



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

EVANDRO LEITE BITENCOURT

**PROSPECÇÃO QUÍMICA DE CARBOIDRATOS ISOLADOS DOS
BASIDIOMAS DAS LINHAGENS BRANCA E CINZA DO COGUMELO
MEDICINAL *Grifola frondosa* (“Maitake”)**

**CATALÃO - GO
2015**

EVANDRO LEITE BITENCOURT

**PROSPECÇÃO QUÍMICA DE CARBOIDRATOS ISOLADOS DOS
BASIDIOMAS DAS LINHAGENS BRANCA E CINZA 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

2015

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

Bitencourt, Evandro Leite

Prospecção química de carboidratos isolados dos basidiomas das linhagens branca e cinza do cogumelo medicinal *Grifola frondosa* ("Maitake") [manuscrito] / Evandro Leite Bitencourt. - 2015. xviii, 99 f.

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, 2015.

Bibliografia. Apêndice.

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

1. Cogumelos medicinais . 2. Grifola frondosa . 3. Polissacarídeos. I. Carbonero, Elaine Rosechrer, orient. II. Ruthes, Andrea Caroline, co orient. III. Título.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química



*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado do candidato **Evandro Leite Bitencourt** realizada em 31 de março de 2015.*

Profa. Dra. Elaine Rosecher Carbonero

Profa. Dra. Carolina Patrícia Aires

Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino

DEDICO

Aos meus pais que sempre lutaram para que eu pudesse chegar até aqui.

Obrigado pela paciência, amor e pelo incentivo.

A maior herança que um pai pode deixar ao seu filho são os estudos.

À minha irmã Rafaella pela amizade, companheirismo e força.

Obrigado por tudo!

À minha excelentíssima orientadora Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero.

Você é minha segunda mãe, obrigado por cada momento ao seu lado.

Obrigado pela sua dedicação, amor, paciência, amizade...

Devo tudo à você! Obrigado por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo meus agradecimentos é porque consegui atingir mais uma etapa de objetivos na minha vida e devo isso a muitas pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para que esse trabalho pudesse se concretizar. Entretanto, agradeço em especial:

A Deus, que me concede forças para continuar caminhando e atingindo meus objetivos. A Ele, agradeço todos os dias pelo dom da vida e por poder estar aqui.

À minha segunda mãe e orientadora, Elaine Rosechrer Carbonero, pela amizade, carinho, humildade, dedicação e ética. Seria inútil tentar descrever em palavras tamanho amor. Deixar seu filho em casa, com um mês de nascimento e vir para o laboratório, para me auxiliar e ensinar, não tem preço. Obrigado pelos puxões de orelha, brincadeiras, momentos de descontração e, principalmente, por acreditar em mim. Por tudo isso, eu já estou sentindo saudades do mestrado. Você é simplesmente tudo pra mim!!!

À Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, pela amizade verdadeira. Obrigado pelos momentos de tensões, descontrações, alegrias, brincadeiras. A sua contribuição na minha formação pessoal e acadêmica é imensurável. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Richele Priscila Severino, que sempre me auxiliou, orientou e me incentivou a prestar o mestrado. Devo muito a você.

À Dra. Ana Paula Terezan, pela amizade, companheirismo e por auxiliar muito no laboratório, principalmente na troca de experiências com os equipamentos e pesquisa. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Lincoln Lucílio Romualdo, pelas inúmeras ajudas no CG-EM. Foram muitas noites, sábados e domingos me auxiliando. Sou muito grato a você.

À minha co-orientadora, Andrea Caroline Ruthes, pelas inúmeras análises de *HPSEC* realizadas.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, do Departamento de Química, da Universidade Federal de São Carlos, e ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás pelas análises de RMN.

A todos os professores do Departamento de Química, pelos seis anos de convivência, sou grato pelos bons momentos durante toda a graduação e a pós.

À Profa. Dra. Luciana Melo Coelho, coordenadora do programa de Pós-Graduação. Agradeço muito por ter conhecido você. Sua pureza me encanta.

À minha querida companheira de bancada e de área, Estefânia, obrigado por tudo, por compartilhar comigo momentos de alegrias e tristeza. Você é uma pessoa fantástica e não tenho dúvidas do seu sucesso. Com você, o mestrado foi mais fácil.

A todos os amigos do laboratório de produtos naturais, Andreia, Antônia, Felipe, Juliana, Michelle Nauara, Leonardo, Letícia e Renan.

Aos companheiros do mestrado, Michelle Machado, João Gabriel e Luciana. Foram muitas brigas, discussões e brincadeiras. Só ficaram lembranças boas das aulas de Cromatografia e de Química Orgânica Avançada. Esse mestrado foi muito proveitoso e divertido com vocês. Obrigado pela amizade sincera!

Aos outros amigos dos laboratórios de Química de Materiais e Meio Ambiente: Rafaela, Priscila, Raphael Lucas e Marta.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Carol, Milleny, Ariadne e Weber. Obrigado por terem compartilhado bons momentos de alegrias, durante esses quatro anos.

Aos técnicos Glenda, Márcia e Régis e as estagiárias Carolina e Marina pela disposição em servir sempre. Obrigada.

Aos meus pais, por me oferecerem todas as condições propícias para os estudos, pelo companheirismo, por sempre estarem ao meu lado me tratando com amor, incentivando-me cada dia mais e mais. Não há palavras para descrever esse amor incondicional.

À minha irmã, Rafaella, pelo carinho, amizade, amor, brigas que contribuíram muito para eu chegar até aqui. Obrigado por acreditar em mim. Te amo!

Aos meus avôs, José Leite e Benedito (*In memoriam*), pelos valores transmitidos de honestidade, humildade e solidariedade. Saudades eternas!

À minhas avós Lindalva e Maria Geralda, pelo amor e carinho.

Ao meu cunhado, Romero, pelos inúmeros favores prestados na assistência elétrica, para instalação dos aparelhos do laboratório para que eu pudesse trabalhar.

Ao meu tio, Ney Coelho, pelas experiências de estudos trocadas, pelo incentivo, pelo emprego que contribuiu muito com o meu amadurecimento pessoal. Obrigado!

A uma pessoa muito especial em minha vida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos os meus familiares e amigos que contribuíram para que eu chegasse até aqui. MUITO OBRIGADO!!!

“ ...Tudo é do Pai. Toda honra e toda glória, é dele a vitória alcançada em minha vida...”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Os cogumelos têm sido valorizados como alimento funcional e suplemento alimentar para a humanidade, devido à presença de substâncias com alto valor nutricional e/ou medicinal. Dentre os cogumelos reconhecidos pelas suas propriedades terapêuticas encontra-se o *Grifola frondosa*, popularmente conhecido como *Maitake*, o qual possui importantes ações farmacológicas como antitumoral, imunomoduladora, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras, as quais têm sido relacionadas, principalmente, aos seus carboidratos. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação química dos polissacarídeos dos basidiomas das duas linhagens (branca e cinza, representadas como *Gfb* e *Gfc*, respectivamente) de *G. frondosa* que vem sendo cultivadas no Brasil. A partir destes foram obtidas as β -glucanas ramificadas contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) e os heteropolissacarídeos formados principalmente por galactose (heterogalactana) ou manose (heteromanana). A heterogalactana constituída, principalmente, por fucose (15,7%), manose (20,5%) e galactose (63,8%), foi denominada de fucomanogalactana (FMG-*Gfb*). Esta contém uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp e de 3-O-Me- α -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 6), as quais se apresentam parcialmente substituídas em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp e em menor proporção com terminais não redutores de α -L-Fucp e α -D-Manp. A heteromanana, composta por fucose (6,9%), xilose (33,1%) e manose (60,0%), ou seja, uma fucoxilomanana (FXM-*Gfc*) mostrou ser constituída por uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp (1 \rightarrow 3) ligadas, sendo uma parte destas substituídas em O-3 por cadeias laterais formadas por fucose e xilose. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que não há diferenças significativas entre os carboidratos de ambas as linhagens, evidenciando que a linhagem branca deve apresentar os efeitos terapêuticos atribuídos aos carboidratos da outra linhagem.

Palavras-chave: Cogumelos medicinais; *Grifola frondosa*; polissacarídeos.

ABSTRACT

Mushrooms have been valued as a functional food and dietary supplement for humanity, due to the presence of substances with high nutritional value and/or therapeutic. Among the mushrooms recognized for its therapeutic properties we have is the leafy *Grifola*, popularly known as "Maitake", which has important pharmacological actions such as anti-tumor, immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant, and others, which have been mainly related to its carbohydrates. Nevertheless, this study aimed to review the chemistry of the polysaccharides from mushroom of the two lines ("white" and "gray", represented as *Gfb* and *Gfc*, respectively) of *G. frondosa* leafy that have been cultivated in Brazil. From these type it was obtained branched β -glucans containing links of type (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) and heteropolysaccharides formed mainly by galactose (heterogalactan) or mannose (heteromannan). The heterogalactan composed mainly of fucose (15.7%), mannose (20.5%) and galactose (63.8%) was denominated fucomannogalactan (FMG-*Gfb*). It contains a main chain consisting of units of α -D-Galp and 3-Me-O- α -D-Galp connected (1 \rightarrow 6), which are present partially substituted by O-2 disaccharide 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp to a lesser extent with terminal non-reducing α -L-Fucp and α -D-Manp. The heteromannan composed of fucose (6.9%), xylose (33.1%) and mannose (60.0%), a fucoxylomannan (FXM-*Gfc*) was found to be composed of a backbone of units α -D-Manp (1 \rightarrow 3) connected, and a part of them substituted by O-3 side chains made of fucose and xylose. The results of this study suggest that there are no significant differences between the carbohydrate of both strains, showing that white strain it provide the therapeutic effects attributed to carbohydrates of another strain.

Keywords: Medicinal mushroom; *Grifola frondosa*; polysaccharides.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura do corpo de frutificação de um basidiomiceto	02
FIGURA 1.2 - Suplementos a base de cogumelos comercializados pela empresa <i>Mushroom Wisdom</i> [®]	04
FIGURA 1.3 - Estrutura da β -glucana frequentemente encontrada em basidiomicetos.....	06
FIGURA 1.4 - Representação esquemática dos fragmentos presentes nas galactanas isoladas de basidiomicetos..	11
FIGURA 1.5 - Representação esquemática dos principais fragmentos presentes nas heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.....	13
FIGURA 1.6 - Representação esquemática da estrutura da fucogalactana isolada de <i>Polyporus ovinus</i> (A) e de <i>Fomes annosus</i> (B).....	14
FIGURA 1.7 - Representação esquemática da estrutura da manogalactana isolada de <i>P. geesteranus</i>	15
FIGURA 1.8 - Representação esquemática da estrutura da glucogalactana isolada de <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
FIGURA 1.9 - Representação esquemática da estrutura da fucomanogalactana isolada de <i>Lentinus edodes</i> e <i>Amanita muscaria</i>	16
FIGURA 1.10 - Representação esquemática da estrutura da manofucogalactana isolada de <i>Armillaria mellea</i>	16
FIGURA 1.11 - Representação esquemática da estrutura da manofucogalactana isolada de <i>Polyporus fomentarius</i>	17

- FIGURA 1.12** - Representação esquemática das principais estruturas presentes nas heterogalactanas isoladas de *Flammulina velutipes* e *Laetiporus sulphureus*..... 17
- FIGURA 1.13** - Representação esquemática das principais estruturas presentes na manofucogalactana de *Fomitella fraxinea*. 17
- FIGURA 1.14** - Representação esquemática da manofucogalactana isolada de *Polyporus giganteus*..... 18
- FIGURA 1.15** - Representação esquemática da estrutura da fucoglucogalactana isolada de *Hericiium erinaceus*..... 18
- FIGURA 1.16** - Representação esquemática dos principais fragmentos de cadeias principais presentes nas heteromananas isoladas de basidiomicetos.. 25
- FIGURA 1.17** - Representação esquemática dos principais fragmentos de cadeias laterais presentes nas xilomananas isoladas de basidiomicetos.. 26
- FIGURA 1.18** - Representação esquemática da estrutura das xilomananas isoladas de *Armillaria mellea* (**A**), *Polyporus tumulosus* (**B**) e *Flammulina velutipes* (**C**)..... 27
- FIGURA 1.19** - Representação esquemática dos principais fragmentos de cadeias laterais presentes nas fucoxilomananas isoladas de basidiomicetos.. 28
- FIGURA 1.20** - Representação esquemática das estruturas das fucoxilomananas isoladas de *Polyporus pinicola* (A), *Fomes annosus* (B) e *Ganoderma lucidum* (C). 29
- FIGURA 1.21** - Foto do basidiomiceto *G. frondosa* linhagem branca (I) e linhagem cinza (II).. 33

- FIGURA 1.22** - Fração-D obtida de *G. frondosa*, comercializada na forma de cápsulas e na forma líquida..... 35
- FIGURA 3.1** - Esquema de extração dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagens branca e cinza, por extrações aquosas e alcalinas 39
- FIGURA 3.2** - Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca, por extração aquosa a frio..... 41
- FIGURA 3.3** - Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca, por extração aquosa a quente..... 42
- FIGURA 3.4** - Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca, por extração aquosa alcalina 42
- FIGURA 3.5** - Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem cinza, por extração aquosa a quente. 44
- FIGURA 3.6** - Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem cinza, por extração aquosa alcalina 45
- FIGURA 3.7** - Esquema de purificação dos polissacarídeos da fração IK-*Gfc* de *G. frondosa* linhagem cinza..... 45
- FIGURA 3.8** - Esquema de obtenção dos acetatos de alditóis a partir dos polissacarídeos para análise em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). 47
- FIGURA 3.9** - Esquema do processo de degradação controlada de Smith da GLC1-*Gfc* (fração SFMRKG-*Gfc*) e GLC2-*Gfc* (fração SFSSAPK-*Gfc*).. 48
- FIGURA 4.1** - Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações CW, HW e K de *G. frondosa* linhagem branca (*Gfb*)..... 53

- FIGURA 4.2** - Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações HW e K de *G. frondosa* linhagem cinza (*Gfc*)..... 54
- FIGURA 4.3** - Perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis (A: ribose, B: fucose; C: arabinose, D: xilose; E: 3-O-Me-Gal, F: manose, G: galactose e H: glucose)..... 55
- FIGURA 4.4** - Estrutura dos monossacarídeos presentes nos extratos obtidos dos basidiomas das duas linhagens de *G. frondosa* 58
- FIGURA 4.5** - Perfil de eluição das frações SCW-*Gfb* (A), MECW-*Gfb* (B) e MRCW-*Gfb* (C), por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS)..... 61
- FIGURA 4.6** - Espectro de RMN de ^{13}C da fração MRCW-*Gfb* de *G. frondosa* linhagem branca, analisada em D_2O a 50°C 62
- FIGURA 4.7** - Espectro de RMN de ^{13}C da fração $\text{PF}_2\text{MRCW-}Gfb$ de *G. frondosa* linhagem branca, analisada em D_2O a 50°C 63
- FIGURA 4.8** - Espectro de HSQC da fração $\text{PF}_2\text{MRCW-}Gfb$ de *G. frondosa* linhagem branca, analisada em D_2O a 50°C , com inserto ampliado da região de C-6 da *Fucp* (A_1) e de C-6 do HSQC-DEPT (B) 64
- FIGURA 4.9** - Principais fragmentos observados para a fucomanogalactana isolada dos basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa* 66
- FIGURA 4.10** - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS), das frações SHW-*Gfb* (A) e SHW-*Gfc* (B) 70

- FIGURA 4.11** - 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-*Gfb* e SK-*Gfc*. 73
- FIGURA 4.12** - Espectros de RMN de ^{13}C da fração MRK-*Gfc* (A) e MRK-*Gfb* (B) de *G. frondosa*, analisadas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 70°C 74
- FIGURA 4.13** - Estrutura da β -glucana (fração MRK) obtida dos basidiomas de *G. frondosa* (linhagens branca e cinza). 75
- FIGURA 4.14** - Espectro de RMN de ^{13}C da fração SFSSAIK-*Gfc*, analisada em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 70°C 77
- FIGURA 4.15** - Espectro de RMN de ^{13}C das frações DS-SFMRKG-*Gfc* (A) e DS-SFSSAIK-*Gfc* (B) analisadas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 50°C 78
- FIGURA 4.16** - Espectro de RMN de ^{13}C da fração PF₂MEK-*Gfc* analisada em D_2O , a 50°C 80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - β -glucanas isoladas dos basidiomas de basidiomicetos.....	08
TABELA 1.2 - Atividade biológica de algumas β -glucanas isoladas de basidiomicetos.....	10
TABELA 1.3 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.....	19
TABELA 1.4 - Atividade biológica de algumas heterogalactanas isoladas dos basidiomas de cogumelos.....	24
TABELA 1.5 - Heteromananas isoladas de basidiomicetos.....	31
TABELA 3.1 - Condições de análises utilizadas para a análise de carboidratos no CG-EM.	50
TABELA 4.1 - Composição monossacarídica das frações obtidas a partir dos extratos aquosos (CW e HW) e alcalinos (K) de <i>G. frondosa</i> linhagem cinza (<i>Gfc</i>) e linhagem branca (<i>Gfb</i>).....	59
TABELA 4.2 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem branca de <i>G. frondosa</i> , por extração aquosa a frio.....	60
TABELA 4.3 - Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da fucomanogalactana isolada da linhagem branca de <i>G. frondosa</i>	65
TABELA 4.4 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem branca de <i>G. frondosa</i> , por extração aquosa a quente.....	69

TABELA 4.5 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem cinza de *G. frondosa*, por extração aquosa a quente..... 69

TABELA 4.6 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem cinza de *G. frondosa*, por extração alcalina. 72

TABELA 4.7 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa* por extração alcalina 73

TABELA 4.8 - Assinalamentos de ^{13}C da β -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) (frações MRK-Gfb e MRK-Gfc) isolada de *G. frondosa*..... 76

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-O-Me-D-Gal	- 3-O-metil-D-Galactose
α	- Alfa
β	- Beta
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
kDa	- Quilodalton
g	- Gramas
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	- Metro
μm	- Micrômetro
μL	- Microlitro
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
h	- Hora
min	- Minuto
$^{\circ}\text{C}$	- Celsius

m/v	- Razão massa/volume
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
MWCO	- Massa molecular de corte
mm	- Milímetro
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
rpm	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoacético
TMS	- Tetrametilsilano
T_R	- Tempo de retenção
v/v	- Razão volume/volume
%	- Porcentagem
~	- Aproximadamente
MHz	- MegaHertz
δ	- Deslocamento químico
Me ₂ SO	- Dimetilsulfóxido
Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FUNGOS	1
1.2 MACROMICETOS.....	2
1.3 IMPORTÂNCIA DOS MACROMICETOS	3
1.4 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS.....	5
1.4.1 Homopolissacarídeos	6
1.4.2 Heteropolissacarídeos.....	12
1.5 <i>Grifola frondosa</i>	33
2. OBJETIVOS	37
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	38
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	38
3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	38
3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	40
3.3.1 Fracionamento dos polissacarídeos da linhagem branca de <i>G. frondosa</i>	40
3.3.2 Fracionamento dos polissacarídeos da linhagem cinza de <i>G. frondosa</i>	43
3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	46
3.4.1 Composição Monossacarídica	46
3.4.2 Oxidação dos Polissacarídeos com Periodato de Sódio	47
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	48
3.5.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	49
3.5.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)...	49
3.5.3 Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS).....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO CW- <i>Gfb</i>	59
4.2 POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES HW- <i>Gfb</i> e HW- <i>Gfc</i>	68
4.3 POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES K- <i>Gfb</i> e K- <i>Gfc</i>	71
5. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 – FUNGOS

Os fungos, comumente chamados de bolores, leveduras, mofos, cogumelos e trufas (BURGE, 1992; BONONI, GRANDI, 1998), constituem um grupo de organismos, geralmente, filamentosos e multicelulares (PUTZKE, PUTZKE, 2004). Eles exploram habitats diversos como solo, plantas e animais, que contenham matéria orgânica passível de colonização, podendo ser parasitas ou sapróbios (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004). Eles são utilizados na indústria para a produção de uma vasta gama de produtos químicos, incluindo a maior parte dos antibióticos, muitos ácidos orgânicos e etanol (BURGE, 1992; BONONI, GRANDI, 1998).

O Reino Fungi é subdividido em cinco filos incluindo Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Eles diferem uns dos outros principalmente na ontogênese, filogenia, reprodução sexuada e assexuada, na produção de esporos e nos elementos constituintes da parede celular (MORADALI et al., 2007).

A maioria destes organismos existe e cresce sob a forma de uma rede espalhada ou micélio (parte vegetativa) vivendo principalmente como hifas. As hifas crescem a partir da extremidade, e alimentam de forma heterotrófica. Isto significa que fungos não podem realizar a fotossíntese como as plantas e algas que são autotróficas (HOOD, 2006).

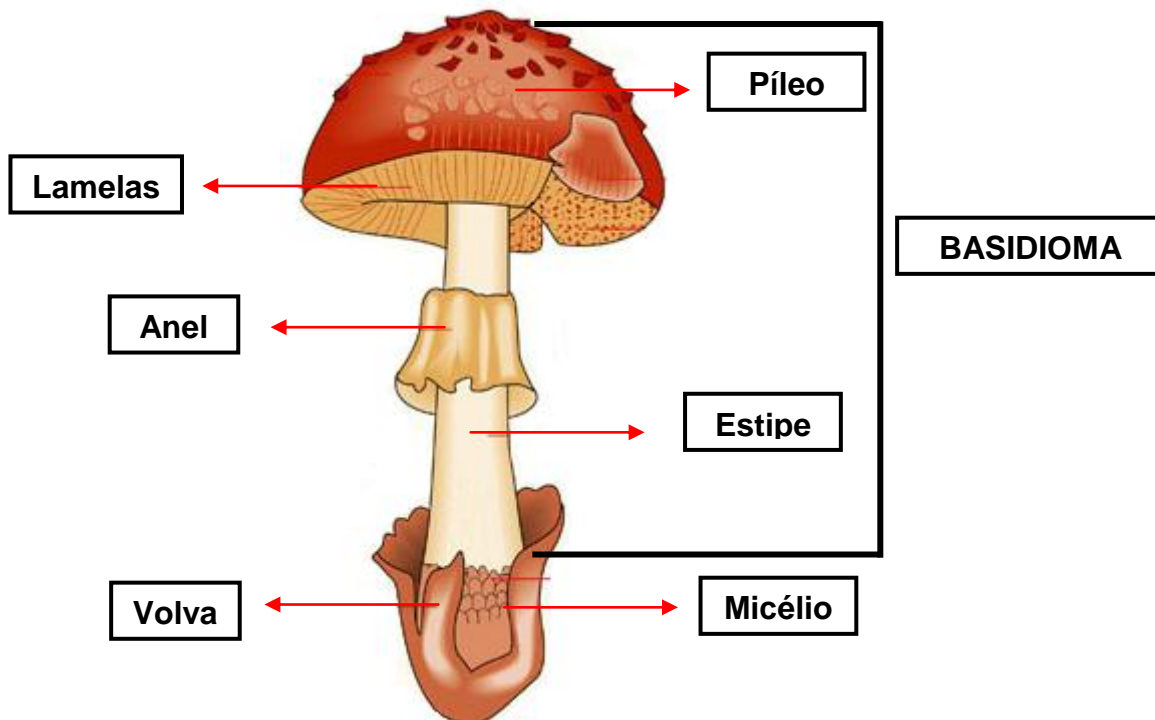
Como a maioria dos organismos, esses seres, pela ação de um grande número de vias metabólicas, podem armazenar energia para a manutenção, crescimento, reprodução e obter os constituintes celulares de uma variedade de meio em que se encontram e incorporam às suas células (assimilação), para poder processar e utilizar esses elementos em distintas vias metabólicas (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004).

1.2 – MACROMICETOS

O termo macromicetos engloba todos os cogumelos que podem ser observados macroscopicamente, incluindo além dos basidiomicetos alguns ascomicetos. A principal característica diagnóstica dos basidiomicetos é a presença de um basídio, onde posteriormente aparecerão os basidiósporos (ESPOSITO, AZEVEDO 2004), que são esporos produzidos internamente no basídio após fusão nuclear e meiose, respectivamente. Cogumelo é um termo popular aplicável para os fungos que apresentam basidioma observável a olho nu, embora sejam de muitas variações na forma, tamanho e coloração, estas se mantêm razoavelmente constante nos diferentes grupos de fungos (MORADALI et al., 2007).

Os basidiomicetos apresentam uma estrutura de frutificação macroscópica, formada por hifas modificadas que formam pseudo-tecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (PUTZKE, PUTZKE, 2004) (Figura 1.1).

FIGURA 1.1 – Estrutura do corpo de frutificação de um basidiomiceto.



FONTE: modificado de THE VISUAL DICTIONARY, 2015.

1.3 – IMPORTÂNCIA DOS MACROMICETOS

Durante milênios, os cogumelos têm sido valorizados como alimento nutricional e suplemento alimentar para a humanidade, devido a presença de substâncias com alto valor nutricional e/ou medicinal. Nas últimas décadas, diversas pesquisas têm validado o conhecimento antigo a respeito da utilização destes cogumelos, considerando-os como potentes e únicas as propriedades biológicas apresentadas por compostos extraídos destes organismos.

Desta maneira, países como Japão, China, Coréia e Rússia vem utilizando preparações derivadas de cogumelo nas práticas clínicas modernas (MIZUNO, 1999; WASSER, WEIS 1999; RESHETNIKOV, WASSER, TAN, 2001; VAN GRIENSVEN, 2009; WASSER, 2010). Ao longo da metade do último século, estudos realizados nesses países, e mais recentemente, nos Estados Unidos têm comprovado o potencial terapêutico destes compostos na prevenção e tratamento do câncer (ZONG, CAO, WANG, 2012).

O valor comercial dos cogumelos aumentou muito com o avanço de estudos das suas propriedades medicinais, além do interesse por alimentos mais saudáveis com menos calorias e mais fibras (GHORAI et al., 2009), pois eles além de possuírem uma baixa quantidade de lipídeos, é uma fonte elevada de proteínas, aminoácidos essenciais, minerais essenciais para a nutrição como Mg, Ca, Fe, Zn e K (RACZ et al., 1996), e fornecem um conteúdo significativo de vitaminas B1, B2, B12, C, D e E (MATILLA et al., 2001; HELENO et al., 2010).

Diante disso, o uso dos cogumelos na produção de suplementos alimentares está se tornando um novo ramo da economia, considerando seu crescimento na utilização como terapia alternativa contra o câncer, pois diversos pacientes já apresentaram melhoras que vão desde a diminuição de tumores até a redução de efeitos colaterais da quimioterapia, provando que a ingestão dos cogumelos é uma terapia eficaz (HARDY, 2008).

Com isso, sua importância vem aumentando em função de um mercado em contínuo crescimento, pelos rápidos avanços tecnológicos melhorando a qualidade, a produtividade e o custo de produção, e pelas

ilimitadas opções de espécies que podem ser cultivadas (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004).

Os cogumelos representam uma importante e ampla inexplorada fonte de novos produtos farmacêuticos, pois existem aproximadamente 15.000 espécies conhecidas, sendo que cerca de 2000 são próprias para consumo humano e 650 destas possuem propriedades medicinais relatadas na literatura (RAI, TIDKE, WASSER, 2005).

Diante dessa riqueza como recurso medicinal, a empresa *Mushroom Wisdom*[®], sediada em East Rutherford, Nova Jersey, Estados Unidos, foi fundada em 1991 e é uma líder mundial no desenvolvimento, produção e pesquisa de suplementos alimentares de cogumelos (Figura 1.2), sendo seus produtos comercializados, principalmente, no Canadá, China, Japão, Nigéria, Porto Rico e Estados Unidos. A empresa comercializa produtos na forma de cápsulas tanto do extrato de cogumelos quanto de moléculas isoladas, fornecendo assim produtos com propriedades comprovadas para apoiar o sistema imunológico, a função do cérebro, os níveis de açúcar no sangue, a saúde da mama, da próstata entre outras.

FIGURA 1.2 – Suplementos a base de cogumelos comercializados pela empresa *Mushroom Wisdom*[®].



Fonte: *MUSHROOM WISDOM*[®], 2015.

1.4 – POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Os carboidratos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou substâncias que geram estes compostos quando hidrolisadas (NELSON, COX, 2011), eles compreendem, as mais abundantes moléculas orgânicas, estando presente nas células de todos os organismos vivos (SANZ, MARTÍNEZ-CASTRO, 2007). São divididos em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos de acordo com o tamanho.

Os basidiomicetos representam uma importante fonte de polissacarídeos com propriedades antitumorais e imunomodulatórias (MUKUMOTO, YAMAGUCHI, 1977; LEE et al., 2003; GONZAGA et al., 2005).

Muitas ações medicinais de cogumelos já foram estudadas, incluindo atividade antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antidiabéticas (ZHANG et al., 2007), antiparasitária, antimicrobiana, antibacteriana, desintoxicação, cardiovascular, entre outros (ZHU et al., 2015).

Diversas substâncias com atividade imunomoduladora e/ou atividade antitumoral tem sido isoladas a partir de cogumelos. Estas incluem polissacarídeos, complexos glicoproteicos, proteínas e triterpenoides (MORADALI et al., 2007; WASSER, 2011). Dentre os compostos isolados destes fungos, está bem estabelecido que os polissacarídeos sejam os principais compostos que atuam como modificadores da resposta biológica (ZONG, CAO, WANG, 2012).

Os efeitos terapêuticos destes compostos, tais como a atividade antitumoral, atividade anti-infecciosa e supressão de doenças autoimunes têm sido associadas, em muitos casos com o seu efeito imunomodulador. Os imunomoduladores podem ser agentes eficazes no tratamento e prevenção de doenças e enfermidades e no que diz respeito ao aumento de doenças que envolvem a disfunção imunológica e o câncer (MORADALI et al., 2007).

Nos basidiomicetos, os polissacarídeos podem ser encontrados de vários tipos, sendo na forma de homopolímeros, heteropolímeros, peptideopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (GOW, GADD, 1995).

Alguns estudos têm mostrado que existe uma relação entre a estrutura e a atividade biológica apresentada por estas moléculas (WASSER,

2002), ou seja, fatores como solubilidade em água, massa molecular e conformação estão diretamente ligados aos efeitos farmacológicos atribuídos aos carboidratos (OHNO, 2005; CHEN, SEVIOUR, 2007; ZHANG et al., 2007).

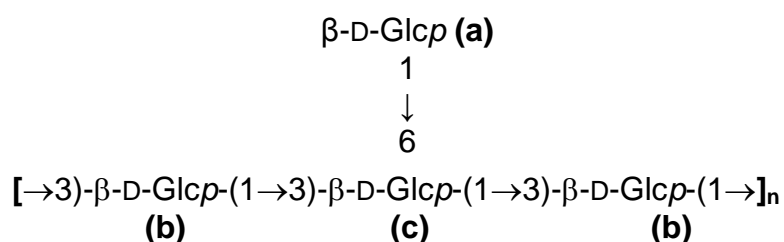
1.4.1 – Homopolissacarídeos

Dentre os diferentes carboidratos isolados de macrofungos, os homopolissacarídeos, polímeros constituídos por apenas um tipo de monossacarídeo, são os mais abundantes e comumente isolados destes organismos. A maioria destes é formada pelo monossacarídeo glucose constituindo as moléculas denominadas de glucanas, as quais se distinguem, principalmente, através do tipo de ligação glicosídica, anomericidade, massa molecular e grau de ramificação (THOMPSON, OYSTON, WILLIAMSON, 2010).

Diversas glucanas têm sido descritas na literatura para estes organismos, podendo apresentar cadeias lineares ou ramificadas, configuração glicosídica α - e/ou β -, e ligações glicosídicas principalmente do tipo (1→3) e (1→6).

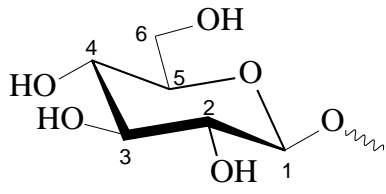
Dentre estas, as glucanas formadas por unidades de glucose com configuração glicosídica do tipo β , conhecidas como β -glucanas, são as frequentemente isoladas nestes fungos (Tabela 1.1, p. 8). A maioria destas apresenta uma cadeia principal de β -D-Glcp ligadas (1→3), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-6 por terminais não-redutores de β -D-Glcp (Figura 1.3).

FIGURA 1.3 – Estrutura da β -glucana frequentemente encontrada em basidiomicetos.

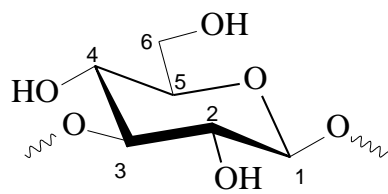


Legenda:

a) β -D-Glcp-(1 \rightarrow



b) \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow



c) \rightarrow 3,6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow

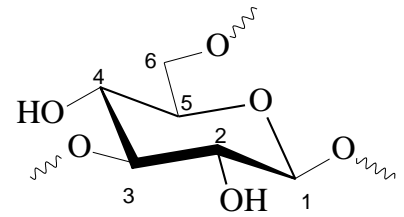


TABELA 1.1 - β -Glucanas isoladas do basidioma de basidiomicetos.

BASIDIOMICETO/ NOME DA FRAÇÃO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	REFERÊNCIAS
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: Grifolan-7N)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 2:1:1*	$M_w = 1200$ kDa $[\alpha]_D^{30} + 1,8^\circ$	IINO et al., 1985
<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-O-Glcp: 3,6-di-O-Glcp em uma proporção molar de 0,8:1,9:1,0, respectivamente	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-O-Glcp (49%) e 3,6-di-O-Glcp (25%), ou seja, proporção molar de ~ 1:2:1, respectivamente	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-O-Glcp (49%) e 3,6-di-O-Glcp (25%), ou seja, proporção molar de ~ 1:2:1, respectivamente	
<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-O-Glcp (58%) e 3,6-di-O-Glcp (19%), ou seja, proporção molar de ~ 1:3:1, respectivamente	SMIDERLE et al., 2006.
<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%)	AMARAL et al., 2008.
<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-O-Glcp (59,5%) e 3,6-di-O-Glcp (20,1%), ou seja, proporção molar de ~ 1:3:1, respectivamente	SANTOS-NEVES et al., 2008.

TABELA 1.1 - β -Glucanas isoladas do basidioma de basidiomicetos.

(Conclusão)

<i>Pleurotus florida</i> (Fração: PS-I)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:3*	Não descrita.	OJHA et al., 2010
<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-O-Glcp (19,4%) e 3,6-di-O-Glcp (40,5%), ou seja, proporção molar de ~ 2:1:2, respectivamente	CARBONERO et al., 2012.
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: GFPBW1)	β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)	Substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-Glcp Grau de substituição = 1:3*	$M_w = 300$ kDa	FANG et al., 2012
<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	RUTHES et al., 2013a.

*Frequência de substituição em relação à cadeia principal.

