



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



JEFTE FARIAS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE  
IMUNOMODULADORA DE POLISSACARÍDEOS DE *Lentinus strigosus*  
(Schwein.) Fr., CULTIVADO SOB FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

MANAUS

2022

JEFTE FARIAS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE  
IMUNOMODULADORA DE POLISSACARÍDEOS DE *Lentinus strigosus*  
(Schwein.) Fr., CULTIVADO SOB FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde.

**Orientadora:** Dra. Ceci Sales-Campos

**Coorientadores:** Dr. Bruno Pontes e Dr. Luciano Henrique Campestrini

MANAUS

2022

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c Silva, Jefte Farias da  
Caracterização físico-química e atividade imunomoduladora de polissacarídeos de *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr., cultivado sob fermentação submersa / Jefte Farias da Silva. 2022  
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ceci Sales-Campos  
Coorientador: Bruno Pontes  
Coorientador: Luciano Campestrini  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Macrófungos. 2. Carboidratos bioativos. 3. Pinças ópticas. 4. Macrófagos. 5. Imunomodulação. I. Sales-Campos, Ceci. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JEFTE FARIAS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE  
IMUNOMODULADORA DE POLISSACARÍDEOS DE *Lentinus strigosus*  
(Schwein.) Fr., CULTIVADO SOB FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2022

**Banca Examinadora**

Prof. Dr.<sup>a</sup> Ceci Sales-Campos (Presidente)

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Manaus, Amazonas, Brasil

Prof. Dr.<sup>a</sup> Fhernanda Ribeiro Smiderle (Membro)

Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe

Curitiba, Paraná, Brasil

Prof. Dr.<sup>a</sup> Júlia Inés Fariña (Membro)

Planta Piloto de Processos Industriais Microbiológicos

San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

## **Dedico,**

À minha mãe, Lilian, minha heroína, a guerreira que todos os dias dá o exemplo de como ser o melhor ser humano que existe nesse mundo!

Obrigado por desde cedo me incentivar, sem medir esforços para me dar a oportunidade de estudar e buscar uma vida melhor.

Ao meu pai, Luís, meu exemplo de força e superação! Obrigado por todos os princípios ensinados, pelo incentivo a me dedicar aos estudos, por me fazer sentir seguro e ser a pessoa com quem eu sempre posso contar.

À minha avó, Maria, por ser meu porto seguro, me amar e apoiar em todos os momentos. Nada me deixa mais feliz do que tê-la comigo para compartilhar deste momento!

À minha irmã, Flávia, da qual possuo tremendo orgulho e admiração. Que isto sirva de inspiração para que nunca desista de seus sonhos, e que todo trabalho duro tem suas recompensas!

Família, somente com o seu incentivo, compreensão e amor incondicional, foi possível concluir mais uma etapa desta trajetória, da qual espero que possamos colher bons frutos.

Amarei-vos para todo o sempre!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre se fazer presente em minha vida, iluminando meus caminhos diariamente, e por me proporcionar a força e a saúde para a realização deste trabalho. E à minha família por todo o apoio.

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela estrutura disponibilizada e por me proporcionar fazer parte da melhor equipe possível: o Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis! Obrigado Aldenora, Vítor, Giovanna, Danielle, Larissa, Lorena, Paula e Sérgio, por todo o auxílio, conhecimentos trocados, pela companhia e amizade, e pelo crescimento pessoal e profissional que me foi proporcionado durante esses 5 anos de convivência!

Agradeço à minha orientadora, Dra. Ceci Sales-Campos, por todo o auxílio e confiança em mim depositada ao assumir a responsabilidade de me orientar. Obrigado por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar, mas também por compreender as minhas limitações. Serei eternamente grato por me adotar desde a Iniciação Científica, e por continuamente abrir portas para a minha caminhada!

Agradeço à Dra. Larissa Chevreuil, um dos pilares mais importantes para a realização deste trabalho. Obrigado pela orientação, amizade, apoio, compreensão e confiança, e por acreditar em mim desde o início! Quando bati na porta do laboratório pela primeira vez, em busca de uma oportunidade, logo encontrei você que me acolheu. Obrigado por todos os ensinamentos, dicas, correções, sugestões, lições e puxões de orelha, sempre me motivando com palavras de “você consegue!” e “pensamento positivo!”.

Agradeço ao Dr. Luciano Campestrini, por aceitar me coorientar. Obrigado por ceder não somente materiais, mas também muitos conhecimentos, paciência e tempo para me explicar tudo com muita clareza. Obrigado pela motivação, pelas correções e sugestões valiosas!

Um agradecimento mais que especial ao meu coorientador, Dr. Bruno Pontes, por topar este desafio desde o início! Obrigado por me acolher como parte da sua equipe desde que “caí de paraquedas” no seu laboratório na UFRJ, durante o estágio ainda na graduação. Tive muita sorte! Obrigado pelas oportunidades que me proporcionou, e principalmente, pela grande amizade! Agradeço também aos demais membros da equipe do Laboratório de Pinças Ópticas e do CENABIO, por me acolherem com tanto carinho.

Agradeço a Dra. Susana Frases Carvajal, por todos os conhecimentos trocados, além dos momentos de risada e descontração! Obrigado pelos recursos disponibilizados, pelo tempo dedicado a realizar comigo os experimentos de DLS, pelo auxílio na organização dos dados, e pela orientação quanto aos resultados.

Agradeço também ao Dr. Leonardo Nimrichter pelos materiais disponibilizados para a dosagem de citocinas, e aos doutorandos Alessandro Vieira e Leandro Honorato, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ, pelo auxílio quanto a estes experimentos.

Gostaria de reservar um parágrafo para agradecer especialmente à Danielle, por topar viver comigo a aventura de sair de Manaus para o Rio de Janeiro, onde auxiliamos um ao outro nos seus respectivos experimentos. Obrigado por todos os momentos, não poderiam ter sido melhores! Você é muito especial e capaz de realizar todos os seus sonhos (que não são pequenos), nunca deixe que lhe digam o contrário.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao PPG-BIOTEC e a todos os docentes que contribuíram para minha formação durante a pós-graduação, me proporcionando novos conhecimentos e crescimento profissional.

Agradeço às professoras que participaram da banca, Dra. Fhernanda Smiderle e Dra. Júlia Fariña, por aceitarem participar da avaliação do trabalho e pelas importantes contribuições.

Agradeço também à Dra. Márcia Rúbia Silva Melo, pela oportunidade de realização do Estágio em Docência, confiando a mim a disciplina de Bioquímica na minha antiga casa, a Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Com muita sorte, no último semestre de aulas presenciais!

Agradeço à FAPEAM pela bolsa de estudo concedida, e pelo financiamento dos recursos necessários para o nosso laboratório e o andamento de nossas pesquisas.

Agradeço também à CAPES, CNPq, FAPERJ e outras agências que fomentam os laboratórios por onde passei, e a todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Obrigado!

## RESUMO

Neste trabalho foram estudadas frações polissacarídicas extraídas da biomassa micelial – obtida via fermentação submersa – da linhagem de origem Amazônica do cogumelo comestível *Lentinus strigosus*. Após a extração e purificação, as frações homogêneas obtidas, aquosa (LSW) e alcalina (LSK) foram caracterizadas quanto à estrutura, propriedades físico-químicas e reológicas, bem como efeitos imunomoduladores e adesivos em macrófagos. Ambos os polissacarídeos apresentaram constituição majoritária de glucose, com traços de galactose, manose, arabinose e xilose. Não foram detectados ácidos urônicos. Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 sugerem que a fração LSW contenha unidades de  $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  e  $\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  como componentes majoritários. Já a fração alcalina (LSK) apresentou unidades de  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  e  $\rightarrow 3,6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ . Análises por espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram um diâmetro médio de 609,37 nm para as partículas polissacarídicas da fração LSW, e 301,17 nm para LSK, ambas com dispersão homogênea de tamanhos. O potencial zeta das duas frações foi similar, em torno de -6,58 mV para LSW e -5,47 mV para LSK, portanto com densidade de cargas elétricas superficiais próxima da neutralidade, porém ligeiramente negativas. Propriedades reológicas das soluções de polissacarídeos foram avaliadas em termos do módulo de armazenamento elástico ( $G'$ ), módulo de perda viscosa ( $G''$ ) e viscosidade complexa ( $\eta^*$ ), indicando um caráter de gel fraco para LSW e de líquido viscoso para LSK, não exibindo histerese térmica significativa. Ambas as frações apresentaram significativa atividade imunomoduladora em macrófagos murinos, estimada através da dosagem de citocinas por ELISA. Em células RAW-264.7, LSW estimulou a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , inibindo a produção de IL-10, enquanto LSK não apresentou indução ou inibição de tais citocinas. Já em células J774.1, ambas frações apresentaram atividade semelhante, ativando a produção de TNF- $\alpha$ , inibindo IL-10 e sem influenciar os níveis de IL-6. Microesferas de poliestireno revestidas com os polissacarídeos foram manipuladas com pinças ópticas (OT) para interagir com macrófagos vivos em cultura, apresentando tempo característico necessário para adesão à superfície celular bastante inferior ao controle, em torno de 13,38 s (LSW) e 13,94 s (LSK), sugerindo que tais polissacarídeos são rapidamente reconhecidos pelos macrófagos. Diante dos resultados, os polissacarídeos de *L. strigosus* apresentam propriedades distintas quando obtidos via extração aquosa e alcalina, ambos com atividade imunoestimuladora *in vitro*, verificada através de uma provável resposta inflamatória e rápida adesão/reconhecimento por macrófagos. Tais resultados vêm a contribuir com o conhecimento sobre o potencial de *L. strigosus* da Amazônia como cogumelo produtor de biomoléculas com benefícios à saúde e propriedades nutracêuticas ou funcionais, com foco na modulação imune. Como perspectivas futuras, estudos mais aprofundados de caracterização estrutural, mecanismos imunológicos ativados e o *screening* de outras atividades biológicas desses polímeros são recomendados, assim como a otimização e escalonamento de produção.

**Palavras-chave:** Macrofungos, Carboidratos Bioativos, Pinças Ópticas, Macrófagos, Imunomodulação.



## ABSTRACT

In this study, polysaccharide fractions extracted from the mycelial biomass – obtained by submerged fermentation – from the Amazonian strain of edible mushroom *Lentinus strigosus* were studied. After extraction and purification, homogenous fractions (aqueous, LSW, and alkaline, LSK) were characterized regarding their structure, physicochemical and rheological properties, as well as immunomodulatory and adhesive effects on macrophages. Both polysaccharides were mostly composed of glucose, with trace amounts of galactose, mannose, arabinose, and xylose. Uronic acids were not detected.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and DEPT-135 nuclear magnetic resonance (NMR) analysis suggests the presence of  $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  and  $\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  as major units in LSW, while LSK is mostly composed of  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  and  $\rightarrow 3,6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ . Dynamic light scattering (DLS) showed an average diameter of 609.37 nm for particles present in the LSW fraction, and 301.17 nm for LSK, both with homogeneous size dispersion. Zeta potential of the two fractions was similar, around -6.58 mV for LSW and -5.47 mV for LSK, therefore with a density of superficial electric charges close to neutrality, but slightly negative. Rheological properties of polysaccharide solutions were estimated in terms of elastic storage modulus ( $G'$ ), viscous loss modulus ( $G''$ ), and complex viscosity ( $\eta^*$ ), suggesting a weak gel-like character for LSW and viscous-fluid for LSK, not exhibiting significant thermal hysteresis. Both fractions showed a strong immunomodulatory effect in murine macrophages, estimated through ELISA-mediated cytokine dosing. In RAW 264.7 cells, LSW stimulated the release of IL-6 and TNF- $\alpha$ , inhibiting the production of IL-10, while LSK did not show significant induction or inhibition of these cytokines. In J774.1 cells, both fractions showed similar activity, enhancing TNF- $\alpha$  production, inhibiting IL-10, and no influence on IL-6. Polystyrene microspheres coated with the polysaccharides were manipulated with optical tweezers (OT) to interact with live macrophages in culture. It was observed that samples had a characteristic time required for adhesion to cell surface much lower than control, around 13.38 s (LSW) and 13.94 s (LSK), suggesting they are rapidly recognized by macrophages. Considering the results, polysaccharides from *L. strigosus* have distinct properties when obtained via aqueous and alkaline extraction, showing *in vitro* immunostimulant activity, verified through a probable inflammatory response and rapid adhesion/recognition by macrophages. These results contribute to the knowledge about the potential of Amazonian *L. strigosus* as a producer of biomolecules with health benefits and nutraceutical or functional properties, with a focus on immune modulation. As future perspectives, further characterization of structure, activated immunological mechanisms, and screening of other biological activities of these polymers are highly recommended, as well as production optimization and upscaling.

**Keywords:** Macrofungi, Bioactive Carbohydrates, Optical Tweezers, Macrophages, Immunomodulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Morfologia típica e ciclo de vida dos fungos basidiomicetos. ....	20
<b>Figura 2</b> – Aspecto dos basidiomas de <i>L. strigosus</i> durante o cultivo sólido em resíduos madeireiros. ....	31
<b>Figura 3</b> – Estrutura básica do lentinano, principal exemplo de polissacarídeo bioativo presente em espécies do gênero <i>Lentinus</i> . ....	34
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de ação proposto para os polissacarídeos provenientes de cogumelos e suas formulações ingeridos a partir da dieta. ....	36
<b>Figura 5</b> – Mecanismos de resposta imune provocados por polissacarídeos em macrófagos. ....	38
<b>Figura 6</b> – Esquema representativo do processo de obtenção de polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> . ....	42
<b>Figura 7</b> – Esquemática das etapas para análise da composição monossacarídica dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> . ....	45
<b>Figura 8</b> – Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (A), <sup>13</sup> C-RMN (B) e DEPT-135 (inserto) da fração polissacarídica LSW (aquosa) de <i>L. strigosus</i> , obtidos a 50 °C em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	53
<b>Figura 9</b> – Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (A), <sup>13</sup> C-RMN (B) e DEPT-135 (inserto) da fração polissacarídica LSK (alcalina) de <i>L. strigosus</i> , obtidos a 50 °C em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	55
<b>Figura 10</b> – Diâmetro efetivo (nm) das partículas de polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> em solução. (A) Valores médios do tamanho das partículas. (B) Distribuição dos valores de diâmetro em relação à intensidade da luz espalhada (0-100%). ....	57
<b>Figura 11</b> – Potencial zeta (mV) das partículas de polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> em solução. ....	60
<b>Figura 12</b> – Propriedades reológicas das frações polissacarídicas obtidas de <i>L. strigosus</i> . (A): Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ). (B): Módulo de armazenamento elástico ( $G'$ ). (C): Módulo de perda viscosa ( $G''$ ). ....	62

<b>Figura 13</b> – Curvas de módulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) das frações polissacarídicas de <i>L. strigosus</i> . (A): Fração aquosa (LSW, cor verde). (B): Fração alcalina (LSK, cor-de-rosa). .....	64
<b>Figura 14</b> – Histerese das propriedades reológicas dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> em função da variação de temperatura (25-85 °C). (A, B): Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ). (C, D): Módulo de armazenamento elástico ( $G'$ ). (E, F): Módulo de perda viscosa ( $G''$ ). .....	67
<b>Figura 15</b> – Perfil de citocinas secretadas por macrófagos tratados com as frações polissacarídicas de <i>L. strigosus</i> . (A-C): Células da linhagem RAW 264.7. (D-F): Linhagem J774.1. ....	69
<b>Figura 16</b> – Adesão relativa ( $N/N_0$ ) em função do tempo de contato (s) entre os macrófagos e as microesferas cobertas com polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> manipuladas por pinças ópticas. .....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais formas atuais de exploração industrial dos fungos. ....	19
<b>Tabela 2</b> – Lista de alguns produtos nutracêuticos de cogumelos disponíveis no mercado. .....	26
<b>Tabela 3</b> – Referências a respeito de <i>Lentinus strigosus</i> com atividades de interesse biotecnológico. ....	30
<b>Tabela 4</b> – Composição do meio de cultura MNM modificado para cultivo de <i>L. strigosus</i> . .....	41
<b>Tabela 5</b> – Dosagens colorimétricas das frações polissacarídicas obtidas de <i>L. strigosus</i> . .....	51
<b>Tabela 6</b> – Composição dos monossacarídeos neutros constituintes dos polissacarídeos de <i>L.</i> <i>strigosus</i> . ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	graus Celsius (unidade de temperatura)	<b>GC</b>	cromatografia gasosa
<b>°GL</b>	graus Gay-Lussac (álcool por volume)	<b>Glc</b>	D-glucose
<b>APCs</b>	células apresentadoras de antígenos	<b>Glc<sub>p</sub></b>	glucopiranosil
<b>Ara</b>	D-arabinose	<b>IFN</b>	interferons
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i> (banco de células)	<b>IL</b>	interleucinas
<b>BDA</b>	Batata-Dextrose-Ágar (meio de cultura)	<b>iNOS</b>	óxido nítrico-sintase induzível
<b>CCD</b>	dispositivo de carga acoplada (câmera)	<b>IPD</b>	índice de polidispersão
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono	<b>IPS</b>	intrapolissacarídeos
<b>DEPT-135</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>	<b>kDa</b>	kilodaltons (unidade de massa molecular)
<b>DLS</b>	espalhamento de luz dinâmico (do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i> )	<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultura)	<b>LSK</b>	<i>Lentinus strigosus</i> – fração polissacarídica alcalina
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	dimetilsulfóxido (deuterado)	<b>LSW</b>	<i>Lentinus strigosus</i> – fração polissacarídica aquosa
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	<b>Man</b>	D-manose
<b>EPS</b>	exopolissacarídeos	<b>Man<sub>p</sub></b>	manopiranosil
<b>FES</b>	fermentação em estado sólido	<b>MNM</b>	<i>Melin-Norkrans Modified</i> (meio de cultura)
<b>FSm</b>	fermentação submersa	<b>mPa·s</b>	milipascal-segundo (unidade de viscosidade)
<b>Fuc</b>	L-fucose	<b>MR</b>	receptores de manose
<b>G'</b>	módulo elástico (de armazenamento)	<b>MS</b>	espectrometria de massas
<b>G''</b>	módulo viscoso (de perda)	<b>mV</b>	milivolts (unidade de tensão elétrica)
<b>Gal</b>	D-galactose	<b>Nd-YAG</b>	<i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i> (tipo de laser)
<b>Gal<sub>p</sub></b>	galactopiranosil	<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>GALT</b>	tecido linfoide associado ao intestino (do inglês <i>Gut- associated Lymphoid Tissue</i> )	<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
		<b>OT</b>	pinças ópticas (do inglês <i>Optical Tweezers</i> )

<b>pg</b>	picograma (unidade de massa, $10^{-12}$ g)	<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>ppm</b>	partes por milhão	<b>TMS</b>	tetrametilsilano
<b>PRRs</b>	receptores de reconhecimento de padrões	<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>rad/s</b>	radiano por segundo (unidade de frequência)	<b>Xyl</b>	D-xilose
<b>Rha</b>	D-ramnose	<b><math>\delta</math></b>	deslocamento químico
<b>RMN</b>	ressonância magnética nuclear	<b><math>\zeta</math></b>	potencial zeta
<b>rpm</b>	rotações por minuto	<b><math>\eta^*</math></b>	viscosidade complexa
<b>SFB</b>	soro fetal bovino	<b><math>\lambda</math></b>	comprimento de onda
<b>SR</b>	receptores <i>scavenger</i>	<b><math>\tau</math></b>	tempo característico (adesão)
		<b><math>\omega</math></b>	frequência angular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Introdução geral.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 O Reino Fungi e o seu potencial biotecnológico .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Os basidiomicetos e os cogumelos comestíveis .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Valor nutricional e terapêutico dos cogumelos .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Alimentos funcionais e nutracêuticos.....</b>	<b>23</b>
1.5.1 Cogumelos como alimentos funcionais e nutracêuticos.....	24
<b>1.6 O cultivo de cogumelos .....</b>	<b>27</b>
1.6.1 Cultivo tradicional e fermentação sólida.....	27
1.6.2 Fermentação submersa como alternativa ao cultivo tradicional .....	28
<b>1.7 O gênero <i>Lentinus</i> .....</b>	<b>28</b>
1.7.1 <i>Lentinus strigosus</i> .....	29
<b>1.8 Os polissacarídeos .....</b>	<b>32</b>
1.8.1 Estrutura e propriedades físico-químicas .....	32
1.8.2 Função de polissacarídeos em basidiomicetos .....	32
1.8.3 Polissacarídeos produzidos por cogumelos .....	33
1.8.4 Polissacarídeos e ação imunomoduladora .....	34
1.8.5 Interação de polissacarídeos e macrófagos .....	37
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Local dos experimentos e material biológico.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Cultivo de <i>L. strigosus</i> sob fermentação submersa .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Obtenção das frações polissacarídicas de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Purificação dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Análise química dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>43</b>
4.5.1 Dosagem de carboidratos totais.....	43
4.5.2 Dosagem de proteínas totais.....	44

4.5.3 Dosagem de ácidos urônicos .....	44
4.5.4 Determinação da composição monossacarídica neutra .....	45
<b>4.6 Análise estrutural e físico-química dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>46</b>
4.6.1 Espectroscopia de RMN ( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H e DEPT-135).....	46
4.6.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS): Diâmetro efetivo e potencial zeta .....	47
4.6.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS): Propriedades reológicas .....	47
<b>4.7 Atividade imunomoduladora dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>47</b>
4.7.1 Cultura de células .....	47
4.7.2 Tratamento dos macrófagos com os polissacarídeos .....	48
4.7.3 Dosagem de citocinas .....	48
4.7.4 Preparo de microesferas cobertas com polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....	48
4.7.5 <i>Set-up</i> de microscopia de pinças ópticas .....	49
4.7.6 Adesão dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> à macrófagos em cultura .....	49
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Caracterização dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>51</b>
5.1.1 Análises colorimétricas e composição monossacarídica.....	51
5.1.2 Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	52
5.1.3 Diâmetro efetivo por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	56
5.1.4 Potencial zeta.....	59
5.1.5 Propriedades reológicas dos polissacarídeos.....	61
5.1.6 Histerese dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> em relação à temperatura .....	65
<b>5.2 Atividade imunomoduladora dos polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> .....</b>	<b>67</b>
5.2.1 Quantificação de citocinas liberadas por macrófagos .....	67
5.2.2 Adesão de <i>beads</i> revestidas com os polissacarídeos de <i>L. strigosus</i> à superfície de macrófagos.....	71
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Introdução geral

Cogumelos são fungos macroscópicos presentes em diversos ecossistemas, utilizados com finalidade alimentícia e medicinal pelos humanos desde a pré-história. Contudo, atualmente, o uso desses organismos tem se expandido para esferas industriais, com a validação científica de seu valor nutricional e da presença de importantes substâncias bioativas. Hoje, cogumelos *in natura*, processados, ou seus constituintes extraídos/isolados, estão presentes em formulações nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, entre outras, sendo classificados, portanto, como alimentos funcionais e/ou nutracêuticos, com benefícios comprovados para a saúde (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017; GUPTA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021).

O consumo regular de cogumelos ou produtos derivados, aliada à prática de hábitos saudáveis, pode estimular o bem-estar do organismo, atuando principalmente no sistema imunológico, de modo a aumentar a resistência a doenças, e em alguns casos causar a regressão de um estado patológico. Essa característica atribuída aos cogumelos se deve principalmente aos polissacarídeos, seus principais constituintes, que consistem em polímeros de carboidratos com ampla variedade de estruturas químicas e atividades biológicas. Os polissacarídeos são uma das classes mais relevantes de macromoléculas para aplicações em saúde, pois, quando consumidos, entre outros efeitos, são conhecidos por modular a função do sistema imune, e assim podem ser chamados de *imunomoduladores* (TZIANABOS, 2000; CAMELINI *et al.*, 2015; GHOSH; SMARTA, 2016; ZHOU *et al.*, 2019).

Atualmente, problemas de saúde relacionados aos hábitos de vida modernos têm sido cada vez mais frequentes, com o desgaste do sistema imune e o aumento da susceptibilidade do corpo humano a doenças infecciosas e cânceres. Dessa forma, os imunomoduladores de origem natural têm sido visados para aplicação direta em imunoterapias específicas ou para fortalecer o sistema imune de forma geral. Nesse contexto, cogumelos são fontes atrativas de polissacarídeos com potencial de uso para essas estratégias (MORRIS-QUEVEDO *et al.*, 2018; CHAKRABORTY *et al.*, 2019; ZIEBA *et al.*, 2021).

Alguns dos tipos de cogumelos explorados com essa finalidade são os do gênero *Lentinus*, conhecidos pela excelente qualidade nutricional e habilidade de se desenvolver numa variedade de substratos em curto tempo, adaptando-se a diferentes condições climáticas, o que

agrega vantagens ao cultivo de seus basidiomas. Esses organismos também são cultivados sob fermentação submersa, um processo que acelera a obtenção de seus compostos bioativos, a partir da biomassa micelial ou do caldo fermentado. Apesar disso, este gênero possui diversas espécies que ainda são pouco exploradas e apresentam grande potencial de uso, como *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr., cogumelo neotropical encontrado na região Amazônica, produtor de uma variedade de compostos com atividade biológica, incluindo polissacarídeos (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013; PESSOA, 2016).

## 1.2 O Reino Fungi e o seu potencial biotecnológico

Fungos são organismos eucariontes presentes em uma variedade de nichos ecológicos da Terra. Devido à diversidade fisiológica e morfológica encontrada no Reino Fungi, se torna difícil generalizar as características desses organismos, o que levou à sua classificação, ao longo da história, em diferentes grupos taxonômicos (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; AZEVEDO; BARATA, 2018).

