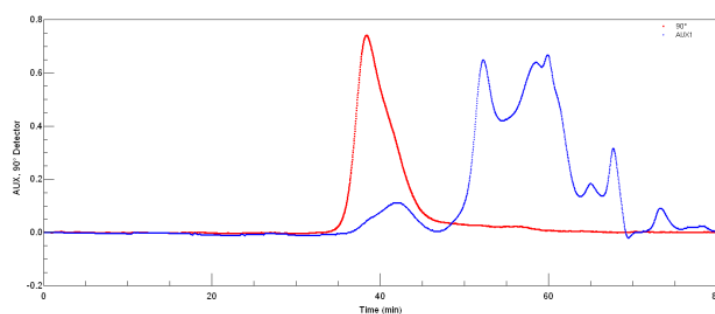
FIGURA 4.4 - Esquema da purificação dos polissacarídeos obtidos dos micélios de *G. frondosa*, por extração aquosa a frio (CW)



Para acompanhar a purificação das amostras solúveis em água foi utilizada a cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (*HPSEC-MALLS*), sendo atribuído um perfil homogêneo para àquelas que apresentarem único pico cromatográfico simétrico.

A fração *SCW-GfM* quando analisada por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.5), apresentou um cromatograma contendo várias bandas, sendo a mesma submetida ao tratamento com sulfato de cobre em meio alcalino (solução de Fehling) (JONES; STOODLEY, 1965), formando os complexos cúpricos solúvel (= sobrenadante de Fehling; *SFCW-GfM*, 3,45 g) e insolúvel (= precipitado de Fehling; *PFCW-GfM*, 384 mg) (Figura 4.4, p. 51), os quais foram separados por centrifugação e recuperados por diálises e deionização com resina catiônica.

FIGURA 4.5 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (*HPSEC-MALLS*), da fração *SCW-GfM*



Este procedimento foi repetido para ambas as frações, *PFCW-GfM* e *SFCW-GfM*, com finalidade de garantir a eficiência do processo, sendo obtidos para cada fração um precipitado [*PF₂CW-GfM* (196,3 mg) e *PF-SFCW-GfM* (645,6 mg), respectivamente] e um sobrenadante [*SF-PFCW-GfM* (94,7 mg) e *SF₂CW-GfM* (1,5 mg), respectivamente] (Figura 4.4, p. 51). As frações obtidas por este método mostraram os mesmos constituintes, porém, em diferentes proporções. Além disso, pode ser observado para a fração *SF₂CW-GfM* um maior teor de 3-*O*-Me-galactose e glucose comparado com a fração *PF₂CW-GfM* (Tabela 4.2, p. 57).

Cabe ressaltar que, embora haja uma similaridade na composição monossacarídica destas frações, é possível verificar através dos cromatogramas, obtidos por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.8, p. 56), e espectros de RMN de ¹³C (Figura 4.6 e 4.7)

diferenças entre as frações sobrenadantes e precipitados de Fehling, sugerindo que este procedimento mostrou ser eficaz no fracionamento destas biomoléculas.

Devido as semelhanças entre as frações PF₂CW-*GfM* (196,3 mg) e PF-SFCW-*GfM* (645,6 mg) observadas através das análises de composições monossacarídicas (Tabela 4.2, p. 57) e de *HPSEC-MALLS* (Figura 4.8, p. 56), estas foram reunidas e tratadas novamente com solução de Fehling, originando as frações SF-PF₂CW-*GfM* (281 mg) e PF₃CW-*GfM* (548,3 mg), as quais se mostraram heterogêneas por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.8, p. 56).

FIGURA 4.6 - Espectros de RMN de ¹³C dos sobrenadantes de Fehling [SFCW-*GfM* (A) e SF₂CW-*GfM* (B)] de *G. frondosa*, analisados em D₂O a 70 °C

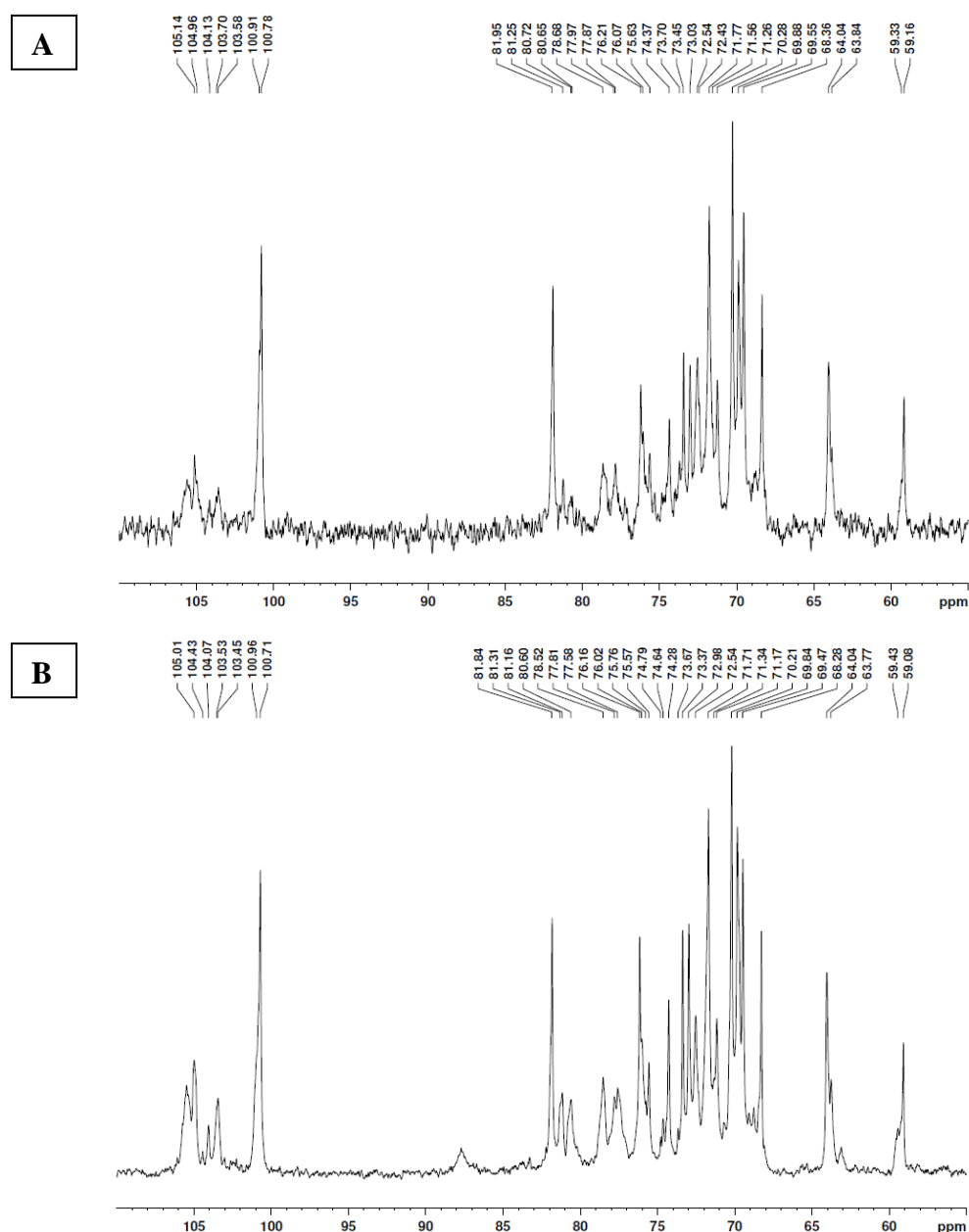
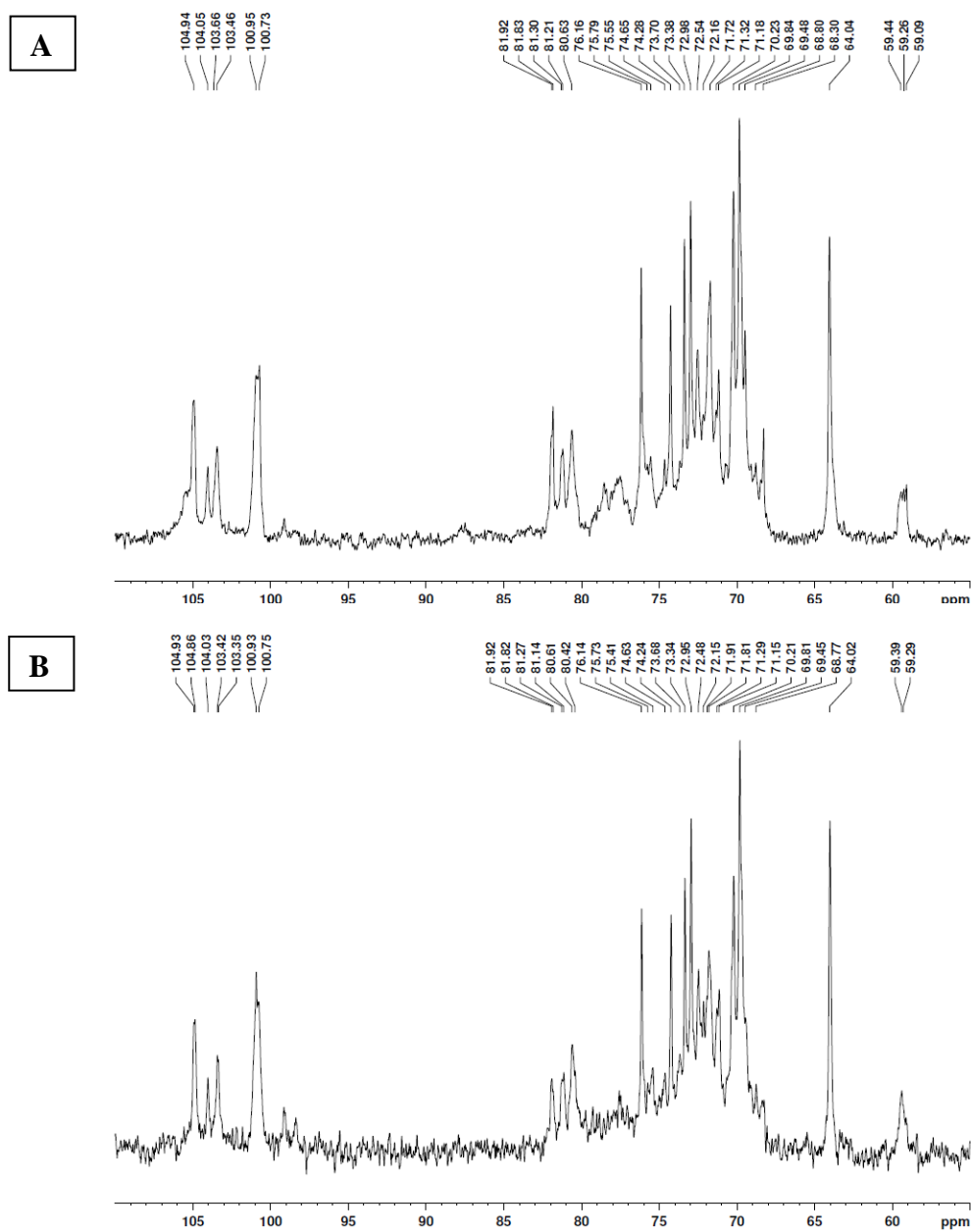


FIGURA 4.7 - Espectros de RMN de ^{13}C dos precipitados de Fehling [PFCW-*GfM* (A), PF₂CW-*GfM* (B), PF-SFCW-*GfM* (C), PF₃CW-*GfM* (D)] de *G. frondosa*, analisados em D₂O a 70°C



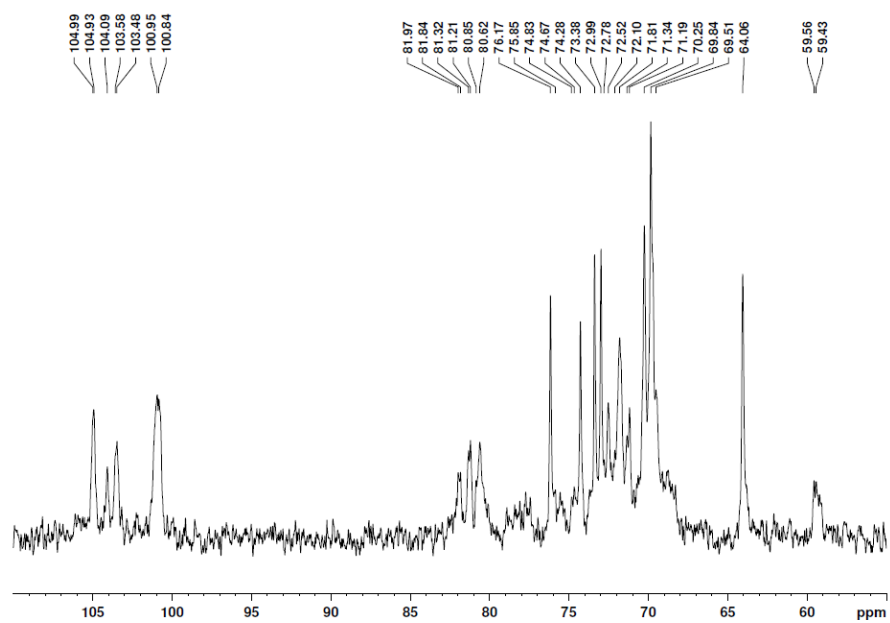
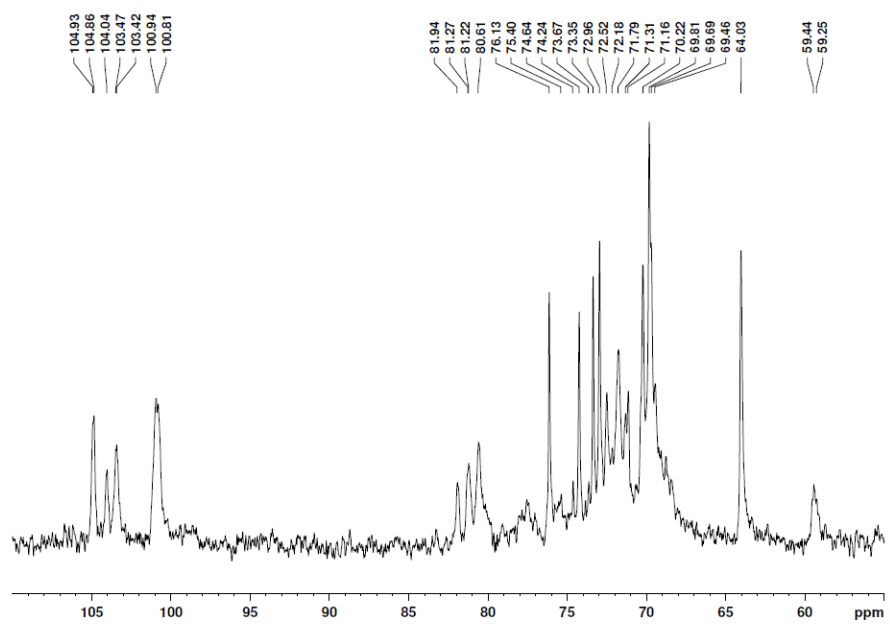
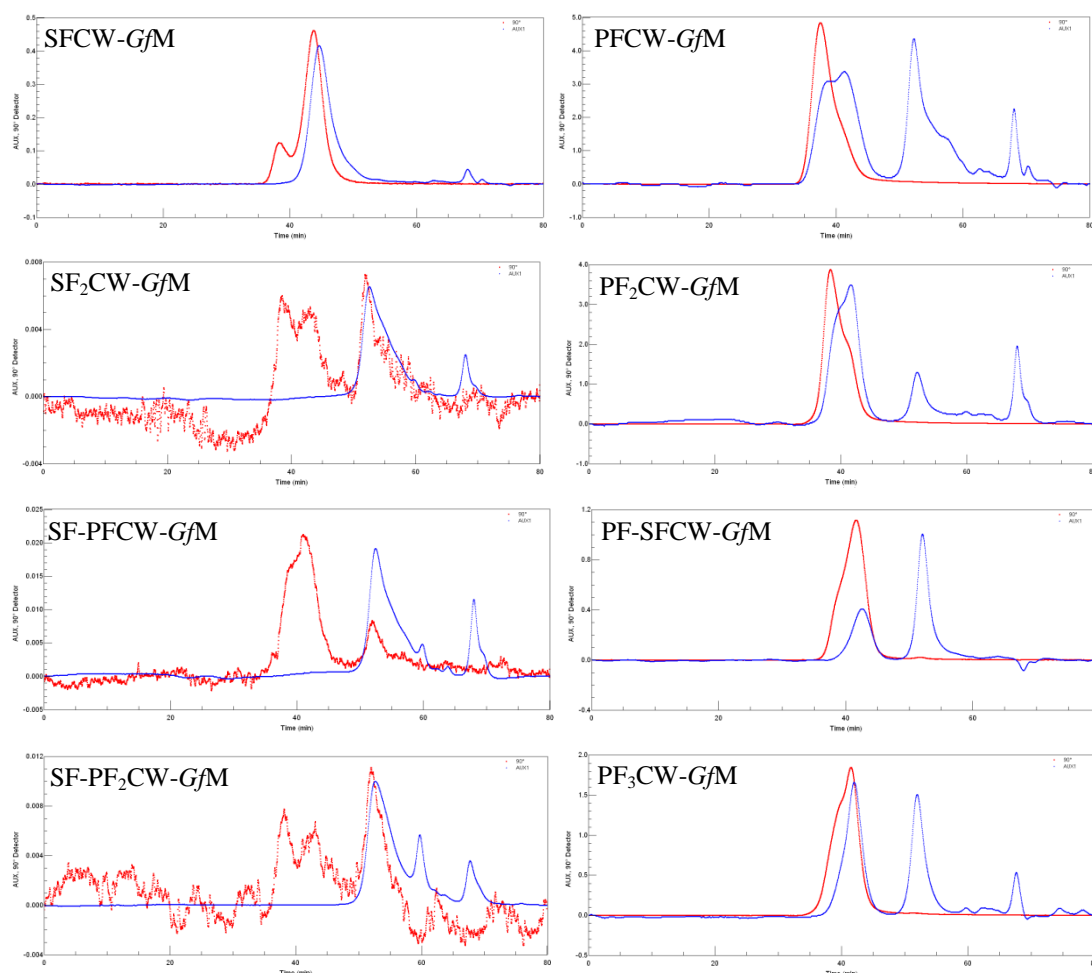
C**D**

FIGURA 4.8 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: —) e índice de refração (IR: - -) (*HPSEC-MALLS*), das frações *SFCW-GfM*, *PFCW-GfM*, *SF₂CW-GfM*, *PF₂CW-GfM*, *SF-PFCW-GfM*, *PF-SFCW-GfM*, *SF-PF₂CW-GfM*, *PF₃CW-GfM*



Com objetivo de purificar a fração *PF₃CW-GfM*, esta foi submetida à diálise fechada utilizando-se membranas com limite de exclusão de 1000 kDa, separando-a em uma fração retida (*MRPF₃CW-GfM*, 318,4 mg) e outra eluída (*MEPF₃CW-GfM*, 200 mg). Deste processo somente a fração eluída mostrou um único pico simétrico por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.9, p. 57), no entanto ambas não apresentaram diferenças significativas nas composições monossacarídicas, sendo estas constituídas por fucose, manose, galactose e 3-*O*-metil-galactose (Tabela 4.2, p. 57), sugerindo a presença de fucomanogalactanas parcialmente metiladas (FMG).