Várias destas β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) foram isoladas de diversos gêneros, sendo algumas destas comercializadas em países como o Japão devido aos efeitos terapêuticos apresentados por estes polímeros. Essas moléculas foram isoladas de diferentes gêneros e algumas destas são denominadas de acordo com a fonte da qual foram obtidas, sendo a grifolana, isolada de *Grifola frondosa*, a lentinana de *Lentinus edodes* e a esquizofilana de *Schizophyllum commune*. Essas glucanas apresentam atividade imunomodulatória, antitumoral e antiviral, respectivamente.

Várias β -glucanas foram avaliadas biologicamente e mostraram ser uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos, apresentando propriedades antitumorais, antibacterianas, anti-inflamatórias, entre outras (Tabela 1.2).

TABELA 1.2 – Atividade biológica de algumas β -glucanas isoladas de basidiomicetos.

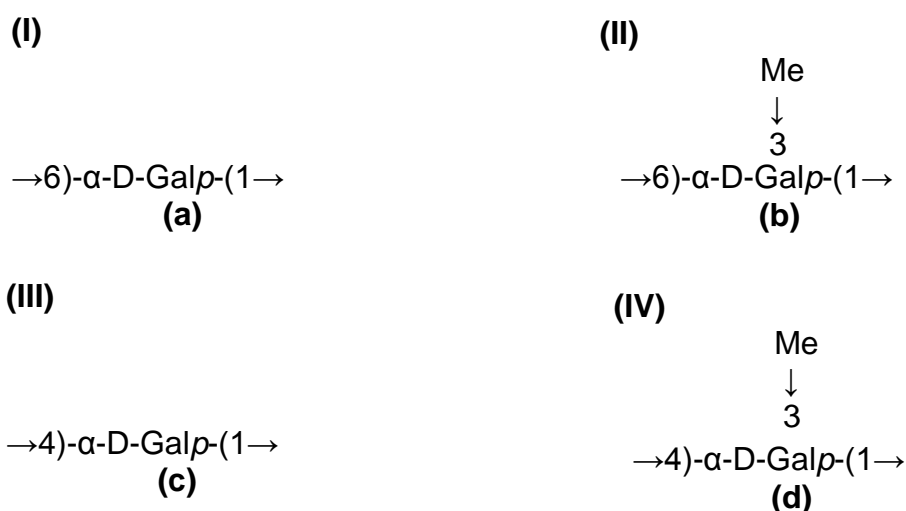
FONTE	EFEITO BIOLÓGICO	REFERÊNCIA
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: Grifolan-7N) Basidiomas	Antitumoral	IINO et al., 1985.
<i>Schizophyllum commune</i> (Fração: SPG) Basidiomas	Antiviral	MIZUNO et al., 1999.
<i>Lentinus edodes</i> (Fração: Não descrita) Basidiomas	Antitumoral	MIZUNO et al., 1999.
<i>Lentinula edodes</i> (Fração: Não descrita) Micélio	Antibacteriana	ISHIKAWA, KASUYA, VANETTI, 2001.
<i>Agaricus blazei</i> (Fração: FI) Basidiomas	Antidiabética	KIM et al., 2005.
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (Fração: Não descrita) Micélio	Antibacteriana	SHITTU et al., 2005
<i>Cortinarius ardesiacus</i> (Fração: Não descrita) Basidiomas	Antibacteriana	BEATTIE et al., 2010.
<i>Sarcodon aspratus</i> (Fração:HBP) Basidiomas	Imunomodulatória	HAN et al., 2010.
<i>Agaricus blasiliensis</i> (Fração:PLS) Basidiomas	Antiviral	MINARI et al., 2011.

TABELA 1.2 – Atividade biológica de algumas β -glucanas isoladas de basidiomicetos. (Conclusão)

<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fração: SGHW) Basidiomas	Imunomodulatória	CARBONERO et al., 2012.
<i>Dictyophora indusiata</i> (Fração: PPS) Basidiomas	Antioxidante	DENG et al, 2012
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: GFPBW1) Basidiomas	Antitumoral	FANG et al., 2012
<i>Amanita muscaria</i> (Fração: FSK2) Basidiomas	Anti-inflamatória e antinociceptiva	RUTHES et al., 2013a.

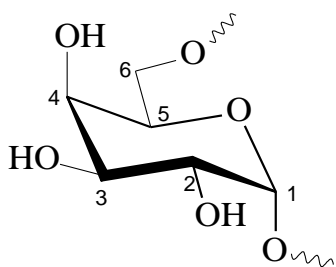
Além das glucanas, outros homopolissacarídeos também já foram isolados como algumas galactanas parcialmente metiladas isoladas do gênero *Pleurotus*. As galactanas isoladas dos basidiomas de *P. eryngii* e *P. ostreatoroseus* mostraram ser constituídas por α -D-galactopiranosose (Figura 1.4-I) e 3-O-metil- α -D-galactopiranosose (Figura 1.4-II) com ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6). (CARBONERO et al., 2008a), enquanto que a isolada a partir cultivo submerso de *P. ostreatoroseus* apresentou os mesmos constituintes, porem estes são conectados através de ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 4) (Figura 1.4-III e IV) (ROSADO et al., 2002).

FIGURA 1.4 - Representação esquemática dos fragmentos presentes nas galactanas isoladas de basidiomicetos.

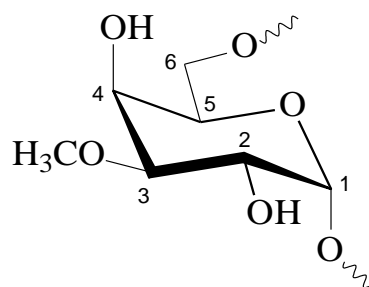


Legenda:

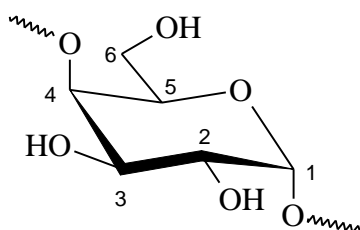
a) $\rightarrow 6$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow)



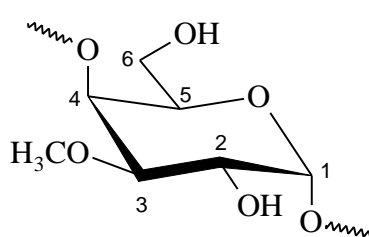
b) $\rightarrow 6$ -3-O-Me- α -D-Galp-(1 \rightarrow)



c) $\rightarrow 4$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow)



d) $\rightarrow 4$ -3-O-Me- α -D-Galp-(1 \rightarrow)



1.4.2- Heteropolissacarídeos

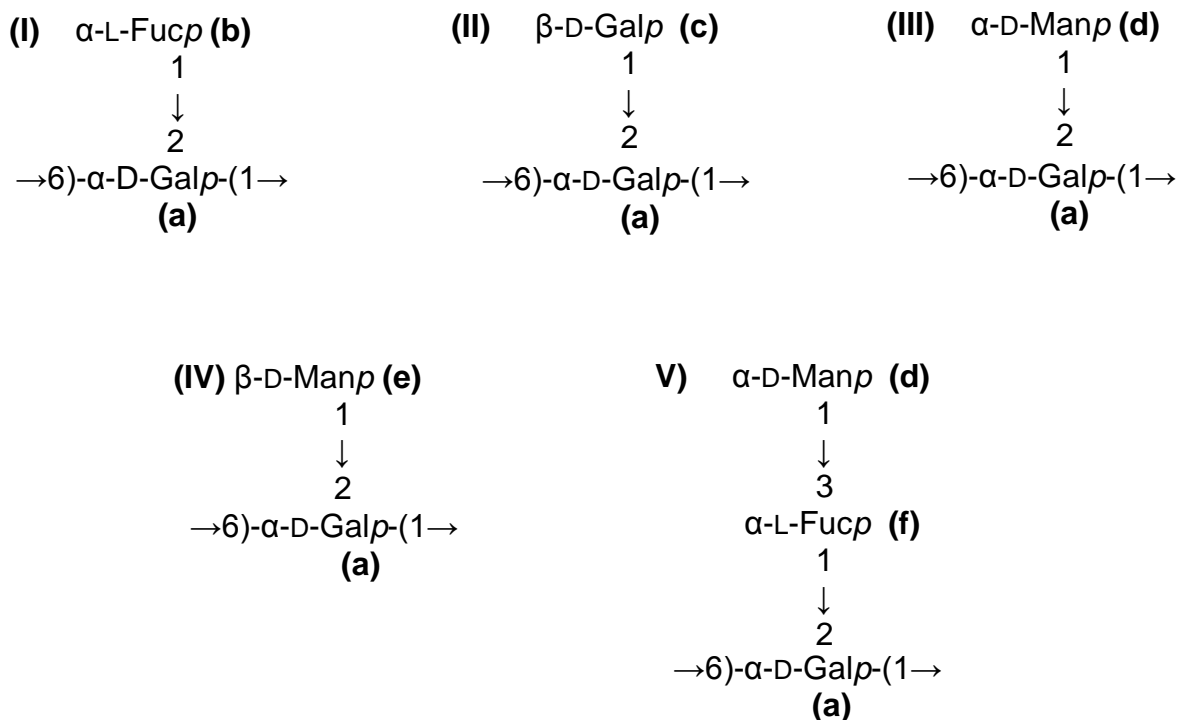
Ao contrário dos homopolímeros, os heteropolissacarídeos são formados pela união de diferentes monossacarídeos. Dentre os heteropolissacarídeos descritos para macrofungos, os isolados frequentemente são aqueles contendo galactose (heterogalactanas) ou manose (heteromananas), principalmente.

As heterogalactanas são polissacarídeos formados majoritariamente por galactose, as quais geralmente compõem a cadeia principal desses polímeros isolados dos cogumelos. Estes polímeros são denominados de acordo com a constituição e o percentual de cada monossacarídeo presente, ressaltando que, geralmente, o nome é atribuído pela ordem crescente dos teores de cada monossacarídeo.

Dentre as heterogalactanas descritas, a maioria apresenta uma cadeia principal constituída por α -Galp ligadas (1 \rightarrow 6) (Figura 1.4-I, p. 11), as quais podem apresentar grupos metil em O-3 (Figura 1.4-II, p. 11) e em O-2 substituições por diferentes cadeias laterais. Os grupos laterais descritos

podem ser terminais não redutores de α -L-Fucp (Figura 1.5-I), terminais não redutores β -D-Galp (Figura 1.5-II), terminais não redutores de α - ou β -D-Manp (Figura 1.5-III e IV, respectivamente) e o dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp (Figura 1.5-V).

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

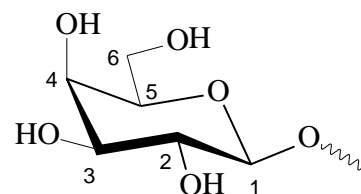
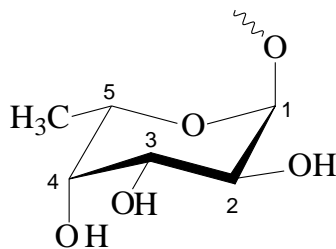
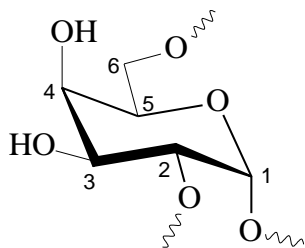


Legenda:

a) →2,6)- α -D-Galp-(1→

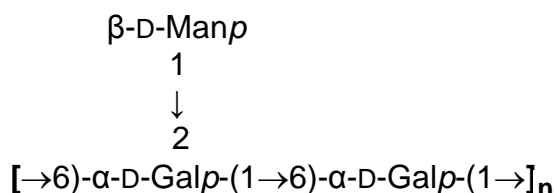
b) α -L-Fucp-(1→

c) β -D-Galp (1→



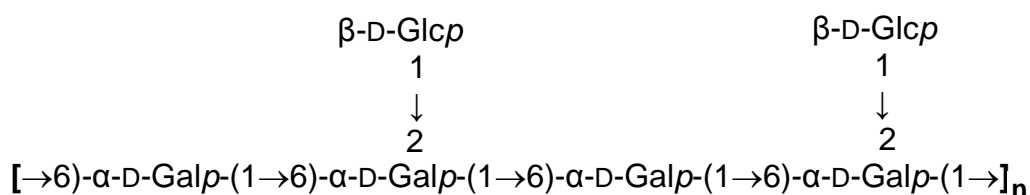
Por outro lado, heterogalactanas contendo apenas manose são chamadas de manogalactanas, as quais têm sido frequentemente isoladas de fungos do gênero *Pleurotus*, como *P. ostreatus* (JAKOVLJEVIC et al., 1998), *P. ostreatus var. florida*, *P. ostreatoroseus* (ROSADO et al., 2003), *P. pulmonarius* (SMIDERLE et al., 2008a), *P. sajor caju* (SILVA et al., 2011) e *P. geesteranus* (ZHANG et al., 2013) (Figura 1.7), sendo parcialmente substituídas em O-2 por unidades de β -D-Manp e em O-3 por grupos metil.

FIGURA 1.7 - Representação esquemática da estrutura da manogalactana isolada de *P. geesteranus*.



Além das moléculas anteriormente citadas, foi descrito para *P. ostreatus* uma heterogalactana parcialmente substituída em O-2 por terminais não redutores de β -D-Glcp, ou seja, uma glucogalactana (Figura 1.8) (SUN, LIU, 2009) (Tabela 1.3, p. 19).

FIGURA 1.8 - Representação esquemática da estrutura da glucogalactana isolada de *Pleurotus ostreatus*.



Heterogalactanas com estruturas complexas também tem sido descritas, as quais podem conter cadeias laterais com tamanho e composição diferentes. Estas são frequentemente compostas por terminais não redutores de L-Fucp, D-Manp, D-Glcp e/ou pelo dissacarídeo 3-O-D-Manp-L-Fucp, sendo chamadas de fucoglucogalactanas, fucomanogalactanas ou manofucogalactanas, de acordo com os teores de cada constituinte.

Heteropolissacarídeos contendo fucose, manose e galactose são denominados de fucomanogalactanas (teores de fucose < manose < galactose) ou manofucogalactanas (teores de manose < fucose < galactose). As fucomanogalactanas mais simples encontradas em cogumelos apresentam apenas terminais não redutores de α -L-Fucp e β -D-Manp como grupos laterais, as quais têm sido descritas em *Lentinus edodes* (CARBONERO et al., 2008b) e *Amanita muscaria* (RUTHES et al., 2013a) (Figura 1.9) (Tabela 1.3, p. 19).

FIGURA 1.9 - Representação esquemática da estrutura da fucomanogalactana isolada de *Lentinus edodes* e *Amanita muscaria*.



Fucomanogalactanas ou manofucogalactanas contendo o dissacarídeo 3-O- α -D-Manp- α -L-Fucp foram descritas para *Armillaria mellea* (BOUVENG, FRASER, LINDBERG, 1967; FRASER, LINDBERG, 1967) (Figura 1.10), *Polyporus fomentarius* (BJÖRNDAL, LINDBERG, 1969) (Figura 1.11, p. 17), *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO, YAMAGUCHI, 1977; SMIDERLE et al., 2008b), *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI et al., 2004) (Figura 1.12, p. 17), *Fomitella fraxinea* (CHO et al., 1998, 2011) (Figura 1.13, p. 17) (Tabela 1.3, p. 19).

FIGURA 1.10 - Representação esquemática da estrutura da manofucogalactana isolada de *Armillaria mellea*.

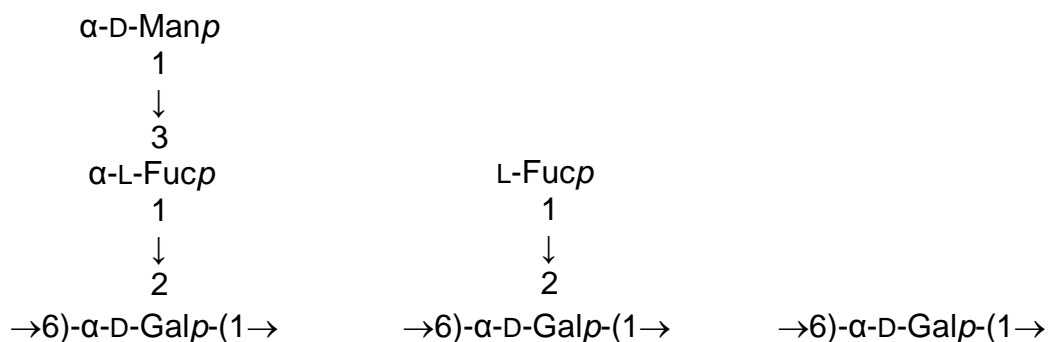


FIGURA 1.11 - Representação esquemática da estrutura da manufucogalactana isolada de *Polyporus fomentarius*.

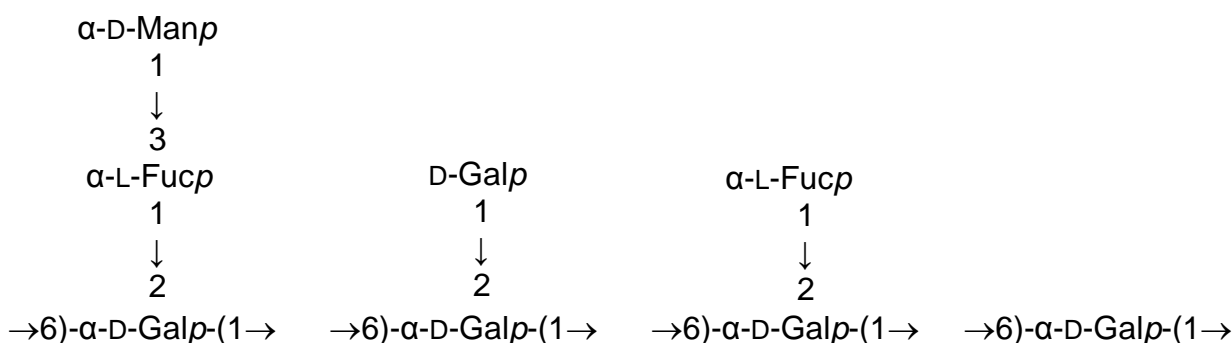


FIGURA 1.12 - Representação esquemática das principais estruturas presentes nas heterogalactanas isoladas de *Flammulina velutipes* e *Laetiporus sulphureus*.

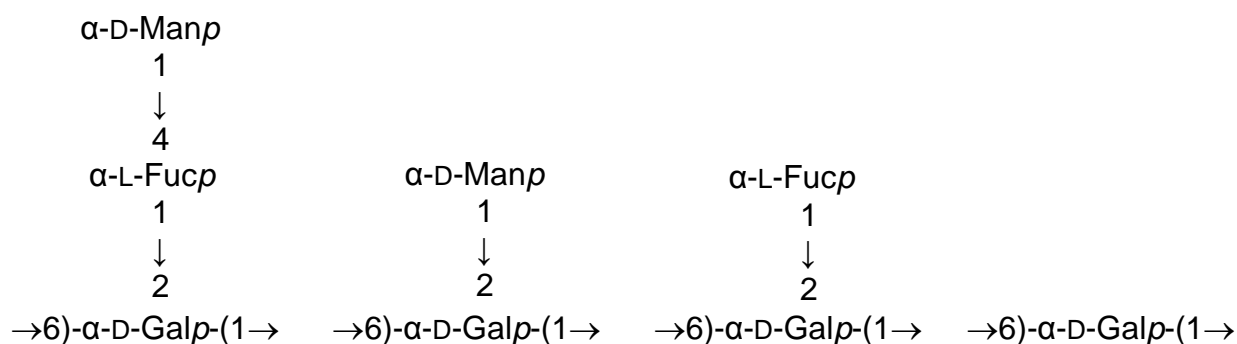
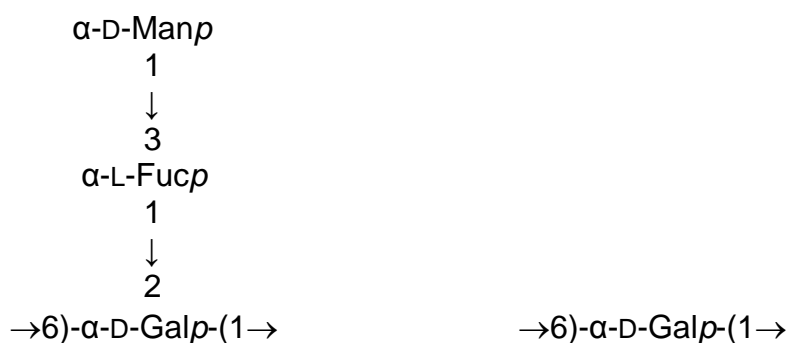


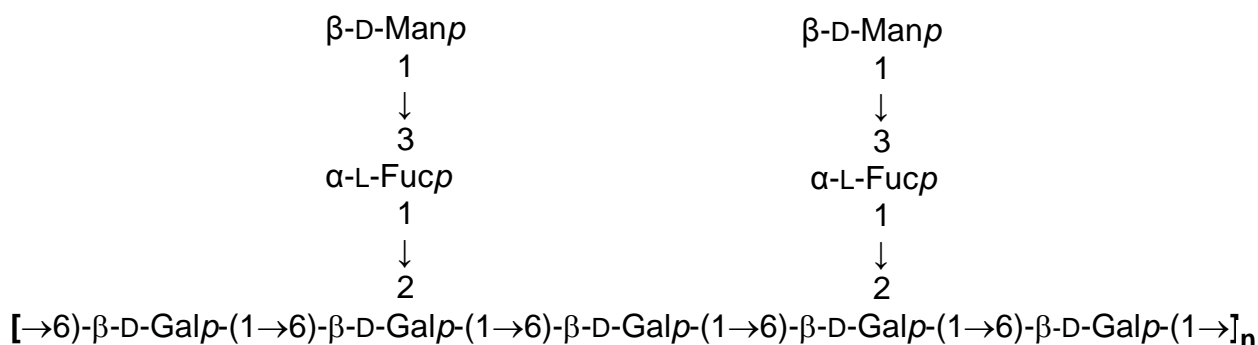
FIGURA 1.13 - Representação esquemática das principais estruturas presentes na manufucogalactana de *Fomitella fraxinea*.



Ao contrário da maioria das manufucogalactanas obtidas de cogumelos, a isolada de *Polyporus giganteus* contém uma cadeia principal

constituída por β -D-Galp, sendo algumas dessas substituídas em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- β -D-Manp- α -L-Fucp (BHAVANANDAN, BOUVENG, LINDBERG, 1964) (Figura 1.14) (Tabela 1.3, p. 19).

FIGURA 1.14 - Representação esquemática da manufucogalactana isolada de *Polyporus giganteus*.



Heteropolissacarídeo composto por fucose, glucose e galactose, ou seja, fucoglucogalactana foi descrita para *Hericiium erinaceus* a qual possui cadeias laterais complexas (WANG, LUO, LIANG, 2004) (Figura 1.15) (Tabela 1.3, p. 19).

FIGURA 1.15 - Representação esquemática da estrutura da fucoglucogalactana isolada de *Hericiium erinaceus*.

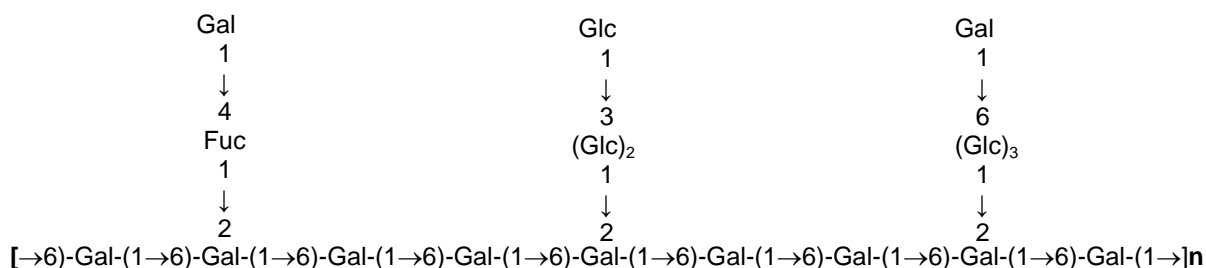


TABELA 1.3 – Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.

TIPO DE POLISSACARÍDEO/ MATERIAL BIOLÓGICO	CADEIA PRINCIPAL	CADEIA LATERAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	REFERÊNCIAS
Fucogalactana <i>Polyporus ovinus</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de α -L-Fucp	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%) $[\alpha]_{578}^{20} + 85^\circ$	AXELSSON, BJÖRNDAL, 1969.
Fucogalactana <i>Fomes annosus</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores α -L-Fucp	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%) $[\alpha]_{578} + 78^\circ$	AXELSSON et al., 1971.
Fucogalactana (Fração: <i>F-IIaP</i>) <i>Ganoderma applanatum</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores α -L-Fucp. Contém grupos acetil	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 $[\alpha]_D + 108^\circ$	USUI, IWASARI, MIZUNO, 1981.
Fucogalactana (Fração: <i>EPF-Ab</i>) <i>Agaricus brasiliensis</i> Basidiomas	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%)	KOMURA et al., 2010.
Fucogalactana (Fração: <i>EPF-Ah</i>) <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>hortensis</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6) e 3-O-Me- α -D-Gal (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-O-Me-Gal (15,4%) e Gal (67,8%) Dados de metilação: Fucp (14,8%), Galp (2,5%), 6-O-Galp (64,8%), 2,6-di-O-Galp (17,9%)	

TABELA 1.3 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.

(Continuação)

Fucogalactana (Fração: <i>RFP-Lr</i>) <i>Lactarius rufus</i> Basidiomas	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%)	RUTHES et al., 2012.
Fucogalactana (Fração: <i>RFP-Ab</i>) <i>Agaricus bisporus</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6) e 3-O-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-O-Me-Gal (10%) Dados de metilação: Fucp (2,8%), Galp (14,5%), 6-O-Galp (64,8%), 2,6-di-O-Galp (17,9%)	
Fucogalactana (Fração: <i>EFP-Ab</i>) <i>Agaricus bisporus</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6) e 3-O-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-O-Me-Gal (14,6%) Dados de metilação: Fucp (13,1%), Galp (3,9%) 6-O-Galp (65,6%), 2,6-di-O-Galp (17,4%)	RUTHES et al., 2013a.
Manogalactana (Fração: Não identificada) <i>Pleurotus ostreatus</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	$M_w = 188$ kDa Composição monossacarídica: Gal: Man: 3-O-Me-Gal, numa proporção molar de 3:2:0,9, respectivamente	JAKOVLJEVIC et al., 1998.
Manogalactana (Fração: EFP) <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>var. florida</i> Basidiomas	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	$M_w = 46$ kDa Composição monossacarídica: Man: 3-O-Me-Gal: Gal, numa proporção molar de 39,0:5,8:55,2, respectivamente Dados de metilação: Manp (38,6%), Galp (0,6%), 6-O-Galp (21,2%), 2,6-di-O-Galp (39,6%)	ROSADO et al., 2003.
Manogalactana (Fração: EFP) <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> Basidiomas	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%)	

TABELA 1.3 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.

(Continuação)

Manogalactana (Fração: MG) <i>Pleurotus pulmonarius</i> Basidiomas	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%)	SMIDERLE et al., 2008a.
Manogalactana (Fração: 50RPF CW- Ps) <i>Pleurotus sajor-caju</i> Basidiomas	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%)	SILVA, 2011.
Manogalactana (Fração: PGPB-1) <i>Pleurotus geesteranus</i> Basidiomas	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	ZHANG et al., 2013.
Glucogalactana (fração: POP) <i>Pleurotus ostreatus</i> Basidiomas	α -Galp (1→6)	Substituições em O-2 por terminais não redutores de β - D-Glcp	$M_w = 24$ kDa Composição monossacarídica: Gal e Glc, numa proporção molar de 2:1 Dados de metilação: Glcp (20 %), 6-O-Galp (21 %), 2,6- O-Galp (19%),	SUN, LIU, 2009.
Fucoglucogalactana (Fração: HPA) <i>Hericiium erinaceus</i> Basidiomas	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:Glcp:4-O-Fucp:3-O-Glcp:6-O- Glcp: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. $[\alpha]_D +64^\circ$	WANG, LUO, LIANG, 2004.
Fucomanogalactana (Fração: EFP-Ls) <i>Laetiporus sulphureus</i> Basidiomas	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 %)	ALQUINI et al., 2004.

TABELA 1.3 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.

(Continuação)

Fucomanogalactana (Fração: FMG-Le) <i>Lentinus edodes</i> Basidiomas	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%)	CARBONERO et al., 2008b.
Fucomanogalactana (Fração: R-FPHW) <i>Amanita muscaria</i> Basidiomas	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 %)	RUTHES et al., 2013b.
Manufucogalactana <i>Polyporus giganteus</i> Basidiomas	β -Galp (1→6)	Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- β -D-Manp- β -L-Fucp.	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 %) $[\alpha]_D + 65^\circ$	BHAVANANDAN, BOUVENG, LINDBERG, 1964.
Manufucogalactana <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	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-MeGal) $[\alpha]_{5780} + 97^\circ$	BOUVENG, FRASER, LINDBERG, 1967.
Manufucogalactana <i>Armillaria mellea</i> Basidiomas	α -D-Galp (1→6)	Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Manp-L-Fucp e únicas unidades de L-Fucp	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 %) $[\alpha]_{5780} + 98^\circ$	FRASER, LINDBERG, 1967.
Manufucogalactana <i>Polyporus fomentarius</i> Basidiomas	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	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%) $[\alpha]_{5780} + 114^\circ$	BJÖRNDAL, LINDBERG, 1969.

TABELA 1.3 - Heterogalactanas isoladas de basidiomicetos.

(Conclusão)

<p>Manofucogalactana</p> <p><i>Flammulina velutipes</i> Basidiomas</p>	<p>α-Galp (1→6)</p>	<p>Substituições em O-2 pelo dissacarídeo 3-O-α-D-Manp-α-L-Fucp e por α-L-Fucp</p>	<p>$M_w = 9,5 \times 10^4$ g/mol</p> <p>Composição monossacarídica: Fuc:Man:Gal, numa proporção molar de 4:3:12</p> <p>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%)</p> <p>$[\alpha]_D^{23} + 54^\circ$</p>	<p>MUKUMOTO, YAMAGUCHI, 1977.</p>
<p>Manofucogalactana (Fração: F-IIaG)</p> <p><i>Ganoderma applanatum</i> Basidiomas</p>	<p>α-D-Galp (1→6)</p>	<p>Substituições em O-2 por α-L-Fucp.e pelo dissacarídeo 3-O-α-D-Manp-α-L-Fucp. Contém grupos acetil.</p>	<p>Composição monossacarídica: Fuc:Man:Gal:, numa proporção molar de 1,3:1,0:2,4.</p> <p>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%)</p> <p>$[\alpha]_D + 87^\circ$</p>	<p>USUI, IWASARI, MIZUNO, 1981.</p>
<p>Manofucogalactana (Fração: Fomitellana A)</p> <p><i>Fomitella fraxinea</i> Basidioma</p>	<p>α-Galp (1→6)</p>	<p>Substituições em O-2, pelo dissacarídeo 3-O-α-D-Manp-α-L-Fucp</p>	<p>$M_w = 1,5 \times 10^4$ kDa</p> <p>Composição monossacarídica: galactose, manose e fucose em uma proporção molar de 3:1:1</p> <p>Dados de metilação: Manp (16,2%), Fucp (18,9%), Galp (1,5%), 6-O-Galp (44,1%), 2,6-di-O-Galp (19,3%)</p> <p>$[\alpha]_D + 90^\circ$</p>	<p>CHO et al., 1998.</p>
<p>Manofucogalactana (Fração: 30E)</p> <p><i>Flammulina velutipes</i> Basidiomas</p>	<p>α-Galp (1→6)</p>	<p>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</p>	<p>Composição monossacarídica: Fuc (20%), Man (16%) e Gal (64%)</p> <p>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%)</p>	<p>SMIDERLE et al., 2008b.</p>

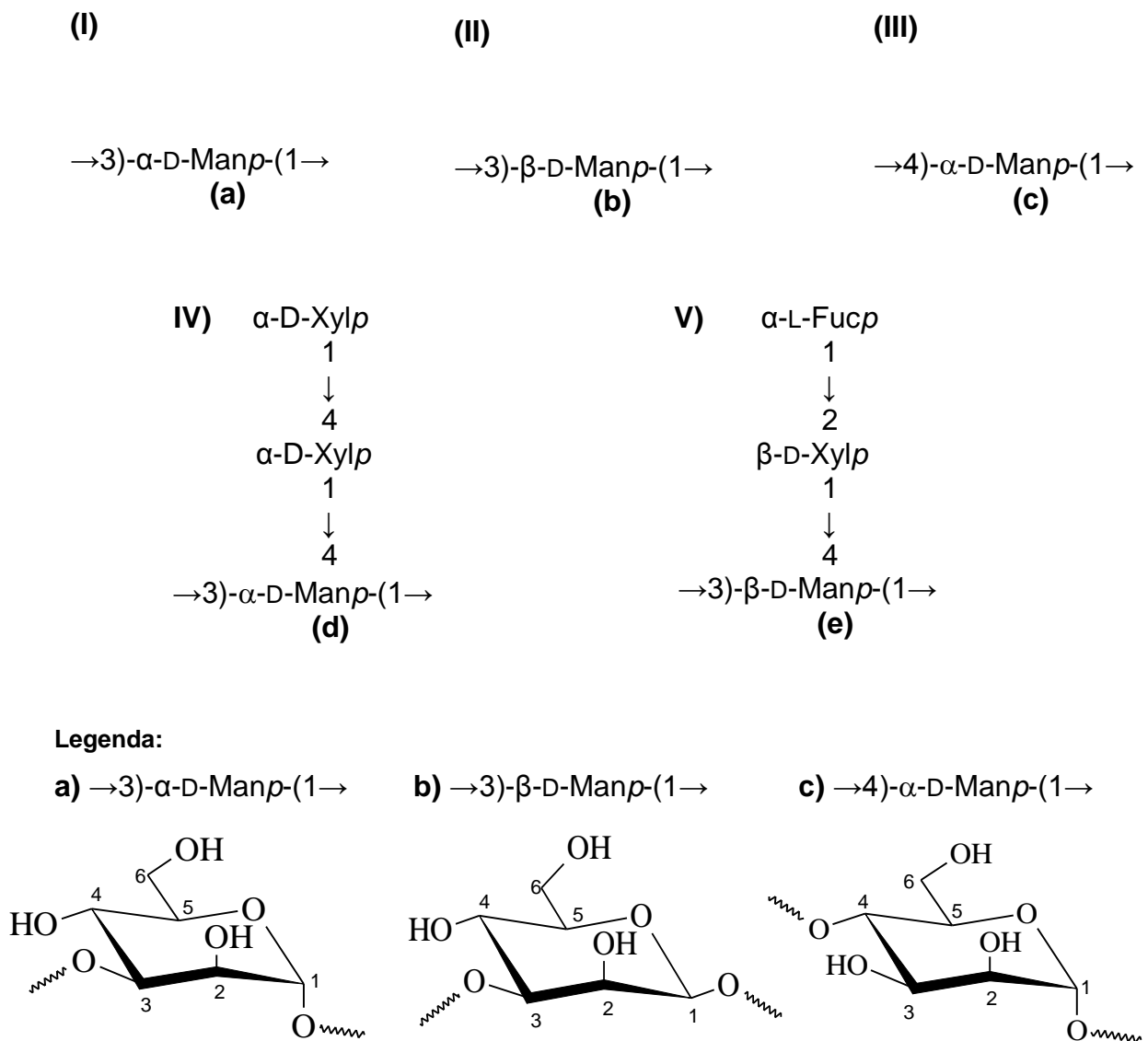
Várias heterogalactanas demonstraram *in vitro* e/ou *in vivo*, efeitos imunomoduladores, antitumorais, anti-inflamatórios, dentre outros (Tabela 1.4).

