

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

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
POLISSACARÍDEOS DE
BASIDIOMICETOS COMESTÍVEIS DE OCORRÊNCIA NA
AMAZÔNIA

FELIPE BARBOSA PESSOA

MANAUS
2016

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

FELIPE BARBOSA PESSOA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
POLISSACARÍDEOS DE
BASIDIOMICETOS COMESTÍVEIS DE OCORRÊNCIA NA
AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientação: Dra. Ceci Sales-Campos
Co-orientação: Dra Elaine R. Carbonero

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

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

P475e Pessoa, Felipe Barbosa
Extração e caracterização química de polissacarídeos de basidiomicetos comestíveis de ocorrência na Amazônia / Felipe Barbosa Pessoa. 2016
95 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ceci Sales Campos
Coorientador: Elaine R. Carbonero
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fugicultura. 2. Polissacarídeo. 3. Fungos comestíveis. 4. Basidiomicetos. I. Campos, Ceci Sales II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FELIPE BARBOSA PESSOA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
POLISSACARÍDEOS DE
BASIDIOMICETOS COMESTÍVEIS DE OCORRÊNCIA NA
AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Manaus, 09 de Agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ceci Sales-Campos, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Kally Alves de Sousa,
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dr. Emerson Silva Lima,
Universidade Federal do Amazonas

Prof Dr. Adrian Martin Pohlit,
Centro de Biotecnologia da Amazônia/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^a Juliana Mesquita Vidal Martinez de Lucena,
Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas

Dedico a
Minha família.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pois sem Ele nada disso seria possível.

A minha família pelo apoio e por compreender minha ausência.

A minha orientadora e co-orientadora pela oportunidade, dedicação e ajuda nesta tese.

Aos amigos e colegas de trabalhos que contribuíram para realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de estudo.

A Universidade Federal de Goiás-Regional Catalão onde foi realizada parte deste estudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela oportunidade da pesquisa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À CAPES, pelo financiamento da pesquisa através do projeto Pró-Amazônia: "Macromicetos amazônicos: conhecendo a sua diversidade e avaliando os seus potenciais biotecnológicos de modo sustentável".

O temor do SENHOR é o princípio do conhecimento, mas os insensatos desprezam.

Provérbios 1:7

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

Os fungos são organismos versáteis que degradam matéria orgânica, produzem substância de valor agregado, além de serem úteis para a alimentação humana. Dentre as substâncias bioativas presentes nos fungos, os polissacarídeos são os principais produtos que apresentam elevado valor para a indústria química, farmacêutica e medicinal. Sabendo que a Amazônia apresenta a maior biodiversidade do planeta e que nesta floresta existem poucas informações sobre espécies nativas de basidiomicetos, são necessárias pesquisas sobre o potencial destes fungos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo o cultivo dos cogumelos comestíveis *Lentinus strigosus* e *Pleurotus ostreatus* em resíduos madeireiros regionais como substratos, visando à extração e caracterização química dos polissacarídeos isolados do corpo de frutificação destes cogumelos. Para o cultivo, foram utilizados resíduos madeireiros regionais, conforme a seguinte formulação de substrato: 68% de serragem de *Simaboura amara* (marupá) ou *Anacardium giganteum* (cajuí), mistura de farelo de cereais (30%) e carbonato de cálcio (2%), sendo os mesmos homogeneizados e umidificados a 75%. Os substratos foram autoclavados, inoculados e mantidos em câmara climática até a completa colonização, sendo em seguida, transferidos para câmara de produção. Após o período de frutificação, os basidiomas foram colhidos, desidratados e analisados quanto à produtividade. Posteriormente foram moídos e submetidos às extrações aquosas à frio e à quente sucessivamente para purificação e caracterização dos polissacarídeos. As frações obtidas contendo os polissacarídeos foram purificadas pelo processamento de congelamento/degelo, solução de Fehling e diálises em membranas com limite de exclusão de 12-14 kDa. A estrutura química dos polissacarídeos foi determinada através das análises de composição monossacarídica, metilação e RMN. Em relação ao cultivo, os resultados mostraram que a formulação contendo cajuí permitiu melhores resultados quanto à

eficiência biológica (EB 221,17 e 104,88 %); rendimento (220,23 g kg⁻¹ e 72,5g kg⁻¹) para *P. ostreatus* e *L. strigosus*, respectivamente. A perda de matéria orgânica (PMO) não diferiu estatisticamente para os dois tipos de substratos utilizados. Três β -D-glucanas foram isoladas das extrações à quente (fração IHW-A, B e C). Sua estrutura contém cadeia principal formada por unidades β -D-Glcp com ligação (1 \rightarrow 3), podendo ser substituída em O-6 por terminais de β -Glcp. Além destas, foram isolados homopolissacarídeos (galactana metilada) das extrações a frio. Sendo assim, foi possível utilizar resíduos de marupá e cajuí para o cultivo de fungos comestíveis nativos da Amazônia. As moléculas descritas neste estudo são semelhantes as que apresentam efeitos biológicos relatadas na literatura, sendo provável que as mesmas tenham um potencial terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: *Pleurotus ostreatus*; *Lentinus strigosus*; fusicultura; polissacarídeo; bioativo.

ABSTRACT

Besides being useful for human consumption, fungi are versatile organisms that degrade organic matter, producing value added substance. Among the bioactive substances present in these fungi, polysaccharides are the main products, which have a high value for chemical, pharmaceutical and medical industries. Knowing that the Amazon presents the greatest biodiversity of the planet and that in this forest there is still little information about the species of native basidiomycetes, the objective of the study was the cultivation of edible mushrooms *Lentinus strigosus* and *Pleurotus ostreatus* in regional wood residues as a substrates, aiming the extraction and Chemical characterization of polysaccharides isolated from the fruiting body of these mushrooms. For the cultivation, regional wood residues were used, according to the following substrate formulation: 68% sawdust of *Simaboura amara* (marupá) or *Anacardium giganteum* (cajuí), cereal meal mixture (30%) and calcium carbonate (2 %), homogenized and humidified to 75%. The substrates were autoclaved, inoculated and kept in a climatic chamber until complete colonization, and then transferred to the production chamber. After the fruiting, the mushrooms were harvested, dehydrated and analyzed for yield. They were grounded and successively subjected to cold and hot water extractions for subsequent purification and characterization of polysaccharides. The fractions obtained containing polysaccharides were purified by the process of freezing and thawing, Fehling solution and dialysis membranes with 12-14 kDa exclusion limit. The chemical structure of the polysaccharide was determined by an analysis of the monosaccharide composition, NMR and methylation. Regarding to the production, the results showed that the formulation containing cajuí allowed better results of biological efficiency (EB 221,17 and 104,88%); Yield (220.23 g kg⁻¹ and 72.5 g kg⁻¹) for *P. ostreatus* and *L. strigosus*, respectively. The organic matter loss (OML) was not significantly different for the two types of substrates used. Three β-D-glucans were isolated from the hot extraction

(IHW-fraction A, B and C), which contains the main chain composed of β -D-Glcp units connection (1 \rightarrow 3), and may be replaced by O-6 for β -Glcp terminals. Besides, these were isolated homopolysaccharide (methylated galactan) of cold extraction. Thus, it is possible to use regional waste timbers for the cultivation of native edible fungi in the Amazon region. The glucans described in this study are similar to those that have biological effects reported in scientific literature, as it is likely that they have a therapeutic potential.

KEYWORDS: *Pleurotus ostreatus*; *Lentinus strigosus*; mushroom cultivation; polysaccharide; bioactive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura morfológica geral dos basidiomicetos.....	15
Figura 2- Estrutura química da β -glucana (1 \rightarrow 3) com ramificação β (1 \rightarrow 6).....	18
Figura 3 - Heteroglucana isolada de <i>P. ostreatus</i> . Cadeia principal composta por unidade repetidas de α e β -Glc _p (1 \rightarrow 6) e α -Fuc _p (1 \rightarrow 2)	24
Figura 4- Representação esquemática dos principais fragmentos presentes nas heterogalactanas isoladas de cogumelos	26
Figura 5- Representação esquemática de heteromanana (fucoxilomananas) isoladas de <i>Ganoderma lucidum</i>	27
Figura 6- Produto formulado a base de polissacarídeo isolado de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Figura 7- Corpo de frutificação de <i>L. strigosus</i>	29
Figura 8- <i>Pleurotus ostreatus</i>	30
Figura 9- Esquema de produção dos basidiomicetos comestíveis.....	39
Figura 10- Fluxograma geral das extrações aquosas	43
Figura 11- Cultivo dos cogumelos comestíveis.....	53
Figura 12- Estrutura dos monossacarídeos presentes nos extratos de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação de <i>P. ostreatus</i> e <i>L. strigosus</i>	56
Figura 13- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: CW-A.....	57
Figura 14- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: CW-B.....	58
Figura 15- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: CW-C.....	58
Figura 16- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: HW-A	59
Figura 17- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: HW- B.....	59
Figura 18- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: HW- C.....	60
Figura 19- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Fucose)..	60
Figura 20- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Xylose)..	61
Figura 21- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (3- <i>O</i> -Me-Gal).	61
Figura 22- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Manose)..	62
Figura 23- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Glucose).	62
Figura 24- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Galactose).	63
Figura 25- Esquema da purificação dos polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação por extração aquosa a frio (CW).....	65
Figura 26- Espectro de RMN de ¹³ C das frações (A) SF3CW-A, (B) SF-PFCW-A, (C) PF2-SFCW-A e (D) PF2-CW-A de <i>P. ostreatus</i>	69
Figura 27- (A) Cromatograma obtido por CG-EM para a fração IHW-A e SHW-A.....	71
Figura 28- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração IHW-B e SHW-B	72
Figura 29- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração IHW-C e SHW-C.....	73
Figura 30- Cromatograma obtido por CG-EM das frações IHW-A e B.	75
Figura 31- Espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados (I: 2,3,4,6-Me ₄ Glc; II: 2,4,6-Me ₃ Glc obtidos após derivatização química (metilação).....	76
Figura 32- Espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados (III: 2,4-Me ₂ Glc) obtidos após derivatização química (metilação).....	76
Figura 33- Cromatograma obtido por CG-EM da fração IHW-C e espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados (I: 2,4,6-Me ₃ Glc) obtidos após derivatização química (metilação).	78
Figura 34- Espectro de RMN de ¹³ C da fração (A) IHW-A analisada em Me ₂ SO-d ₆ a 70 °C.	79

Figura 35- Estrutura química da β -glucana (1 \rightarrow 3) com ramificação em O-6 por terminais não redutores isolada das extrações a quente de <i>P. ostreatus</i> em cajuí e marupá.....	80
Figura 36- Provável estrutura química da β -glucana (1 \rightarrow 3) linear isolada das extrações a quente de <i>L.strigosus</i> em cajuí.	80
Figura 37- Espectro de RMN de ^{13}C da fração SHW-A.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tempo médio de desenvolvimento das linhagens fúngicas cultivadas em dois tipos de substratos.	52
Tabela 2- Eficiência Biológica de duas linhagens de cogumelos cultivados em dois tipos de substratos.	54
Tabela 3- Rendimento do cultivo dos cogumelos cultivados em cajuí e marupá.....	54
Tabela 4-Perda de matéria orgânica de duas linhagens de cogumelos cultivados em dois tipos de substratos.....	54
Tabela 5- Composição monossacarídica das frações polissacarídicas brutas obtidas do corpo de frutificação de <i>P. ostreatus</i> e <i>L. strigosus</i>	56
Tabela 6- Composição monossacarídica das frações solúveis e insolúveis provenientes do congelamento/degelo, obtidas no processo de purificação de polissacarídeos de <i>P. ostreatus</i> e <i>L. strigosus</i>	66
Tabela 7- Composição monossacarídica das frações submetidas à solução de Fehling provenientes do processo de purificação de polissacarídeos de <i>P. ostreatus</i> e <i>L. strigosus</i> cultivados em diferentes substratos.	67
Tabela 8- Assinalamentos dos espectros de RMN de ¹³ C das frações SF3CW-A, SF-PFCW-A, PF2-SFCW-A e PF2-CW-A de <i>P. ostreatus</i>	68
Tabela 9-Composição monossacarídica das frações solúveis e insolúveis provenientes do congelamento/degelo da extração à quente obtidas do corpo de frutificação de <i>P. ostreatus</i> e <i>L. strigosus</i>	70
Tabela 10- Análise por metilação das glucanas isoladas dos corpos de frutificação das amostras IHW-A, B e C. Analisado em CG-EM (coluna HP5) após metilação, hidrólise ácida total (ácido fórmico 45% por 18h), redução (NaB ₂ H ₄) e acetilação.	77
Tabela 11- Assinalamentos do espectro de RMN de ¹³ C da fração IHW-A. Fração insolúvel de <i>P. ostreatus</i> cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.	79

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Fungos comestíveis	15
2.2 Carboidratos	16
2.3 Importância dos polissacarídeos de fungos	27
2.4 <i>Lentinus strigosus</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
3. OBJETIVOS.....	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1 Cultivo dos basidiomicetos.....	38
4.2 Extração aquosa dos polissacarídeos	41
4.3 Purificação dos polissacarídeos	42
4.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo.....	44
4.3.2 Precipitação com solução de Fehling	44
4.4 Análise estrutural dos polissacarídeos	45
4.4.1 Composição monossacarídica (hidrólise ácida total, redução e acetilação).....	45
4.4.2 Metilação dos polissacarídeos	46
4.5 Métodos analíticos.....	47
4.5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	47
4.5.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Cultivo	48
5.2 Purificação e caracterização	55
5.2.1 Purificação e caracterização dos polissacarídeos da fração CW (A, B e C)	63
5.2.2 Purificação e caracterização dos polissacarídeos da fração HW (A, B e C)	70
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
7. REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

Existe na região amazônica uma grande quantidade de resíduos (madeireiros, agroflorestais e agroindustriais), cujo quantitativo tem sido subestimado, os quais constituem fontes potenciais para utilização no cultivo de fungos comestíveis na região, ou seja, pode-se utilizar tais resíduos de forma sustentável. Justifica-se, o uso de resíduos regionais no cultivo de fungos comestíveis, pois apresentaram resultados promissores quanto à produtividade e valor protéico dos fungos cultivados nestes substratos (SALES-CAMPOS, 2008). A utilização de fungos na conversão de resíduos lignocelulósicos em cogumelos comestíveis, através da interação fungo x substrato, é um dos processos mais importantes do ponto de vista econômico e biotecnológico, pois combina a produção de alimentos ricos em proteínas com a redução da poluição do meio ambiente. Além dos fungos comestíveis apresentarem a capacidade de bioconversão do resíduo em alimento, o substrato residual resultante do cultivo destes pode ainda ser utilizado como forragem para animais, condicionador de solo ou fertilizante natural ou como alimento para animais, fechando o ciclo de aproveitamento da matéria-prima (SANCHÉZ, 2010).

Os cogumelos apresentam um alto valor protéico, baixo teor lipídico, carboidratos, sais minerais, vitaminas e aminoácidos essenciais, que ajudam na manutenção de um bom equilíbrio nutricional podendo ser comparado com ovos, leite e carne (SANCHÉZ, 2010). Os cogumelos comestíveis podem vir a ser uma solução para alguns problemas de importância global, como a carência de proteínas na alimentação e a possibilidade de manejo ambiental, pois estes são fontes de proteína de alta qualidade, que podem ser produzidos com maior eficiência biológica do que a proteína animal e,

portanto, podem ter grande importância nos países em desenvolvimento para enriquecimento da dieta de populações com carências protéicas (SALES-CAMPOS, 2008).

Os polissacarídeos de fungos possuem uma ampla gama de aplicações. Na área de alimento, a pululana é usada como pró-biótico para promover seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium* spp no intestino humano. Na área da saúde, alguns polissacarídeos são usados como agentes antitumorais (CUNHA *et al*, 2009; SILVA *et al*, 2006). Além de apresentarem estas propriedades, estas biomoléculas são menos susceptíveis à variabilidade em suas propriedades químicas e físicas, mantendo o padrão de qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Além disso, sua recuperação e purificação apresentam dificuldades menores, comparadas as moléculas provenientes dos vegetais (SILVA *et al.*, 2006).

Sabendo que a Amazônia apresenta a maior biodiversidade do mundo e que esta continua sendo um patrimônio quase inexplorado, pretende-se buscar novas moléculas derivadas de cogumelos comestíveis que tenham aplicabilidade para indústria farmacêutica ou alimentícia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos comestíveis

O reino Fungi compreende quase 5 milhões de espécies, as quais estão distribuídas em quatro filos *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota* (HEITMAN, 2011). Os fungos tem importância ecológica, pois são grandes decompositores do mundo, degradando os restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas. Sua importância econômica está pautada principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica (ALEXOPOULOS *et al*, 1996).

Muitos fungos comestíveis pertencem ao filo *Basidiomycota*, cuja estrutura morfológica é constituída basicamente por micélio, formados por filamentos ou hifas (do grego *hypha*=rede), e basidioma, também chamado de basidiocarpo, corpo de frutificação ou cogumelo. Dentre os quais, muitos apresentam a forma que lembra um guarda-chuva com um “chapéu” (píleo) e uma haste (estipe) (Figura 1) (ALEXOPOULOS *et al*, 1996; REN *et al*, 2012).

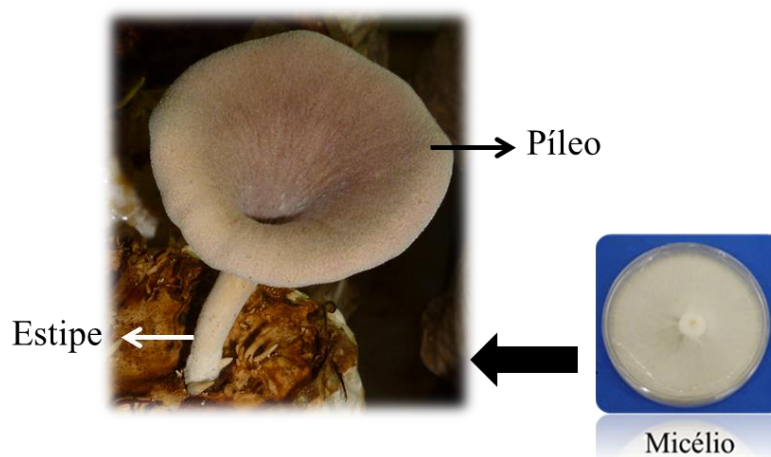


Figura 1- Estrutura morfológica geral dos basidiomicetos

Fonte: figura do próprio autor

Os cogumelos comestíveis são produzidos ao redor do mundo, pois além de serem fáceis de cultivá-los em uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, apresentam propriedades nutritivas que promovem a saúde humana (KALAC, 2013; SANCHÉZ, 2010).

Além destas propriedades nutricionais, os cogumelos possuem normalmente componentes naturais com atividade antimicrobiana, pois precisam sobreviver ao seu ambiente natural. Portanto, componentes antibacterianos e antifúngicos podem ser isolados do corpo de frutificação, micélio e do cultivo submerso (caldo fermentado proveniente de uma fermentação submersa), trazendo benefícios para humanidade (ALVES *et al*, 2014; COHEN *et al*, 2002).

Com a comprovação científica de seus efeitos imunomodulatórios e antitumorais, tem sido intensificado o cultivo, o consumo e estudos a respeito de seus componentes bioativos, muitos dos quais, isolados dos corpos de frutificação (ARANGO & NIETO 2013; LINDEQUIST *et al*, 2005).

Nas últimas décadas houve o aumento da prevalência de doenças infecciosas em todo o mundo. Alguns fármacos que são usados na prevenção e no tratamento de determinadas patologias, estão perdendo seu efeito microbicida, devido à resistência aos medicamentos comumente empregados. Assim, são buscadas novas substâncias eficientes contra micro-organismos resistentes aos tratamentos convencionais (ALVES *et al*, 2012).

2.2 Carboidratos

Carboidrato é a designação dada aos açúcares, compreendendo o grupo de mono, oligo e polissacarídeos. Os polissacarídeos são polímeros formados por

monossacarídeos unidos por ligações *O*-glicosídicas. Sabe-se que suas funções estão relacionadas com a estrutura química, podendo ser ramificados ou lineares e de acordo com os monômeros presentes na molécula podem ser classificados em homopolissacarídeos, com apenas um tipo de monossacarídeo, e heteropolissacarídeos, dois ou mais tipos de monossacarídeos, apresentando diferentes configurações glicosídicas (NELSON & COX, 2011; REN *et al*, 2012; SMIDERLE *et al*, 2006; WASSER, 2002).