TABELA 4.2 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações polissacarídicas obtidas do micélio de *G. frondosa*

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (mol %) ^b				
		Fuc ^c	Man ^c	3- <i>O</i> -Me-Gal ^{c,d}	Gal ^c	Glc ^c
CW- <i>GfM</i>	4,10	12,6	27,0	24,7	10,3	17,9
ICW- <i>GfM</i>	0,40	12,3	26,8	10,9	20,2	16,1
SCW- <i>GfM</i>	3,70	11,2	30,0	22,6	13,8	18,7
SFCW- <i>GfM</i>	1,50	14,4	22,6	33,1	14,6	13,0
SF ₂ CW- <i>GfM</i>	0,65	11,3	19,7	31,3	12,8	22,3
PF-SFCW- <i>GfM</i>	0,28	14,2	28,5	31,1	21,6	3,0
PFCW- <i>GfM</i>	0,17	17,1	27,5	23,2	21,7	6,2
PF ₂ CW- <i>GfM</i>	0,09	13,0	28,7	22,9	30,6	2,3
SF-PFCW- <i>GfM</i>	0,04	12,2	20,2	31,3	13,5	18,9
PF ₃ CW- <i>GfM</i>	0,24	22,8	26,1	24,3	26,9	-
SF-PF ₂ CW- <i>GfM</i>	0,12	17,0	28,9	30,2	14,7	9,7
MRPF ₃ CW- <i>GfM</i>	0,14	16,4	26,6	19,3	37,7	-
MEPF ₃ CW- <i>GfM</i>	0,09	27,1	27,7	25,0	20,2	-

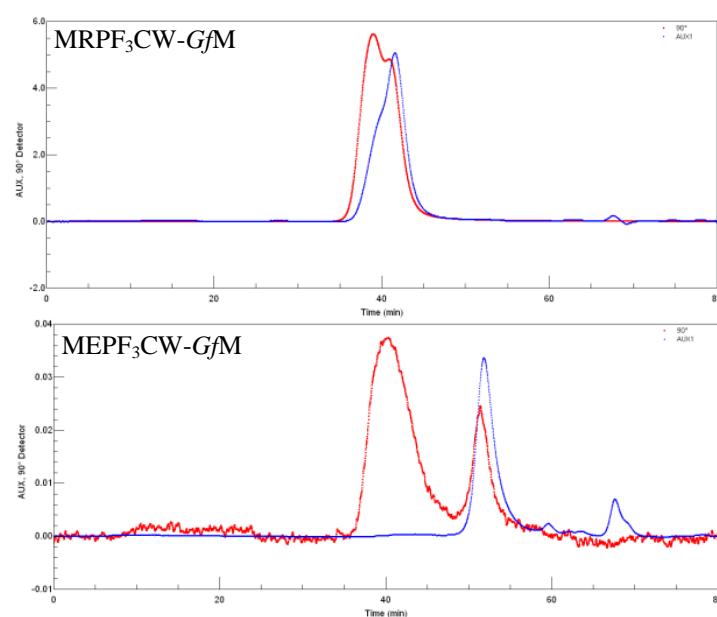
^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (229,4 g)

^b Analisado em CG-EM (coluna DB-225-MS) após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

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

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

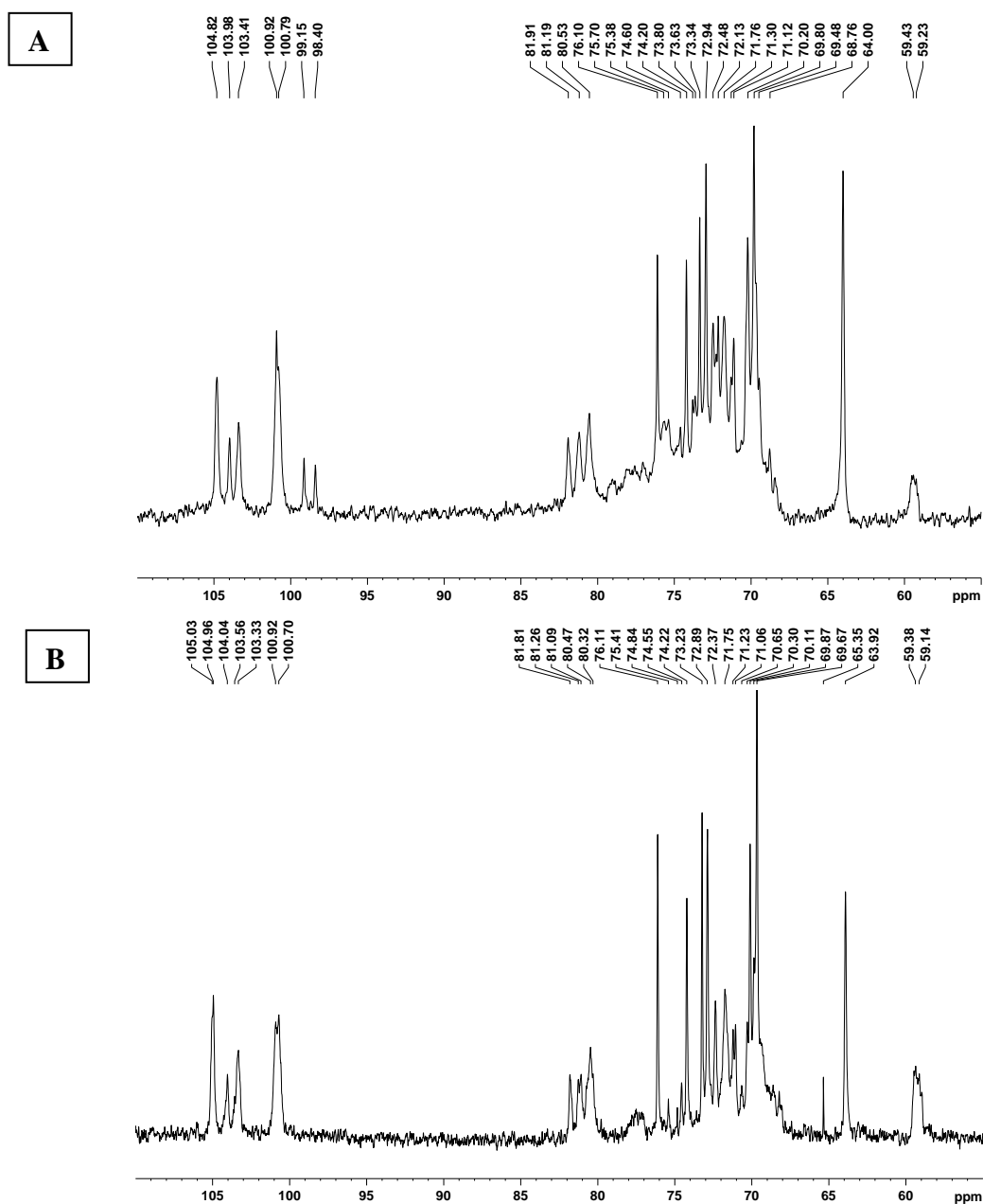
FIGURA 4.9 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: —) e índice de refração (IR: - -) (HPSEC-MALLS), das frações MRPF₃CW-*GfM* e MEPF₃CW-*GfM*



O espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.10, p. 58) desta heterogalactana apresentou sinais de C-1 correspondentes aos terminais não redutores de Man_p (δ

105,03), às unidades de Fucp 3-*O*-substituídas (δ 104,04) e às unidades de 3-*O*-Me- α -Galp e α -Galp 6-*O*- e 2,6-di-*O*-substituídas (δ 100,7 e δ 100,9) da cadeia principal. As ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 2) e (1 \rightarrow 6) das unidades de 3-*O*-Me- α -Galp e α -Galp da cadeia principal foi sugerida pela presença dos sinais em δ 80,5, δ 80,3 e δ 70,1, δ 69,7, respectivamente. Os sinais em δ 59,1, δ 59,4 e δ 81,8 (C-3 substituído) confirmam a presença do grupo -CH₃ presente na posição O-3 das unidades de 3-*O*-Me- α -Galp. Os sinais de C-3 substituídos e de C-6 da α -Fucp foram observados em δ 81,3 e δ 18,4, respectivamente.

FIGURA 4.10 - Espectros de RMN de ¹³C das frações MEPF₃CW-*GfM* (A) e MRPF₃CW-*GfM* (B) de *G. frondosa*, analisadas em D₂O a 70 °C



Com o objetivo de obter informações sobre os tipos de ligações glicosídicas deste polímero, uma alíquota da fração MEPF₃CW-GfM (FMG-GfM) foi submetida à metilação (CIUCANU, KEREK, 1984), a qual confirmou os padrões de substituição dos monossacarídeos observados nas análises espectroscópicas. Os derivados parcialmente *O*-metilados evidenciados para são correspondentes aos terminais não redutores de Manp (2,3,4,6-Me₄-Man) e às unidades de α -Galp e 3-*O*-Me- α -Galp da cadeia principal 6-*O*- (2,3,4-Me₃-Gal) e 2,6-di-*O*-substituídas (3,4-Me₂-Gal). A presença de unidades de Fucp 3-*O*-substituídas foi confirmada pelo derivado 2,4-Me₂-Fuc (Figura 4.11, p. 59; Figura 4.12, p. 60; Tabela 4.3, p. 62).

FIGURA 4.11 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração MEPF₃CW-GfM (FMG-GfM) após derivatização química (metilação)

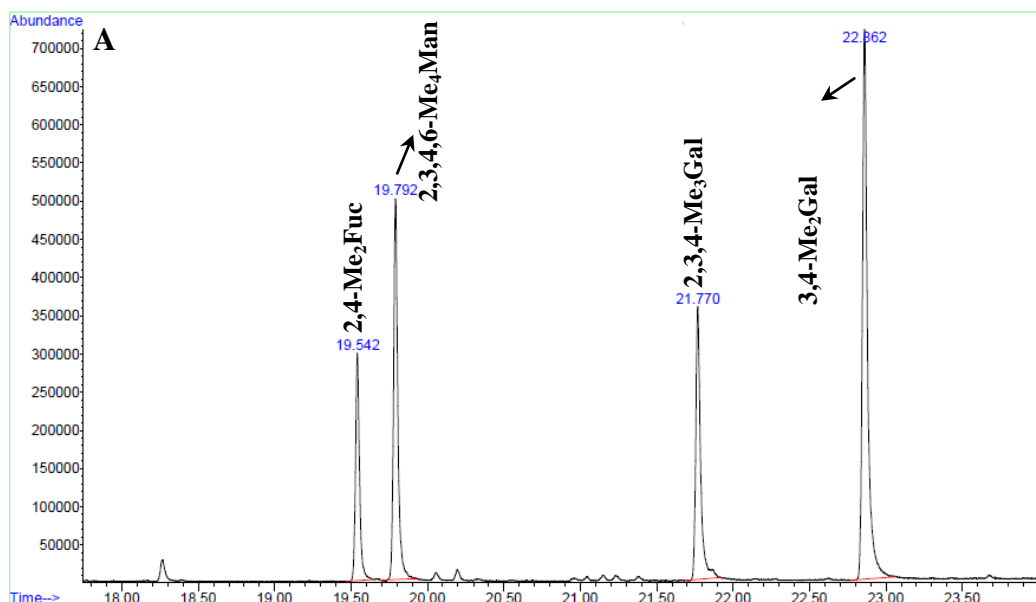


FIGURA 4.12 - Espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (I: 2,4-Me₂Fuc; II: 2,3,4,6-Me₄Man; III: 2,3,4-Me₃Gal; IV: 3,4-Me₂Gal) obtidos após derivatização química (metilação) da fração MEPF₃CW-G_fM (FMG-G_fM) (Conclusão)

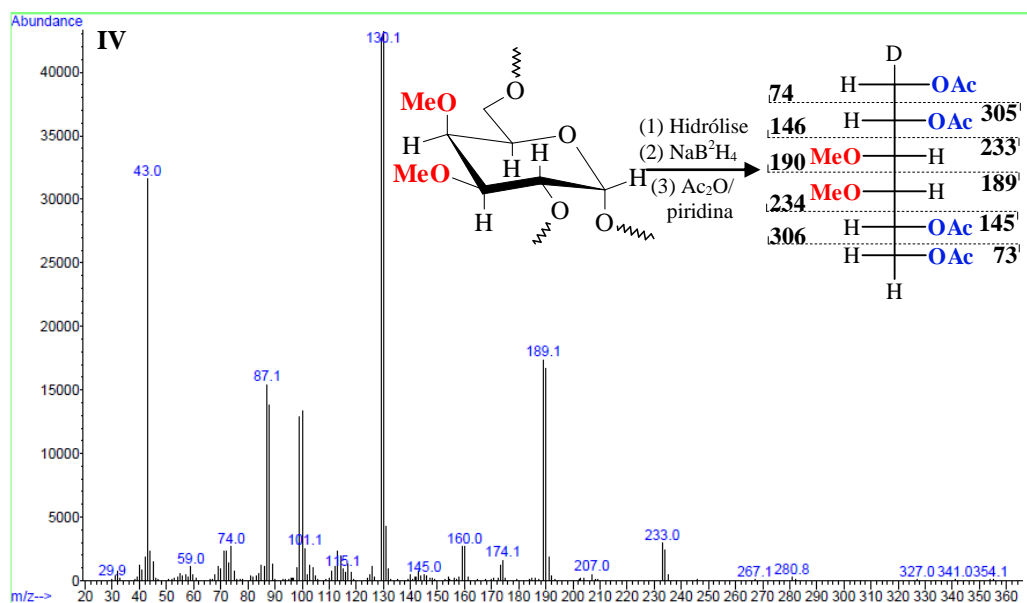
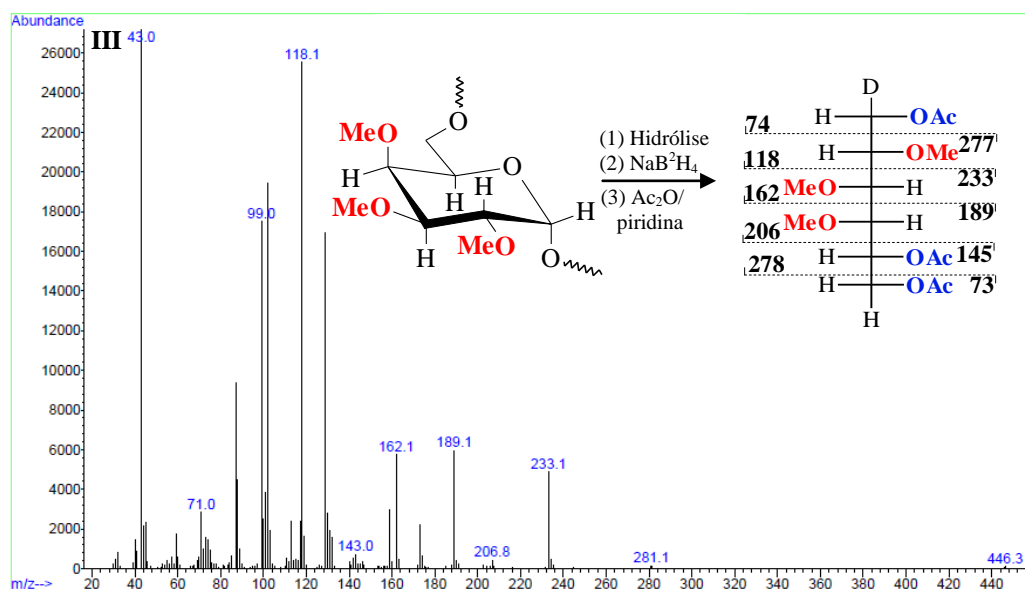


TABELA 4.3 - Análise por metilação da fucomanogalactana (FMG-*GfM*) isolada do micélio de *G. frondosa*

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^(a)	Tipo de ligação ^(b)	T _R ^(c)	mol(%)
			FMG ^(a)
2,4-Me ₂ Fuc	→3)-Fucp-(1→	19.542	13,7
2,3,4,6-Me ₄ Man	Manp-(1→	19.792	24,3
2,3,4,6-Me ₄ Gal	Galp-(1→	20.053	-
2,3,4-Me ₃ Man	→6)-Manp-(1→	21.380	-
2,3,4-Me ₃ Gal	→6)-Galp-(1→	21.770	19,7
3,4-Me ₂ Gal	2,6→)-Galp-(1→	22.862	42,2

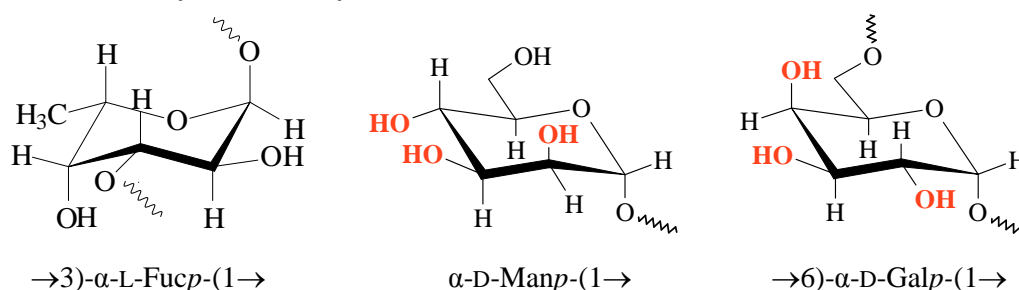
^a Analisado em CG-EM (coluna HP5) após metilação, hidrólise ácida total (ácido fórmico 45% por 10h), redução (NaB²H₄) e acetilação.

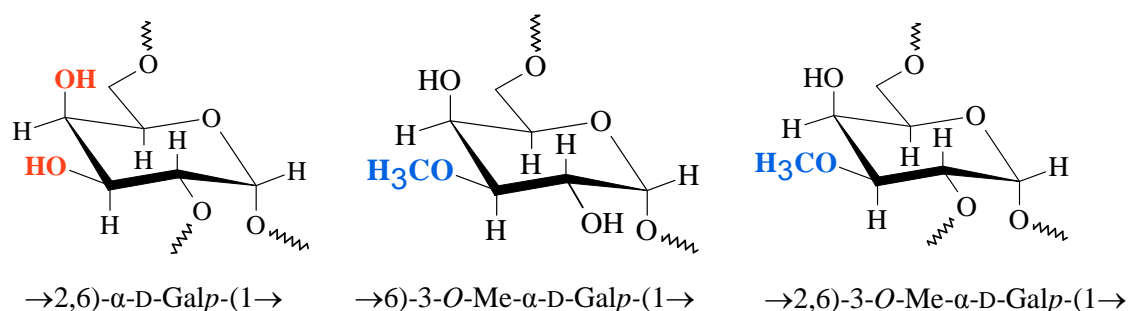
^b Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilado.

^c Tempo de retenção (min).

Tendo em vista que a cadeia principal deste polímero é constituída por Galp e 3-*O*-Me-Galp 6-*O*-substituídas e que estas podem apresentar ramificações em *O*-2, as quais não podem ser distinguidas através da metilação com CH₃I não deuterado, uma alíquota desta fração (MEPF₃CW-*GfM*) foi submetida à oxidação com periodato de sódio, seguida de redução com borohidreto de sódio (Figura 3.5, p. 41). Este procedimento irá degradar somente os monossacarídeos contendo hidroxilas vicinais livres (Figura 4.13), das unidades de Galp e Manp presentes neste polímero, os quais não foram observados por CG-EM após hidrólise ácida total de uma alíquota do material oxidado (Ox-FMG-*GfM*). Deste modo, somente as unidades resistentes à oxidação, como Fucp (46,7%) e 3-*O*-Me-Galp (53,3%), foram detectadas.

FIGURA 4.13 - Representação dos constituintes monossacarídeos da fração MEPF₃CW-*GfM* (FMG-*GfM*)^a





^a Em destaque a 3-*O*-Me-galactose e os monossacarídeos com hidroxilas vicinais livres que são degradados na oxidação com periodato de sódio.

Uma alíquota (~ 8 mg) da fração oxidada (Ox-FMG-*GfM*) foi submetida à metilação para verificar, principalmente, se as unidades de 3-*O*-Me-Galp continham substituintes em O-2. Os acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados obtidos após derivatização química (metilação, hidrólise, redução com borohidreto de sódio e acetilação, sucessivamente) e analisados por CG-EM, revelaram que as unidades de 3-*O*-Me-Galp estão 6-*O*- e 2-6-di-*O*- substituídas em uma proporção de 1:2,5, respectivamente.

A FMG-*GfM* possui uma massa molar de 175×10^3 g/mol e uma cadeia principal constituída por 3-*O*-Me- α -Galp e α -Galp ligadas (1 \rightarrow 6), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2, principalmente, por terminais não redutores de Manp e dissacarídeo 3-*O*-D-manopiranosil-L-fucopiranosil, sendo que a proporção de Me-Gal não substituída: Me-Gal substituída neste polímero é de aproximadamente 1:2,5.