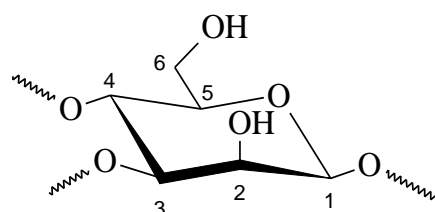
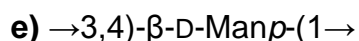
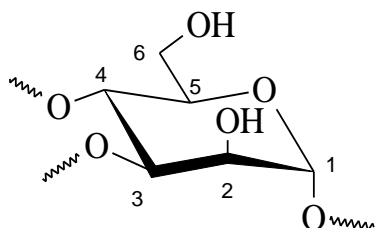
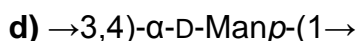
TABELA 1.4 – Atividade biológica de algumas heterogalactanas isoladas dos basidiomas de cogumelos.

FONTE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>Fomitella fraxinea</i> Fração: <i>Fomitellana A</i>	Efeito mitogênico; Imunomodulatória.	CHO et al., 1998
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: <i>GFPS1b</i>)	Antitumoral	CUI et al., 2007
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fração: <i>MG</i>)	Antinociceptiva	SMIDERLE et al., 2008a.
<i>Lentinus edodes</i> (Fração: <i>FMG-Le</i>)	Anti-inflamatória e Antinociceptiva	CARBONERO et al., 2008b.
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: <i>MZF</i>)	Antitumoral	MASUDA et al., 2009.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (fração: <i>POP</i>)	Imunomodulatória	SUN, LIU, 2009.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Fração: <i>POPS-1</i>)	Antitumoral	TONG et al., 2009.
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fração: <i>FI</i>)	Antineoplásica	DALONSO et al, 2010.
<i>Agaricus brasiliensis</i> (Fração: <i>EPF-Ab</i>)	Antinociceptiva	KOMURA et al., 2010.
<i>Agaricus bisporus</i> <i>var. hortensis</i> (Fração: <i>EFP-Ah</i>)	Anti-inflamatória	
<i>Grifola frondosa</i> (Fração: <i>GF</i>)	Imunomodulatória	XU et al., 2010.
<i>Lactarius rufus</i> (Fração: <i>RFP-Lr</i>)	Antissepse	RUTHES et al., 2012.
<i>Agaricus bisporus</i> (Fração: <i>RFP-Ab</i>)	Antissepse	
<i>Agaricus bisporus</i> (Fração: <i>EFP-Ab</i>)	Antissepse Antinociceptiva Anti-inflamatória	RUTHES et al., 2013a.
<i>Amanita muscaria</i> (Fração: <i>R-FPHW</i>)	Anti-inflamatória e antinociceptiva	RUTHES et al., 2013b.

Os heteropolissacarídeos formados principalmente por manose, heteromananas, tem sido relatadas em cogumelos, porém a incidência é menor quando comparada às heterogalactanas. Estas possuem uma estrutura principal formada por Manp unidas através de ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3) (Figura 1.16-I), β -(1 \rightarrow 3) (Figura 1.16-II) ou α -(1 \rightarrow 4) (Figura 1.16-III), as quais se encontram parcialmente substituídas em O-4 ou O-3 (Figura 1.16-IV e V), respectivamente, por apenas xilose (xilomananas) ou por cadeias laterais constituídas por fucose e xilose (fucoxilomananas) (Tabela 1.5, p. 29).

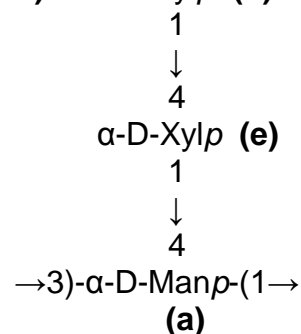
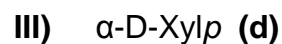
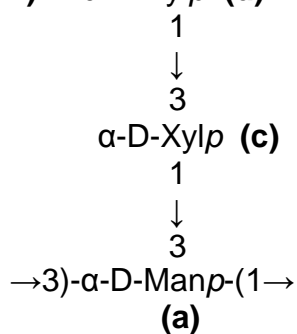
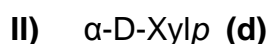
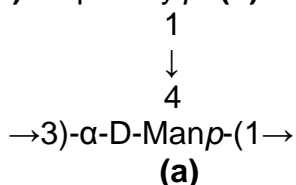
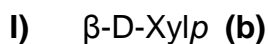
FIGURA 1.16 - Representação esquemática dos principais fragmentos de cadeias principais presentes nas heteromananas isoladas de basidiomicetos.



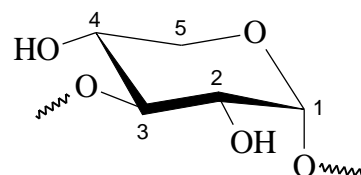
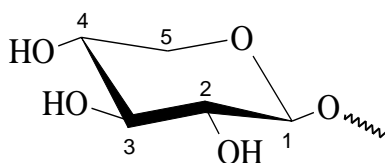
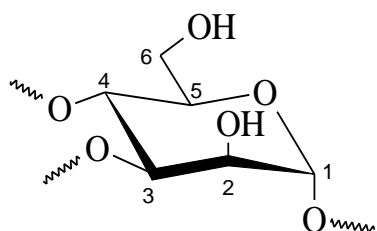
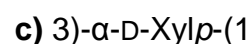
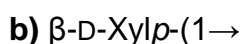
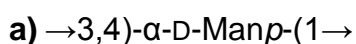


As xilomananas apresentam um *core* formado por $\alpha\text{-Manp-(1}\rightarrow 3)$, sendo algumas destas substituídas em O-4 por terminais não redutores de D-Xylp (Figura 1.17-I) e/ou por dissacarídeos constituídos por D-Xylp (1 \rightarrow 3) ou (1 \rightarrow 4) ligadas (Figuras 1.17-II e III, respectivamente). Estas foram relatadas em *Armillaria mellea* (Figura 1.18-A, p. 27) (BOUVENG, FRASER, LINDBERG, 1967), *Polyporus tumulosus* (Figura 1.18-B, p. 27) (ANGYAL, BENDER, RALPH, 1974) e *Flammulina velutipes* (Figura 1.8-C, p. 27) (SMIDERLE et al., 2006) (Tabela 1.5, p. 31).

FIGURA 1.17 - Representação esquemática dos principais fragmentos de cadeias laterais presentes nas xilomananas isoladas de basidiomicetos.



Legenda:



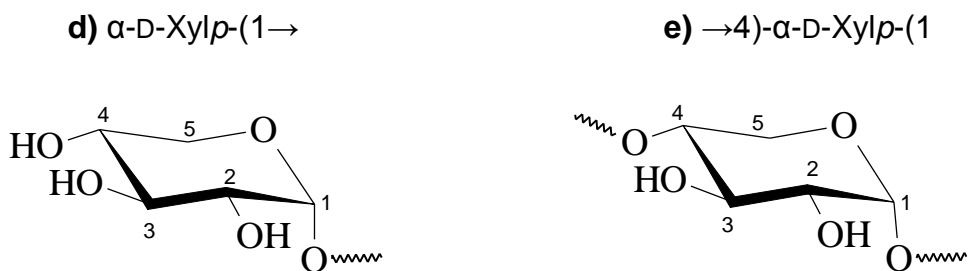
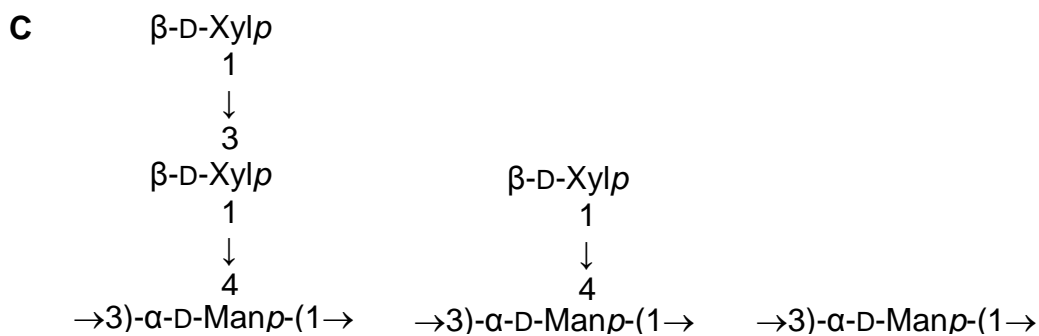
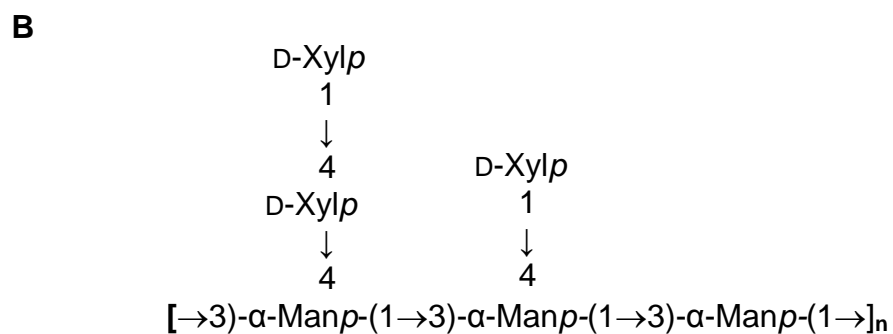
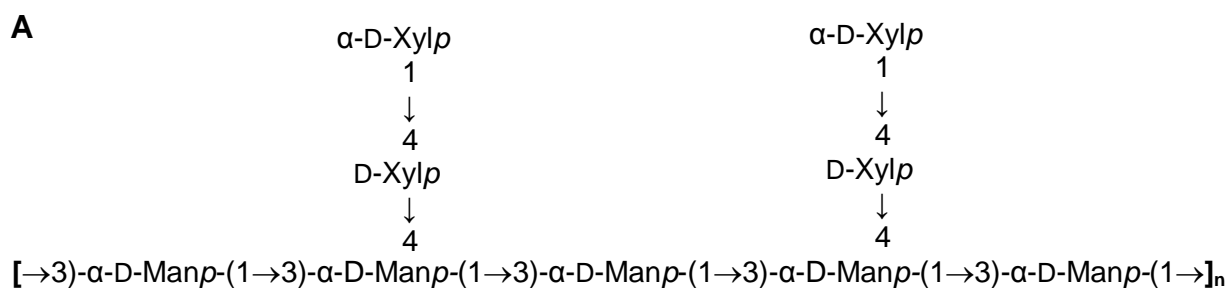
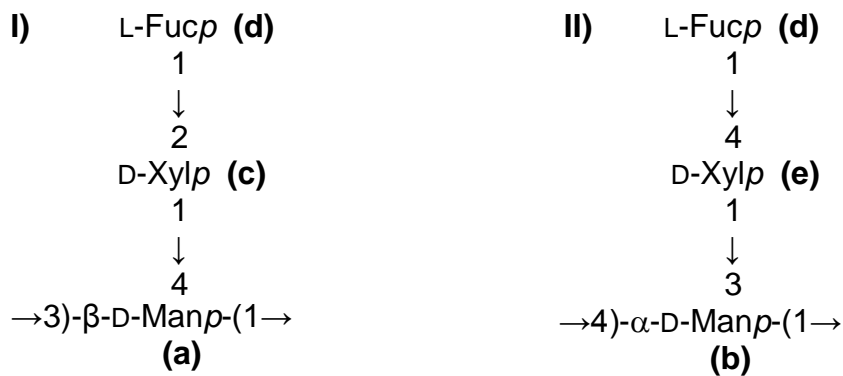


FIGURA 1.18 - Representação esquemática da estrutura das xilomananas isoladas de *Armillaria mellea* (A), *Polyporus tumulosus* (B) e *Flammulina velutipes* (C).



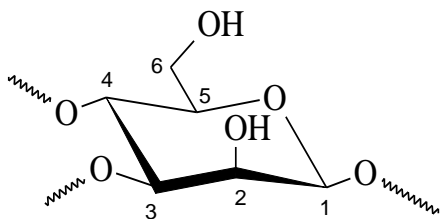
Diferente das xilomananas, as fucoxilomananas possuem um *core* constituído por β -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 3) ou α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 4) e grupos laterais constituídas pelos dissacarídeos 2-O- α -L-Fucp- β -D-Xyl (Figura 1.19-I) ou 4-O-L-Fucp-D-Xylp (Figura 1.19-II), respectivamente.

FIGURA 1.19 - Representação esquemática dos principais fragmentos de cadeias laterais presentes nas fucoxilomananas isoladas de basidiomicetos.

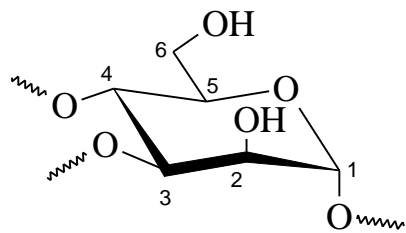


Legenda:

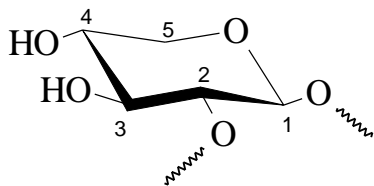
a) →3,4)- β -D-Manp-(1→



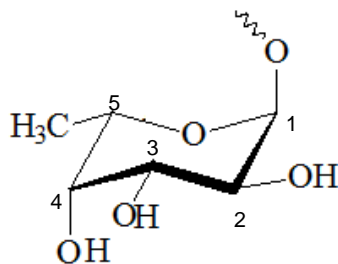
b) →3,4)- α -D-Manp-(1→



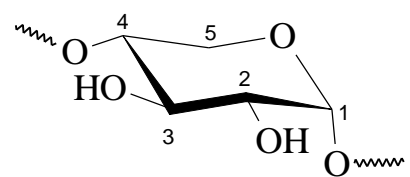
c) →2)- β -D-Xylp-(1→



d) α -L-Fucp-(1→

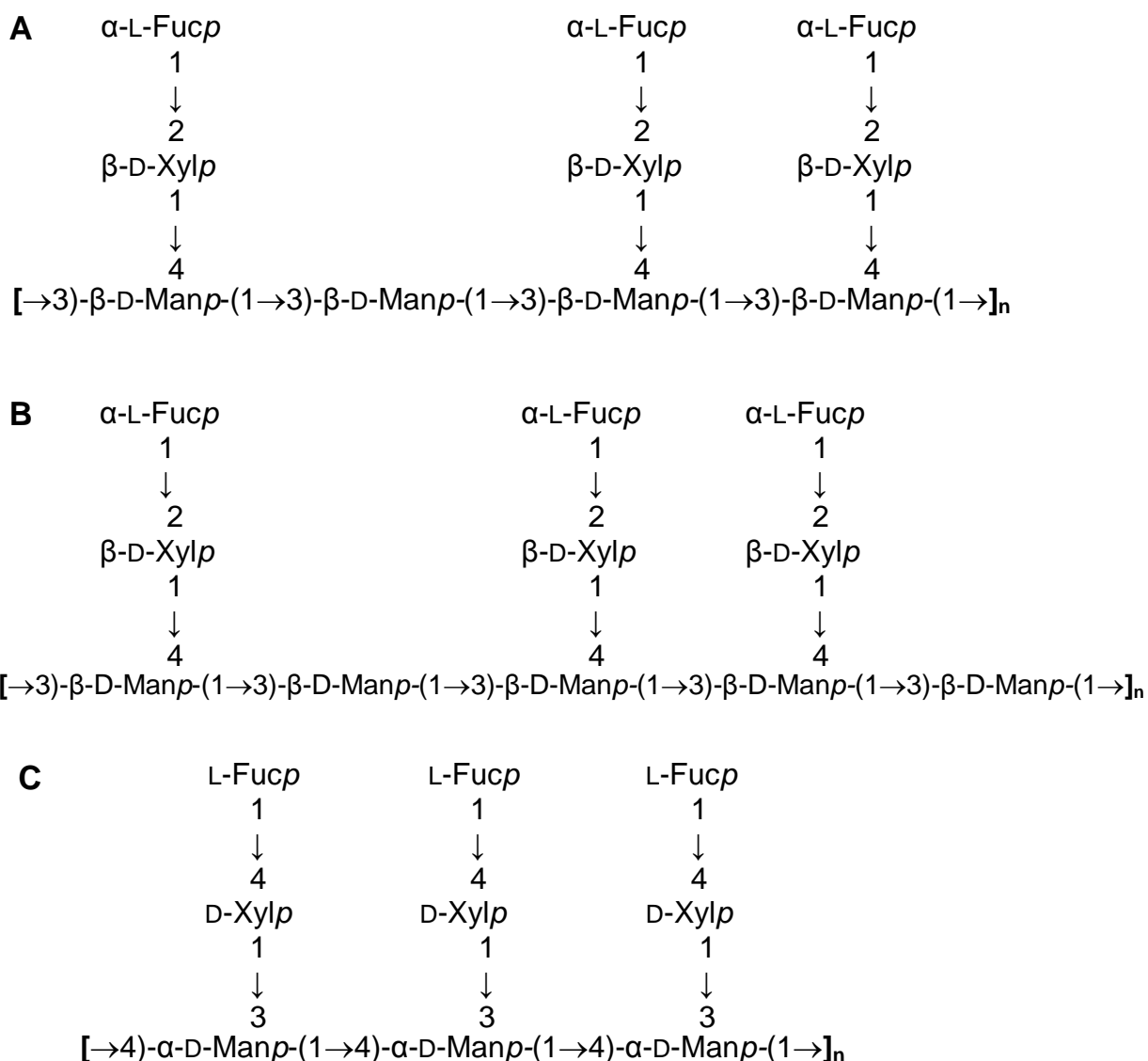


e) →4)- α -D-Xylp-(1→



Esses polímeros foram encontrados em *Polyporus pinicola* (Figura 1.20-A) (AXELSSON, BJÖRNDAL, LINDBERG, 1969), *Fomes annosus* (Figura 1.20-B) (AXELSSON et al., 1971) e *Ganoderma lucidum* (Figura 1.20-C) (MIYAZAKI et al., 1982). As duas primeiras contêm uma cadeia principal constituída por resíduos de β -D-Manp ligados (1 \rightarrow 3) e parcialmente substituídos em O-4 pelo dissacarídeo 2-O- α -L-Fucp- β -D-Xylp, sendo distinta da proveniente de *G. lucidum*, a qual é formada por um core de α -D-Manp (1 \rightarrow 4) e pelo dissacarídeo 4-O-L-Fucp-D-Xylp como substituinte em O-3 (Tabela 1.5, p. 31).

FIGURA 1.20 - Representação esquemática das estruturas das fucoxilomananas isoladas de *Polyporus pinicola* (A), *Fomes annosus* (B) e *Ganoderma lucidum* (C).



Ao contrário das heterogalactanas e glucanas que têm sido amplamente avaliadas quanto aos seus efeitos biológicos, apenas a fucoxilomanana de *Ganoderma lucidum* foi testada em relação aos seus possíveis efeitos terapêuticos, apresentando atividade antitumoral frente às células tumorais de Sarcoma 180 (MIYAZAKI et al., 1982).

TABELA 1.5 - Heteromananas isoladas de basidiomicetos.

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

TABELA 1.5 - Heteromananas isoladas de basidiomicetos.

(Conclusão)

Fucoxilomanana <i>Ganoderma lucidum</i> Basidiomas	D-Manp (1→4)	Substituições em O-3, pelo dissacarídeo 4-O-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-O-Xylp, 4-O-Manp, 3,4-di-O-Manp $[\alpha]_D^{20} - 0,06^\circ$	MIYAZAKI et al., 1982.
--	--------------	--	--	---------------------------

1.5 – *Grifola frondosa*

Grifola frondosa é um fungo que pertence à classe Basidiomycetes, ordem Aphyllophorales e família Polyporaceae. Ele é popularmente conhecido como "*Huishu hua*" (China) e "*Maitake*" (Japão, "*mai*" significa dança e "*take*" significa cogumelo) (ZHANG, WANG, WU, 2012). Existem duas linhagens desse fungo que foram cultivadas no Brasil, sendo uma branca (Figura 1.20-I) e a outra cinza (Figura 1.21-II).

FIGURA 1.21 - Representação do basidiomiceto *G. frondosa*: linhagem branca (I) e linhagem cinza (II).

(I)



Fonte: SOCIÉTÉ MYCOLOGIQUE DU POITOU, 2015.

(II)



Fonte: MEDICAL MUSHROOMS, 2015.

O “*Maitake*” tem sido uma espécie economicamente importante em países do Extremo Oriente, como o Japão e a China. É cultivado numa escala comercial e comumente adquirido por sua importância na culinária, devido ao seu excelente sabor e textura, e pelos seus efeitos benéficos à saúde (ZHUANG, WASSER, 2004).

Vários polissacarídeos já foram isolados desse cogumelo, tanto do seu corpo de frutificação quanto do cultivo submerso (exopolissacarídeos e micélio). Dentre os polissacarídeos isolados, o mais importante e amplamente estudado é a grifolana devido à sua ação imunomoduladora. Conforme descrito anteriormente, esta β -glucana vem sendo comercializada, principalmente na forma de cápsulas, em diversos países como Canadá, China, Japão, Nigéria, Porto Rico e Estados Unidos. Porém, no Brasil a venda é proibida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), devido principalmente à escassez de estudos científicos que garantam a eficácia destes produtos.

Polissacarídeos isolados de “*Maitake*” estão entre os mais efetivos, demonstrando atividade antitumoral *in vivo*. “*Maitake*” também demonstrou ser o cogumelo mais promissor como um imunomodulador, sendo mais eficaz quando administrado por via injetável (MAYELL, 2001). Devido aos efeitos terapêuticos destes polímeros, vários polissacarídeos isolados de *G. frondosa* foram patenteados no Japão (BOH, BEROVIC, 2007).

Em 1985, foi identificada uma fração, tanto nos micélios quanto nos basidiomas de *G. frondosa* com capacidade de estimular os macrófagos. Essa fração, obtida por extrações aquosas à quente foi denominada de fração D, que consiste em uma mistura de polissacarídeo e proteína numa proporção molar de (80:20). A porção polissacarídica é constituída por β -glucanas com cadeia principal (1 \rightarrow 3) e ramificações em O-6 e com cadeia principal (1 \rightarrow 6), as quais podem apresentar-se ramificadas em O-3. O isolamento desta fração gerou uma patente (JP Patent 59210901), que após novas purificações, chegou-se a fração-MD (US Patent 5854404), a qual é constituída por um complexo glucana-proteína em uma relação de 99:1, respectivamente (MAYELL, 2001).

A empresa Mushroom Wisdom[®] comercializa a fração-D de “*Maitake*” com ação estimulante do sistema imunológico, tanto na forma de cápsulas quanto na forma líquida (Figura 1.22, p. 35).

FIGURA 1.22 – Fração-D obtida de *G. frondosa*, comercializada na forma de cápsulas e na forma líquida.



Fonte: *MUSHROOM WISDOM*[®], 2015

A fração-D de “*Maitake*” já foi testada de forma injetável ativando o sistema imunológico e evitando a proliferação de novos tumores, além de prevenir o desenvolvimento de câncer a partir de células normais em camundongos com câncer de fígado (NANBA, 1995) e com câncer de mama (NANKA, KUBO, 1997).

Diante desses resultados, a Agência de administração de comida e drogas dos Estados Unidos (USFDA - *United States Food and Drug Administration*) começou a tratar pacientes com câncer utilizando as frações D e MD. Em 1998, foi aprovado o estudo piloto da Fase II (IND 54589) sobre os potenciais efeitos da fração-D frente à cânceres de mama e de próstata. Os resultados foram idênticos àqueles observados nos camundongos. Além disso, este fungo pode ser empregado em conjunto com a quimioterapia para diminuir seus efeitos colaterais, tais como a perda de cabelo, dor e náuseas (MAYELL, 2001).

LIN et al., 2010, testou β -glucanas de “*Maitake*”, dando-lhes, juntamente com paclitaxel aos camundongos. Os camundongos que receberam a β -glucana juntamente com paclitaxel apresentaram uma recuperação mais rápida dos glóbulos brancos do que aqueles que não receberam a β -glucana.

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (USNIH- *United States National Institutes of Health*, 2014) está realizando um ensaio

clínico com uma β -glucana desse cogumelo, que está sendo testada em conjunto com outros medicamentos para saber se eles aumentam a eficácia de um anticorpo monoclonal (3F8). Este teste está sendo realizado em pacientes com neuroblastoma, os quais não responderam ao tratamento comum. O estudo tem como objetivo observar os efeitos imunológicos, os efeitos colaterais, e a dose máxima da β -glucana tolerada. Ele está previsto para ser concluído no final de 2015.

Segundo a Sociedade Americana de Câncer (ACS - *American Cancer Society*, 2014), “*Maitake*” pode ser utilizado como alimento ou na forma de chá, além de estar disponível como extrato líquido, comprimido e cápsula, porém a quantidade de β -glucanas em cada forma pode variar. A dose usual recomendada de cogumelo seco é entre 3 a 7 gramas por dia.

Cabe ressaltar que os estudos referentes aos polissacarídeos de *G. frondosa* foram realizados apenas para a linhagem “cinza”. No entanto, recentemente, vem sendo cultivada a linhagem conhecida como “branca” ou “albina”, a qual tem sido avaliada quimicamente com o intuito de verificar se a mesma possui propriedades medicinais semelhantes às descritas anteriormente para este fungo.

Com o intuito de verificar se o Brasil vem sendo cultivadas as linhagens branca e cinza do cogumelo medicinal *G. frondosa*. Apesar da diferença na pigmentação, as duas linhagens estão sendo cultivadas sob as mesmas condições para efeito de comparação.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar a caracterização química de polissacarídeos isolados dos basidiomas das linhagens branca e cinza do fungo *Grifola frondosa* obtidos por cultivo em substrato.

Para essa finalidade, as seguintes etapas foram propostas:

- a) Extrair os polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* (linhagens branca e cinza) através de extrações aquosas e alcalinas;
- b) Purificar as frações polissacarídicas obtidas por técnicas de fracionamento como congelamento/degelo, precipitação com sais de cobre (ex: solução de Fehling) e diálise;
- c) Caracterizar estruturalmente os polímeros isolados utilizando métodos de derivatização química [conversão dos carboidratos em acetatos de alditóis (acetilação), oxidação com periodato de sódio] e técnicas analíticas de RMN, CG-EM e *HPSEC-MALLS*;

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL DE ESTUDO

Os basidiomas das linhagens branca (massa seca = 35,0 g) e cinza (massa seca = 209,6 g) de *G. frondosa* foram fornecidos, em maio de 2010, pela empresa YURI Cogumelos (Proprietário: Iwao Akamatsu), localizada na cidade de Sorocaba, São Paulo.

3.2 - OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

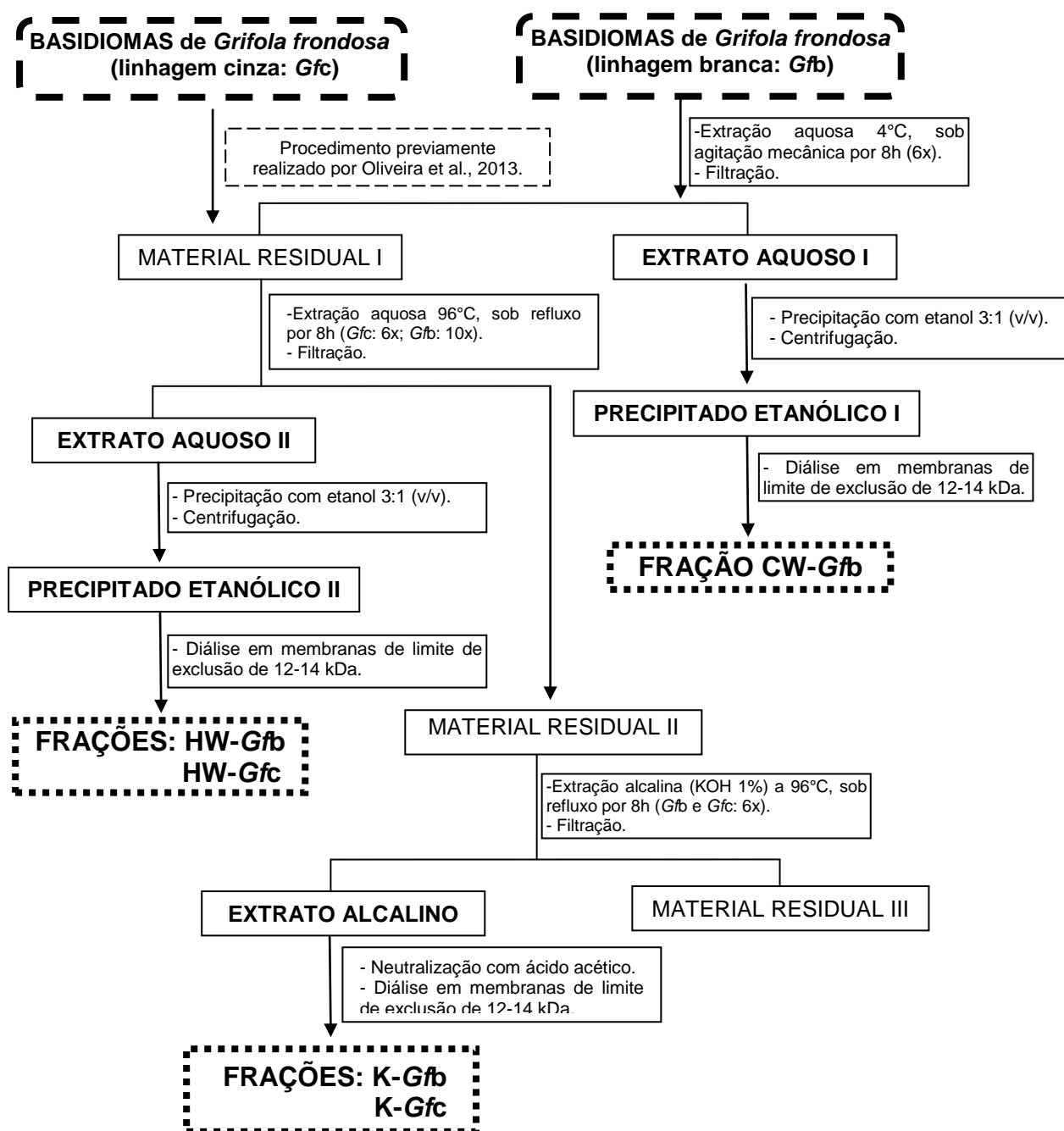
Os basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca (35,0 g) foram submetidos a sucessivas extrações aquosas (2 L) a frio ~10 °C por 8 h, sob agitação mecânica, sendo esse processo repetido por 6 vezes. Após cada extração, os materiais foram filtrados separando os resíduos I dos extratos aquosos I. Os extratos aquosos obtidos foram unidos e concentrados sob pressão reduzida até um volume pequeno, precipitados com etanol e centrifugados (3214 g, 15 min, 25 °C). O precipitado etanólico I (fração CW-Gfb) foi dialisado contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa), por aproximadamente 24 h, e liofilizado (Figura 3.1, p. 39).

Os materiais residuais (I), provenientes da extração aquosa a frio de ambas as linhagens, foram submetidos a sucessivas extrações aquosas (2 L) sob refluxo em banho de água fervente ~96 °C por 8 h, sendo 10 vezes para a linhagem branca e 6 vezes para a linhagem cinza (Figura 3.1, p. 39). Após cada extração, os materiais foram filtrados separando os materiais residuais II dos extratos aquosos II. Os extratos aquosos II, obtidos para cada linhagem, foram unidos e concentrados sob pressão reduzida até um volume pequeno, precipitados com etanol (3:1, v/v) e centrifugados (3214 g, 15 min, 25 °C). Os precipitados etanólicos II obtidos, frações HW-Gfb e HW-Gfc, foram dialisados contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa) por, aproximadamente, 24 h e liofilizados (Figuras 3.1, p. 39).

Os materiais residuais II foram tratados com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 1%, sob refluxo em banho de água fervente ~96 °C por 8 h, sendo 6 vezes para ambas as linhagens. Os extratos

alcalinos foram filtrados, neutralizados com ácido acético (AcOH), dialisados (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente por 48 h, concentrado sob pressão reduzida até volume pequeno e liofilizado, resultando nas frações K-Gfb e K-Gfc (Figura 3.1).

FIGURA 3.1 – Esquema de extração dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagens branca e cinza, por extrações aquosas e alcalinas.



3.3 - PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A purificação das frações polissacarídicas obtidas por extrações aquosas (CW-*Gfb*, HW-*Gfb* e HW-*Gfc*) e alcalinas (K-*Gfc* e K-*Gfb*) foi realizada através de procedimentos de fracionamento como: congelamento e degelo (GORIN, IACOMINI, 1984), precipitação com solução de Fehling (precipitação por formação de complexos cúpricos solúveis e insolúveis) (JONES, STOODLEY, 1965) e diálise em sistemas fechados utilizando membranas com diferentes limites de exclusão (CARBONERO, 2005). O fracionamento das frações solúveis 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- Fracionamento dos polissacarídeos da linhagem branca de *G. frondosa*

As frações polissacarídicas CW-*Gfb*, HW-*Gfb* e K-*Gfb* foram submetidas, primeiramente, ao procedimento de purificação por congelamento e degelo. Para isto, cada fração foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetida ao congelamento e posterior degelo em temperatura ambiente (25 °C). Os precipitados insolúveis em água fria (ICW-*Gfb*, IHW-*Gfb* e IK-*Gfb*) foram separados dos demais componentes solúveis (SCW-*Gfb*, SHW-*Gfb* e SK-*Gfb*) por centrifugação (4629 g, 15 min, 10 °C) (Figura 3.2, p. 41; Figura 3.3, p. 42; Figura 3.4, p. 42). Esse procedimento foi repetido diversas vezes até que os sobrenadantes não apresentassem material insolúvel em água fria.

Em seguida, as frações solúveis em água fria (SCW-*Gfb*, SHW-*Gfb* e SK-*Gfb*) originadas do processo de congelamento/descongelamento foram submetidas à diálise em membranas (Spectra/Por[®]), com limite de exclusão (MWCO: 1000 kDa), contra água destilada (Figuras 3.2, p. 41; Figura 3.3, p. 42; Figura 3.4, p. 42). O processo foi repetido diversas vezes, até que a fração eluída (= água de diálise) não apresentasse coloração. Da fração MRK-*Gfb* foi purificada uma glucana denominada de GLC1-*Gfb* (Figura 3.4, p. 42).