Os homopolissacarídeos podem exercer principalmente a função estrutural e de reserva, sendo os polissacarídeos mais conhecidos a celulose, formada por unidades de D-glucose com ligações β (1 \rightarrow 4), e o glicogênio, formado por subunidades de glucose ligadas por α (1 \rightarrow 4) com ligações α (1 \rightarrow 6) nas ramificações.

As glucanas (homopolissacarídeo), constituídas por unidades repetitivas de D-glucose, apresentam configuração α , exemplo glicogênio, β , exemplo pleurana com ligações (1 \rightarrow 3), ou a mistura de α e β , sendo uma das moléculas comumente pesquisadas. Tem funções estrutural, de reserva, proteger a hidratação das hifas e regular a concentração de glucose extracelular, contribuindo na manutenção do pH ótimo para as enzimas ligninolíticas (KAGIMURA *et al*, 2015; SILVA *et al*, 2006; VANNUCCI *et al*, 2013).

Várias glucanas de cogumelos tem sido isoladas e caracterizadas, sendo relatados seus efeitos imunomodulador, profilático e antitumoral. As moléculas mais descritas e que têm demonstrado atividade antitumoral são as que apresentam ligações β (1 \rightarrow 3) com ramificação (1 \rightarrow 6) (Figura 2) (Quadro 1) (KAGIMURA *et al*, 2015; REN *et al*, 2012).

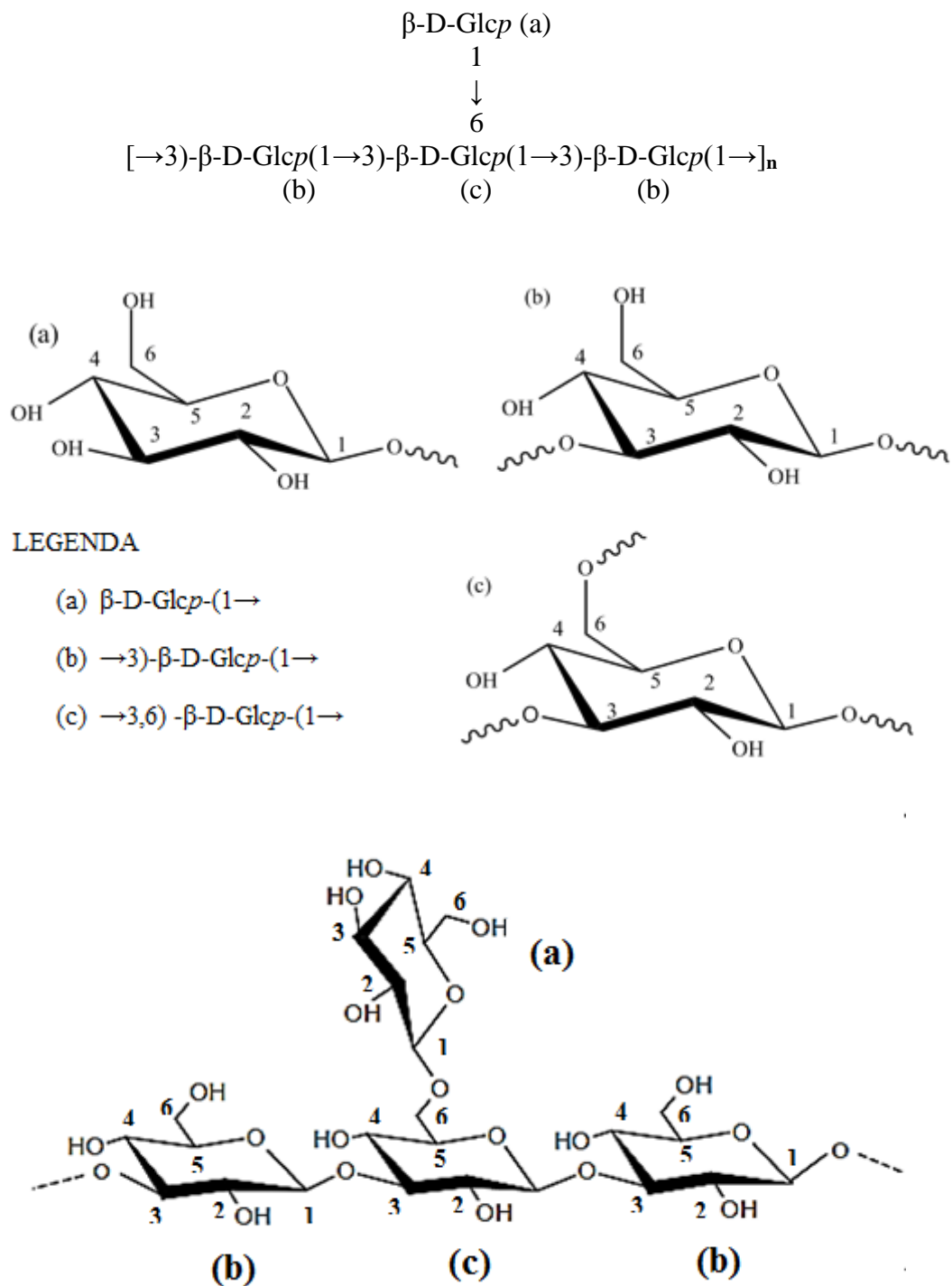


Figura 2- Estrutura química da β -glucana (1 \rightarrow 3) com ramificação β (1 \rightarrow 6), sendo uma substituição a cada 3 unidades da cadeia principal.

Basidiomicetos	Características estruturais	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
<i>Agaricus brasiliensis</i>	$M_w=6,09 \times 10^2$ Da Cadeia principal: composta por β -D-Glcp (1→3) Ramificação em O-6 das unidades Glcp (1→3) com unidades Glcp (1→6)	Extração: Aquosa à quente (100 °C) Purificação: Cromatografia de gel permeação; diálise (membrana 3,5 kDa), TF-IV, RMN monodimensional Propriedades biológicas: Anti-herpético	CARDOZO <i>et al</i> , 2013, 2014.
<i>Agrocybe cylindracea</i>	$M_w=20 \times 10^4$ Da $[\alpha]_D + 24^0$	Extração: aquosa à quente. Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: Hidrólise ácida, metilação, degradação de Smith, CG-EM, RMN monodimensional e rotação óptica específica. Propriedades biológicas: Hipoglicêmico	KIHO <i>et al</i> , 1994

Quadro 1- β -glucanas (1→3) (1→6) provenientes do corpo de frutificação de basidiomicetos (continuação).

Basidiomicetos	Características estruturais	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
<i>Amanita muscaria</i>	Polissacarídeo denominado: β GLC- <i>Am</i> $M_w=16,2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$	Extração: KOH 2% (~98°C). Purificação: Solução Cu^{2+} (Fehling), diálise (membrana $M_w=100 \text{ kDa}$), Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: Hidrólise ácida, metilação e degradação de Smith, CG-EM e RMN mono e bidimensional. Propriedades biológicas: Anti-inflamatório	RUTHES ^a <i>et al</i> , 2013
<i>Cryptoporus volvatus</i>	$M_w=44,0 \times 10^4 \text{ Da}$ $[\alpha]_D^{30} + 19,2^0$ (c 0,107%, H_2O)	Extração: aquosa à quente (85-90°C) e utilização de protease. Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: TF-IV, Hidrólise ácida, metilação, utilização da exo-(1→3)- β -glucanase, Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), CG-EM, Microscópio eletrônico, RMN monodimensional e rotação óptica específica Propriedades biológicas: Antitumoral	KITAMURA <i>et al</i> , 1994

Quadro 1- β -glucanas (1→3) (1→6) provenientes do corpo de frutificação de basidiomicetos. (continuação).

Basidiomicetos	Características estruturais	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
<i>Dictyophora indusiata</i>	Polissacarídeo denominado DI $M_w = \sim 536 \times 10^4 \text{ Da}$ Estrutura em tripla hélice.	Extração: Aquosa à quente (90 °C). Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: Hidrólise ácida, TF-IV, CG-EM e RMN monodimensional, Congo Red e UV. Propriedades biológicas: Imunomodulador	FU <i>et al</i> , 2015
<i>Grifola frondosa</i>	Polissacarídeos denominados GFPBW1 $M_w = 300 \times 10^3 \text{ Da}$	Extração: NaOH 5% Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: TF-IV, Hidrólise ácida, metilação, CG-EM, RMN mono e bidimensional. Propriedades biológicas: Antitumoral e imunomodulador	FANG <i>et al</i> , 2012

Quadro 1- β -glucanas (1→3) (1→6) provenientes do corpo de frutificação de basidiomicetos (continuação).

Basidiomicetos	Características estruturais	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
<i>Lactarius rufus</i>	<p>Polissacarídeos denominados de FSHW (fração solúvel e mais ramificada) e IHW (fração insolúvel e menos ramificada)</p> <p>$M_w = 1,13 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (FSHW)</p> <p>Presença de ligações D-Glcp (1→, Glcp (1→3) e Glcp (1, 3→6), na razão molar 1:1,2:1 (FSHW) e 1:3:1 (IHW)</p>	<p>Extração: aquosa a frio (4°C) e à quente (~98°C)</p> <p>Purificação: Solução Cu^{2+}(Fehling) e diálise</p> <p>Caracterização estrutural: Hidrólise ácida, metilação e degradação de Smith, CG-EM, RMN mono e bidimensional.</p> <p>Propriedades biológicas: Antinociceptivo e anti-inflamatório</p>	RUTHES ^b <i>et al</i> , 2013
<i>Phellinus ribis</i>	<p>Polissacarídeo denominado PRG</p> <p>$[\alpha]_D^{20} +32,1^\circ$ (c 0,1; H₂O)</p> <p>$M_w = 5,16 \times 10^3 \text{ Da}$.</p> <p>Ramificações em O-6 das unidades Glcp, por um oligossacarídeo.</p>	<p>Extração: Aquosa à quente (90 °C).</p> <p>Purificação: Cromatografia de gel permeação e troca iônica.</p> <p>Caracterização estrutural: Hidrólise ácida, metilação, degradação de Smith, infravermelho transformada de Fourier (TF-IV), CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e RMN (ressonância magnética nuclear) mono e bidimensional, rotação óptica específica.</p> <p>Propriedades biológicas: auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas.</p>	LIU <i>et al</i> , 2015

Quadro 1- β -glucanas (1→3) (1→6) provenientes do corpo de frutificação de basidiomicetos. (continuação).

Basidiomicetos	Características estruturais	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Polissacarídeo denominados de SGHW $M_w = 9,75 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$	Extração: aquosa a frio (4°C) e à quente (~98°C). Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: Hidrólise ácida, metilação e degradação de Smith, CG-EM, RMN mono e bidimensional. Propriedades biológicas: Imunomodulador	CARBONERO <i>et al</i> , 2012
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	$M_w = \sim 45 \times 10^3 \text{ Da}$	Extração: aquosa à quente (120°C) e utilização xilanase e celulase. Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: TF-IV, Hidrólise ácida, CG-EM, Congo red e microscópio de força atômica (MFA) Propriedades biológicas: Imunomodulador	SATITMANWIWAT <i>et al</i> , 2012

Quadro 1- β -glucanas (1→3) (1→6) provenientes do corpo de frutificação de basidiomicetos.

Embora as β -glucanas sejam as mais relatadas na literatura, os heteropolissacarídeos têm recebido atenção, pois muitos destes podem atuar também como modificadores de resposta biológica. São mais complexos que os homopolissacarídeos, pois podem variar em sua composição monossacarídica, em sua configuração anomérica, no tipo de ligação e ramificação, além de alguns destes polissacarídeos apresentarem naturalmente em sua composição monossacarídeos metilados (RUTHES *et al*, 2016).

De acordo com o monossacarídeo majoritário presente em sua cadeia principal, os heteropolissacarídeos podem ser denominados de heteroglucanas, heterogalactanas, e heteromananas, contendo altos teores de glucose, galactose e manose, respectivamente (RUTHES *et al*, 2016; SILVA, 2014).

As heteroglucanas (Figura 3) que foram isoladas até o presente momento apresentam em sua cadeia principal β -D-glucopiranoose (β -D-Glcp) com ligações do tipo (1 \rightarrow 6); (1 \rightarrow 4) e/ou (1 \rightarrow 3), contendo diferentes substituintes ligados em O-3 ou O-6, como β -D-Glcp, α -D-galactopiranoose (α -D-Galp), α -L-fucopiranoose (α -L-Fucp) e α -D-glucopiranoose (α -D-Glcp), sendo também observados pequenas ramificações ou dissacarídeos, tais como: β -manopiranoose (β -D-Manp) e α -D-Galp (1 \rightarrow 6); β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow (RUTHES *et al*, 2016).

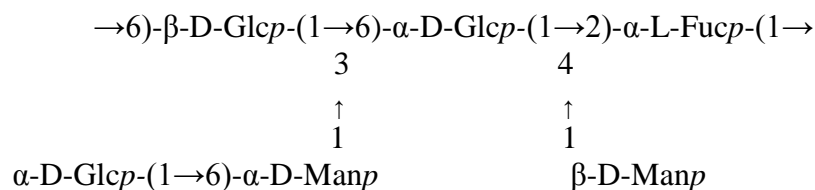


Figura 3 - Heteroglucana isolada de *P. ostreatus*. Cadeia principal composta por unidade repetidas de α e β -Glcp (1 \rightarrow 6) e α -Fucp (1 \rightarrow 2), Ramificações em O-4 e O-3 das unidades α - e β -Glcp, respectivamente, por terminais não redutores α -D-Manp e pelo dissacarídeo α -Glcp (1 \rightarrow 6)- α -Manp (1 \rightarrow

(PATRAS *et al*, 2013).

As heteroglucanas, heteromananas e heterogalactanas são nomeadas de acordo com a constituição monossacarídica dos grupos laterais. Exemplo: As heterogalactanas que contêm apenas fucose ou manose como cadeia lateral são conhecidas como fucogalactanas e manogalactanas, respectivamente, e aquelas que possuem ambos os monossacarídeos são denominadas de fucomanogalactanas ou manofucogalactanas de acordo com a proporção dos mesmos.

As heterogalactanas isoladas de cogumelos apresentam comumente em sua cadeia principal α -D-Galp com ligações glicosídicas do tipo 1→6 (**Figura 4I**), contendo diferentes substituintes ligados em O-2, principalmente por α -L-Fucp (**4II**) e/ou α - ou β -manopiranosose (α/β -D-Manp) (**4III** e **4IV**, respectivamente), β -galactopiranosose (β -D-Galp) (**4V**) e pelo dissacarídeo 3-O- α -D-manopiranosil- α -L-fucopiranosil (**4VI**). Além disso, outras podem conter unidades de galactose com substituição em O-3 por grupos metil, ou seja, possuem o monossacarídeo 3-O-metil-galactose (3-O-Me-Galp) (**g**), sendo denominadas de heterogalactanas parcialmente metiladas (Figura 4) (SILVA, 2014).

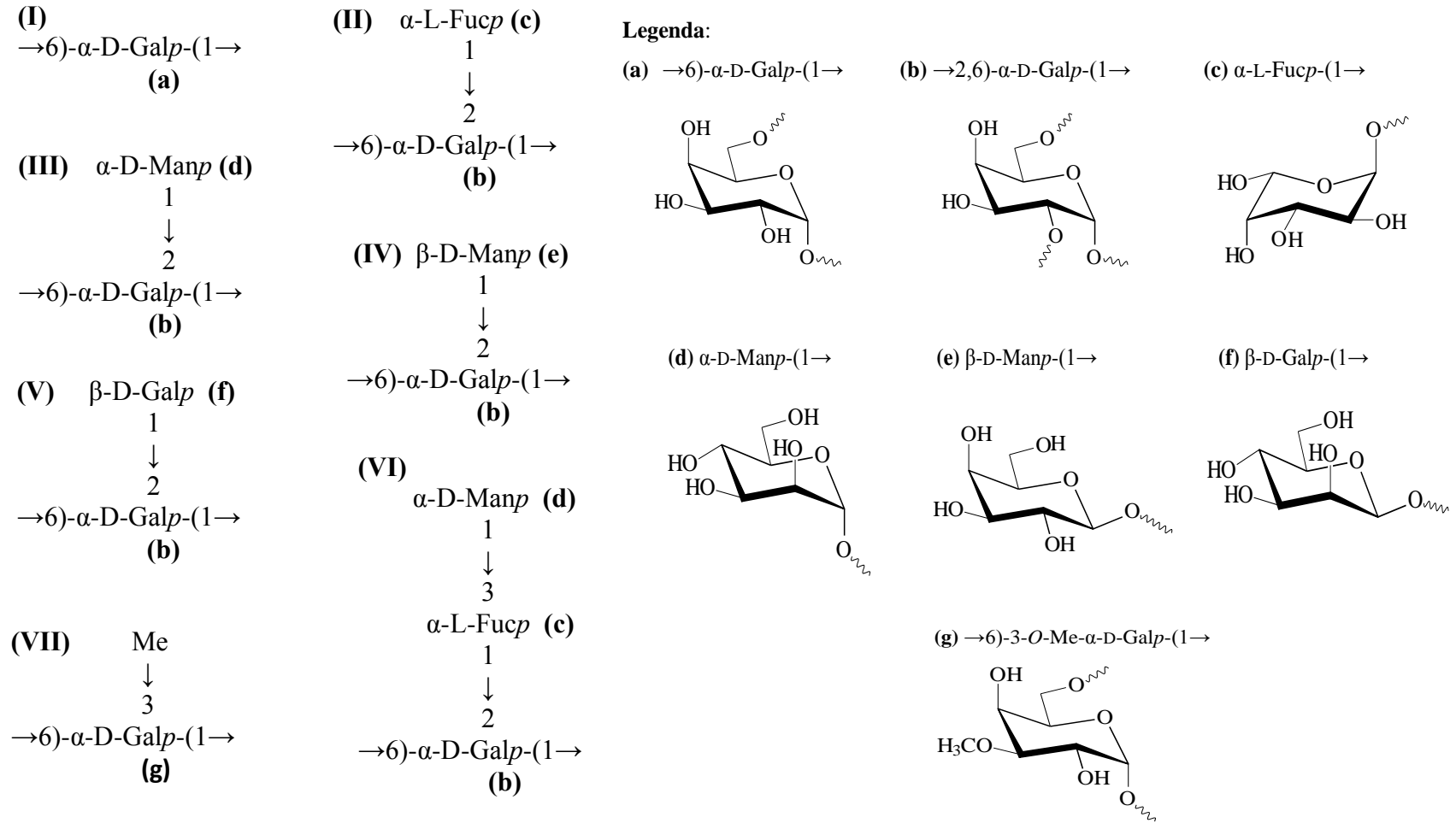


Figura 4- Representação esquemática dos principais fragmentos presentes nas heterogalactanas isoladas de cogumelos

As heteromananas isoladas de basidiomicetos ainda são pouco relatadas, todavia as que foram descritas, apresentam cadeias principais similares, constituída principalmente de α - ou β -manopiranosose (Manp) com ligações glicosídicas (1 \rightarrow 3). A partir do basidioma de *Ganoderma lucidum* foi obtida uma fucoxilomanana distinta das anteriores, sendo formada por unidades de D-Manp unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4) e substituídas em O-3 pelo dissacarídeo 4-O-L-Fucp-D-Xylp (Figura 5) (SILVA, 2014). Pode-se citar ainda galactomananas e glucogalactomananas, heteromananas isoladas de cogumelos (RUTHES *et al*, 2016).

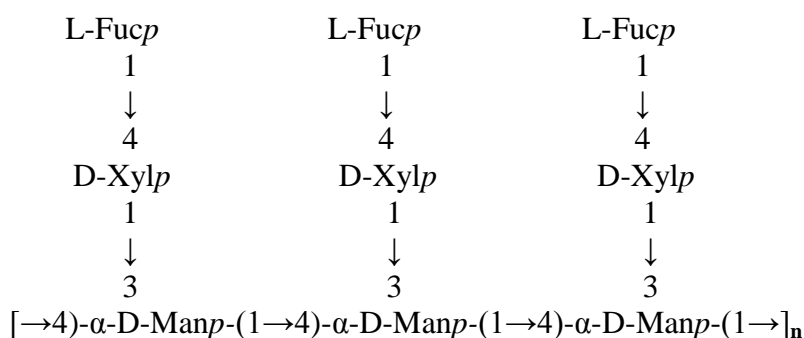


Figura 5- Representação esquemática de heteromanana (fucoxilomananas) isoladas de *Ganoderma lucidum* (MIYAZAKI & NISHIJIMA, 1982).