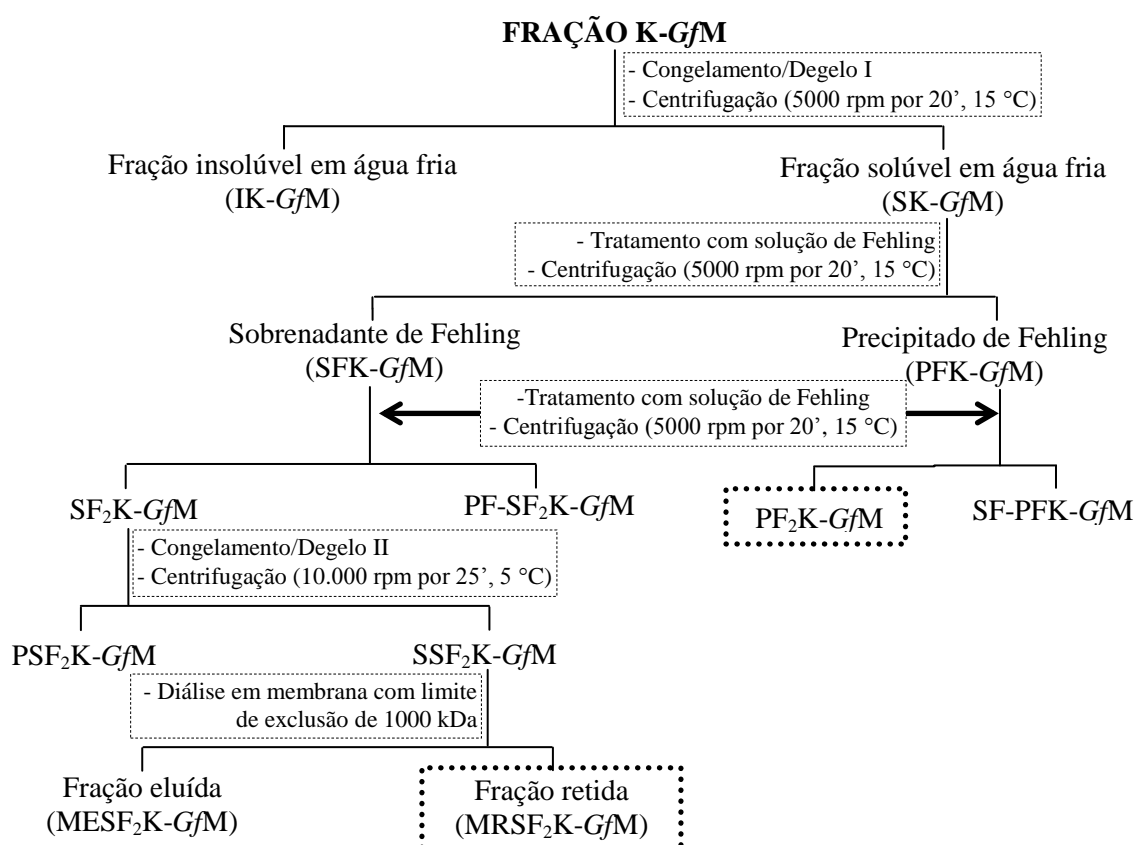
Foi isolado dos basidiomas deste fungo heterogalactanas similares à encontrada neste trabalho, as quais foram denominadas de QEPF-*Gf* (OLIVEIRA, 2013) e GFPW (WANG et al., 2014). A fração QEPF-*Gf* apresentou 3-*O*-Me-Galp e Galp em uma relação molar de 1:9 diferente de FMG-*GfM* que foi de 1,2:1, respectivamente. Por outro lado, GFPW não apresentou o derivado 3-*O*-Me-Galp em sua estrutura, ou seja, sua cadeia principal é constituída apenas por unidades de α -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 6). O derivado parcialmente metilado (3-*O*-Me-Galp) têm sido encontrado em diferentes percentuais, principalmente, nas fucogalactanas e manogalactanas isoladas de basidiomicetos, sendo observado uma relação molar 1:1 de 3-*O*-Me-Galp e Galp apenas para a manogalactana isolada de *Pleurotus geesteranus* (ZHANG et al., 2013) (Tabela 1.2, p. 13).

4.2 - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO K-*GfM*

Conforme discutido anteriormente, o extrato alcalino (15,0 g) (Figura 3.2, p. 35), denominado fração K, mostrou-se distinto das frações CW e HW quanto aos constituintes monossacarídeos, sendo composto por Fuc (4,8 %), Xyl (19,0%), Man (37,2 %) e Glc (39,0 %) (Tabela 4.4, p. 65). Semelhante à fração CW-*GfM*, este extrato foi primeiramente fracionado pelo método de congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984), originando, após centrifugação, uma fração solúvel (SK-*GfM*; 9,2 g) e outra insolúvel em água fria (IK-*GfM*; 5,7 g) (Figura 4.14).

Além da diferença quanto à solubilidade, estas frações apresentaram composições monossacarídicas distintas, sendo a fração IK-*GfM* composta principalmente por Glc (85,6%) e a SK-*GfM* por Fuc: Xyl: Man: Glc na proporção de 8,3: 15,7: 33,4: 42,7 (Tabela 4.4, p. 65).

FIGURA 4.14 - Esquema da purificação dos polissacarídeos obtidos dos micélios de *G. frondosa*, por extração alcalina (K)



A fração SK-*GfM* (9,2 g) apresentou um cromatograma, obtido por *HPSEC-MALLS*, contendo várias bandas (Figura 4.15, p. 66). Devido à heterogeneidade desta fração, esta foi submetida à precipitação com solução de Fehling, separando-a em um sobrenadante (SFK-*GfM*; 3,9 g) e um precipitado de Fehling (PFK-*GfM*; 1,3 g) (Figura 4.14, p. 64). Este procedimento foi repetido, separadamente, para ambas frações (PFK-*GfM* e SFK-*GfM*), o qual novamente forneceu os complexos cúpricos insolúveis [PF₂K-*GfM* (635,1 mg) e PF-SFK-*GfM* (869,6 mg), respectivamente] e solúveis [SF-PFK-*GfM* (609,2 mg) e SF₂K-*GfM* (2,0 g), respectivamente] (Figura 4.14, p. 64).

As análises de composição monossacarídica (Tabela 4.4), *HPSEC-MALLS* (Figura 4.15, p. 66) dos sobrenadantes de Fehling (SF₂K-*GfM* e SF-PFK-*GfM*) mostraram-se distintos dos precipitados (PF₂K-*GfM* e PF-SFK-*GfM*), evidenciando a presença de diferentes polímeros entre estas frações.

TABELA 4.4 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações obtidas do micélio de *G. frondosa*

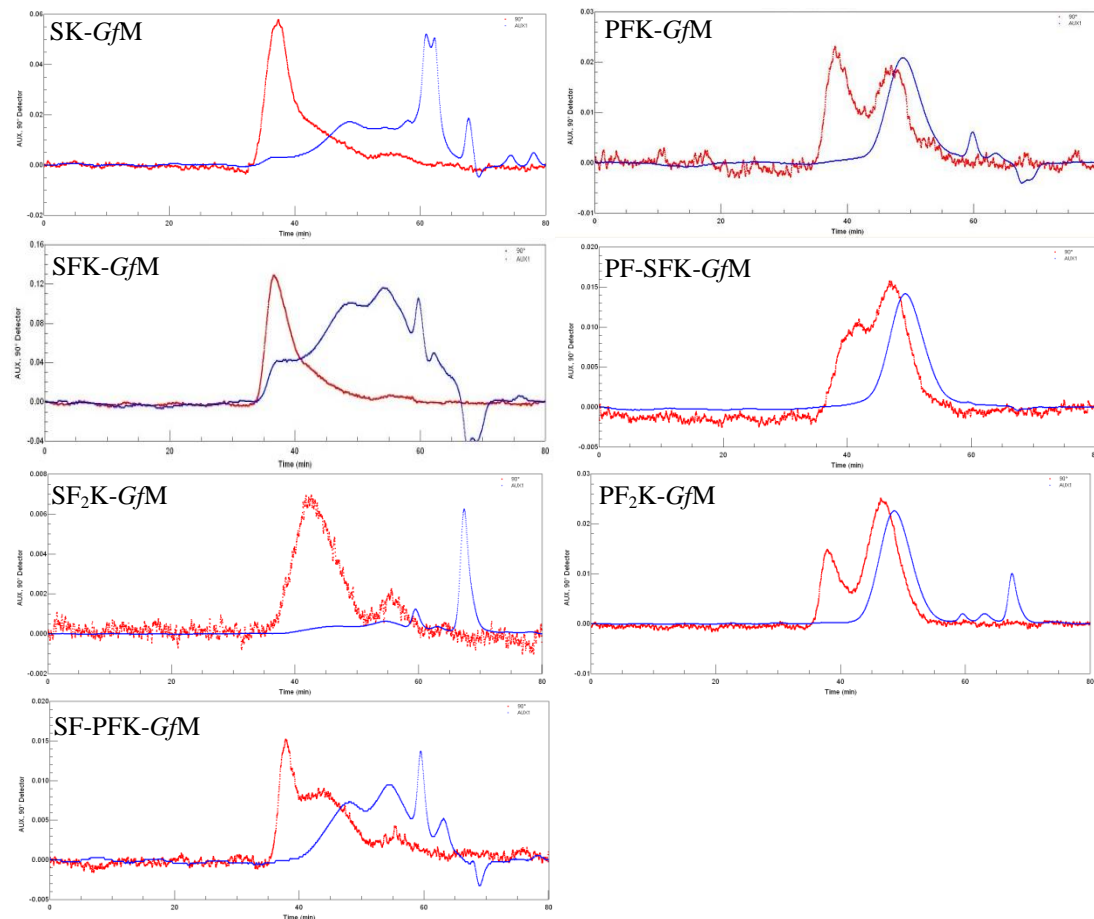
FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (mol %) ^b			
		Fuc ^c	Xyl ^c	Man ^c	Glc ^c
K- <i>GfM</i>	6,54	4,8	19,0	37,2	39,0
IK- <i>GfM</i>	2,47	-	4,6	10,0	85,6
SK- <i>GfM</i>	4,03	8,3	15,7	33,4	42,7
PFK- <i>GfM</i>	0,56	12,0	30,9	51,2	6,0
PF ₂ K- <i>GfM</i>	0,28	15,8	30,2	53,9	-
SF-PFK- <i>GfM</i>	0,27	-	18,4	38,6	43,0
SFK- <i>GfM</i>	1,71	2,3	14,0	34,6	49,2
SF ₂ K- <i>GfM</i>	0,87	-	10,9	21,0	68,1
PF-SFK- <i>GfM</i>	0,38	5,3	39,5	45,0	10,2

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (229,4 g)

^b Analisado em CG-EM (coluna DB225) após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^c Fuc: fucose; Xyl: xilose; Man: manose e Glc: glucose.

FIGURA 4.15 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: —) e índice de refração (IR: - -) (*HPSEC-MALLS*), das frações *SK-GfM*, *PFK-GfM*, *SFK-GfM*, *PF-SFK-GfM*, *SF₂K-GfM*, *PF₂K-GfM*, *SF-PFK-GfM*



4.2.1 – Caracterização Estrutural do Polissacarídeo da Fração *PF₂K-GfM*

A fração *PF₂K-GfM*, constituída por fucose (15,8 %), xilose (30,2 %) e manose (53,9 %) (Tabela 4.4, p. 65), mostrou-se homogênea por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.15, p. 66), possuindo uma $M_w = 202 \times 10^3$ g/mol.

A fim de determinar os tipos de ligações glicosídicas deste heteropolissacarídeo, uma alíquota desta fração (~ 8 mg) foi metilada (CIUCANU, KEREK, 1984) e analisada por CG-EM após hidrólise ácida total, redução com NaB^2H_4 e acetilação. Os resultados obtidos sugeriram a presença de uma fucoxilomanana (denominada *FXM-GfM*) altamente ramificada, devido aos teores elevados de terminais não redutores de *Xylp* (2,3,4-Me₃Xyl, 16,5%), *Fucp* (2,3,4-Me₃Fuc, 13,9%) e *Manp* (2,3,4,6-Me₄Man, 12,0%), os quais estão de acordo com os elevados percentuais de

Manp 3,4-di-*O*-substituída (2,6-Me₂Man, 34,5%) da cadeia principal. Também foram observadas unidades de Xylp 3-*O*- (2,4-Me₂Xyl, 2,0%), 4-*O*- (2,3-Me₂Xyl, 13,1%) e 2,3-di-*O*- (4-MeXyl, 8,0%) substituídas (Figura 4.16; Figura 4.17; Tabela 4.5, p. 71).

FIGURA 4.16 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração (A) PF₂K-*GfM* (FXM-*GfM*) após derivatização química (metilação)

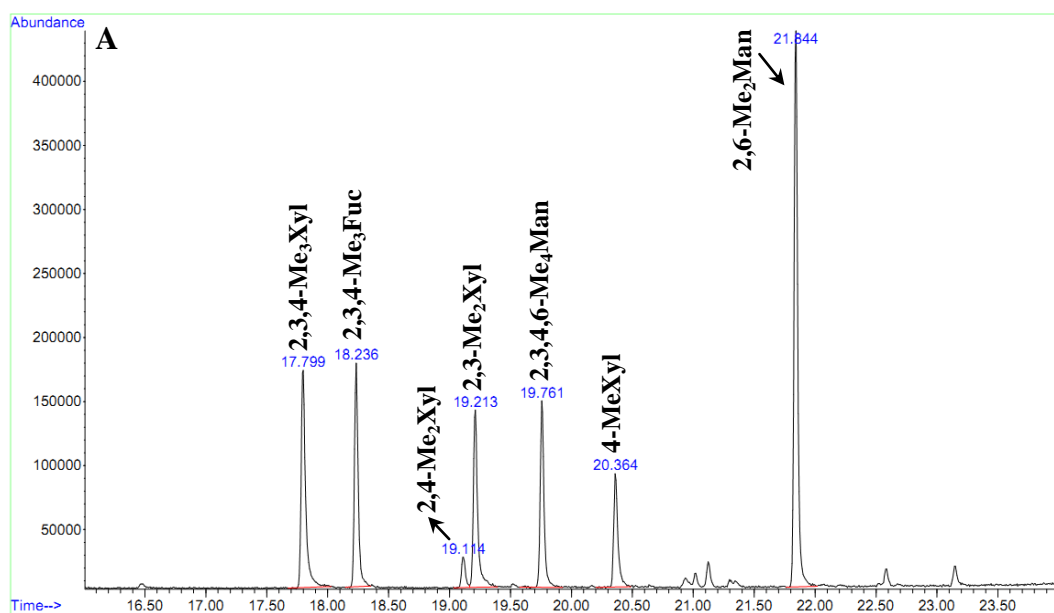


FIGURA 4.17 - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃Xyl; A₂: 2,3,4-Me₃Fuc; A₃: 2,4-Me₂Xyl; A₄: 2,3-Me₂Xyl; A₅: 2,3,4,6-Me₄Man; A₆: 4-MeXyl; A₇: 2,6-Me₂Man) obtidos após derivatização química (metilação) da fração PF₂K-*GfM* (FXM-*GfM*)

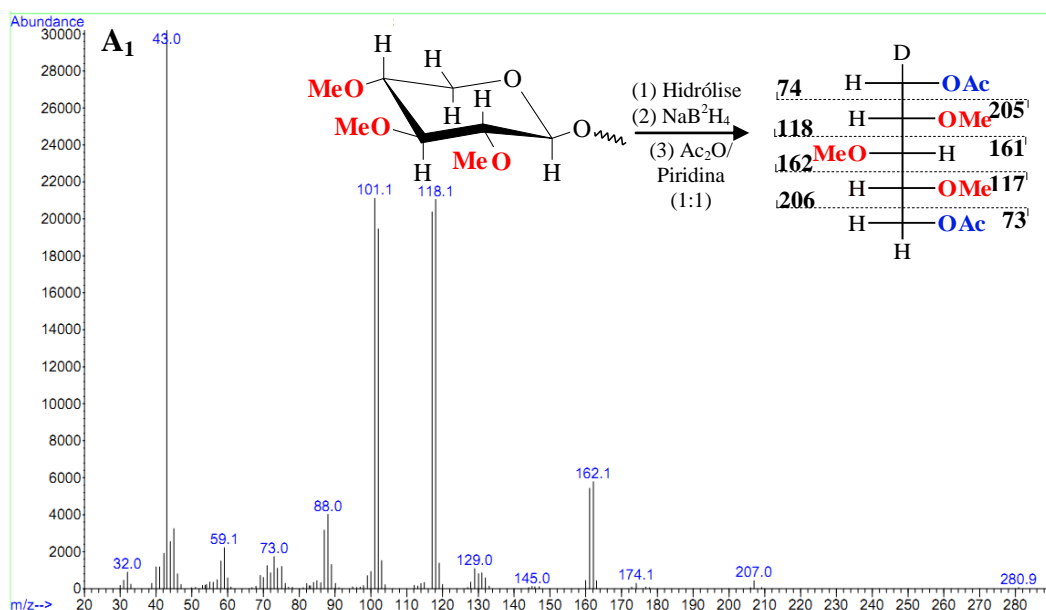


FIGURA 4.17 - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃Xyl; A₂: 2,3,4-Me₃Fuc; A₃: 2,4-Me₂Xyl; A₄: 2,3-Me₂Xyl; A₅: 2,3,4,6-Me₄Man; A₆: 4-MeXyl; A₇: 2,6-Me₂Man) obtidos após derivatização química (metilação) da fração PF₂K-*GfM* (FXM-*GfM*) (Continuação)

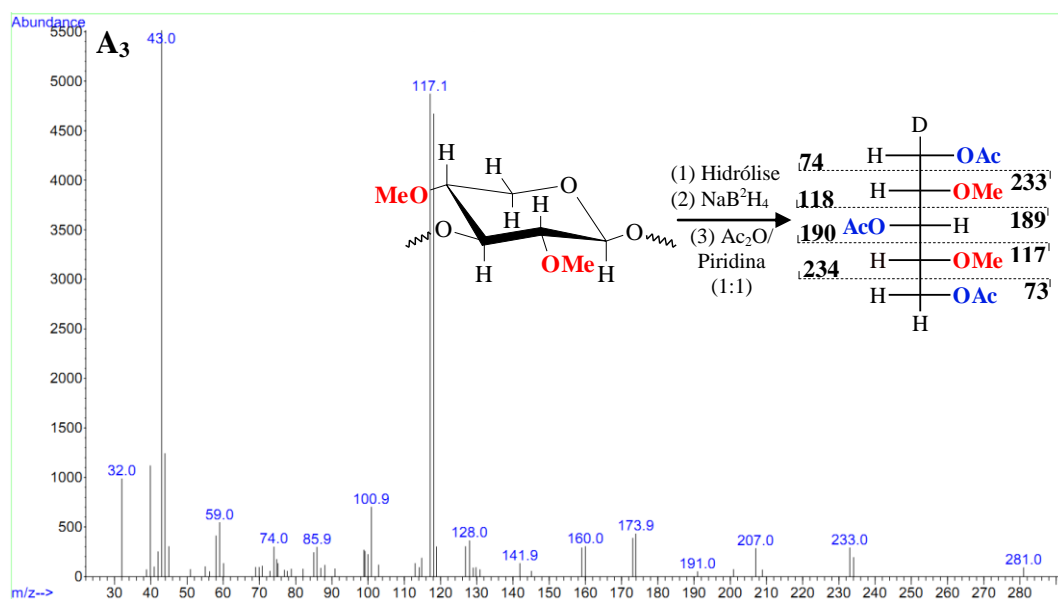
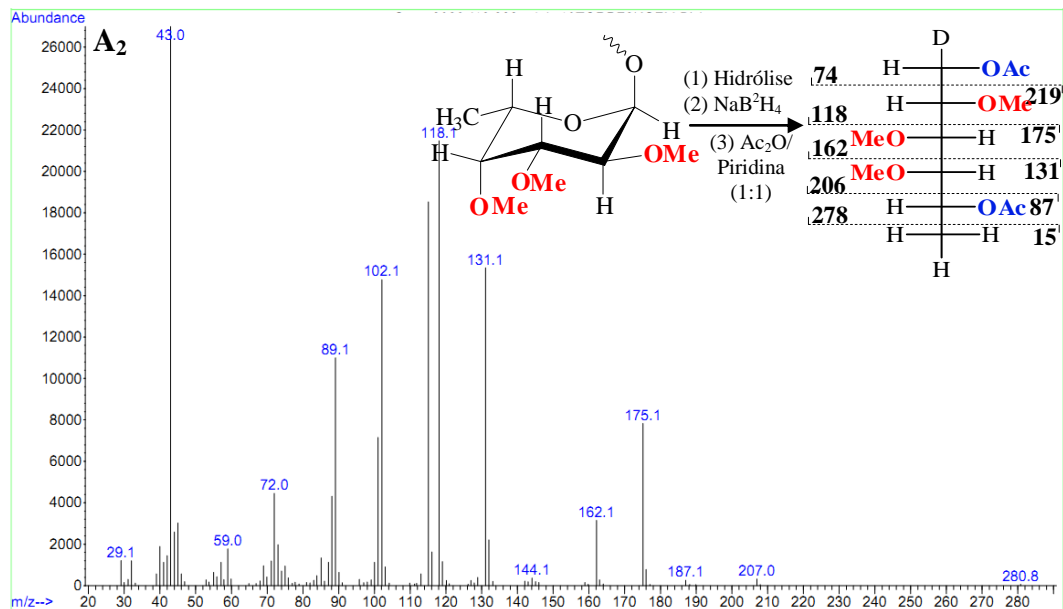


FIGURA 4.17 - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃Xyl; A₂: 2,3,4-Me₃Fuc; A₃: 2,4-Me₂Xyl; A₄: 2,3-Me₂Xyl; A₅: 2,3,4,6-Me₄Man; A₆: 4-MeXyl; A₇: 2,6-Me₂Man) obtidos após derivatização química (metilação) da fração PF₂K-*GfM* (FXM-*GfM*) (Continuação)