Apesar da heterogeneidade desse grupo, a principal característica que os une é sua atuação como decompositores na natureza. Como seres heterotróficos por absorção, possuem um metabolismo eficiente em degradar substratos orgânicos, sendo primordiais em diversos ciclos biogeoquímicos. Assim, a ação decompositora dos fungos permite o início de novos ciclos de vida, atuando na reciclagem de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros elementos essenciais (DAVIDSON; JAINE, 2014; ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

Devido a essa e outras características, os fungos foram distribuídos em um reino independente a partir da década de 60 do século passado. Essa nova classificação se sustenta em características que os diferem dos outros organismos, como a presença de quitina na parede celular, ausência de plastos, clorofila ou outros pigmentos fotossintéticos, reprodução tanto assexuada quanto sexuada, sempre culminando na produção de esporos, armazenamento de glicogênio como substância de reserva, entre outras características únicas (SILVEIRA, 1995; KIRK *et al.*, 2008).

Devido ao seu metabolismo único e eficiente, além de suas importantes funções nos ecossistemas, os fungos têm se destacado pela utilidade em diversos setores econômicos. Ressaltando as vantagens do uso industrial desses organismos, algumas maneiras que podemos explorar fungos industrialmente estão listadas na Tabela 1.

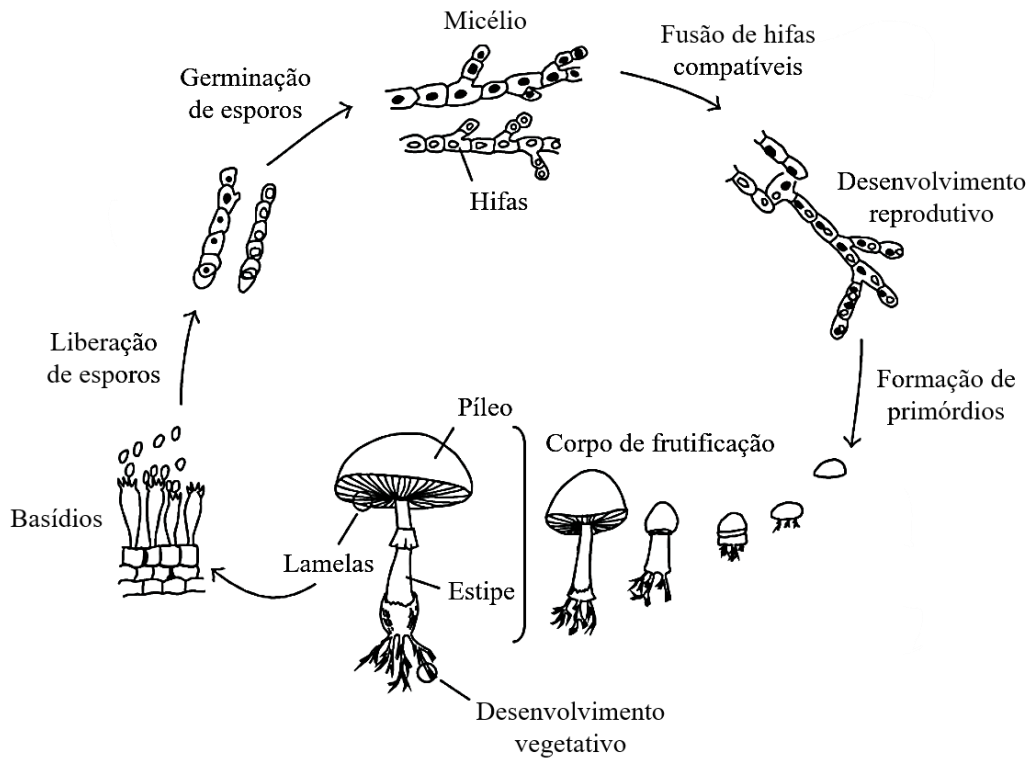
**Tabela 1** – Principais formas atuais de exploração industrial dos fungos.

Saúde humana	Agricultura e silvicultura	Alimentos e bebidas	Meio ambiente	Commodities
Antibacterianos	Biofertilizadores	<i>Single-cell protein</i>	Reciclagem de resíduos agrícolas	Cosméticos e cosmeceúticos
Antifúngicos	Controle de fitopatologias	Cultivo de cogumelos comestíveis	Biorremediação de ambientes poluídos	Enzimas
Inibidores de biofilmes	Biocontrole de insetos	Corantes alimentares	“Micofumigação”	Resinas
Agentes anticâncer	Biocontrole de nematódeos	Aromatizantes alimentares	Fixação de CO <sub>2</sub>	Plásticos biodegradáveis
Agentes antidiabetes	Biocontrole de ervas daninhas	Ingredientes funcionais	Biocompósitos	Ácidos orgânicos
Agentes antivirais	Micorrizas e ectomicorrizas	Alimentos nutracêuticos	Degradação de plásticos	Vitaminas
Controle de doenças cardiovasculares	Hormônios promotores do crescimento vegetal	Prebióticos	Degradação de hidrocarbonetos	Corantes e fibras têxteis
Melhoramento do sistema nervoso e cognitivo	Mitigação do estresse abiótico em plantas	Panificação	Degradação de xenobióticos	Conservantes naturais
Imunossupressores e estimulantes	Controle de doenças pós-colheita	Produção de queijos, vinhos, cervejas e outros fermentados	Produção de <i>biochar</i>	Biocombustíveis

Fonte: KAVANAGH, 2011; HYDE *et al.* 2019.

A estrutura fúngica é composta basicamente por uma parte vegetativa, o micélio, e uma parte reprodutora, o corpo de frutificação. O micélio é constituído por filamentos de células (hifas), que se desenvolvem a partir da germinação de esporos em um substrato adequado. As hifas formam uma rede sobre o substrato, desempenhando funções fisiológicas básicas, como a ingestão de alimento, assimilação de nutrientes, respiração e excreção. Durante o ciclo de vida do fungo, ao ocorrer a fusão de hifas compatíveis, o novo micélio formado pode desenvolver-se rapidamente e, em condições favoráveis, originar o componente reprodutivo, o corpo de frutificação, com a função de produzir e liberar novos esporos (Figura 1) (WALKER; WHITE, 2017; SCHMIEDER *et al.*, 2019; RAI *et al.*, 2021).

**Figura 1** – Morfologia típica e ciclo de vida dos fungos basidiomicetos.



Fonte: Adaptado de LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005.

### 1.3 Os basidiomicetos e os cogumelos comestíveis

O Reino Fungi, atualmente, compreende cinco filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, abrangendo desde organismos unicelulares (leveduras) a pluricelulares (fungos filamentosos), que vão de dimensões microscópicas até macroscópicas. Enquanto a maioria dos fungos se desenvolve essencialmente como microrganismos, os macrofungos, conhecidos popularmente como cogumelos, formam estruturas de tamanho suficiente para serem vistas a olho nu. Estes fungos pertencem às divisões Basidiomycota e Ascomycota, sendo em sua grande maioria basidiomicetos (KIRK *et al.*, 2008; NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

O filo Basidiomycota abriga uma biodiversidade estimada em 31.515 espécies, classificadas em 3 subfilos, 16 classes, 52 ordens, 177 famílias e 1.589 gêneros, sendo o segundo em diversidade de espécies depois dos ascomicetos. Estes fungos estão distribuídos em diferentes ambientes, atuando como parasitas, simbiontes micorrízicos e, na maioria das vezes, saprófitos, sendo decompositores de substratos orgânicos sem vida. Muitos dos basidiomicetos macroscópicos, decompositores de madeira e outros materiais vegetais na

natureza, são também comestíveis, ou seja, não apresentam compostos tóxicos intrínsecos que impeçam seu consumo na alimentação humana. Sendo atrativos recursos culinários, diversas culturas consomem os cogumelos diretamente ou os utilizam no preparo de pratos (BERNAS; JAWORSKA; LISIEWSKA, 2006; KIRK *et al.*, 2008; SALES-CAMPOS; DE ANDRADE, 2011; ERJAVEC *et al.*, 2012).

O conhecimento sobre as propriedades comestíveis dos cogumelos foi largamente desenvolvido fora do âmbito científico, através das experiências de povos tradicionais, indígenas e rurais, mas possui um grande embasamento, confirmado por uma literatura científica cada vez mais robusta. Além de seguros para consumo, as pesquisas têm validado os cogumelos como um ótimo recurso medicinal. Uma vez que a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere que os cuidados de saúde podem ser melhorados pela integração da alimentação com o uso de medicamentos tradicionais e práticas de autocuidado, uma grande atenção científica foi atraída para os cogumelos e seus benefícios à saúde (LU *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021).

Das cerca de 97 mil espécies fúngicas categorizadas ao redor do mundo, estima-se que 16 mil são cogumelos, das quais cerca de 2 mil são comestíveis e 700 são conhecidas por propriedades medicinais, porém apenas 35 são cultivadas a nível comercial para o consumo humano. Muitas dessas espécies estão na interseção entre recursos medicinais e alimentícios, não havendo uma distinção fácil entre estas duas categorias, visto que muitos dos cogumelos mais comuns possuem propriedades terapêuticas, e muitos dos cultivados para fins medicinais, também são comestíveis (PATEL; NARAIAN; SINGH, 2012; VALVERDE; HERNÁNDEZ-PEREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015; VARGHESE; AMRITKUMAR, 2020).

Na vasta região Amazônica, existe uma grande diversidade de cogumelos, com potencial de exploração para vários fins, tanto alimentícios quanto medicinais. No entanto, a variedade dos macrofungos amazônicos e seus potenciais de aplicação ainda são tópicos de pesquisa largamente inexplorados, principalmente no que diz respeito ao seu valor nutricional e terapêutico, assim como na produção de compostos bioativos. Diante desse cenário, destacam-se os estudos que têm sido conduzidos no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com o objetivo de selecionar espécies nativas da região, com o propósito de otimizar o processo produtivo de cogumelos e suas biomoléculas (SALES-CAMPOS; CHEVREUIL, 2019; SALES-CAMPOS *et al.*, 2021).

#### 1.4 Valor nutricional e terapêutico dos cogumelos

O consumo de cogumelos como alimento é um costume milenar, estimado a existir desde o período Neolítico (8.000 a.C.), tendo sido provavelmente um dos primeiros alimentos coletados nas florestas pelos povos pré-históricos. Na antiguidade, cogumelos eram colhidos e intencionalmente cultivados por civilizações orientais, que também o tinham como importantes itens de sua medicina tradicional, em nações como o Japão, China e Coreia (WASSER, 2005; EROL; AKATA; ERTUĞRUL, 2020).

No Ocidente, apesar dos relatos históricos serem menos frequentes e detalhados, é possível verificar o seu uso pelos antigos povos romanos, que os consideravam como “alimento dos deuses”. Em regiões como o Egito e a África subsaariana, também existem registros milenares do uso alimentar e em cuidados com a saúde. Já os povos nativos da América estampavam imagens de cogumelos em esculturas, cerâmicas, objetos de metal e têxteis em culturas do Norte ao Sul do continente, inclusive na região Amazônica, mostrando a grande importância histórica desses organismos em nossa cultura (ZENT; ZENT; ITURRIAGA, 2004; TRUTMAN, 2012; FERNANDES *et al.*, 2021).

Do ponto de vista nutricional, cogumelos são geralmente considerados alimentos completos e saudáveis, sendo fonte de diversos macro e micronutrientes, apesar de que a sua composição pode variar de acordo com a espécie, origem, forma de cultivo, tempo de colheita, bem como fatores ambientais e abióticos aos quais o cogumelo está sujeito (DA SILVA; JORGE, 2011; VETTER, 2019).

Entre os macronutrientes presentes em cogumelos, pode-se destacar os carboidratos, que podem representar de 50 a 70% do seu peso seco, em sua maioria sob a forma de fibras alimentares. Tais fibras correspondem a polissacarídeos não-digeríveis, portanto de baixo valor calórico, e não-amiláceos, assim, portanto, também de baixo índice glicêmico. Outro macronutriente importante são as proteínas, que constituem de 19 a 35% da composição dos cogumelos mais comuns, contendo todos os aminoácidos não sintetizados pelo corpo humano, e que, portanto, devem ser fornecidos pela dieta. Os valores de lipídios (gorduras) em geral são baixos, variando de 2 a 6%, contribuindo para a caracterização dos cogumelos como um alimento de valor calórico reduzido (SANDE *et al.*, 2019; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; GONZÁLEZ *et al.*, 2021).

Apesar da maioria dos carboidratos de cogumelos existirem sob a forma de fibras, os carboidratos livres (entre 9 e 18%) geralmente correspondem a mono e oligossacarídeos de glucose, galactose, manose e trealose (KIM *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2018). Um item que merece destaque neste grupo são alguns carboidratos considerados prebióticos, que promovem benefícios através da manutenção da microbiota intestinal, verificada a partir do aumento de bactérias benéficas e declínio das danosas (MOUMITA; DAS, 2022).

Ainda, entre a pequena fração lipídica, estão presentes os ácidos graxos de cadeia curta, também considerados prebióticos, e os ácidos graxos poli-insaturados (ex.: ácido linoleico, palmítico, esteárico etc.), que também são benéficos à saúde (JAYACHANDRAN; XIAO; XU, 2017; SANDE *et al.*, 2019).

Cogumelos também são fonte de micronutrientes, com destaque para os sais minerais, como o potássio, fósforo, ferro, magnésio, cálcio e selênio, com baixo teor de sódio. Também possuem diversas vitaminas, principalmente as do complexo B, mas também as vitaminas dos tipos A, C, E e K. Além disso, esses organismos são uma importante fonte alimentar não-animal de vitaminas do complexo D, pois produzem grande quantidade de moléculas precursoras das vitaminas D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (BERNAS; JAWORSKA; LISIEWSKA, 2006; CARDWELL *et al.*, 2018; VETTER, 2019).

Em complemento ao seu grande valor nutricional, vários dos compostos presentes em cogumelos são biologicamente ativos, incluindo alguns úteis para o aprimoramento do sistema imune, alguns potencializadores de atividade antioxidante, outros úteis como estimuladores do desenvolvimento de neurônios, e ainda compostos antimicrobianos para limitar a multiplicação de vírus, bactérias e fungos, entre muitas outras atividades. Sejam provenientes do metabolismo primário (ex.: polissacarídeos, proteoglicanos, glicoproteínas, enzimas, aminas etc.), ou do secundário (ex.: alcaloides, esteroides, terpenoides, lactonas, antraquinonas, tocoferóis, compostos fenólicos etc.), esses compostos possuem comprovado valor terapêutico (YAOITA; KIKUCHI; MACHIDA, 2014; LUO *et al.*, 2017; MILLAR *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2020).

### **1.5 Alimentos funcionais e nutracêuticos**

Devido à presença de nutrientes e diversas moléculas bioativas, cogumelos têm tido destaque no contexto de alimentos funcionais e nutracêuticos. Ultimamente, as evidências científicas sobre a relação existente entre alimentação e saúde vêm despertando mudanças nas demandas dos consumidores. Assim, o mercado tem buscado alimentos que não apenas

atendam às necessidades nutricionais, mas também contribuam diretamente para a saúde e bem-estar, causando uma onda de avanços na indústria alimentícia e farmacêutica, contando também com mudanças nas legislações pertinentes à rotulagem e delimitação dessas formulações (PEREIRA *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2017).

De modo geral, os alimentos funcionais, também conhecidos como *alimentos para uso específico de saúde*, são aqueles que proporcionam comprovados benefícios a saúde além da nutrição básica, sendo apresentados na forma de alimentos comuns e consumidos em dietas convencionais. Já um nutracêutico é um produto nutricional extraído a partir de alimentos, com comprovados benefícios terapêuticos, incluindo a prevenção e tratamento de doenças, e geralmente são apresentados em formatos como cápsulas, comprimidos, tabletes, pós, granulados, pastilhas, suspensões e soluções (STRINGHETA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2014).

Ambos são considerados importantes para o bem-estar, em complemento a uma dieta equilibrada e atividade física. Características nutracêuticas e funcionais têm sido descobertas em muitos alimentos já considerados tradicionais, enquanto novos produtos têm sido desenvolvidos visando atender a essa demanda (VALVERDE; HERNÁNDEZ-PEREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2015; CARDOSO *et al.*, 2017).

### **1.5.1 Cogumelos como alimentos funcionais e nutracêuticos**

De acordo com as definições e legislações internacionais, o enquadramento de cogumelos como alimentos funcionais e nutracêuticos é bastante adequado, visto que são comprovadamente promotores de saúde, principalmente devido às quantidades significativas de fibras, proteínas, vitaminas e compostos bioativos do metabolismo secundário. Na indústria alimentícia, a biomassa de cogumelos tem sido utilizada também como substituta de ingredientes tradicionais na para a criação de produtos fortificados e de baixo teor calórico, sem comprometer a textura, reologia e palatabilidade (KIM *et al.*, 2011; ULZIJARGAL *et al.*, 2013; VENTURELLA *et al.*, 2021).

Na indústria farmacêutica há um grande desenvolvimento de produtos usando cogumelos, podendo ter seus metabólitos extraídos para uso em vários tipos de formulações. Hoje, produtos derivados de cogumelos estão presentes no mundo todo, seja sob a forma de suplementos alimentares, na medicina complementar e alternativa, ou como medicamentos alopáticos, exemplificados pela lovastatina, utilizada desde 1987 no tratamento de doenças



envolvendo o metabolismo do colesterol, e considerada um medicamento essencial pela OMS (ELKHATEEB *et al.*, 2019; ÖZÜNLÜ; ERGEZER, 2021).

As mais importantes propriedades medicinais atribuídas aos cogumelos incluem efeito anticâncer, imunoestimulante, imunossupressor, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, antiparasitário, anti-hipercolesterômico, antiobesidade, anti-hipertensivo, anti-hiperglicêmico (antidiabético), antitrombótico, antialérgico, antidepressivo, prebiótico, hepatoprotetor e cardioprotetor, atuando também no alívio de distúrbios neurológicos, doenças neurodegenerativas e dermatológicas, entre muitos outros. Assim, estes organismos têm despertado atenção como uma fonte de moléculas inéditas ou com novos mecanismos de ação contra várias doenças (WANG *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016; RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016; YADAV *et al.*, 2020; TAOFIQ; BARREIRO; FERREIRA, 2020; RAI *et al.*, 2021).

Contudo, antes de recomendar-se qualquer constituinte bioativo para fins clínicos e farmacológicos, são necessários extensivos estudos, desde a elucidação de sua estrutura química, propriedades físico-químicas e doses adequadas, até a viabilidade econômica e uniformidade do processo produtivo, garantindo quantidade e qualidade, além de segurança e eficácia. Adicionalmente, uma das questões mais debatidas são os mecanismos de ação, muitas vezes ainda desconhecidos. Todos esses fatores são de grande relevância para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos a partir de cogumelos, de seus extratos e constituintes isolados (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017; DUDEKULA; DORIYA; DEVARAI, 2020).

Apesar disso, diversos produtos terapêuticos de cogumelos têm adentrado o mercado mundo afora, visto que muitos componentes obtidos dos micélios, basidiomas e caldo fermentado já completaram suas fases de pesquisa, teste e regulação em seus respectivos países de origem, e estão disponíveis como suplementos alimentares. O destaque vai para as atividades imunomoduladoras, anticâncer e antioxidantes, as mais comumente estudadas (Tabela 2) (ÜSTÜN; BULAM; PEKSEN, 2018; VENTURELLA *et al.*, 2021).

**Tabela 2** – Lista de alguns produtos nutracêuticos de cogumelos disponíveis no mercado.

Espécie	Produto	Ingrediente ativo	Dose recomendada	Efeitos
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Organic Reishi</i> ® (comprimidos)	Basidioma em pó	3 cápsulas/dia (500 mg)	Suplemento imunoestimulante
	<i>GanoSuper</i> ® (extrato concentrado)	37% polissacarídeos e 4,6% terpenos	2 cápsulas/dia (500 mg)	Antioxidante; suplemento imunoestimulante
<i>Lentinus edodes</i>	<i>Lentinan</i> , <i>LentinanXP</i> ®, <i>Lentinex</i> ®	Polissacarídeo ( $\beta$ -1,3-glucana isolada)	-	Atividade anticâncer e antioxidante
<i>G. lucidum</i> <i>L. edodes</i>	<i>Organic ReiShi-Gen</i> ®	Basidioma em pó (50% <i>G. lucidum</i> e 50% <i>L. edodes</i> )	-	Suplemento imunoestimulante
<i>G. lucidum</i> <i>Phellinus linteus</i> <i>Trametes versicolor</i>	<i>BreastDefend</i> ® (cápsulas)	Mix de extratos de cogumelos	2 cápsulas/dia (400 mg)	Manutenção da saúde e balanço hormonal saudável; imunomodulador
<i>Agaricus blazei</i>	<i>NatuSol</i> ® (cápsulas)	Basidioma em pó	3 cápsulas/dia (500 mg)	Suplemento imunoestimulante
<i>Agaricus sylvaticus</i>	Cogumelo do sol® (comprimidos)	Basidioma em pó	1 comprimido/dia (400 mg)	Imunoestimulante popular no mercado brasileiro
<i>Grifola frondosa</i>	<i>Maitake</i> ® (cápsulas)	$\beta$ -glucanas isoladas	-	Imunomodulador; recomendado para imunodeficiências
<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Eight Element</i> ® (cápsulas)	Basidioma em pó	2 cápsulas/dia (500 ou 600 mg)	Aumento na taxa metabólica celular
<i>C. sinensis</i> <i>G. frondosa</i> <i>Coprinus comatus</i>	<i>Levoler Forte</i> ® (comprimidos)	Extrato de <i>C. sinensis</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>C. comatus</i> , canela e biotina	4 comprimidos/dia (250 mg)	Usado no alívio dos sintomas da diabetes
<i>C. sinensis</i> <i>G. lucidum</i>	<i>Nutricafe</i> ® (blend com café orgânico)	Extrato de <i>Cordyceps</i> e <i>Ganoderma</i>	-	Aumenta a resistência física e ajuda a remover toxinas do corpo
<i>Trametes versicolor</i>	<i>Krestin</i>	Complexo polissacarídeo-proteína	-	Imunomodulador e anticâncer
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Immunoglukan</i> ® P4H Synbio (cápsulas)	Polissacarídeos, vitamina C, prebióticos	1 cápsula/dia (250 mg)	Imunomodulador, alívio da fadiga e estresse oxidativo

Fonte: MORRIS *et al.*, 2017; RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017; ZHANG *et al.*, 2021.

## 1.6 O cultivo de cogumelos

Apesar do seu uso histórico por diferentes civilizações, os cogumelos permanecem ainda largamente inexplorados, em comparação com as plantas, como fonte de compostos inéditos para diversas aplicações, com variados mecanismos de ação. A defasagem na exploração científica dos cogumelos foi por muito tempo devido a sua natureza efêmera, pois os corpos de frutificação surgem rapidamente na natureza, e na mesma velocidade se decompõem, após cumprir seu propósito reprodutivo. Dessa forma, o recente aumento no interesse por cogumelos não está relacionado apenas à profunda história cultural do seu uso, mas também ao desenvolvimento de métodos modernos para o cultivo desses organismos, como a fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) (STAMETS; ZWICKEY, 2014).

### 1.6.1 Cultivo tradicional e fermentação sólida

Na natureza, cogumelos se desenvolvem como decompositores primários de matéria orgânica. Das espécies comercialmente cultivadas ao redor do mundo, a maioria é de hábito saprofítico e são encontradas naturalmente em madeiras mortas e materiais vegetais em decomposição, salvo algumas espécies que crescem em solos ricos em nutrientes ou materiais de compostagem, e as que ocorrem como micorrizas, necessitando de árvores vivas como parceiros simbióticos (GRIMM; KUENZ; RAHMANN, 2021; ZIEBA *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, o cultivo de cogumelos foi desenvolvido em troncos ou toras de madeira inoculadas com o micélio. Porém, devido à dificuldade de cultivo e aquisição da matéria-prima, outras formas mais acessíveis foram adaptadas. Aos poucos, os produtores foram introduzindo o uso de blocos ou sacos contendo substratos orgânicos formulados com resíduos lignocelulósicos, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, processo conhecido como fermentação em estado sólido (FES) (SALES-CAMPOS; CHEVREUIL, 2019; SINGH *et al.*, 2020; ZIEBA *et al.*, 2021).

Contudo, apesar de sua contribuição ao meio ambiente, principalmente na reciclagem de resíduos agroindustriais, o cultivo sólido é um processo longo e trabalhoso, podendo levar vários meses da inoculação do substrato até a coleta dos basidiomas, além do difícil controle de qualidade, de possíveis contaminantes, e fatores ambientais. Com a crescente demanda por bioprodutos derivados de cogumelos, surgiu como alternativa o cultivo líquido, também conhecido como fermentação submersa (FSm), um processo mais rápido, homogêneo e de

parâmetros mais controláveis (TANG *et al.*, 2007; SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012; RATHORE *et al.*, 2019).