Após separação por diálise, as frações MRCW-*Gfb*, MECW-*Gfb*, MEK-*Gfb* foram, separadamente, tratadas com solução de Fehling, originando os complexos cúpricos solúveis (SFMRCW-*Gfb*, SFMECW-*Gfb* e SFMEK-*Gfb*)

e insolúveis (PFMRCW-*Gfb*, PFMECW-*Gfb* PFMEK-*Gfb*) que foram separados por centrifugação (4629 *g*, 15 min, 20 °C) (Figuras 3.2; Figura 3.3, p. 42; Figura 3.4, p. 42). Com a finalidade de remover os sais utilizados neste fracionamento, estas frações foram, após neutralização com ácido acético, dialisadas contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa) por ~48 h. Decorrido o tempo, as mesmas foram tratadas com resina catiônica fortemente ácida (forma H⁺) com o objetivo de remover o cobre, filtradas em algodão para remoção da resina e novamente dialisadas contra água corrente (MWCO: 12-14 kDa por aproximadamente 24 h).

Esse procedimento foi repetido para a frações PFMRCW-*Gfb*, SFMRCW-*Gfb*, SFMECW-*Gfb*, SFMEK-*Gfb* originando os complexos cúpricos solúveis (SF-PFMRCW-*Gfb*, SF₂MRCW-*Gfb*, SF₂MECW-*Gfb* e SF₂MEK-*Gfb*) e insolúveis (PF₂MRCW-*Gfb*, PF-SFMRCW-*Gfb*, PF-SFMECW-*Gfb* e PF-SFMEK-*Gfb*) os quais foram separados por centrifugação (4629 *g*, 15 min, 20 °C) (Figura 3.2; Figura 3.3, p. 42; Figura 3.4, p. 42). Da fração PF₂MRCW-*Gfb* foi isolada uma fucomanogalactana denominada de FMG-*Gfb*.

A fração MEHW-*Gfb* foi submetida à diálise em membrana (Spectra/Por[®]) com limite de exclusão de 500 kDa, gerando uma fração eluída (QEMEHW-*Gfb*) e uma retida (QRMEHW-*Gfb*) (Figura 3.3, p. 42).

FIGURA 3.2 – Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca, por extração aquosa a frio.

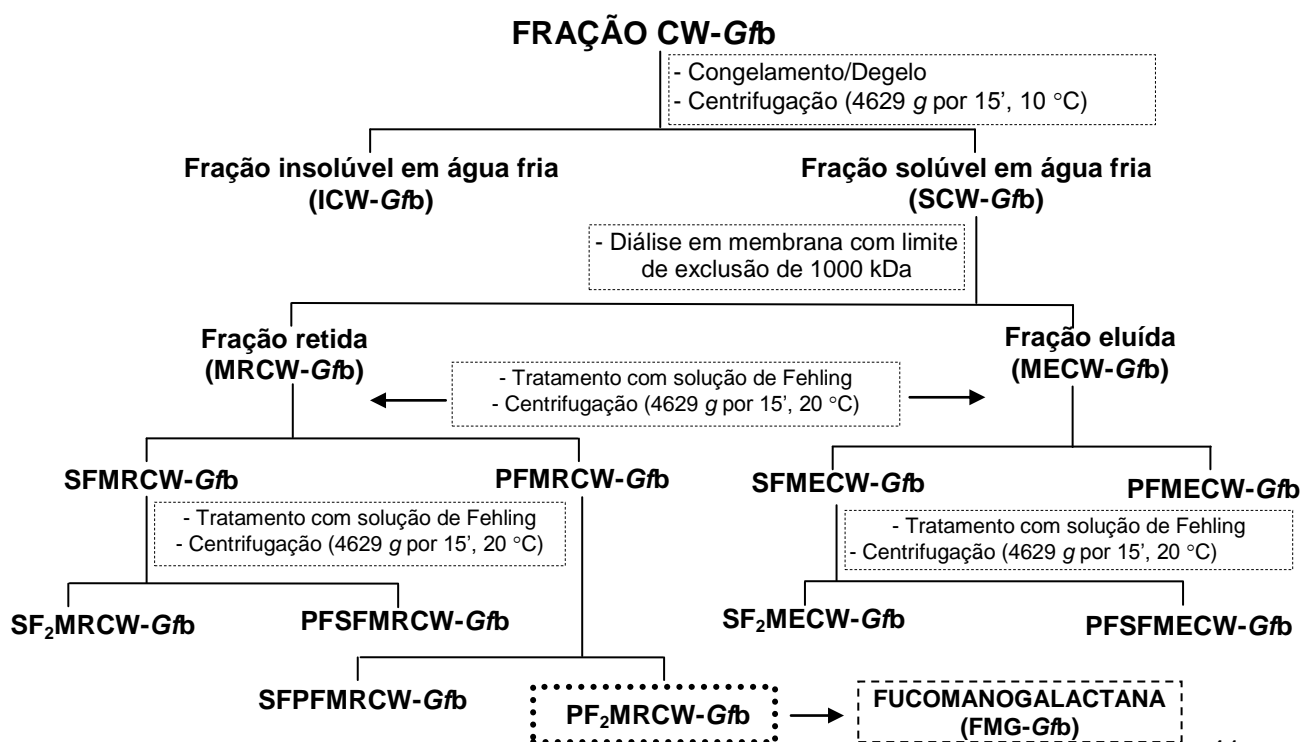


FIGURA 3.3 – Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca, por extração aquosa a quente.

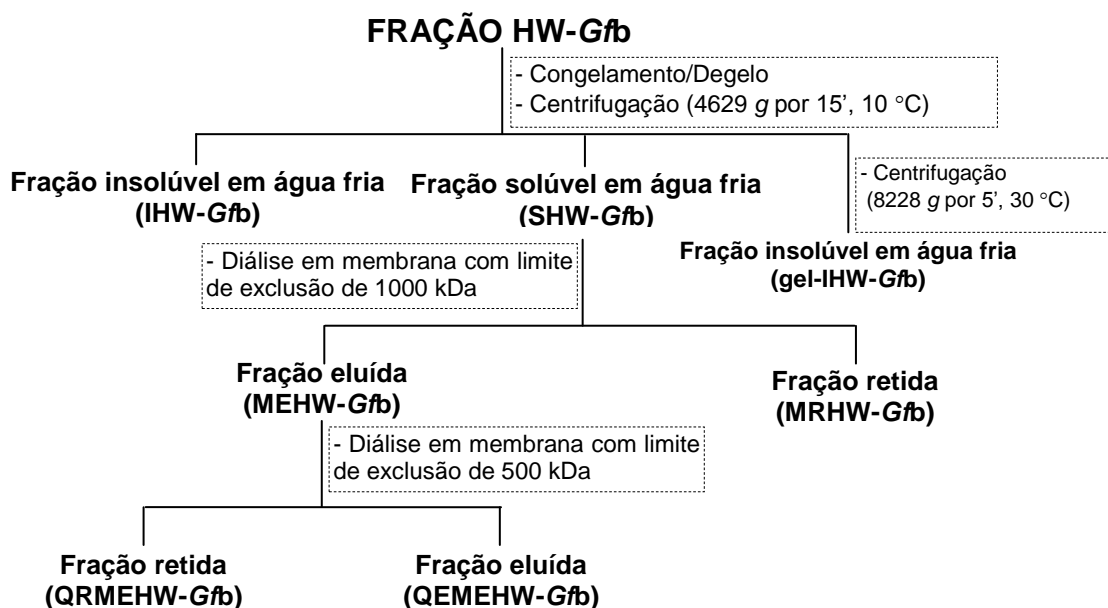
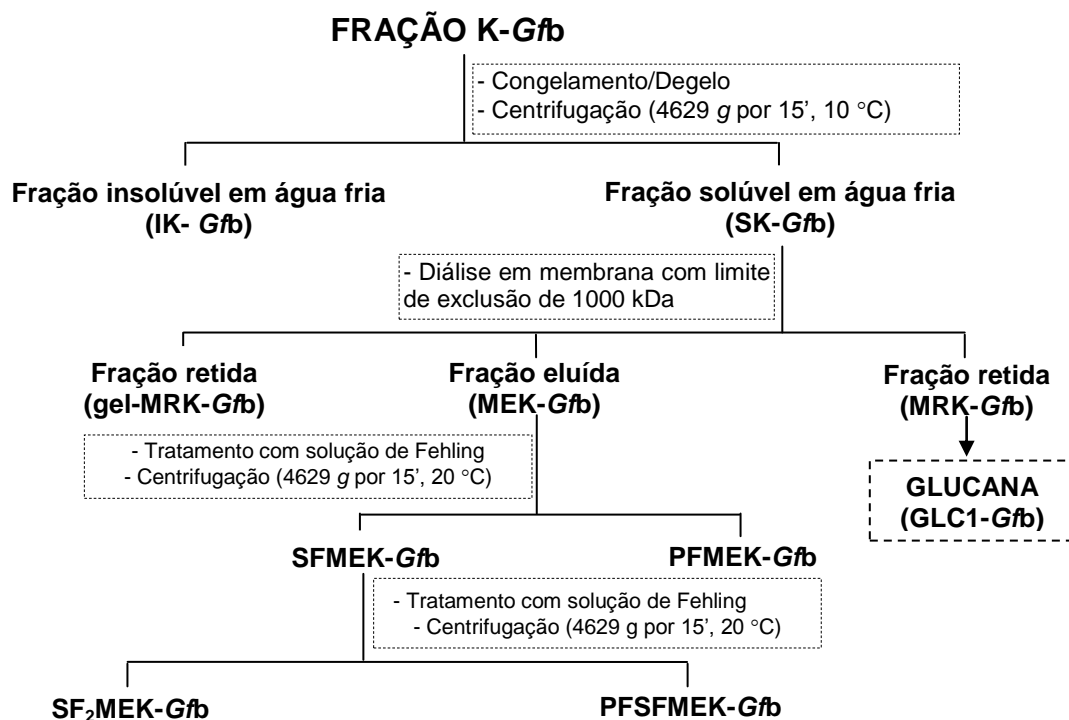


FIGURA 3.4 – Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem branca, por extração aquosa alcalina.



3.3.2 - Fracionamento dos polissacarídeos da linhagem cinza de *G. frondosa*

As frações polissacarídicas HW-*Gfc* e K-*Gfc* foram submetidas, da mesma forma que as frações da linhagem branca, ao procedimento de purificação por congelamento e degelo, gerando precipitados insolúveis em água fria (IHW-*Gfc* e IK-*Gfc*) e componentes solúveis (SHW-*Gfc* e SK-*Gfc*), os quais foram separados por centrifugação sob as mesmas condições citadas anteriormente (Figura 3.5, p. 44; Figura 3.6, p. 45).

A fração solúvel originada do congelamento e degelo (SHW-*Gfc*) foi submetida ao tratamento com solução de Fehling gerando as frações SFHW-*Gfc* e PFHW-*Gfc*, as quais foram separadas por centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. A fração SFHW-*Gfc* foi dialisada primeiramente em membrana (Spectra/Por[®]) com limite de exclusão de 1000 kDa, contra água destilada, resultando em uma fração retida (MRSFHW-*Gfc*) e uma eluída (MESFHW-*Gfc*) (Figuras 3.5, p. 44). Em seguida, MESFHW-*Gfc* foi dialisada em membrana (Spectra/Por[®]) com limite de exclusão de 500 kDa, fracionando em uma fração eluída (QEMESFHW-*Gfc*) e outra retida (QRMESFHW-*Gfc*) nesta membrana (Figura 3.5, p. 44; Figura 3.6, p. 45).

A fração SK-*Gfc* foi dialisada em membrana (Spectra/Por[®]) com limite de exclusão de 1000 kDa, contra água destilada, originando a fração MRK-*Gfc* (retida) e a MEK-*Gfc* (eluída). Ambas frações foram tratadas com solução de Fehling, fracionando-as em sobrenadantes (SFMRK-*Gfc* e SFMEK-*Gfc*) e precipitados de Fehling (PFMRK-*Gfc* e PFMEK-*Gfc*) (Figura 3.6, p. 45). A partir da fração SFMRK-*Gfc* foi purificada a glucana denominada de GLC1-*Gfc* e a partir da fração PFMEK-*Gfc*, após o segundo tratamento com solução de cobre em meio alcalino, foi obtido a fucoxilomanana (denominada FXM-*Gfc*) (fração PF₂MEK-*Gfc*) (Figura 3.6, p. 45).

Com a finalidade de purificação, a fração IK-*Gfc* foi, após solubilização em hidróxido de sódio 2% (NaOH), tratado com ácido acético (concentração final igual a 4%), resultando na formação de um precipitado que foi separado por centrifugação (12857 g por 30', 5 °C) (Figura 3.7, p. 45). A fração solúvel (SAAIK-*Gfc*) e a insolúvel em ácido acético (PAAIK-*Gfc*) foram submetidas a técnica de congelamento/degelo, fracionando-as em precipitados

(PPAIK-*Gfc* e PSAIK-*Gfc*), sobrenadantes (SPAIK-*Gfc*, SSAIK-*Gfc*) e uma fração com consistência viscosa (gel-SSAIK-*Gfc*) (Figura 3.7, p. 45). Em seguida, SSAIK-*Gfc* foi tratada com solução de sulfato de cobre em meio alcalino, originando as frações SFSSAIK-*Gfc* e PFSSAIK-*Gfc*. A partir da fração SPAIK-*Gfc* foi purificada a glucana denominada de GLC2-*Gfc*, e partir da fração SFSSAIK-*Gfc* foi purificada outra glucana denominada de GLC3-*Gfc* (Figura 3.7, p. 45).

FIGURA 3.5 – Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem cinza, por extração aquosa a quente.

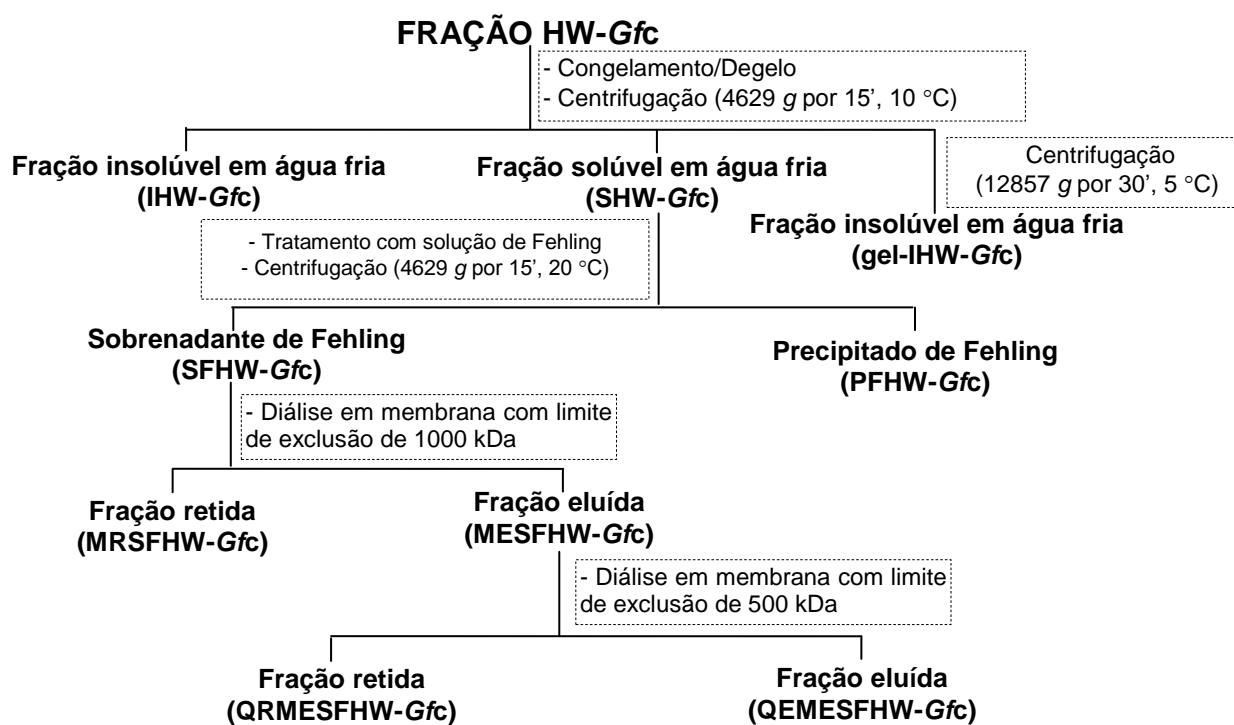


FIGURA 3.6 – Esquema de purificação dos polissacarídeos dos basidiomas de *G. frondosa* linhagem “cinza”, por extração aquosa alcalina.

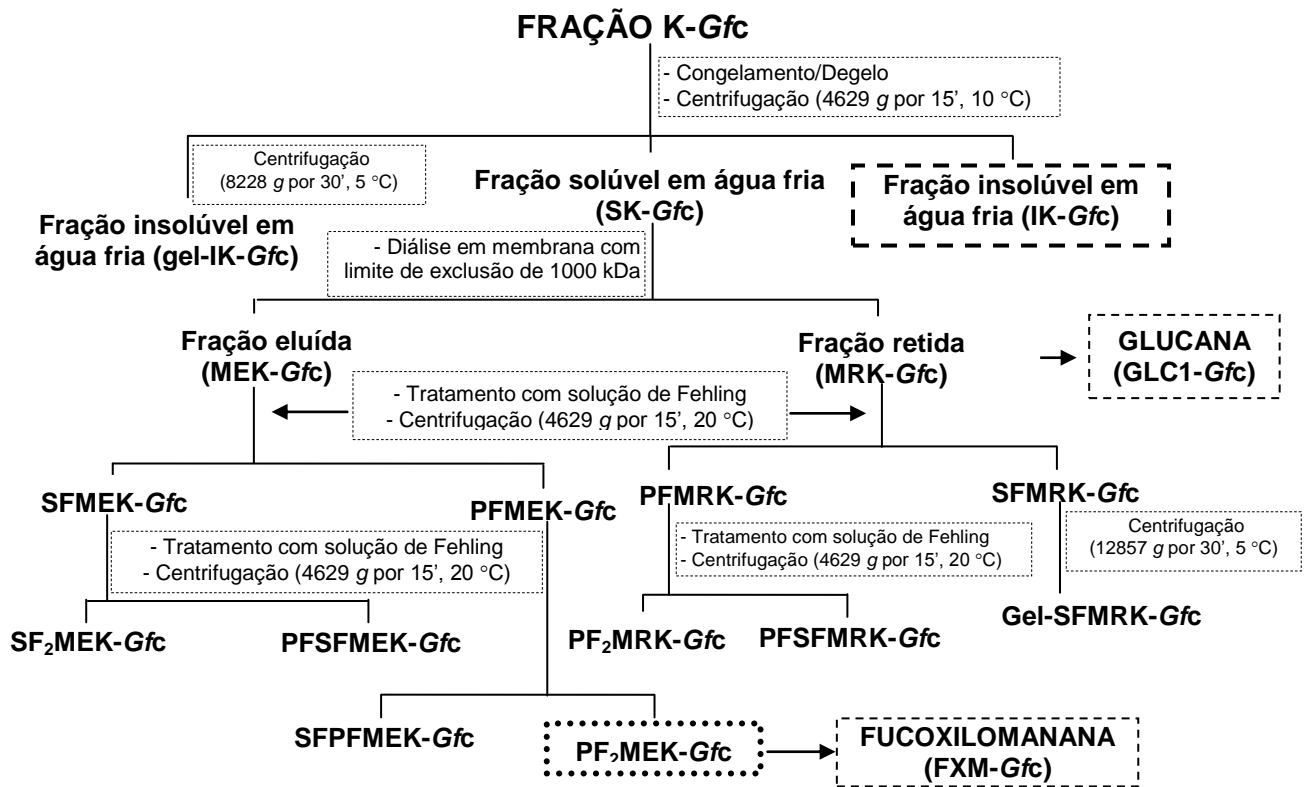
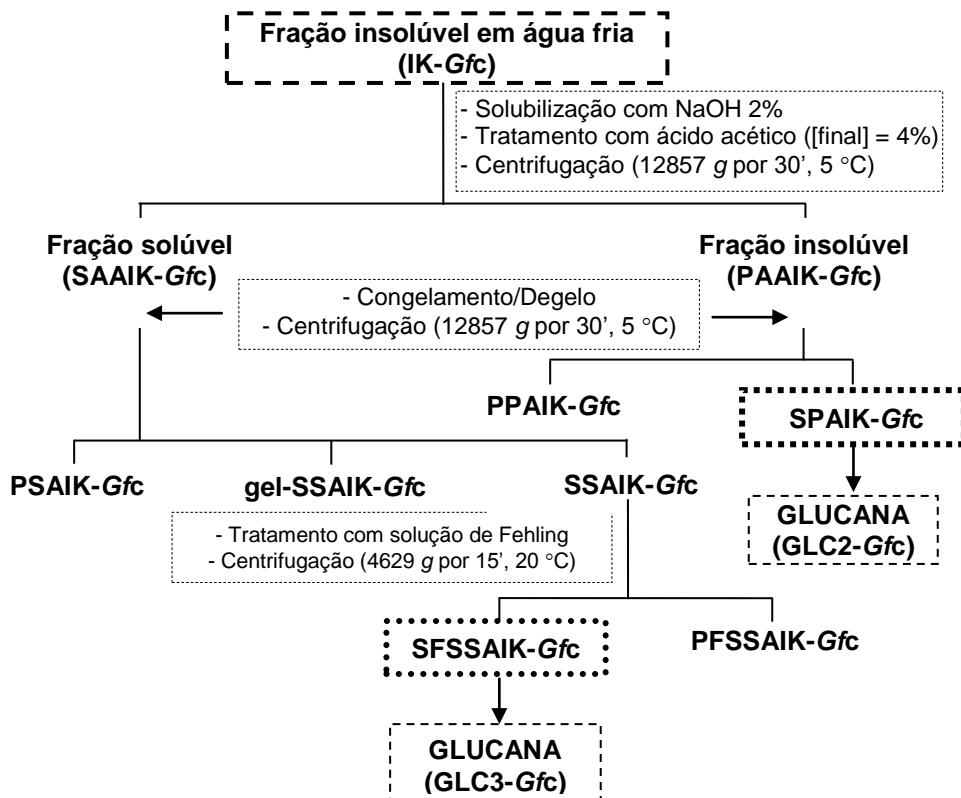


FIGURA 3.7 – Esquema de purificação dos polissacarídeos da fração IK-Gfc de *G. frondosa* linhagem cinza, por extração aquosa alcalina.



3.4 - ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

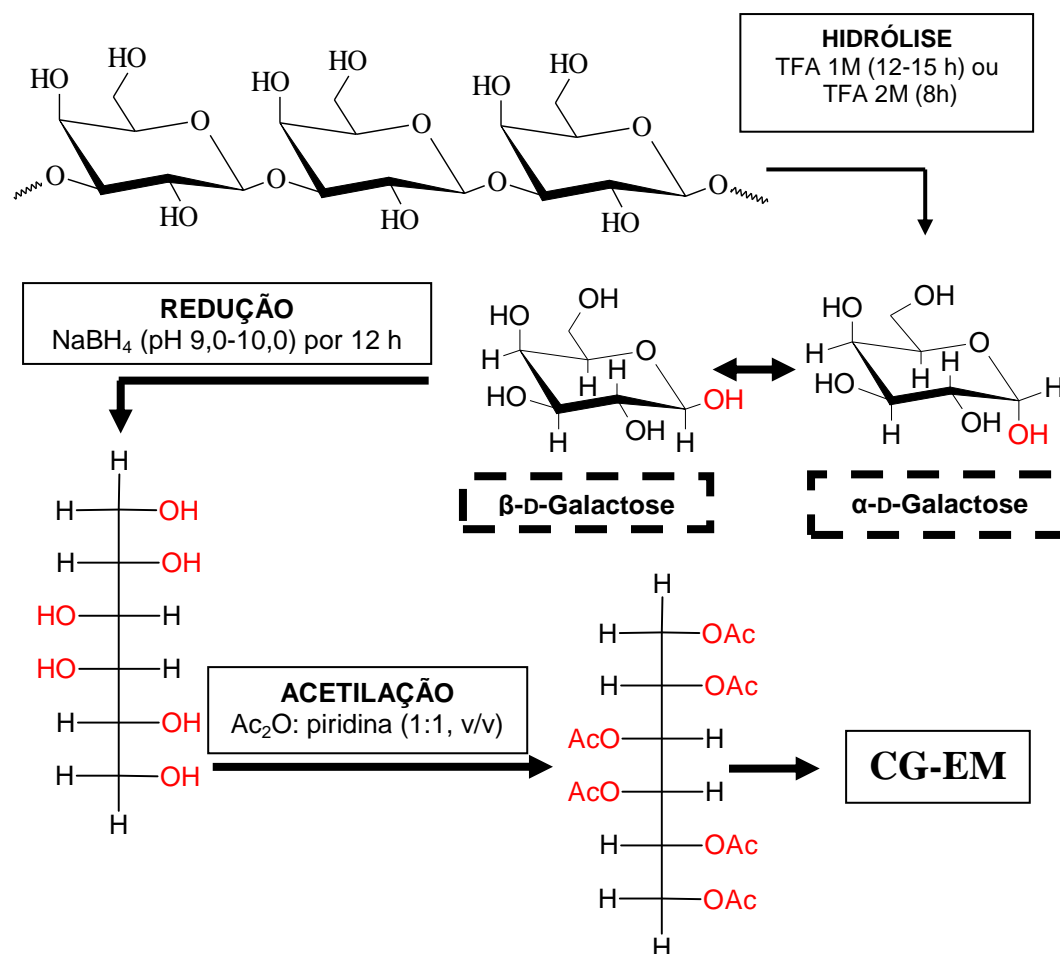
3.4.1- Composição Monossacarídica

Os constituintes monossacarídeos foram determinados através da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), de acordo com seus respectivos tempos de retenção e perfis de fragmentação. Para isso, foi necessário realizar a derivatização química destes compostos, sendo neste trabalho convertidos em acetatos de alditóis (hidrólise, redução e acetilação).

Para a derivatização, uma alíquota (1-2 mg) de cada fração polissacarídica foi hidrolisada a 100 °C em estufa, com 0,2 mL de TFA 1 M (ácido trifluoracético) durante 12 a 15 h, ou 0,2 mL de TFA 2 M durante 8 h (Apêndice A). Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi removido por evaporação, reduzidos com NaBH₄ (pH 9,0-10,0), por 12 h. Após, os materiais foram neutralizados com resina catiônica e o ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol na forma de borato de trimetila [B(OCH₃)₃].

A seguir, os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac₂O) e piridina (1:1, v/v; 0,5 mL) em temperatura ambiente (25 °C). Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio (CHCl₃) e a piridina residual removida por complexação com sulfato de cobre 5% (m/v) (WOLFROM, THOMPSON, 1963 a, b). Após a completa remoção da piridina, o CHCl₃ foi evaporado e os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (Figura 3.8, p. 47) (Apêndices B, C, D, E).

FIGURA 3.8 - Esquema de obtenção dos acetatos de alditóis a partir dos polissacarídeos para análise em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).



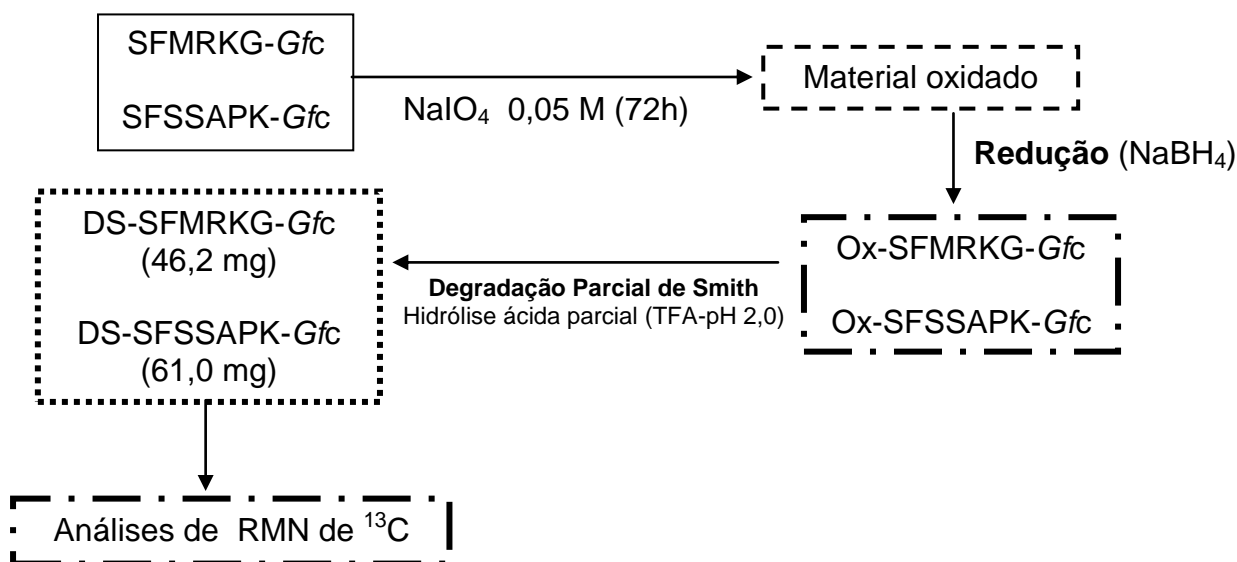
3.4.2 - Oxidação com Periodato de Sódio

Uma alíquota das frações purificadas SFMRKG-*Gfc* (100,3 mg) e SFSSAPK-*Gfc* (100,4 mg) foi solubilizada em água e em seguida adicionado periodato de sódio (NaIO_4) até atingir uma concentração final de 0,05M. O material foi mantido sob agitação por 72 h, em ausência de luz. Decorrido o tempo de reação, o material foi neutralizado com ácido acético e dialisado (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente (~24 h).

Em seguida, este foi reduzido com NaBH_4 (pH 9,0-10,0) por ~24 h (GOLDSTEIN et al., 2005), sendo o produto resultante, neutralizado com AcOH e submetido a diálise (MWCO: 12-14 kDa) contra água corrente por ~48 h, originando as frações denominadas Ox-SFMRKG-*Gfc* e Ox-SFSSAPK-*Gfc*.

As frações polissacarídicas previamente oxidadas com NaIO_4 , Ox-SFMRKG-Gfc (100,3 mg) e Ox-SFSSAPK-Gfc (100,4 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 (100 °C) por ~50 min. Decorrido o tempo, a solução foi neutralizada com AcOH e dialisada em membranas com limite de exclusão de 2 kDa. Os materiais resistentes à oxidação (DS-SFMRKG-Gfc e DS-SFSSAPK-Gfc, respectivamente) (Figura 3.9) foram submetidos às análises de RMN de ^{13}C .

FIGURA 3.9 - Esquema do processo de degradação controlada de Smith da GLC1-Gfc (fração SFMRKG-Gfc) e GLC2-Gfc (fração SFSSAPK-Gfc).



3.5- MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises das estruturas dos polímeros foram realizadas em cooperação 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 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As frações polissacarídicas (~ 40 mg) previamente solubilizadas em óxido de deutério (D₂O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me₂SO-*d*₆), dependendo da sua solubilidade, foram analisadas a 50 ou 70 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ), de acordo com o padrão interno tetrametilsilano (TMS; δ_{C/H} = 0,0).

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram realizados em espectrômetro BRUKER, modelo Avance III - 500 MHz (Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia) ou Avance III – 400 MHz (Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos).

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

As análises de composição monossacarídica e de metilação foram realizadas em CG-EM, marca:

a) Varian, modelo 3800, acoplado a espectrômetro de massa, modelo Saturn 2000R utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-225-MS (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná) (Tabela 3.1);

b) Agilent Technologies, modelo 7820, acoplado a espectrômetro de massa Agilent 5975E utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-225-MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 μm) e HP-5 (0,25 mm x 30 m x 0,25 μm) (Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás/Regional Catalão) (Tabela 3.1).

Foi utilizada ionização por elétrons (70 eV), com analisador do tipo quadrupolo e hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

TABELA 3.1 - Condições de análises utilizadas para a análise de carboidratos no CG-EM.

COLUNA CAPILAR		
Modelo da coluna	DB225-MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm)	HP5 (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm)
Composição	50%-cianopropilfenil- metilpolisiloxano	5% de fenilmetilsiloxano
Temperatura do injetor	250 °C	250 °C
Temperatura do detector (EM)	280 °C	280 °C
Condições cromatográficas utilizadas	<p>Acetato de alditol: 50 °C (1 min), 40 °C/min até 220 °C (20 min).</p> <p>Acetato de alditol parcialmente metilado: 50 °C (1 min), 40 °C/min até 215 °C (27 min).</p>	<p>Acetato de alditol: 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>Acetato de alditol 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>
Modo de injeção	Split (4:1)	Split (4:1)
Volume de injeção	1 µL	1 µL

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

Para as análises de homogeneidade, uma alíquota de cada fração solúvel em água (1 mg) foi dissolvida em 1 mL do eluente utilizado na análise [solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol.L⁻¹ contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g.L⁻¹ filtrada em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm (Millipore). Essas análises foram realizadas em *HPSEC-MALLS* (Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz), que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo WATERS, acoplado a um detector de índice de refração diferencial, modelo

WATERS 2410, conectado em série com um detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo 64 DAWN DSP-F. Para isso, foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . As análises de *HPSEC-MALLS* foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta pesquisa foram estudados os polissacarídeos obtidos dos basidiomas das duas linhagens branca e cinza de *G. frondosa*. Conforme descrito anteriormente, na seção Procedimento Experimental, para cada linhagem deste fungo foram realizados os processos de extração e purificação de carboidratos, sendo adotadas as siglas *Gfb* e *Gfc* para as linhagens branca e cinza, respectivamente.

Os basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa* foram liofilizados, obtendo 87,0% de umidade, semelhante ao teor observado previamente para a linhagem cinza (OLIVEIRA, 2013). Com a finalidade de avaliar quimicamente os polissacarídeos das duas linhagens de *G. frondosa* (massa seca de *Gfb* = 35 g e massa seca de *Gfc* = 209,6 g) estas foram submetidas a sucessivas extrações (Figura 3.1, p. 39), as quais forneceram os extratos polissacarídeos brutos (HW-*Gfc*, K-*Gfc*, CW-*Gfb*, HW-*Gfb* e K-*Gfb*).

Primeiramente, uma alíquota das frações HW-*Gfc*, K-*Gfc*, CW-*Gfb*, HW-*Gfb* e K-*Gfb*, após hidrólise ácida, redução com NaBH₄ e acetilação, foram analisadas em CG-EM para a determinação dos monossacarídeos que constituem as macromoléculas presentes nestas frações (Figura 4.1, p. 53; Figura 4.2, p. 54; Figura 4.3, p. 55). Os monossacarídeos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos para os padrões (APÊNDICE C e D).

FIGURA 4.1 – Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações CW, HW e K de *G. frondosa* linhagem branca (*Gfb*).