Sabe-se que alguns fatores podem influenciar a atividade imunomoduladora e antitumoral destes polissacarídeos, as quais incluem: peso molecular, o grau de ramificação e conformação das cadeias laterais. Isso implica que a estrutura é reconhecida dentro dos sistemas biológicos, assim sendo, é importante à elucidação estrutural destas moléculas (MAEDA *et al*, 1988; OOI & LIU, 2000; VANNUCCI *et al*, 2013).

2.3 Importância dos polissacarídeos de fungos

Como relatado em parágrafos anteriores, moléculas bioativas, principalmente os polissacarídeos, podem ser extraídos e isolados tanto do corpo de frutificação, do micélio e a

partir do cultivo submerso (caldo fermentado). A busca por estas moléculas vem crescendo nos últimos anos, aumentando o interesse por estes polímeros, pois apresentam aplicações para indústria alimentícia, exemplo pré-biótico e suplemento alimentar (Figura 6) (SILVA *et al*, 2006; CUNHA *et al*, 2009), farmacêutica, utilizados como veículo de liberação de fármaco (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009). Todavia, os estudos tem se concentrado principalmente, em aplicá-los como agentes antitumorais (KAGIMURA *et al*, 2015), sendo descrito polissacarídeo isolado dos cogumelos *Lentinus edodes* e *Schizophyllum commune* denominado de lentinana e esquizofilana, respectivamente com estrutura β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), os quais tornaram-se clinicamente relevantes no Japão, no auxílio ao tratamento contra o câncer (LINDEQUIST *et al*, 2005).



Figura 6- Produto formulado a base de polissacarídeo isolado de *Pleurotus ostreatus*.

Fonte: <http://www.imunoglukan.com/imunoglukan-phenomenon/imunoglukan-p4h-capsules.html/>

2.4 *Lentinus strigosus* e *Pleurotus ostreatus*

A floresta amazônica apresenta uma grande diversidade de fungos, dentre estes estão *Lentinus strigosus* e *Pleurotus ostreatus*, os quais foram o foco deste estudo.

A espécie *Lentinus strigosus* (Figura 7) pertence ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales e família Polyporaceae. Esta é

encontrada na região Amazônica, sendo relatado seu consumo por grupos indígenas desta região (VARGAS-ISLA *et al*, 2015).

Existem poucos trabalhos relacionados com este macrofungo, dentre estes a composição centesimal em relação ao cultivo, (SALES-CAMPOS *et al*, 2013), avaliação biológica, a qual demonstrou *in vitro* atividade antiparasitária (COTA *et al*, 2008; SOUZA-FAGUNDES *et al*, 2010), e o efeito hipoglicêmico atribuído ao exopolissacarídeo produzido em cultura submersa por esta espécie (YAMAC *et al*, 2008).



Figura 7- Corpo de frutificação de *L. strigosus*

Fonte: próprio autor

Ao contrário de *L. strigosus*, o basidiomiceto *P. ostreatus* tem sido amplamente estudado quanto avaliação biológica.

P. ostreatus (Figura 8) pertence ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Agaricales e família Pleurotaceae (NCBI, 2016).

Os fungos do gênero *Pleurotus* são conhecidos como cogumelos “ostra”, os quais podem ser encontrados em florestas úmidas tropicais e subtropicais. As espécies desse gênero possuem ampla distribuição mundial, sendo algumas encontradas em áreas da mata atlântica brasileira. A maioria das espécies é comestível, possuindo alto índice protéico, vitamínico e

de carboidratos, e baixo teor de gordura, tornando estes cogumelos apropriados para incorporação na dieta humana (RIVAS *et al*, 2010).



Figura 8- *Pleurotus ostreatus*

Fonte: do próprio autor

P. ostreatus apresenta ações, descritas *in vivo* e *in vitro*, imunomodulador, antioxidante e antitumoral, devido à presença de moléculas bioativas (Quadro 2) (COHEN *et al*, 2002; JEDINAK & SLIVA, 2008; ROUPAS *et al*, 2012).

P. ostreatus é uma das espécies mais cultivadas em nível mundial, sendo facilmente produzida (HOLTZ *et al*, 2009; SALES-CAMPOS, 2008; SÁNCHEZ, 2010), devido à capacidade de degradar uma larga variedade de substratos lignocelulósicos, produzidos pela agricultura, florestas e indústria alimentícia (COHEN *et al*, 2002).

Polissacarídeo	Parte do material biológico	Características estruturais*	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
GLUCANA	BASIDIOMA	Composição monossacarídica: Glc β -glucanas com ligações (1→3), (1→6) e (1→4); Fração ¹ M_w = 1137 kDa, Fração ² M_w = 19 kDa	Extração: Ácido clorídrico (HCl) (3,8% a 30 °C). Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: métodos enzimáticos: (liticase, exo-1,3- β -d-glucanase/ β -glucosidase), IR, UV e Espectrometria de massas.	SZWENGIEL & STACHOWIAK, 2016
		Composição monossacarídica: Glc (84,8%), Man (10,8%) e Xyl (4,3%). Cadeia principal composta por unidades repetidas de α -Glc _p (1→3) e α -Glc _p (1→4) Ramificações em O-6 das unidades α -Glc _p (1→3) e (1→4).	Extração: metanol (MeOH), seguida de cloreto de sódio (NaCl), carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃), hidróxido de sódio (NaOH) e borohidreto de sódio (NaBH ₄) extração à quente. Purificação: Coluna cromatográfica C-18 fase reversa. Caracterização estrutural: CG-EM, RMN monodimensional, IR-FT. Atividade biológica: Antitumoral	WIATER <i>et al</i> , 2011

Quadro 2- Polissacarídeos isolados de *P. ostreatus*. *Glc: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Xyl: Xilose; Ara: Arabinose; Rha: Raminose; Fuc: Fucose (continuação).

Polissacarídeo	Parte do material biológico	Características estruturais*	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
GLUCANA	BASIDIOMA	<p>Composição monossacarídica: Glc $M_w = 2,4 \times 10^4 \text{Da}$.</p> <p>Cadeia principal composta por unidades repetidas de $\beta\text{-D-Glcp}$ (1\rightarrow3);</p> <p>Ramificações: $\alpha\text{-D-Glcp}$ ligados a resíduos de Glc</p>	<p>Extração: Aquosa à quente.</p> <p>Purificação: Cromatografia de troca iônica.</p> <p>Caracterização estrutural: CG, metilação e RMN monodimensional;</p>	SAITÔ <i>et al</i> , 1976
		<p>Polissacarídeos isolados da Fração A₅:</p> <p>a) $H_{51} = [\alpha]_D^{20} +16^\circ$ b) $H_{52} = [\alpha]_D^{20} +128^\circ$ c) $H_{53} = [\alpha]_D^{20} -24^\circ$</p> <p>Composição monossacarídica: H₅₁ e H₅₃, constituído principalmente de resíduos de Glc, com traços de Gal e Man; H₅₂= heteroglucana constituída de resíduos de Gal e Man;</p> <p>Cadeia principal composta por unidades repetidas de $\beta\text{-D-Glcp}$ (1\rightarrow3) para os três polissacarídeos.</p> <p>Ramificação: H₅₁ H₅₂ e H₅₃ contém resíduos de $\alpha\text{-Glc}$, Gal e Man</p>	<p>Extração: Aquosa.</p> <p>Purificação: Gel permeação e Cromatografia de troca iônica.</p> <p>Caracterização estrutural: CG- EM; IR, rotação óptica específica.</p> <p>Atividade biológica: H₅₂ e H₅₃ não apresentaram atividade antitumoral, apenas H₅₁.</p>	YOSHIOKA <i>et al</i> , 1975

Quadro 2- Polissacarídeos isolados de *P. ostreatus*. *Glc: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Xyl: Xilose; Ara: Arabinose; Rha: Raminose; Fuc: Fucose (continuação).

Polissacarídeo	Parte do material biológico	Características estruturais*	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
GLUCANA	MICÉLIO	Composição monossacarídica: não realizada. $M_w = 1 \times 10^4 - 1.5 \times 10^6$ Da	Extração: Álcool etílico (EtOH) (95%). Purificação: Cromatografia de gel permeação. Caracterização estrutural: CLAE, UV e TF-IV. Atividade biológica: antitumoral contra linhagens celulares do carcinoma humano (cólon e endométrio)	SILVA <i>et al</i> , 2012
HETEROPOLISSACARÍDEO	BASIDIOMA	Composição monossacarídica (fração POPw): Glc (52,3%), Gal (25,8%), Man (10,0%), Rha (6,1%), e Ara (5,2%). $M_w = 2,3 \times 10^4$ Da	Extração: EtOH (95%, 4°C por 24h). Purificação: Cromatografia de troca iônica Caracterização estrutural: CG-EM. Atividade biológica: proteger a mucosa gástrica	YANG <i>et al</i> , 2012

Quadro 2- Polissacarídeos isolados de *P. ostreatus*. *Glc: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Xyl: Xilose; Ara: Arabinose; Rha: Raminose; Fuc: Fucose (continuação).

Polissacarídeo	Parte do material biológico	Características estruturais*	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
HETEROPOLISSACARÍDEO	BASIDIOMA	<p>Composição monossacarídica: Glc e Gal (7:1) $[\alpha]_D^{25} +18.6^\circ$ (c 0.094, H₂O) $M_w \sim 1.87 \times 10^5$ Da.</p> <p>Cadeia principal composta por β-Glc_p ligadas (1→3) e (1→6), em uma proporção 1:2.</p> <p>Ramificações em O-3 das unidades de β-Glc_p (1→6) com resíduos de α-D-Glc_p e α-D-Galp;</p>	<p>Extração: Aquosa à quente.</p> <p>Purificação: Cromatografia de gel permeação.</p> <p>Caracterização estrutural: CG-EM, RMN mono e bidimensional, metilação e oxidação com periodato de sódio, rotação óptica específica.</p> <p>Atividade biológica: Imunomodulador</p>	MAITY <i>et al</i> , 2011
		<p>Composição monossacarídica (fração POPS-1): Glc, Gal e Man (7,9: 2,1 :1). $M_w = 31$ kDa.</p> <p>Cadeia principal composta por unidades repetidas de Glc_p (1→3).</p> <p>Ramificações em O-6 das unidades Glc_p, por dissacarídeo com Glc_p-(1→4)-Galp e um oligossacarídeo com Galp-(1→4)-Manp-(1→3)-Glc_p</p>	<p>Extração: Aquosa à quente.</p> <p>Purificação: Cromatografia de troca iônica e Gel permeação.</p> <p>Caracterização estrutural: CG-EM, metilação e oxidação com periodato de sódio e degradação de Smith.</p> <p>Atividade biológica: Antitumoral</p>	TONG <i>et al</i> , 2009

Quadro 2- Polissacarídeos isolados de *P. ostreatus*. *Glc: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Xyl: Xilose; Ara: Arabinose; Rha: Raminose; Fuc: Fucose (continuação).

Polissacarídeo	Parte do material biológico	Características estruturais*	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
HETEROPOLISSACARÍDEO	BASIDIOMA	<p>Composição monossacarídica (glucogalactana): Gal e Glc (2:1) $M_w = 2,4 \times 10^4 \text{Da}$.</p> <p>Cadeia principal composta por unidades repetidas de α-D-Galp (1\rightarrow6).</p> <p>Ramificações em O-2 das unidades Galp, por terminais não redutores β-D-Glcp (1\rightarrow3).</p> <p>Substituição a cada 03 unidades de α-D-Galp (1\rightarrow6).</p>	<p>Extração: Aquosa à quente.</p> <p>Purificação: Cromatografia de troca iônica e Gel permeação.</p> <p>Caracterização estrutural: CG-EM, metilação e oxidação com periodato de sódio e degradação de Smith; UV, IR e RMN mono e bidimensional.</p> <p>Atividade biológica: Imunomodulador</p>	SUN & LIU, 2009
	MICÉLIO	<p>Composição monossacarídica: Glc, Man e Fuc (3:2:1). $[\alpha] = \pm 25^\circ$ (c = 0.1, H₂O) $M_w = \sim 2.7 \times 10^6 \text{Da}$ Presença de ligações α e β.</p>	<p>Extração: Alcalina (KOH 2%).</p> <p>Purificação: Cromatografia gel permeação.</p> <p>Caracterização estrutural: CG-EM, IR-FT, RMN monodimensional, rotação óptica específica.</p> <p>Atividade biológica: antitumoral e imunomodulador</p>	DEVI <i>et al</i> , 2013

Quadro 2- Polissacarídeos isolados de *P. ostreatus*. *Glc: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Xyl: Xilose; Ara: Arabinose; Rha: Raminose; Fuc: Fucose (continuação).

Polissacarídeo	Parte do material biológico	Características estruturais*	Métodos de extração, purificação, caracterização estrutural e ensaios biológicos	Referências
HETEROPOLISSACARÍDEO	MICÉLIO	<p>Composição monossacarídica (fração PS): Glc, Man e Fuc (3:2:1). $[\alpha]_D^{26} + 8,5$ (c = 8,4, H₂O) $M_w = \sim 1.8 \times 10^5$ Da.</p> <p>Cadeia principal composta por unidades repetidas de α- e β-Glc_p (1→6) e α-L-Fuc_p (1→2).</p> <p>Ramificações em O-4 e O-3 das unidades α- e β-Glc_p, respectivamente, por terminais não redutores β-D-Man_p e pelo dissacarídeo α-Glc_p (1→6)-α-Man_p (1→</p>	<p>Extração: Alcalina (KOH 2%).</p> <p>Purificação: Cromatografia de gel permeação.</p> <p>Caracterização estrutural: CG-EM, RMN 2D, metilação e oxidação com periodato de sódio, rotação óptica específica.</p> <p>Atividade: antioxidante</p>	PATRA <i>et al</i> , 2013

Quadro 2- Polissacarídeos isolados de *P. ostreatus*. *Glc: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Xyl: Xilose; Ara: Arabinose; Rha: Raminose; Fuc: Fucose.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Cultivar, extrair e caracterizar polissacarídeos dos basidiomicetos comestíveis, *Lentinus strigosus* (Schwinitz) Fries e *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) de ocorrência na Amazônia, em substratos regionais.

3.2 Específicos

- a) Cultivar os basidiomicetos comestíveis *Lentinus strigosus* e *Pleurotus ostreatus* (branco) em substratos lignocelulósicos de *Simarouba amara* (marupá) e *Anacardium giganteum* (cajuí);
- b) Analisar o rendimento, a eficiência biológica, a perda de matéria orgânica e o comportamento fisiológico destes cogumelos nos substratos lignocelulósicos regionais;
- c) Obter os polissacarídeos dos basidiomas de *Lentinus strigosus* e *Pleurotus ostreatus* através de extrações aquosas;
- d) Purificar as frações polissacarídicas obtidas utilizando diferentes metodologias como congelamento/degelo, precipitação com solução de Fehling e diálise;
- e) Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos isolados por metilação, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo dos basidiomicetos

As linhagens, *Lentinus strigosus* 1466 e *P. ostreatus* 1467, foram obtidas da Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA.

As matrizes primárias de cada espécie fúngica em estudo foram preparadas a partir de culturas contidas em tubo de ensaios, as quais foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar malte e incubadas em estufa tipo BOD a 25 ± 2 °C por 7 dias. Decorrido o tempo de incubação, discos de 8 mm de diâmetro da matriz primária foram replicados nas mesmas condições experimentais, constituindo a matriz secundária (SALES-CAMPOS & ANDRADE, 2011), a qual foi utilizada para produção da matriz terciária ou *spawn*.

A matriz terciária foi preparada, em condições axênicas, por inoculação de discos de 8 mm de micélio da matriz secundária para cada substrato, os quais foram previamente homogeneizados, umidificados a 75% e acondicionados em frações de 500g em saco de polietileno de alta densidade, lacrados com fita adesiva e autoclavados à 121 °C por 1 hora (Figura 9).

A composição dos substratos para o cultivo foi formulada com serragem (*Simarouba amara* “marupá” ou *Anacardium giganteum* “cajuí”), mistura de farelos e carbonato de cálcio (CaCO_3), em um percentual 68:30:2, respectivamente. Os resíduos madeireiros de *S. amara* e *A. giganteum*, desidratados por secador solar, foram cedidos pela Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTI/INPA). Os resíduos madeireiros foram lixiviados (2x) e secos em estufa a 100°C por 24 h para posterior uso na formulação do substrato. A mistura de farelos foi composta de arroz (*Oryza* spp., 75%), trigo (*Triticum* spp., 20%) e milho (*Zea mays*, 5%) (SALES-CAMPOS *et al*, 2010).

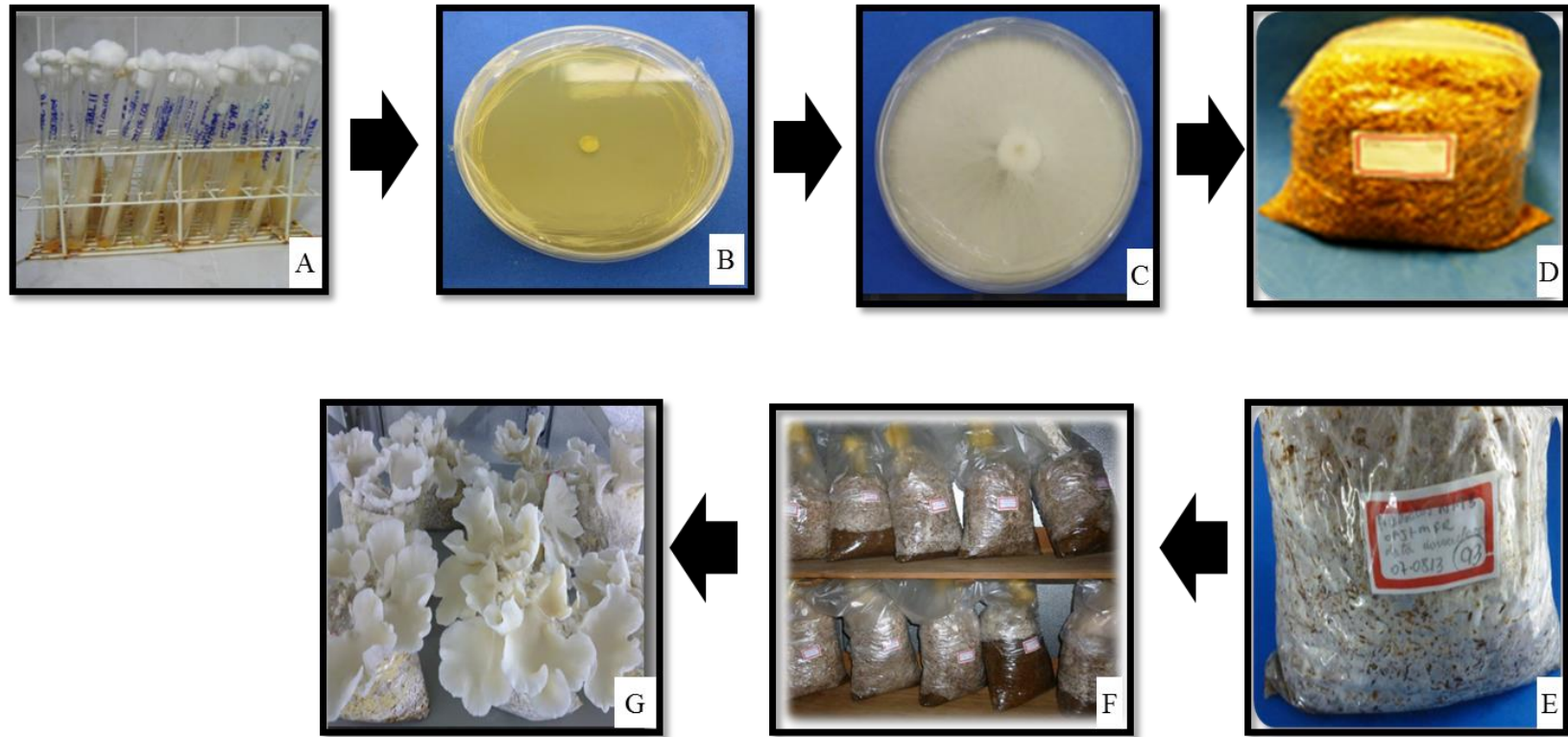


Figura 9- Esquema de produção dos basidiomicetos comestíveis. A-Cultura, B-Matriz primária, C-Matriz secundária, D-substrato elaborado e estéril, E-Matriz terciária, F-Substratos inoculados com *spawn* na câmara de incubação e G- Corpo de frutificação de *P.ostreatus*.