### 1.6.2 Fermentação submersa como alternativa ao cultivo tradicional

A FSm é caracterizada pela inoculação do micélio ou de esporos fúngicos em meio de cultura líquido, contendo nutrientes solúveis selecionados e otimizados de acordo com as necessidades particulares de cada espécie, para o crescimento e produção das moléculas de interesse. Ao invés de corpos de frutificação (basidiomas), o produto obtido no cultivo líquido de cogumelos é uma biomassa micelial, constituída por aglomerados de hifas. Após a separação deste material do meio de cultivo, é possível utilizá-lo diretamente, ou extrair os produtos de interesse. Entretanto, muitos compostos bioativos têm sido obtidos também a partir do meio líquido, sendo este um dos principais alvos da pesquisa atual na área (ELISASHVILI, 2012; RATHORE *et al.*, 2019; DUDEKULA; DORIYA; DEVARAI *et al.*, 2020).

Com a maioria dos processos levando de 2 a 3 semanas, a FSm permite o desenvolvimento de produtos mais uniformes e reproduzíveis em diferentes escalas, em menor tempo, sendo interessante por exemplo na obtenção de biomoléculas, com processos *downstream* menos complicados. Geralmente, os compostos obtidos da biomassa micelial apresentam propriedades farmacológicas semelhantes daqueles obtidos no basidioma. Dessa forma, a FSm pode ser empregada na produção em larga escala, visando as aplicações dos cogumelos como ingredientes funcionais, ou de seus componentes isolados como fármacos e produtos nutracêuticos (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012; RATHORE *et al.* 2019).

### 1.7 O gênero *Lentinus*

*Lentinus* é um gênero de basidiomicetos saprofíticos, decompositores de madeiras, que ocorre naturalmente ao redor do mundo, porém é mais frequentemente encontrado em regiões tropicais. Estes fungos fazem parte da microbiota brasileira, sendo encontrados em regiões de extrema importância biogeográfica, como a Amazônia, o Semiárido e o Pantanal. Apesar de pertencerem taxonomicamente à ordem Polyporales, estes fungos possuem grandes semelhanças aos da ordem Agaricales, principalmente devido à presença de lamelas, ainda que muito primitivas, sendo considerados então intermediários entre os fungos poroides e agaricoides (BONONI *et al.*, 2008; DRECHSLER-SANTOS *et al.*, 2012).

O gênero *Lentinus* abrange cerca de 63 espécies, sendo muitas consideradas não-tóxicas e comestíveis. A espécie *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler, por exemplo, ocupa um lugar proeminente no consumo e produção mundial de cogumelos, sendo popularmente conhecida como *shiitake*. Somando as suas características nutricionais e bioativas à facilidade com a qual podem ser cultivados, muitas espécies de *Lentinus* têm sido atrativas para a produção, também por apresentarem cores, texturas, formatos e aromas diferenciados, porém poucas espécies do gênero além de *L. edodes* são cultivadas para fins comerciais (VARGAS-ISLA; ISHIKAWA, 2008; MACHADO *et al.*, 2016).

### 1.7.1 *Lentinus strigosus*

*Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. (sinonímia: *Panus neostrigosus*) é um fungo comestível de ocorrência neotropical, sendo comumente encontrado em troncos caídos, raramente em árvores vivas. No que diz respeito à taxonomia, esta espécie foi descrita pela primeira vez pelo naturalista alemão Lewis David von Schweinitz como *Agaricus strigosus* (SCHWEINITZ, 1822). Ao longo dos anos, passou por reclassificações em diferentes gêneros, sobretudo dentro do gênero *Lentinus*, sendo mais recentemente proposto o táxon *Panus neostrigosus* (DRECHSLER-SANTOS *et al.*, 2012).

Todavia, esta última classificação ainda é disputada, permanecendo como consenso pelo “Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas” o epíteto *Lentinus strigosus*, podendo então os dois serem considerados sinônimos taxonômicos, e ambos os gêneros (*Lentinus* e *Panus*) sendo referidos conjuntamente como “fungos lentinoides” (SANUMA *et al.*, 2016; ZMITROVICH; KOVALENKO, 2016).

Dessa forma, a referida espécie atualmente se enquadra na seguinte classificação taxonômica: **Reino:** Fungi; **Filo:** Basidiomycota; **Classe:** Basidiomycetes; **Ordem:** Polyporales; **Família:** Polyporaceae; **Gênero:** *Lentinus*; **Espécie:** *Lentinus strigosus*.

Este cogumelo ainda não é cultivado comercialmente, nem muito explorado na literatura científica, sendo que a busca de informações, seja sobre “*Lentinus strigosus*” ou sua sinonímia “*Panus neostrigosus*”, retornam poucos resultados, principalmente em termos de pesquisas para fins biotecnológicos e farmacêuticos. No entanto, publicações pioneiras de nosso grupo de pesquisa (LCFC) relatam a domesticação e o cultivo deste cogumelo na Amazônia, com resultados satisfatórios em termos de produção e rendimento, assim como de características

nutricionais. O cultivo desta espécie, apesar de pouco comum, pode ser interessante devido ao baixo custo de produção, facilidade de crescer em resíduos madeireiros regionais, adaptabilidade, alta eficiência biológica e elevado valor nutricional, rico em fibras e proteínas, com baixo índice lipídico (SALES-CAMPOS, 2008; SALES-CAMPOS; ANDRADE, 2010; SALES-CAMPOS; ANDRADE, 2011; SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

Em publicações de outros grupos de pesquisa, o micélio de *L. strigosus* cultivado sob fermentação submersa também é relatado como detentor de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides, terpenoides, esteroides, saponinas, antraquinonas e cumarinas, os quais são conhecidos por exercer inúmeras atividades biológicas (BABAC *et al.*, 2021).

Apesar de escassos em relação a outros cogumelos mais populares, as referências envolvendo *L. strigosus* têm indicado algumas atividades em potencial. Os estudos são originados em diferentes regiões geográficas, porém mais recorrentes no Brasil, e têm sido realizados tanto a partir dos basidiomas coletados na natureza, quanto dos provenientes de cultivo sólido, assim como da biomassa micelial (FSm), ou do substrato sólido e caldo pós-cultivo (Tabela 3).

**Tabela 3** – Referências a respeito de *Lentinus strigosus* com atividades de interesse biotecnológico.

Refere-se a	Origem geográfica	Atividade atribuída	Referência
<i>P. neostrigosus</i>	Turquia	Degradação de aflatoxinas	SÖYLEMEZ; YAMAÇ; YILDIZ, 2020
<i>P. neostrigosus</i>	Tailândia	Produção de enzimas ligninolíticas	TERASAWAT; PHOOLPHUNDH, 2021
<i>L. strigosus</i>	Brasil		OKINO <i>et al.</i> , 2000
<i>L. strigosus</i>	Tailândia	Degradação de corantes	VAITHANOMSAT <i>et al.</i> , 2012
<i>L. strigosus</i>	Brasil		MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005
<i>L. strigosus</i>	Tailândia	Atividade antifúngica	SRIKRAM; PHALAKHUN, 2019

**Tabela 3** – Referências a respeito de *Lentinus strigosus* com atividades de interesse biotecnológico (continuação).

Refere-se a	Origem geográfica	Atividade atribuída	Referência
<i>L. strigosus</i>	Brasil	Atividade antimicrobiana	ROSA <i>et al.</i> , 2003
<i>L. strigosus</i>	Brasil	Atividade antiparasitária (tripanocida)	COTA <i>et al.</i> , 2008
<i>L. strigosus</i>	Brasil	Atividade antiparasitária (leishmanicida)	SOUZA-FAGUNDES <i>et al.</i> , 2010
<i>L. strigosus</i>	Índia	Bioabsorção de metais	MURALEEDHARAN; IYENGAR; VENKOBACHAR, 1995
<i>L. strigosus</i>	Filipinas	Atividade antiobesidade ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	AQUINO; DULAY; KALAW, 2020
<i>L. strigosus</i>	Brasil	Produção de exopolissacarídeos e biomassa micelial	MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 1999
<i>L. strigosus</i>	Turquia	Produção de exopolissacarídeos com atividade hipoglicêmica	YAMAÇ <i>et al.</i> , 2008

Morfologicamente, *L. strigosus* é caracterizado pelos corpos de frutificação pigmentados de cor que varia de púrpura a marrom, com tons cor-de-rosa, de aspecto denso e aveludado, que usualmente crescem em aglomerados, seja na natureza ou em cultivos sólidos (Figura 2) (DULAY; RIVERA; GARCIA, 2017).

**Figura 2** – Aspecto dos basidiomas de *L. strigosus* durante o cultivo sólido em resíduos madeireiros.



Fonte: Acervo do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC/INPA).

## 1.8 Os polissacarídeos

### 1.8.1 Estrutura e propriedades físico-químicas

Principais constituintes dos cogumelos (em percentual de peso seco), os polissacarídeos são também a classe de macromoléculas mais investigada nesses organismos. Quimicamente, são carboidratos de longa cadeia, formados por pequenas unidades de açúcares simples (monossacarídeos) unidos por ligações glicosídicas, sendo, portanto, classificados como polímeros. A estrutura de um polissacarídeo é definida por diferentes fatores: sua composição e sequência monossacarídica, que pode ser de monômeros iguais (em homopolissacarídeos) ou diferentes (heteropolissacarídeos); configuração das ligações glicosídicas; tamanho da cadeia; posição de possíveis ramificações; e a natureza, número e localização de grupos não-carboidratos associados, como proteínas, polifenóis e outras moléculas secundárias (CAMELINI *et al.*, 2015; ASKER; KADY; MAHMOUD, 2019).

As unidades de açúcares podem se ligar em posições diferentes para formar uma ampla variedade de estruturas, de tamanho e massa molecular bastante diversificados, porém quase sempre tendendo a moléculas grandes, de alta massa molar. Em adição, modificações como sulfatação, metilação e *O*-acetilação podem aumentar ainda mais a diversidade das estruturas adotadas pelos polissacarídeos. Assim, a enorme variabilidade nesse grupo de moléculas dá a flexibilidade necessária para interagir com células e modular respostas biológicas. Quando solubilizados, polissacarídeos apresentam também estruturas secundárias e tridimensionais, e tendem a formar agregados que podem mascarar o comportamento de moléculas individuais. Conseqüentemente, caracterizar a estrutura química e a conformação de polissacarídeos não é uma tarefa fácil, e exige a utilização de uma variedade de métodos complementares entre si (CAMELINI *et al.*, 2015; ASKER; KADY; MAHMOUD, 2019).

### 1.8.2 Função de polissacarídeos em basidiomicetos

Em geral, basidiomicetos possuem a capacidade natural de sintetizar polissacarídeos, que possuem papel imprescindível na estrutura da parede celular, na formação de reservas energéticas, e são produzidos como mecanismo de proteção celular em resposta a diferentes estímulos. Além disso, essas moléculas atuam na adaptação osmótica e estabelecimento de relações simbióticas, entre outras atividades essenciais para a sobrevivência de fungos sob



diferentes condições ambientais (YU *et al.*, 2018; RUIZ-HERRERA; ORTIZ-CASTELLANOS, 2019; KLAUS *et al.*, 2021).

Esses compostos podem ser extraídos, no contexto do cultivo sólido, a partir dos corpos de frutificação; e no cultivo submerso, da biomassa micelial (intrapolissacarídeos, IPS) ou do caldo fermentado (exopolissacarídeos, EPS). Além de possuir um papel vital no crescimento e desenvolvimento do fungo, os polissacarídeos são potentes modificadores de respostas biológicas em quem os consome, fazendo deles um importante foco para o desenvolvimento de novos biofármacos (TIAN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2020; CAMPESTRINI; SALES-CAMPOS, 2021).

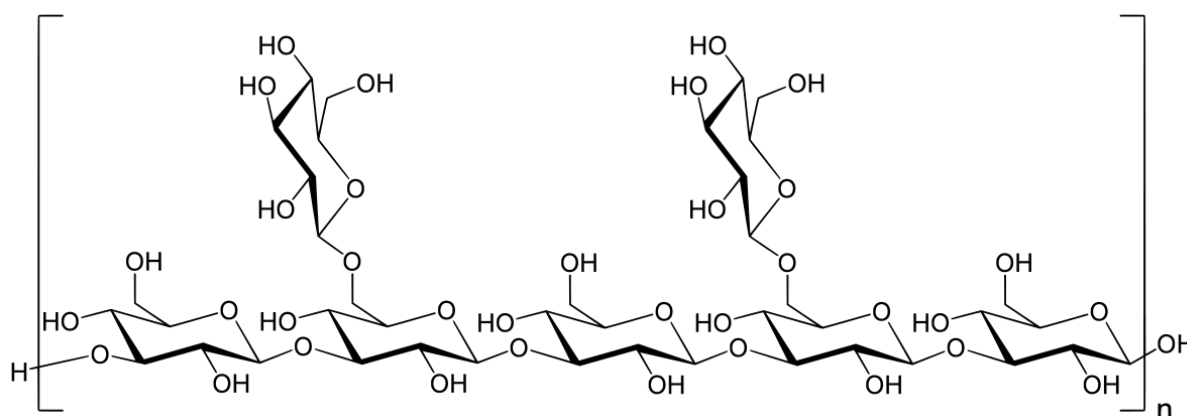
### 1.8.3 Polissacarídeos produzidos por cogumelos

O arranjo molecular dos polissacarídeos produzidos por basidiomicetos é bastante diverso, comumente mostrando-se diferente de acordo com a espécie, linhagem e estágio de desenvolvimento. Entretanto, a maioria dos polissacarídeos de cogumelos pertence ao grupo das  $\beta$ -glucanas, polímeros de D-Glc cuja cadeia principal é formada por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), mas também podem conter um número variado de ramificações com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Outros polissacarídeos encontrados em cogumelos são as  $\alpha$ -glucanas, com ligações do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), as quitinas (polímeros de *N*-acetilglicosamina 1 $\rightarrow$ 4 ligadas), mananas (polímeros de D-Man), e galactanas (D-Gal), além de heteropolissacarídeos contendo diferentes combinações de açúcares, como galactomananas e glucogalactomananas (CAMELINI *et al.*, 2015; CORRÊA *et al.*, 2016; RUTHES *et al.*, 2016; CAMPESTRINI; SALES-CAMPOS, 2021).

Os relatos publicados sobre polissacarídeos obtidos de *Lentinus strigosus* são poucos, e escassos de informação sobre sua estrutura, composição e atividade biológica. Contudo, cogumelos pertencentes ao mesmo gênero geralmente apresentam grande similaridade em sua composição, incluindo na estrutura de seus carboidratos. Portanto, os polissacarídeos do gênero *Lentinus* podem ser muito bem exemplificados pelo lentinano, um dos polissacarídeos mais estudados entre os cogumelos. Esta molécula foi isolada pela primeira vez da espécie *Lentinus edodes*, porém já foi relatada em outras espécies do gênero (MANJUNATHAN; KAVIYARASAN, 2010).

O lentinano é largamente explorado pela sua atividade imunomoduladora, antioxidante e antitumoral, sendo também um produto nutracêutico regulado e registrado no mercado de alguns países, e muito apreciado pela medicina asiática. Estruturalmente, é uma  $\beta$ -glucana composta de uma cadeia principal de resíduos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glcp com cadeias laterais de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glcp, apresentando peso molecular em torno de 500 kDa (YANG; ZHOU; ZHANG, 2019; ZHANG *et al.*, 2019) (Figura 3).

**Figura 3** – Estrutura básica do lentinano, principal exemplo de polissacarídeo bioativo presente em espécies do gênero *Lentinus*.



Fonte: Wikimedia Commons

Outros exemplos de polissacarídeos isolados a partir de espécies do gênero *Lentinus* ainda não foram totalmente caracterizados, em nível de comparação ao lentinano. Entretanto, relatos incluem uma glucana isolada de *L. velutinus*, com massa molecular de 336 kDa, e atividade antioxidante e citotóxica contra células cancerosas (UDCHUMPISAI; BANGYEEKHUN, 2020). Um polissacarídeo solúvel isolado de *L. squarrosulus* foi relatado como constituído de Man, Glc e Gal, exibindo atividade antioxidante e antibacteriana (AYIMBILA; SIRIWONG; KEAWSOMPONG, 2021).

Ainda, em um estudo comparativo da produção de polissacarídeos por *L. edodes*, *L. lepideus* e *L. tigrinus*, foi verificada a presença de frações com propriedades físico-químicas similares, porém massas moleculares variadas, indo de baixa (< 10 kDa) a alta ( $\geq$  200-2000 kDa), identificadas como glucanas, contendo quantidades menores de Ara, Gal, Xyl e Man (PUCHKOVA; SHCHERBA; BABITSKAYA, 2010).

#### 1.8.4 Polissacarídeos e ação imunomoduladora

Devido a sua capacidade de modificar respostas biológicas, uma das principais atividades atribuídas aos polissacarídeos é a modulação do sistema imune, que por sua vez pode

desencadear uma série de outros efeitos. Diante disso, polissacarídeos de diversas fontes naturais têm sido utilizados como componentes principais ou coadjuvantes de imunoterapias (GUGGENHEIM; WRIGHT; ZWICKEY, 2014).

As imunoterapias atuam principalmente na prevenção ou tratamento da imunodeficiência, caracterizada pela deterioração ou falha na ativação de componentes celulares ou moleculares do sistema imunológico, assim diminuindo a susceptibilidade a doenças infecciosas e desenvolvimento de cânceres (carcinogênese). Essa questão tem se tornado um grande problema de saúde pública em escala global, diretamente ligada a fatores endógenos e exógenos, como: idade; estresse; má nutrição ou maus hábitos alimentares; fumo; exposição à radiação; condições ambientais adversas; histórico de infecções e vacinas; ou ainda ao surgimento de patologias que afetam diretamente as células de defesa (CHINEN; SHEARER, 2010; MORRIS-QUEVEDO *et al.*, 2018).

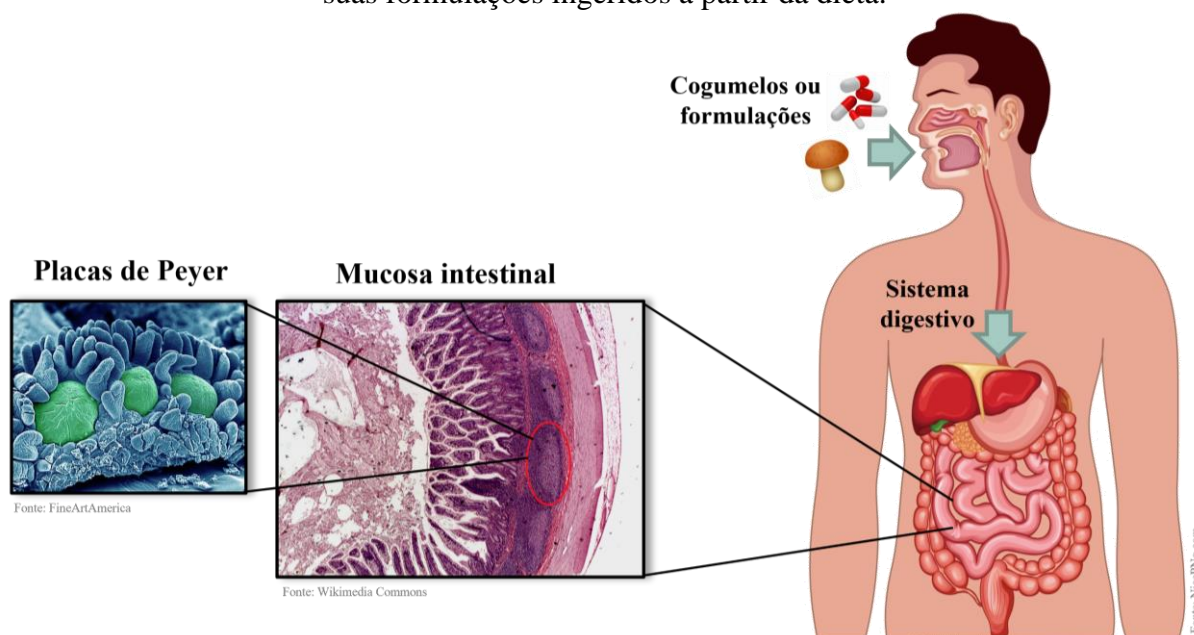
Diante desse cenário, a busca por imunomoduladores de origem natural tem sido cada vez mais relevante, o que é observado principalmente pelo aumento no número de produtos que afirmam “aumentar a imunidade” ou “melhorar a resposta imune”. Em termos de comprovação científica, polissacarídeos têm sido validados para diversas aplicações nesse sentido. De modo geral, os polissacarídeos de origem natural mais estudados por atividades imunomoduladoras são as glucanas (MURPHY *et al.*, 2020), mananas (ZHU *et al.*, 2022), pectinas (MERHEB; ABDEL-MASSIH; KARAM, 2019), fucoidanas (PENG *et al.*, 2019), galactanas (KHONGTHONG *et al.*, 2021), frutanas (YOUNG; LATOUSAKIS; JUGE, 2021) e hialuronatos (CHUNG; LAU; CHAU, 2021).

Muitos desses polissacarídeos interagem de forma direta ou indireta com o sistema imunológico, e apesar de alguns apresentarem importantes efeitos imunossupressores, a grande maioria é de natureza imunoestimulante, incluindo os obtidos de fungos comestíveis (CHINEN; SHEARER, 2010; MORRIS-QUEVEDO *et al.*, 2018).

Polissacarídeos agem estimulando o sistema imune principalmente pela ativação de componentes da imunidade celular, como células dendríticas e macrófagos, além de efeitos promotores da proliferação de linfócitos T ( $CD_4^+$  e  $CD_8^+$ ) e NK (*natural killer*), assim como de esplenócitos do sistema linfático. Entretanto, também podem interagir e regular a atividade de moléculas que medeiam a imunidade humoral, como anticorpos e proteínas do sistema complemento (SUN *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2019; UDCHUMPISAI; BANGYEEKHUN, 2020).

A maioria dos polissacarídeos de cogumelos não são digeríveis por humanos, como as  $\beta$ -glucanas, pois essas moléculas possuem ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ , que nossas enzimas digestivas são incapazes de quebrar. Assim, quando ingeridos a partir da dieta, ou de qualquer formulação administrada via oral, os polissacarídeos passam com poucas alterações do estômago para o intestino delgado, onde teoriza-se que interagem com as placas de Peyer, um “tecido linfoide associado ao intestino” ou GALT (do inglês *Gut-associated Lymphoid Tissue*), que consiste em folículos linfóides distribuídos ao longo do trato gastrointestinal. Visto que a mucosa intestinal é uma barreira crucial para a defesa contra patógenos e antígenos ingeridos, as placas de Peyer concentram cerca de 70% de todas as células imunes do organismo humano (YU *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2016; UDCHUMPISAI; BANGYEEKHUN, 2020) (Figura 4).

**Figura 4** – Mecanismo de ação proposto para os polissacarídeos provenientes de cogumelos e suas formulações ingeridos a partir da dieta.



Fonte: Elaborado com ilustrações de FineArtAmerica, Wikimedia Commons e NicePNG.com

Ao chegar ao intestino, os polissacarídeos podem interagir com as células presentes nas placas de Peyer, ativando os diferentes mecanismos do sistema imune, e os componentes imunes produzidos podem então migrar para outros tecidos e atuar de forma sistêmica, através da circulação linfática. Somando todas essas possibilidades de interação, a ativação dos mecanismos da imunidade pelos polissacarídeos pode resultar em uma maior chance de o organismo ser capaz de eliminar patógenos ou células tumorais (FERREIRA, 2014; XIE *et al.*, 2016).

### 1.8.5 Interação de polissacarídeos e macrófagos

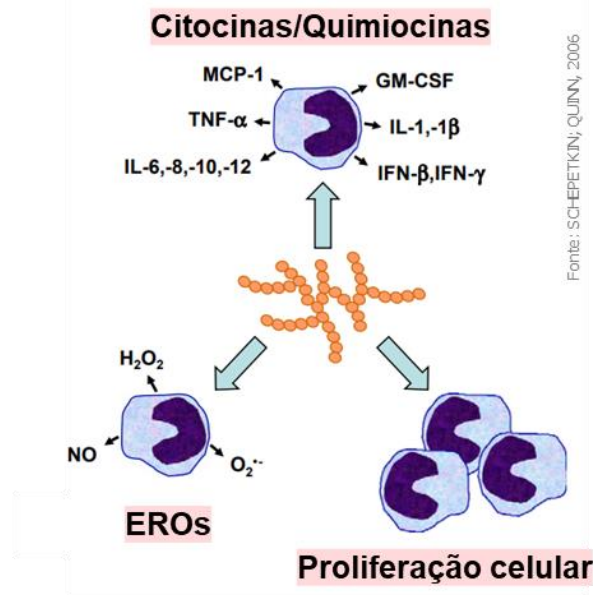
O importante papel dos macrófagos no sistema imune é amplamente estabelecido na ciência médica, sendo células que atuam na “linha de frente” da imunidade inata, liberando mediadores imunológicos e exercendo a fagocitose e pinocitose de diversos materiais, além de servir como células apresentadoras de antígenos (APCs) e colaborar com linfócitos para regular respostas imunes adaptativas (ZHENG; WANG; LI, 2015; YIN; ZHANG, LI, 2019).

Nesse contexto, os polissacarídeos derivados de cogumelos são relatados como potentes moduladores de macrófagos. Após o consumo ou administração oral, os polissacarídeos no intestino delgado são rapidamente capturados e fragmentados por macrófagos presentes nas placas de Peyer, provocando vias de sinalização já bastante conhecidas, sendo atualmente elucidadas ao nível molécula-receptor (YIN; ZHANG, LI, 2019; UDCHUMPISAI; BANGYEEKHUN, 2020).