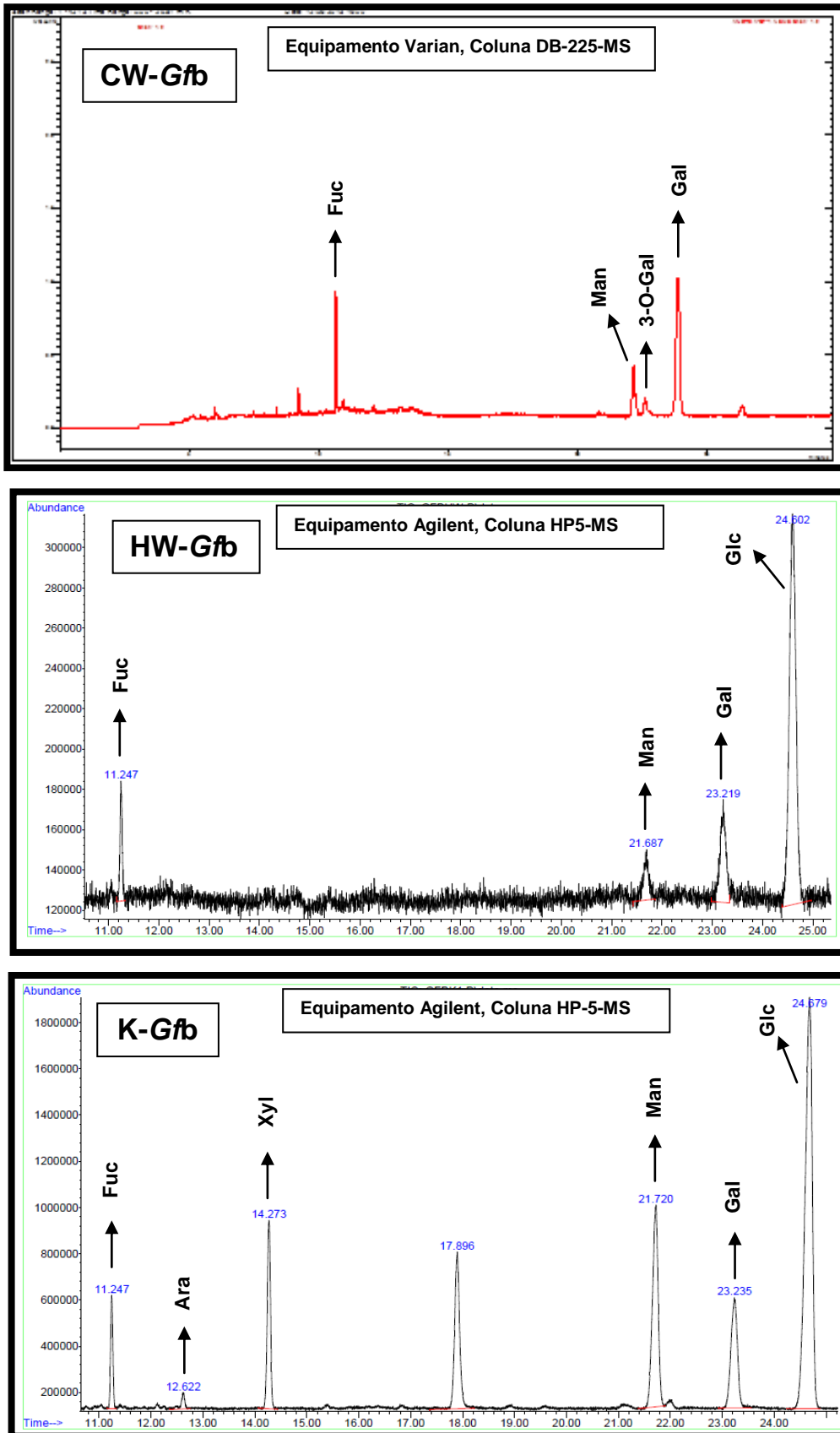


FIGURA 4.2 – Cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações HW e K de *G. frondosa* linhagem cinza (*Gfc*).

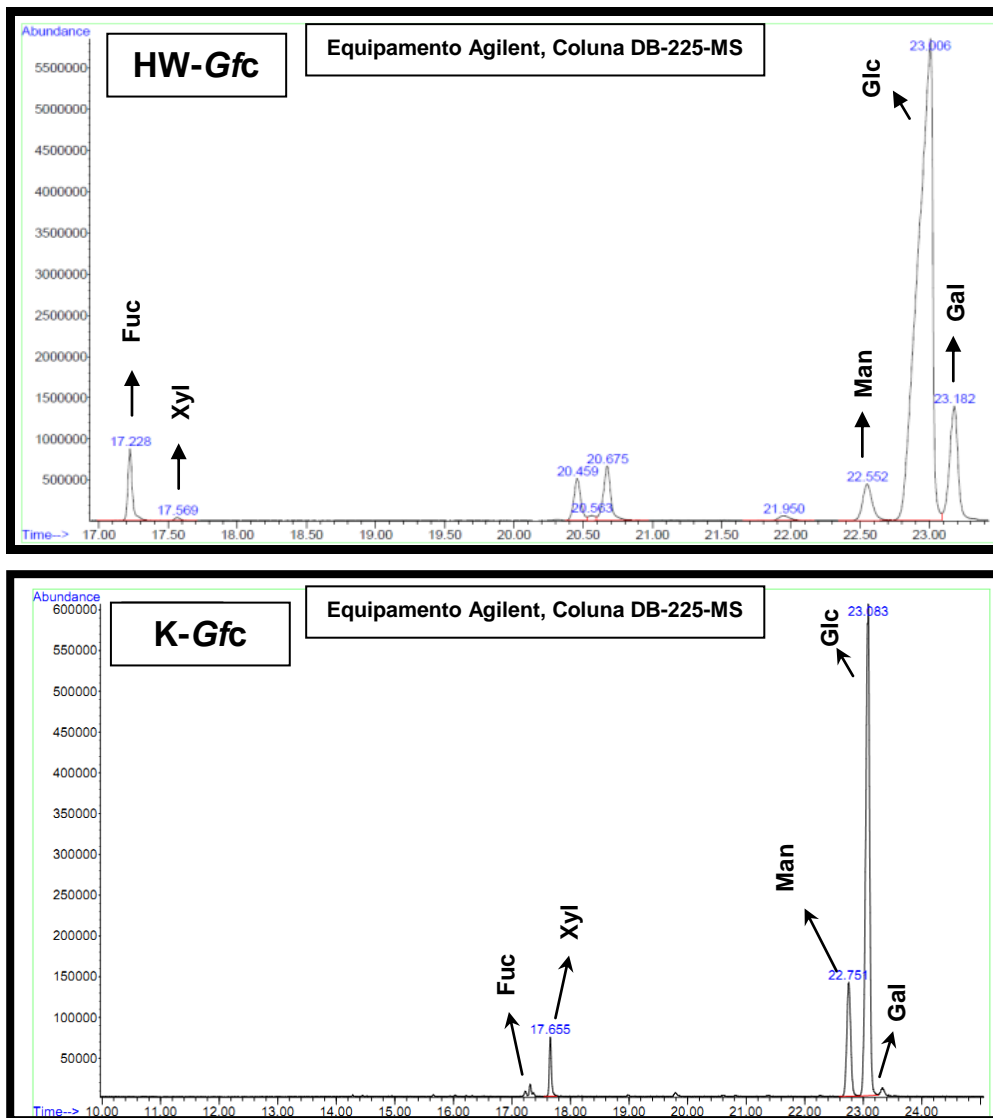
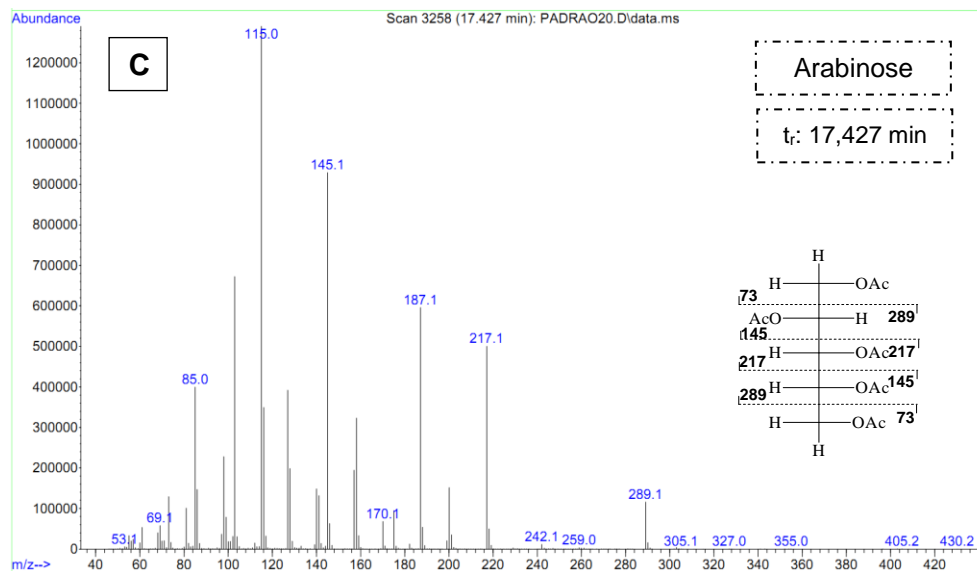
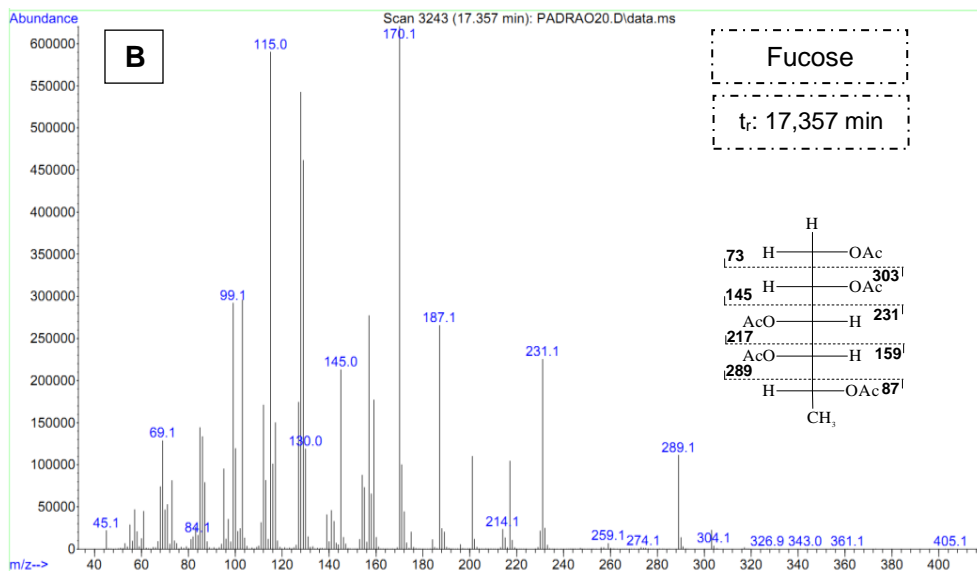
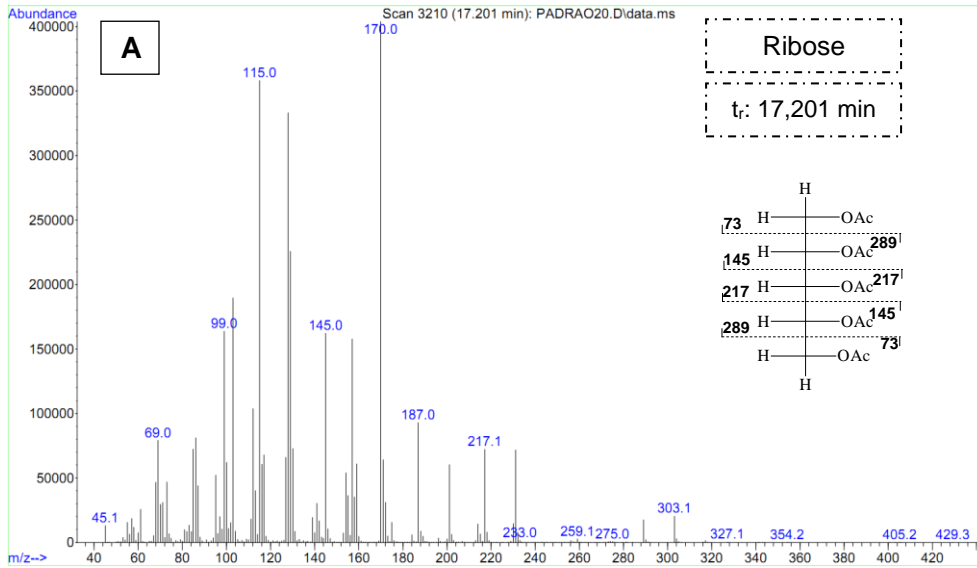
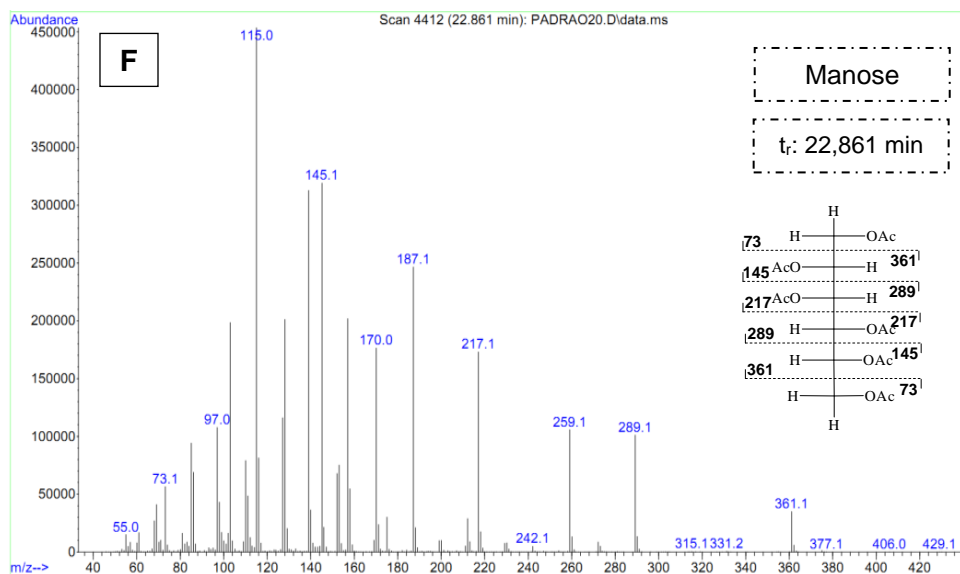
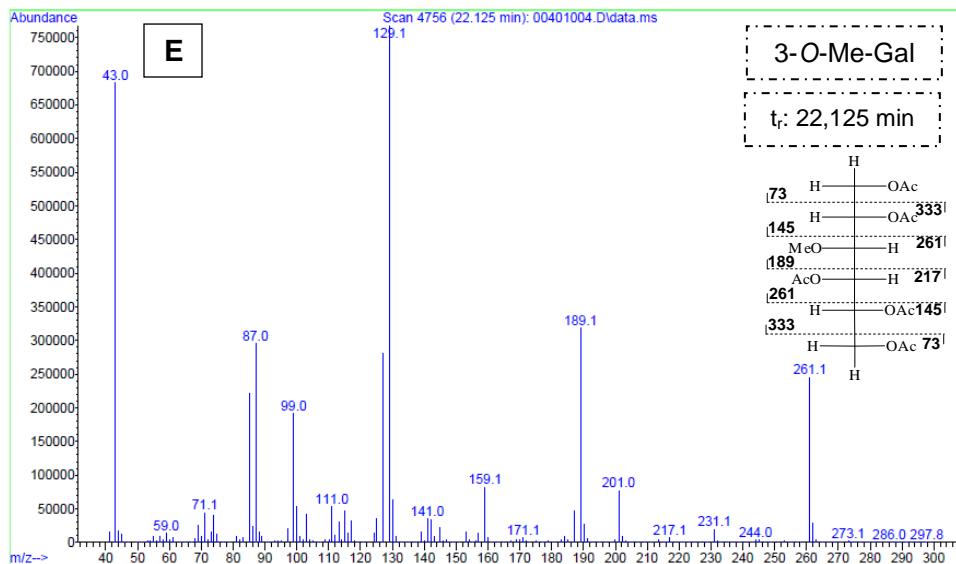
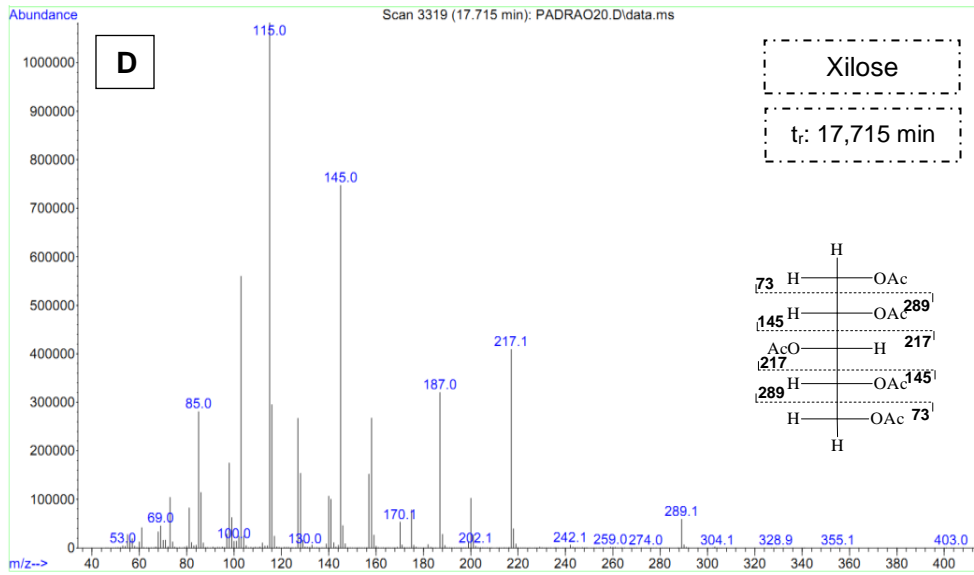
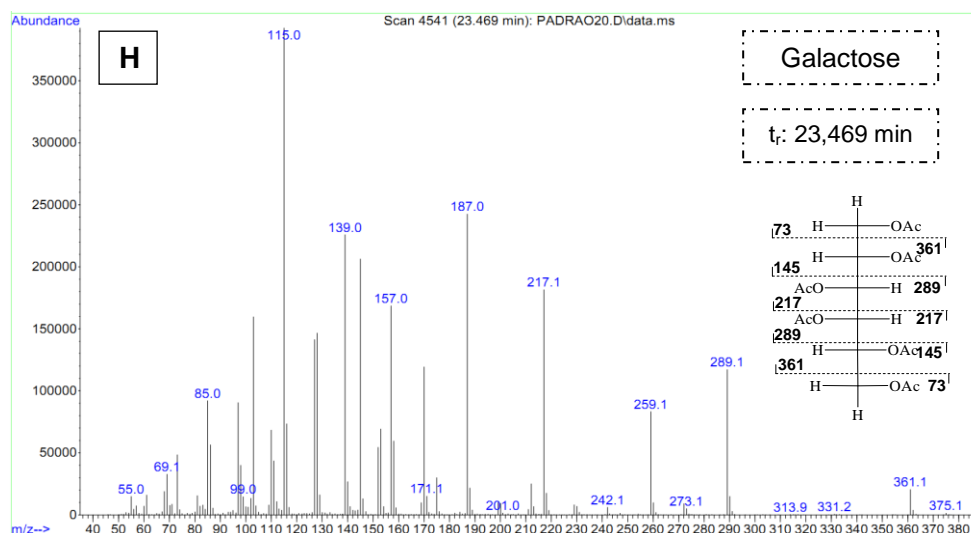
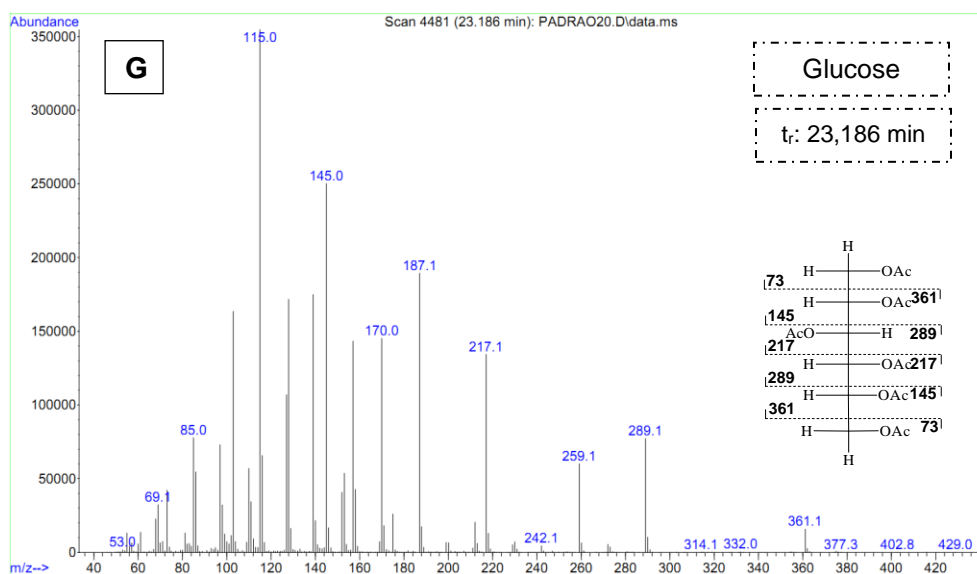


FIGURA 4.3 – Perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis (A: ribose, B: fucose; C: arabinose, D: xilose; E: 3-O-Me-Gal, F: manose, G: galactose e H: glucose).

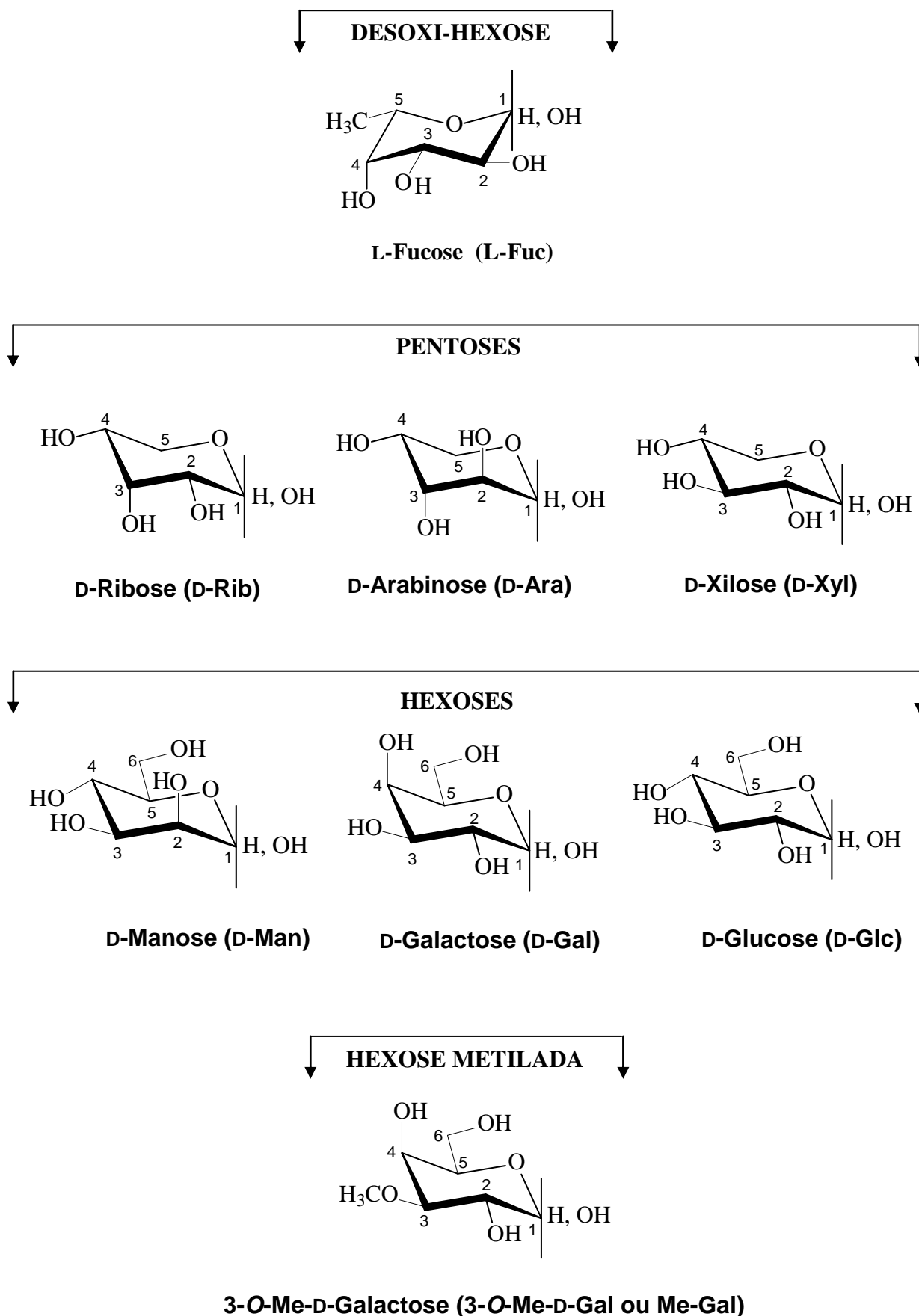






De acordo com os resultados obtidos pelas análises de CG-EM, os principais monossacarídeos observados, para ambas linhagens, foram fucose (Fuc), ribose (Rib), arabinose (Ara), xilose (Xyl), manose (Man), galactose (Gal), glucose (Glc) e 3-O-metil-galactose (3-O-Me-Gal ou Me-Gal) (Figura 4.4, p. 55; Tabela 4.1, p. 56). Apesar de todas as frações apresentarem estes monossacarídeos, os teores de cada um são distintos entre as mesmas, sugerindo que, com as diferentes extrações, foi possível isolar polímeros distintos em cada extrato (Tabela 4.1, p. 59).

FIGURA 4.4 – Estrutura dos monossacarídeos presentes nos extratos obtidos dos basidiomas das duas linhagens de *G. frondosa*.



Por outro lado, as frações correspondentes a cada linhagem apresentaram-se similares entre si, sugerindo tratar-se de polímeros contendo semelhanças estruturais. Cabe ressaltar que, a única exceção foi observada para CW-*Gfb* a qual não apresentou glucose, sendo esta distinta da fração previamente isolada da linhagem cinza (CW-*Gfc*) a qual apresentou 44,5% de glucose, além de fucose (9,4%), manose (23,7%), 3-*O*-metil-galactose e galactose (21,3%) (OLIVEIRA, 2013) (Tabela 4.1).

TABELA 4.1 – Composição monossacarídica das frações obtidas a partir dos extratos aquosos (CW e HW) e alcalino (K) de *G. frondosa* linhagem cinza (*Gfc*) e linhagem branca (*Gfb*).

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^a					
		Fuc ^b	Xyl ^b	Man ^b	3- <i>O</i> -Me-Gal ^{b,c}	Gal ^b	Glc ^b
HW-<i>Gfc</i>	1,08	3,8	0,2	4,0	-	11,3	80,7
K-<i>Gfc</i>	2,91	Tr.	5,0	17,8	-	Tr. ^d	77,2
CW-<i>Gfb</i>	3,14	21,2	-	23,0	5,4	50,4	-
HW-<i>Gfb</i>	3,36	7,3	-	7,1	-	15,8	69,8
K-<i>Gfb</i>^e	5,64	4,5	10,8	19,9	-	12,5	51,2

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

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

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

^d Traços.

^e Apresenta 1,1% de arabinose.

Após análise da composição monossacarídica, os extratos polissacarídicos brutos (CW-*Gfb*, HW-*Gfb*, HW-*Gfc*, K-*Gfb* e K-*Gfc*) foram, separadamente, submetidos aos processos de fracionamento.

4.1 - POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO CW-*Gfb*.

Com a finalidade de purificação das macromoléculas presentes nessa fração (1,1 g), o primeiro processo foi a separação dos polímeros por congelamento e degelo, originando uma fração solúvel (SCW-*Gfb*, 454,2 mg) e outra insolúvel em água fria (ICW-*Gfb*, 620,7 mg), as quais foram separadas por centrifugação (Figura 3.2, p. 41).

A fração SCW-*Gfb* mostrou ser constituída por fucose, manose, galactose e glucose, enquanto que a fração ICW-*Gfb* apresentou, além desses monossacarídeos, raminose, ribose e xilose (Tabela 4.2).

TABELA 4.2 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa*, por extração aquosa a frio.

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b						
		Fuc ^c	Man ^c	3-O-Me-Gal ^{c,d}	Gal ^c	Glc ^c	Rib ^c	Rha ^c
CW- <i>Gfb</i>	3,14	21,2	23,0	5,4	50,4	-	-	-
SCW- <i>Gfb</i>	1,30	15,5	36,4	-	35,3	12,8	-	-
ICW- <i>Gfb</i> ^e	1,77	10,5	15,6	-	19,2	28,8	7,4	2,7
MRCW- <i>Gfb</i>	0,46	15,0	24,6	-	56,0	-	-	4,4
MECW- <i>Gfb</i>	0,82	12,4	42,2	-	27,5	14,1	2,2	1,6
SFMRCW- <i>Gfb</i>	0,05	15,5	21,6	3,5	44,1	11,6	-	3,7
PFMRCW- <i>Gfb</i>	0,34	16,4	21,6	3,3	56,9	-	-	1,8
SF ₂ MRCW- <i>Gfb</i>	0,03	19,3	15,1	-	55,9	9,7	-	-
PF ₂ MRCW- <i>Gfb</i>	0,16	15,7	20,5	-	63,8	-	-	-
SFPFMRCW- <i>Gfb</i>	0,13	20,1	16,4	-	49,5	8,8	-	5,2
SFMECW- <i>Gfb</i>	0,58	20,1	49,2	-	17,0	Tr.	13,7	-
PFMECW- <i>Gfb</i>	0,11	15,3	36,7	-	48,0	Tr.	-	-
SF ₂ MECW- <i>Gfb</i>	0,39	17,3	29,2	-	38,8	14,7	-	-
PFSFMECW- <i>Gfb</i>	0,14	20,4	20,1	-	59,5	-	-	-

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (35,0 g).

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

^c Fuc: fucose; Man: manose; 3-O-Me-Gal: 3-O-metil-galactose; Gal: galactose; Glc: glucose; Rib: ribose e Rha: raminose.

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

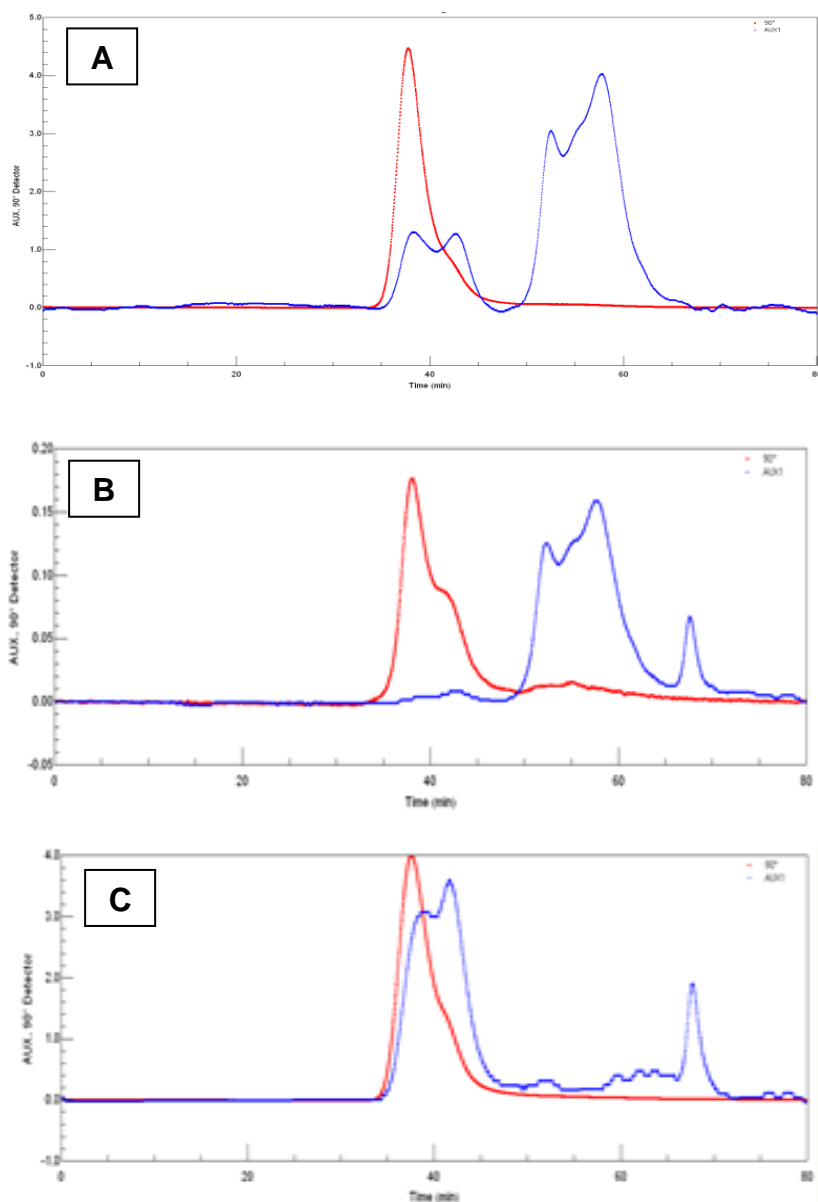
^e Apresenta 15,8 % de xilose.

Para o acompanhamento dos procedimentos de purificação das amostras solúveis em água fria, foram utilizadas as análises de *HPSEC-MALLS*, sendo atribuído um perfil homogêneo para aquelas análises que apresentarem um único pico cromatográfico simétrico.