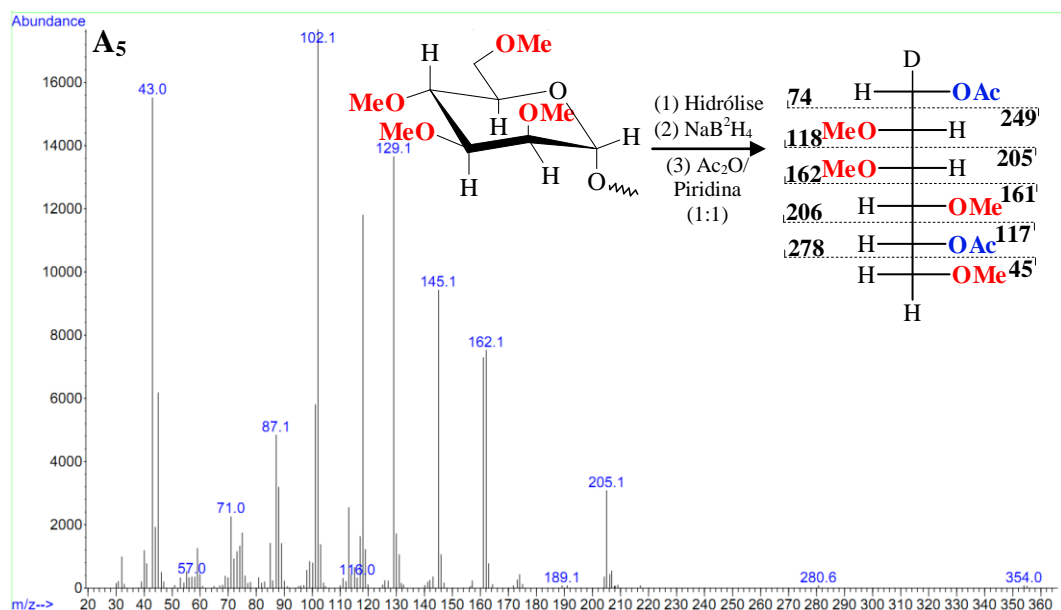
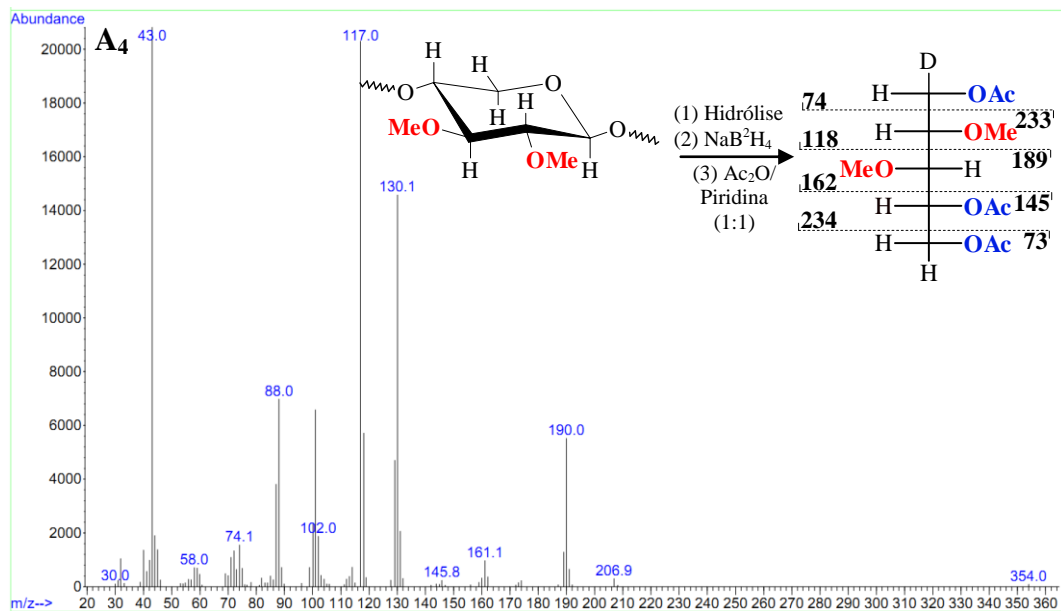


FIGURA 4.17 - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4-Me₃Xyl; A₂: 2,3,4-Me₃Fuc; A₃: 2,4-Me₂Xyl; A₄: 2,3-Me₂Xyl; A₅: 2,3,4,6-Me₄Man; A₆: 4-MeXyl; A₇: 2,6-Me₂Man) obtidos após derivatização química (metilação) da fração PF₂K-GfM (FXM-GfM) (Conclusão)

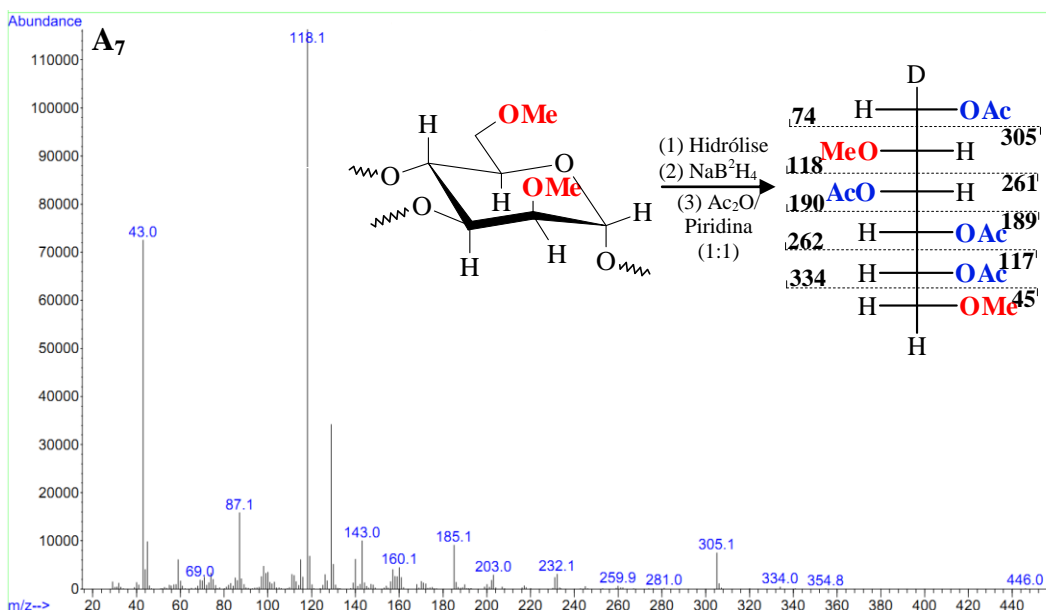
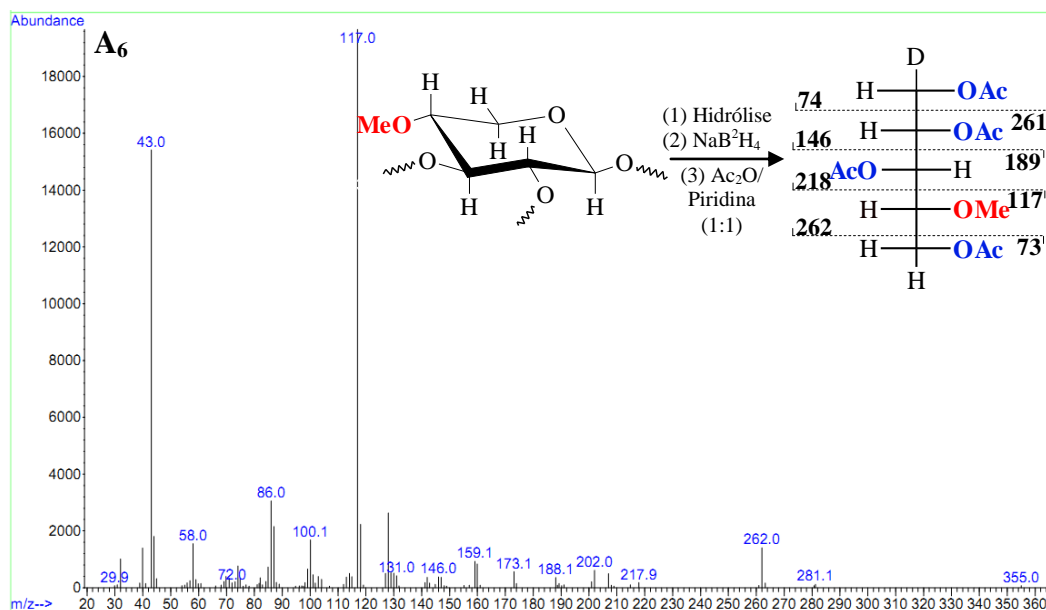


Tabela 4.5 - Análise por metilação da fucoxilomanana (FXM-GfM) isolada dos micélios de *G. frondosa*, e dos produtos resistentes à oxidação com periodato de sódio (Ox-FXM-GfM)

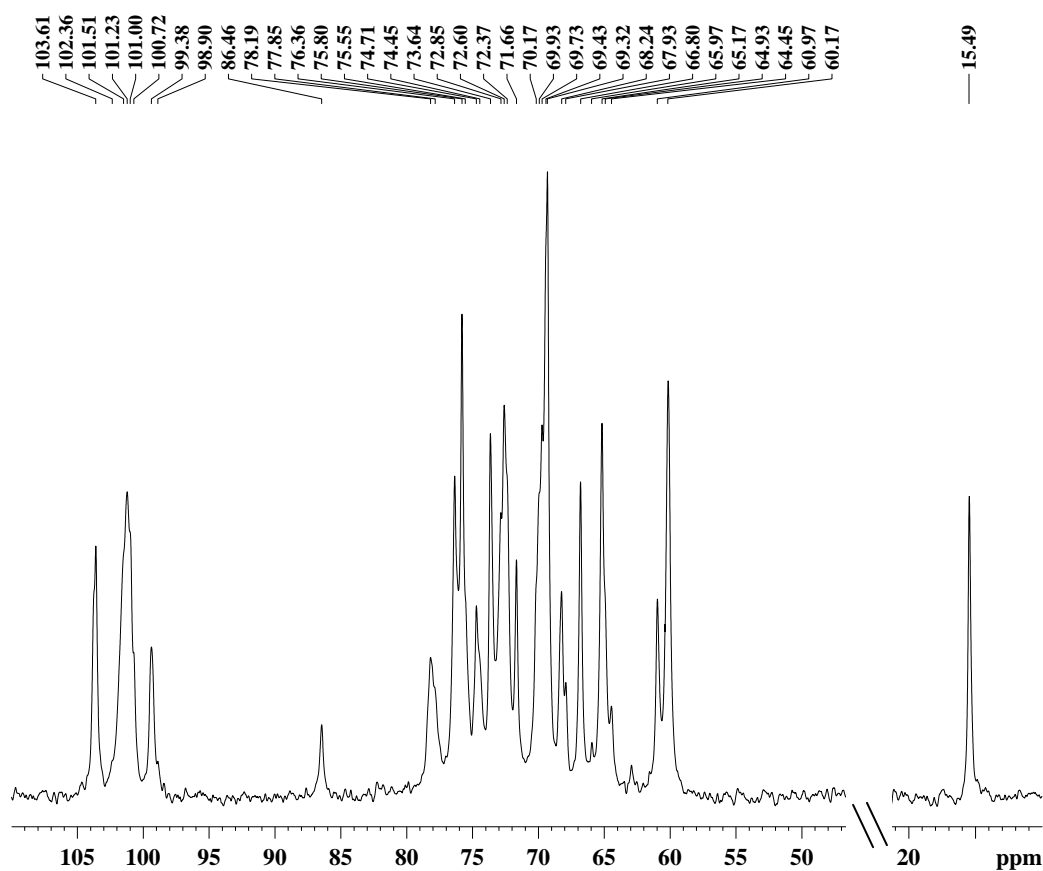
Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^(a)	Tipo de Ligação ^(b)	T_R ^(c)	mol(%)	
			FXM ^(a)	Ox-FXM ^(a)
2,3,4-Me ₃ Xyl	Xylp-(1→	17.799	16,5	-
2,3,4-Me ₃ Fuc	Fucp-(1→	18.236	13,9	-
2,4-Me ₂ Xyl	→3)-Xylp-(1→	19.114	2,0	-
2,3-Me ₂ Xyl	→4)-Xylp-(1→	19.213	13,1	-
2,3,4,6-Me ₄ Man	Manp-(1→	19.761	12,0	-
4-MeXyl	→2,3)-Xylp-(1→	20.364	8,0	19,7
2,4,6-Me ₂ Man	→3)-Manp-(1→	21.083	-	-
2,6-Me ₂ Man	→3,4)-Manp-(1→	21.844	34,5	80,3

^a Analisado em CG-EM (coluna HP5) após metilação, hidrólise ácida total [TFA 1 M a 100 °C por 10 h (FXM) ou 12 h (Ox-FXM)], redução (NaB²H₄) e acetilação.

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

^c Tempo de retenção (min)

FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de ¹³C da fração PF₂K-GfM (FXM) de *G. frondosa*, analisada em D₂O a 70 °C



O espectro de RMN de ^{13}C está de acordo com os dados de metilação, os quais sugerem tratar-se de uma estrutura complexa. Os sinais na região anomérica são correspondentes às unidades de $\beta\text{-Xylp}$ (δ 103,61 e δ 101,23), $\alpha\text{-Manp}$ (δ 101,51, δ 101,0 e δ 100,72) e $\alpha\text{-Fucp}$ (δ 99,38 e δ 98,90). As substituições em O-3 e O-4 das unidades de Xylp foram confirmadas através dos sinais em δ 86,6 e δ 78,4, respectivamente. Os sinais em δ 78,19 refere-se ao C-3 das unidades de $\alpha\text{-Manp}$ (VINOGRADOV et al., 2004; SMIDERLE et al., 2006).

Devido a presença de um polímero altamente ramificado, optou-se por realizar a oxidação com periodato de sódio seguida por redução com NaBH_4 e hidrólise ácida parcial (= degradação controlada de Smith) de uma alíquota desta fração (200 mg), com o intuito de elucidar a cadeia principal deste carboidrato. O produto resistente desta degradação (1DS-FXM-GfM, 160 mg) foi analisado por CG-EM, para a determinação de seus constituintes monossacarídeos (Tabela 4.6, p. 73) bem como dos tipos de ligações glicosídicas, e RMN de ^{13}C (Figura 4.19, p. 73). De acordo com os resultados obtidos nestas análises, foi verificado para a fração 1DS-FXM-GfM um aumento do percentual de manose (de 53,9 para 88,1%), sugerindo que este seja o monossacarídeo constituinte do *core* deste polímero, e a concomitante remoção parcial de xilose (de 30,2 para 11,9 %) e total de fucose (Tabela 4.6, p. 73). Estes dados foram confirmados por metilação, sendo observada uma diminuição nos teores do derivado correspondente às unidades de Manp 3,4-di-*O* substituídas (2,6- Me_2Man), devido à remoção parcial das cadeias laterais formadas por Fucp , Manp e Xylp . Ao removê-las, notou-se o aparecimento do derivado referente às Manp 3-*O*-substituídas (2,4,6- Me_3Man), indicando que estas cadeias laterais encontravam-se ligadas em O-4 à cadeia principal constituída por Manp . Além destes, foi detectado os terminais não redutores de Xylp (2,3,4- Me_3Xylp , 7,5%), os quais são referentes às unidades de Xylp 3-*O*- e 2,3-di-*O*- substituídas que se encontravam internamente nas ramificações, ressaltando que não foram removidas devido a ausência de hidroxila vicinais livres.

TABELA 4.6 - Análise da composição monossacarídica das frações Ox-FXM, 1DS-FXM e 2DS-FXM-GfM

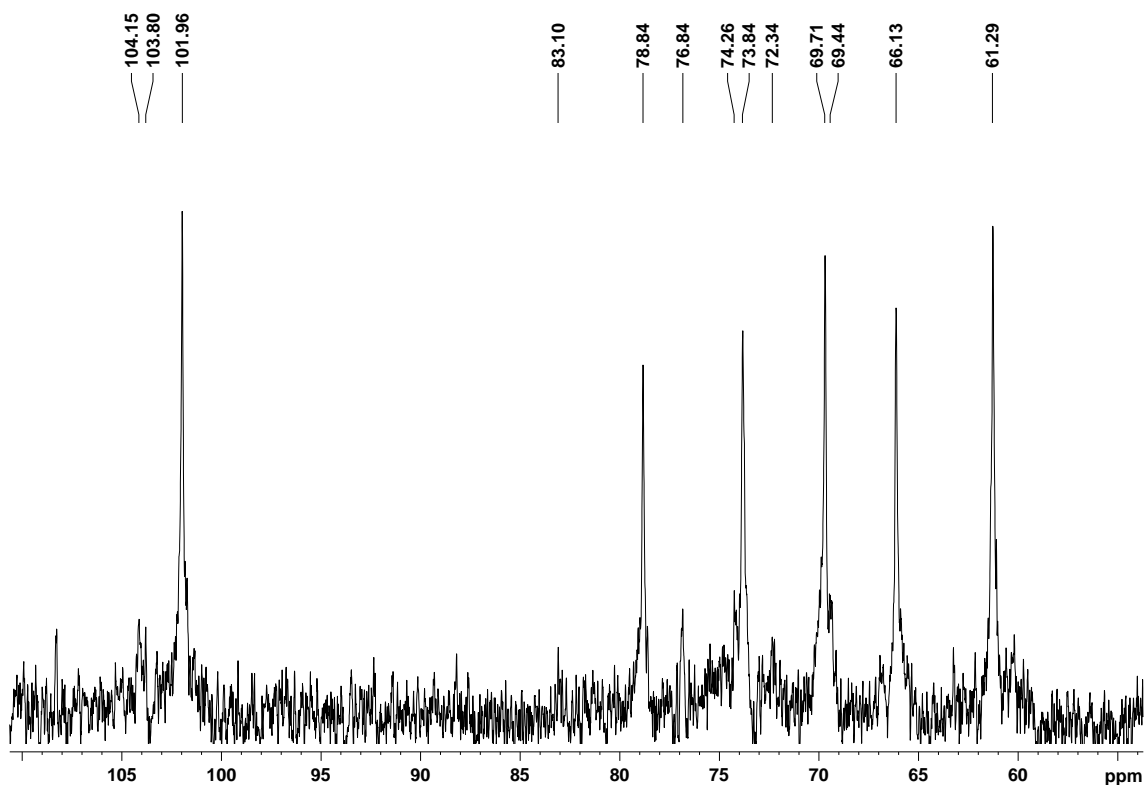
FRAÇÃO	Composição monossacarídica (mol %) ^a	
	Xyl ^b	Man ^b
Ox-FXM-GfM	9,8	90,2
1DS-FXM-GfM	11,9	88,1
2DS-FXM-GfM	-	100

^a Analisado em CG-EM (coluna HP5) após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^b Xyl: xilose; Man: manose.

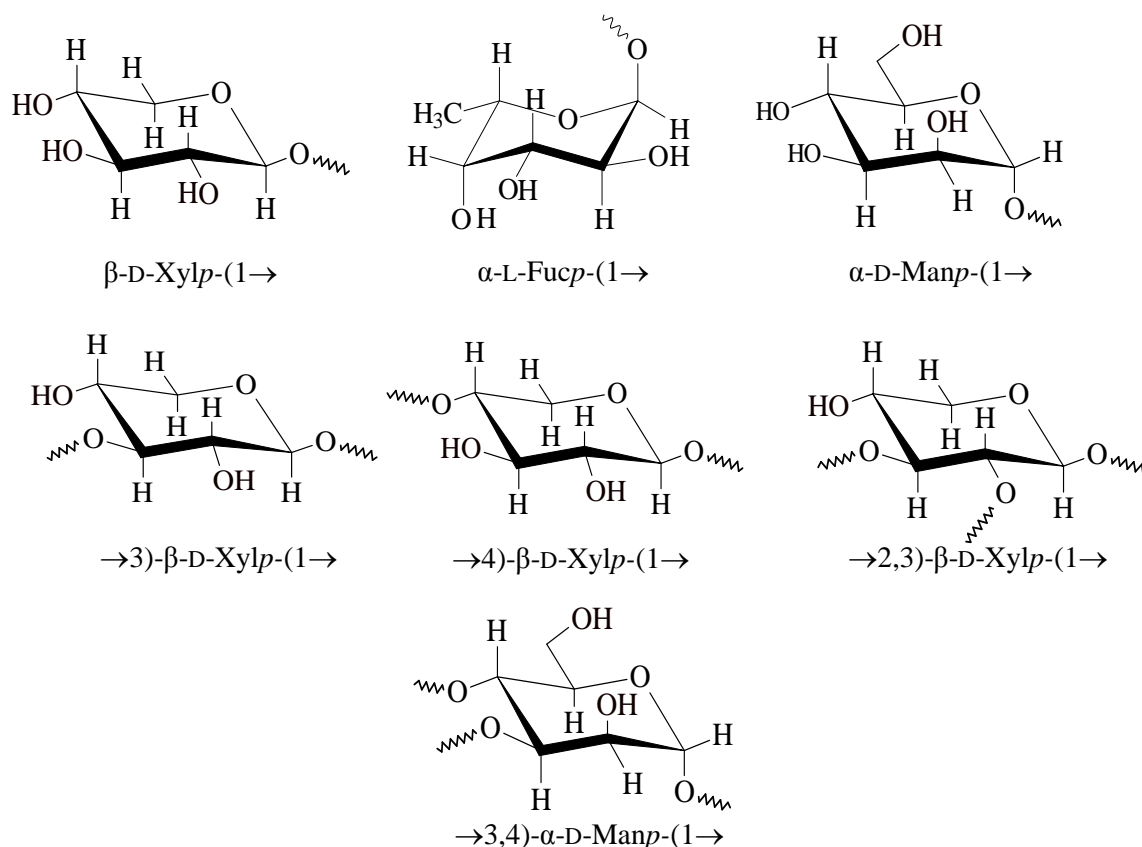
O espectro de RMN de ¹³C da fração 1DS-FXM-GfM (Figura 4.19) apresentou 6 sinais de carbono de maior intensidade referentes ao C-1 a C-6 (δ 101,96; δ 69,71; δ 78,84; δ 66,13; δ 73,84 e δ 61,29, respectivamente) (SMIDERLE et al, 2006) das unidades de α -Manp 3-O- substituídas da cadeia principal. Além destes, há outros de menor intensidade que foram atribuídos aos terminais não redutores de Xylp, os quais foram removidos após a realização do segundo ciclo de degradação parcial de Smith, fornecendo a fração 2DS-FXM-GfM (Tabela 4.6).