Supõe-se que polissacarídeos ativam a ação de macrófagos principalmente pelo reconhecimento e ligação à receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) na superfície celular, sugerindo que esses receptores podem ter sítios de ligação específicos para esses polímeros. Tais receptores incluem: Toll-like 2 (TLR2); Toll-like 4 (TLR4); CD14; receptor do complemento 3 (CR3); receptores *scavenger* (SR); receptores de manose (MR) e dectina-1, sendo este último específico para as  $\beta$ -glucanas fúngicas (ZHENG; WANG; LI, 2015; YIN; ZHANG, LI, 2019).

Uma vez reconhecidos pelos receptores na superfície dos macrófagos, os polissacarídeos podem então desencadear uma série de cascatas de sinalização, levando principalmente ao aumento da produção de citocinas, como os fatores de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL), interferons (IFN), quimiocinas, e à indução da síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o óxido nítrico, pela atividade de óxido nítrico-sintase (iNOS), além de regular positivamente a atividade fagocitária dos macrófagos e estimular a proliferação dessas células (ZHENG; WANG; LI, 2015; YIN; ZHANG, LI, 2019; UDCHUMPISAI; BANGYEEKHUN, 2020) (Figura 5).

**Figura 5** – Mecanismos de resposta imune provocados por polissacarídeos em macrófagos.



Fonte: Adaptado de SCHEPETKIN; QUINN, 2006.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar do seu potencial, as biomoléculas produzidas por *L. strigosus*, incluindo polissacarídeos, ainda não foram totalmente caracterizadas, levando a uma necessidade de estratégias apropriadas para preencher esta lacuna de conhecimento. Além disso, considerando que esta espécie é de ocorrência na Amazônia, região que representa a maior biodiversidade do mundo, justificam-se os estudos que visam ampliar os conhecimentos sobre as aplicabilidades das linhagens de cogumelos de ocorrência local, abrindo o caminho para explorá-las de modo sustentável.

Para tanto, a abordagem deste trabalho propôs a extração e caracterização de polissacarídeos produzidos pela linhagem regional Amazônica de *L. strigosus*, cultivada sob fermentação submersa, e verificar o possível efeito modulador dessas moléculas em macrófagos, células que atuam na linha de frente do sistema imune.

O racional foi prover uma base teórica de relevância para a futura utilização desses polissacarídeos como potenciais imunostimulantes, em terapias baseadas em alimentos funcionais ou nutracêuticos, produtos que têm observado um crescimento de mercado nos últimos anos. Assim, será possível também contribuir para a difusão dessa linhagem nativa como recurso alimentício de benefício à saúde, e oferecer perspectivas para seu uso como insumo nas indústrias, agregando valor econômico às cadeias de produção locais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Extrair polissacarídeos da biomassa micelial da linhagem regional amazônica do cogumelo comestível *Lentinus strigosus*, e caracterizá-los quanto a estrutura e propriedades físico-químicas, assim como efeitos imunomoduladores e adesivos em macrófagos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Cultivar o fungo comestível *Lentinus strigosus* sob fermentação líquida e extrair polissacarídeos de sua biomassa micelial;
- b) Purificar as frações polissacarídicas da biomassa de *L. strigosus* até a obtenção de frações com o maior grau possível de homogeneidade;
- c) Caracterizar quimicamente a composição dos polissacarídeos de *L. strigosus* por meio de dosagens colorimétricas e cromatográficas;
- d) Caracterizar parcialmente a estrutura dos polissacarídeos de *L. strigosus* por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135;
- e) Determinar características físico-químicas e reológicas das soluções de polissacarídeos de *L. strigosus* por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS).
- f) Avaliar o efeito imunomodulador a partir da dosagem de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) produzidas por macrófagos tratados com os polissacarídeos;
- g) Caracterizar a adesão de microesferas cobertas com os polissacarídeos de *L. strigosus* à superfície de macrófagos, por meio de interação mediada por pinças ópticas (OT).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local dos experimentos e material biológico

Para este estudo, foi utilizada uma linhagem do fungo comestível *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. (Polyporaceae), isolada de um ambiente natural da Floresta Amazônica. A linhagem foi obtida da Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural, pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação (COTEI) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (nº de depósito 1466), e foi mantida no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC) (COTEI/INPA) em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sendo regularmente repicada para manter sua viabilidade. Neste mesmo laboratório, foi realizado o cultivo submerso e produção do micélio de *L. strigosus*.

A extração, purificação e parte da caracterização estrutural dos polissacarídeos foi realizada em parceria com o Núcleo Paranaense de Pesquisa Científica e Educacional de Plantas Medicinais (NUPPLAMED), da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Já a caracterização físico-química e os ensaios biológicos em cultivos celulares foram feitos em parceria com o Laboratório de Pinças Ópticas (LPO), pertencente ao Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO), e o Laboratório de Biofísica de Fungos (LBF), pertencente ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

### 4.2 Cultivo de *L. strigosus* sob fermentação submersa

A fermentação submersa foi realizada a partir do preparo do pré-inóculo de *L. strigosus* em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura MNM (*Melin-Norkrans Modified*) (MARX, 1969), com adaptações. O pH do processo fermentativo foi ajustado para a faixa de 6,0, e a composição do meio seguiu o descrito na Tabela 4, a seguir:



**Tabela 4** – Composição do meio de cultura MNM modificado para cultivo de *L. strigosus*

Componente	Fórmula	Concentração
Sacarose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	20 g/L
Extrato de Malte	-	3 g/L
Fosfato diamônico	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,93 g/L
Fosfato monopotássico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/L
Fosfato dipotássico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,7 g/L
Cloreto de cálcio (dihidratado)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05 g/L
Cloreto de sódio	NaCl	0,025 g/L
Sulfato de magnésio (heptahidratado)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,15 g/L
Cloridrato de tiamina	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS·HCl	100 µg/L
Solução de cloreto férrico	FeCl <sub>3</sub>	1% v/v
Leite de castanha do Brasil	-	0,1% v/v

Placas de Petri contendo o micélio de *L. strigosus* repicado no meio sólido BDA foram utilizadas para a obtenção de discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro. Os frascos contendo 100 mL de meio MNM foram inoculados com 7 discos de micélio de cada placa de *L. strigosus*, e mantidos por 8 dias em *shaker* orbital a 30 ± 2 °C e 120 rpm. Após o tempo de cultivo, a biomassa micelial foi separada do meio de cultura por centrifugação (10 min a 5000 rpm, à temperatura ambiente) e lavada com água destilada estéril, resultando no pré-inóculo.

Em seguida, o pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 1000 mL, dessa vez contendo 500 mL de meio, que foram mantidos nas condições anteriores. Após o período de fermentação, o material do frasco também foi separado por centrifugação (10 min, 5000 rpm, temperatura ambiente), resultando na separação da biomassa micelial e do caldo fermentado (pós-cultivo).

### 4.3 Obtenção das frações polissacarídicas de *L. strigosus*

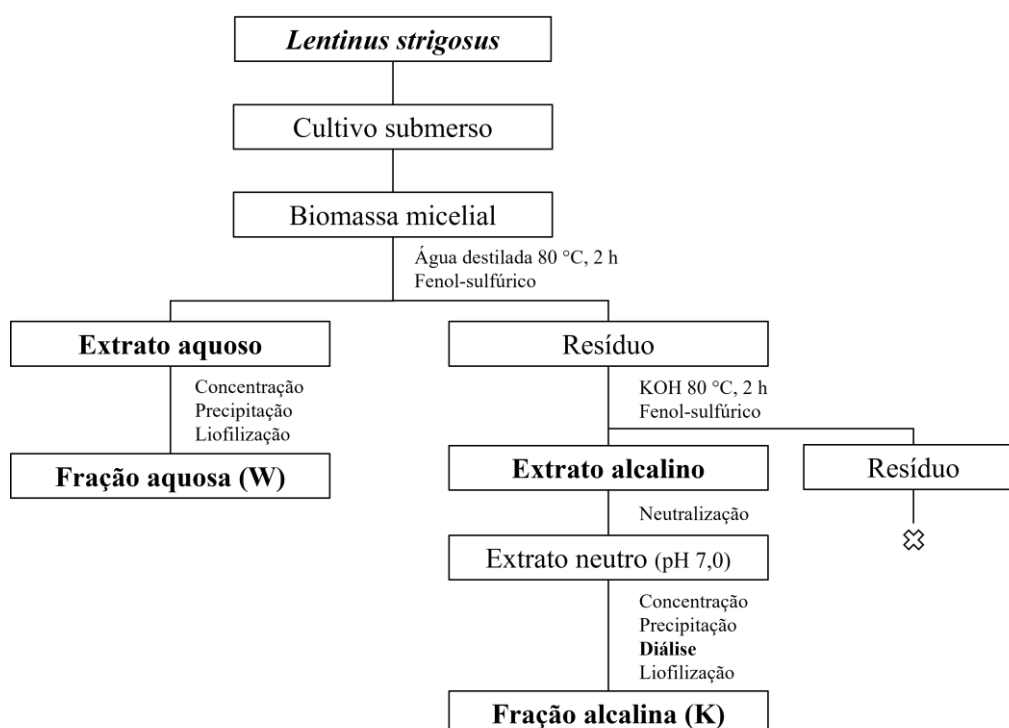
A biomassa micelial de *L. strigosus*, obtida durante a fermentação submersa, foi lavada e liofilizada, e em seguida submetida à extração de polissacarídeos, de acordo com o esquema representado na Figura 6. A biomassa micelial foi dispersa em água destilada e aquecida a cerca de 80 °C sob constante agitação. A extração foi feita por repetidas vezes, até que não fosse

verificada a presença de carboidratos nos extratos, pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

Os extratos obtidos foram reunidos, concentrados em rota-evaporador até o volume de aproximadamente 200 mL, e precipitados pela adição de etanol 96 °GL gelado, na proporção de 1:4 (m/v), por 24 h sob refrigeração. Após a precipitação, o material foi centrifugado a 4300 rpm por 10 min a 10 °C, para separação do etanol, sendo posteriormente congelado e liofilizado (Figura 6).

O resíduo da extração aquosa foi submetido à extração alcalina, em solução de hidróxido de potássio (KOH 1 M) a cerca de 80 °C sob agitação, acrescida de 100 mg do agente redutor borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), por repetidas vezes até a reação negativa do extrato com fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Os extratos foram reunidos e neutralizados até o pH 7,0 pela adição de ácido acético glacial e em seguida concentrados em rotaevaporador e precipitados com etanol 96 °GL por 24 h em geladeira. Diferentemente da extração aquosa, os extratos alcalinos passaram por uma diálise em membrana de celulose com limite de exclusão de 12-14 kDa, em sistema aberto contra água corrente por 72 h, para remoção dos sais formados pela neutralização. O material sólido obtido em ambas as extrações foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim, as frações polissacarídicas brutas (Figura 6).

**Figura 6** – Esquema representativo do processo de obtenção de polissacarídeos de *L. strigosus*.



Fonte: O autor.

#### **4.4 Purificação dos polissacarídeos de *L. strigosus***

As frações polissacarídicas liofilizadas foram ressuspendidas em água ultrapura (1:4 m/v) e submetidas a ciclos de gelo e degelo, de acordo com a metodologia descrita por Gorin e Iacomini (1984). Durante o congelamento, a cristalização da fase aquosa comprime significativamente o espaço ocupado pelas cadeias polissacarídicas, e proporciona que elas se agrupem e formem estruturas ordenadas e compactadas, conhecidas como zonas microcristalinas. No descongelamento lento a 4 °C, geralmente é possível observar a formação uma fração solúvel e uma insolúvel (ZHANG; ZHANG; WU, 2013; HU; XU, 2020).

O material solúvel após o gelo/degelo de ambas as frações foi coletado por centrifugação e dialisado em membrana com poros de exclusão de 1000 kDa, durante 72h em sistema aberto contra água corrente, e em seguida sistema fechado contra água ultrapura, também por 72h, coletando-se ao final o material retido na membrana. Assim, foram obtidas as frações finais que foram congeladas e liofilizadas, e posteriormente utilizadas na caracterização e ensaios biológicos, denominadas de LSW para a extração aquosa, e LSK para a extração alcalina.

#### **4.5 Análise química dos polissacarídeos de *L. strigosus***

Após a purificação via gelo/degelo e diálise, as concentrações de carboidratos totais, proteínas totais e ácidos urônicos nas frações polissacarídicas (LSW e LSK) de *L. strigosus* foram determinadas a partir de dosagens colorimétricas. As frações foram solubilizadas em água ultrapura, na concentração de 1 mg/mL, e a partir dessas soluções, foram utilizados volumes correspondentes para cada ensaio, em microtubos de 1,5 mL. Ao final de todos os ensaios, 200 µL da mistura reacional foram transferidos para placas de fundo chato de 96 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) para leitura em espectrofotômetro de multiplaca (BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), no comprimento de onda específico para cada metodologia, sendo os resultados expressos em percentagem relativa ao rendimento total da fração.

##### **4.5.1 Dosagem de carboidratos totais**

A concentração de carboidratos totais foi determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (FOX; ROBYT, 1991), utilizando uma curva-padrão do açúcar D-glucose.

Alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  das amostras (a 1 mg/mL) foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, em triplicata. Em seguida, 40  $\mu\text{L}$  de fenol a 5% (m/v) foram misturados às soluções com o auxílio de pipeta e posteriormente homogeneizados cuidadosamente. Para a obtenção do branco de cada amostra, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de água destilada ao invés de fenol. Por fim, 200  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado foram adicionados, misturando-o da mesma forma. Após o aquecimento das amostras a 100 °C em estufa por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo, a absorvância foi lida a  $\lambda = 490 \text{ nm}$ .

#### 4.5.2 Dosagem de proteínas totais

A determinação de proteínas totais nas amostras foi executada de acordo com o método de Bradford (1976), e calculada a partir de uma curva-padrão utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As leituras de absorvância foram feitas em triplicata a  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

#### 4.5.3 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação da quantidade de ácidos urônicos presente nas frações foi realizada a partir de uma adaptação do método do *m*-hidroxibifenil descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). As amostras (100  $\mu\text{L}$ ) foram pipetadas em microtubos de 1,5 mL em triplicata. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de sulfamato de potássio (4 M, pH 1,6) e os tubos foram agitados em aparelho tipo vórtex.

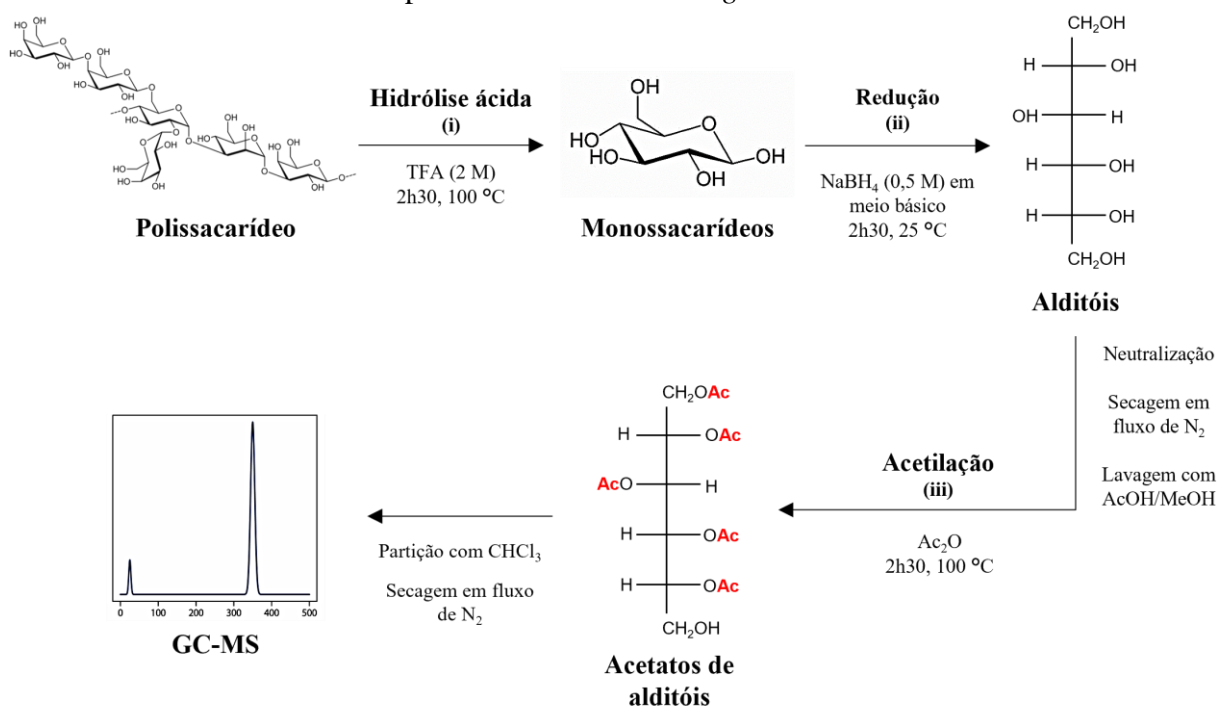
Posteriormente, foi feita a adição de 600  $\mu\text{L}$  de tetraborato de sódio (75 mM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e novamente os tubos foram agitados. Após aquecimento a 100 °C em estufa por 15 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de *m*-hidroxibifenil (0,15 % m/v em NaOH aquoso a 0,5 % m/v), e os tubos novamente foram agitados em vórtex.

Para realização do branco da amostra, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de água destilada ao invés de *m*-hidroxibifenil. Após 10 min de repouso, a absorvância foi lida a  $\lambda = 525 \text{ nm}$ . A concentração em porcentagem de ácidos urônicos foi determinada com base em uma curva padrão de ácido D-glucurônico.

#### 4.5.4 Determinação da composição monossacarídica neutra

A composição monossacarídica neutra das frações foi determinada via cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massas (MS), a partir da hidrólise (i), redução (ii) e acetilação (iii) dos polissacarídeos (Figura 7), sendo analisados na forma de derivados de acetatos de alditóis e expressos em termos percentuais, relativos ao rendimento total de carboidratos das frações (PETTOLINO *et al.*, 2012).

**Figura 7** – Esquemática das etapas para análise da composição monossacarídica dos polissacarídeos de *L. strigosus*.



Fonte: O autor.

Inicialmente, foi realizada a hidrólise ácida total das frações de polissacarídeos, em alíquotas de 100 µL da amostra na concentração de 1 mg/mL, com a adição de 100 µL de ácido trifluoracético (TFA, 2 M), sendo mantidas por 2 h 30 min, a 100 °C em estufa, obtendo-se os monossacarídeos constituintes (Figura 7, passo i).

A redução dos monossacarídeos foi realizada com a adição de 50 µL de boroidreto de sódio em meio básico (NaBH<sub>4</sub> 0,5 M em NH<sub>4</sub>OH 2 M), durante 2 h 30 min em temperatura ambiente (25 °C), obtendo-se os alditóis correspondentes a cada monossacarídeo (Figura 7, passo ii). Após o período de redução, o excesso do agente redutor foi removido (e o meio básico neutralizado) com 20 µL de ácido acético concentrado, seguido de secagem em fluxo de

nitrogênio comercial. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 250 µL de ácido acético (5% v/v) em metanol, e mais duas lavagens com 250 µL de metanol absoluto.

A acetilação dos alditóis foi realizada a partir da adição de 250 µL de anidrido acético, sendo mantida por 2 h 30 min em estufa a 100 °C obtendo-se os acetatos de alditóis (Figura 7, passo iii). Após este período, o excesso de anidrido acético foi removido pela adição de 1 mL de água destilada, seguida de agitação vigorosa e repouso de 10 min. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio às amostras, resultando na separação da solução em duas fases: uma fase clorofórmica (fase inferior - mais densa), onde os acetatos de alditóis formados estavam solubilizados; e uma aquosa (fase superior), contendo resíduos e sais. A fase do clorofórmio foi lavada duas vezes com 1 mL de água destilada e evaporada em fluxo de nitrogênio comercial.

Os acetatos de alditóis obtidos foram analisados em equipamento de cromatografia a gás (GC-2010, Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna utilizada foi SH-Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm) (Shimadzu, Japão), mantida sob aquecimento a 50 °C durante a injeção, e então programada à temperatura inicial de 50 °C, com elevação até 150 °C de 20 em 20 °C, elevação até 200 °C de 5 em 5 °C e mantido por 3 min, elevação até 250 °C de 20 em 20 °C mantido por 3,5 min, totalizando 25 min por corrida. A injeção foi feita no modo *splitless*, injetando-se 0,2 µL de amostra.

Os monossacarídeos foram identificados por comparação com os tempos de retenção e perfil de massas dos acetatos de alditóis padrões de D-ramnose (Rha), L-fucose (Fuc), D-arabinose (Ara), D-xilose (Xyl), D-galactose (Gal), 3-*O*-Metil-D-galactose (3-*O*-Me-Gal), D-manose (Man) e D-glucose (Glc). As porcentagens molares (% mol) de cada monossacarídeo foram calculadas de acordo com a área de cada pico de acetato de alditol, relativo à soma das áreas totais.

## **4.6 Análise estrutural e físico-química dos polissacarídeos de *L. strigosus***

### **4.6.1 Espectroscopia de RMN (<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H e DEPT-135)**

As frações polissacarídicas LSW e LSK foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética de próton (<sup>1</sup>H), de carbono (<sup>13</sup>C) e DEPT-135. Os espectros foram obtidos em equipamento BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) na temperatura de 50 °C. As frações (20 mg) foram solubilizadas em dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm,

sendo inicialmente calibrados com TMS em DMSO-d<sub>6</sub> ( $\delta$  39.53 no <sup>13</sup>C e 2.574 no <sup>1</sup>H). Os espectros foram analisados com o auxílio do software TOPSPIN® (Bruker, Alemanha).

#### **4.6.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS): Diâmetro efetivo e potencial zeta**

O diâmetro efetivo e o potencial zeta ( $\zeta$ ) dos polissacarídeos de *L. strigosus* foram determinados a partir da solubilização de 1 mg/mL das amostras em água ultrapura. As amostras passaram ainda por um filtro de seringa de 0,8  $\mu$ m, imediatamente antes da leitura para eliminar sujeiras, e outras fontes exógenas de luz refratada ou espalhada. Para as leituras de diâmetro das moléculas, utilizou-se uma cubeta de quartzo, e para o potencial zeta, uma cubeta de quartzo com mobilidade eletroforética. As leituras foram realizadas a 25 °C e ângulo de espalhamento fixo de 90°, em um equipamento de DLS *NanoBrook Omniparticle Sizer* (Brookhaven Instruments, Holtsville, Nova York, EUA). A média dos valores foi obtida a partir de dez diferentes repetições (ARAÚJO *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2021).

#### **4.6.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS): Propriedades reológicas**

As propriedades reológicas dos polissacarídeos LSW e LSK de *L. strigosus* foi caracterizado a partir da análise do comportamento de microesferas de poliestireno com diâmetro de 1  $\mu$ m dispersas nas soluções (1 mg/mL). Em um analisador de DLS *NanoBrook Omniparticle*, foi medido o espalhamento de luz pelas microesferas, e com os valores obtidos estimou-se a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ), módulo elástico (de armazenamento) ( $G'$ ) e módulo viscoso (de perda) ( $G''$ ) das soluções de polissacarídeos. As medidas foram feitas na faixa de frequência angular ( $\omega$ ) entre 10 e 10<sup>6</sup> rad/s, inicialmente na temperatura de 25 °C, sendo em seguida aquecidas a 85 °C, e retornadas a 25 °C para verificar a influência da temperatura nas propriedades mencionadas (histerese) (ARAÚJO *et al.*, 2019).

### **4.7 Atividade imunomoduladora dos polissacarídeos de *L. strigosus***

#### **4.7.1 Cultura de células**

Para os experimentos a seguir, foram utilizadas duas linhagens de macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774.1), provenientes da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em placas específicas para cultura (60  $\times$  15 mm), contendo meio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), suplementado com L-glutamina e 10% de soro fetal

bovino (SFB) (Gemini Bioproducts, Woodland, Califórnia, EUA). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até o plaqueamento para realização de cada experimento (ARAÚJO *et al.*, 2017).

#### **4.7.2 Tratamento dos macrófagos com os polissacarídeos**

De modo a caracterizar a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos de *L. strigosus* sobre os macrófagos, as amostras foram diluídas a 1 mg/mL no próprio meio de cultura (DMEM), sem adição de SFB, esterilizadas por filtração em poros de 0,22 µm e adicionadas às culturas celulares de RAW-264.7 e J774.1, que foram pré-cultivadas a 1×10<sup>6</sup> células/poço em placas de 96 poços contendo meio DMEM e 10% de SFB. As placas permaneceram por 24 h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (ARAÚJO *et al.*, 2017).

#### **4.7.3 Dosagem de citocinas**

Após o período de incubação com os polissacarídeos de *L. strigosus* (24 h), o sobrenadante das culturas celulares foi coletado e utilizado na quantificação de citocinas secretadas pelas células, com o auxílio de kits de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para detecção de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e do fator de necrose tumoral α (TNF-α) (PeproTech, Cranbury, Nova Jersey, EUA). O lipopolissacarídeo (LPS) (500 ng/mL, Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo, e as células sem nenhum tratamento (apenas meio DMEM), como controle negativo (ARAÚJO *et al.*, 2017).

#### **4.7.4 Preparo de microesferas cobertas com polissacarídeos de *L. strigosus***

Nas soluções contendo 1,0 mg/mL dos polissacarídeos em meio de cultura DMEM, foi adicionada uma suspensão contendo microesferas de poliestireno, de 3 ± 0,15 µm de diâmetro (Polysciences, Warrington, Pensilvânia, EUA), mantendo-se a mistura *overnight* a 4 °C, permitindo que o polissacarídeo venha a aderir eletrostaticamente à superfície das microesferas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para remoção do sobrenadante contendo partículas de polissacarídeo não-aderido ou em excesso, e ressuspensas novamente no meio DMEM para aplicação nas células, imediatamente antes da manipulação no microscópio de pinças ópticas (ARAÚJO *et al.*, 2017).