Para cada espécie fúngica foram preparadas 4 matrizes terciárias, ou seja, 2 contendo marupá e 2 contendo cajuí como resíduo madeireiro, as quais foram incubadas por aproximadamente 30 dias para a colonização total do substrato.

Após a colonização total do substrato, 15g da matriz terciária foram transferidas em condições axênicas para os substratos de cultivo (fechados com arame flexível e com esponjas medindo 8 cm de altura e 3 cm de largura, estéreis colocadas na extremidade de cada saco), os quais foram levados para câmara de incubação a temperatura de 25°C, e UR de 85%, na ausência de luz até a colonização do substrato pelos respectivos fungos, a qual ocorreu aproximadamente 30 dias após a inoculação. Após a colonização, os mesmos foram transferidos para a câmara de produção (temperatura foi reduzida para 22°C, UR elevada para 90% e fotoperíodo de 8h), estimulando a produção dos basidiomas (Figura 9).

O experimento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2, correspondente a duas combinações de resíduos e 2 linhagens fúngicas, com 30 repetições para cada tipo de resíduo e linhagem, totalizando 120 unidades experimentais (SALES-CAMPOS & ANDRADE, 2011).

Durante o cultivo foram analisadas as seguintes variáveis: eficiência biológica (EB), conversão dos resíduos lignocelulósicos em basidiomas (cogumelos), rendimento (R) de cogumelos produzidos (peso de cogumelos frescos por substratos), perda de matéria orgânica (PMO) decomposta pelo fungo (SALES-CAMPOS & ANDRADE, 2011). As equações utilizadas para determinar eficiência biológica (1), rendimento (2) e perda de matéria orgânica (3) são descritas:

$$(MFC/MSSi) \times 100 \text{ (1)}$$

MFC: corresponde a massa fresca de cogumelos e MSSi: massa seca de substrato inicial.

$$(MFC/MFS) \quad (2)$$

MFS: massa fresca do substrato.

$$(MSSI - MSSR/MSSI) \times 100 \quad (3)$$

MSSI: massa seca do substrato inicial e massa seca do substrato residual.

Foi avaliado também o comportamento fisiológico das linhagens (tempo de incubação, formação de primórdio, produção, números de fluxos, dimensão do píleo e altura do estipe), conforme Sales-Campos, 2008. Após o período de frutificação dos cogumelos, estes foram colhidos e pesados, sendo em seguida secos em estufa de circulação de ar ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) para determinação da umidade e massa.

Os dados de cultivo referentes à EB, R e PMO foram analisados por meio do programa *Sisvar* (versão 5.3), desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras, MG. Foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Os controles deste experimento foram igualmente constituídos, porém com a ausência da inoculação do fungo. O experimento foi conduzido por 180 dias.

4.2 Extração aquosa dos polissacarídeos

Os basidiomas desidratados de *P. ostreatus* cultivados em cajuí e em marupá e de *L. strigosus* cultivado em cajuí foram pulverizados em moinho de faca tipo willey, os quais foram denominados de A, B e C, respectivamente. Como não houve a produção do cogumelo *L. strigosus* no substrato formulado com a serragem de marupá, esta não foi processada.

Após a pulverização, as amostras A (239 g), B (184 g) e C (203 g) foram submetidas à extração aquosa a frio (**Cold Water**) ($\sim 10^\circ\text{C}$; por 10 h; 10x; 2 litros, cada)

sob agitação mecânica, e a quente (**H**ot **W**ater) (~96 °C; por 10 h; 9x; 2 litros, cada) sob refluxo em banho de água fervente.

Os extratos aquosos foram separados do material residual por filtração e centrifugação (8000 rpm, 10 min a 20°C). Após a concentração do material por rotaevaporador, os polissacarídeos foram separados dos componentes de baixa massa molecular por precipitação com etanol a 92% (v/v, 3:1), sendo estes removidos por centrifugação sob as condições citadas anteriormente.

Os precipitados etanólicos **I** (**CW-A**, **CW-B** e **CW-C**, respectivamente) e **II** (**HW-A**, **HW-B** e **HW-C**, respectivamente) após solubilização em água destilada, foram dialisados em membranas com limite de exclusão de 12-14 kDa, contra água corrente por 24 h. Decorrido o tempo, os materiais foram concentrados em rotaevaporador e liofilizados (Figura 10).

4.3 Purificação dos polissacarídeos

As frações CW (A, B e C) e HW (A, B e C) foram submetidas, separadamente, ao processo de purificação dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento, precipitação com solução alcalina de sulfato de cobre (precipitação com solução de Fehling) e diálise em membrana de 12-14 kDa.

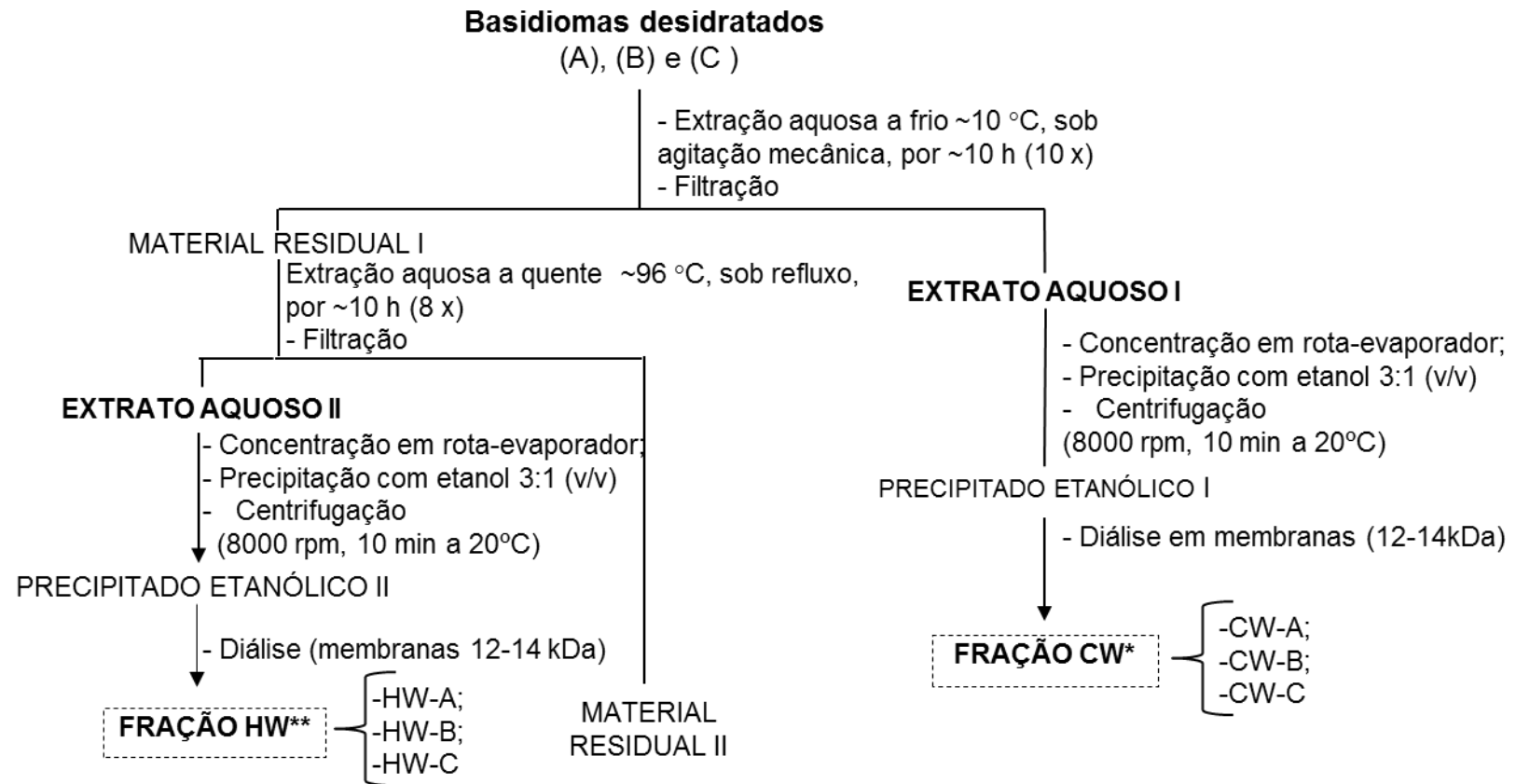


Figura 10- Fluxograma geral das extrações aquosas. CW*: Cold Water; HW**: Hot Water

4.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

A técnica de congelamento e degelo consistiu em solubilizar as frações polissacarídicas em água destilada, seguida de congelamento e posterior descongelamento à temperatura ambiente. Os precipitados insolúveis em água fria e a quente foram separados dos demais componentes solúveis por centrifugação (20°C, 8000 rpm, 10 min; 10°C, 8000 rpm, 20 min, respectivamente). Este procedimento resultou para cada extrato aquoso uma fração solúvel (SCW-A, SCW-B, SCW-C, SHW-A, SHW-B e SHW-C) e outra insolúvel em água (ICW-A, ICW-B, ICW-C, IHW-A, IHW-B e IHW-C). Este processo de purificação foi repetido diversas vezes até que não houvesse formação de precipitado no sobrenadante (CARBONERO, 2005).

4.3.2 Precipitação com solução de Fehling

As frações solúveis em água, SCW-A (3,5 g) e SCW-C (12 g) geradas por congelamento e degelo, foram submetidas à purificação por precipitação com solução de Fehling (JONES & STOODLEY, 1965). Entretanto, não foi possível submeter à fração SCW-B a esta precipitação devido ao seu baixo rendimento (0,9 g).

As frações submetidas a este procedimento foram solubilizadas primeiramente na solução A (tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de potássio (KOH), seguida da adição de igual volume da solução B (sulfato de cobre, CuSO_4). Após agitação vigorosa (24 h), o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas. Decorrido o tempo, o precipitado (PF) e sobrenadante de Fehling (SF) foram separados

por centrifugação (20°C, 8.000 rpm; 15 min), neutralizadas com ácido acético e dialisadas contra água corrente (membranas 12-14 kDa; ~ 24 h)

Após diálise, ambas foram deionizadas com resina catiônica, filtradas em algodão e novamente dialisadas contra água corrente (membranas 12-14 kDa; ~ 24 h), sendo este procedimento repetido. Após descomplexação, todas as frações foram concentradas e liofilizadas.

4.4 Análise estrutural dos polissacarídeos

4.4.1 Composição monossacarídica (hidrólise ácida total, redução e acetilação)

A composição monossacarídica foi realizada pelos seguintes procedimentos, hidrólise ácida total, redução e acetilação. Alíquotas das amostras (1-2 mg) foram hidrolisadas com 500 µL do ácido trifluoroacético (TFA) 1 molar (1 M) por 12 h ou 2 molar (2 M) do ácido trifluoroacético por 8h, mantidos em estufa a 100°C. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado por evaporação a temperatura ambiente ou em capela de exaustão. Após este procedimento, as mesmas foram reduzidas com borohidreto de sódio (NaBH₄) a temperatura ambiente (pH 9,0-10,0) por 12 horas.

Em seguida, as amostras foram neutralizadas com resina catiônica, filtradas e levadas à secura por rotaevaporação. O ácido bórico (H₃BO₃) formado foi eliminado por co-evaporação com metanol (~200-300 µL, 3x), na forma de borato de trimetila [B(OCH₃)₃].

Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac_2O) e piridina (1:1, v/v; 0,5 mL) em temperatura ambiente por 12 horas. Os acetatos de alditol foram extraídos com 1 mL de clorofórmio (CHCl_3) e a piridina residual foi removida com sucessivas adições de solução de sulfato de cobre 5% (m/v) e água destilada (1 mL), seguidas por filtração em algodão. Os derivados acetilados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SILVA, 2014).

4.4.2 Metilação dos polissacarídeos

Para a determinação do tipo de ligação glicosídica presente nos polissacarídeos, uma alíquota (15 mg) de cada fração purificada (IHW-A, IHW-B e IHW-C) foi submetida à análise por metilação. As mesmas foram solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (Me_2SO), seguida de adição de iodeto de metila (CH_3I) (1 mL) e hidróxido de sódio (NaOH) seco e triturado (4:1 de carboidrato) sendo a mistura reacional submetida a agitação vigorosa em vórtex por 30 a 40 min, seguida por um período de repouso (~24 h). Decorrido o tempo, as amostras foram neutralizadas com ácido acético e os produtos per-*O*-metilados foram removidos com CHCl_3 e, após evaporação dos solventes orgânicos, submetidos à hidrólise ácida total.

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados foi realizada com 0,5 mL de solução de ácido fórmico (CH_2O_2) 45 % a 100°C por 18 h (SILVA, 2014). Após o período necessário para hidrólise, o ácido foi evaporado e o material residual foi reduzido com borohidreto de sódio deuterado (NaBD_4), e acetilado como citado anteriormente (item 4.4.1). Os derivados metilados foram analisados na forma de

acetatos de alditóis parcialmente metilados por CG-EM e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SILVA, 2014).

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo gasoso Agilent Technologies, modelo 7820A, acoplado a espectrômetro de massa Agilent 5975E (Departamento de Química - UFG/Regional Catalão), equipado com coluna capilar de sílica fundida HP5 (0,25 mm x 30 m x 0,25 μ m) (Quadro 3), usando fonte de ionização por impacto eletrônico (70 eV) e analisador do tipo *ion trap*. Hélio ultra puro foi usado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL. min⁻¹.

COLUNA CAPILAR	
HP5 (5% defenilmetilsiloxano)	
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detector (EM)	280 °C
Rampa de eluição	<p>Análise de alditol acetato: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 240 °C (2 min).</p> <p>Análise de alditol acetato parcialmente metilado: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 250 °C (10 min), 50 °C/min até 270 °C (10 min).</p>
Modo de injeção	Split (4:1)
Volume de injeção	1 μ L

Quadro 3- Condições de análises utilizadas no CG-EM

4.5.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro–Bruker, modelo–Avance III-500 MHz (Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia, Campus Samambaia);

As análises foram realizadas a 50 ou 70°C, com as amostras de polissacarídeos (~ 35 mg) dissolvidas em óxido de deutério (D₂O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me₂SO-*d*₆). Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D₂O foram expressos em ppm (δ) relativos aos sinais de ¹³C em δ 30,20, ou de acordo com o padrão interno tetrametilsilano (TMS; $\delta_{C/H} = 0,0$) e aos sinais de Me₂SO-*d*₆ em δ 39,70 (¹³C), para as amostras solúveis no mesmo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo

A capacidade de transformar resíduos lignocelulósicos em massa fúngica tem feito com que cogumelos sejam cultivados em vários substratos. Por exemplo, *P. ostreatus* tem sido cultivado em resíduos de algodão da indústria têxtil (HOLTZ *et al*, 2009), resíduos de banana (CARVALHO *et al*, 2012), entre outros resíduos (SÁNCHEZ, 2010).

Levando em consideração a grande quantidade de resíduo madeireiro e a capacidade dos basidiomicetos de bioconversão, os basidiomicetos *L. strigosus* e *P. ostreatus* foram cultivados nos substratos “cajuí” e “marupá”, suplementados com farelos de arroz, trigo e milho, os quais auxiliam no crescimento e desenvolvimento do

micélio, promovendo a rápida colonização do substrato e consequentemente redução na probabilidade de contaminação (DONINI *et al*, 2006). A suplementação com farelos é comumente utilizada, porque atua como fonte de substâncias nutritivas e de N orgânico prontamente disponível e necessário ao aumento da massa miceliana, produtividade e eficiência biológica (MONTINI, 2001).

Os cogumelos obtidos a partir destes substratos foram avaliados quanto ao comportamento fisiológico e às características morfológicas. Os resultados relacionados ao comportamento fisiológico dos fungos cultivados em cajuí mostraram-se similares sendo observada a média de dias de colonização, emissão de primórdios e tempo de frutificação de 28, 31 e 35, respectivamente, para *L. strigosus* (número de fluxos 4) e de 29, 34 e 37, respectivamente, para *P. ostreatus* (número de fluxos 3). Por outro lado, quando utilizado o substrato marupá apenas a linhagem *P. ostreatus* desenvolveu-se, sendo observado uma média de 30, 35 e 38 dias para a colonização, emissão de primórdios e tempo de frutificação, com quatro fluxos. Pode ser observado que não houve diferença significativa no comportamento fisiológico de *P. ostreatus* nos substratos estudados (Tabela 1).

L. strigosus não se desenvolveu em “marupá”, pois provavelmente neste resíduo havia substâncias inibitórias. Supõe-se a possibilidade de que estas substâncias tenham impedido o desenvolvimento de *L. strigosus* (BONTÉ *et al*, 1996; GROSVENOR *et al*, 2006; JESUS *et al*, 1998; MARANHÃO *et al*, 2014).

Pesquisas realizadas com “marupá” para o cultivo de *L. strigosus* mostram que este resíduo foi satisfatório para o cultivo deste cogumelo (SALES-CAMPOS & ANDRADE, 2011; VARGAS-ISLA *et al*, 2012). Todavia, ao usar o mesmo resíduo não foi possível cultivar *L. strigosus* no presente estudo. Provavelmente a origem deste resíduo advindo de árvore diferente ou mesmo de solo diferente das amostras usadas

nos estudos anteriores, tenha contribuído para a inibição deste fungo no presente estudo, já que condições edáficas podem ter contribuído para produção de extrativos neste marupá e que estes tenham inibido o crescimento do *L. strigosus* no atual estudo.

Provavelmente a melhor assimilação dos fungos ao “cajuí”, tenha se dado, devido a uma fonte de carbono mais prontamente assimilável a estes fungos.

Por outro lado *P. ostreatus* se desenvolveu em “marupá”. Sabe-se que este cogumelo não necessita de um longo tempo para crescer e, em condições de cultivo rústico, não é necessário que o substrato seja esterilizado, apenas pasteurizado. Além disso, converte alta porcentagem de seu substrato para o corpo de frutificação, aumentando a rentabilidade. Este não é atacado frequentemente por doenças ou pragas, podendo ser cultivado de maneira simples e barata. Não necessita de um controle rigoroso do ambiente para ser cultivado comparado com as outras espécies de fungos comestíveis (SÁNCHEZ, 2010).

Em relação às características morfológicas foram analisados o diâmetro do píleo e altura do estipe. O diâmetro do píleo de *P. ostreatus* cultivado em cajuí e marupá variou de 3,0 - 7,5 cm e de 2,0 -6,0 cm, respectivamente, e a variação da altura do estipe foi de 0,3-1,0 cm e 0,4-1,2 cm, respectivamente. *L. strigosus* apresentou uma variação de 3,0- 5,0 cm e de 1,3-2,6 cm no diâmetro do píleo e na altura do estipe, respectivamente, quando cultivado em “cajuí” (Tabela 1) (Figura 11).

A produtividade foi avaliada quanto à eficiência biológica, rendimento de cogumelos produzidos por substratos. Foi avaliada também a perda de matéria orgânica decomposta pelos cogumelos. A produtividade de *P. ostreatus* cultivado nos substratos em estudo mostrou-se diferente, sendo observados maiores índices de eficiência biológica (EB) (99,92%) e de rendimento 220,11 g kg⁻¹ (Tabela 2 e 3, respectivamente) no substrato “cajuí”. No substrato marupá apresentou 43,62% de eficiência biológica e

rendimento 151,03 g kg⁻¹. Em relação à produtividade de *L. strigosus* no substrato cajú, o fungo apresentou eficiência biológica de 32,61% e rendimento 71,82 g kg⁻¹. Sales-Campos & Andrade (2011) cultivaram este mesmo fungo no substrato “marupá”, o qual apresentou 38 % de eficiência biológica, 98 g kg⁻¹ de rendimento e 42 % de perda de matéria orgânica.

Tabela 1- Tempo médio de desenvolvimento das linhagens fúngicas cultivadas em dois tipos de substratos.

Linhagem	Substrato	Período (dias)			Nº de fluxos	Dimensão do píleo (cm)	Altura do estipe (cm)
		Incubação	Primórdio (início)	Frutificação (início)			
<i>L. strigosus</i>	marupá	0	0	0	0	0	0
	cajuí	28	31	35	4	3,0 a 5,0	1,3 a 2,6
<i>P. ostreatus</i>	marupá	30	35	38	4	2,0 a 6,0	0,4 a 1,2
	cajuí	29	34	37	3	3,0 a 7,5	0,3 a 1,0



Figura 11- Cultivo dos cogumelos comestíveis. A e B: *P. ostreatus* no substrato cajú. C: *P. ostreatus* no substrato marupá. D: *L. strigosus* no substrato cajú.