Devido ao perfil cromatográfico heterogêneo, por *HPSEC-MALLS*, da fração SCW-*Gfb* (Figura 4.5, p. 61), esta foi dialisada em membrana com limite de exclusão de 1000 kDa devido a presença de polímeros com alta massa molecular, sugerida pela banda significativa detectada por espalhamento de luz. Este procedimento gerou duas novas frações, ou seja, a fração retida (MRCW-*Gfb*, 162,1 mg) e a fração eluída (MECW-*Gfb*, 288,6 mg)

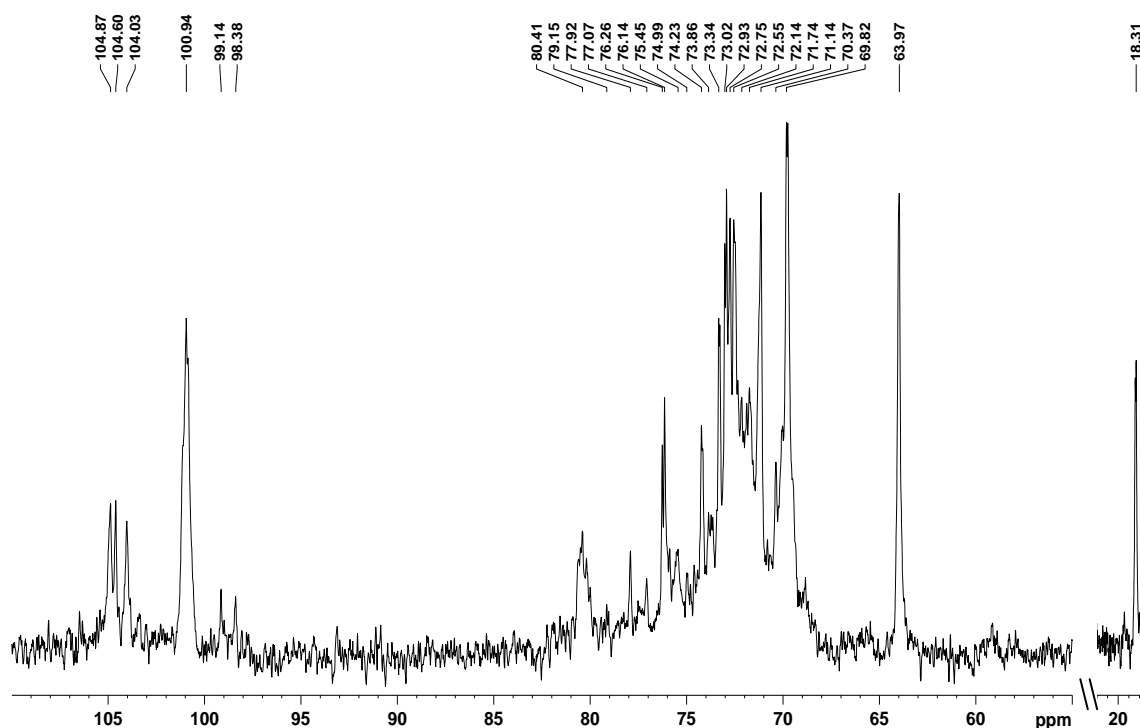
(Figura 3.2, p. 41), as quais apesar de impuras mostraram-se distintas quanto ao perfil de eluição (Figura 4.5).

FIGURA 4.5 – Perfil de eluição das frações SCW-Gfb (A), MECW-Gfb (B) e MRCW-Gfb (C), por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (EL: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS).



Para verificar o tipo de polímero presente na fração MRCW-Gfb, foi realizada uma análise de RMN de ^{13}C (Figura 4.6, p. 62), a qual apresentou sinais característicos da heterogalactana isolada para a linhagem cinza (OLIVEIRA, 2013).

FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração MRCW-*Gfb* de *G. frondosa* linhagem branca, analisada em D_2O , a 50°C .



No entanto, devido à heterogeneidade das frações MRCW-*Gfb* e MECW-*Gfb*, determinada por *HPSEC-MALLS*, estas foram submetidas ao fracionamento com solução de Fehling (JONES, STOODLEY, 1965) (Figura 3.2, p. 41), formando os complexos cúpricos solúveis (= sobrenadante de Fehling: SFMRCW-*Gfb*, 17,4 mg e SFMECW-*Gfb*, 203,7 mg, respectivamente) e os insolúveis (= precipitado de Fehling: PFMRCW-*Gfb*, 120,3 mg e PFMECW-*Gfb*, 40,0 mg) (Figura 3.2, p. 41), os quais foram separados por centrifugação e recuperados por diálises e deionização com resina catiônica.

Para garantir a eficiência do processo de precipitação com solução de Fehling, as frações SFMRCW-*Gfb*, SFMECW-*Gfb* e PFMRCW-*Gfb* foram novamente submetidas a este procedimento, gerando para cada fração um sobrenadante (SF₂MRCW-*Gfb* 9,2 mg, SF₂MECW-*Gfb* 135,4 mg e SF-PFMRCW-*Gfb* 44,5 mg, respectivamente) e um precipitado (PF-SFMRCW-*Gfb* 3,5 mg, PF-SFMECW-*Gfb* 48,2 mg e PF₂MRCW-*Gfb* 56,9 mg, respectivamente) (Figura 3.2, p. 41).

Todas as frações provenientes do tratamento com solução de Fehling foram analisadas quanto à composição monossacarídica, sendo

observado, principalmente, fucose, manose e galactose para todas as amostras. A principal diferença observada entre as mesmas deve-se a presença de glucose nos complexos cúpricos solúveis (Tabela 4.2, p. 60).

Devido à composição química da fração PF₂MRCW-Gfb, constituída apenas por fucose, manose e galactose, e aos recentes relatos de heterogalactanas purificadas do micélio (SILVA, 2014) e do basidioma da linhagem cinza deste fungo (OLIVEIRA, 2013), a mesma foi analisada por RMN de ¹³C (Figura 4.7) e HSQC (Figura 4.8, p. 64) para confirmar a presença desta macromolécula na correspondente fração.

FIGURA 4.7 – Espectro de RMN de ¹³C da fração PF₂MRCW-Gfb de *G. frondosa* linhagem branca, analisada em D₂O, a 50°C, 100 MHz.

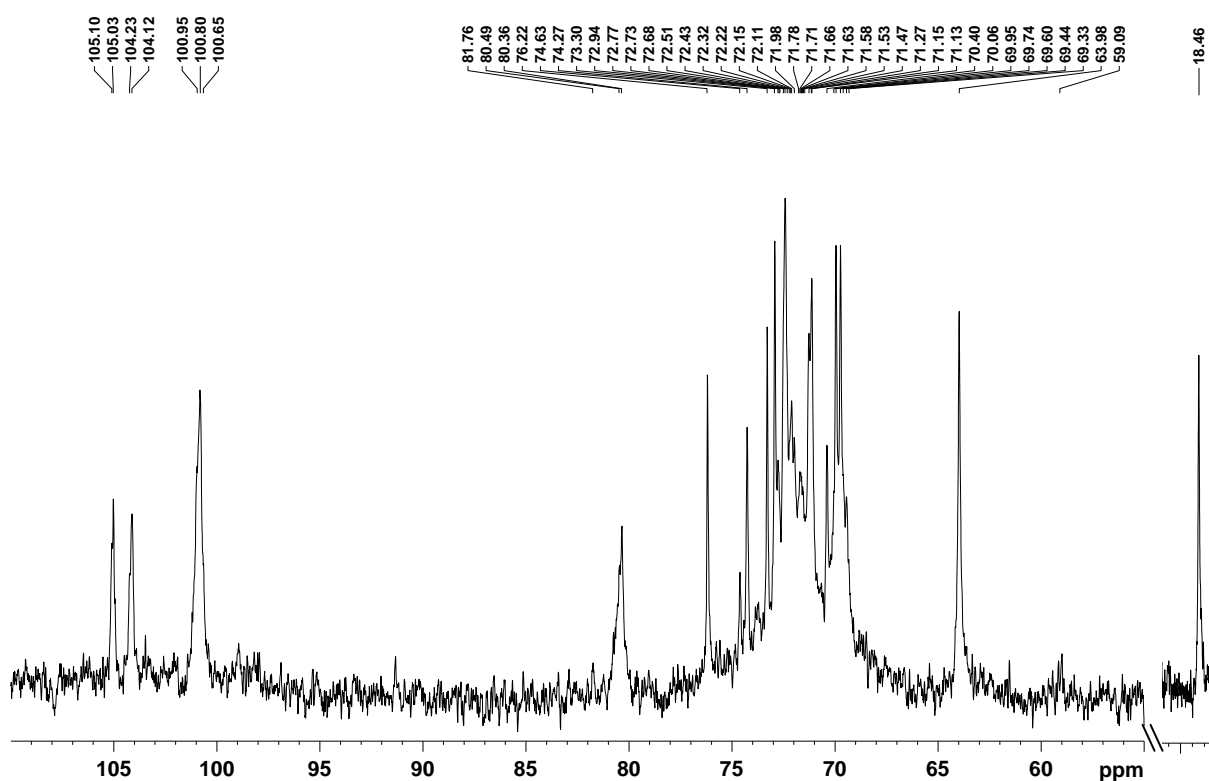
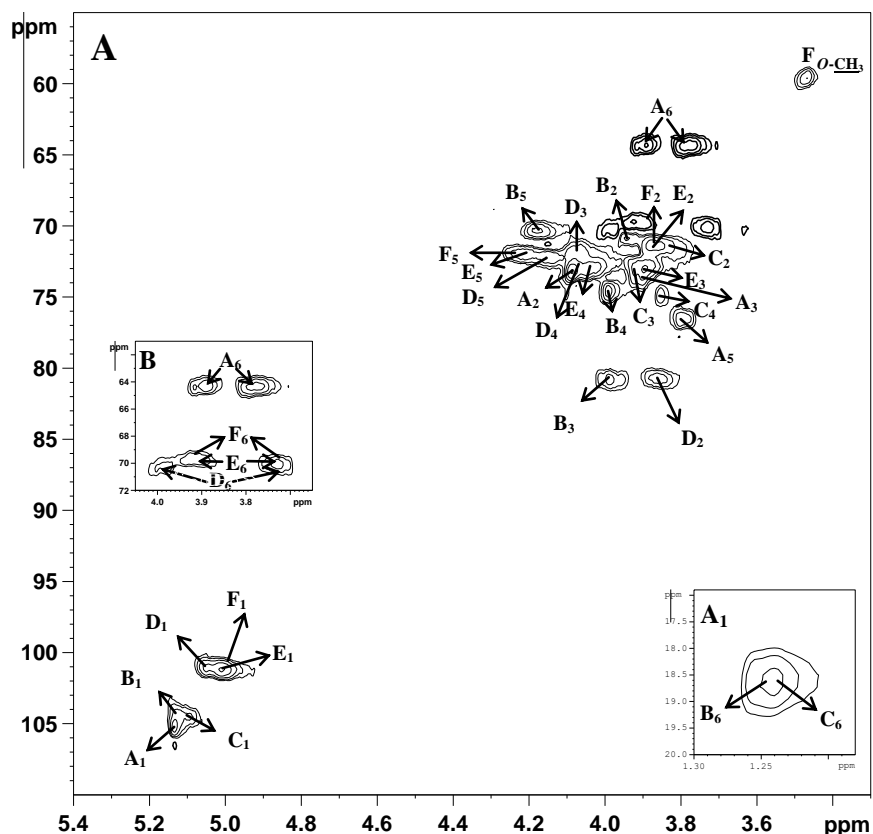


FIGURA 4.8 – Espectro de HSQC da fração PF₂MRCW-*Gfb* de *G. frondosa* linhagem branca, analisada em D₂O a 50°C, com inserto ampliado da região de C-6 da Fucp (A₁) e de C-6 do HSQC-DEPT (B).



Legenda: A= terminal não redutor de α -Manp; B = terminal não redutor de α -Fucp; C = α -Fucp substituída em O-3 por α -Manp; D = α -Galp 2,6-di-O-substituída; E = α -Galp 6-O-substituída; F = 3-O-Me- α -Galp 6-O-substituída.

Os espectros de RMN de ¹³C e HSQC mostraram-se similares àqueles obtidos para heterogalactana isolada da linhagem cinza deste macrofungo (OLIVEIRA, 2013), a qual é constituída por uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Galp, parcialmente substituídas em O-2, principalmente, pelo dissacarídeo 3-O- α -DManp- α -L-Fucp e em uma menor proporção por terminais não redutores de α -L-Fucp e α -D-Manp.

Os assinalamentos de ¹³C e ¹H (Tabela 4.3, p. 65) da fucomanogalactana isolada neste trabalho foram determinados por comparação com dados obtidos para polímeros similares descritos na literatura (CHO et al., 2011; OLIVEIRA, 2013). De acordo com estes dados, os

monossacarídeos foram denominados de A, B, C, D, E e F de acordo com o valor decrescente de deslocamento químico dos seis sinais principais de H-1, presentes na região anomérica em δ 5,13, 5,12, 5,09, 5,05, 5,00 e 4,99 do espectro de HSQC (Figura 4.8, p. 64), os quais foram atribuídos aos terminais não redutores de Manp (δ 5,13) e Fucp (δ 5,09), às unidades de Fucp 3-O-substituídas (δ 5,12), 3-O-Me-Galp 6-O-substituídas (δ 4,99) e 6-O- (δ 5,00) e 2,6-di-O-substituídas Galp (δ 5,05).

TABELA 4.3 – Assinalamentos de ^{13}C e ^1H da fucomanogalactana isolada da linhagem branca de *G. frondosa*^a.

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

^a Os assinalamentos foram realizados de acordo com os dados da literatura (CHO et al., 2011; OLIVEIRA, 2013).

O espectro de HSQC (Figura 4.8; p. 64) apresentou sinais de C-1/H-1 em δ 105,10; 105,03/5,13, 104,23/5,09 e 104,10/5,12 correspondentes aos terminais não redutores de α -Manp e α -Fucp e às unidades de α -Fucp 3-O-substituídas, respectivamente. Os sinais (C1/H1) na região anomérica em δ 100,78/5,05 e 100,95/5,00 foram atribuídos às unidades de α -Galp 6-O- e 2,6-di-O- substituídas, respectivamente, e aquele em δ 100,65/4,99 às unidades de 3-O-Me- α -Galp 6-O-substituídas.

A presença de unidades de α -Fucp substituídas em O-3 e de α -Galp ligadas em O-6 ou O-2,6, foram confirmadas pelos sinais de C-2 e C-3 O-substituídos em δ 80,3, respectivamente, (Figura 4.7, p. 63 e Figura 4.8; p.

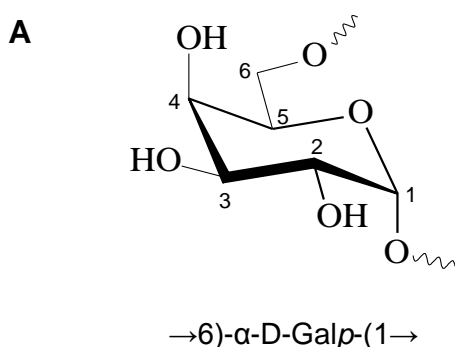
64) e os C-6 substituídos das unidades de Galp e 3-O-Me-Galp 6-O-ligadas e às unidades de Galp 2,6-di-O-substituídas da cadeia principal em δ 69,4 e 69,7, respectivamente, sendo estes grupos $-CH_2$ substituídos confirmados por inversão no espectro de HSQC-DEPT (Figura 4.8 – B; p. 64).

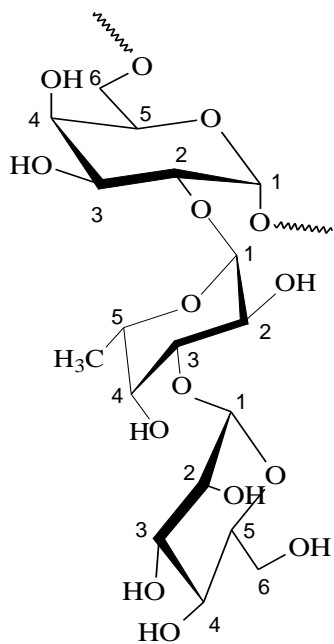
Apesar desta fração apresentar baixos teores de grupos O-metil, foi possível confirmar a presença e a posição destes no heteropolissacarídeo sendo confirmados pelos sinais (C/H) em δ 59,03/3,46 e δ 81,80/3,56 correspondentes ao $-O-CH_3$ e ao C-3/H-3 O-substituídos, respectivamente (Figura 4.8, p. 64; Tabela 4.3, p. 65).

Além destes sinais, foi possível determinar os deslocamentos de C-2/H-2 a C-6/H-6 dos terminais não redutores de α -Manp (δ 72,90/4,09, 73,28/3,92, 69,73/3,69, 76,19/3,80 e 63,97/3,78;3,90) e de α -Fucp (δ 71,12/3,83, 72,31/3,91, 74,62/3,85, 71,98/4,14 e 18,42/1,24, respectivamente) (Figura 4.8, p. 64; Tabela 4.3, p. 65).

Os resultados obtidos através das análises realizadas sugerem que a fração PF₂MRCW-Gfb consiste em uma fucomanogalactana ramificada formada por uma cadeia principal constituída por α -D-galactopiranosose (A), parcialmente substituída em O-2 pelo dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil (B) e, em uma menor proporção, por terminais não redutores de α -L-Fucp (C) e α -D-Manp (D), além de conter substituições em O-3 por grupos metil (E) (Figura 4.9).

FIGURA 4.9 – Principais fragmentos observados para a fucomanogalactana isolada dos basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa*.



B α -D-Man ρ

1

↓

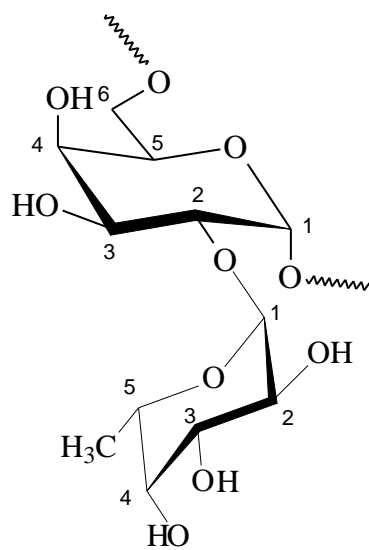
3

 α -L-Fuc ρ

1

↓

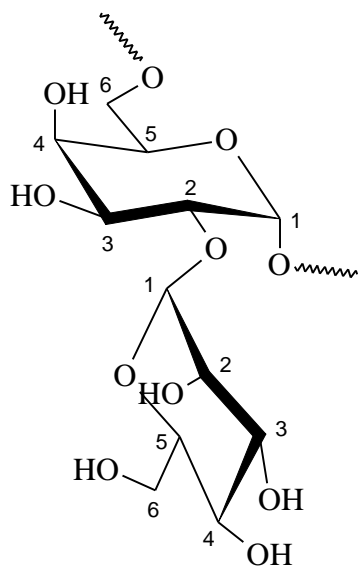
2

→6)- α -D-Galp-(1→**C** α -L-Fuc ρ

1

↓

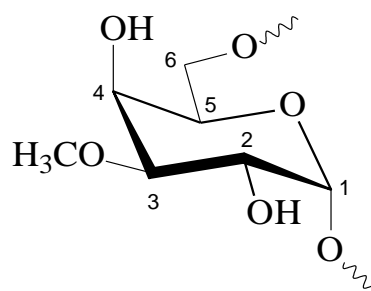
2

→6)- α -D-Galp-(1→**D** α -D-Man ρ

1

↓

2

→6)- α -D-Galp-(1→**E**

Me

↓

3

→6)- α -D-Galp-(1→

As heterogalactanas consistem em um grupo de moléculas amplamente encontrada em cogumelos, sendo a maioria constituída por uma cadeia principal composta por α -D-Galp (1 \rightarrow 6) ligadas, as quais se encontram, parcialmente, substituídas em O-2 por diferentes cadeias laterais. De acordo com o tipo de cadeia lateral, estas são chamadas de fucogalactanas, manogalactanas, manofucogalactanas ou fucomanogalactanas podendo ser formadas por α -L-Fucp, α - ou β -D-Manp e β -D-Galp e o dissacarídeo 3-O- α/β -D-manopiranosil- α -D-fucopiranosil (Tabela 1.3, p. 19).

Heteropolissacarídeos similares à fucomanogalactana encontrada na fração PF₂MRCW-Gfb têm sido previamente isoladas do basidioma (fração QEPF-Gfc) (OLIVEIRA, 2013) e do micélio da linhagem cinza deste fungo (MEPF₃CW-GfM) (SILVA, 2014). O polímero descrito para o basidioma da linhagem cinza apresentou apenas pequenas diferenças quanto à composição (OLIVEIRA, 2013), ao contrário da obtida do micélio a qual se mostrou altamente metilada (25% de 3-O-metil-galactose) (SILVA, 2014). Polissacarídeos parcialmente metilados têm sido encontrados principalmente em cogumelos do gênero *Pleurotus* e em algumas espécies de *Agaricus*, como *Agaricus bisporus* var. *hortensis* e *Agaricus bisporus*, sendo isoladas as manogalactanas (JAKOVLEVIĆ et al., 1998; ROSADO et al., 2003; SMIDERLE et al., 2008a; ZHANG et al., 2013) e galactanas de *Pleurotus* spp (CARBONERO et al., 2008a) e as fucogalactanas a partir das espécies de *Agaricus* citadas anteriormente (KOMURA et al., 2010; RUTHES et al., 2012, 2013b).

4.2 - POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES HW-Gfb e HW-Gfc

De maneira similar ao fracionamento da fração CW-Gfb por congelamento e degelo, as amostras HW-Gfb (1,2 g) e HW-Gfc (2,3 g) foram submetidas a esta técnica de purificação separando-as em frações solúveis (SHW-Gfb 992,4 mg e SHW-Gfc, 1,7 g) e insolúveis em água fria (ICW-Gfb, 57,9 mg e ICW-Gfc, 238,7 mg), os quais foram separados por centrifugação. Além destas frações, foi possível separar através deste fracionamento um

material viscoso com a característica de um gel, sendo estes chamados de gel-*Gfb* (36,7 mg) e gel-*Gfc* (270,0 mg) (Figura 3.3, p. 42; Figura 3.5, p. 44).

Análises de composição monossacarídica foram realizadas para as frações provenientes deste processo, as quais mostraram ser constituídas principalmente por glucose, ou seja, similar às frações de origem (Tabela 4.4; Tabela 4.5).

TABELA 4.4 - Composição monossacarídica e rendimento (g%) das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa*, por extração aquosa a quente.

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b			
		Fuc ^c	Man ^c	Gal ^c	Glc ^c
HW- <i>Gfb</i>	3,36	7,3	7,1	15,8	69,8
SHW- <i>Gfb</i>	2,83	6,1	5,6	12,3	76,0
IHW- <i>Gfb</i>	0,17	-	28,1	-	71,9
Gel-HW- <i>Gfb</i>	0,26	-	-	23,4	76,6
MRHW- <i>Gfb</i>	0,09	Tr. ^d	Tr.	8,5	91,5
MEHW- <i>Gfb</i>	2,60	Tr.	Tr.	10,2	89,8
QRMEHW- <i>Gfb</i>	0,81	9,1	4,1	44,0	42,8
QEMEHW- <i>Gfb</i>	1,53	2,7	4,8	12,8	79,7

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (35,0 g)

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

^c Fuc: fucose; Man: manose; Gal: galactose e Glc: glucose.

^d Traços.

TABELA 4.5 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem cinza de *G. frondosa*, por extração aquosa a quente.

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b			
		Fuc ^c	Man ^c	Gal ^c	Glc ^c
HW- <i>Gfc</i>	1,08	3,8	4,0	11,3	80,7
SHW- <i>Gfc</i>	0,81	6,0	5,6	16,3	72,1
IHW- <i>Gfc</i>	0,11	Tr. ^d	-	37,9	62,1
Gel- <i>Gfc</i>	0,13	2,3	2,3	11,0	84,4
SFHW- <i>Gfc</i>	0,76	18,0	7,9	25,8	48,3
PFHW- <i>Gfc</i>	0,04	24,5	12,7	37,1	25,7
MRSFHW- <i>Gfc</i>	0,01	5,9	9,4	21,0	63,7
MESFHW- <i>Gfc</i>	0,73	Tr.	-	Tr.	100
QRMESFHW- <i>Gfc</i>	0,22	Tr.	Tr.	6,5	93,5
QEMESFHW- <i>Gfc</i>	0,49	6,6	Tr.	17,2	76,2

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (209,6 g)

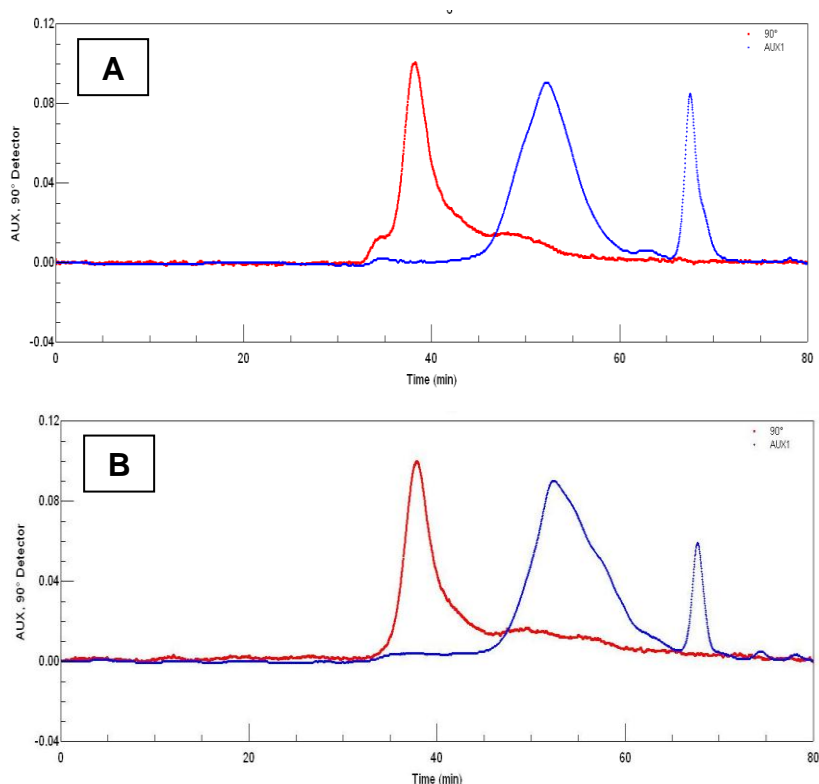
^b Analisado em CG-EM após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

^c Fuc: fucose; Man: manose; Gal: galactose e Glc: glucose.

^d Traços.

Devido ao maior rendimento das frações solúveis em água fria (SHW-Gfb e SHW-Gfc), estas foram submetidas a procedimentos adicionais de purificação, pois as mesmas apresentaram um perfil cromatográfico heterogêneo quando analisadas por *HPSEC-MALLS* (Figura 4.10). Com este objetivo, SHW-Gfc foi tratada com solução de sulfato de cobre em meio alcalino (JONES, STOODLEY, 1965), fracionando-a em um sobrenadante (SFHW-Gfc, 1,6 g) e um precipitado de Fehling (PFHW-Gfc, 81,1 mg) (Figura 3.5, p. 44). No entanto, esta etapa não foi realizada para SHW-Gfb devido ao baixo rendimento da fração PFHW-Gfc, sugerindo que os polímeros presentes nas mesmas não formam complexos cúpricos insolúveis, ou seja, não apresentam quantidades significativas de hidroxilas vicinais livres.

FIGURA 4.10 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (EL: -) e índice de refração (IR: -) (*HPSEC-MALLS*), das frações SHW-Gfb (A) e SHW-Gfc (B).



Levando em consideração o perfil cromatográfico, por *HPSEC-MALLS*, das frações solúveis em água fria (Figura 4.10), o qual sugeriu a presença de moléculas com diferentes massas molares, foi escolhido o processo de purificação baseado no tamanho das moléculas, como a diálise

em membranas com diferentes limites de exclusão. Para isto, as amostras SHW-*Gfb* e SFHW-*Gfc* foram submetidas a diálises, sequenciais, em membranas com limites de exclusão de 1000 e 500 kDa. A partir deste método de fracionamento, foram obtidas as frações retidas (MRHW-*Gfb*, 34,1 mg; MRSFHW-*Gfc*, 29,9 mg; QRMEHW-*Gfb*, 284,8 mg; QRMESFHW-*Gfc*, 466,4 mg) e eluídas (MEHW-*Gfb*, 912,3 mg; MESFHW-*Gfc*, 1,5 g; QEMEHW-*Gfb*, 535,3 mg; QEMESFHW-*Gfc*, 1,0 g) nas membranas de 1000 e 500 kDa, respectivamente, para cada ambas amostras dialisadas (Figura 3.3, p. 42 e Figura 3.5, p. 44).

Os resultados obtidos através das análises de composição monossacarídica destas frações originadas a partir das diálises sugerem que o polímero principal presente nestas amostras são formados principalmente por glucose, ou seja, as glucanas, pois as que apresentaram maior rendimento são constituídas por altos teores deste monossacarídeo. Provavelmente, os demais monossacarídeos pertencentes a estas frações, como fucose, manose e galactose, sejam referentes às heterogalactanas obtidas nos extratos polissacarídeos obtidos por extração com água fria, no entanto, para a confirmação destes dados será necessário realizar análises de RMN de ^{13}C e *HPSEC-MALLS*.

4.3- POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES K-*Gfb* e K-*Gfc*

Primeiramente, os extratos polissacarídicos obtidos por tratamento dos basidiomas com solução aquosa de hidróxido de potássio (K-*Gfb*, 2,0 g e K-*Gfc*, 6,1 g) foram submetidos ao fracionamento baseado na solubilidade das moléculas em água fria, originando, para cada uma delas, frações solúveis (SK-*Gfb*: 917,4 mg e SK-*Gfc*, 2,8 g) e insolúveis em água fria (IK-*Gfb*1,04 mg e IK-*Gfc*, 3,3 g). Para a linhagem cinza, também foi isolado através deste procedimento uma fração com consistência gelatinosa a qual foi chamada de gel-K-*Gfc* (71,7 mg) (Figura 3.4, p. 42; Figura 3.6, p. 45).

Para saber a respeito dos constituintes monossacarídicos destas frações, uma alíquota das mesmas foi analisada em CG-EM após conversão em acetatos de alditóis, sendo observado apenas xilose, manose e glucose para as obtidas da linhagem cinza (Tabela 4.6, p. 72). As resultantes da

linhagem branca continham, além destes monossacarídeos, fucose e galactose (Tabela 4.7, p. 73).

TABELA 4.6 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem cinza de *G. frondosa*, por extração alcalina.

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b				
		Fuc ^c	Xyl ^c	Man ^c	Gal ^c	Glc ^c
K- <i>Gfc</i>	2,91	-	5,0	17,8	Tr.	77,2
SK- <i>Gfc</i>	1,32	-	6,9	20,3	-	72,8
IK- <i>Gfc</i>	1,52	-	4,5	15,5	-	80,0
gel- <i>IK Gfc</i>	0,03	-	6,4	9,9	-	83,7
MRK- <i>Gfc</i>	0,41	-	Tr. ^d	27,2	-	72,8
MEK- <i>Gfc</i>	0,89	-	8,2	23,9	-	67,9
SFMRK- <i>Gfc</i>	0,18	-	3,5	7,4	-	89,1
gel-SFMRK <i>Gfc</i>	0,20	-	-	-	-	100,0
PFMRK- <i>Gfc</i>	0,03	-	24,7	61,9	-	13,4
SFMEK- <i>Gfc</i>	0,61	0,9	6,5	27,0	-	65,6
PFMEK- <i>Gfc</i>	0,05	4,4	20,8	63,8	-	11,0
PF ₂ MRK- <i>Gfc</i>	0,01	4,1	27,7	61,5	-	6,7
SF ₂ MEK- <i>Gfc</i>	0,56	3,9	23,4	24,4	2,4	45,9
PFSFMEK- <i>Gfc</i>	0,05	Tr.	Tr.	31,1	-	68,9
PF ₂ MEK- <i>Gfc</i>	0,03	6,9	33,1	60,0	-	-
SFPFMEK- <i>Gfc</i>	0,02	4,4	20,6	56,4	-	18,6
SAAIK- <i>Gfc</i>	0,76	-	25,1	5,5	5,5	63,9
PAAIK- <i>Gfc</i>	0,75	9,5	53,6	10,0	-	26,9
SSAIK- <i>Gfc</i>	0,16	-	2,6	6,0	2,4	89,0
gelSSAIK <i>Gfc</i>	0,13	1,0	4,2	8,6	2,3	83,9
PSAIK- <i>Gfc</i>	0,45	-	7,0	16,5	8,4	68,1
SPAIK- <i>Gfc</i>	0,03	-	-	-	-	100,0
PPAPK- <i>Gfc</i> ^e	0,71	4,2	29,8	30,7	1,7	32,8
SFSSAIK- <i>Gfc</i>	0,14	-	-	-	-	100,0
PFSSAIK- <i>Gfc</i>	0,02	Tr.	23,5	63,4	-	13,1

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (209,6 g)

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

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

^d Traços.

^e Apresenta 0,8% de raminose.

TABELA 4.7 - Composição monossacarídica e rendimento das frações polissacarídicas obtidas dos basidiomas da linhagem branca de *G. frondosa* por extração alcalina.

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ^a	Composição monossacarídica (%) ^b					
		Fuc ^c	Xyl ^c	Ara ^c	Man ^c	Gal ^c	Glc ^c
K- <i>Gfb</i>	5,64	4,5	10,8	1,1	19,9	12,5	51,2
SK- <i>Gfb</i>	2,62	1,7	7,1	1,2	16,6	-	73,4
IK- <i>Gfb</i> ^d	2,97	4,0	3,9	2,1	15,2	18,5	56,3
MRK- <i>Gfb</i>	0,48	-	30,8	-	17,5	-	51,7
gel-MRK <i>Gfb</i>	0,43	-	7,7	-	10,8	-	81,5
MEK- <i>Gfb</i>	1,66	-	7,8	-	10,7	-	81,5
SFMEK- <i>Gfb</i>	1,57	2,7	10,1	-	40,0	-	47,2
PFMEK- <i>Gfb</i>	0,03	-	Tr. ^e	-	28,4	-	71,6
SF ₂ MEK- <i>Gfb</i>	1,18	Tr.	3,8	-	13,5	-	82,7
PFSFMEK- <i>Gfb</i>	0,05	9,7	27,4	-	44,2	2,8	15,9

^a Rendimento calculado em relação ao peso seco (35,0 g)

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

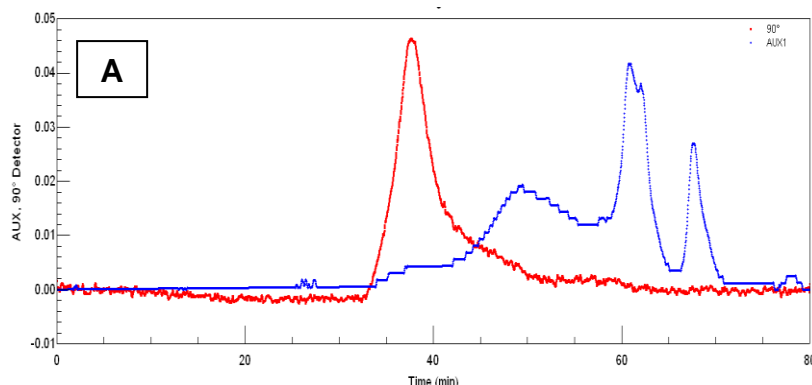
^c Fuc: fucose; Xyl: xilose; Ara: arabinose; Man: manose; Gal: galactose e Glc: glucose.

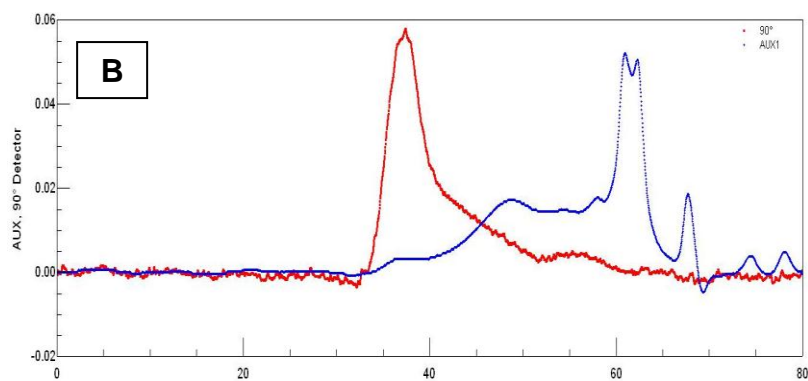
^d Apresenta traços de 3-O-metil galactose.