FIGURA 4.19 - Espectros de RMN de ¹³C da fração 1DS-FXM-GfM de *G. frondosa*, analisadas em Me₂SO-*d*₆ a 70 °C



A fucoxilomanana (FXM-*GfM*) isolada dos micélios de *G. frondosa*, $M_w = 202 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, apresenta uma cadeia principal constituída por $\alpha\text{-Manp}$ (1 \rightarrow 3)-ligadas, a qual se encontra totalmente substituída em O-4 por cadeias laterais constituídas por Xylp, Fucp e Manp (Figura 4.20; Tabela 4.5, p. 71).

FIGURA 4.20 - Principais fragmentos da fucoxilomanana isolada do micélio de *G. frondosa*



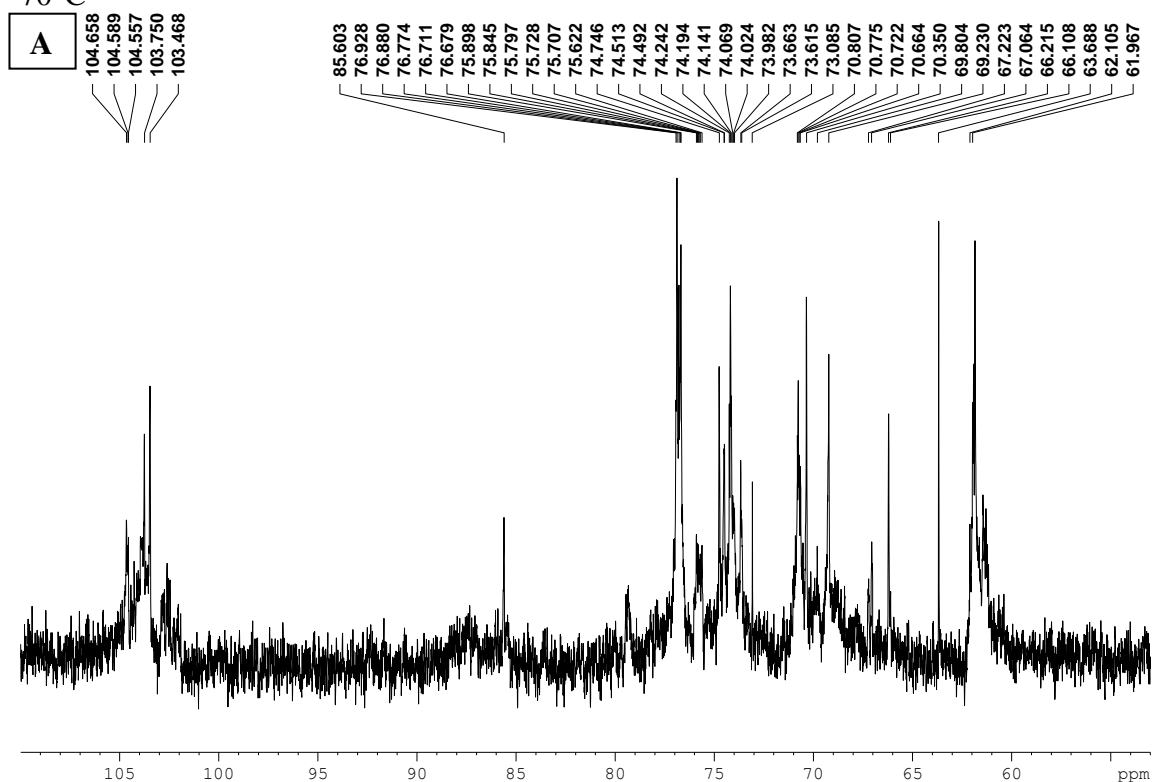
Alguns trabalhos têm relatado a presença de fucoxilomananas no corpo de frutificação de *Polyporus pinicola* (AXELSSON et al., 1969), *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971) e *Ganoderma lucidum* (MIYAZAKI et al., 1982), porém apresentam cadeias principais distintas da isolada neste trabalho. Estas contêm uma cadeia principal de $\beta\text{-D-Manp}$ ligada (1 \rightarrow 3) podendo ser substituída em O-4, pelo dissacarídeo 2-*O*- $\alpha\text{-L-Fucp}$ - $\beta\text{-D-Xylp}$ (*Polyporus pinicola*, *Fomes annosus*) ou D-Manp ligada (1 \rightarrow 4) podendo ser substituída em O-3 pelo dissacarídeo 4-*O*- L-Fucp - D-Xylp (*G. lucidum*).

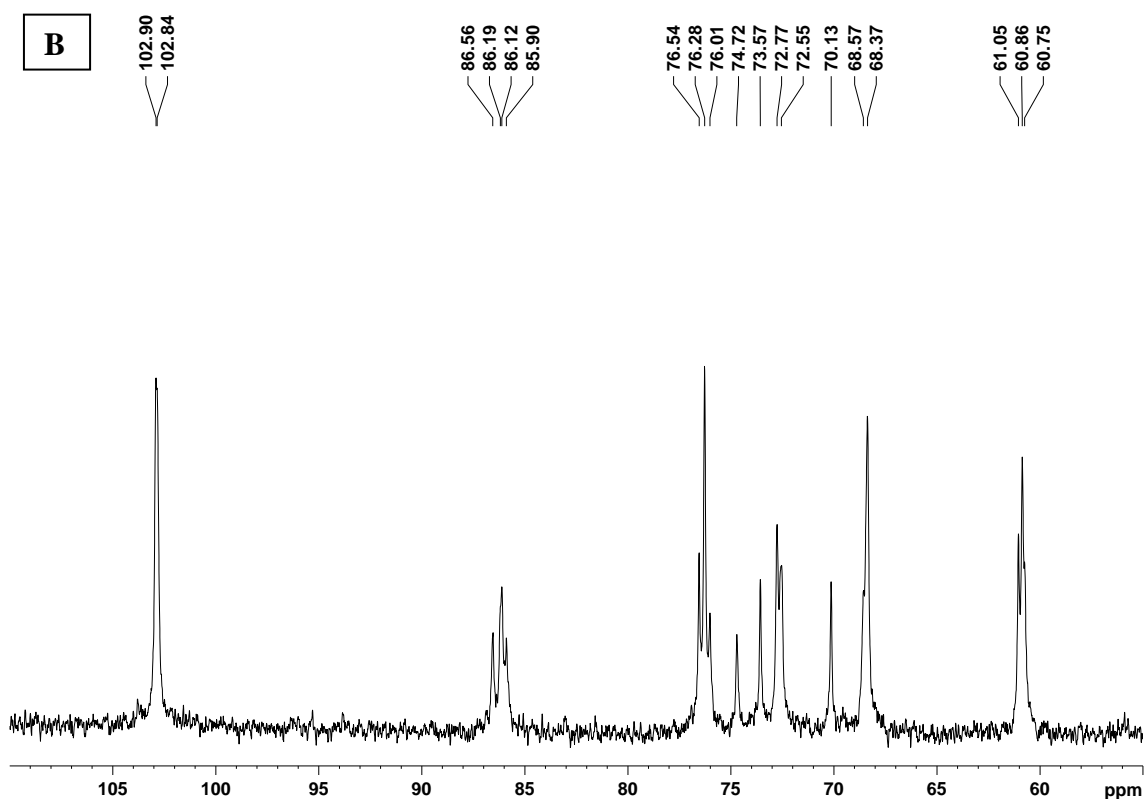
4.2.2 – Caracterização estrutural dos polissacarídeos da fração SF₂K-GfM

A fração SF₂K-GfM (sobrenadante de Fehling obtida do extrato alcalino), composta por Xyl:Man:Glc em uma proporção molar de 10,9:21,0:68,1 (Tabela 4.7, p. 78), apresentou-se heterogênea por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.23, p. 78). Com a finalidade de purificação, esta fração foi solubilizada em água destilada e submetida ao processo de congelamento e degelo seguido de centrifugação à baixa temperatura (10.000 rpm, 5 °C por 25 minutos) (Figura 4.14, p. 64). Com este procedimento, foi possível separar uma fração que se apresentava como gel a temperaturas baixas, de outra fração que não apresentava nenhuma viscosidade, as quais foram denominadas de SSF₂K-GfM (1,39 g) e PSF₂K-GfM (558 mg), respectivamente.

A fração SSF₂K-GfM mostrou ser constituída por Xyl (21,6%), Man (38,1%) e Glc (40,3%), ao contrário da PSF₂K-GfM que continha apenas glucose (100%) (Tabela 4.7, p. 78), sugerindo a presença de uma glucana (GLC1-GfM). Os espectros de RMN de ¹³C destas frações mostraram distintos assim como os cromatogramas obtidos por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.21; Figura 4.23, p. 78).

FIGURA 4.21 – Espectros de RMN de ¹³C das frações SSF₂K-GfM (A) e PSF₂K-GfM (B) de *G. frondosa*, analisadas em D₂O (A) ou Me₂SO-*d*₆ (B), respectivamente, ambas a 70°C





Com objetivo de purificar a fração SSF_2K-GfM , esta foi submetida à diálise, em sistema fechado, através de uma membrana com limite de exclusão 1000 kDa, originando a fração eluída ($MESF_2K-GfM$, 1,08 g) e a retida ($MRSF_2K-GfM$, 301,5 mg) deste processo (Figura 4.14, p. 64). Estas frações mostraram-se distintas quanto à composição monossacarídica (Tabela 4.7, p. 78), *HPSEC-MALLS* (Figura 4.23, p. 78) e RMN de ^{13}C (Figura 4.22, p. 77).

A fração $MRSF_2K-GfM$ contém apenas glucose, ou seja, glucanas ($GLC2-GfM$). De maneira similar a fração PSF_2K-GfM , esta apresentou um perfil de eluição heterogêneo por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.23, p. 78). No entanto, os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 4.21, p.75; Figura 4.22, p. 77) destas frações mostraram-se similares e característicos de β -glucanas com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), sugerindo que a presença de várias bandas é decorrente de glucanas com diferentes massa molares.

FIGURA 4.22 – Espectros de RMN de ^{13}C das frações MESF₂K-*GfM* (A) e MRSF₂K-*GfM* (B) de *G. frondosa*, analisadas em D₂O (A) ou Me₂SO-*d*₆ (B), respectivamente, ambas a 70 °C

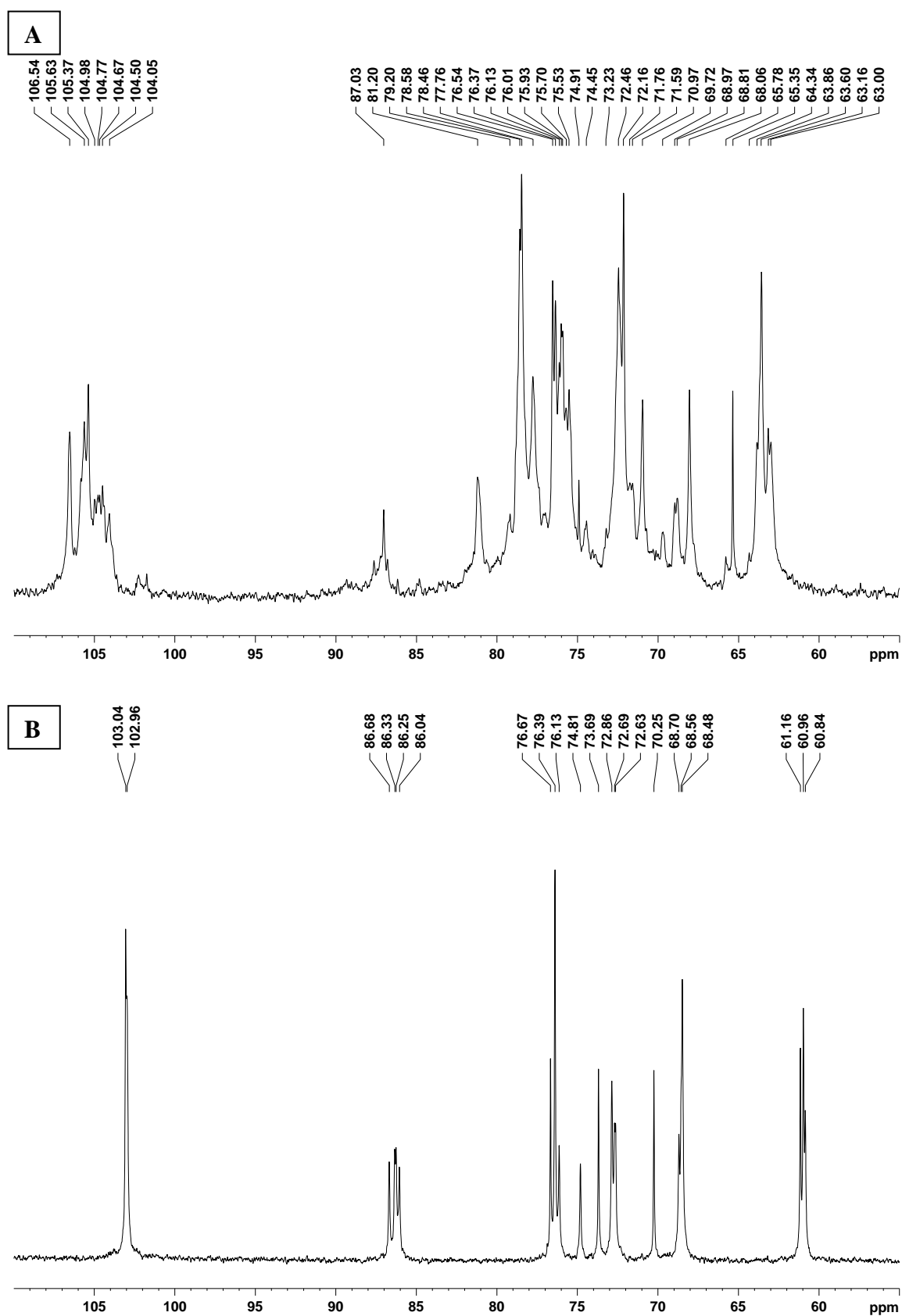


FIGURA 4.23 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: —) e índice de refração (IR: - -) (*HPSEC-MALLS*), das frações SF₂K-*GfM*, PSF₂K-*GfM*, SSF₂K-*GfM*, MRSF₂K-*GfM*, MESF₂K-*GfM*

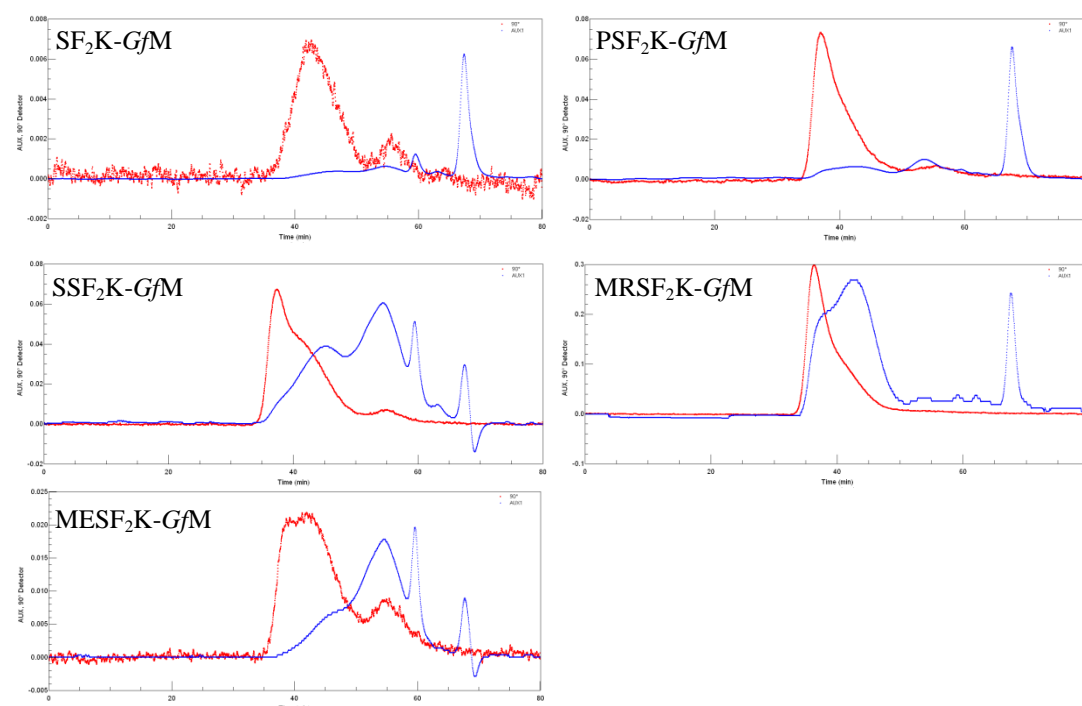


TABELA 4.7 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações obtidas do micélio de *G. frondosa*

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (mol %) ^b			
		Fuc ^c	Xyl ^c	Man ^c	Glc ^c
SF ₂ K- <i>GfM</i>	0,87	-	10,9	21,0	68,1
PSF ₂ K- <i>GfM</i>	0,24	-	-	-	100
SSF ₂ K- <i>GfM</i>	0,61	-	21,6	38,1	40,3
MESF ₂ K- <i>GfM</i>	0,47	2,3	14,0	31,0	52,8
MRSF ₂ K- <i>GfM</i>	0,13	-	-	-	100

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (229,4 g)

^b Analisado em CG-EM (coluna DB-225-MS) após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^c Fuc: fucose; Xyl: xilose; Man: manose e Glc: glucose.

Os espectros de RMN de ¹³C das frações PSF₂K-*GfM* (Figura 4.21, B, p. 76) e MRSF₂K-*GfM* (Figura 4.22, B, p. 77) apresentaram sinais na região anomérica (C-1) correspondentes aos terminais não redutores β-D-Glcp (δ 103,4) e às unidades de β-Glcp 3-*O*- e 3,6-di-*O*-substituídas (δ 103,0). Os sinais em δ 86,7, δ 86,3, δ 86,2, δ

86,0 e àquele em δ 70,2 sugerem a presença de ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), respectivamente (TADA et al., 2009).

Devido a similaridade destas frações, apenas a MRSF₂K-GfM foi submetida aos demais procedimentos de caracterização.

A fim de confirmar o tipo de ligação glicosídica deste polímero, a fração MRSF₂K-GfM (GLC2-GfM) foi metilada (CIUCANU, KERERK, 1984), obtendo-se os derivados parcialmente *O*-metilados correspondentes aos terminais não redutores de Glcp (2,3,4,6-Me₄Glc, 23,4 %) e às unidades de Glcp 3-*O*- (2,4,6-Me₃Glc, 48,8 %) e 3,6-di-*O*- substituídas (2,4-Me₂Glc, 27,8 %) da cadeia principal, contendo em média 1 substituição a cada 3 unidades da cadeia principal (Figura, 4.24; Figura 4.25, p. 80; Tabela 4.8, p. 81).