Tabela 2- Eficiência Biológica de duas linhagens de cogumelos cultivados em dois tipos de substratos.

Substrato	Linhagem	
	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i>
cajuí	32,61 B	99,92 A a
marupá	-	43,62 b

Dados numéricos expressos em %. Em maiúscula, análise comparando as médias do mesmo tipo de substrato para cogumelos diferentes. Em minúsculas, análise comparando as médias das duas formulações de substratos diferentes para o mesmo cogumelo. Médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si. (Tukey, 5%). (média de 30 repetições).

Tabela 3- Rendimento do cultivo dos cogumelos cultivados em cajuí e marupá.

Substrato	Linhagem	
	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i>
cajuí	71,82 B	220,11 A a
marupá	-	151,03 b

Dados numéricos expressos em g kg⁻¹ de substrato. Em maiúscula, análise comparando as médias do mesmo tipo de substrato para cogumelos diferentes. Em minúsculas, análise comparando as médias das duas formulações de substratos diferentes para o mesmo cogumelo. Médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si (Tukey, 5%). (média de 30 repetições).

As análises da perda de matéria orgânica (PMO) para os dois diferentes substratos mostram que houve diferença significativa entre os mesmos. Assim como, ocorreu diferença significativa entre os diferentes cogumelos cultivados no mesmo substrato (Tabela 4).

Tabela 4-Perda de matéria orgânica de duas linhagens de cogumelos cultivados em dois tipos de substratos

Substrato	Linhagem	
	<i>L. strigosus</i>	<i>P. ostreatus</i>
cajuí	69,06 A	53,89 B b
marupá	-	72,20 a

Letra maiúscula, análise comparando as médias do mesmo tipo de substrato para cogumelos diferentes. Em minúsculas, análise comparando as médias das duas formulações de substratos diferentes para o mesmo cogumelo. Médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si. Dados numéricos expressos em % (Tukey, 5%). (média de 30 repetições).

Comparando os dados da EB (Tabela 2) com os da PMO (Tabela 4) observa-se que a PMO variou com o tipo de substrato utilizado, diferindo estatisticamente, e não esteve relacionada com a eficiência biológica no presente estudo.

Segundo Boyle (1998), a perda de matéria orgânica do substrato não está necessariamente relacionada com o crescimento fúngico, podendo estar relacionada ao uso do carboidrato contido no substrato pelo cogumelo para produção de seu aparato enzimático e manutenção de suas atividades metabólicas (BARI *et al*, 2015; BOYLE & KROPP, 1992).

Com a quebra de celulose do substrato pelo fungo, ocorre a liberação de água e gás carbônico aumentando a umidade na madeira. O aumento da umidade na madeira é importante, pois a atividade metabólica fúngica é dependente de água sendo a mesma usada para captar nutrientes, transportar moléculas dentro do micélio e como solvente para o metabolismo (BARI *et al*, 2015; SCHMIDT, 2006).

5.2 Purificação e caracterização

Os basidiomas de A, B e C (ver item 4.1) obtidos por cultivos em substratos regionais lignocelulósico foram analisados. Os basidiomas secos e triturados foram submetidos, sucessivamente, a extrações aquosas (10 e 96 °C), resultando em frações polissacarídicas brutas, provenientes da precipitação dos extratos aquosos com etanol, denominadas de CW-A (4,0 g), CW-B (0,9 g) e CW-C (16,3 g), HW-A (3,5 g), HW-B (774 mg) e HW-C (1,6 g), respectivamente. Uma alíquota destas amostras foi analisada quanto à composição monossacarídica (Figura 12) em CG-EM, sendo os principais monossacarídeos presentes nestas frações: glucose (Glc), galactose (Gal), manose (Man), galactose metilada (3-*O*-Me-Gal), fucose (Fuc) e xilose (Xyl) (Tabela 5).

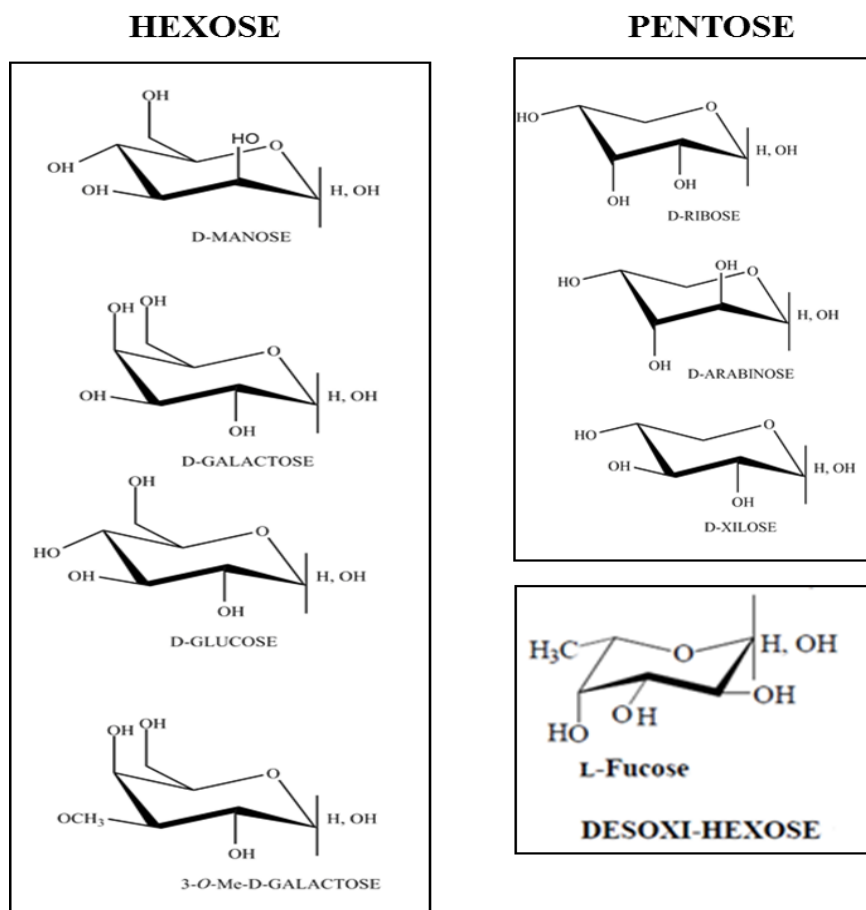


Figura 12- Estrutura dos monossacarídeos presentes nos extratos de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação de *P. ostreatus* e *L. strigosus*.

Tabela 5- Composição monossacarídica das frações polissacarídicas brutas obtidas do corpo de frutificação de *P. ostreatus* e *L. strigosus*.

FRAÇÕES	Composição monossacarídica (mol %) ^a					
	Fuc ^b	Xyl ^b	Man ^b	3-O-Me-Gal ^b	Gal ^b	Glc ^b
CW-A	1,3	1,5	12,0	7,4	35,7	41,3
CW-B ^d	-	1,7	12,4	6,0	37,5	42,2
CW-C	3,8	1,8	5,3	-	41,3	43,7
HW-A	-	-	-	-	-	100
HW-B	-	-	-	-	-	100
HW-C	-	-	1,8	-	3,0	95,1

^a Analisado em CG-EM (coluna HP5) após hidrólise ácida total, redução (NaBH_4) e acetilação. ^b Fuc: fucose; Xyl: xilose; Man: manose; 3-O-Me-Gal: 3-O-metil-galactose, confirmado pelos fragmentos de massa m/z 130 e 190 após redução com NaB^2H_4 ; Gal: galactose e Glc: glucose. ^d Apresentou 0,6 % de raminose (Rha). CW-A - extração aquosa a frio dos polissacarídeos de *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui. CW-B - extração aquosa a frio dos polissacarídeos de *P. ostreatus* cultivado em serragem de marupá. CW-C - extração aquosa a frio dos polissacarídeos de *L. strigosus* cultivado em serragem de cajui. HW-A - extração aquosa a quente dos polissacarídeos *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui, HW-B - extração aquosa a quente dos polissacarídeos de *P. ostreatus* cultivado em serragem de marupá e HW-C extração aquosa a quente dos polissacarídeos - *L. strigosus* cultivado em serragem de cajui.

As composições monossacarídicas (Figura 13-24) das frações CW foram distintas das HW, justificando esta sequência de extração. As frações CW apresentaram principalmente manose, galactose e glucose, enquanto nas frações HW foi observado glucose como o principal monossacarídeo. Para o gênero *Pleurotus* foi constatado o derivado 3-O-Me-Gal que é característico deste gênero (Tabela 5; Figura 13 e 14).

Em geral, as extrações de polissacarídeos são realizadas em sequência utilizando primeiramente água em diferentes temperaturas ou solução alcalina, podendo ser repetida várias vezes até a exaustão (RUTHES *et al*, 2015). A exaustão tem a função de garantir que todos os polissacarídeos sejam removidos e que não serão extraídos com o próximo procedimento.

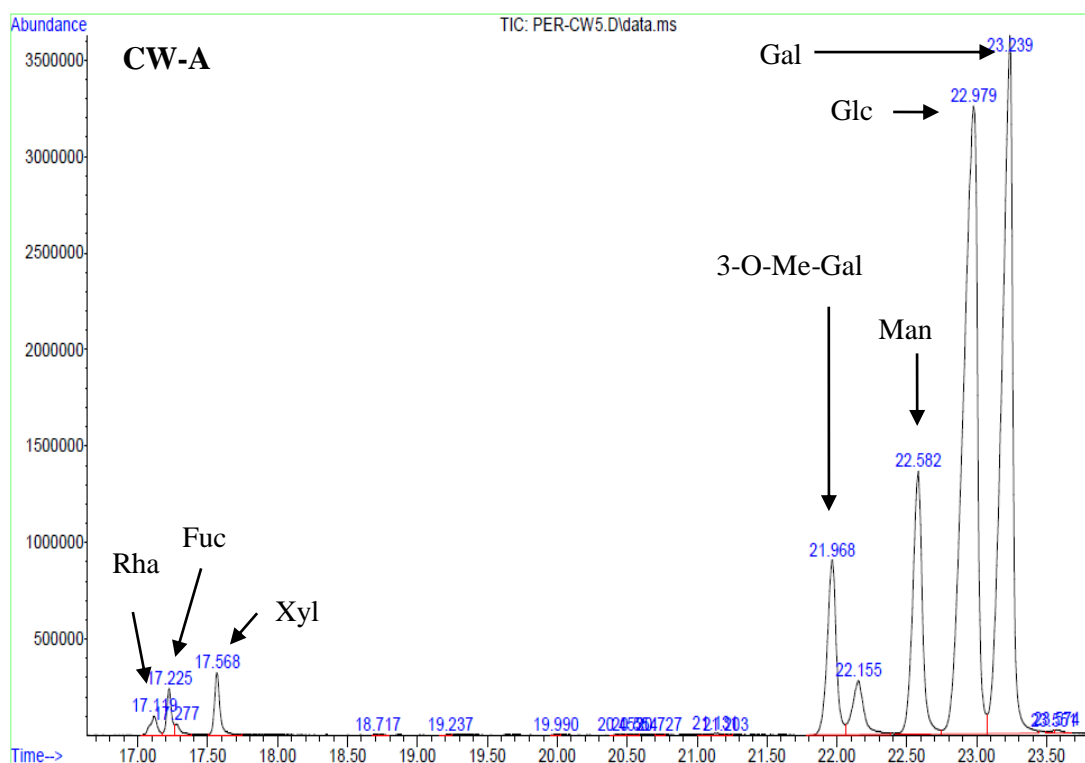


Figura 13- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: CW-A- extração aquosa a frio dos polissacarídeos de *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui.

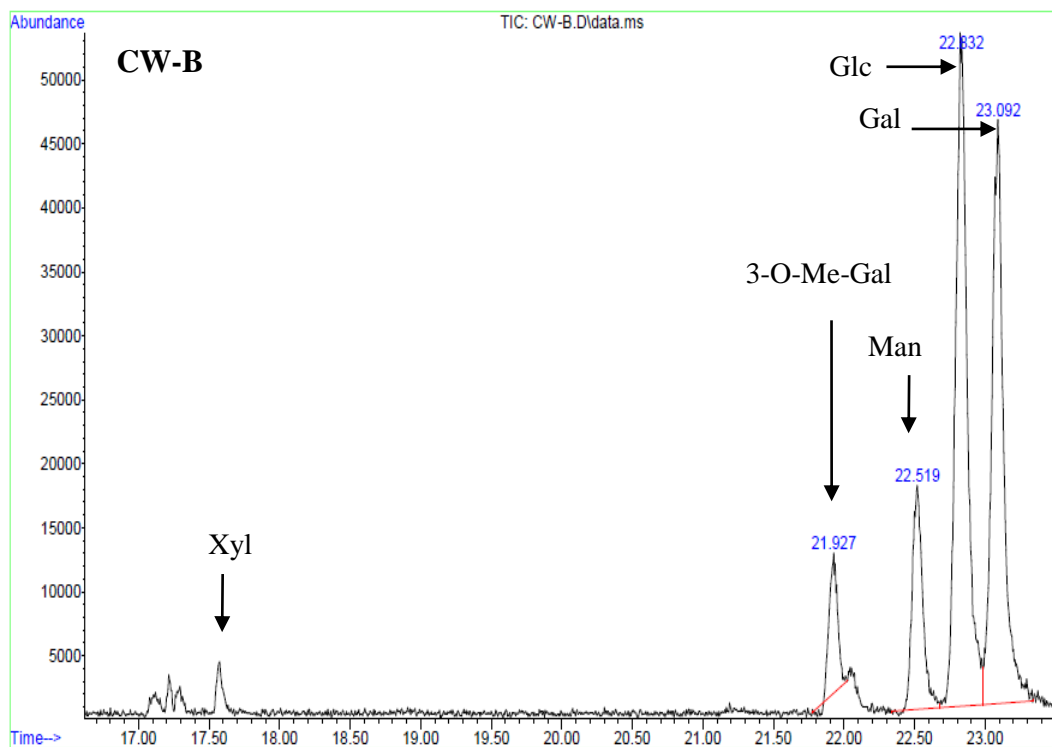


Figura 14- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: CW-B – e extração aquosa a frio dos polissacarídeos de *P. ostreatus* cultivado em serragem de marupá.

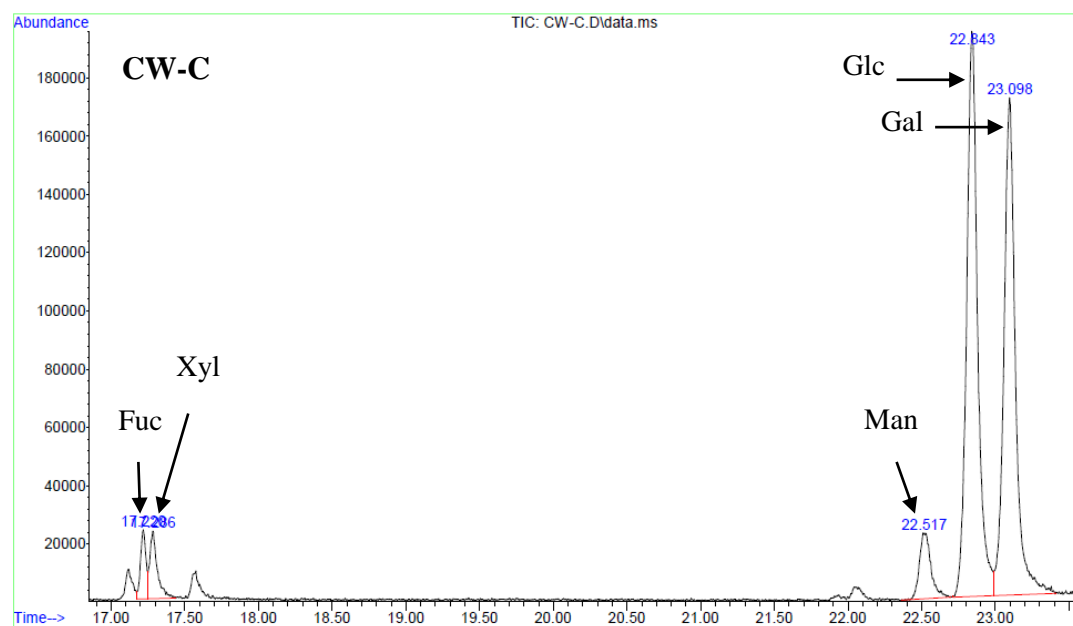


Figura 15- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: CW-C-extração aquosa a frio dos polissacarídeos de *L. strigosus* cultivado em serragem de cajú.

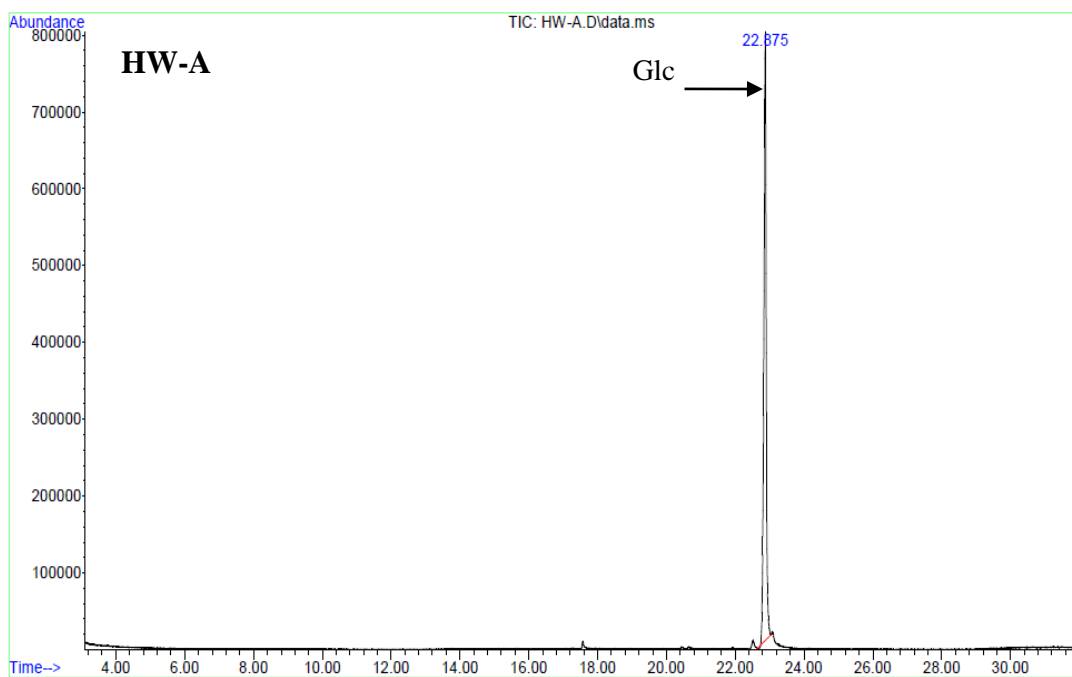


Figura 16-Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: HW-A-extração a quente dos polissacarídeos de *P.ostreatus* cultivados em cajuí.