^e Traços.

Em seguida, SK-*Gfb* e SK-*Gfc* foram submetidas a diálises em membranas com limites de exclusão de 1000 kDa, pois as mesmas apresentaram-se um cromatograma com várias bandas, ou seja, heterogêneo (Figura 4.11).

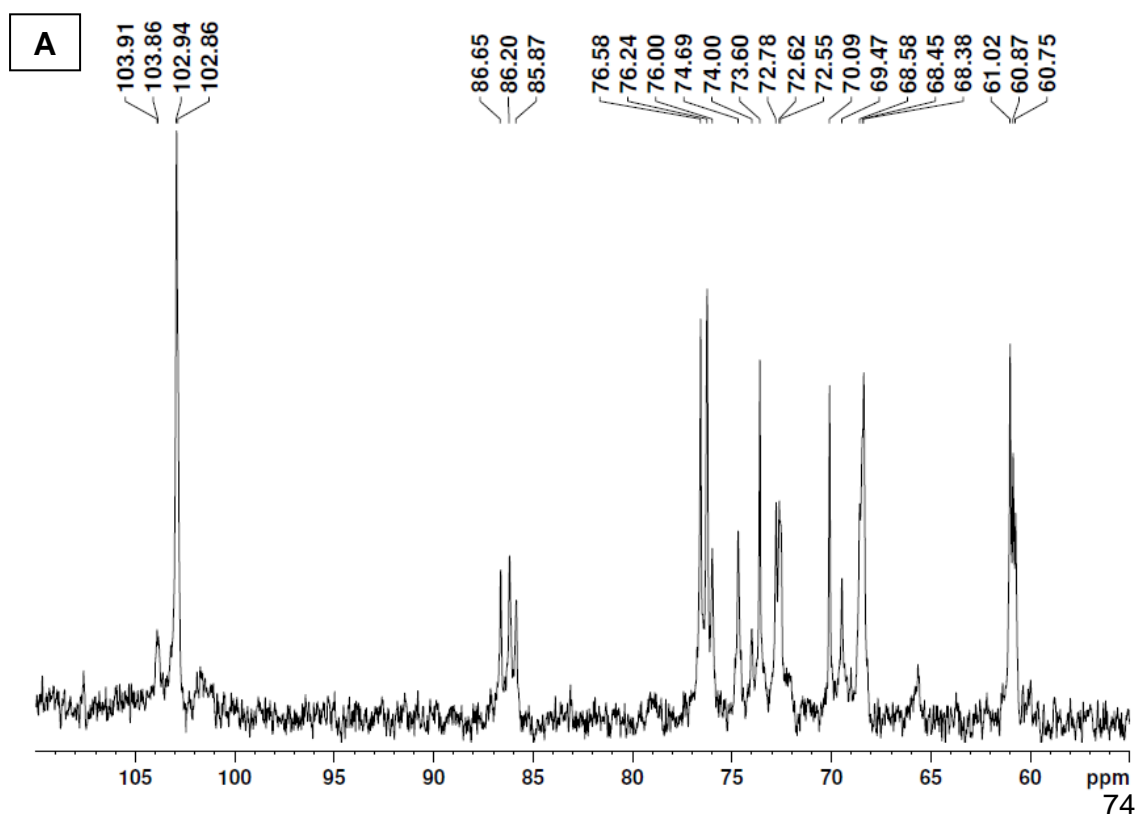
FIGURA 4.11 - Perfil de eluição, por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (EL: -) e índice de refração (IR: -) (HPSEC-MALLS), das frações SK-*Gfb* e SK-*Gfc*.

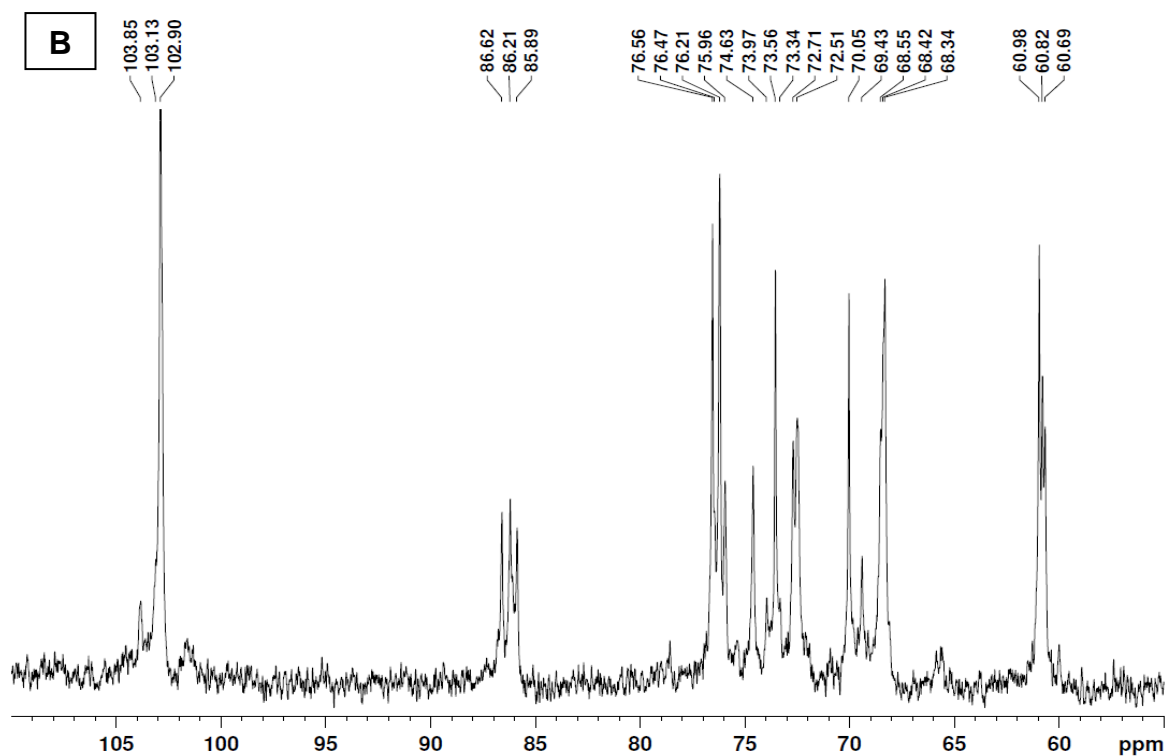




As frações retidas (MRK-*Gfb*, 169,6 mg e MRK-*Gfc*, 866,4 mg) e eluídas em membranas de 1000 kDa (MEK-*Gfb*, 580,4 mg e MEK-*Gfc*, 1,9 g), (Figura 3.4, p. 42; Figura 3.6, p. 45) de ambas linhagens mostraram ser constituídas pelos mesmos monossacarídeos (xilose, manose e glucose), mas os teores dos mesmos são variáveis entre as frações (Tabela 4.6, p. 72; Tabela 4.7, p. 73), sugerindo não tratar-se de moléculas idênticas. Devido a geleificação parcial da fração MRK-*Gfb* a baixas temperaturas, esta foi centrifugada a fim de separá-la (gel-MRK-*Gfb* 151,1 mg), resultando em uma fração com elevado teor de glucose (81,5%), sugerindo a presença de glucanas, as quais foram confirmadas através da análise de RMN de ^{13}C de MRK-*Gfb* e MRK-*Gfc* (Figura 4.12).

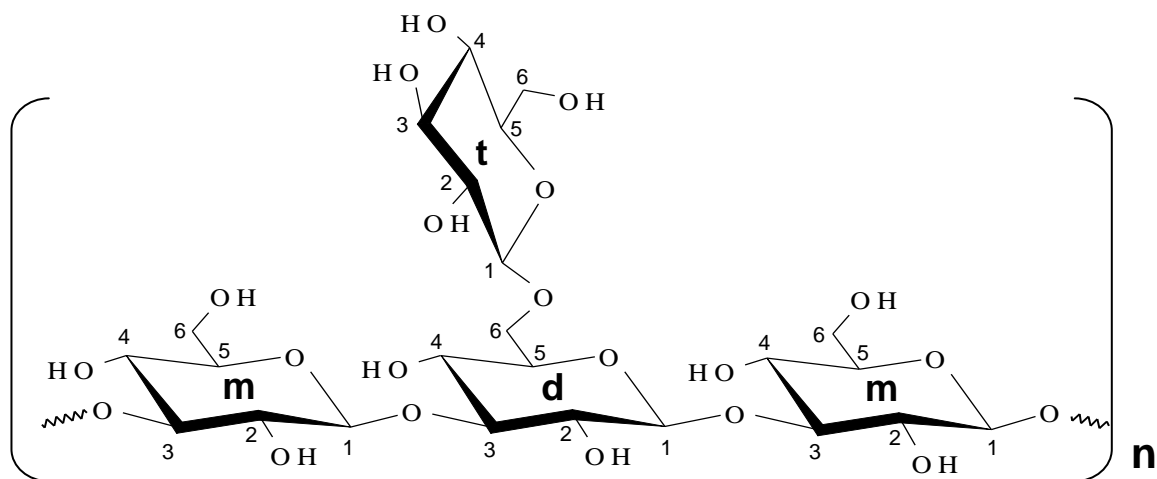
FIGURA 4.12 – Espectros de RMN de ^{13}C das frações MRK-*Gfc* (A) e MRK-*Gfb* (B) de *G. frondosa*, analisadas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C .





Apesar das frações MRK de ambas linhagens não estarem totalmente purificadas, os seus espectros de RMN de ^{13}C contém sinais característicos de uma β -glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) comumente encontrada em basidiomicetos, a qual é formada por uma cadeia principal constituída por unidades de β -Glc p ligadas (1 \rightarrow 3), parcialmente substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -Glc p (Figura 4.13).

FIGURA 4.13 - Estrutura da β -glucana (fração MRK: GLC1) obtida dos basidiomas de *G. frondosa* (linhagens branca e cinza).



Os sinais de ^{13}C referentes a este homopolímero foram determinados por comparação com os encontrados na literatura para polissacarídeos similares (Tabela 4.8) (CARBONERO et al., 2006, 2012; SANTOS-NEVES et al., 2008) .

A configuração glicosídica do tipo β foi confirmada pelos valores de C-1 em δ 103,1 e 103,0 correspondentes aos terminais não redutores (**t**) e às unidades 3-O- (**m**) e 3,6-di-O-substituídas (**d**) de Glcp, respectivamente. O tipo de ligação glicosídica desta glucana foi determinada pela presença de sinais de C-3 substituídos em δ 86,7/86,3/86,0 e C-6 ligados em δ 68,5 (Figura 4.12, p. 74).

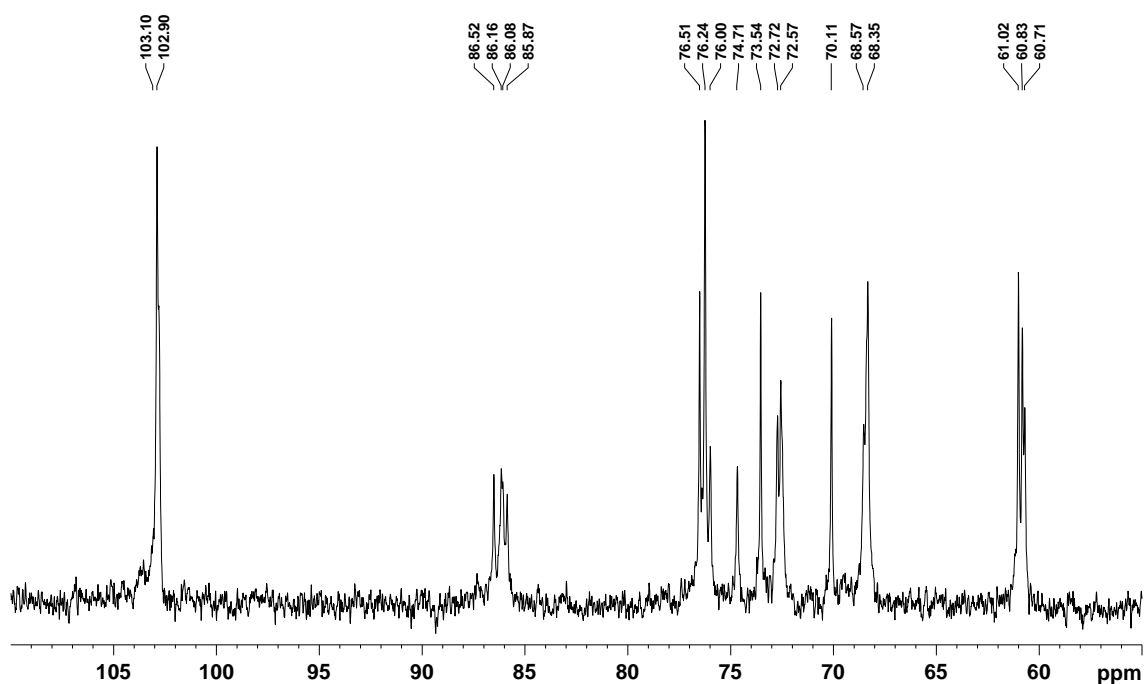
TABELA 4.8 - Assinalamentos de ^{13}C da β -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) (frações MRK-Gfb e MRK-Gfc) isolada de *G. frondosa*.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
\rightarrow3)-β-Glcp-(1\rightarrow (m)	103,0	73,0/72,8	86,6/86,2	68,6	76,5/,4	61,0/60,9
\rightarrow3,6)-β-Glcp(1\rightarrow (d)	103,0	72,7	85,8	68,7	74,9	68,5
β-Glcp-(1\rightarrow (t)	103,1	73,7	76,7	70,3	76,2	61,2

Com a finalidade de purificação deste polímero, a fração MRK-Gfc foi tratada com uma solução de sulfato de cobre em meio alcalino, separando-a em um precipitado (PFMRK-Gfc, 56,8 mg) e um sobrenadante de Fehling (SFMRK-Gfc, 377,5 mg). Estes foram distintos quanto à composição monossacarídica, sendo o precipitado formado principalmente por xilose (24,7%) e manose (61,9%) e o sobrenadante por glucose (89,1%). De maneira similar a algumas frações citadas anteriormente, SFMRK-Gfc resultou na formação de um gel (gel-SFMRK-Gfc, 426,8 mg) quando submetidas a baixas temperaturas. Esta etapa foi eficiente para a purificação da glucana, pois após o fracionamento os teores de glucose atingiram 100% (Figura 3.6, p. 45) (Tabela 4.6, p. 72). Outras β -glucanas (frações: SFSSAIK-Gfc, 290,9 mg e SPAIK-Gfc, 67,6 mg) foram isoladas a partir da fração insolúvel em água fria

(IK-*Gfc*), após várias etapas de fracionamento, como precipitação por adição de ácido acético, congelamento e degelo e tratamento com sulfato de cobre em meio alcalino, sucessivamente (Figura 3.7, p. 45), sendo cada etapa avaliada apenas pela determinação da composição química por CG-EM (Tabela 4.6, p. 69) devido a baixa solubilidade em água das mesmas. Como pode ser evidenciado, estas etapas foram importantes para a purificação de IK-*Gfc*, pois foram isoladas glucanas contendo exclusivamente glucose (Tabela 4.6, p. 72). O espectro de RMN de ^{13}C de SFSSAIK-*Gfc* (Figura 4.14) mostrou-se similar a da β -glucana citada anteriormente (Figura 4.12, p. 74), indicando a presença de um polímero com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6).

FIGURA 4.14- Espectro de RMN de ^{13}C da fração SFSSAIK-*Gfc* (GLC 2) de *G. frondosa*, analisada em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 70°C .

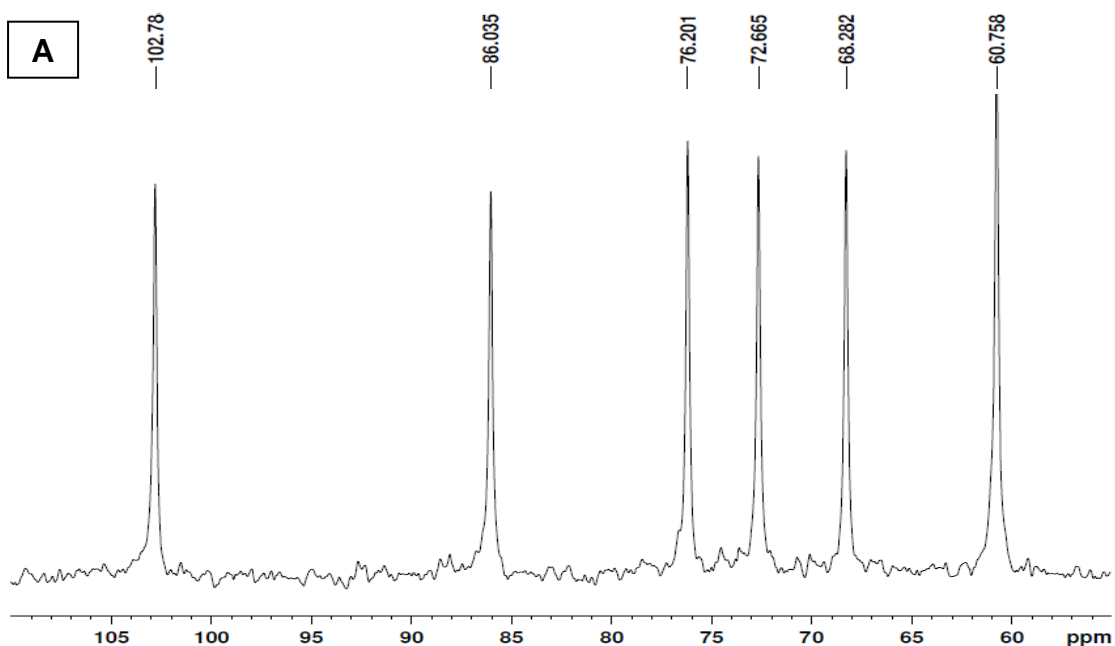


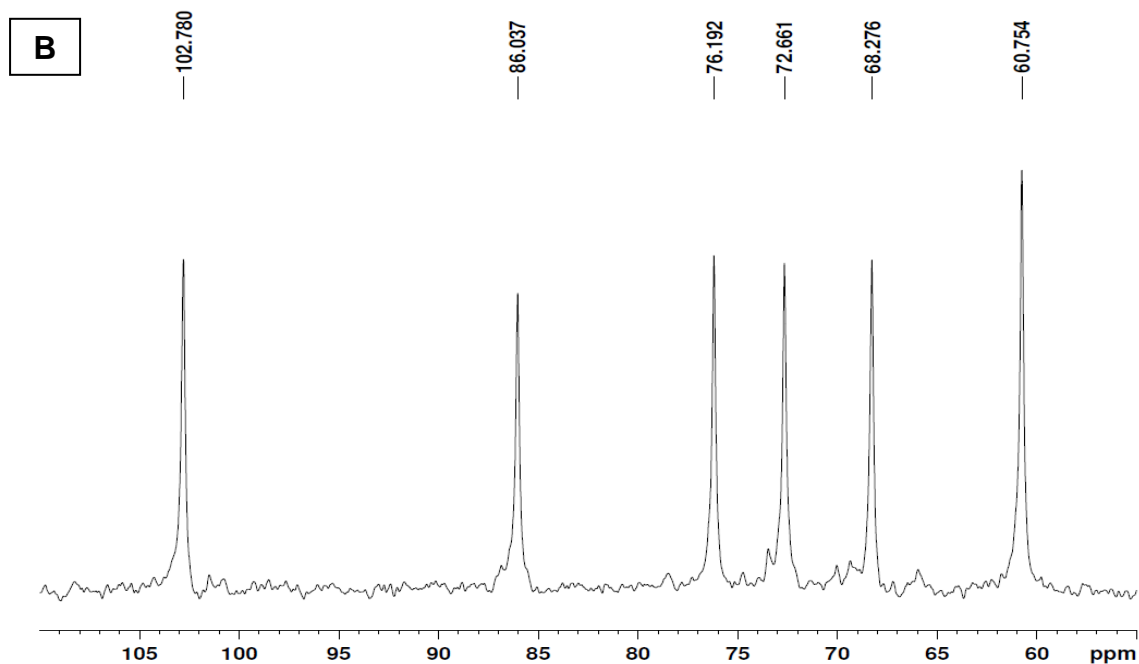
As β -glucanas isoladas apresentam resíduos com ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3), os quais não são degradados, isso porque não apresentam hidroxilas vicinais livres. Assim, uma alíquota da fração SFMRKG-*Gfc* (46,2 mg) e SFSSAPK-*Gfc* (61,0 mg) foi submetida à degradação controlada de Smith (Figura 3.9, p. 48), para confirmar a cadeia principal destas β -glucanas. Os materiais resultantes das degradações (frações DS-SFMRKG-

Gfc e DS-SFSSAPK-*Gfc*) foram submetidos à análise de RMN de ^{13}C (Figura 4.15).

Estes espectros (Figura 4.15) apresentaram 6 sinais típicos de carbono de maior intensidade referentes ao C-1 a C-6 (δ 102,78; δ 86,03; δ 76,20; δ 72,66; δ 68,28 e δ 60,75, respectivamente) confirmando ser uma cadeia principal linear (1 \rightarrow 3) (CARBONERO et al., 2001), parcialmente substituída em O-6 por cadeias laterais de β -Glc_p, típica de certos basidiomicetos e com diferentes graus de substituição (SMIDERLE et al, 2006).

FIGURA 4.15- Espectros de RMN de ^{13}C das frações DS-SFMRKG-*Gfc* (A) e DS-SFSSAIK-*Gfc* (B) de *G. frondosa*, analisados em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 50°C.





Conforme relatado anteriormente, β -glucanas similares à isolada neste trabalho são frequentemente encontradas em basidiomicetos, sendo diferenciadas principalmente em relação ao tamanho, grau de ramificação, solubilidade em água e conformação. Dentre estes, a determinação do percentual de substituição destes homopolímeros é de fundamental importância, pois está correlacionada com a solubilidade em água e a conformação da molécula. Para a identificação do teor de substituição é necessário realizar, além das técnicas de ^{13}C e/ou ^1H , análises de metilação, pois na maioria das vezes os resultados provenientes das análises espectroscópicas geram dúvidas devido à sobreposição de sinais e à baixa resolução dos espectros.

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 corpo de frutificação quanto do micélio, sendo algumas delas comercializadas devido aos seus efeitos terapêuticos.

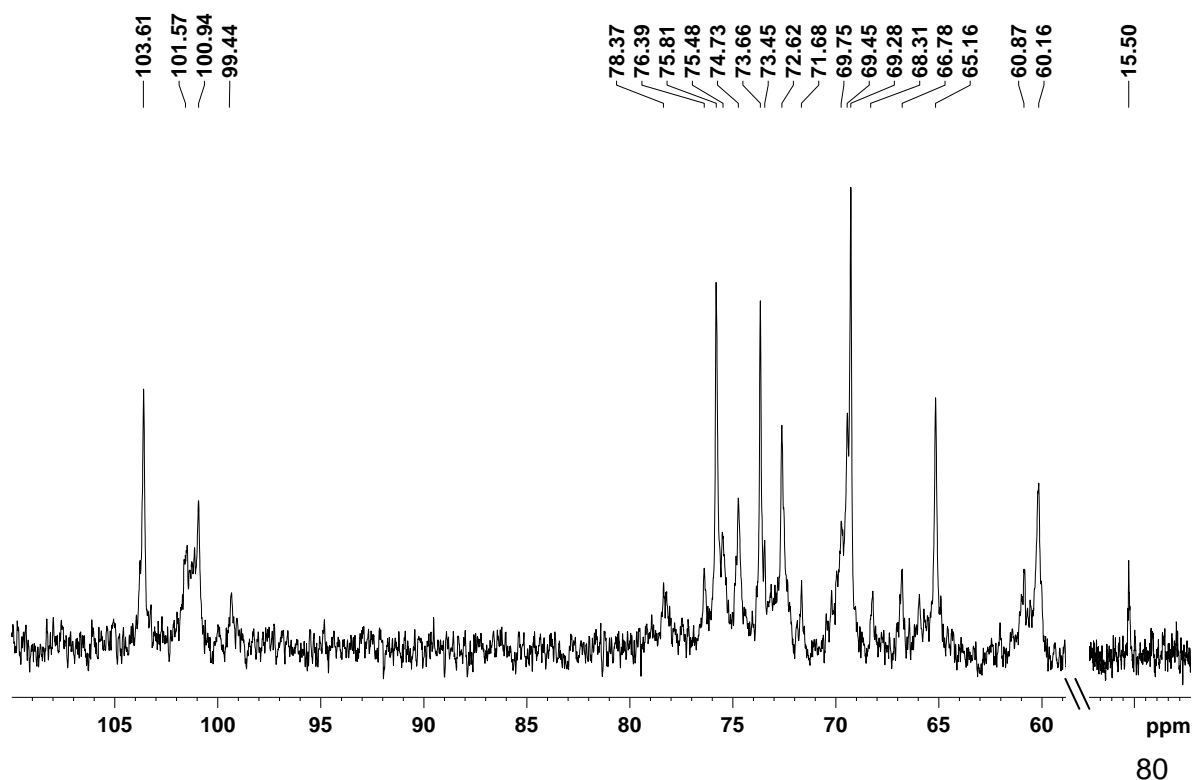
Desta maneira, faz-se necessário realizar a metilação para a confirmação do percentual de substituição destas moléculas isoladas neste trabalho para saber se as mesmas são idênticas ou não às descritas anteriormente para este macrofungo.

Além dos polímeros constituídos principalmente por glucose, glucanas, foi isolado do extrato alcalino proveniente da extração dos basidiomas da linhagem cinza de *G. frondosa*, um heteropolissacarídeo

constituído principalmente por fucose, xilose e manose. O heteropolissacarídeo foi isolado a partir do tratamento da fração MEK-*Gfc* com sulfato de cobre em meio alcalino (solução de Fehling), formando as frações (SFMEK-*Gfc*, 1,3 g e a PFMEK-*Gfc*, 104,7 mg). Esta técnica foi repetida para ambas frações com o objetivo de garantir a eficiência do processo, obtendo-se, para cada uma delas, os complexos cúpricos solúveis (SF₂MEK-*Gfc*, 1,2 g e SFPFMEK-*Gfc*, 41,2 mg) e insolúveis (PF₂MEK-*Gfc*, 59,9 mg e PFSFMEK-*Gfc*, 101,5 mg), respectivamente (Figura 3.6, p. 45). Análises de composição monossacarídica foram realizadas para todas estas amostras, sendo algumas destas distintas da fração de origem, como evidenciado para a fração PF₂MEK-*Gfc* a qual é formada por fucose (6,9%), xilose (33,1%) e manose (60,0%), ao contrário da fração de origem que é constituída por xilose (8,2%), manose (23,9%) e glucose (67,9%) (Tabela 4.6, p. 72).

Levando em consideração a composição monossacarídica da fração PF₂MEK-*Gfc* e aos relatos da presença de fucoxilomananas no micélio deste fungo, esta fração foi submetida a análises de RMN de ¹³C (Figura 4.16) a fim de caracterizá-la.

FIGURA 4.16- Espectro de RMN de ¹³C da fração PF₂MEK-*Gfc* de *G. frondosa*, analisada em D₂O, a 50°C.



A presença de vários sinais na região anomérica sugere uma estrutura complexa, correspondendo às unidades de β -Xylp (δ 103,61 e 101,40), α -Manp (δ 101,57 e 100,94) e α -Fucp (δ 99,44) (VINOGRADOV et al., 2004; SMIDERLE et al., 2006; SILVA, 2014). O sinal de ^{13}C referente às substituições em O-4 das unidades de Xylp e em O-3 das unidades de α -Manp foi observado, sobreposto, em δ 78,37 (Figura 4.16, p. 80).

Cabe ressaltar que os procedimentos de purificação deste heteropolissacarídeo foram realizados para a outra linhagem em estudo, mas ainda não foi possível purificá-la totalmente. No entanto, pode ser evidenciado através da composição monossacarídica da fração PFSFMEK-Gfb (fucose, 9,7%; xilose, 27,4%; manose, 44,2%) a presença deste heteropolímero (Tabela 4.7, p. 73).

Ao contrário das β -glucanas, as fucoxilomananas não têm sido encontradas frequentemente. Recentemente, foi isolado do micélio deste fungo uma fucoxilomanana formada por uma cadeia principal constituída por α -Manp (1 \rightarrow 3)- ligadas, a qual se encontra totalmente substituída em O-4 por cadeias laterais constituídas por Xylp, Fucp e Manp. Além desta, foram obtidas a partir do corpo de frutificação de *Polyporus pinicola* (AXELSSON et al., 1969), *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971) e *Ganoderma lucidum* (MIYAZAKI et al., 1982) heteromananas com cadeias principais de β -D-Manp ligada (1 \rightarrow 3) as quais podem ser substituídas em O-4 pelo dissacarídeo 2-O- α -L-Fucp- β -D-Xylp (*Polyporus pinicola*, *Fomes annosus*) ou de D-Manp ligada (1 \rightarrow 4) podendo ser substituída em O-3 pelo dissacarídeo 4-O-L-Fucp-D-Xylp (*Ganoderma lucidum*).

Análises adicionais de caracterização estrutural devem ser realizadas, pois nenhuma destas moléculas descritas na literatura contem informações a respeito da estrutura química fina destes heteropolissacarídeos.

5 - CONCLUSÃO

Nesse estudo, foram isolados a partir dos basidiomas de *G. frondosa* (linhagens branca e cinza) os seguintes polissacarídeos:

- β -Glucanas (denominadas GLC1-*Gfb*, GLC1-*Gfc*, GLC2-*Gfc* e GLC3-*Gfc*) formadas por uma cadeia principal constituída por unidades de β -Glc_p ligadas (1→3), parcialmente substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -Glc_p.

- Fucomanogalactana (FMG-*Gfb*) constituída por uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Gal_p, parcialmente substituídas em O-2, principalmente pelo dissacarídeo 3-O- α -D-Man_p- α -L-Fuc_p e em uma menor proporção por terminais não redutores de α -L-Fuc_p e α -D-Man_p.

- Fucoxilomanana (FXM-*Gfc*) constituída por um *core* de α -Man_p (1→3)- ligadas, as quais podem apresentar em O-4 grupos laterais constituídos por xilose e/ou fucose.

De acordo com os dados obtidos até o presente momento, não foram observadas diferenças significativas em relação aos polissacarídeos das duas linhagens de *G. frondosa* avaliadas, sugerindo que esta nova linhagem que vem sendo cultivada, ou seja, a branca, possa ter os mesmos efeitos terapêuticos atribuídos aos carboidratos da outra linhagem.

REFERÊNCIAS

- 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**.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Effects of treatment in the medicine<<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementaryandalternativemedicine/dietandnutrition/maitake-mushrooms>>. Acesso em: 10 março 2014.
- ANGYAL, S.J.; BENDER, V.J. & RALPH, B.J. "Structure of polysaccharides from the *Polyporus tumulosus* cell wall". *Biochim. et 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 fucoxylomannan from *Polyporus pinicola* (Fr)". *Acta Chem. Scand.*, 23: 1597, **1969**.
- AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; SVENSSON, S. & HAMMARSTROM, S. "Polysaccharides elaborated by *Fomes annosus* (Fr.) Cooke". *Acta Chem. Scand.*, 25: 3645, **1971**.
- BEATTIE, K.D.; ROUF, R.; GANDER, L.; MAY, T.W.; RATKOWSKY, D.; DONNER, C.D.; GILL, M.; GRICE, I.D. & TIRALONGO, E. "Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*". *Phytochemistry*, 71: 948, **2010**.
- BHAVANANDAN, V.P.; BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. "Polysaccharides from *Polyporus giganteus*". *Acta Chem. Scand.*, 18: 504, **1964**.
- 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**.
- 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**.
- BOH, B. & BEROVIC, M. "*Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S. F. Gray (Maitake mushroom): medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation". *Int. J. Med. Mushrooms*, 9: 89, **2007**.
- BONONI, V.L.R. & GRANDI, R.A.P. "Zigomicetos, Basidiomicetos, e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas".

São Paulo: Instituto de Botânica, *Secretaria de Estado do Meio Ambiente*, 1998.184p.

BURGE, H. A. "Classification of the Fungi". *Clin. Rev. Allergy*, 10: 153, **1992**.

CARBONERO, E.R.; SASSAKI, G.L.; STUELP, P.M.; GORIN, P.A.J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; IACOMINI, M. "Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes". *FEMS Microbiol. Lett.* 194: 65, **2001**.

CARBONERO, E.R. Polissacarídeos de Fungos Liquenizados Contendo Diferentes Fotobiontes. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia molecular UFPR, 2005. Tese de doutorado, 120p.

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.; 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.; 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**.

CHEN, J. & SEVIOUR, R. "Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans". *Mycol. Res.*, 111: 635, **2007**.

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

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

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**.

- DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M.L.L.; RUZZA, A.A.; WAGNER, T.M.; WISBECK, E. & FURLAN, S.A. "Characterization and Antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 2265, **2010**.
- DENG, C.; HU, Z.; FU, H.T.; HU, M.H.; XU, X. & CHEN, J.H. "Chemical analysis and antioxidant activity *in vitro* of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*". *Int. J. Biol. Macromol.*, 51, 70, **2012**.
- ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 285p.
- 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**.
- GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S. & KHOWALA, S. "Fungal biotechnology in food and feed processing". *Food Res. Int.*, 42: 577, **2009**.
- 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**.
- GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.M.P.S.; HEATLEY, F. & SOARES, S.A. "Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill". *Carbohydr. Polym.*, 60:43, **2005**.
- 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**.
- GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. "Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*". *Carbohydr. Res.*, 128: 119, **1984**.
- GOW, N. & GADD, G.M. The Growing Fungus. Chapman e Hall, London, 1995. 473p.
- HAN, X.; CHAI, X.; JIA, Y.; HAN, C. & TU, P. "Structure elucidation and immunological activity of a novel polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito". *Int. J. Biol. Macromol.*, 47: 420, **2010**.
- HARDY, M.L. Dietary supplement use in cancer care: help or harm. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 22: 581, **2008**.
- HELENO, S.A.; BARROS, L.; SOUSA, M.J.; MARTINS, A. & FERREIRA, I.C.F.R. "Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidante capacity". *Food Chem.*, 119: 1443, **2010**.

HOOD, I.A. The mycology of the Basidiomycetes, 2006. 26p.

IINO, K.; OHNO, N.; SUZUKI, I.; MIYAZAKI, T. & YADOMAE, T. "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**.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M., & VANETTI, M.C.D. "Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium". *Braz. J. Microbiol.*, 32: 206, **2001**.

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

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

KIM, Y.W.; KIM, K.H.; CHOI, H.J. & LEE, D.S. "Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*". *Biotechnol. Lett.*, 27: 483, **2005**.