FIGURA 4.24 - Cromatograma obtido por CG-EM (A) da fração MRSF₂K-GfM (GLC-GfM) após derivatização química (metilação)

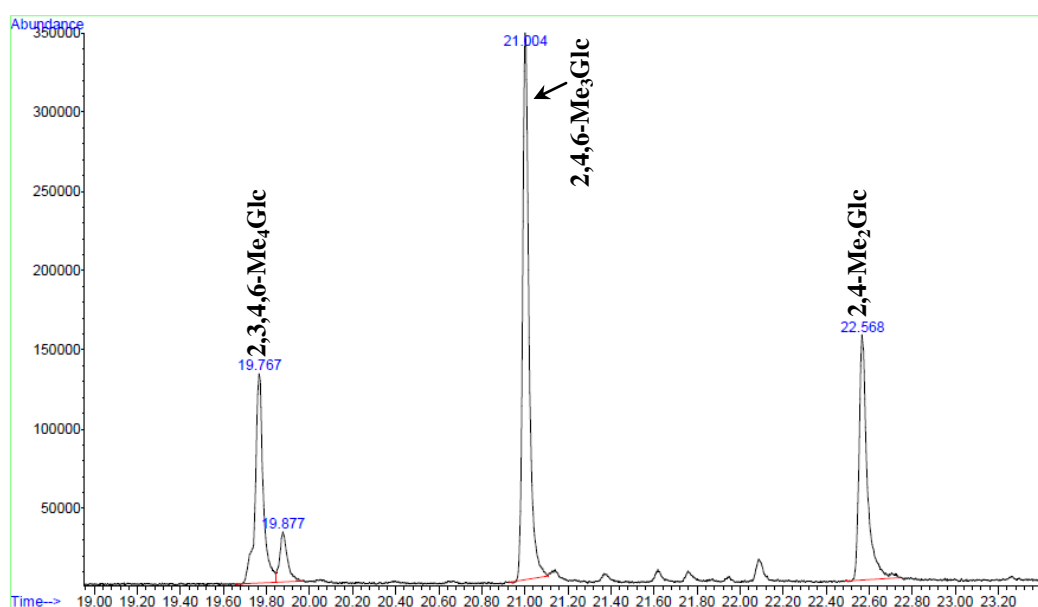


FIGURA 4.25 – Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A_1 : 2,3,4,6-Me₄Glc; A_2 : 2,4,6-Me₃Glc; A_3 : 2,4-Me₂Glc) obtidos após derivatização química (metilação) da fração MRSF₂K-*GfM* (GLC-*GfM*)

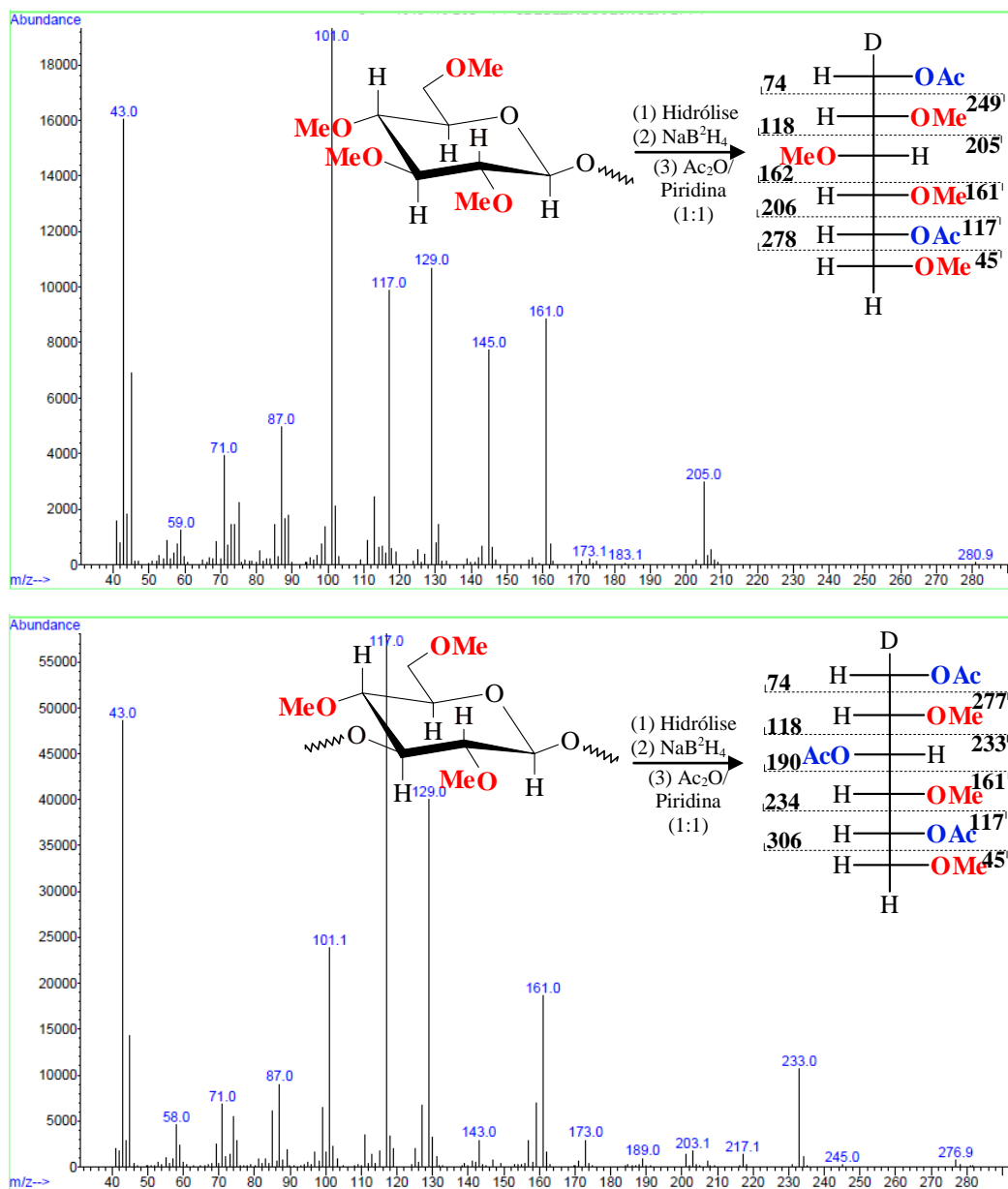


FIGURA 4.25 - Espectro de massas dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (A₁: 2,3,4,6-Me₄Glc; A₂: 2,4,6-Me₃Glc; A₃: 2,4-Me₂Glc) obtidos após derivatização química (metilação) da fração MRSF₂K-*GfM* (GLC-*GfM*) **(Conclusão)**

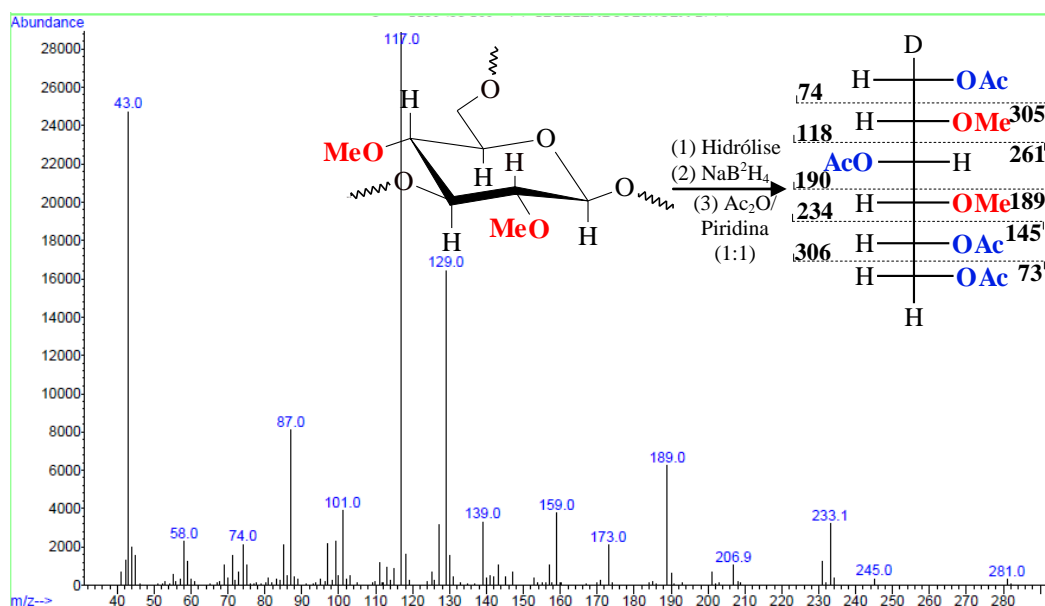


Tabela 4.8 - Análise por metilação da glucana MRSF₂K-*GfM* (GLC2-*GfM*), isolada do micélio de *G. frondosa*, e da fração DS-GLC2-*GfM*, obtida após degradação controlada de Smith

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^(a)	Tipo de Ligação ^(b)	T _R ^(c)	mol(%)	
			GLC2 ^(a)	DS-GLC2 ^(a)
2,3,4,6-Me ₄ Glc	Glc _p -(1→	19.767	23,4	-
2,4,6-Me ₃ Glc	→3)-Glc _p -(1→	21.004	48,8	100,0
2,4-Me ₂ Glc	→3,6)-Glc _p -(1→	22.568	27,8	-

^a Analisado em CG-EM (coluna HP5) após metilação, hidrólise ácida total (GLC2: *TFA* 0,5 M por 7 h; DS-GLC2: *TFA* 1 M por 12 h), redução (NaB²H₄) e acetilação.

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

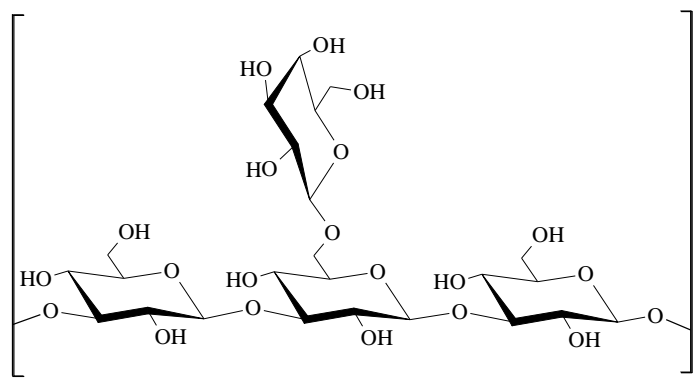
^c Tempo de retenção (min).

Tendo em vista que o polímero isolado apresenta resíduos ligados (1→3) e que estes não são degradados, uma alíquota (80 mg) da fração GLC2-*GfM* foi submetida à degradação controlada de Smith (Figura 3.5, p. 41), com objetivo de confirmar a cadeia principal deste polímero. O material resultante da degradação (fração DS-GLC2-*GfM*) foi analisado por CG-EM, após metilação, sendo detectado apenas o derivado 2,4,6-Me₃Glc correspondente às unidades de β-Glc_p-(1→3)- ligadas (Tabela 4.8).

As frações GLC1-*GfM* e GLC2-*GfM* consistem em β -glucanas similares ligadas (1 \rightarrow 3) e parcialmente substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -Glc p , porém com diferenças quanto à solubilidade em água e massa molar.

As β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) contendo uma ramificação a cada três unidades da cadeia principal têm sido descritas para este fungo, tanto do basidioma quanto do micélio (cultivo líquido), e algumas delas tem sido comercializadas devido aos seus efeitos terapêuticos. Desta maneira, o micélio obtido por cultivo em substratos lignocelulósico é uma fonte promissora destas moléculas bioativas.

FIGURA 4.26 – Esquema representativo da β -glucana (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) (frações PSF₂K e MRSF₂K) isoladas do micélio de *G. frondosa*



5 - CONCLUSÃO

Os polissacarídeos obtidos do extrato aquoso I (fração CW) e extrato alcalino (fração K) provenientes do micélio de *G. frondosa* cultivado em substrato lignocelulósico apresentaram as seguintes estruturas:

- Fucomanogalactana (FMG-*GfM*) constituída por uma cadeia principal de 3-*O*-Me- α -Gal p e α -Gal p ligadas (1 \rightarrow 6), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2, principalmente, por terminais não redutores de α -Man p e pelo dissacarídeo 3-*O*-D-Man p -L-Fuc p .

- Fucoxilomanana (FXM-*GfM*) contendo uma cadeia principal de α -Man p -(1 \rightarrow 3) ligadas e substituídas em O-4 por cadeias laterais constituídas por Xyl p , Fuc p e Man p .

- β -Glucanas (GLC1- e GLC2-*GfM*) ligadas (1 \rightarrow 3) e parcialmente substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -Glc p , em uma média de uma ramificação a cada três unidades da cadeia principal.

Levando em consideração os efeitos biológicos apresentados por moléculas similares descritas para estes macrofungos, o micélio obtido por cultivos em substratos de *G. frondosa* pode ser uma fonte promissora de substâncias bioativas. Para isto, estes foram submetidos à avaliação do seu potencial terapêutico, principalmente em relação à ação imunomoduladora e antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

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

AL ALI ZIDAN, N. & ALNEAMEH, H. "A review on antitumor actions of polysaccharide isolated from medicinal mushrooms". *Int. J. Acad. Sci. Res.*, 2: 14, **2014**.

ALQUINI, G.; CARBONERO, E.R.; ROSADO, F.R.; COSENTINO, C. & IACOMINI, M. "Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr". *FEMS Microbiol. Lett.*, 230: 47, **2004**.

AMARAL, A.E.; CARBONERO, E.R.; SIMÃO, R.C.G.; KADOWAKI, M.K.; SASSAKI, G.L.; OSAKU, C.A.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*". *Carbohydr. Polym.*, 72: 473, **2008**.

ANGYAL, S.J.; BENDER, V.J. & RALPH, B.J. "Structure of polysaccharides from the *Polyporus tumulosus* cell wall". *Biochim. Biophys. Acta*, 362: 175, **1974**.

AXELSSON, K. & BJÖRNDAL, H. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus ovinus* (Schaeff.)". *Acta Chem. Scand.*, 23: 1815, **1969**.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. "Structure of the fucoxylomannan from *Polyporus pinicola* (Fr)". *Acta Chem. Scand.*, 23: 1597, **1969**.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; SVENSSON, S. & HAMMARSTRÖM, S. "Polysaccharides elaborated by *Fomes annosus* (Fr.) Cooke". *Acta Chem. Scand.*, 25: 3645, **1971**.

BHAVANANDAN, V.P., BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. "Polysaccharides from *Polyporus giganteus*". *Acta Chem. Scand.*, 18: 504, **1964**.

BJÖRNDAL, H. & LINDBERG, B. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.) Part I. water-soluble neutral polysaccharides from the fruit bodies". *Carbohydr. Polym.*, 10: 79, **1969**.

BOUVENG, H.O.; FRASER, R.N. & LINDBERG, B. "Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (tricholomataceae) Part II. water-soluble mycelium polysaccharides". *Carbohydr. Res.*, 4: 20, **1967**.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; ROSA, M.C.C.; TORRI, G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "Unusual partially 3-O-methylated α -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*". *Phytochemistry*, 69: 252, **2008a**.

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

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

CARBONERO, E.R. Polissacarídeos de Fungos Liqueenizados Contendo Diferentes Fotobiontes. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2005. Tese de doutorado, 143 p.

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*". *Carbohydr. Polym.*, 90: 814, **2012**.

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

CHANG, S.T. "Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution". *Int. J. Med. Mushrooms*, 1:1, **1999**.

CHEN, G.; MA, X.; LIU, S.; LIAO, Y. & ZHAO, G. "Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*". *Carbohydr. Polym.*, 89: 61, **2012**.

CHIANG, P.D.; YEN, C.T. & MAU, J.L. "Non-volatile taste components of canned mushrooms". *Food Chem.*, 97: 431, **2006**.

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

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

CUI, F.J.; TAO, W.Y.; XU, Z.H.; GUO, W.J.; XU, H.Y.; AO, Z. H.; JIN, J. & WEI, Y.Q. "Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801". *Bioresour. Technol.*, 98: 395, **2007**.

DAI, Y-CH.; YANG, Z-L.; UI, B-K.; YU, CH-J.; ZHOU, L-W. "Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China". *Int. J. Med. Mushrooms*, 11: 287, **2009**.

DIDUKH, M.Y.; WASSER, S.P. & NEVO, E. "Medicinal value of species of the family Agaricaceae Cohn (higher Basidiomycetes) current stage of knowledge and future perspectives". *Int. J. Med. Mushrooms*, 5:133, **2003**.

DYER, J.R. "Use of periodate oxidations in biochemical analysis". *Meth. Biochem. Anal.*, 3: 112, **1956**.

FANG, J.; WANG, Y.; LV, X.; SHEN, X.; NI, X. & DING, K. "Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- κ B signaling". *Glycoconjugate J.*, 29: 365, **2012**.

FRASER, R.N. & LINDBERG, B. "Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (tricholomataceae) Part I. a water-soluble polysaccharide from the fruit bodies". *Carbohydr. Res.*, 4: 12, **1967**.

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

GAO, Y.; ZHOU, S.H.; HUANG, M. & XU, A. "Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllphoromycetideae): a review". *Int. J. Med. Mushrooms*, 5: 235, **2003**.

GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. "Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis". *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5: 361, **2005**.

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

GORIN, P.A.J.; HORITSU, K. & SPENCER, J.F.T. An exocellular mannan alternately linked 1,3- β and 1,4- β from *Rhodotorula glutinis*. *Can. J. Chem.*, 43: 950, **1965**.

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

IINO, K.; OHNO, N.; SUZUKI, I.; MIYAZAKI, T.; YADOMAE, T.; OIKAWA, S. & SATO, K. "Structural characterization of a neutral antitumor β -D-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*". *Carbohydr. Res.*, 141: 111, **1985**.

ILLANA-ESTEBAN, C. "The fungus *maitake* (*Grifola frondosa*) and its therapeutic potential". *Rev. Iberoam. Micol.*, 25: 141, **2008**.

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

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

KALAČ, P. "Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review". *Food Chem.*, 113: 9, **2009**.

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

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

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)". *Carbohydr. Polym.*, 87: 348, **2012**.

MAJI, P. K.; SEN, I. K.; DEVI, K. S. P.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R. & ISLAM, S. R. "Structural characterization of a biologically active glucan isolated from a hybrid mushroom strain *pfle1v* of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*". *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, 2: 73, **2013**.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V. & PIZZOFERRATO, L. "Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study". *Food Chem.*, 65: 477, **1999**.

MASUDA, Y.; MATSUMOTO, A.; TOIDA, T.; OIKAMA, T.; ITO, K. & NANBA, H. "Characterization and antitumor effect of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*". *J. Agric. Food Chem.*, 57: 10143, **2009**.

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

MIYAZAKI, T. "Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*". *Carbohydr. Res.*, 109: 290, **1982**.

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

MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S. & HEDJAROUDE, G.A. "Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)". *Int. Immunopharmacol*, 7: 701, **2007**.

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

NANBA, H. & KUBO, K. "Antitumor substance extracted from *Grifola*". *U.S. Patent* 5,854,404, issued December 29, **1998**.

OHNO, N. "Structural diversity and physiological functions of β -glucans". *Int. J. Med. Mushrooms*, 7: 167, **2005**.

OHNO, N.; SUZUKI, I.; OIKAWA, S.; SATO, K.; MIYAZAKI, T. & YADOMAE, T. "Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*". *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 1142, **1984**.

OLIVEIRA, G.K.F. Elucidação Estrutural de Heterogalactanas Parcialmente Metiladas Obtidas de *Grifola frondosa* (“Maitake”) e *Pleurotus ostreatus* (“Shimeji”). Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão (UFG/RC), 2013. Dissertação de mestrado, 77 p.

REN, L.; PERERA, C. & HEMAR, Y. “Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review”. *Food Funct.*, 3: 1118, **2012**.

RESHETNIKOV, S.V.; WASSER, S.P. & TAN, K.K. “Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides”. *Int. J. Med. Mushrooms*, 3: 361, **2001**.

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

ROUPAS, P.; KEOGH, J.; NOAKES, M.; MARGETTS, C. & TAYLOR, P. “The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence”. *J. Funct. Foods*, 4: 687, **2012**.

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”. *Carbohydr. Polym.*, 98: 761, **2013a**.

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

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

SANTOS-NEVES, J.C.; PEREIRA, M.I.; CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L. & IACOMINI, M. “A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*”. *Carbohydr. Res*, 343: 1456, **2008**.

SILVA, E.V. Determinação Estrutural do Heteropolissacarídeo Isolado do Basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju*. Graduação em Química - Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão (UFG/RC), 2011. Relatório de Estágio, 36 p.

SMIDERLE, F.R.; CARBONERO, E.R.; MELLINGER, C.G.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. “Structural characterization of a polysaccharide and a

β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*". *Phytochemistry*, 67: 2189, **2006**.

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

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

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

SULLIVAN, R.; SMITH, J.E. & ROWAN, N.J. "Medicinal mushrooms and cancer therapy. Translating a traditional practice into Western medicine". *Perspect. Biol. Med.* 49:159, **2006**.

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

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

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

VINOGRADOV, E.; PETERSEN, B.O.; DUUS, J. & WASSER, S. "The structure of the glucuronoxylomannan produced by culinary-medicinal yellow brain mushroom (*Tremella mesenterica* Ritz.: Fr., Heterobasidiomycetes) grown as one cell biomass in submerged culture". *Carbohydr. Res.*, 339: 1483, **2004**.

WANG, Y.; SHEN, X.; LIAO, W.; FANG, J.; CHEN, X.; DONG, Q. & DING, K. "A heteropolysaccharide, L-fuco-D-manno-1,6- α -D-galactan extracted from *Grifola frondosa* and antiangiogenic activity of its sulfated derivative". *Carbohydr. Polym.*, 101: 631, **2014**.

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

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

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

WASSER, S.P. “Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems”. *Int. J. Med. Mushrooms*, 12: 1, **2010**.