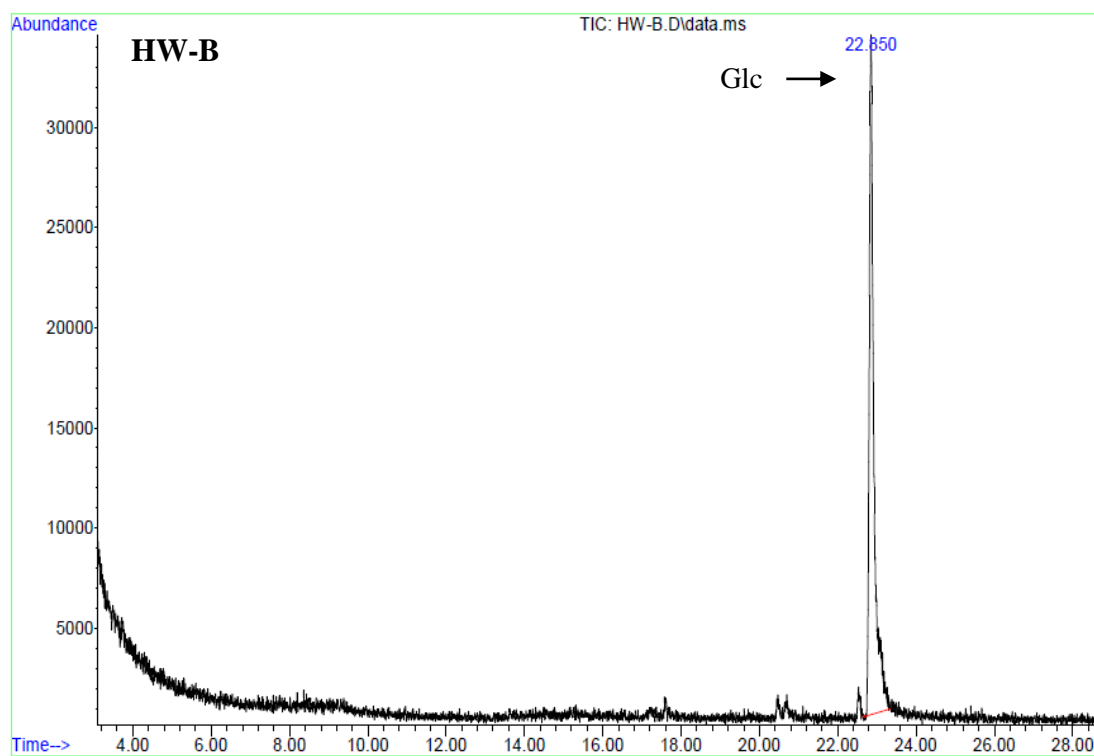


Figura 17- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: HW- B-extração a quente dos polissacarídeos de *P.ostreatus* cultivados em marupá.

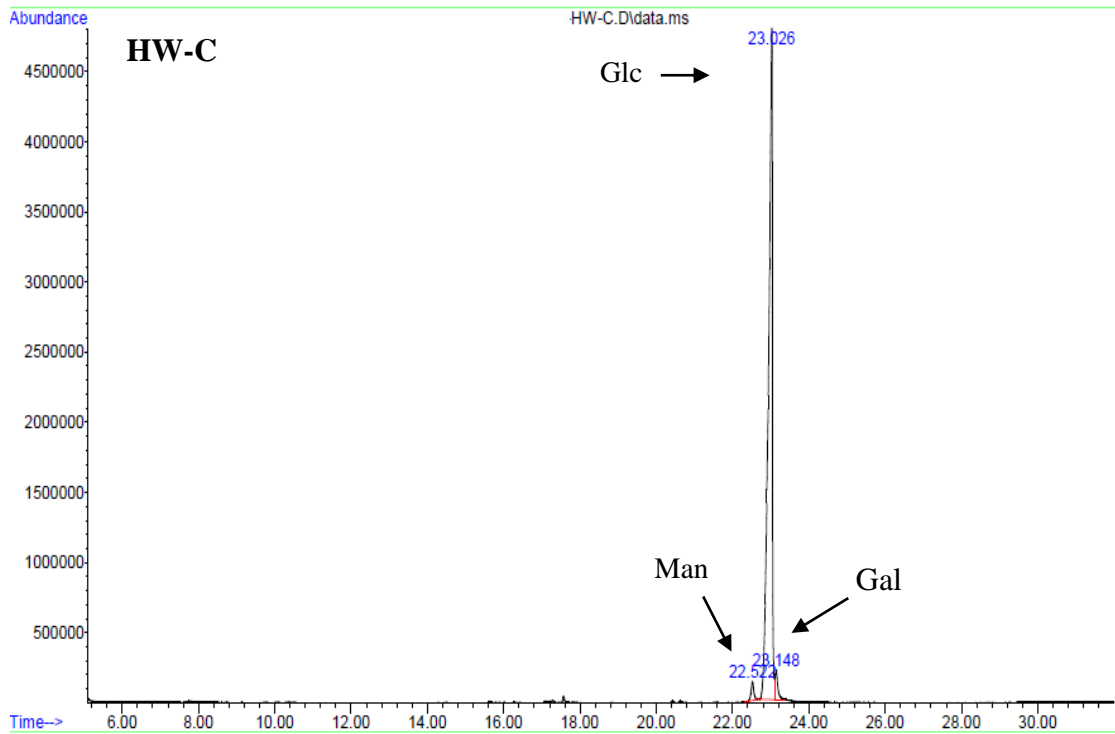


Figura 18- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração: HW- C-extração a quente dos polissacarídeos de *L.strigosus* cultivados em cajú.

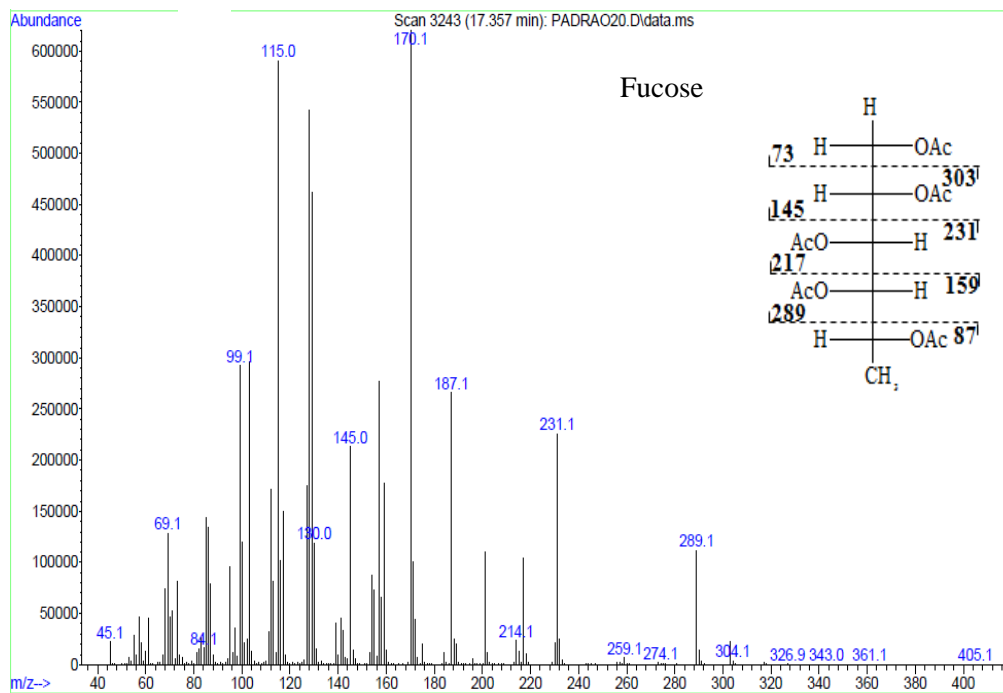


Figura 19- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Fucose).

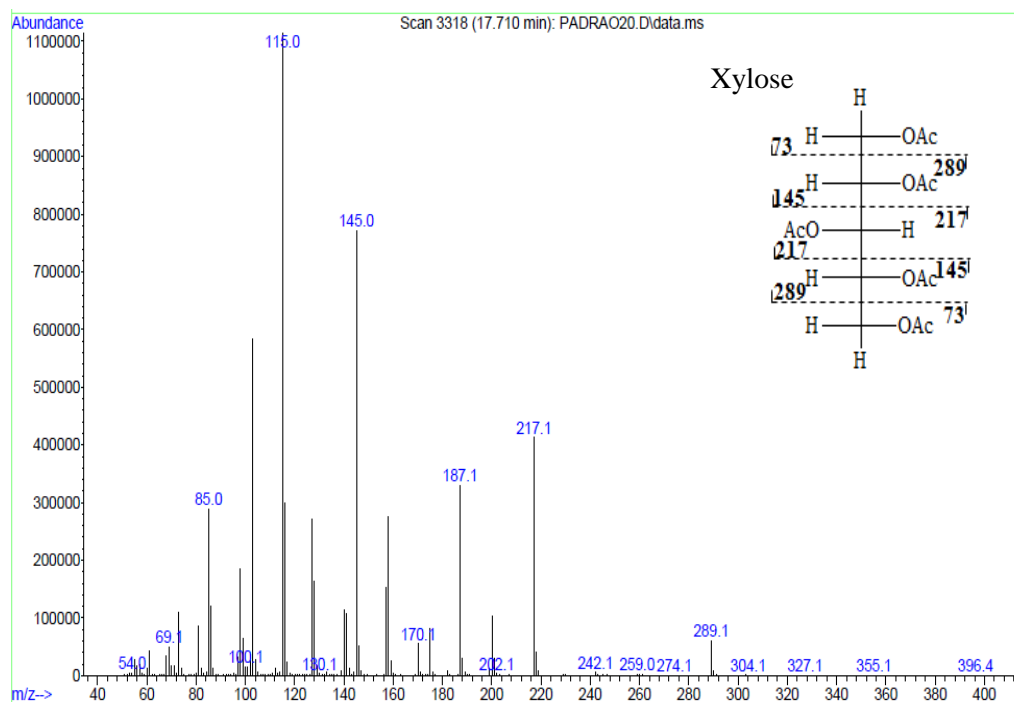


Figura 20- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Xylose).

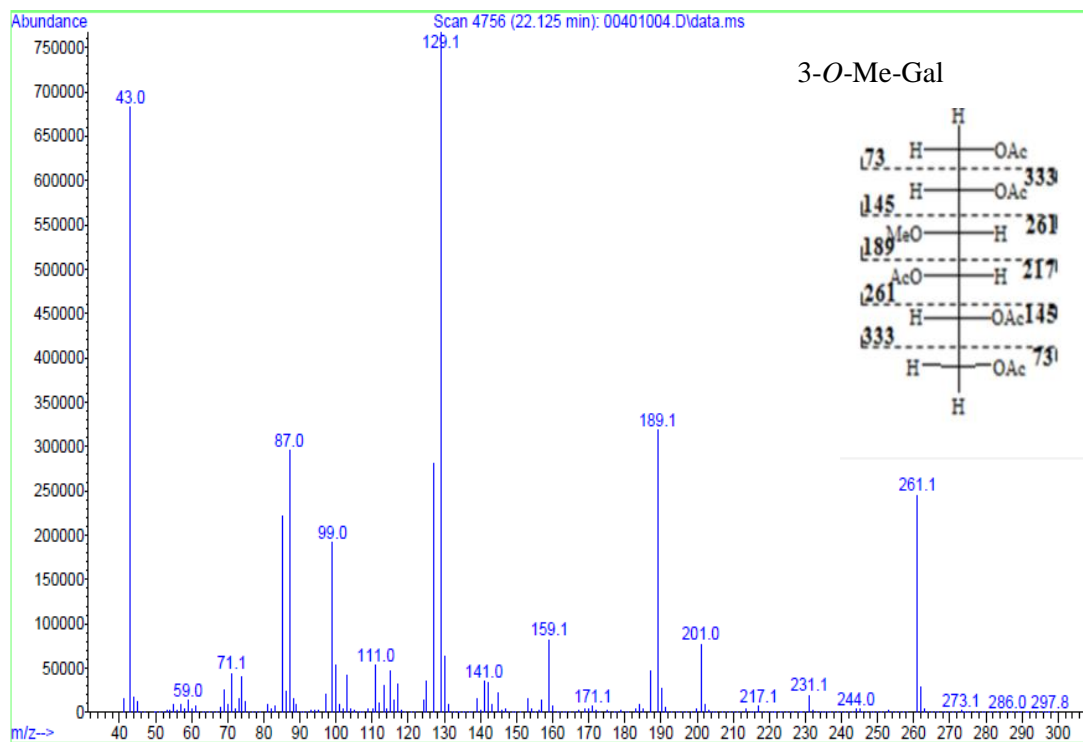


Figura 21- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (3-O-Me-Gal).

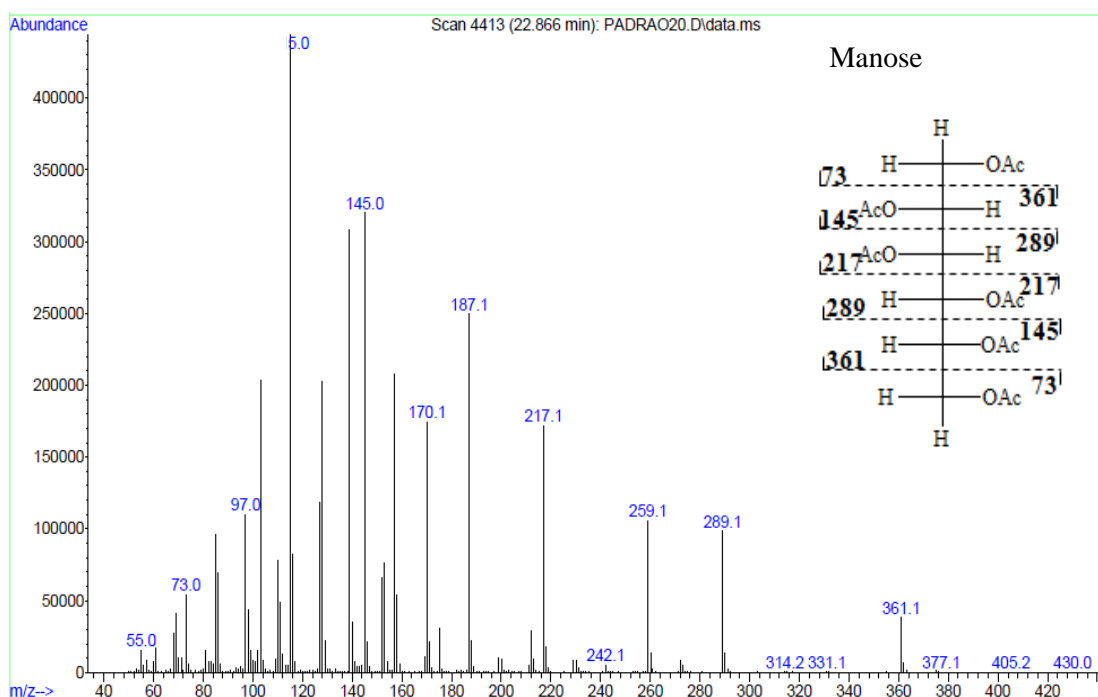


Figura 22- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Manose).

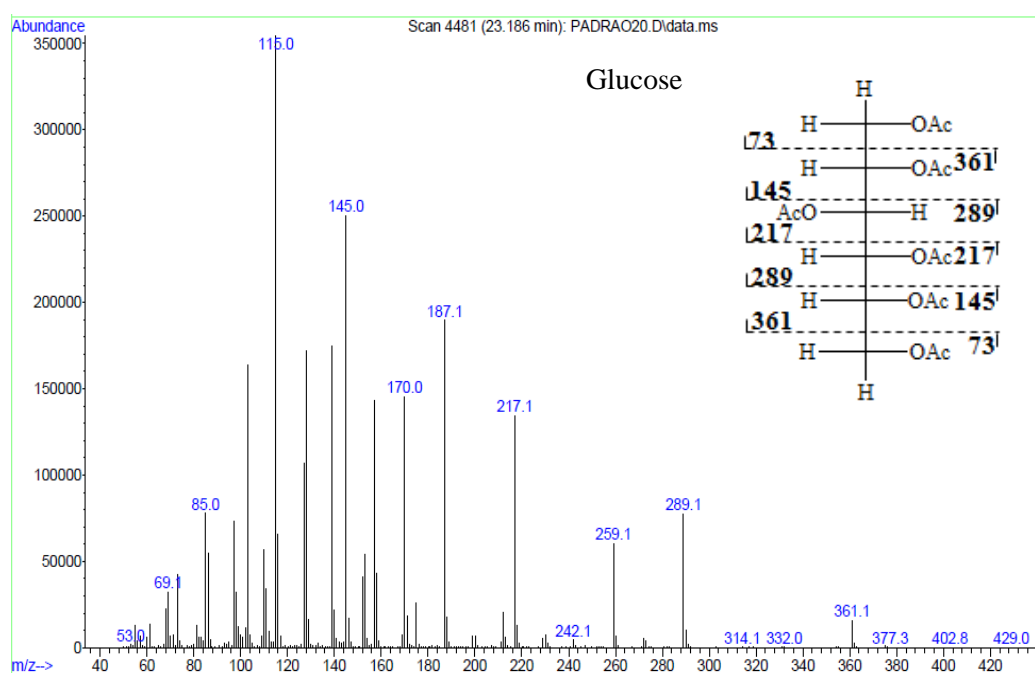


Figura 23- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Glucose).

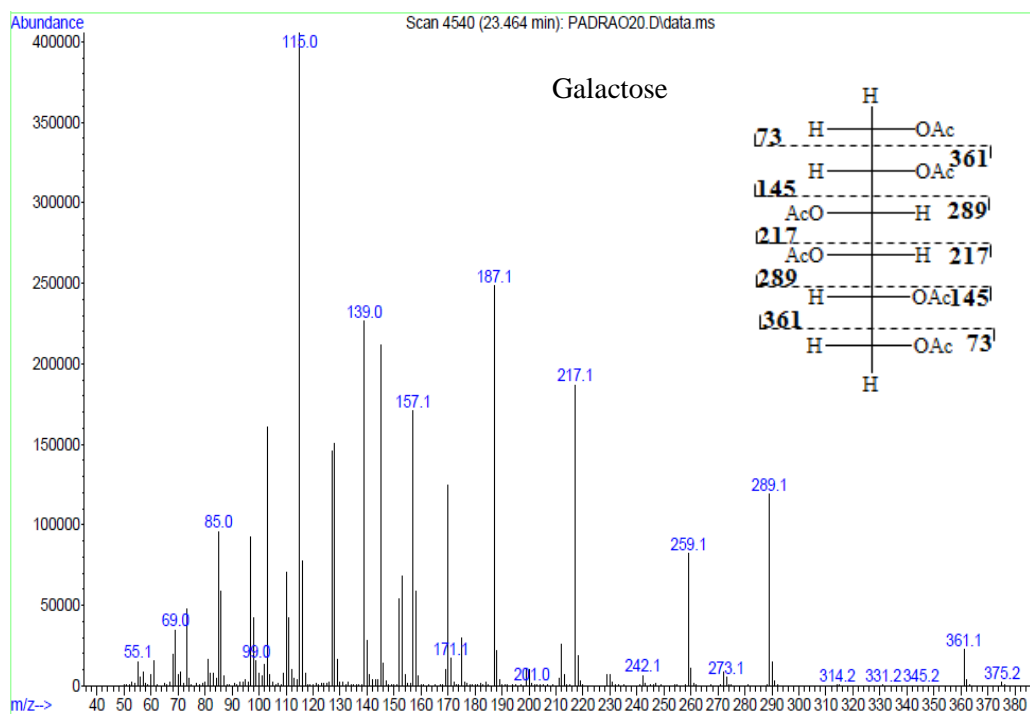
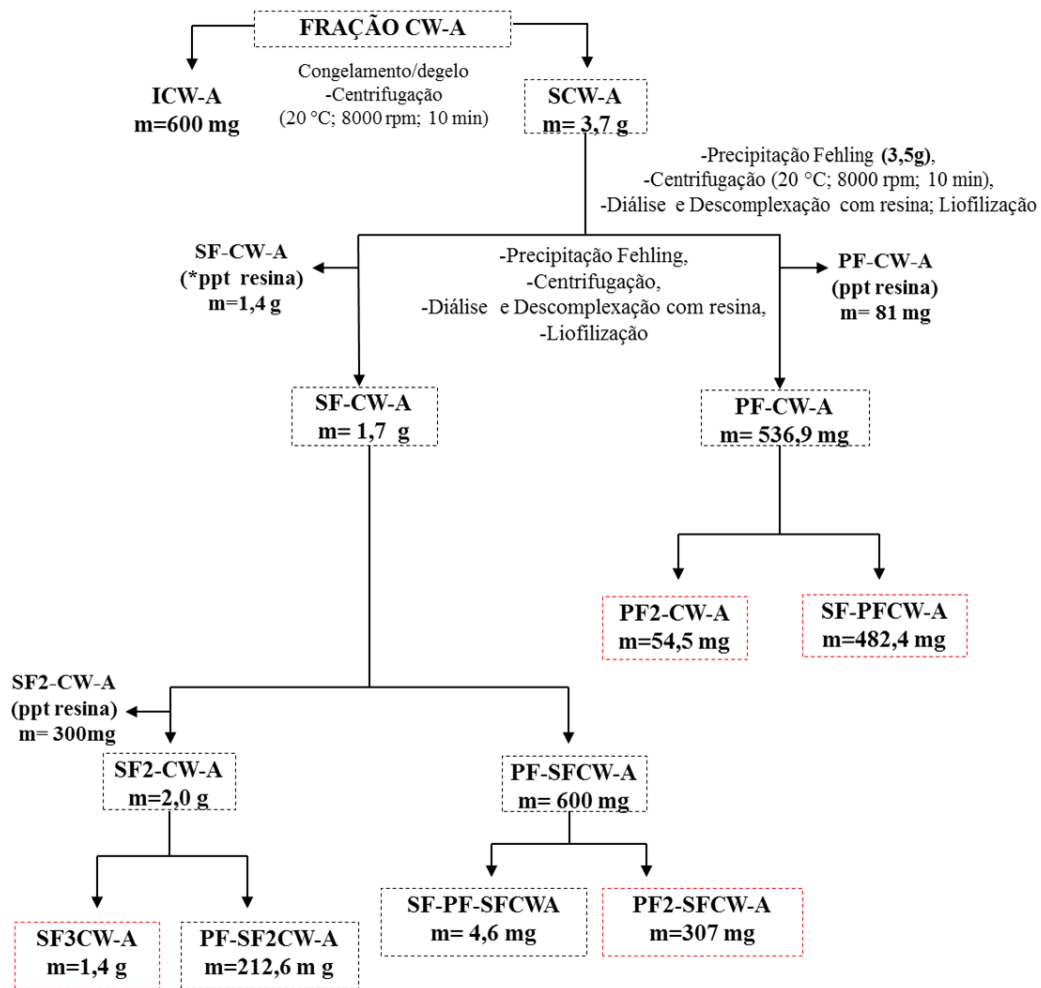


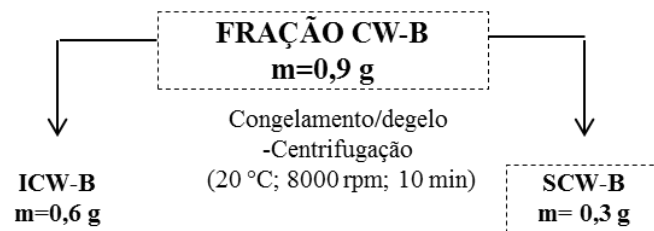
Figura 24- Padrão de fragmentação dos acetatos de alditóis obtidos por CG-EM (Galactose).