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**.

LEE, B.C.; BAE, J.P.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J. & YUN, J.W. "Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa*". *Enzyme Microb. Tech.*, 32: 574, **2003**.

LIN, H.; STANCHINA, E.; XI, K.Z.; FENG, H.; SEIDMAN, A.; FORNIER, M.; XIAO, W.; KENNELLY, E.J.; WESA, K.; CASSILETH, B.R. & CUNNINGHAM-RUNDLES, S. "Maitake beta-glucan promotes recovery of leukocytes and myeloid cell function in peripheral blood from paclitaxel hematotoxicity". *Cancer Immunol. Immunother.*, 59: 885, **2010**.

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: 10143-10149, **2009**.

MATILLA, P.; KONKO, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J.M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M. & PIIRONEN, V. "Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms". *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2343, **2001**.

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

MEDICAL MUSHROOMS. *Grifola frondosa*. <<http://www.medicalmushrooms.net/grifolafrondosa-maitake>>. Acesso em: 16 janeiro 2015.

MINARI, M.C.; RINCÃO, V.P.; SOARES, S.A.; RICARDO, N.M.; NOZAWA, C.; & LINHARES, R.E. “Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1”. *Acta virol.*, 55: 255, **2011**.

MIYAZAKI, T. “Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*”. *Carbohydr. Res.*, 109: 290-294, **1982**.

MIZUNO, T. “The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review)”. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1: 9, **1999**.

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**.

MUSHROOMS WISDOM PRODUCTS – *Royal Agaricus, Shitake, Tremella, Fração-D Maitake*. <<http://www.mushroomwisdom.com/products.php>>. Acesso em: 16 janeiro 2015.

NANBA H. “Activity of maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis”. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 768: 243, **1995**.

NANBA H. & KUBO K. “Effect of maitake D-fraction on cancer prevention”. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 833: 204, **1997**.

NELSON, D.L. & COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York, 5^a ed., 2011. 1272p.

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

OJHA, A.K.; CHANDRA, K.; GHOSH, K. & ISLAM, S.S. “Glucans from the alkaline extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cv Assam Florida: isolation, purification, and characterization”. *Carbohydr. Res.*, 345: 2157, **2010**.

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 da Universidade Federal de Goiás/Regional Catalão, 2013. Dissertação de mestrado, 77 p.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M.T.L. *Os Reinos dos Fungos*. Santa Cruz do Sul. 2^a ed. EDUNISC, 2004. 606p.

RACZ, L.; PAPP, L.; PROKAI, B. & KOVACZ, Z. “Trace element determination in cultivated mushrooms: na investigation of manganese, nickel, and cadmium intake in cultivated mushrooms using ICP atomic emission”. *Microchemical Journal*, 54: 444, **1996**.

- RAI, M.; TIDKE, G. & WASSER, S.P. "Therapeutic potential of mushrooms". *Nat. Prod. Radiance*, 4: 246, **2005**.
- RESHETNIKOV, S.V.; WASSER, S.P. & TAN, K.K. "Higher Basidiomycota as source of antitumor and immunostimulating polysaccharides". *Int. J. Med. Mushrooms*, 3: 361, **2001**.
- ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; KEMMELMEIER, C.; TISCHER, C.A.; GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. "A partially 3-O-methylated (1→4)-linked α -D-galactan and α -D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing". *FEMS Microbiol. Lett.*, 212: 261, **2002**.
- ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; CLAUDINO, R.F.; TISCHER, C.A.; KEMMELMEIER, C. & IACOMINI, M. "The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing". *FEMS Microbiol. Lett.*, 221: 119, **2003**.
- RUTHES, A.C.; 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**.
- 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**.
- 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**.
- SANZ, M.L. & MARTÍNEZ-CASTRO, I. "Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates". *J. Chromatogr. A*, 1153: 74, **2007**.
- SHITTU, O.B.; ALOFE, F.V.; ONAWUNMI, G.O.; OGUNDAINI, A.O. & TIWALADE, T. A. "Mycelial growth and antibacterial metabolite production by wild mushrooms". *Afr. J. Microbiol. Res.*, 8: 157, **2005**.
- SILVA, E.V. Determinação Estrutural do Heteropolissacarídeo Isolado do Basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju*. Catalão, Graduação em Química – UFG-RC, 2011. Relatório de Estágio, 36 p.

SILVA, E.V. Estudo químico de polissacarídeos isolados do micélio do cogumelo medicinal *Grifola frondosa*. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG-RC, 2014. Dissertação de mestrado, 101 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**.

SOCIÉTÉ MYCOLOGIQUE DU POITOU. *Grifola frondosa* "Maitake". <<http://www.societe-mycologique-poitou.org/Grifola-frondosa-Dickson-Fr-Gray.html>> Acesso em: 08 janeiro 2015.

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**.

US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Beta-glucan and monoclonal antibody 3F8 in treating patients with metastatic neuroblastoma. <<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00492167>>. Acesso em: 10 março 2014.

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**.

THE VISUAL DICTIONARY. Volume 1: Vegetal Biology, edible mushroom. <http://www.infovisual.info/01/024_en.html>. Acesso em: 14 janeiro 2015.

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

THOMPSON, I. J.; OYSTON, P. C. F. & WILLIAMSON, D. E. "Potencial of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents". *Expert Rev. Anti-Infect Ther.*, 8: 339, **2010**.

VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. "Culinary-medicinal mushrooms: must action be taken". *Int. J. Med. Mushrooms*, 11: 281, **2009**.

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, Z.; LUO, D. & LIANG, Z. "Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium 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: 65-67, **1963a**.

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

XU, H.; LIU, J.; SHEN, Z.; FEI, Y. & CHEN, X. "Analysis of chemical composition, structure of *Grifola frondosa* polysaccharides and its effect on skin TNF- α levels, IgG content, T lymphocytes rate and caspase-3 mRNA". *Carbohydr. Polym.*, 82: 687, **2010**.

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

ZHANG, Y.; WANG, N. & WU, T.X. "Effect of the extracts from *Gastrodia elata* BL. on mycelial growth and polysaccharide biosynthesis by *Grifola frondosa*". *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6: 379, **2012**.

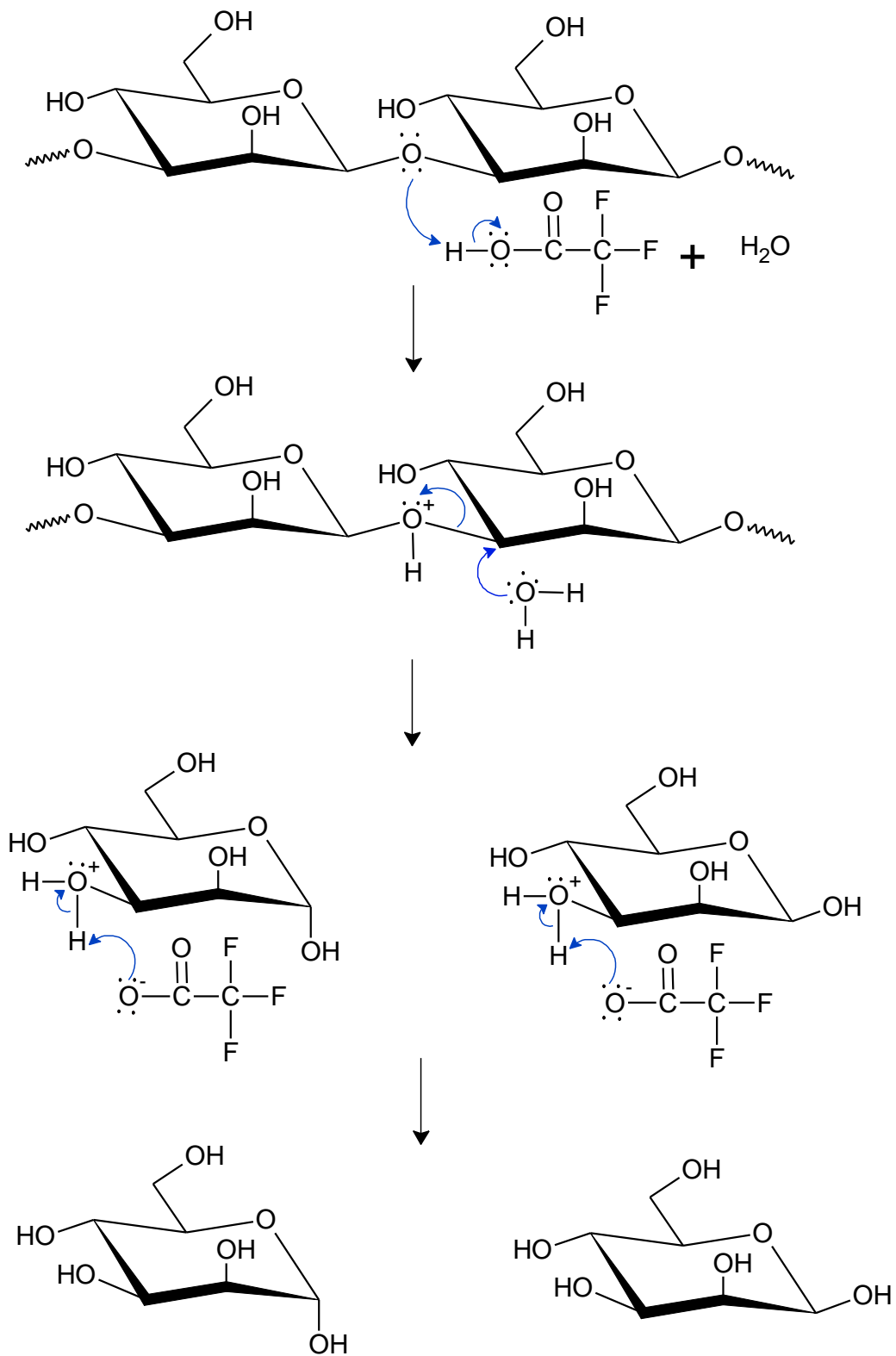
ZHANG, A.; XU, M.; FU, L. & SUN, P. "Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*". *Carbohydr. Polym.*, 92: 236, **2013**.

ZHU, F.; DU, B.; BIAN, Z. & XU, B. "Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *J. Food Compos. Anal.*, **2015**.

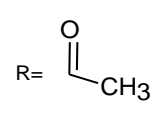
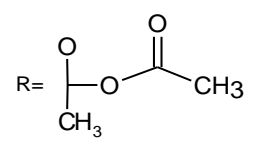
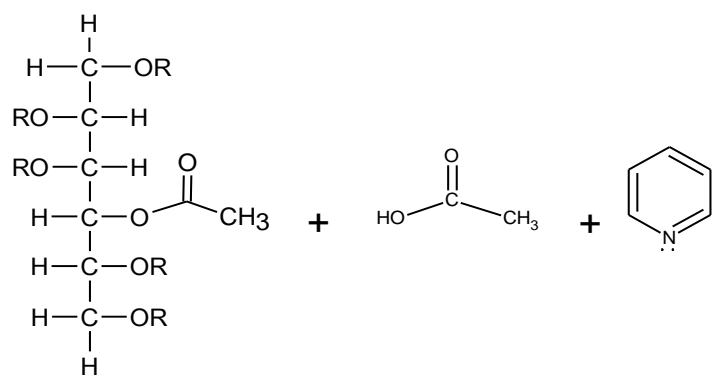
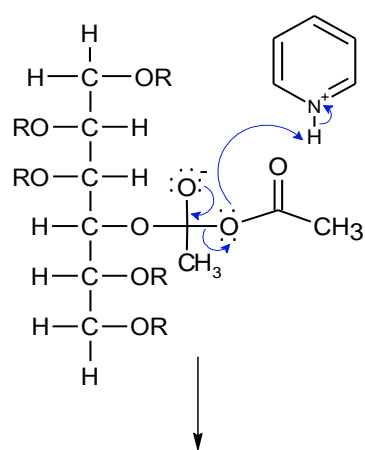
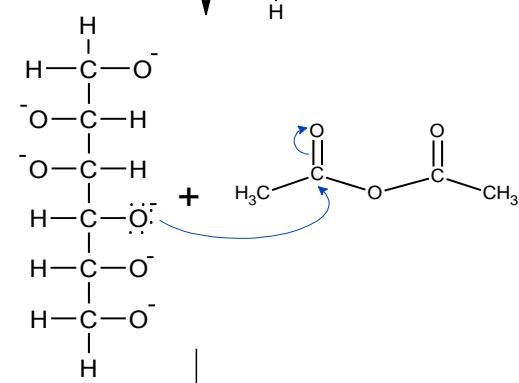
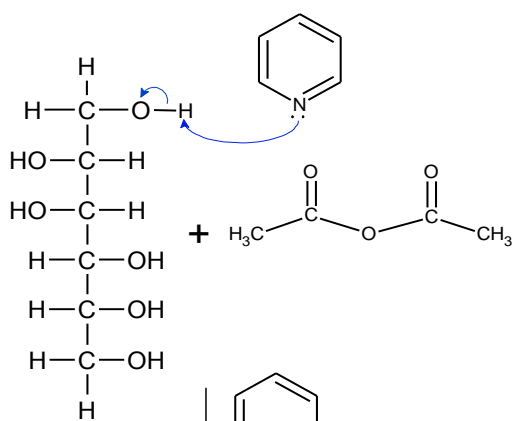
ZHUANG, C. & WASSER, S.P. "Medicinal value of culinary–medicinal Maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Aphyllorphomycetideae)". *Int. J. Med. Mushrooms*, 6: 287, **2004**.

ZONG, A.; CAO, H. & WANG, F. "Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research". *Carbohydr. Polym.*, 90: 1395, **2012**.

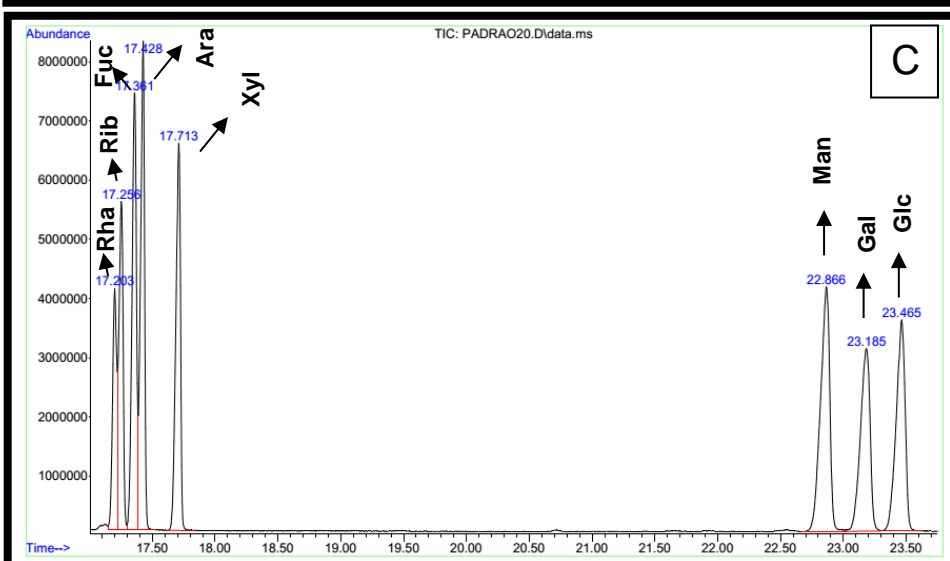
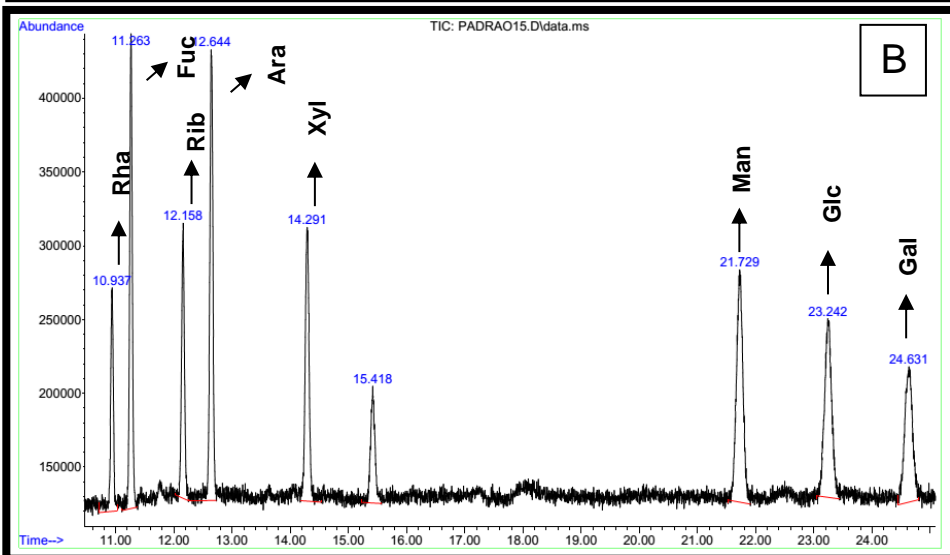
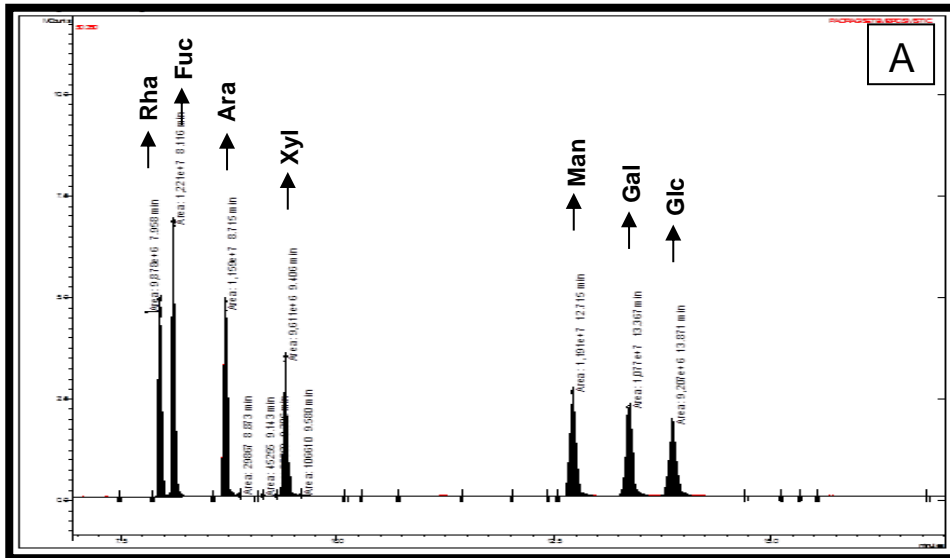
APÊNDICE A - Proposta de mecanismo para hidrólise ácida de carboidratos.



APÊNDICE B - Proposta de mecanismo para acetilação.

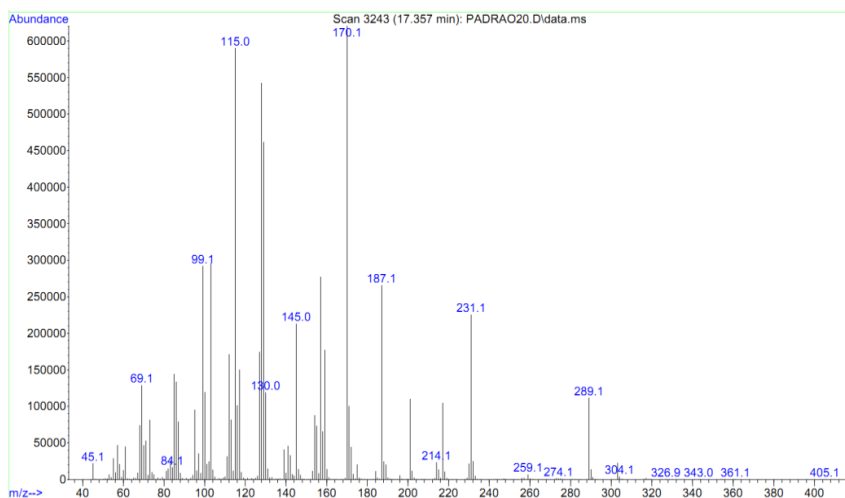


APÊNDICE C - Cromatogramas obtidos a partir do padrão dos principais monossacarídeos obtidos por CG-EM (A) Cromatógrafo Varian/coluna DB-225-MS, (B) Cromatógrafo Agilent/coluna DB-225-MS e (C) Cromatógrafo Agilent/coluna HP-5.

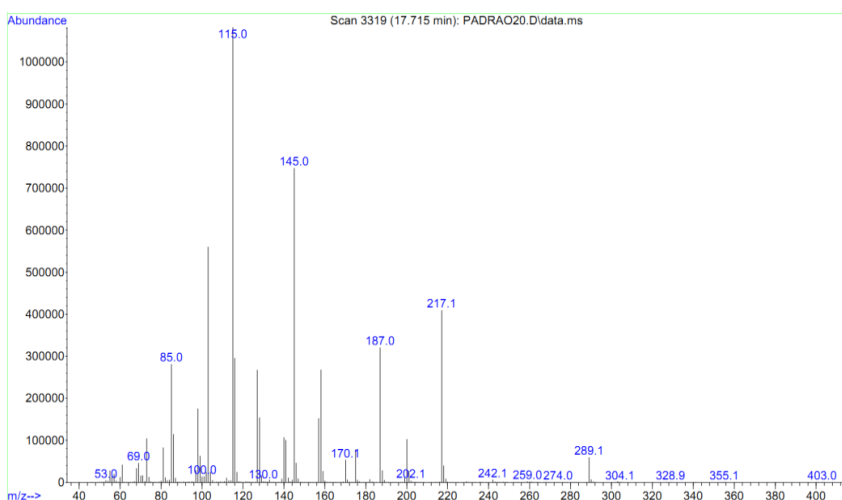


APÊNDICE D - Espectros de massas dos padrões dos monossacarídeos obtidos por CG-EM.

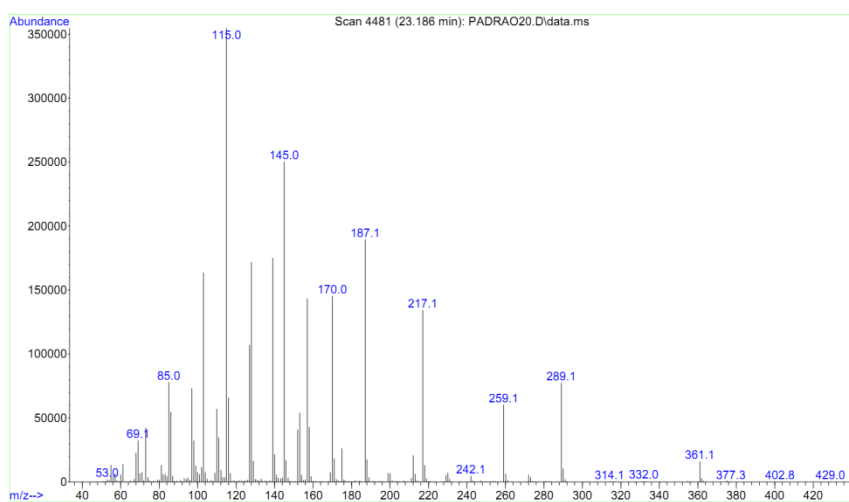
Raminose e Fucose (DESOXI-HEXOSES)



Arabinose, Ribose e Xilose (PENTOSES)

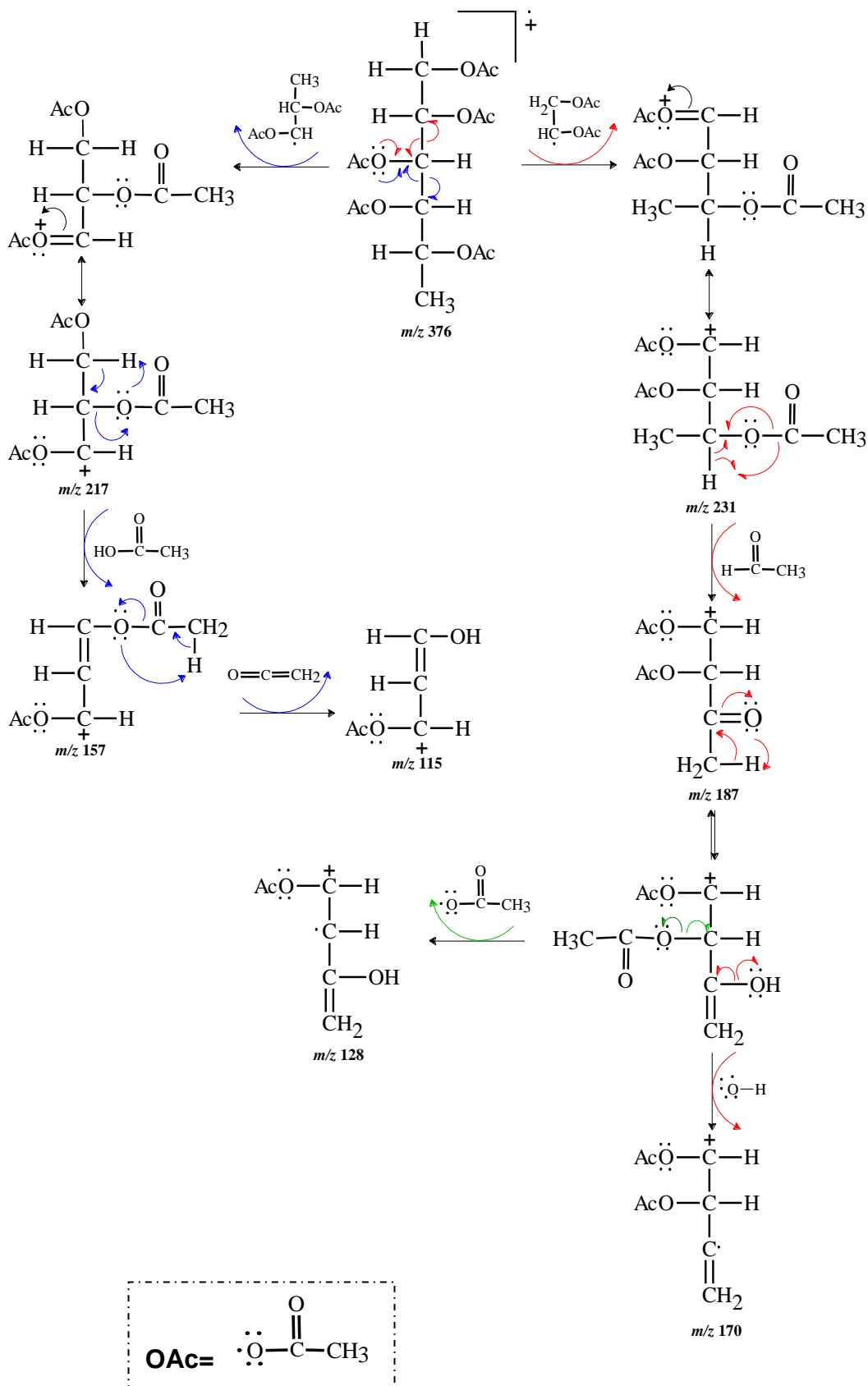


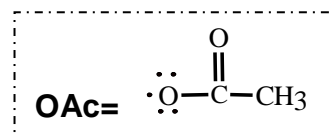
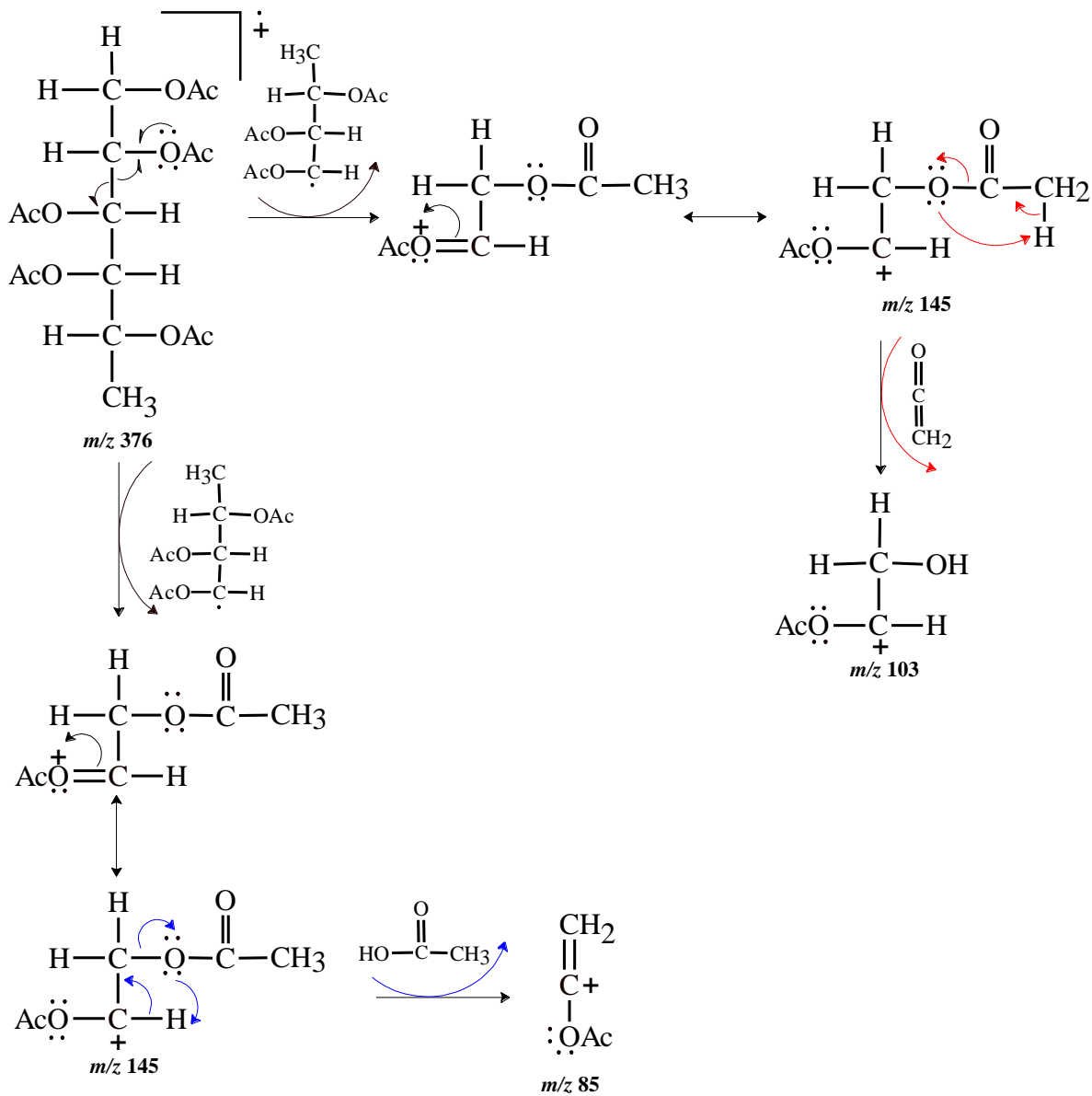
Manose, Galactose e Glucose (HEXOSES)



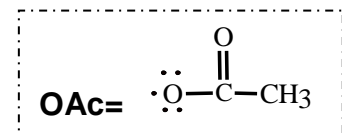
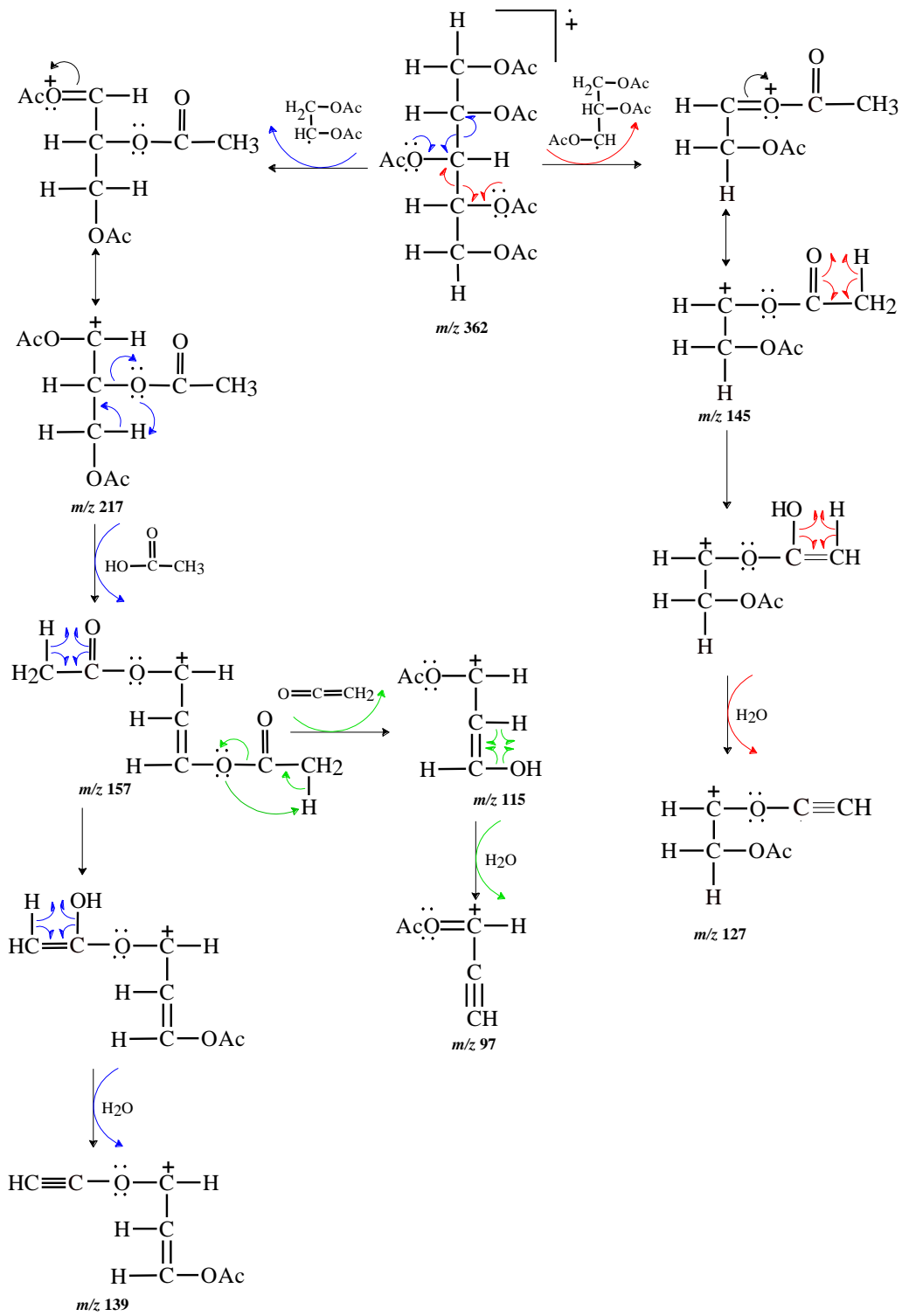
APÊNDICE E - Principais fragmentos secundários dos acetatos de alditóis.

→ DESOXI-HEXOSE





→ PENTOSES



→ HEXOSE