#### 4.7.5 Setup de microscopia de pinças ópticas

O sistema utilizado nas análises a seguir consistiu em um microscópio invertido Nikon TE300 (Nikon, Melville, Nova York, EUA), acoplado a uma câmera CCD C2400 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japão) para captura de imagens, e equipado com um sistema de motor de passos (Prior Scientific, Rockland, Maryland, USA), capaz de deslocar a amostra nas direções  $x$  e  $y$  sob velocidade controlada, além de câmara de controle de CO<sub>2</sub> e temperatura, permitindo a realização das medidas com células vivas e em tempo real, em condições controladas (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) (SOARES *et al.*, 2020; POMPEU *et al.*, 2021).

O sistema de pinças ópticas utilizado consistiu em um laser infravermelho Nd-YAG (IPG Photonics, Nova York, EUA), de  $\lambda = 1064$  nm operando a uma potência em torno de 1 W, acoplado ao microscópio Nikon TE300. Uma lente objetiva foi utilizada para focalizar o laser e criar uma armadilha óptica que permitiu capturar e manipular micro objetos ao redor dos macrófagos, com a observação de todo o processo em um sistema de vídeo. Antes de qualquer medida, o sistema foi calibrado de acordo com o protocolo descrito em POMPEU *et al.* (2021).

#### 4.7.6 Adesão dos polissacarídeos de *L. strigosus* à macrófagos em cultura

Os macrófagos J774.1 foram plaqueados antes do experimento, em placas contendo fundo de lamínula de vidro, previamente tratadas com poli-L-lisina (solução aquosa a 0,01% v/v). As células foram mantidas por 24 horas em estufa para permitir a adesão à placa. Em seguida, as microesferas de poliestireno recobertas com os polissacarídeos de *L. strigosus* foram acrescentadas à placa, que foi então posicionada no microscópio de pinças ópticas para realização do experimento (SOARES *et al.*, 2020).

O experimento de adesão foi realizado a partir da metodologia descrita em GUIMARÃES *et al.* (2019). A partir da captura de uma das microesferas dispersas no meio com a pinça óptica, esta foi opticamente manipulada pelo laser, sendo aproximada à superfície de um macrófago aderido à lamínula, e então pressionada por um determinado tempo sobre a sua superfície. Em seguida, o estágio do microscópio foi deslocado na tentativa de destacar a esfera da superfície celular. Diferentes intervalos de tempo de contato das células com as microesferas foram avaliados (10, 30, 60 e 120 s), de modo a caracterizar o tempo necessário para a adesão da microesfera à superfície celular, montando-se uma curva cinética de tempo.

A adesão relativa foi obtida pela razão entre o número de eventos de adesão positivos ( $N$ ) e o número total de tentativas ( $N_0$ ), sendo determinada em experimentos independentes para

cada ponto de tempo e condição experimental. O tempo característico ( $\tau$ ) foi definido como o tempo requerido para ~63% das interações serem positivas em todas as tentativas, e foi determinado para todas as condições experimentais e tempos de contatos a partir do ajuste das curvas cinéticas de acordo com a equação:

$$\frac{N}{N_0} = 1 - e^{-t/\tau} . \quad (1)$$

#### 4.8 Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos experimentos de dosagens químicas, diâmetro efetivo, potencial zeta, dosagem de citocinas foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software* PRISM<sup>®</sup> v. 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados do experimento de adesão celular foram obtidos com auxílio de KaleidaGraph<sup>®</sup> v. 4.5.3 (Synergy Software, Reading, Pensilvânia, EUA).

Os resultados estão apresentados como valores de média e desvio padrão. Diferenças estatísticas entre as amostras foram analisadas pelos testes t de Student (comparação entre duas amostras independentes) ou ANOVA seguido dos pós-testes de Tukey (comparação entre tratamentos distintos) ou Dunnett (comparação com um controle). Para todas as análises estatísticas  $p < 0,05$  foi o valor crítico para determinar diferenças significativas. Maiores informações estão presentes nas legendas de cada figura.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos polissacarídeos de *L. strigosus*

#### 5.1.1 Análises colorimétricas e composição monossacarídica

A partir do cultivo líquido e obtenção da biomassa micelial de *L. strigosus*, foram obtidas as frações de polissacarídeos correspondentes à extração aquosa (LSW) e a alcalina (LSK). As duas frações, objetos deste estudo, foram analisadas quanto ao teor de carboidratos totais, proteínas totais e ácidos urônicos, sendo os resultados apresentados abaixo (Tabela 5).

**Tabela 5** – Rendimento e dosagens colorimétricas das frações polissacarídicas de *L. strigosus*.

	Frações	
	LSW (aquosa)	LSK (alcalina)
Rendimento (%) *	0,5	0,85
Carboidratos totais (%)	60	70
Proteínas totais (%)	1	n.d.
Ácidos urônicos (%)	n.d.	n.d.

\* Percentagem relativa à biomassa micelial:  $\frac{\text{peso seco do polissacarídeo (g)}}{\text{peso seco da biomassa (g)}} \times 100$ ; n.d.: Não detectado.

Como observado, as análises demonstraram a presença de alta quantidade de carboidratos em ambas as frações, e de proteínas em baixa concentração para a fração LSW e não detectadas na fração LSK, após as etapas de purificação dos polissacarídeos. As frações também não apresentaram conteúdo quantificável de ácidos urônicos, e divergiram quanto ao conteúdo de carboidratos totais, inferindo que diferentes processos de extração, como aquoso e alcalino, podem gerar proporções diferentes do conteúdo de carboidratos.

A extração aquosa à quente ocupa o posto de técnica extrativa mais utilizada, sendo a extração alcalina utilizada sucessivamente à extração aquosa para maximizar a extração dos polissacarídeos (LEONG; YANG; CHANG, 2021).

Quando analisadas quanto a sua composição (neutra) de monossacarídeos, sob a forma de acetatos de alditóis, as frações LSW e LSK apresentaram-se constituídas principalmente de Glc, seguidas de percentuais semelhantes de Gal e Man, e quantidades diferentes de Ara. O monossacarídeo Xyl foi encontrado apenas na fração alcalina (Tabela 6).

**Tabela 6** – Composição dos monossacarídeos neutros constituintes dos polissacarídeos de *L. strigosus*.

Frações polissacarídicas	Monossacarídeos neutros (% mol) *				
	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
LSW (aquosa)	1	-	3	4	92
LSK (alcalina)	2	2	3	4	89

\* % mol = Porcentagem molar relativa, calculada a partir da área dos picos de cada monossacarídeo determinados pela análise de GC-MS na forma de acetatos de alditóis.

Os resultados mostram, portanto, que ambas as frações apresentam como monossacarídeo majoritário a Glc, sugerindo que estas possuam cadeias compostas majoritariamente de glucanas, o que condiz com a maioria dos resultados reportados na literatura para polissacarídeos fúngicos. Neste ponto, sugere-se a realização de análise de homogeneidade, a fim de verificar a presença de um ou mais conjuntos de frações presentes nas amostras, com proporções diferenciadas de monossacarídeos.

### 5.1.2 Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

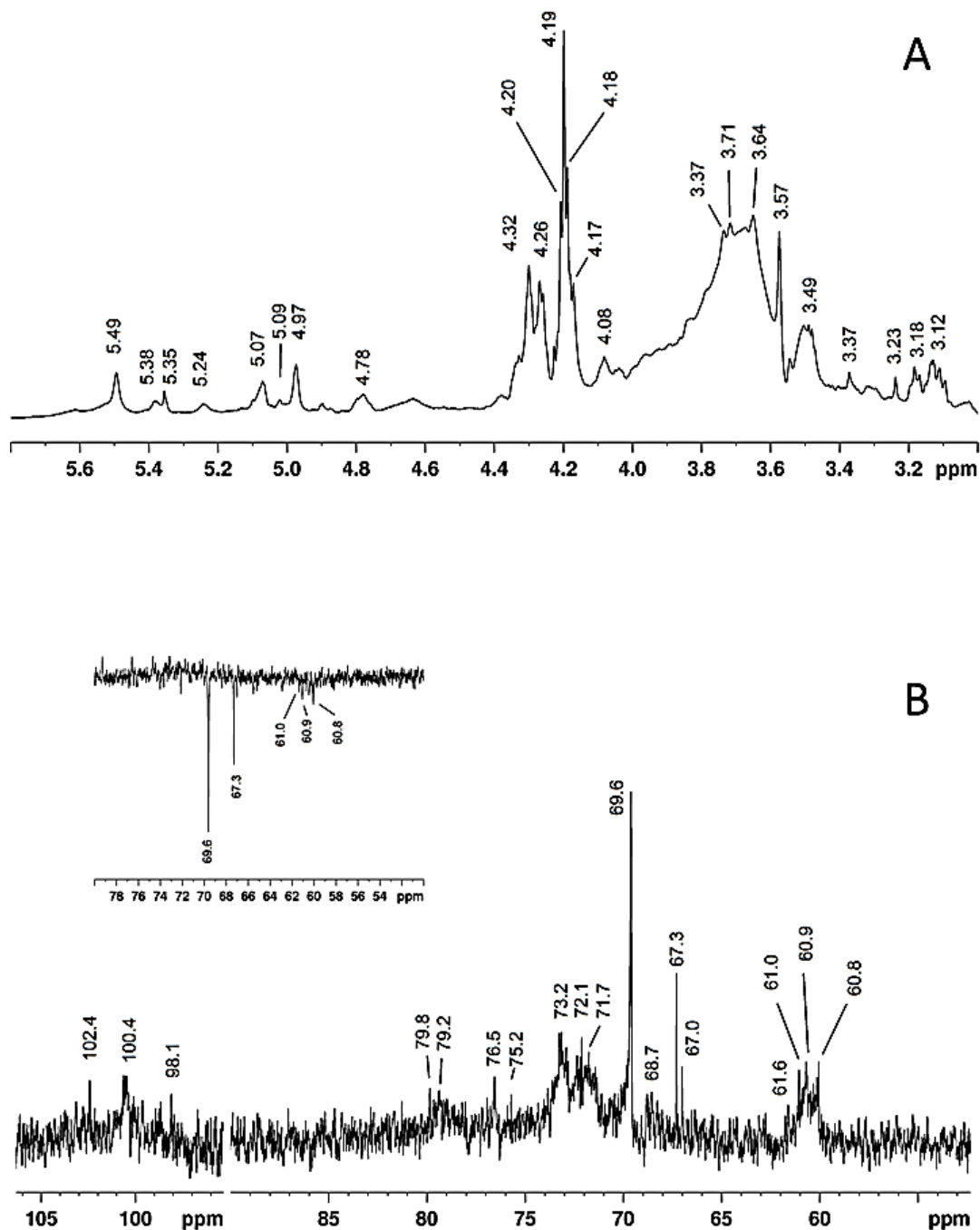
As frações polissacarídicas LSW e LSK também foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN são geralmente utilizados na determinação da configuração das ligações glicosídicas em um polissacarídeo (ZHOU *et al.*, 2016). Os prótons das regiões anoméricas (H-1) dos monossacarídeos constituintes são observados na região compreendida entre 4.5 e 5.5 ppm (AYIMBILA; SIRIWONG; KEAWSOMPONG, 2021), sendo os prótons  $\alpha$ -piranosídicos determinados acima de 5.0 ppm, e os  $\beta$ -piranosídicos abaixo deste valor (AGRAWAL, 1992).

A Figura 8A, relativa ao espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da fração LSW, mostra cinco sinais mais intensos na região de prótons anoméricos ( $\delta$  5.49, 5.35, 5.07, 5.49 e 4.78), o que pode sugerir que esta fração seja composta por quatro tipos de ligações de unidades monossacarídicas do tipo  $\alpha$ , e que o sinal em  $\delta$  4.78 esteja na configuração glicosídica  $\beta$ - (ZHONG *et al.*, 2021). Outros sinais de prótons ocorreram entre  $\delta$  3.3 e  $\delta$  4.4 ppm, sendo atribuídos aos H2-H6 das unidades monossacarídicas (TIAN *et al.*, 2016).

Já o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de LSW apresentou três sinais na região anomérica (C-1):  $\delta$  102.4,  $\delta$  100.4 e  $\delta$  98.1 ppm (Figura 8B). Não foram detectados sinais na região de  $\delta$  170-180 ppm, o que confirma a ausência de ácidos urônicos nas frações. De acordo com a literatura, os

sinais em  $\delta$  100.4 e  $\delta$  102.4 ppm podem ser atribuídos ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-Glcp (WANG *et al.*, 2014; SMIDERLE *et al.*, 2008a), enquanto o sinal em  $\delta$  98.1 pode ser atribuído a unidades de  $\alpha$ -D-Galp (SMIDERLE *et al.*, 2013).

**Figura 8** – Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (A),  $^{13}\text{C}$ -RMN (B) e DEPT-135 (inserto) da fração polissacarídica LSW (aquosa) de *L. strigosus*, obtidos a 50 °C em DMSO- $d_6$ .



Relatos da literatura apontam sinais relativos a unidades de  $\rightarrow 6$ - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  como  $\delta$  102.4 (C-1),  $\delta$  73.2 (C-2),  $\delta$  75.6 (C-3),  $\delta$  69.6 (C-4),  $\delta$  75.6 (C-5) e  $\delta$  60.8 (C-6) (SEN *et al.*, 2013; BI *et al.*, 2009). Ainda, os sinais encontrados em  $\delta$  100.4 e 79.8 ppm são correlacionados,

respectivamente a ocorrência de C-1 e C-4 substituído de unidades  $\rightarrow 4$ - $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ), presentes em polissacarídeos de reserva como o glicogênio comumente encontrados em cogumelos (LIU *et al.*, 2021; SOVRANI *et al.*, 2017). As unidades de  $\rightarrow 6$ - $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ) foram assinaladas de acordo com a literatura como  $\delta$  98.1 (C-1),  $\delta$  79.8 (C-2),  $\delta$  68.7 (C-4),  $\delta$  69.6 (C-5) e  $\delta$  67.0 (C-6 ligado) (SMIDERLE *et al.*, 2008b; SEN *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2016; SOVRANI *et al.*, 2017).

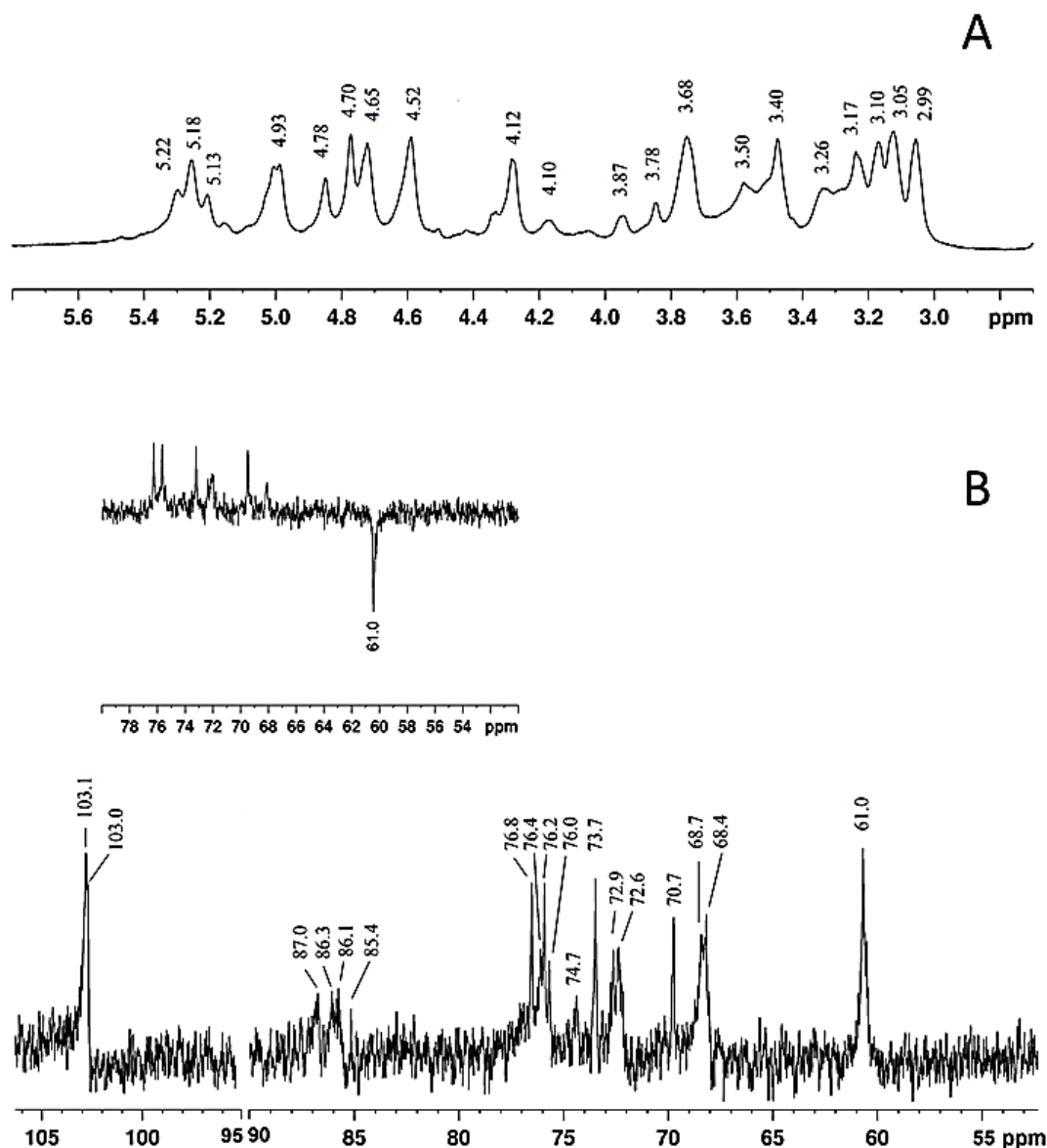
Os sinais adicionais em  $\delta$  69.6 e  $\delta$  67.3, correspondem ao -CH<sub>2</sub> das unidades monossacarídicas, conforme confirmado pela inversão do sinal no experimento de <sup>13</sup>C-RMN-DEPT (inserto da Figura 8B). Neste experimento, outros dois sinais ( $\delta$  61.6 e  $\delta$  61.0) apresentaram inversão, o que indica -CH<sub>2</sub> de outras unidades monossacarídicas livres, de hexoses (SEN *et al.*, 2013; CARBONERO *et al.*, 2008; SMIDERLE *et al.*, 2008a).

Estes dados sugerem a presença majoritária de uma glucana nesta fração, apresentando unidades em configuração  $\alpha$  e  $\beta$ . Extrações aquosas à quente são comumente utilizadas para obtenção de frações polissacarídicas de basidiomicetos, que geralmente se apresentam como  $\beta$ -glucanas com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), as mais estudadas, embora algumas glucanas também já tenham sido descritas com anomericidade  $\alpha$ - (ZHANG; ZHANG; CHENG, 1999).

Para fungos do gênero *Lentinus*, são relatadas diversas estruturas para os polissacarídeos obtidos a partir dessa modalidade extrativa, incluindo frações com alto conteúdo de Xyl, Man e Gal, que também foram unidades monossacarídicas detectadas por GC-MS neste estudo, mesmo que em menor proporção (SEN *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2018). Alguns exemplos citados para este gênero descrevem cadeias que consistem em unidades principais de (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galp, com ramificações em O-2 de  $\beta$ -Manp, e em O-4 de  $\beta$ -D-Glcp, ou também frações cuja estrutura é composta por unidades Glcp ligadas por ligações (1 $\rightarrow$ 6), (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 3), unidades de  $\alpha$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 6)-ligados, e unidades de  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 3,6)- e (1 $\rightarrow$ 2,4)-ligados (JEFF *et al.*, 2013; SEN *et al.*, 2013).

A Figura 9 apresenta os espectros de RMN obtidos a partir da fração LSK. Condições de extração em meio aquoso utilizando bases fortes e temperaturas elevadas levam à ruptura da estrutura da parede celular e liberação de diferentes polissacarídeos. Relatos da literatura descrevem algumas frações obtidas nessas condições, menções a (1 $\rightarrow$ 3)-glucanas, com ou sem ramificações em 1 $\rightarrow$ 6, assim como observado no presente trabalho (ZHANG; ZHANG; CHENG, 1999).

**Figura 9** – Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (A),  $^{13}\text{C}$ -RMN (B) e DEPT-135 (inserto) da fração polissacarídica LSK (alcalina) de *L. strigosus*, obtidos a 50 °C em DMSO- $d_6$ .



De acordo com os valores referência observados na literatura, os sinais dos picos compreendidos entre  $\delta$  5.5 e 4.5 ( $^1\text{H}$ ) e de  $\delta$  95 a  $\delta$  105 ( $^{13}\text{C}$ ) são característicos da região anomérica (C-1) de polissacarídeos (LIU *et al.*, 2021). Na região anomérica do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da fração LSK pode-se anotar oito sinais:  $\delta$  5.22, 5.18, 5.13, 4.93, 4.78, 4.70, 4.65 e 4.52 ppm (Figura 9A).

Os três primeiros sinais, assinalados de acordo com a literatura, indicam prótons com anomericidade  $\alpha$ , e os demais são sinais de anômeros  $\beta$ . Os sinais compreendidos entre  $\delta$  3.00 e  $\delta$  4.50 indicam prótons de H-2 a H-6. Já no espectro de  $^{13}\text{C}$ , a fração LSK apresentou sinais na região anomérica correspondentes a unidades de  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  em  $\delta$  103.0, e a unidades de  $\rightarrow 3,6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  em  $\delta$  103.1 (Figura 9B) (YOSHIOKA *et al.*, 1985; ZHANG;

ZHANG; CHEN, 1999; CARBONERO *et al.*, 2006; CARBONERO *et al.*, 2012; AYIMBILA; SIRIWONG; KEAWSOMPONG, 2021).

O assinalamento proposto para o C-1 da fração LSK, correspondente aos terminais não redutores  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ), foi de  $\delta$  103.0, inferindo que este sinal esteja sobreposto ao próprio  $\delta$  103.0 referente a  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  (Figura 9B). Os assinalamentos sugeridos para C-3 substituído e C-6 livre de unidades  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  podem ser observados em  $\delta$  86.3 e  $\delta$  61.0 ppm (JEFF *et al.*, 2013; PESSOA, 2016; LIU *et al.*, 2021). O sinal  $\delta$  61.0 ppm, correspondente a CH<sub>2</sub> livre na posição C-6 de  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ , é observado pela inversão do mesmo no experimento de DEPT-135, o que confirma a ausência da ligação 1 $\rightarrow$ 6 (Figura 9B - inserto).

Já para C2-C6 de unidades de  $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ , foram sugeridos os deslocamentos  $\delta$  72.6,  $\delta$  86.1,  $\delta$  68.7,  $\delta$  74.7 e  $\delta$  68.4 ppm. Especificamente, o sinal em  $\delta$  86.1 apresenta o deslocamento de maior ppm entre estes, uma vez que nesta unidade, C-3 encontra-se substituído (ligado) (YOSHIOKA *et al.*, 1985; ZHANG; ZHANG; CHENG, 1999; GRACHER, 2005, CARBONERO *et al.*, 2006; CARBONERO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2014; PESSOA, 2016; ZHONG *et al.*, 2021).

Embora a fração LSK se constitua de Gal, Man, Ara e Xyl, além dos 89% de Glc, estas unidades não foram assinaladas, possivelmente por se encontrarem em sobreposição de sinais. Além disso, baixas concentrações desses monossacarídeos são outro fator pelo qual seus deslocamentos não pudessem ser anotados e por essa razão, análises de ligação através de ensaios de metilação podem auxiliar a elucidar completamente a sequência das ligações entre as unidades.

### 5.1.3 Diâmetro efetivo por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) mede a intensidade da luz espalhada por partículas em solução ou suspensão, sendo uma técnica utilizada para caracterizar o tamanho de vários tipos de partículas, incluindo proteínas, carboidratos, micelas e nanopartículas. Como partículas em suspensão descrevem um movimento Browniano (movimento aleatório de partículas suspensas em um fluido), o feixe de laser que incide sobre elas é espalhado quando se choca com a partícula em movimento (CORDERO *et al.*, 2013; YEAP *et al.*, 2018).