5.2.1 Purificação e caracterização dos polissacarídeos da fração CW (A, B e C)

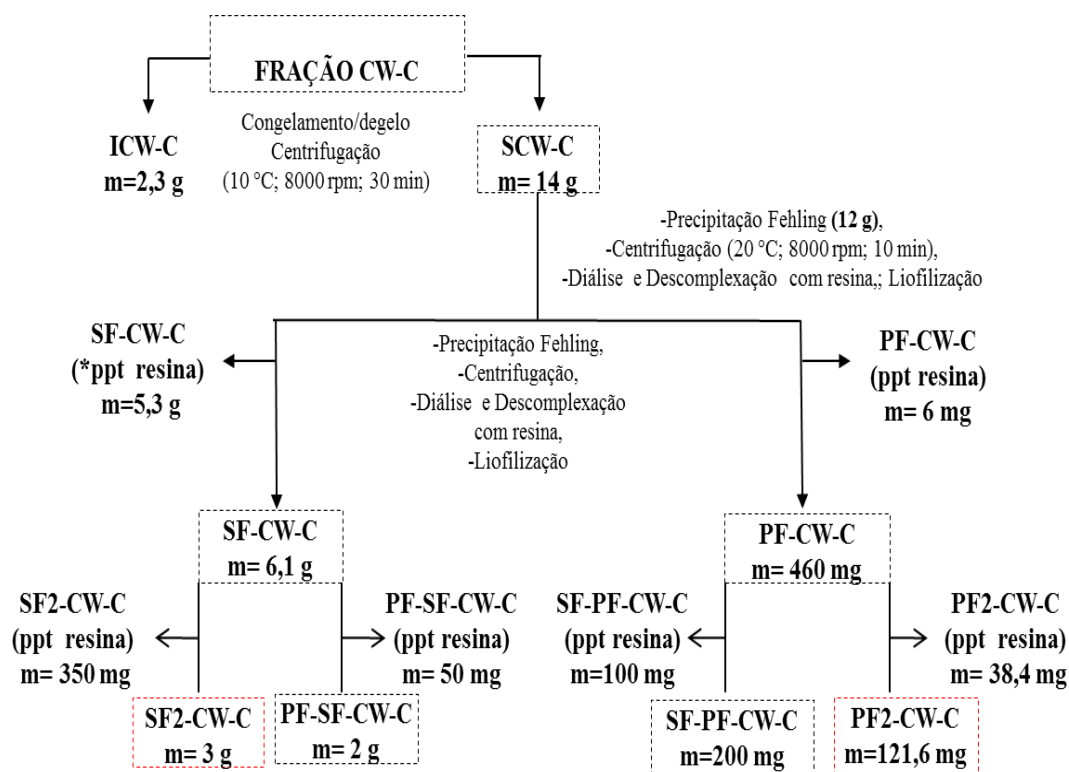
As frações CW-A, CW-B e CW-C foram submetidas ao processo de purificação por congelamento e degelo, seguidas de centrifugação originando frações insolúveis (ICW-A, 0,6 g, ICW-B, 0,6 g e ICW-C, 2,3 g) e solúveis (SCW-A, 3,7 g, SCW-B, 0,3 g e SCW-C, 14 g), as quais foram separadas por centrifugação (Figura 25). Para todas as frações foram realizadas as composições monossacarídicas, as quais foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM).



(A)



(B)



(C)

Figura 25- Esquema da purificação dos polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação por extração aquosa a frio (CW). (A) *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajuí, (B) *P. ostreatus* cultivado em serragem de marupá e (C) *L. strigosus* cultivado em serragem de cajuí. *ppt: precipitado. SCW (A, B,C), ICW (A, B, C) correspondem as frações solúveis e insolúveis de *Pleurotus ostreatus* cultivado em serragem de cajuí e marupá e de *Lentinus strigosus* cultivado em serragem de cajuí. SF-CW-A, SF2-CW-A e SF3CW-A: sobrenadante de Fehling SF, SF2 e SF3, correspondentes as subsequentes etapas de purificação; PF-SF2CW-A: precipitado de Fehling oriundo do sobrenadante de Fehling dois; PF-SFCW-A e PF2-SFCW-A: precipitado de Fehling da primeira (PF) e segunda (PF2) etapa de purificação oriundo do sobrenadante de Fehling; SF-PF-SFCWA: sobrenadante de Fehling oriundo do precipitado de Fehling do sobrenadante de Fehling. PF-CW-A e PF2-CW-A: precipitado de Fehling da primeira (PF) e segunda (PF2) etapa de purificação; SF-PFCW-A: sobrenadante de Fehling oriundo do precipitado de Fehling, correspondentes a *Pleurotus ostreatus* cultivado em serragem de cajuí. SF-CW-C e SF2-CW-C: correspondentes as subsequentes etapas de purificação do sobrenadante; PF-SF-CW-C: precipitado de Fehling do sobrenadante de Fehling; PF-CW-C e PF2-CW-C: correspondentes as subsequentes etapas de purificação do precipitado; SF-PF-CW-C: sobrenadante de Fehling oriundo do precipitado de Fehling da de *L.strigosus* cultivado em serragem de cajuí.

As frações SCW (A, B e C) e ICW (A, B e C) quando analisada por GC-EM, apresentaram glucose e galactose majoritariamente em sua composição monossacarídica (Tabela 6). Com a finalidade de purificação, as frações solúveis SCW-A e SCW-C foram submetidas ao processo de purificação por precipitação com solução de Fehling. Entretanto, não foi possível submeter à fração B a esta precipitação devido ao seu baixo rendimento (0,9 g).

Tabela 6- Composição monossacarídica das frações solúveis e insolúveis provenientes do congelamento/degelo, obtidas no processo de purificação de polissacarídeos de *P. ostreatus* e *L. strigosus*.

FRAÇÕES	Composição monossacarídica (mol %) ^b					
	Fuc ^c	Xyl ^c	Man ^c	3-O-Me-Gal ^{c,d}	Gal ^c	Glc ^c
SCW-A	-	-	12,2	9,8	38,1	39,7
ICW-A	7,2	5,3	8,8	-	11,4	67,0
SCW-B	5,5	4,1	12,3	0,3	30,0	47,8
ICW-B	20,1	2,1	7,2	-	16,5	53,8
SCW-C	1,9	-	7,6	-	33,1	56,0
ICW-C	-	-	11,5	-	37,5	50,8

(ICW -A) – fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui. (ICW- B-) fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em serragem de marupá. (ICW-C) fração insolúvel de *L. strigosus* cultivado em serragem de cajui. (SCW-A) fração solúvel de *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui. (SCW-B) fração solúvel de *P. ostreatus* cultivado em serragem de marupá. (SCW-C) fração solúvel de *L. strigosus* cultivado em serragem de cajui.

Este procedimento foi repetido para as frações SF-CW-A e PF-CW-A para garantir a eficiência do processo sendo obtidas as frações SF3CW-A (1,4 g), SF-PFCW-A (482,4 mg), as quais apresentaram majoritariamente galactose e glucose. As frações PF2-CW-A (54,5 mg) e PF2-SFCW-A (307 mg) apresentaram maiores quantidades de xilose e galactose em sua composição monossacarídica (Tabela 7). Estas frações de Fehling foram diferentes em suas composições sugerindo que este procedimento mostrou ser eficaz na separação destas biomoléculas.

Tabela 7- Composição monossacarídica das frações submetidas à solução de Fehling provenientes do processo de purificação de polissacarídeos de *P. ostreatus* e *L. strigosus* cultivados em diferentes substratos.

FRAÇÕES	Composição monossacarídica (mol %) ^a				
	Xyl ^b	Man ^c	3- <i>O</i> -Me-Gal ^c	Gal ^c	Glc ^c
SF-CW-A	2,1	2,3	12,2	55,9	22,5
PF2-CW-A	23,2	9,7	4,1	50,2	12,7
SF-PFCW-A	-	-	12,9	68,9	18,1
SF2-CW-A	-	-	19,0	62,2	18,6
SF3-CW-A	-	-	16,9	61,3	21,6
PF-SF2-CW-A	-	-	14,3	58,9	26,8
PF2-SFCW-A	19,1	11,6	9,3	59,8	-

^a Analisado em CG-EM (coluna HP5) após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação. ^bXyl: xilose; ^cMan: manose; ^{c,d}3-*O*-Me-Gal: 3-*O*-metil-galactose, confirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190 após redução com NaB²H₄. ^cGal: galactose e ^cGlc: glucose. SF-CWA, SF2-CW-A e SF3CW-A: correspondentes ao sobrenadante de Fehling da primeira, segunda e terceira etapa de purificação, respectivamente; PF2-CW-A: precipitado de Fehling dois; SF-PFCW-A: sobrenadante de Fehling do precipitado de Fehling; PF-SF2-CW-A: precipitado de Fehling do sobrenadante de Fehling dois; PF2-SFCW-A: precipitado de Fehling dois do sobrenadante de Fehling proveniente de *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui.

As frações SF3CW-A, SF-PFCW-A, PF2-CW-A e PF2-SFCW-A foram submetidas à RMN de ¹³C, apresentando sinais na região anomérica (C-1) correspondentes aos terminais não redutores α-D-Galp (δ 100,8) e às unidades de 3-*O*-Me-Galp (δ 100,7). Os sinais em δ 71,0, 72,5, 72,3, 71,7 sugerem ser C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente das unidades Galp. Estes carbonos (2, 3, 4 e 5) são sugeridos nos sinais em δ 70,0, 81,8, 68,3, 71,7, respectivamente dos resíduos de 3-*O*-Me-Galp. No δ 59,1 corresponde ao metil ligado oxigênio na posição 3 do monossacarídeo (O-CH₃) e em δ 69,5 corresponde ao C-6 (O-susbtituído-CH₂-6) das unidades Galp e dos resíduos de 3-*O*-Me-Galp (Figura 26) (Tabela 8) (CARBONERO *et al*, 2008).

Tabela 8- Assinalamentos dos espectros de RMN de ^{13}C das frações SF3CW-A, SF-PFCW-A, PF2-SFCW-A e PF2-CW-A de *P. ostreatus*.

Unidades	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	O-Me
α -Galp	100,8	71,0	72,5	72,3	71,7	69,5	
3-O-Me- α -Galp	100,7	70,0	81,8	68,3	71,7	69,5	59,1

Os resultados de RMN mostraram que estas frações são semelhantes (Figura 19), sendo que os sinais principais são característicos de uma galactana linear parcialmente metilada, a qual é característica para o gênero *Pleurotus*, diferindo na quantidade de 3-O-Me-Galp (Tabela 6) (CARBONERO *et al*, 2008; KOMURA *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2013).

No presente estudo, a galactose parcialmente metilada foi obtida nas extrações a frio das frações CW-A e CW-B (Tabela 4). Galactoses metiladas foram isoladas de outras espécies deste gênero, *P. ostreatoroseus* (CARBONERO *et al*, 2006; ROSADO^a *et al*, 2003), *P. ostreatus* 'Florida' (KOMURA *et al*, 2014; ROSADO^b *et al*, 2003), *Pleurotus geesteranus* (ZHANG *et al*, 2013), *P. eryngii* (CARBONERO *et al*, 2006) e *P. pulmonarius* (SMIDERLE *et al*, 2008), cuja diferença entre elas ocorre pela quantidade (%) de galactose metilada em suas estruturas químicas.

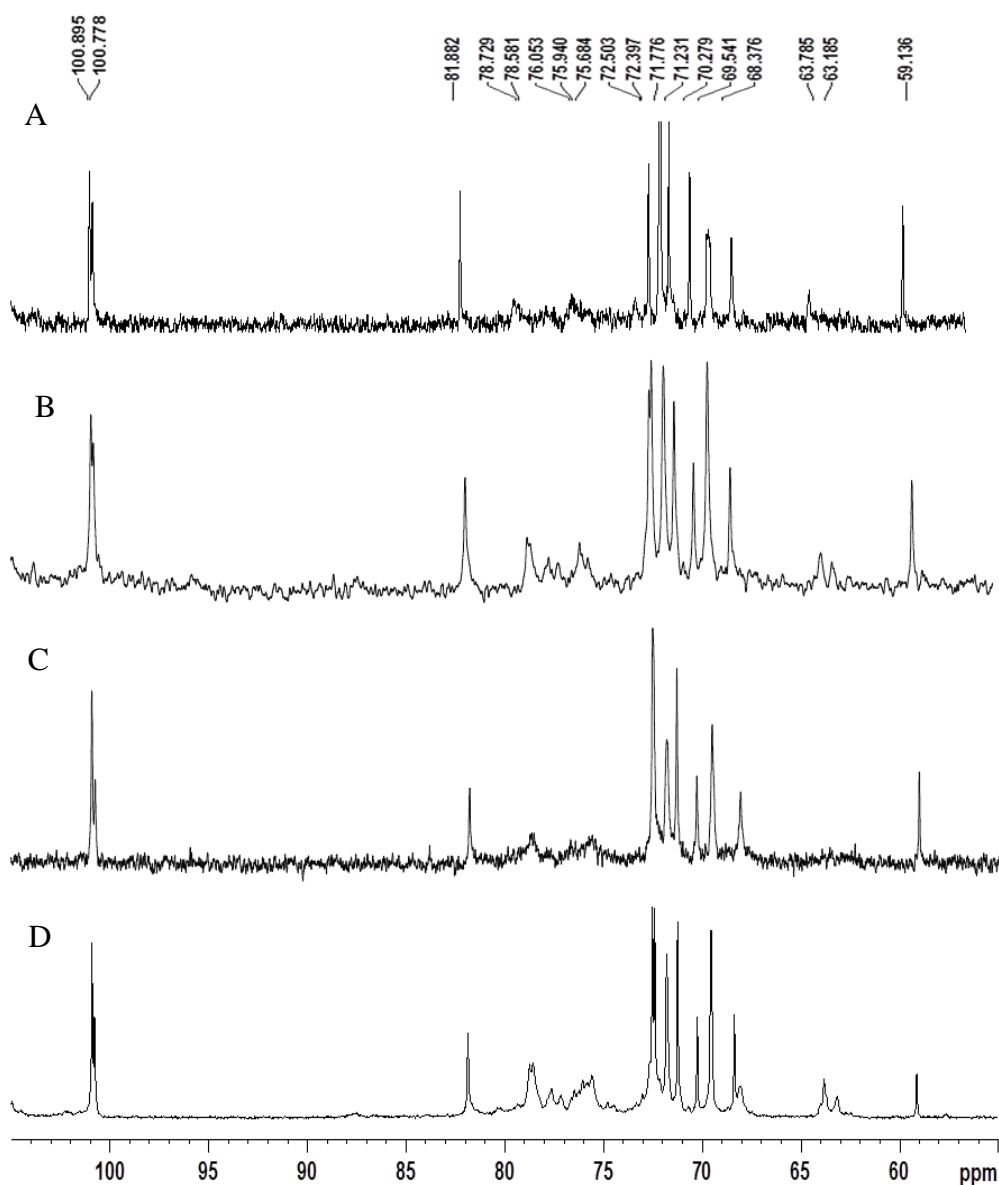


Figura 26- Espectro de RMN de ^{13}C das frações (A) SF3CW-A, (B) SF-PFCW-A, (C) PF2-SFCW-A e (D) PF2-CW-A de *P. ostreatus*. SF3CW-A: sobrenadante de Fehling três; SF-PFCW-A: sobrenadante de Fehling do Precipitado de Fehling; PF2-SFCW-A: precipitado de Fehling dois do sobrenadante de Fehling; PF2-CW-A: precipitado de Fehling dois proveniente da extração aquosa a frio de *P. ostreatus* cultivado em serragem de cajui.

Após submeter amostra C à precipitação com solução de Fehling foram obtidas as frações que são mostradas na figura 25, sendo as frações PF2-CW-C e SF2-CW-C submetidas ao processo de hidrólise, redução e acetilação. Os resultados não são mostrados, pois é necessária a repetição deste procedimento para confirmar as composições monossacarídica destas frações.

5.2.2 Purificação e caracterização dos polissacarídeos da fração HW (A, B e C)

As frações brutas HW-A (3,5 g), HW-B (774 mg) e HW-C (1,6 g) foram solubilizadas em água, sendo posteriormente congeladas e descongeladas, originando as frações insolúveis IHW-A (200 mg), IHW-B (100 mg) e IHW-C (700 mg); e solúveis SHW-A (3,2 g), SHW-B (0,6 g) e SHW-C (0,8 g), as quais foram separadas por centrifugação (Figura 27-29). As frações apresentaram em sua composição monossacarídica principalmente glucose, diferindo apenas na presença de manose para a amostra C (Tabela 9).

Tabela 9-Composição monossacarídica das frações solúveis e insolúveis provenientes do congelamento/degelo da extração à quente obtidas do corpo de frutificação de *P. ostreatus* e *L. strigosus*.

FRAÇÕES	Composição monossacarídica (mol %) ^a	
	Man ^b	Glc ^b
SHW-A	-	100
IHW-A	-	100
SHW-B	-	100
IHW-B	-	100
SHW-C	-	100
IHW-C	9,3	90,6

^aAnalisado em CG-EM (coluna HP5) após hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação. ^bMan: manose; Glc: glucose. (IHW-A) fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (IHW-B) fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em marupá, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (IHW-C) fração insolúvel de *L. strigosus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (SHW-A) fração solúvel de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (SHW-B) fração solúvel de *P. ostreatus* cultivado em marupá, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (SHW-C) fração solúvel de *L. strigosus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.