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

WOLFROM, M. L. & THOMPSON, “A reduction with sodium borohydride”. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 2: 65, **1963a**.

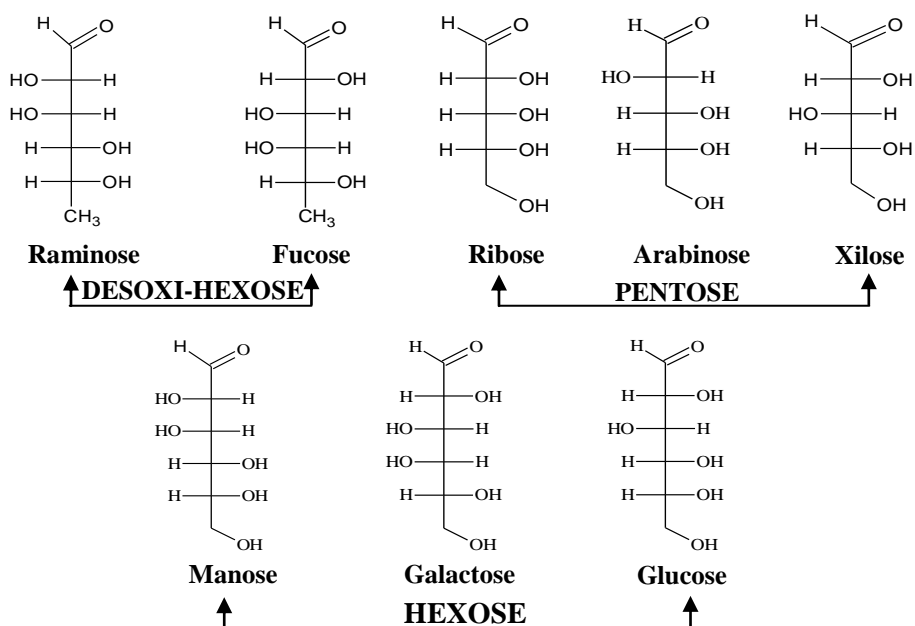
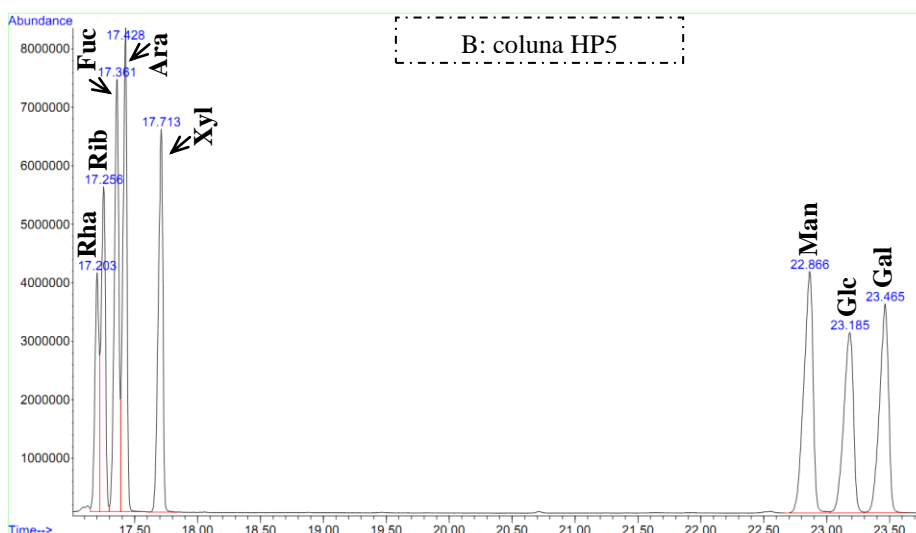
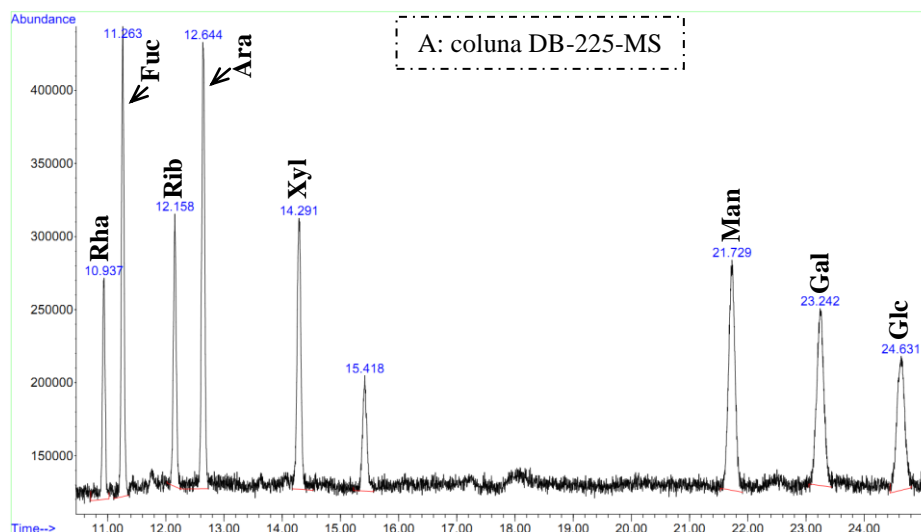
WOLFROM, M. L. & THOMPSON, A. “Acetylation”. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 2: 211, **1963b**.

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

ZHANG, M.; CUI, S.W.; CHEUNG, P.C.K. & WANG, Q. “Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity”. *Trends Food Sci. Technol.*, 18: 4, **2007**.

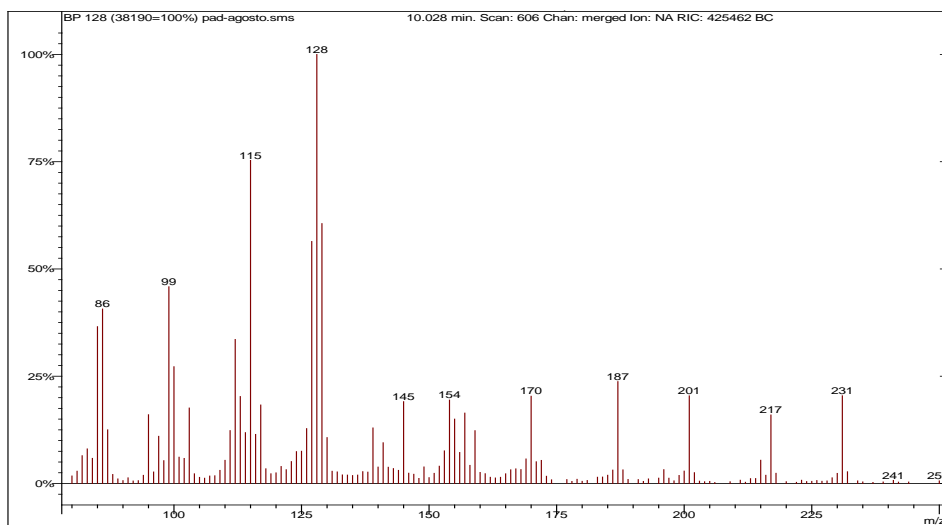
ZHUANG, C. & WASSER, S.P. “Medicinal value of culinary-medicinal Maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetidae)”. *Int. J. Med. Mushrooms*, 6: 287, **2004**.

APÊNDICE A - Cromatogramas referentes aos principais monossacarídeos obtidos por CG-EM (A: coluna DB-225-MS; B: coluna HP-5)

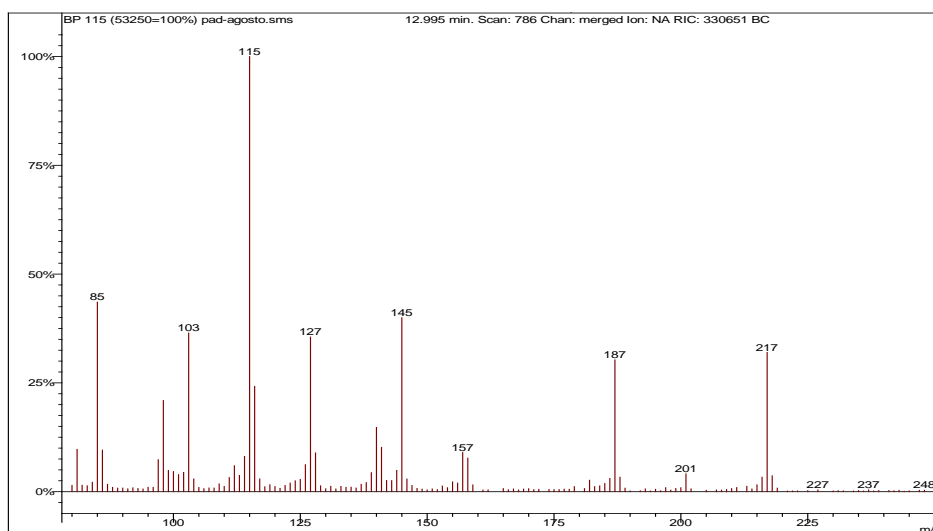


APÊNDICE B - Espectros de massas dos padrões obtidos por CG-EM dos principais monossacarídeos

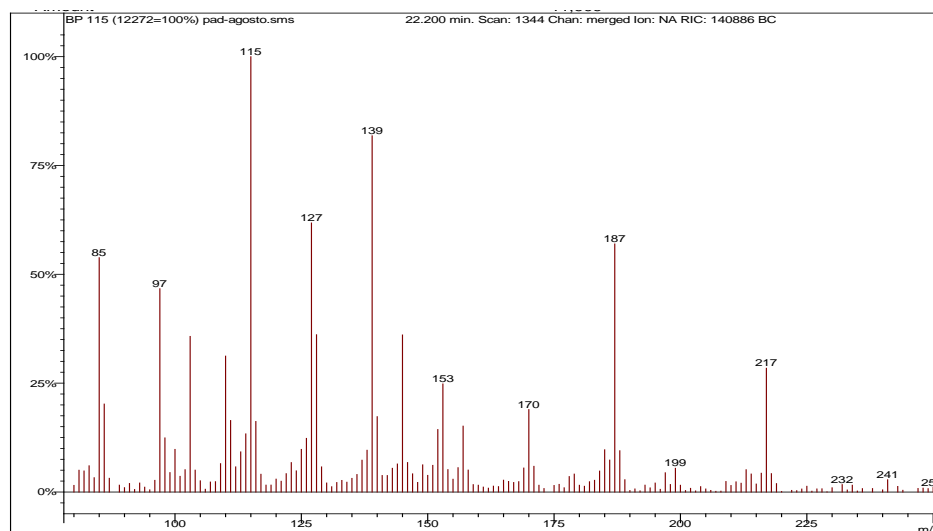
DESOXI-HEXOSE (Raminose e Fucose)



PENTOSE (Arabinose, Ribose e Xilose)

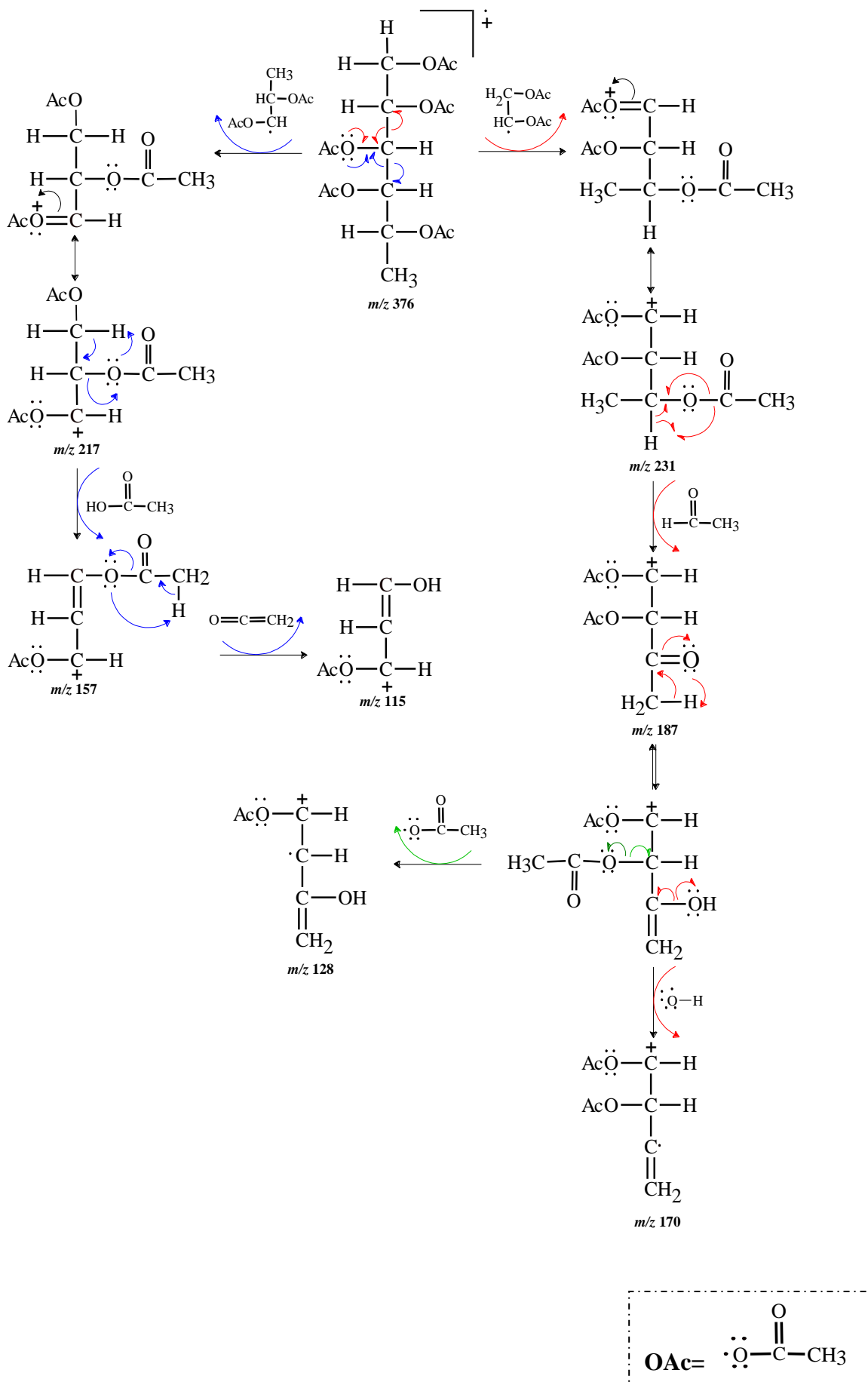


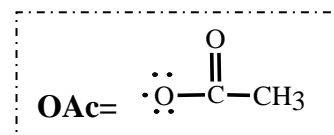
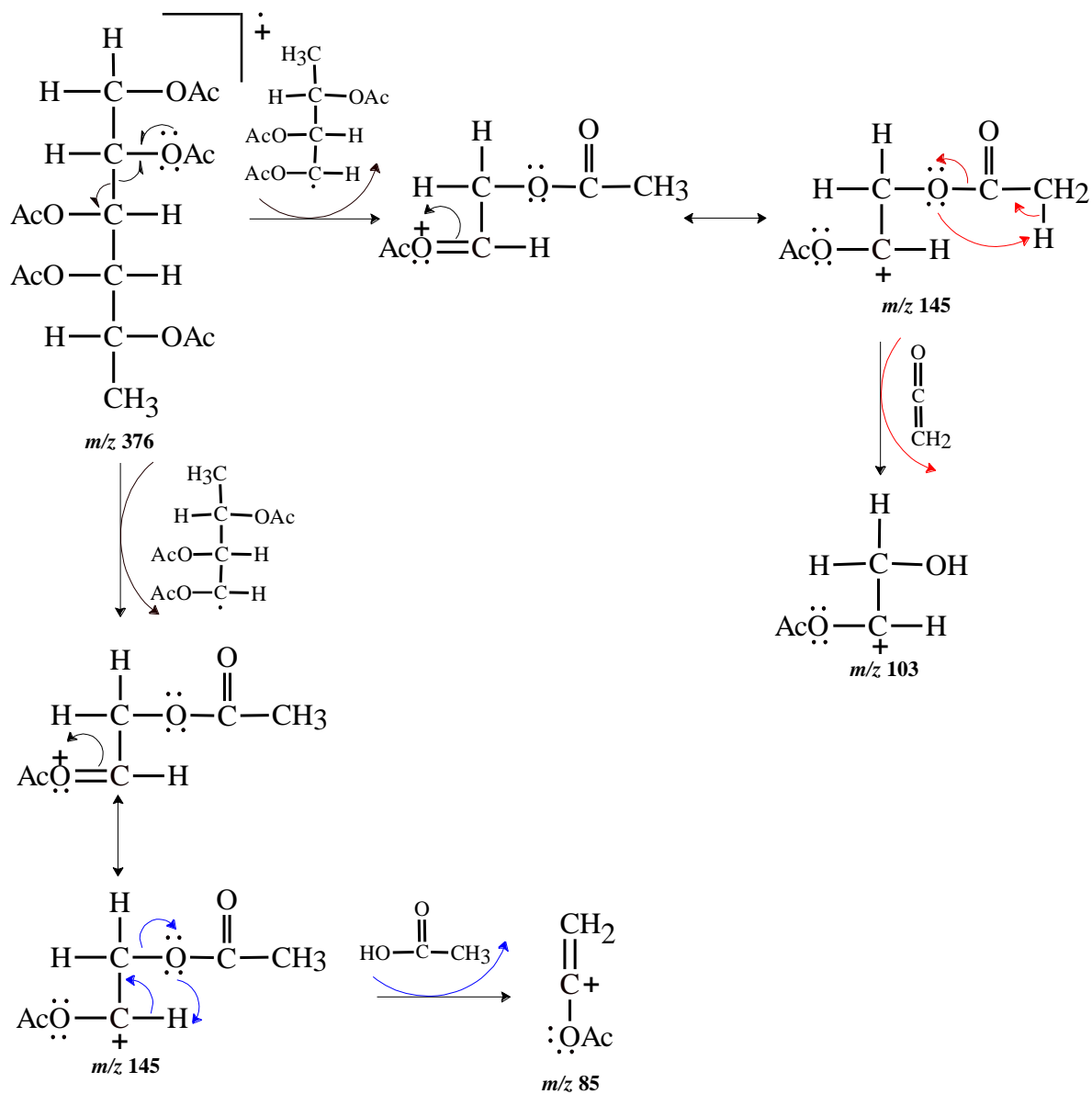
HEXOSE (Manose, Galactose e Glucose)



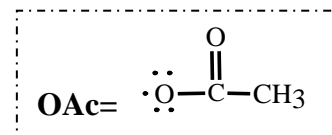
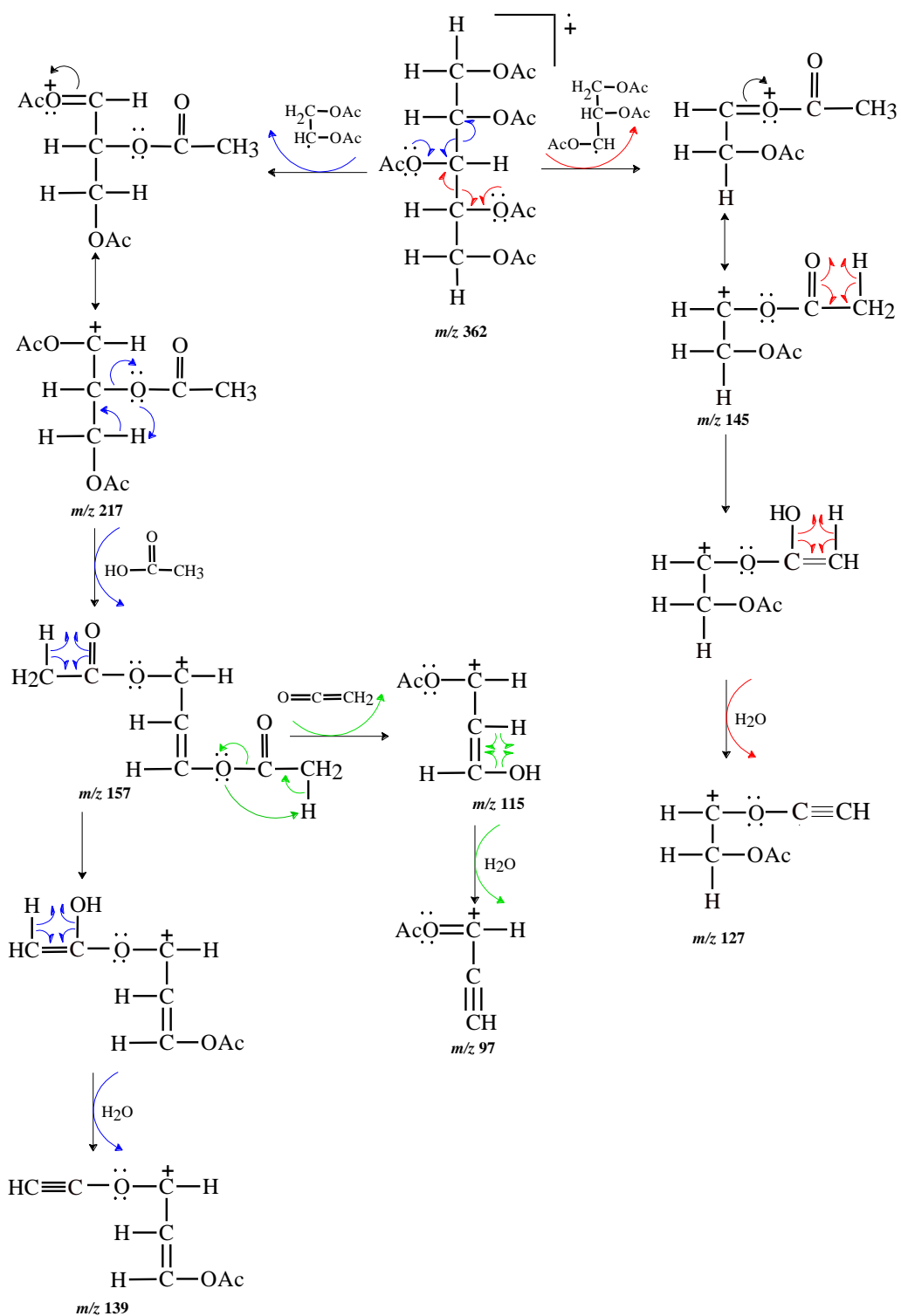
APÊNDICE C - Principais fragmentos secundários dos acetatos de alditóis