Através da equação de Stokes-Einstein (definida abaixo), as variações na intensidade da luz espalhada são correlacionadas a um coeficiente de difusão, que permite determinar o tamanho relativo da partícula, sendo que quanto maior for o seu tamanho, mais lenta será sua difusão (CORDERO *et al.*, 2013; YEAP *et al.*, 2018):

$$D_h = \frac{k_B T}{3 \pi \eta D_t} \quad (2)$$

Onde:

$D_h$  é o diâmetro hidrodinâmico (tamanho da partícula);

$D_t$  é o coeficiente de difusão translacional;

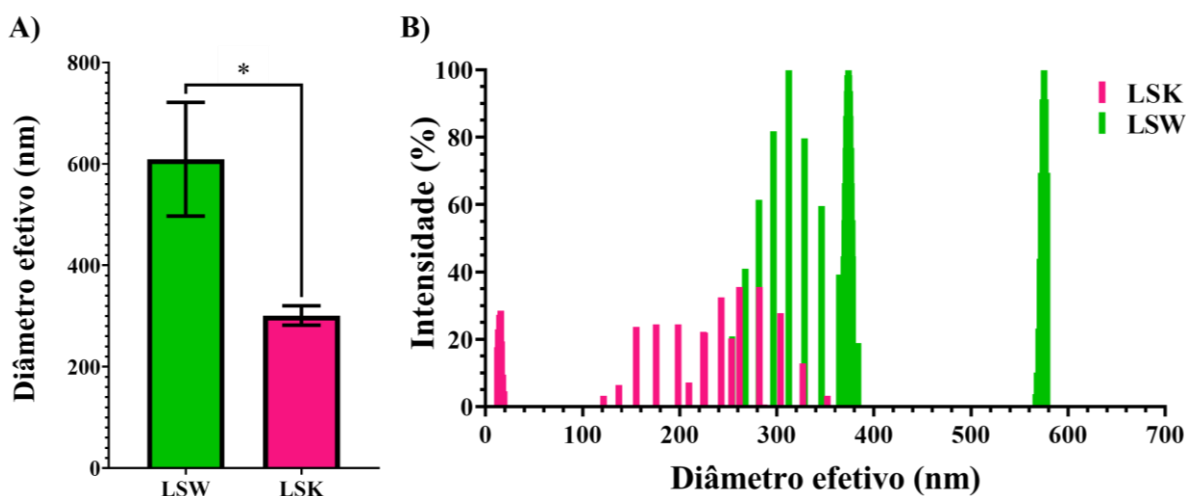
$k_B$  é a constante de Boltzmann;

$T$  é a temperatura do meio;

$\eta$  é a viscosidade do meio.

Os polissacarídeos extraídos da biomassa micelial de *L. strigosus* foram avaliados quanto ao seu tamanho, em termos de seu diâmetro efetivo (nm), por DLS, na concentração de 1 mg/mL em água. Na Figura 10A, estão representados graficamente os valores médios do diâmetro das partículas presentes nas duas frações polissacarídicas, LSW e LSK. Na Figura 10B, está representada a distribuição de tamanho das diferentes partículas de polissacarídeo detectadas na amostra, em razão da intensidade da luz espalhada por elas.

**Figura 10** – Diâmetro efetivo (nm) das partículas de polissacarídeos de *L. strigosus* em solução. (A) Valores médios do tamanho das partículas. (B) Distribuição dos valores de diâmetro em relação à intensidade da luz espalhada (0-100%).



LSW: Fração aquosa (verde). LSK: Fração alcalina (cor-de-rosa). Asteriscos: diferenças significativas entre as amostras pelo teste *t* de Student (\*:  $p \leq 0,05$ ). Valores médios obtidos a partir de dez repetições de medidas ( $n = 10$ ). Barras de erro: desvio padrão (SD).

As medidas mostram que os polissacarídeos contidos em ambas as frações, ao serem solubilizados em água, formam partículas de grande tamanho (considerando a escala nanométrica), e de diâmetros estatisticamente distintos ( $p = 0,0266$ ). A média do diâmetro das partículas de polissacarídeos contidos na fração LSW (verde nos gráficos) resultou em  $609,4 \pm 112,1$  nm, enquanto na fração LSK (cor-de-rosa), o resultado foi de  $301,2 \pm 19,1$  nm (Figura 10A).

Ademais, ainda podem ser observados alguns grupos de partículas com tamanhos diferentes, distribuídas ao longo do eixo  $x$  da Figura 10B. Observa-se na fração LSW uma dispersão de partículas com dimensões entre 250 e 600 nm, sendo detectadas com maior intensidade as populações em torno de 400 e 600 nm. Enquanto na fração LSK, apesar da menor intensidade com que os polissacarídeos foram detectados, é possível observar uma ampla distribuição de tamanhos até 350 nm (Figura 10B).

Além do tamanho das partículas, outro parâmetro importante a ser analisado é o índice de polidispersão (IPD), que descreve a distribuição das partículas com tamanhos diferentes na amostra. Quanto maior o número de populações com diferentes tamanhos, maior é o IPD. O valor de IPD varia de 0 a 1, onde as amostras com IPD abaixo de 0,1 implicam em partículas monodispersas (de maior homogeneidade), enquanto valores acima disso representam distribuições polidispersas, sendo os valores a partir de 0,7 representativos de amostras com ampla distribuição de tamanhos de partículas. O IPD é obtido a partir da divisão da raiz quadrada do desvio padrão pela média do diâmetro das partículas (MUDALIGE *et al.*, 2019; RAVAL, 2019).

Dessa forma, a fração LSW apresentou IPD de 0,03, enquanto a fração alcalina LSK um índice de 0,02, demonstrando que ambas as amostras são monodispersas, ou seja, possuem certa homogeneidade no tamanho das partículas dispersas em solução, sendo a fração LSK a de distribuição mais homogênea. O tamanho de partícula e sua polidispersão são sugeridos como indicadores da estabilidade, uniformidade e do grau de atividade biológica, visto que as células respondem de forma distinta ao reconhecimento de moléculas com dimensões e formatos diferentes. Apesar de isoladamente não fornecerem informações suficientes sobre a estrutura e conformação de um polissacarídeo, esses dados são cruciais no conjunto de informações que levam à caracterização completa dessas moléculas (DEVI *et al.*, 2013; JIA *et al.*, 2021).

De modo geral, os polissacarídeos apresentam diâmetros efetivos bastante variados, visto que em solução tendem a se auto agregar de diferentes formas, assumindo a morfologia de

fibrilas, fibras, hélices, esferas, entre outros, com tamanhos que variam de acordo com sua conformação. Além de modificar o diâmetro do polissacarídeo, a conformação tridimensional ou agregação pode também impactar sua atividade biológica. Por exemplo, o lentinano (polissacarídeo extraído de *L. edodes*) com conformação tripla-hélice apresenta alta atividade antitumoral, enquanto a cadeia única (linear) deste polissacarídeo mostra pouca atividade (ZHANG *et al.*, 2011).

Em estudos sobre polissacarídeos extraídos de cogumelos, o tamanho das partículas é bastante diversificado. É possível verificar exemplos de heteroglucanas com diâmetro efetivo desde 42 nm (IPD = 0,206), isoladas do corpo de frutificação do cogumelo *Grifola frondosa* (LI *et al.*, 2017), passando por 53,7 nm (IPD = 0,332) quando isoladas do basidioma de *Pleurotus ostreatus* (ZHANG *et al.*, 2020). Já da biomassa micelial desta última espécie, foi isolada uma heteroglucana de 105,2 nm e IPD de 0,231, a qual exibiu ativação de macrófagos murinos e atividade antitumoral (DEVI *et al.*, 2013). A partir da espécie *Lignosus rhinocerotis*, foi isolada uma  $\beta$ -D-glucana formadora de agregados esféricos com diâmetro efetivo entre 100 e 120 nm, os quais reduziram de tamanho para cerca de 90 nm após serem dissociados por tratamento com ultrassonicação (HU *et al.*, 2021).

#### 5.1.4 Potencial zeta

Quando uma partícula é dispersa em uma solução, uma camada de solvente/dispersante se adsorve em sua superfície. Assim, o potencial zeta ( $\zeta$ ), também conhecido como potencial eletrocinético, é uma medida de carga elétrica, ou seja, da diferença de potencial (em milivolts, mV) entre a superfície de partículas se movendo sob um campo elétrico, e as camadas de solvente/dispersante adsorvidas ao seu redor, o que também pode ser descrito como a carga elétrica da interface entre a partícula e o fluido (BHATTACHARJEE, 2016). Utilizado largamente na caracterização de nanopartículas e outros sistemas coloides,  $\zeta$  é derivado da equação:

$$\zeta = \frac{4 \pi \eta M}{D} \quad (3)$$

Onde:

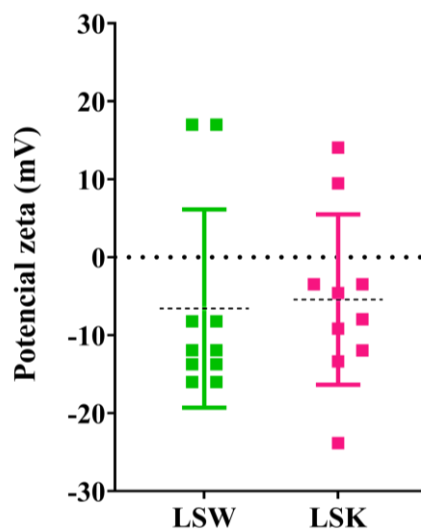
$D$  é a constante dielétrica do meio;

$\eta$  é a viscosidade do meio;

$M$  é a mobilidade eletroforética da partícula no meio.

As frações polissacarídicas extraídas da biomassa micelial de *L. strigosus* foram avaliadas quanto ao seu potencial zeta por DLS, a partir da medida da mobilidade eletroforética das partículas, na concentração de 1 mg/mL em água ultrapura. Observaram-se valores médios muito próximos entre as duas amostras, sendo obtido o valor de  $-6,58 \pm 12,71$  mV para a fração LSW e  $-5,43 \pm 10,93$  mV para a fração LSK, valores estes que não diferiram estatisticamente ( $p = 0,8307 > 0,05$ ). Ainda assim, é possível afirmar que ambas as frações polissacarídicas mostraram densidades elétricas superficiais próximas da neutralidade, porém levemente negativas (Figura 11).

**Figura 11** – Potencial zeta (mV) das partículas de polissacarídeos de *L. strigosus* em solução.



Valores médios obtidos a partir de dez repetições de medidas ( $n = 10$ ). Barras de erro: desvio padrão (SD).

Como a medida do  $\zeta$  indica o potencial de superfície das partículas, medindo forças eletrostáticas repulsivas e atrativas, isso pode ser influenciado por vários fatores que alteram a interface com o meio dispersante, como a dissociação de grupos funcionais da superfície da molécula, ou adsorção de espécies iônicas que estão presentes no meio aquoso (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MIRHOSSEINI *et al.*, 2008).

Portanto, alguns fatores que podem ser levados em consideração neste experimento, para uma caracterização mais aprofundada do  $\zeta$  são o pH, força iônica e a própria concentração da amostra, fatores estes que se mostram especialmente interessantes no estudo de polissacarídeos (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011).

Geralmente, as macromoléculas de ocorrência natural (proteínas, polissacarídeos, lipídeos etc.) exibem carga superficial negativa. No caso de polissacarídeos, a presença dessas cargas geralmente está associada a presença de resíduos de monossacarídeos ionizáveis, como

os ácidos urônicos, ou também à presença de grandes quantidades de hidroxilas e carboxilas, onde todos contribuem para um  $\zeta$  negativo (PATHAK *et al.*, 2015; BHATTACHARJEE, 2016).

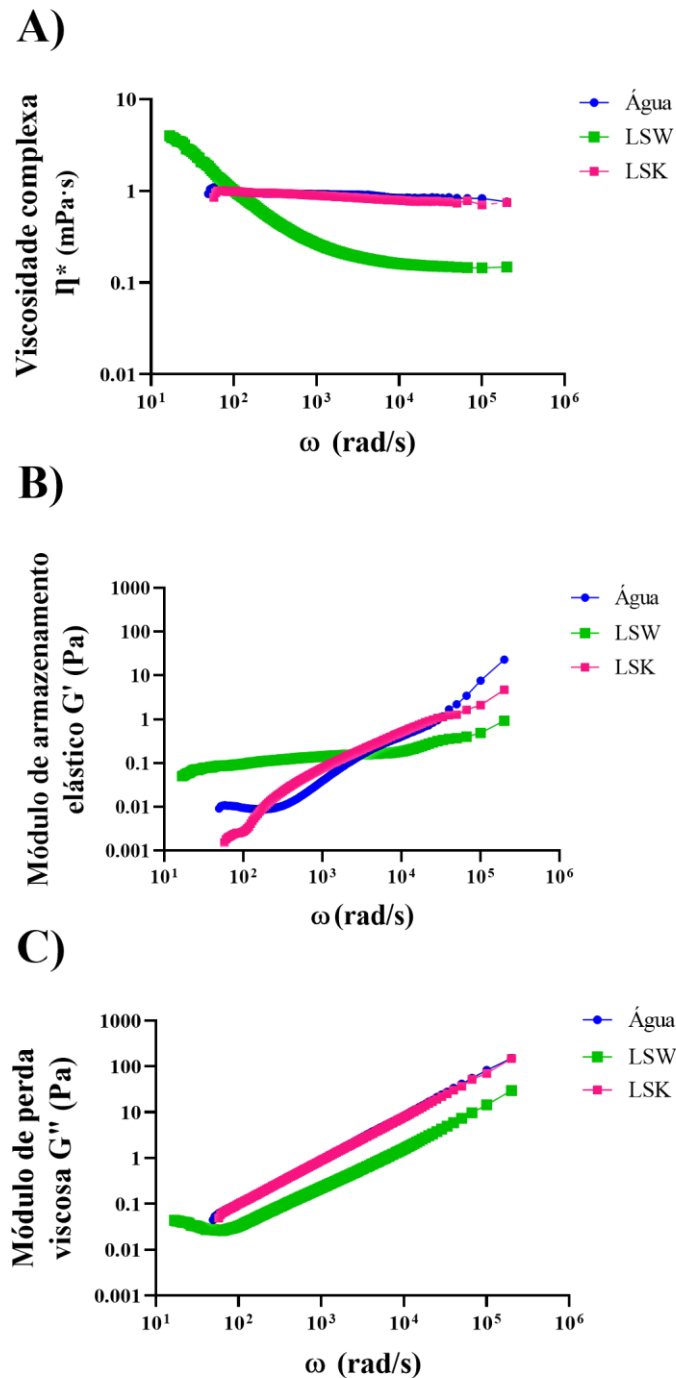
Como nas frações polissacarídicas de *L. strigosus* não foi detectada a presença dos ácidos urônicos, ou de outros monossacarídeos ácidos, o que levaria o seu  $\zeta$  a um patamar mais negativo e afastado do ponto de carga zero, o  $\zeta$  levemente negativo verificado pode estar relacionado a fatores como os grupos hidroxila que são observados em açúcares como Glc, Gal, Man e Ara.

### 5.1.5 Propriedades reológicas dos polissacarídeos

A caracterização reológica das frações polissacarídicas de *L. strigosus* relacionou o seu comportamento em termos de elasticidade e viscosidade. Para polissacarídeos, experimentos de reologia podem ser aplicados para caracterizar não somente suas propriedades viscosas (fluidez) e elásticas (resistência à aplicação de forças), mas também suas propriedades de formação de gel, permitindo a sua exploração adequada para diferentes fins de acordo com suas características (GRESHAM, 2008; EVAGELIOU, 2020).

Inicialmente, as medidas de reologia dos polissacarídeos foram realizadas por DLS, utilizando microesferas de poliestireno dispersas nas soluções LSW e LSK a 1 mg/mL e 25 °C, para determinar a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) e os módulos elástico (de armazenamento) ( $G'$ ) e viscoso (de perda) ( $G''$ ) das soluções. Estes módulos revelam o caráter sólido (elasticidade) ou líquido (fluidez) de uma amostra, respectivamente. Os resultados são representados graficamente em função da frequência angular ( $\omega$ ) aplicada no experimento oscilatório, que variou entre 10 e  $10^6$  rad/s, e em comparativo com a água, dispersante no qual as soluções foram preparadas (Figura 12).

**Figura 12** – Propriedades reológicas das frações polissacarídicas obtidas de *L. strigosus*. (A): Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ). (B): Módulo de armazenamento elástico ( $G'$ ). (C): Módulo de perda viscosa ( $G''$ ).



A viscosidade é uma propriedade reológica que relaciona o estresse mecânico e descreve comportamentos viscosos, definida como a resistência de um fluido ao escoamento ou à deformação (GRESHAM, 2008). No que diz respeito à  $\eta^*$  dos polissacarídeos de *L. strigosus*, foram observados comportamentos diferentes entre as duas frações polissacarídicas LSW e LSK solubilizadas em água a 1 mg/mL e analisadas a 25 °C (Figura 12A).

Na fração LSW, observou-se um comportamento dependente da frequência angular, onde a viscosidade da solução diminui de acordo com o aumento da oscilação aplicada. Em frequências mais baixas ( $< 10^2$  rad/s), a solução apresenta valores de viscosidade altos, superiores à água, enquanto nas frequências maiores, LSW apresenta viscosidade mais baixa, indicando que a oscilação mais forte causa uma mudança, assim sugerindo que esta estrutura polimérica pode ser menos resistente ao estresse. Enquanto isso, na fração LSK, a viscosidade é constante, e não é afetada pela variação de frequência, se mantendo bastante próxima da água em toda a faixa oscilatória analisada (Figura 12A).

Nas Figuras 12B e 12C estão representados graficamente  $G'$  e  $G''$  da água e das duas frações polissacarídicas de *L. strigosus*.  $G'$  é uma medida da energia armazenada (recuperável) no material durante a deformação, ou seja, a “rigidez” do material, atribuída a sua capacidade de deformação elástica. Já o  $G''$  é uma medida da energia dissipada (não recuperável) pelo material sob deformação, ou seja, a “fluidez” do material (HILL, 2000).

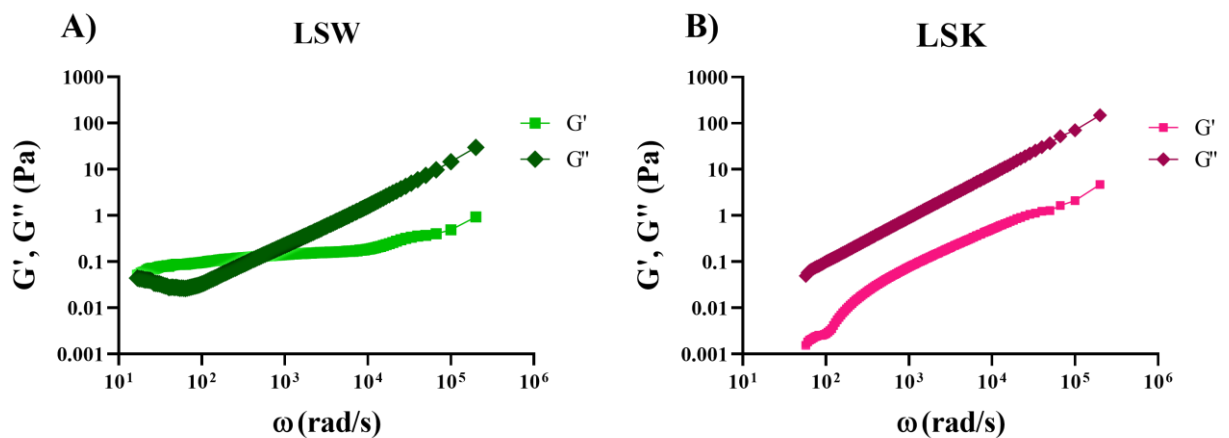
Observa-se que, em ambas as frações, essas duas propriedades reológicas variam de acordo com a frequência de oscilação, aumentando proporcionalmente (Figura 12B e C). No caso de  $G'$ , referente a capacidade de armazenamento de energia elástica, ou apenas a elasticidade do material, é nítido que em frequências mais baixas, a fração LSW se sobressai em relação a LSK e a água (Figura 12B). Entretanto, acompanhando a curva, nota-se uma interseção dos pontos de  $G'$  entre as frequências de  $10^3$  a  $10^4$ , valores a partir dos quais a fração LSW não resiste e perde parte da sua elasticidade, se tornando de menor elasticidade que as demais amostras (Figura 12B).

Já a partir da análise de  $G''$ , referente a dissipação de energia viscosa, ou a fluidez do material, observa-se um comportamento semelhante nas três amostras, aumentando proporcionalmente com o aumento da frequência angular. Ainda pode-se observar que os valores de  $G''$  de LSK se mantêm acima dos de LSW em todas as frequências aplicadas, indicando uma maior fluidez desse material, que possui um comportamento mais líquido do que sólido (Figura 12C).

Ambas as frações polissacarídicas apresentaram um efeito comumente observado em polímeros, a viscoelasticidade, que acontece quando um material apresenta ao mesmo tempo propriedades de sólidos e de líquidos, em resposta a forças ou deformações. Dessa forma, o dito “comportamento viscoelástico” pode ser avaliado verificando-se como os módulos  $G'$  e  $G''$  se comportam frente à uma deformação, como por exemplo a variação da frequência angular de um

experimento. No caso de polissacarídeos, tais medidas podem auxiliar a determinar se o sistema possui característica de gel ( $G' > G''$ ), ou de líquido fluido ( $G'' > G'$ ) (EVAGELIOU, 2020). A Figura 13 mostra em comparativo o  $G'$  e  $G''$  das frações polissacarídicas LSW e LSK, em função da frequência angular aplicada sobre elas.

**Figura 13** – Curvas de módulo de armazenamento elástico ( $G'$ ) e perda viscosa ( $G''$ ) das frações polissacarídicas de *L. strigosus*. (A): Fração aquosa (LSW, cor verde). (B): Fração alcalina (LSK, cor-de-rosa).



A fração LSW apresentou tanto propriedades sólidas quanto líquidas, de acordo com a frequência angular aplicada (Figura 13A). Os módulos de armazenamento e perda de LSW se intersectam a uma frequência entre  $10^2$  e  $10^3$  rad/s. Neste ponto, onde  $G'$  é igual a  $G''$ , conhecido como ponto de gel, é a faixa de frequência requerida para induzir a transição de um sólido a um estado fluídico. Abaixo disso, o material mostra um comportamento de gel ( $G' > G''$ ), onde o componente elástico ( $G'$ ) predomina. Em contrapartida, em frequências oscilatórias maiores,  $G''$  é maior que  $G'$ , indicando um caráter mais líquido, onde a fluidez predomina ( $G''$ ). Já para a fração LSK,  $G''$  é sempre maior que  $G'$  em toda a faixa de frequência, indicando que esta fração não possui comportamento de gel, e sim de líquido viscoso (Figura 13B).

No caso de um gel verdadeiro,  $G'$  é sempre maior que  $G''$ , independente da frequência. Contudo, para polissacarídeos, uma outra categoria existente é a de “gel fraco”, onde o espectro reológico da amostra é similar ao de um gel ( $G' > G''$ ), porém ambos os módulos exibem dependência em relação à frequência, se tornando fluido ao ser aplicado um estresse suficiente (EVAGELIOU, 2020).



Dessa forma, LSW pode ser caracterizado como um sistema gel fraco, pois apesar de possuir a característica de formação de gel, essa pode ser perdida com um estresse acima de sua resistência, se tornando um líquido (Figura 13A).

Já a fração LSK não apresentou comportamento característico de gel, pois os valores de  $G''$  foram maiores que  $G'$  em todas as frequências aplicadas, indicando que este polímero se comporta melhor como um fluido em solução, independente da magnitude do estresse aplicado sobre ele, aumentando sua fluidez (i.e., perda de viscosidade) proporcionalmente (Figura 13B).

### 5.1.6 Histerese dos polissacarídeos de *L. strigosus* em relação à temperatura

A histerese é a propriedade que um objeto, sistema ou material possui de manter suas características mesmo que não receba mais a ação que foi necessária para a sua formação. Ou seja, é a tendência de um sistema de conservar suas propriedades na ausência do estímulo que as gerou, ou ainda, é a capacidade de preservar uma deformação efetuada por um estímulo, mesmo após o seu fim (HILL, 2000; PUISTO *et al.*, 2015).

A variação da temperatura é particularmente conhecida como um dos principais fatores que podem afetar a estrutura e propriedades reológicas de um sistema hidrocoloide (como um polissacarídeo disperso em água), afetando as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas no sistema. De modo a verificar a estabilidade das frações polissacarídicas frente a um aumento de temperatura, foi realizado um experimento de histerese das propriedades reológicas de LSW e LSK a 1 mg/mL, a partir das medidas de  $\eta^*$ ,  $G'$  e  $G''$  antes e após o aquecimento a 85 °C, verificando até que ponto as propriedades se modificavam à altas temperaturas, e se retornariam ao seu estado original ou sofreriam alterações irreversíveis (histerese). Para cada amostra, as três propriedades foram medidas em três pontos: 25 °C ( $t = 0$  min), após 10 min a 85 °C ( $t = 10$  min), e após o retorno a 25 °C por 10 min ( $t = 20$  min) (Figura 14).

De modo geral, os resultados sugerem que os polissacarídeos de *L. strigosus* são capazes de suportar altas temperaturas sem apresentar mudanças significativas na sua reologia, porém, para cada propriedade reológica e amostra avaliada, foram observados padrões de histerese levemente diferentes. No caso de  $\eta^*$ , não foi observado um aumento ou diminuição drástica a 85 °C, e houve um retorno quase completo à condição original após o fim do aquecimento (Figura 14A e B).

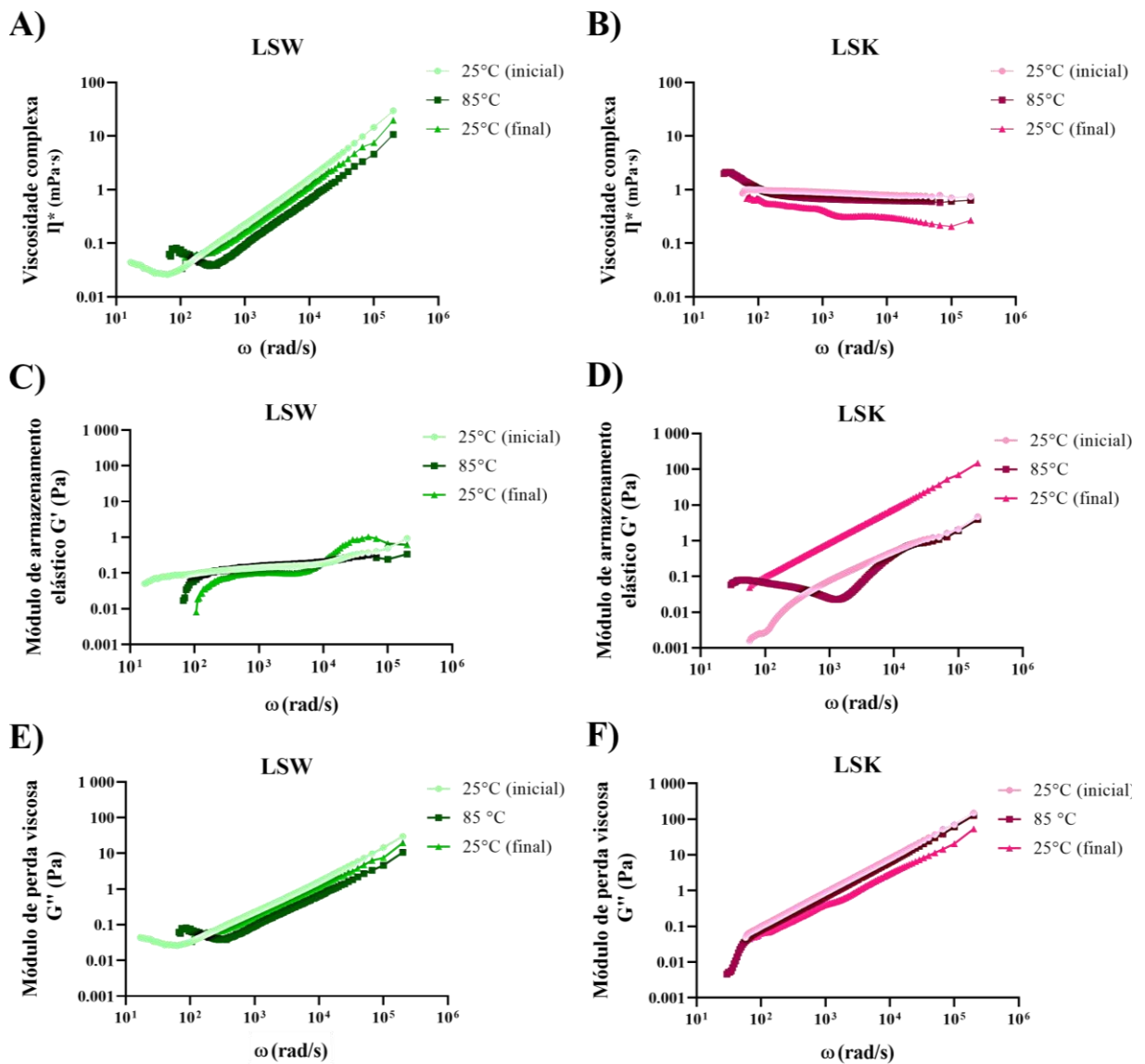
A viscosidade da fração LSW apresentou uma leve diminuição com o aumento da temperatura, porém retornou a um estado próximo do original após o resfriamento, não apresentando histerese térmica (Figura 14A).

Na fração LSK, por sua vez, a viscosidade se manteve semelhante nos pontos  $t = 0$  e  $t = 10$ , porém após o  $t = 20$  min, não foi observado um retorno completo à configuração original, e sim uma leve diminuição da viscosidade, sendo que  $\eta^*$  novamente se manteve estável em relação a variação da frequência angular (Figura 14B). Neste caso de histerese térmica, é possível que as cadeias polissacarídicas tenham sofrido mudança devido ao aumento na temperatura, tornando, por exemplo, as ligações hidrogênio entre elas mais fracas.

No que diz respeito ao  $G'$  das soluções, foi observado que na fração LSW esta propriedade também é pouco alterada a  $85\text{ }^\circ\text{C}$ , e o polissacarídeo apresenta retorno a um patamar próximo do original ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) com o fim do aquecimento, estando as alterações sujeitas aos valores de frequência (Figura 14C). Na fração LSK, entretanto, o comportamento observado é diferente, onde esta propriedade não retorna ao original, exibindo histerese e mudando irreversivelmente (Figura 14D).

Quanto ao  $G''$ , o que se observa é uma certa estabilidade em ambas as amostras. A fração LSW apresentou um  $G''$  mais baixo a  $85\text{ }^\circ\text{C}$  do que a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  (inicial), porém após o fim do aquecimento, a amostra teve um  $G''$  próximo do original (Figura 14E). Enquanto isso, a fração LSK apresentou proximidade dos valores de  $G''$  entre  $25$  e  $85\text{ }^\circ\text{C}$ , não apresentando histerese térmica em frequências baixas, porém com algumas alterações observadas em frequências mais altas (Figura 14F).

**Figura 14** – Histerese das propriedades reológicas dos polissacarídeos de *L. strigosus* em função da variação de temperatura (25-85 °C). (A, B): Viscosidade complexa ( $\eta^*$ ). (C, D): Módulo de armazenamento elástico ( $G'$ ). (E, F): Módulo de perda viscosa ( $G''$ ).



## 5.2 Atividade imunomoduladora dos polissacarídeos de *L. strigosus*

### 5.2.1 Quantificação de citocinas liberadas por macrófagos

Um dos principais efeitos imunomoduladores de polissacarídeos ocorre pela sua capacidade de regular a produção de citocinas, pequenas proteínas solúveis que atuam como mediadores de respostas imunes, ou moléculas de sinalização que regem o desenvolvimento, diferenciação e regulação das células do sistema imunológico. Citocinas são extremamente potentes e específicas, agindo em concentrações de  $10^{-9}$  (pico) a  $10^{-15}$  (femto)gramas, desencadeando reações em cascata, onde uma citocina pode induzir a secreção de outras citocinas, produzindo efeitos autócrinos sobre a própria célula que a liberou, ação parácrina sobre

as células vizinhas, ou exócrina sobre células distantes. As células ativadas pela ação das citocinas podem então atacar células mortas e patógenos intracelulares, além de migrar e produzir outras citocinas que serão citotóxicas para células cancerosas e microrganismos circulantes (VIEIRA *et al.*, 2001; GUGGENHEIM; WRIGHT; ZWICKEY, 2014).

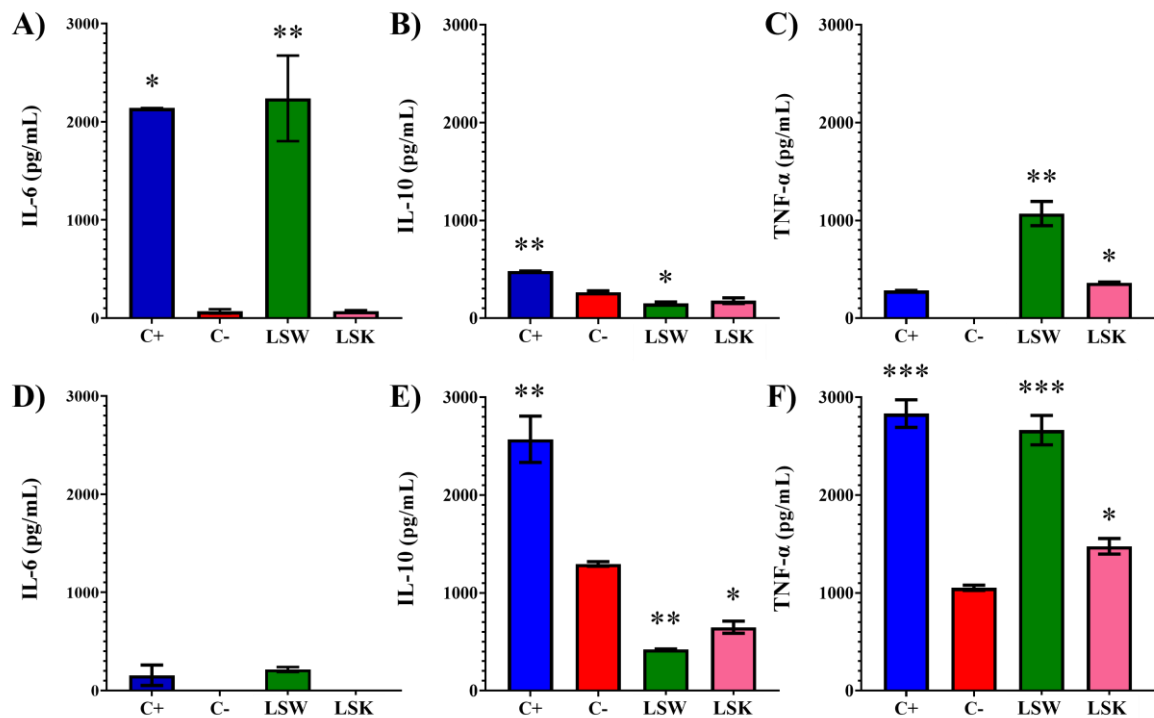
Geralmente, as abordagens utilizadas na caracterização imunomoduladora de um determinado composto envolvem a dosagem de um certo conjunto de citocinas, em células imunes tratadas com ele. Macrófagos, como células da linha de frente do sistema imune, são especialmente importantes no estudo de imunomoduladores de origem natural. Neste estudo, duas linhagens de macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774.1) foram tratadas com as frações polissacarídicas de *L. strigosus* (LSW e LSK), quantificando-se os níveis de citocinas liberadas pelas células durante 24 horas de contato. Foram utilizadas duas citocinas associadas a respostas inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e uma anti-inflamatória (IL-10).

Um padrão de citocinas semelhante foi observado em ambas as linhagens celulares, apesar das diferenças na quantidade (em pg/mL) de cada citocina dosada, o que pode estar relacionado a características próprias de cada célula (Figura 15).

Nos macrófagos RAW 264.7, a fração aquosa (LSW) promoveu um forte aumento na expressão de IL-6 (Figura 16 A) e TNF- $\alpha$  (Figura 15C), com inibição da produção de IL-10, em relação ao controle negativo (células não tratadas) (Figura 15B), indicando um possível efeito inflamatório. Enquanto isso, a fração alcalina (LSK) apresentou um efeito mais moderado na modulação das três citocinas (Figura 15A-C).

Já nos macrófagos da linhagem J774.1 (Figura 15D-F), foi observado um padrão semelhante para as duas frações polissacarídicas, onde ambas não modificaram significativamente os níveis de IL-6 (em relação ao controle) (Figura 15D), porém inibiram a produção de IL-10 (Figura 15E) e estimularam a síntese de TNF- $\alpha$  (Figura 15F), indicando novamente um possível efeito inflamatório, mas desta vez com perfil de citocinas diferenciado, novamente destacando-se a fração LSW como a maior indutora de TNF- $\alpha$ .

**Figura 15** – Perfil de citocinas secretadas por macrófagos tratados com as frações polissacarídicas de *L. strigosus*. (A-C): Células da linhagem RAW 264.7. (D-F): Linhagem J774.1.



C+ (azul): Controle positivo (LPS a 500 ng/mL). C- (vermelho): Controle negativo (células não-tratadas). LSW: Fração aquosa (verde). LSK: Fração alcalina (cor-de-rosa). Asteriscos: Tratamentos com diferenças significativas em relação ao controle negativo, pelo teste de Dunnett (\*:  $p \leq 0,05$ . \*\*:  $p \leq 0,01$ . \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ).

Citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- $\alpha$ ) são liberadas nas primeiras respostas a agentes potencialmente infecciosos, sendo responsáveis por estimular o sistema imune inato, além de estarem envolvidas no complexo processo de ativação da imunidade adaptativa. Portanto, imunomoduladores capazes de estimular a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  se tornam interessantes para aplicações do ponto de vista biotecnológico, com potencial de uso farmacológico para modular os mecanismos imunes, e auxiliar no tratamento de doenças. Os resultados deste trabalho são condizentes com o que é reportado na literatura, onde a maioria dos estudos com cogumelos indica que elementos de polissacarídeos (inteiros ou fragmentos) podem atuar como ligantes em receptores específicos, e induzir a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em células RAW 264.7 (XU; YAN; ZHANG, 2012; LIU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; GHOSH *et al.*, 2021; ZHONG *et al.*, 2021).

No caso da linhagem J774.1, é menor o volume de trabalhos científicos avaliando o efeito imunomodulador de polissacarídeos de cogumelos nessas células, porém é possível encontrar evidências de polissacarídeos vegetais, como a arabinogalactana isolada de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae), estimuladora da síntese de IL-6 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem (KOUAKOU *et al.*,

2013), e da glucomanana esterificada de *Amorphophallus oncophyllus* (Araceae) (GURUSMATIKA *et al.*, 2017). Coincidentemente, um dos poucos trabalhos que dosam citocinas liberadas por J774.1 em resposta a polissacarídeos de cogumelos é representativo do gênero *Lentinus*, mais especificamente da espécie *L. crinitus*, onde foi verificada uma fração polissacarídica que aumentou a produção de TNF- $\alpha$ , sendo composta de Glc, Gal, Ara e Xyl, similarmente ao presente estudo (LÓPEZ-LEGARDA *et al.*, 2020).

IL-6 é uma citocina secretada majoritariamente por macrófagos, e possui um papel central na defesa imune, com efeitos bastante amplos em diferentes vias de sinalização, que produzem resultados diretos na imunocompetência (capacidade de um hospedeiro de responder a infecções), sendo que modelos experimentais com animais não-produtores de IL-6 possuem capacidade reduzida de resistir a infecções de diferentes patógenos. Ainda, as evidências sugerem que essa citocina é importante na manutenção da homeostase, e por consequência sua deficiência está envolvida na patogênese de diversos distúrbios (ROSE-JOHN; WINTHROP; CALABRESE, 2017).

TNF- $\alpha$  é outra citocina secretada majoritariamente por macrófagos, e além de exibir uma potente atividade inflamatória contra patógenos, também é responsável por atividades antitumorais, principalmente por ativar as vias de sinalização intracelular NF- $\kappa$ B (fator nuclear *kappa* B), MAPK (proteína-quinase ativada por mitógenos) e de caspases (MITOMA *et al.*, 2018).

IL-10, por sua vez, é produzida tanto por células imunes inatas quanto adaptativas, sendo responsável por regular e restringir respostas inflamatórias excessivas, e promover mecanismos de reparo tecidual, sendo considerada, portanto, uma importante citocina anti-inflamatória, conhecida também como o fator inibidor da síntese de citocinas humanas (OUYANG; O'GARRA, 2019; WANG *et al.*, 2019).

Enquanto a expressão de IL-10 conjunta à de outras citocinas é benéfica, devido ao seu caráter regulatório, os macrófagos tratados com as frações polissacarídicas de *L. strigosus* expressaram IL-10 apenas a níveis basais, sendo menor que o controle negativo (Figura 15B e E), o que sugere um potencial muito mais pró-inflamatório desses polissacarídeos.

De forma simplificada, citocinas agem como uma rede na qual a produção de uma citocina influencia a síntese ou resposta de outras, pelos estímulos regulatórios promotores (positivos) ou inibitórios (negativos). Dessa forma, a síntese de IL-6 e TNF- $\alpha$  pode estar inibindo a síntese de

IL-10, já que estão envolvidas em respostas praticamente opostas. Ainda, é conhecido que macrófagos são células heterogêneas, e o perfil de expressão de citocinas é diferente em macrófagos polarizados do tipo M1 (classicamente ativados, produzindo respostas inflamatórias) e M2 (alternativamente ativados, respostas anti-inflamatórias) (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018), sendo a polarização um fator não avaliado no presente estudo. Outro ponto a ser explorado como perspectiva futura é a repetição do experimento de modo a confirmar ou ajustar os valores médios do controle negativo de alguns tratamentos, como no caso da alta produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  por macrófagos J774.1 não-tratados.

### **5.2.2 Adesão de *beads* revestidas com os polissacarídeos de *L. strigosus* à superfície de macrófagos**

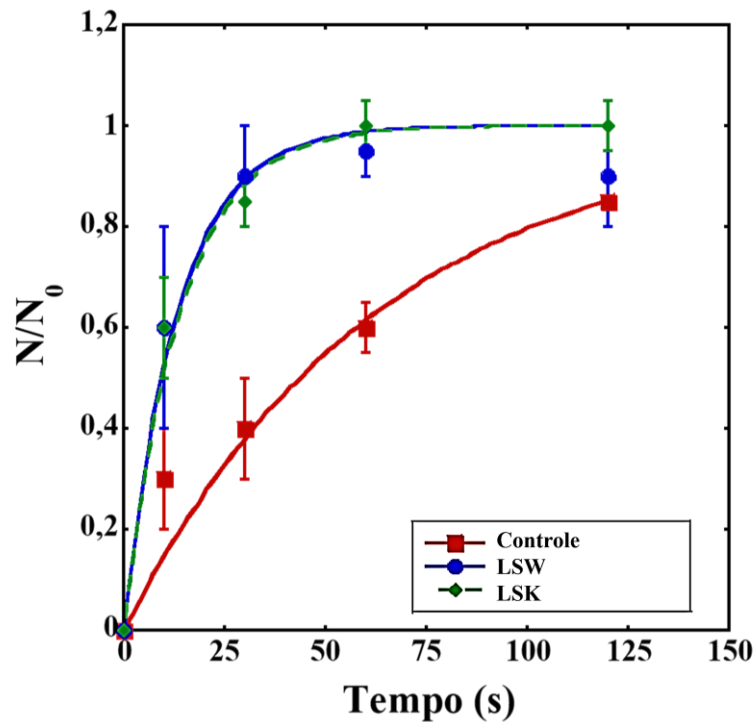
Células imunes são particularmente caracterizadas por interações dinâmicas ao nível célula-célula. Dessa forma, estímulos mecânicos e adesivos são cruciais na ativação e regulação de respostas imunológicas, incluindo aquelas mediadas por macrófagos, permitindo controlar a força e especificidade de suas respostas, regular a ativação de receptores na sua superfície, regular sua migração, sinalizações intra e intercelulares, entre outros processos. No entanto, os mecanismos pelos quais os macrófagos, em particular, atendem mecanicamente em resposta a um estímulo ou à presença de um antígeno, permanecem largamente desconhecidos (HUSE, 2017; MARUYAMA; NEMOTO; YAMADA, 2019; PFANNENSTILL *et al.*, 2021).

Uma das técnicas que podem ser utilizadas para caracterizar a interação da superfície celular com algum estímulo mecânico, associado ou não à presença de antígenos é a pinça óptica (OT, do inglês *optical tweezers*), onde um feixe de laser extremamente focalizado através das lentes de um microscópio é utilizado para aprisionar e manipular micro objetos, de forma similar a uma pinça. O uso de OTs permite interagir com uma célula viva sem danificá-la, exercendo forças e medindo deslocamentos de processos biológicos (NUSSENZVEIG, 2018; FARIAS; POMPEU; PONTES, 2020).

Usando esta plataforma, a interação entre macrófagos murinos J774.1 e microesferas de poliestireno recobertas com as frações polissacarídicas LSW e LSK de *L. strigosus* foi estudada a partir da contagem de eventos de adesão positivos ( $N$ ) das microesferas em relação ao total de tentativas ( $N_0$ ), sob diferentes tempos de contato com a célula (10 s, 30 s, 60 s e 120 s). Os resultados mostram que a adesão relativa entre as microesferas e a superfície dos macrófagos foi tempo-dependente, mostrando-se semelhante para as duas frações polissacarídicas. As

microesferas recobertas apresentaram adesão relativa ( $N/N_0$ ) bastante superior ao controle (microesferas não-recobertas), onde nos pontos de  $t = 20$  s, apresentaram adesão em mais de 60% das tentativas, aumentando exponencialmente até adesão de 100% em  $t = 60$  s (Figura 16).

**Figura 16** – Adesão relativa ( $N/N_0$ ) em função do tempo de contato (s) entre os macrófagos e as microesferas cobertas com polissacarídeos de *L. strigosus* manipuladas por pinças ópticas.



Azul (●): Fração aquosa (LSW). Verde (◆): Fração alcalina (LSK). Vermelho (■): Controle negativo (microesferas não-tratadas com os polissacarídeos). Dados referentes à média de três experimentos independentes para cada condição experimental (amostra/tempo de contato).

As curvas acima (Figura 16) descrevem um comportamento exponencial descrito pela Equação (1) (previamente definida no subitem 4.7.6). Dessa forma, o tempo característico ( $\tau$ ) necessário para adesão à superfície celular da fração LSW foi de  $13,38 \pm 4,27$  s, e o da fração LSK foi de  $13,94 \pm 2,24$  s, sugerindo que existem características similares nestes polissacarídeos, e que permitem às esferas se aderir ou serem reconhecidas mais rapidamente pelos macrófagos do que o controle, que levou  $\tau = 62,68 \pm 6,38$  s para a adesão.

No que diz respeito a macrófagos, as abordagens mecanobiológicas têm sido aplicadas para entender, principalmente, os mecanismos de fagocitose adotados por essas células. Esse processo, importantíssimo na imunidade inata, pode ser ativado pela adesão de antígenos à superfície celular, sendo essa a etapa imediatamente anterior à fagocitose. Assim, alguns objetos manipulados por pinças ópticas já foram utilizados para caracterizar as forças de adesão de macrófagos J774.1, como por exemplo microesferas cobertas com antígenos como o



lipopolissacarídeo (LPS) e o zimosano (MATSUMURA *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2010; BYVALOV; KONONENKO; KONY SHEV, 2017), ou células inteiras como o microrganismo patogênicos *Histoplasma capsulatum* (GUIMARÃES *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Todavia, experimentos relacionados a capacidade de adesão de polissacarídeos de cogumelos à superfície de células envolvendo a manipulação via pinças ópticas ainda são inéditos. Nos experimentos mais aproximados, Wei *et al.* (2007) reportam a manipulação de microesferas de poliestireno cobertas de lipopolissacarídeo (LPS), via pinças ópticas, mensurando sua interação com células J774.1 pré-tratadas com polissacarídeos extraídos de *Ganoderma lucidum*. Neste trabalho, os resultados indicaram que a afinidade celular pelas microesferas com LPS aumenta quando os macrófagos são pré-tratados com o polissacarídeo, diminuindo o tempo necessário para a adesão, e aumentando a força da interação entre o LPS e receptores na superfície celular.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Duas frações polissacarídicas foram extraídas a partir da biomassa micelial de *Lentinus strigosus*, uma linhagem de cogumelo comestível da Amazônia, sendo denominadas LSW e LSK.

As frações apresentaram constituições química e estrutural distintas, porém ambas com a presença majoritária de glucanas, constituídas de Glc, Gal, Man, Xyl e Ara, com proporção molar de 89:4:3:2:2 em LSK e 92:4:3:0:1 em LSW. A estrutura de LSW apresentou-se constituída majoritariamente de unidades  $\rightarrow 6$ - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  e  $\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ , enquanto LSK apresentou-se constituída principalmente de unidades de  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  e  $\rightarrow 3,6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ .

As frações apresentaram tamanho de partícula (diâmetro efetivo) distinto e potencial zeta semelhante, sendo a reologia de LSW caracterizada como gel fraco e LSK como fluido, com comportamentos reológicos dependendo de fatores como temperatura e frequência angular.

O uso de diferentes métodos de extração (aquoso e alcalino) foi relevante para a obtenção de polissacarídeos com propriedades estruturais e físico-químicas distintas, porém ambas as extrações resultaram em atividade imunomoduladora semelhante, de caráter pró-inflamatório, verificado através do aumento da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  e inibição de IL-10 em macrófagos, com perfil de citocinas diferenciado entre células RAW 264.7 e J774.1. Foi verificada também uma forte adesão de microesferas recobertas com ambas as frações polissacarídicas à superfície dessas células.

Os resultados deste trabalho fornecem dados iniciais para explorar a estrutura química e correlacioná-la ao efeito imunomodulador destes polissacarídeos, permitindo concluir que os polissacarídeos contidos na biomassa de *L. strigosus* têm potencial para ser avaliados e desenvolvidos como ingredientes funcionais com benefícios à saúde, principalmente como agentes imunomoduladores.

Como perspectivas futuras, sugerem-se estudos de otimização e escalonamento da produção destes polissacarídeos, assim como uma caracterização mais completa de sua composição e estrutura química, possível toxicidade e mecanismos de ação, não somente em macrófagos como também em outros agentes do sistema imune, ampliando os experimentos para modelos *in-vivo* e pré-clínicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, 2015.

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

ANDRADE, M, C. N. *et al.* Use of wood waste from the Brazilian Amazon in the in vitro cultivation of *Lentinus strigosus*. **Ambiência**, v. 9, n. 1, p. 189-196, 2013.

AQUINO, Y. K.; DULAY, R. M.; KALAW, S. Effect of *Lentinus strigosus* extract on the food intake and locomotion of N2 wild strain *Caenorhabditis elegans* as model for obesity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 12, p. 023-028, 2020.

ARAÚJO, G. R. S. *et al.* Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29561, 2012.

ARAÚJO, G. R. S. *et al.* Dexamethasone and methylprednisolone promote cell proliferation, capsule enlargement, and in vivo dissemination of *C. neoformans*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 3, 2021.

ARAÚJO, G. R. S. *et al.* Rheological properties of cryptococcal polysaccharide change with fiber size, antibody binding and temperature. **Future Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 867-884, 2019.

ARAÚJO, G. R. S. *et al.* The environmental yeast *Cryptococcus liquefaciens* produces capsular and secreted polysaccharides with similar pathogenic properties to those of *C. neoformans*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

ASKER, M. S.; KADY, E. M. E.; MAHMOUD, M. G. New trends of the polysaccharides as a drug. **World Journal of Agriculture and Soil Science**, vol. 3, n. 4, p. 1-22, 2019.