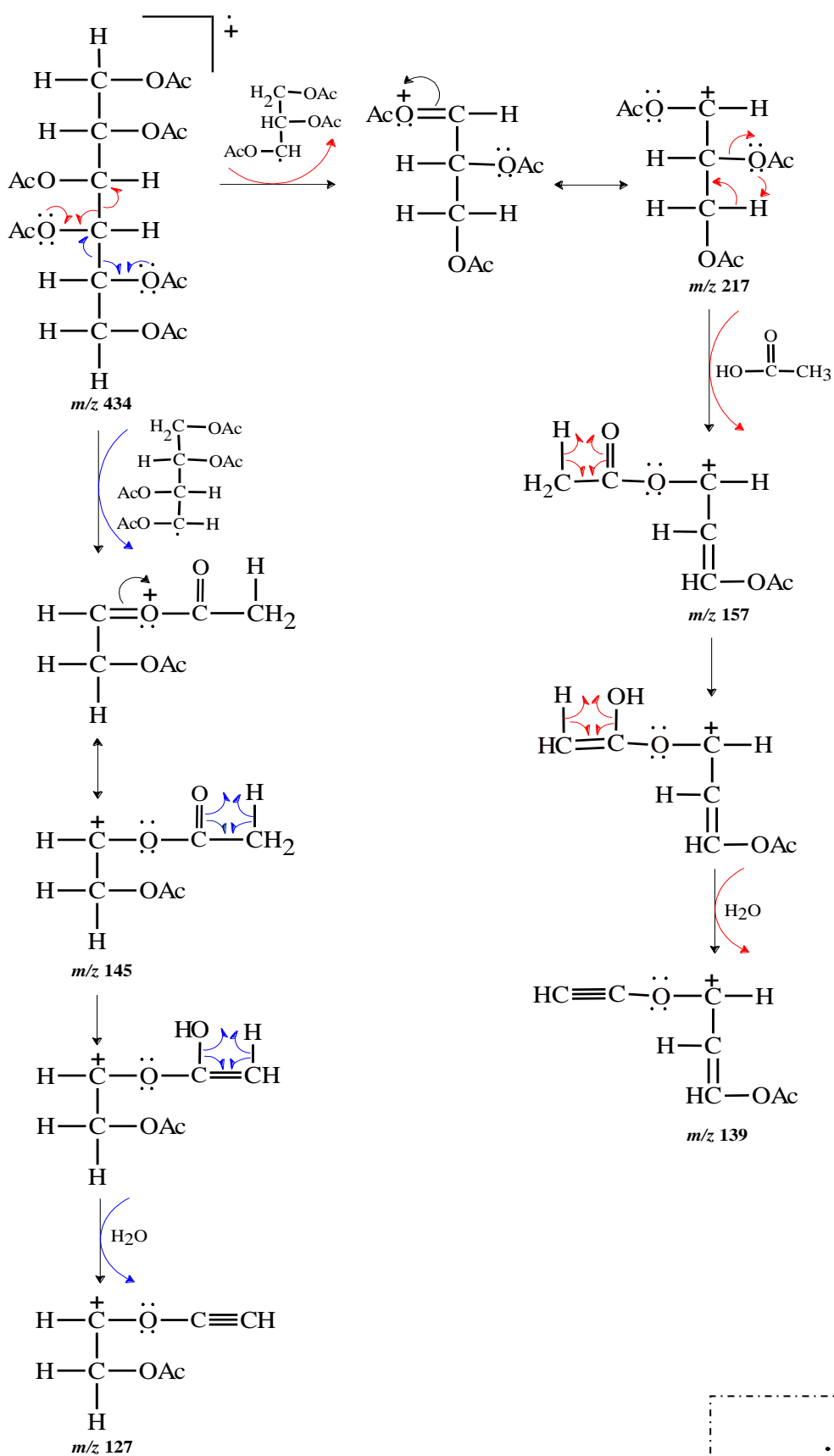
→ DESOXI-HEXOSE

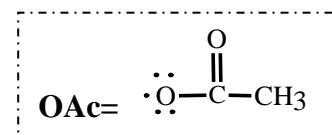
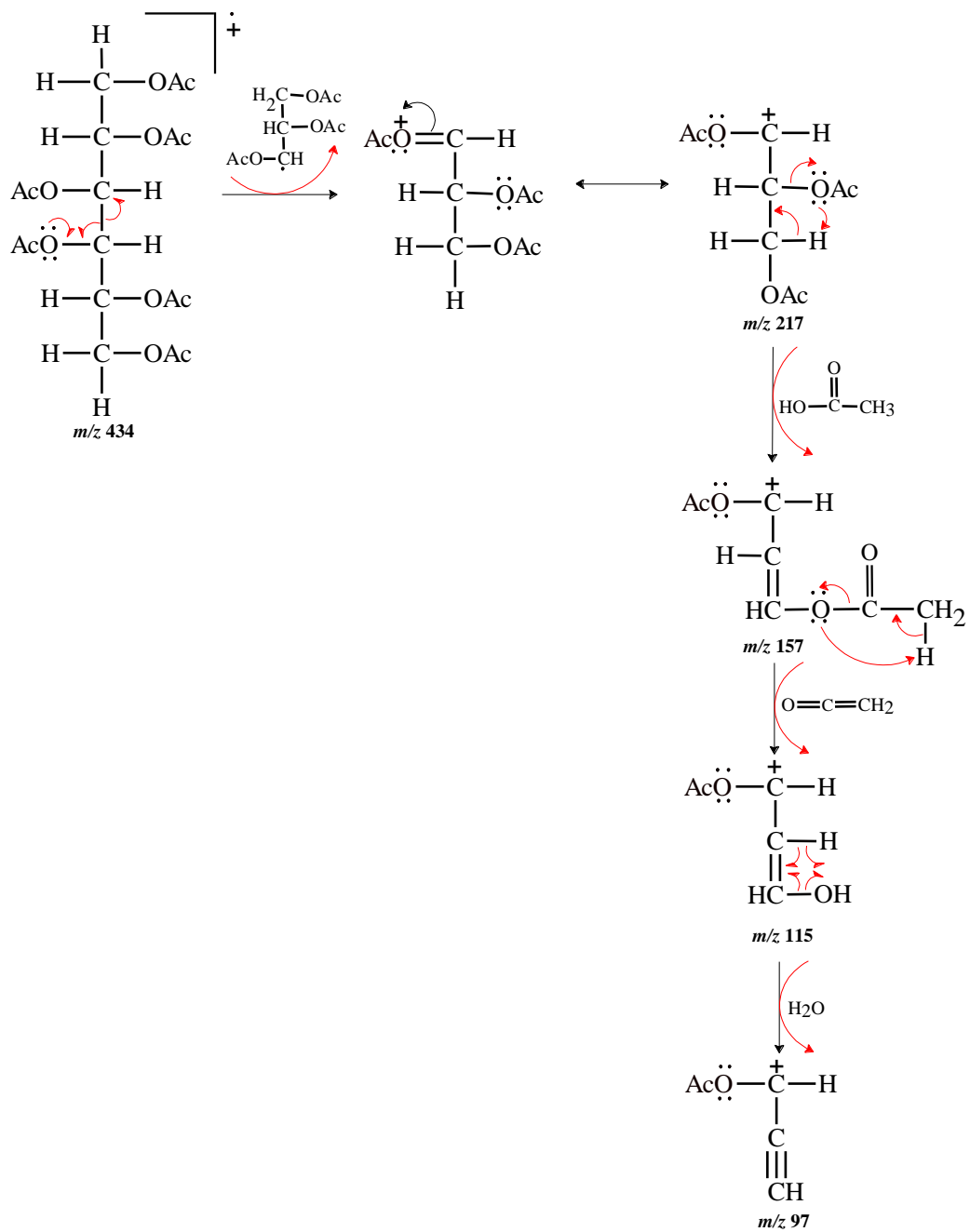




→ PENTOSE

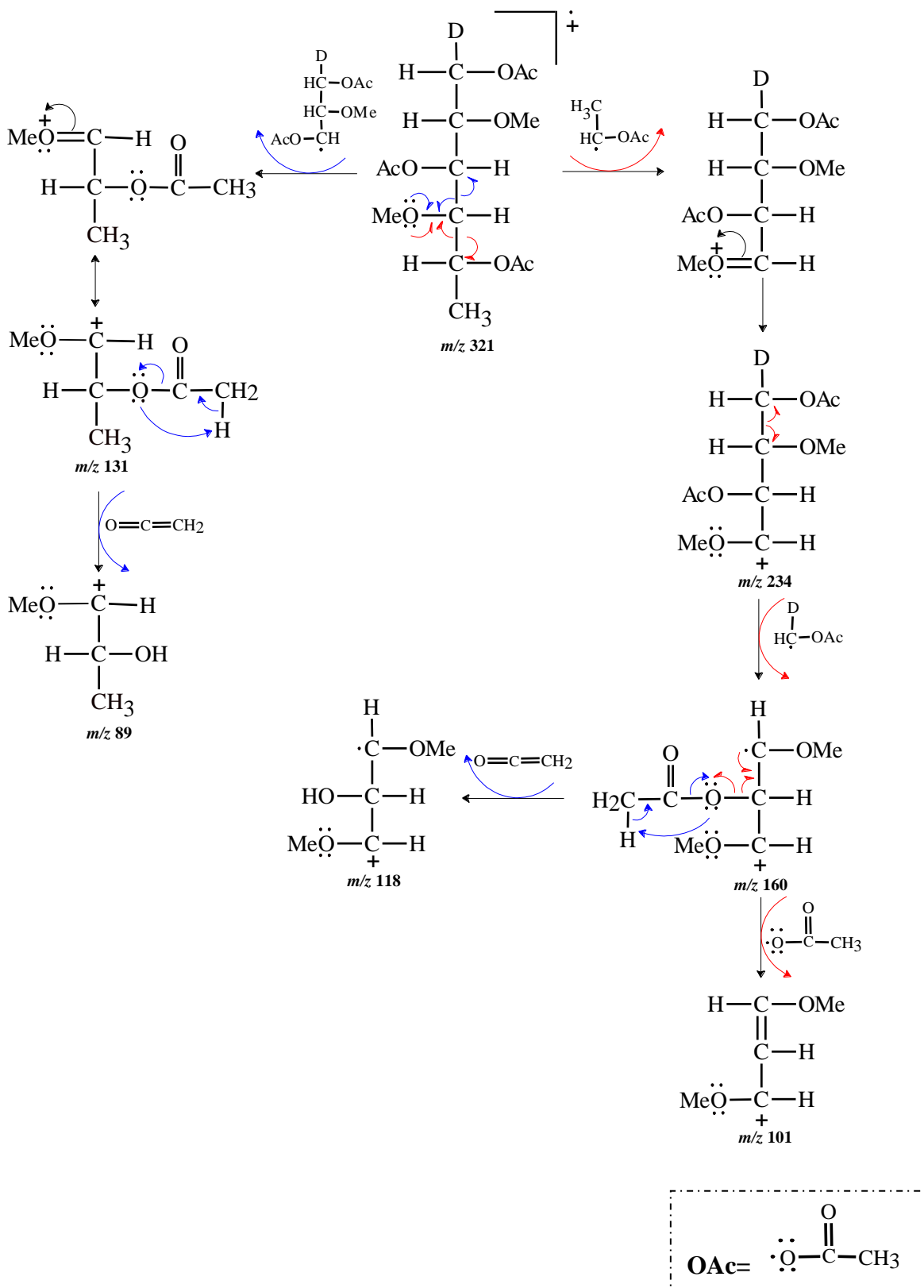


→ **HEXOSE**

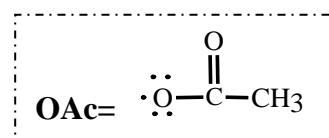
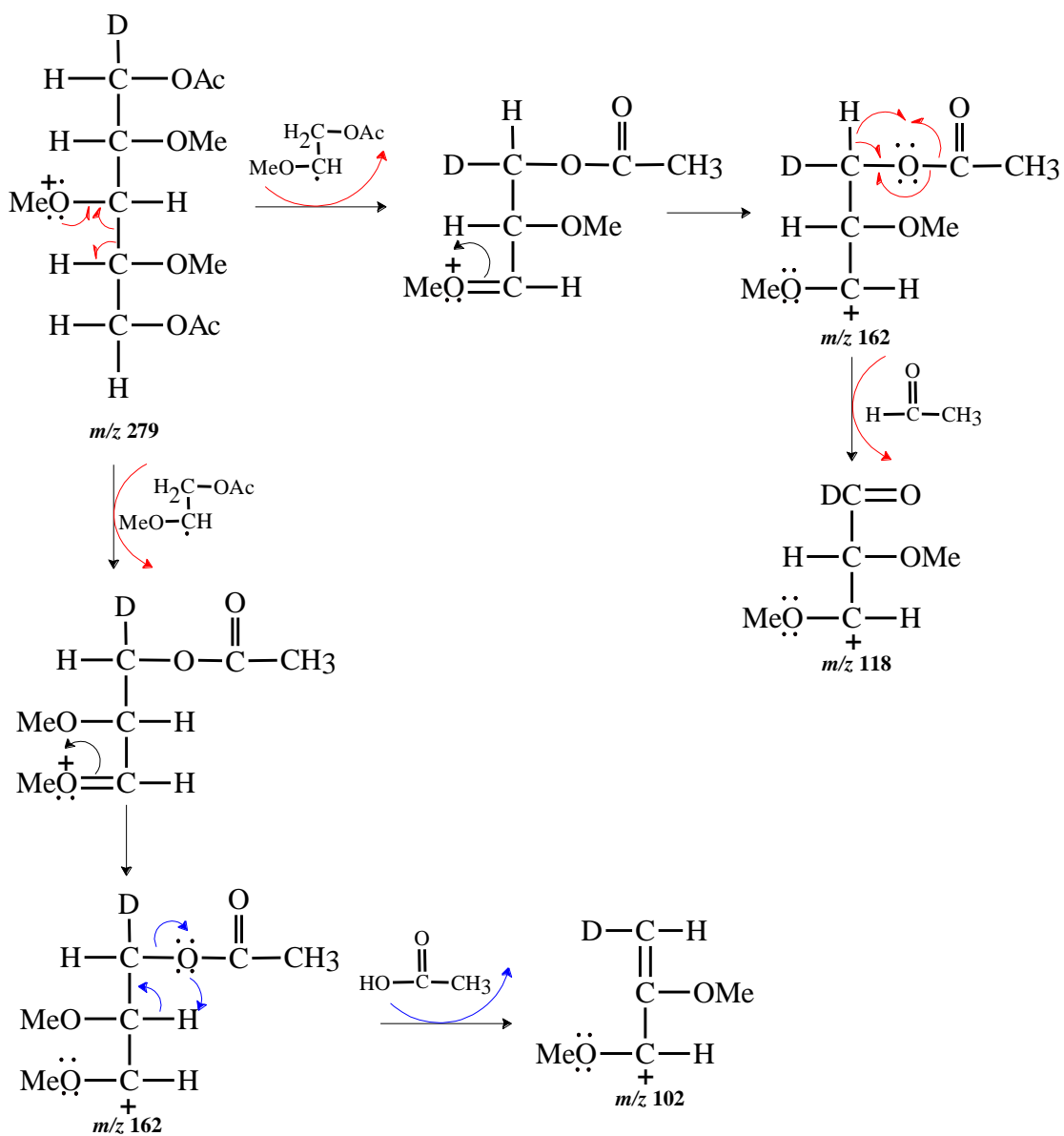


APÊNDICE D - Principais fragmentos secundários dos acetatos de alditéis parcialmente metilados

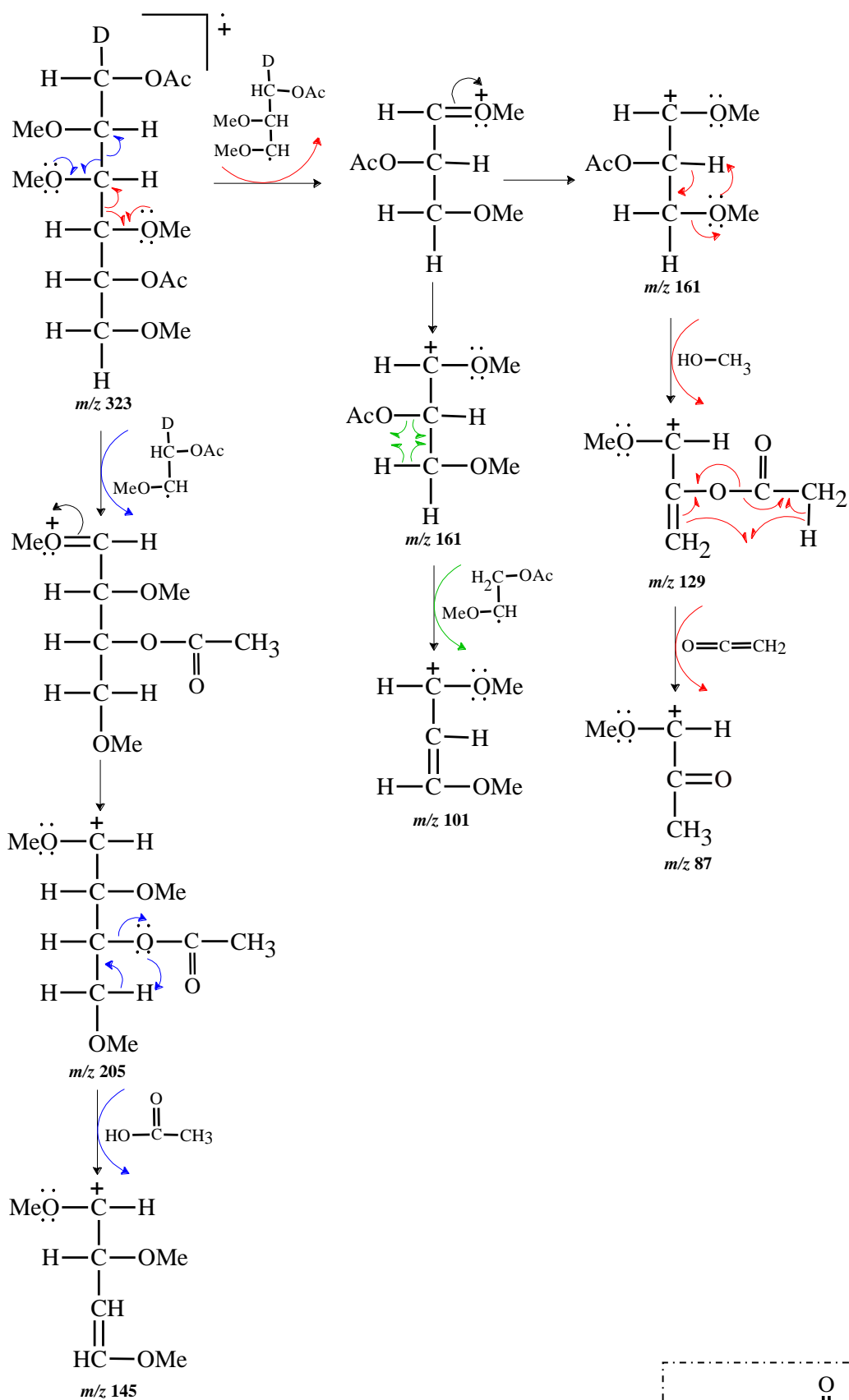
→ **2,4-Me₂-Desoxi-Hexose**



→ 2,3,4-Me₃-Pentose



→ 2,3,4,6-Me₄-Hexose



→ 3,4-Me₂-Hexose