AYIMBILA, F.; SIRIWONG, S.; KEAWSOMPONG, S. Structural characteristics and bioactive properties of water-soluble polysaccharide from *Lentinus squarrosulus*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 26, p. 100266, 2021.

BABAC, B. D. *et al.* In-vitro activity of ethanolic extract of *Lentinus strigosus* mycelia in N2 wild strain *Caenorhabditis elegans*—An animal model for obesity and its chemical composition. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 41-46, 2021.

BERNAS, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 5, n. 1, p. 5-20, 2006.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BI, H. *et al.* A novel water-soluble  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Bulgaria inquinans* (Fries). **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1254-1258, 2009.

BONONI, V. L. R. *et al.* Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 489-511, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p. 248-254, 1976.

BYVALOV, A. A.; KONONENKO, V. L.; KONYSHEV, I. V. Effect of lipopolysaccharide O-side chains on the adhesiveness of *Yersinia pseudotuberculosis* to J774.1 macrophages as revealed by optical tweezers. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 258-266, 2017.

CAMELINI, C. M. *et al.* Fungal Cultivation and Production of Polysaccharides. In: RAMAWAT, K., MÉRILLON J. M. (eds.). **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, p. 1-33, 2015.

CAMPESTRINI, L. H.; SALLES-CAMPOS, C. Aspects of mushroom cultivation to obtain polysaccharides in submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 100-107, 2021.

CARBONERO, E. R. *et al.* A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 252-257, 2006.

CARBONERO, E. R. *et al.* Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 814-819, 2012.

CARBONERO, E. R. *et al.* Unusual partially 3-O-methylated  $\alpha$ -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 252-257, 2008.

CARDOSO, R. V. C. *et al.* Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. **Food & Function**, v. 8, n. 6, p. 2155-2164, 2017.

CARDWELL, G. *et al.* A review of mushrooms as a potential source of dietary vitamin D. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1498, 2018.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. *et al.* Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 522-528, 2011.

CHAKRABORTY, I. *et al.* Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101425, 2019.

CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S195-S203, 2010.

CHUNG, J.T.; LAU, C.M.L.; CHAU, Y. The effect of polysaccharide-based hydrogels on the response of antigen-presenting cell lines to immunomodulators. **Biomaterials Science**, v. 9, n. 19, p. 6542-6554, 2021.

- CORDERO, R. J. B. *et al.* Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 317-323, 2013.
- CORRÊA, R. C. G. *et al.* Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 103-117, 2016.
- COTA, B. B. *et al.* A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 263-270, 2008.
- DA SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **Journal of Health Sciences**, v. 13 (esp.), p. 375-384, 2011.
- DAVIDSON, A.; JAINE, T. **The Oxford companion to food**. (3. ed). Oxford, Reino Unido: Oxford University Press, 2014.
- DEVI, K. S. P. *et al.* Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 857-865, 2013.
- DRECHSLER-SANTOS, E. R. *et al.* Studies on lentinoid fungi (*Lentinus* and *Panus*) from the semi-arid region of Brazil. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 139, n. 4, p. 437-446, 2012.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytic Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUDEKULA, U. T.; DORIYA, K.; DEVARAI, S. K. A critical review on submerged production of mushroom and their bioactive metabolites. **3 Biotech**, v. 10, n. 8, p. 1-12, 2020.
- DULAY, R. M. R.; RIVERA, A. G. C.; GARCIA, E. J. B. Mycelial growth and basidiocarp production of wild hairy sawgill *Lentinus strigosus*, a new record of naturally occurring mushroom in the Philippines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 242-246, 2017.
- ELISASHVILI, V. I. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 3, 2012.
- ELKHATEEB, W. A. *et al.* Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 2, p. 88-101, 2019.
- ERJAVEC, J. *et al.* Proteins of higher fungi - from forest to application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 259-273, 2012.
- EROL, S. S.; AKATA, I.; ERTUĞRUL, K. A. Y. A. Use of Macrofungi in Traditional and Complementary Medicine Practices: Mycotherapy. **International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research**, v. 1, n. 2, p. 70-78, 2020.
- EVAGELIOU, V. Shear and extensional rheology of selected polysaccharides. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 5, p. 1853-1861, 2020.

FARIAS, J.; POMPEU, P.; PONTES, B. Exploring stem cell differentiation from a mechanobiological perspective: insights from neural precursor cells and beyond. **Journal of Stem Cells Research Development & Therapy**, v. 6, p. 053, 2020.

FERNANDES, T. *et al.* Mushroom Nutrition as Preventative Healthcare in Sub-Saharan Africa. **Applied Sciences**, v. 11, n. 9, p. 4221, 2021.

FERREIRA, S. S. **Relação estrutura-função de polissacarídeos imunoestimuladores**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade de Aveiro, Portugal. 2014. 113 p.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v.197, p.157-160, 1991.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v.195, n.1, p.93-96, 1991.

GHOSH, D.; SMARTA, R. B. **Pharmaceuticals to Nutraceuticals: A Shift in Disease Prevention**. (1 ed.). Boca Raton, EUA: CRC Press, 2016. 282 p.

GHOSH, S. *et al.* Crude polysaccharide from the milky mushroom, *Calocybe indica*, modulates innate immunity of macrophage cells by triggering MyD88-dependent TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 70-81, 2021.

GONZÁLEZ, A. *et al.* Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. **Food & Function**, v. 346, n. 9, p. 7400-7414, 2021.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GRACHER, A. H. P. Caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação de *Ganoderma multiplicatum*. 2005. 80 f. (Dissertação: Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GRESHAM, R. M. Viscosity: A fluid's resistance to flow. **Tribology & Lubrication Technology**, v. 64, n. 11, p. 55, 2008.

GRIMM, D.; KUENZ, A.; RAHMANN, G. Integration of mushroom production into circular food chains. **Organic Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 309-317, 2021.

GUGGENHEIM, A. G.; WRIGHT, K. M.; ZWICKEY, H. L. Immune modulation from five major mushrooms: application to integrative oncology. **Integrative Medicine: A Clinician's Journal**, v. 13, n. 1, p. 32, 2014.

GUIMARÃES, A. J. *et al.* Agglutination of *Histoplasma capsulatum* by IgG monoclonal antibodies against Hsp60 impacts macrophage effector functions. **Infection and immunity**, v. 79, n. 2, p. 918-927, 2011.

GUIMARÃES, A. J. *et al.* Host membrane glycosphingolipids and lipid microdomains facilitate *Histoplasma capsulatum* internalisation by macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 21, n. 3, p. e12976, 2019.

- GUPTA, S. *et al.* Edible mushrooms: cultivation, bioactive molecules, and health benefits. *In: MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. (eds.). Bioactive Molecules in Food: Reference Series in Phytochemistry.* Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 1815-1847.
- GURUSMATIKA, S. *et al.* Immunomodulatory activity of octenyl succinic anhydride modified Porang (*Amorphophallus oncophyllus*) glucomannan on mouse macrophage-like J774.1 cells and mouse primary peritoneal macrophages. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1187, 2017.
- HU, H.; XU, F. Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 8, p. 2084-2101, 2020.
- HU, T. *et al.* Structure, size and aggregated morphology of a  $\beta$ -D-glucan from *Lignosus rhinocerotis* as affected by ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, p. 118344, 2021.
- HUSE, M. Mechanical forces in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 11, p. 679-690, 2017.
- HYDE, K. D. *et al.* The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019.
- JAYACHANDRAN, M.; XIAO, J.; XU, B. A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1934, 2017.
- JEFF, I. B. *et al.* Purification, structural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Fitoterapia**, v. 84, p. 338-346, 2013.
- JIA, H. *et al.* Deep eutectic solvent electrolysis for preparing water-soluble magnetic iron oxide nanoparticles. **Nanoscale**, v. 13, n. 45, p. 19004-19011, 2021.
- KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 2. ed. West Sussex, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd., 2011. 356 p.
- KHAN, T. *et al.* Polysaccharides as potential anticancer agents - A review of their progress. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 412-428, 2019.
- KHONGTHONG, S. *et al.* Characterization and immunomodulatory activity of sulfated galactan from the red seaweed *Gracilaria fisheri*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 705-714, 2021.
- KIM, J. *et al.*  $\beta$ -Glucan-enriched materials from *Lentinus edodes* mushroom as a high-fibre and low-calorie flour substitute for baked foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 10, p. 1915-1919, 2011.
- KIM, M. *et al.* Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 386-393, 2009.
- KIRK, P. M. *et al.* **Dictionary of the Fungi**. Wallingford, Reino Unido: CAB International, 2008. 771 p.
- KOUAKOU, K. *et al.* Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Alchornea cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 232-242, 2013.

LEONG, Y. K.; YANG, F.; CHANG, J. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117006, 2021.

LI, H. *et al.* Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence-based classification system. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1982-2014, 2021.

LI, Q. *et al.* Structural elucidation and antioxidant activity a novel Se-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 42-52, 2017.

LI, X. *et al.* Nonvolatile taste components, nutritional values, bioactive compounds, and antioxidant activities of three wild Chanterelle mushrooms. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 8, p. 1855-1864, 2018.

LIU, J. *et al.* Characterization and chemical modification of PLN-1, an exopolysaccharide from *Phomopsis liquidambari* NJUSTb1. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p. 117197, 2021.

LIU, Y. *et al.* Extraction optimization, characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of a novel polysaccharide from the wild mushroom *Paxillus involutus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 326-332, 2018.

LÓPEZ-LEGARDA, X. *et al.* Biotechnological production, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from a native strain of *Lentinus crinitus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3133-3144, 2020.

LU, H. *et al.* Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2333-2356, 2020.

LULL, C.; WICHERS, H. J.; SAVELKOUL, H. F. J. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 2, p. 63-80, 2005.

LUO, Y. *et al.* Evaluation of fatty acid composition and antioxidant activity of wild-growing mushrooms from Southwest China. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 10, 2017.

MACHADO, A. R. G. *et al.* Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 621-627, 2016.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, F. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MANJUNATHAN, J.; KAVIYARASAN, V. Biotechnological Applications of *Lentinus tuberregium* (Fr): A South Indian Edible Mushroom. **EJBS**, v. 4, n. 1, p. 28-31, 2010.

MARUYAMA, K.; NEMOTO, E.; YAMADA, S. Mechanical regulation of macrophage function-cyclic tensile force inhibits NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in murine macrophages. **Inflammation & Regeneration**, v. 39, n. 1, p. 1-9, 2019.



- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v. 59, n. 2, p. 153-163, 1969.
- MATSUMURA, K. *et al.* Phagocytic response to fully controlled plural stimulation of antigens on macrophage using on-chip microcultivation system. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2006.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiología**, v. 30, p. 77-84, 1999.
- MERHEB, R.; ABDEL-MASSIH, R.M.; KARAM, M.C. Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1-5, 2019.
- MILLAR, B. C. *et al.* Antimicrobial properties of basidiomycota macrofungi to *Mycobacterium abscessus* isolated from patients with cystic fibrosis. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 8, n. 1, p. 93-97, 2019.
- MIRHOSSEINI, H. *et al.* Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 47-56, 2008.
- MITOMA, H. *et al.* Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents—Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. **Cytokine**, v. 101, p. 56-63, 2018.
- MORRIS, H. J. *et al.* The use of mushrooms in the development of functional foods, drugs, and nutraceuticals. *In: Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications*, v. 5, p. 123-159, 2017.
- MORRIS-QUEVEDO, H. J. *et al.* Evaluación de la actividad inmunomoduladora de bioproductos obtenidos de la seta comestible-medicinal *Pleurotus ostreatus*. **Biología Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 3511-3514, 2018.
- MOUMITA, S.; DAS, B. Assessment of the prebiotic potential and bioactive components of common edible mushrooms in India and formulation of symbiotic microcapsules. **LWT: Food Science & Technology**, v. 156, p. 113050, 2022.
- MUDALIGE, T. *et al.* Characterization of nanomaterials: Tools and challenges. **Nanomaterials for Food Applications**, p. 313-353, 2019.
- MURALEEDHARAN, T. R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Screening of tropical wood-rotting mushrooms for copper biosorption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3507-3508, 1995.
- MURPHY, F.J. *et al.*  $\beta$ -glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 356, 2020.
- NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.

NUSSENZVEIG, H. M. Cell membrane biophysics with optical tweezers. **European Biophysics Journal**, v. 47, n. 5, p. 499-514, 2018.

OKINO, L. K. *et al.* Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 889-893, 2000.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871-891, 2019.

ÖZÜNLÜ, O.; ERGEZER, H. Possibilities of using dried oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in the production of beef salami. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, p. e15117, 2021.

PATEL, Y.; NARAIAN, R.; SINGH, V. K. Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2012.

PATHAK, P. O. *et al.* Cholesterol anchored arabinogalactan for asialoglycoprotein receptor targeting: synthesis, characterization, and proof of concept of hepatospecific delivery. **Carbohydrate Research**, v. 408, p. 33-43, 2015.

PENG, Y. *et al.* *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory effects of fucoidan compound agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 48-56, 2019.

PEREIRA, M. C. S. *et al.* Proposta de guia simplificado para registro de alimento com alegações de propriedades funcionais. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 2, p. 88-95, 2014.

PESSOA, F. B. **Extração e caracterização química de polissacarídeos de basidiomicetos comestíveis de ocorrência na Amazônia**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Brasil. 2016. 95 p.

PETTOLINO, F. A.; WALSH, C.; FINCHER, G. B.; BACIC, A. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1590-1607, 2012.

PFANNENSTILL, V. *et al.* Quantitative methodologies to dissect immune cell mechanobiology. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 851, 2021.

POMPEU, P. *et al.* Protocol to measure the membrane tension and bending modulus of cells using optical tweezers and scanning electron microscopy. **STAR Protocols**, v. 2, n. 1, p. 100283, 2021.

PUCHKOVA, T. A.; SHCHERBA, V. V.; BABITSKAYA, V. G. Comparative examination of polysaccharide synthesis by medicinal mushrooms from the genus *Lentinus* Fr. (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 12, n. 2, 2010.

PUISTO, A. *et al.* Dynamic hysteresis in the rheology of complex fluids. **Physical Review E**, v. 91, n. 4, p. 042314, 2015

RAI, S. N. *et al.* Therapeutic applications of mushrooms and their biomolecules along with a glimpse of *in silico* approach in neurodegenerative diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111377, 2021.

- RATHORE, H. *et al.* Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 182-193, 2019.
- RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 2, p. 35-46, 2017.
- RAVAL, N. Basic Fundamentals of Drug Delivery - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. p. 369–400, 2019.
- REIS, G. C. L. *et al.* Investigation of biologically active amines in some selected edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, p. 103375, 2020.
- REN, G. *et al.* Structural characterization and antiviral activity of lentinan from *Lentinus edodes* mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 1202-1210, 2018.
- ROSA, L. H. *et al.* Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967-974, 2003.
- ROSE-JOHN, S.; WINTHROP, K.; CALABRESE, L. The role of IL-6 in host defense against infections: immunobiology and clinical implications. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 7, p. 399-409, 2017.
- RUIZ-HERRERA, J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L. Cell wall glucans of fungi. A review. **The Cell Surface**, v. 5, p. 100022, 2019.
- RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 358-375, 2016.
- SALES-CAMPOS, C. **Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na Região Amazônica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2008. 197p.
- SALES-CAMPOS, C. *et al.* Centesimal composition and physical-chemistry analysis of the edible mushroom *Lentinus strigosus* occurring in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 1537-1544, 2013.
- SALES-CAMPOS, C. *et al.* Nutritional and bioactive properties of an Amazon wild oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes): contributions to functional food and human health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 23, n. 7, p. 79-90, 2021.
- SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2011.
- SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 539-543, 2010.

- SALES-CAMPOS, C.; CHEVREUIL, L. R. Macromicetos Amazônicos: potenciais biotecnológicos de modo sustentável. In: DE OLIVEIRA, Luiz Antonio *et al.* **Conhecimento, conservação e uso de fungos**. Manaus, Brasil: Editora INPA, 2019. p. 148-157.
- SANDE, D. *et al.* Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 125, p. 108524, 2019.
- SANUMA, O. I. *et al.* Sanöma samakönö sama tökö nii pewö oa wi ï tökö waheta: Ana amopö = **Enciclopédia dos alimentos Yanomami (Sanöma): Cogumelos**. São Paulo, Brasil: Instituto Socioambiental, 2016.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHMIEDER, S. S. *et al.* Bidirectional propagation of signals and nutrients in fungal networks via specialized hyphae. **Current Biology**, v. 29, n. 2, p. 217-228, 2019.
- SCHWEINITZ, L. D. **Synopsis fungorum Carolinae superioris**. 1a ed. Leipzig, Alemanha: Johann Ambrosius Barth, 1822. p. 20-31.
- SEN, I. K. *et al.* Structural characterization of an immunoenhancing heteroglycan of a hybrid mushroom (pfls1h) of *Pleurotus florida* and *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. **Carbohydrate Research**, v. 371, p. 45-51, 2013.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.
- SHARIFI-RAD, J. *et al.* Mushrooms-rich preparations on wound healing: From nutritional to medicinal attributes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.
- SILVEIRA, M. L. L. *et al.* Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear  $\beta$ -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 588-596, 2014.
- SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Brasil: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1995.
- SINGH, A. K. *et al.* Mushroom cultivation as a viable income generating unit for livelihood security: a success story of ARYA project at Turkaulia block of East Champaran. **Asian Journal of Agricultural Extension, Economics & Sociology**, p. 78-81, 2020.
- SMIDERLE, F. R. *et al.* A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, n. 15, p. 2731-2736, 2008b.
- SMIDERLE, F. R. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 597, n. 1-3, p. 86-91, 2008a.
- SMIDERLE, F. R. *et al.* Isolation and chemical characterization of a glucogalactomannan of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 74-80, 2013.
- SOARES, J. *et al.* Membrane elastic properties during neural precursor cell differentiation. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1323, 2020.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. *et al.* In vitro activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 1054-1061, 2010.

SOVRANI, V. *et al.* Structural characterization and rheological properties of a gel-like  $\beta$ -D-glucan from *Pholiota nameko*. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 1-8, 2017.

SÖYLEMEZ, T.; YAMAÇ, M.; YILDIZ, Z. Statistical optimization of cultural variables for enzymatic degradation of aflatoxin b1 by *Panus neostrigosus*. **Toxicon**, v. 186, p. 141-150, 2020.

SRIKRAM, A.; PHALAKUN, N. Screening of anti-aspergillus activities of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. **Khon Kaen Agriculture Journal**, v. 47, n. 1, p. 1639-1644, 2019.

STAMETS, P.; ZWICKEY, H. Medicinal mushrooms: ancient remedies meet modern science. **Integrative Medicine: A Clinician's Journal**, v. 13, n. 1, p. 46, 2014.

STRINGHETA, P. C. *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUN, Y. *et al.* A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 577-582, 2013.

TANG, Y. *et al.* Submerged culture of mushrooms in bioreactors: Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 45, n. 3, 2007.

TAOFIQ, O.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. The role of bioactive compounds and other metabolites from mushrooms against skin disorders - A systematic review assessing their cosmeceutical and nutricosmetic outcomes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 41, p. 6926-6965, 2020.

TERASAWAT, A.; PHOOLPHUNDH, S. Simultaneous Biological Pretreatment and Saccharification of Rice Straw by Ligninolytic Enzymes from *Panus neostrigosus* I9 and Commercial Cellulase. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 853, 2021.

TIAN, Y. *et al.* Structural characterization of a novel neutral polysaccharide from *Lentinus giganteus* and its antitumor activity through inducing apoptosis. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 231-240, 2016.

TRUTMANN, P. The forgotten mushrooms of ancient Peru. **Global Mountain Action**, v. 33, 2012.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

UDCHUMPISAI, W.; BANGYEEKHUN, E. Purification, structural characterization, and biological activity of polysaccharides from *Lentinus velutinus*. *Mycobiology*, v. 48, n. 1, p. 51-57, 2020.

ULZIJARGAL, E. *et al.* Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 70-76, 2013.

ÜSTÜN, N. S.; BULAM, S.; PEKSEN, A. The use of mushrooms and their extracts and compounds in functional foods and nutraceuticals. **International Technological Sciences and Design Symposium**, v. 1, p. 1205-1222, 2018.

VAITHANOMSAT, P. *et al.* Improvement of lignin-degrading enzymes production from the white-rot fungus (*Lentinus strigosus*) and its application in synthetic dye removal. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 2, p. 267-278, 2012.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, 2015.

VARGHESE, B. P.; AMRITKUMAR, P. Comparative Study on Cultivation of Oyster Mushrooms using Nutrition Enhancing Substrates. **International Journal of Science & Research in Biological Sciences**, v. 7, n. 2, 2020.

VENTURELLA, G. *et al.* Medicinal mushrooms: bioactive compounds, use, and clinical trials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 634, 2021.

VETTER, J. Biological values of cultivated mushrooms - A review. **Acta Alimentaria**, v. 48, n. 2, p. 229-240, 2019.

VIEIRA, I. O. *et al.* Atualização em Nefrologia Clínica: citocinas e osteodistrofia renal. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 23, n. 4, p. 224-29, 2001.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. *In*: KAVANAGH, K. (ed.). **Fungi: Biology and applications**. 2. ed. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd., p. 1-35, 2011.

WANG, X. *et al.* Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 2, p. a028548, 2019.

WANG, Y. *et al.* Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharide isolated from *Collybia radicata* mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 300-306, 2018.

WASSER, S. P. The importance of culinary-medicinal mushrooms from ancient times to the present. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, n. 3, p. 363, 2005.

WEI, S. *et al.* Measurement of macrophage adhesion using optical tweezers with backward-scattered detection. *In*: **Optical Trapping and Optical Micromanipulation VII**. International Society for Optics and Photonics, 2010. p. 77622M.

- XIE, S. al. Intestinal immunomodulating activity and structural characterization of a new polysaccharide from stems of *Dendrobium officinale*. **Food & Function**, v. 7, n. 6, p. 2789-2799, 2016.
- XU, X.; YAN, H.; ZHANG, X. Structure and immuno-stimulating activities of a new heteropolysaccharide from *Lentinula edodes*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11560-11566, 2012.
- YAMAÇ, M. *et al.* Hypoglycemic effect of *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. crude exopolysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 3, p. 513-517, 2008.
- YANG, D.; ZHOU, Z.; ZHANG, L. An overview of fungal glycan-based therapeutics. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 163, p. 135-163, 2019.
- YAOITA, Y.; KIKUCHI, M.; MACHIDA, K. Terpenoids and sterols from some Japanese mushrooms. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 3, p. 1934578X1400900332, 2014.
- YEAP, S. P.; LIM, J.; NGANG, H. P. *et al.* Role of Particle–Particle Interaction Towards Effective Interpretation of Z-Average and Particle Size Distributions from Dynamic Light Scattering (DLS) Analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 10, 2018.
- YIN, M.; ZHANG, Y.; LI, H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 145, 2019.
- YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITO, H.; UEHARA, N.; FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Quéél.: isolation and structure of a  $\beta$ -glucan. **Carbohydrate Research**, v. 140, p. 93-100, 1985.
- YOUNG, I.D.; LATOUSAKIS, D.; JUGE, N. The immunomodulatory properties of  $\beta$ -2,6 fructans: a comprehensive review. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1309, 2021.
- YU, K. *et al.* Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea*. **Planta Medica**, v. 64, n. 08, p. 714-719, 1998.
- YU, Y. *et al.* Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 91-101, 2018.
- ZENT, E. L.; ZENT, S.; ITURRIAGA, T. Knowledge and use of fungi by a mycophilic society of the Venezuelan Amazon. **Economic Botany**, v. 58, n. 2, p. 214-226, 2004.
- ZHANG, H.; ZHANG, F.; WU, J. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze–thaw technique. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 7, p. 923-928, 2013.
- ZHANG, M. *et al.* Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 163, p. 297-328, 2019.
- ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Chemical structure and molecular weights of  $\alpha$ -(1→3)-D-glucan from *Lentinus edodes*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 7, p. 1197-1202, 1999.

ZHANG, Y. *et al.* Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 196-206, 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Healthy function and high valued utilization of edible fungi. **Food Science & Human Wellness**, v. 10, n. 4, p. 408-420, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Physicochemical characterization and antitumor activity *in vitro* of a selenium polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2934-2946, 2020.

ZHAO, Y. *et al.* Natural polysaccharides with immunomodulatory activities. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 96-106, 2020.

ZHENG, Y.; WANG, W.; LI, Y. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Trametes orientalis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 248-254, 2015.

ZHONG, R. *et al.* Structural characteristics, anti-proliferative and immunomodulatory activities of a purified polysaccharide from *Lactarius volemus* Fr. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 967-977, 2021.

ZHOU, D. *et al.* Structure and immunoregulatory activity of  $\beta$ -D-galactofuranose-containing polysaccharides from the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 530-537, 2019.

ZHOU, K. *et al.* Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 205-214, 2016.

ZHU, H. *et al.* Preparation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 976-984, 2018.

ZHU, Y. *et al.* Structural analysis and immunomodulatory activity of a homopolysaccharide isolated from *Parabacteroides distasonis*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 103755, 2022.

ZIEBA, P. *et al.* Culinary and medicinal mushrooms: Insight into growing technologies. **Acta Mycologica**, v. 55, n. 2, 2021.

ZMITROVICH, I. V.; KOVALENKO, A. E. Lentinoid and polyporoid fungi, two generic conglomerates containing important medicinal mushrooms in molecular perspective. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 1, 2016.