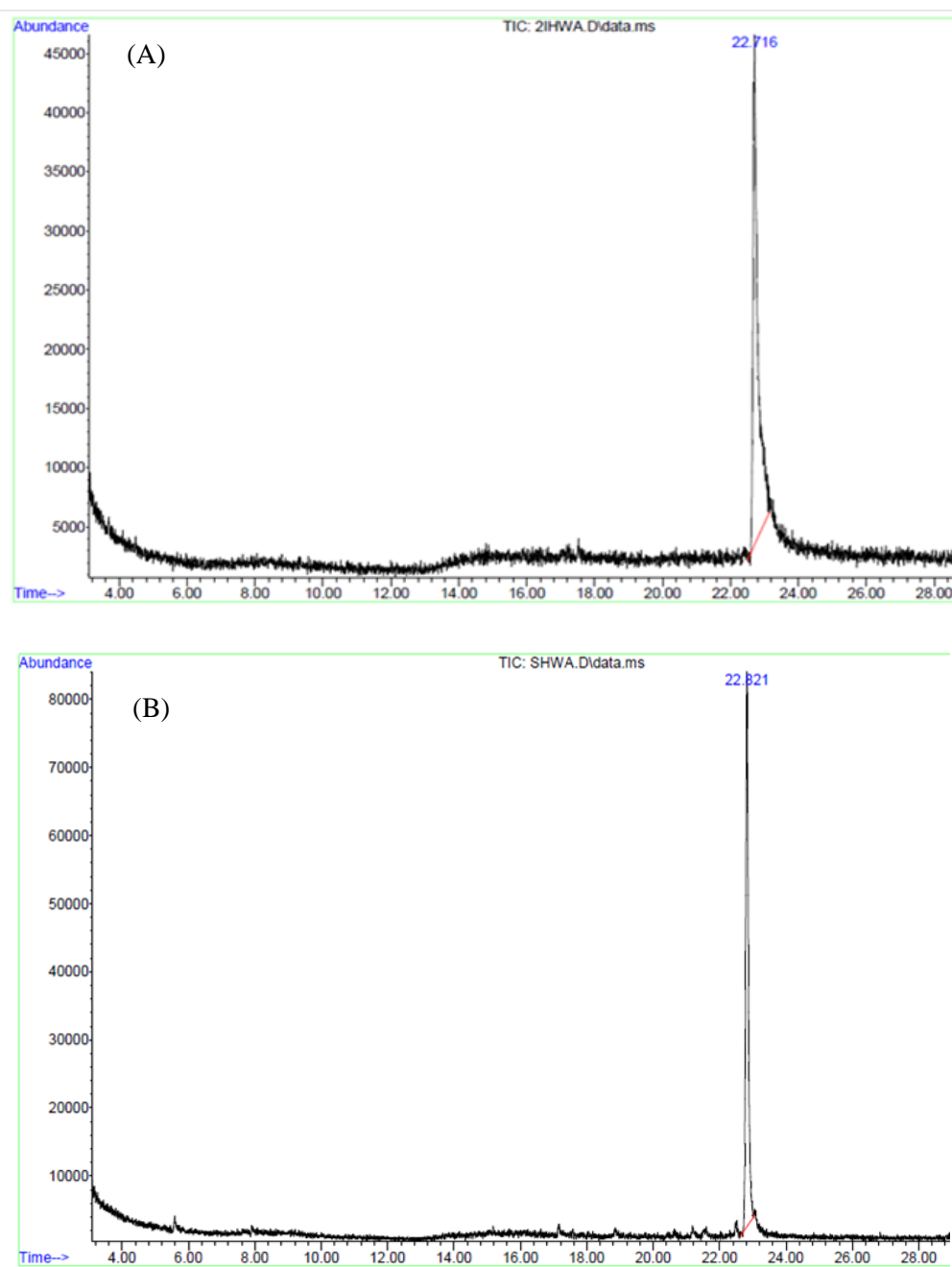


Figura 27- (A) Cromatograma obtido por CG-EM para a fração IHW-A e SHW-A (B). Fração insolúvel e solúvel, respectivamente de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.

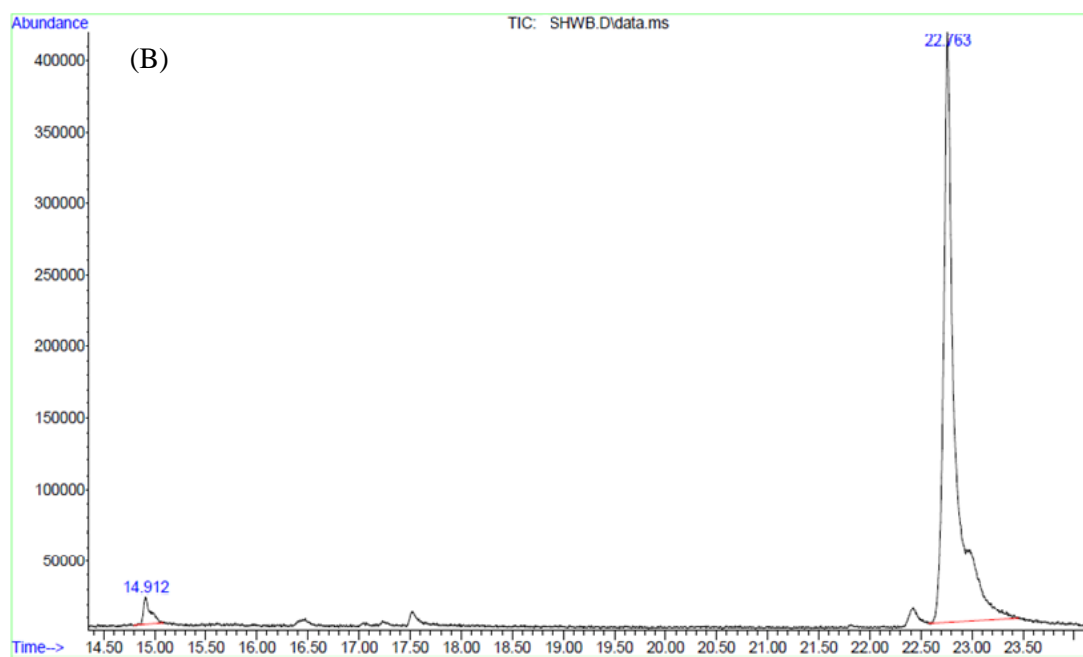
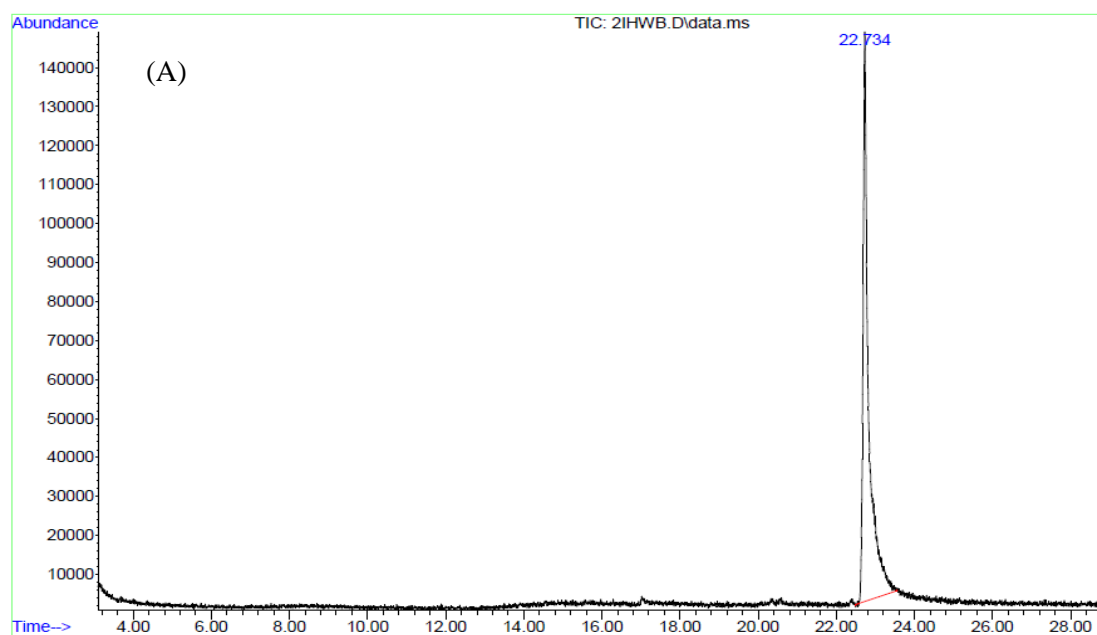


Figura 28- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração IHW-B (A) e SHW-B (B). Fração insolúvel e solúvel, respectivamente de *P. ostreatus* cultivado em marupá, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.

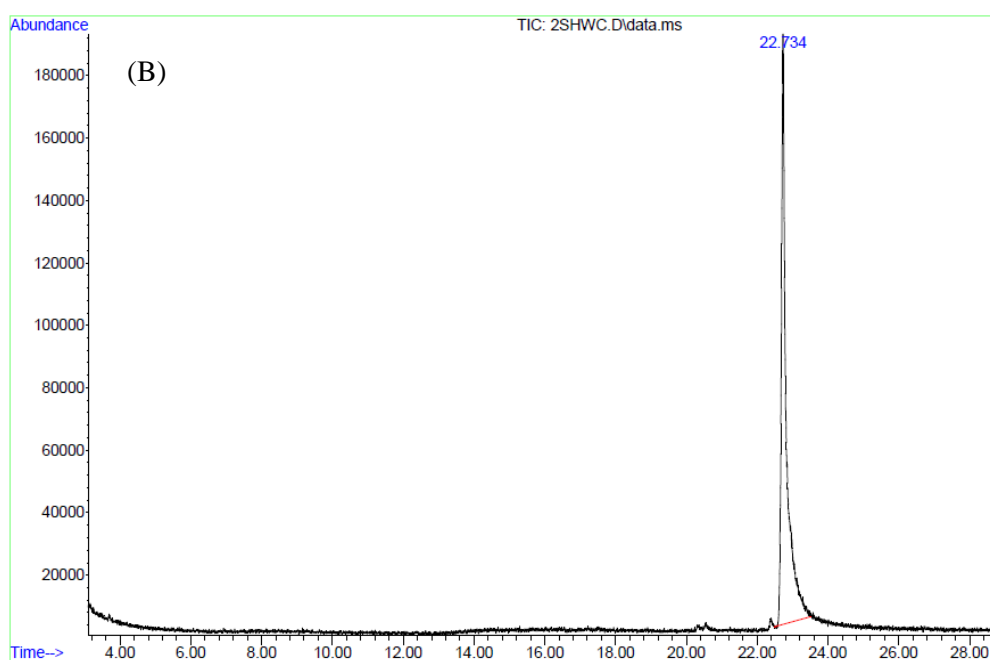
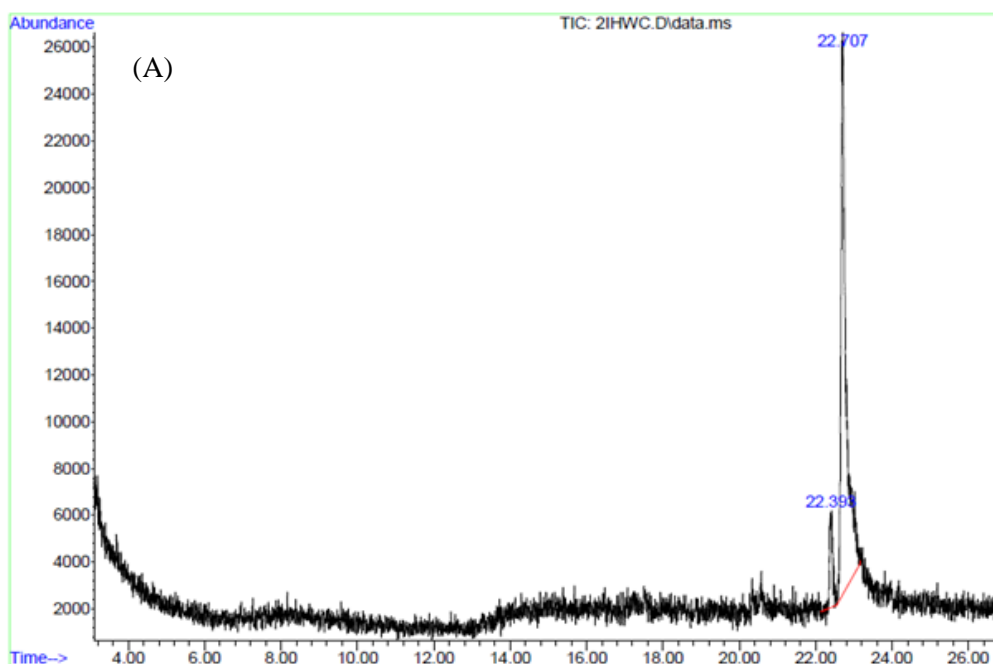
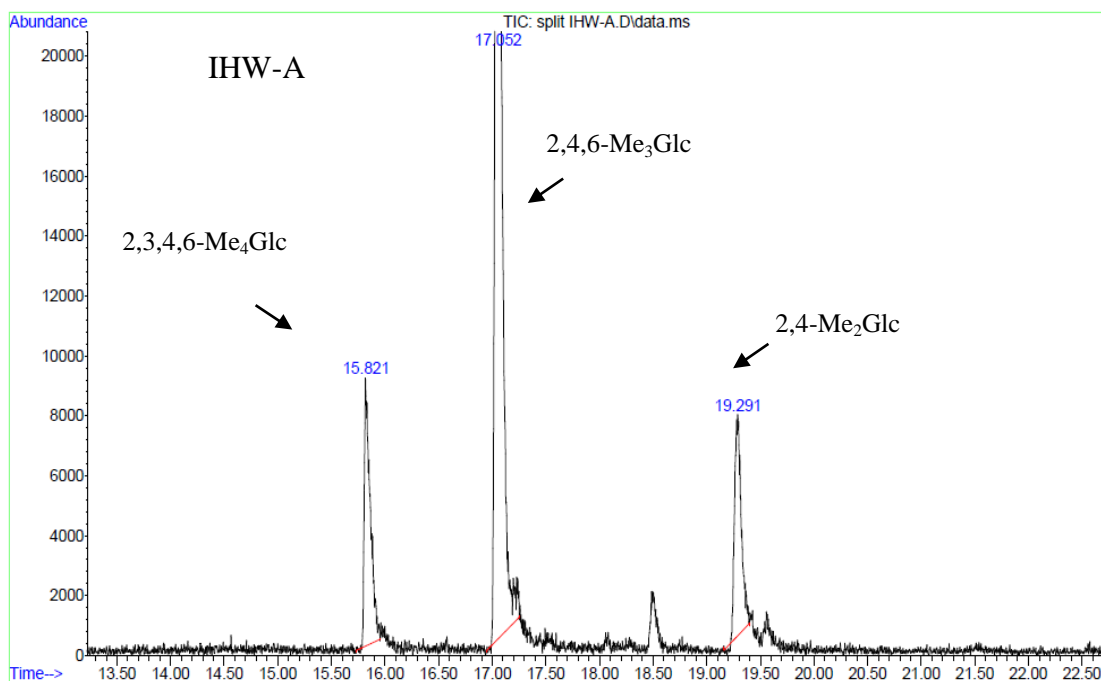


Figura 29- Cromatograma obtido por CG-EM para a fração IHW-C (A) e SHW-C (B). Fração insolúvel e solúvel, respectivamente de *L. strigosus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelamento.

Com a finalidade de verificar o tipo de ligação glicosídica das frações insolúveis em água quente (IHW), uma alíquota das frações IHW-A, IHW-B e IHW-C foram submetidas ao processo de metilação (CIUCANU & KEREK, 1984).

As frações A e B foram similares contendo os derivados parcialmente *O*-metilados correspondentes aos terminais não redutores de Glcp (2,3,4,6-Me₄-Glc) e às unidades de Glcp 3-*O*- (2,4,6-Me₃-Glc) e 3,6-di-*O*- (2,4-Me₂-Glc) substituídas (Figuras 30-32 e Tabela 10). No entanto, a fração C diferiu das frações A e B, pois não apresentou as unidades de Glcp 3,6-di-*O*- (2,4-Me₂-Glc) substituídas (Tabela 10 e Figura 33).



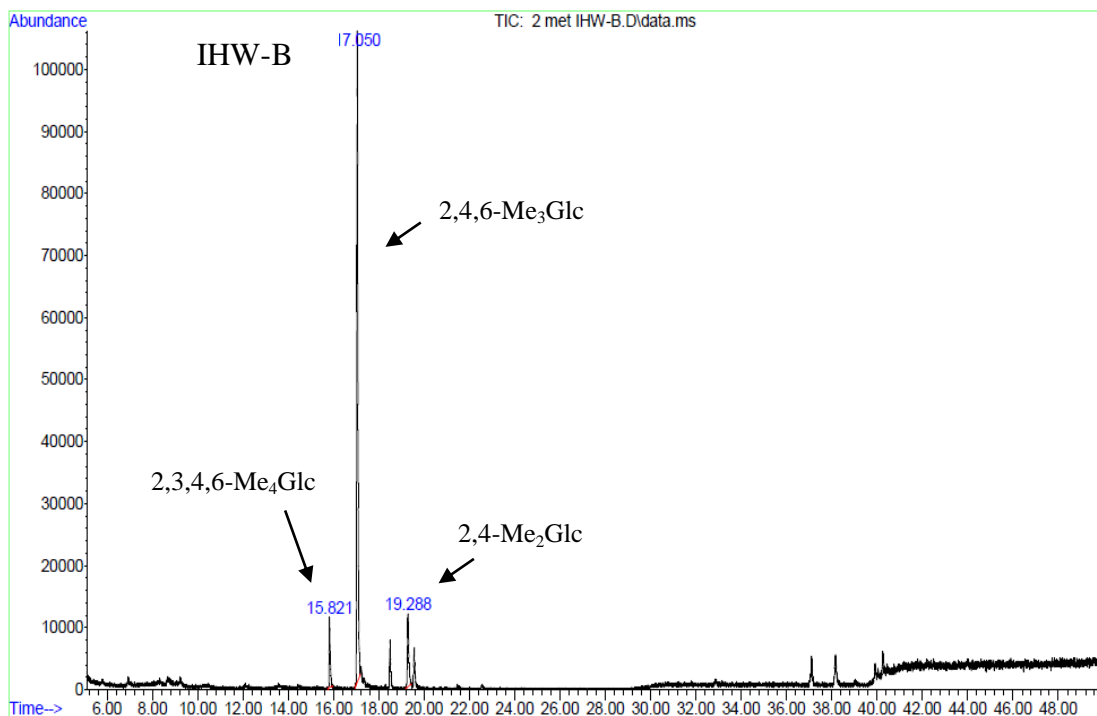
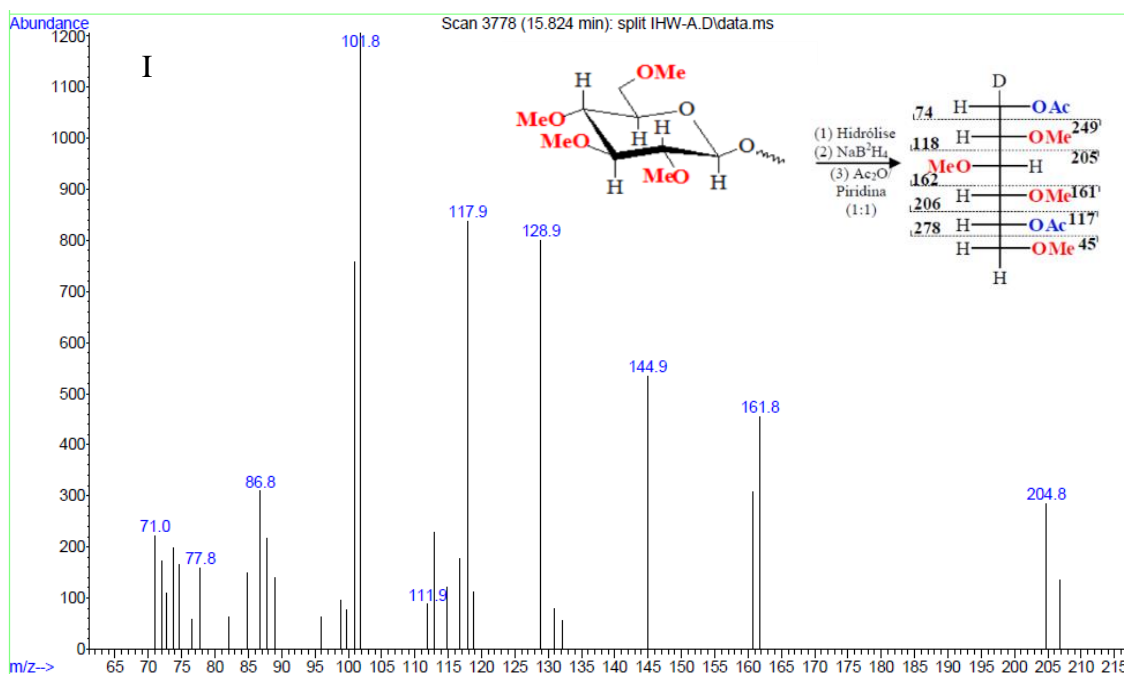


Figura 30- Cromatograma obtido por CG-EM das frações IHW-A e B. Frações insolúveis de *P. ostreatus* cultivado em cajú e marupá respectivamente, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.



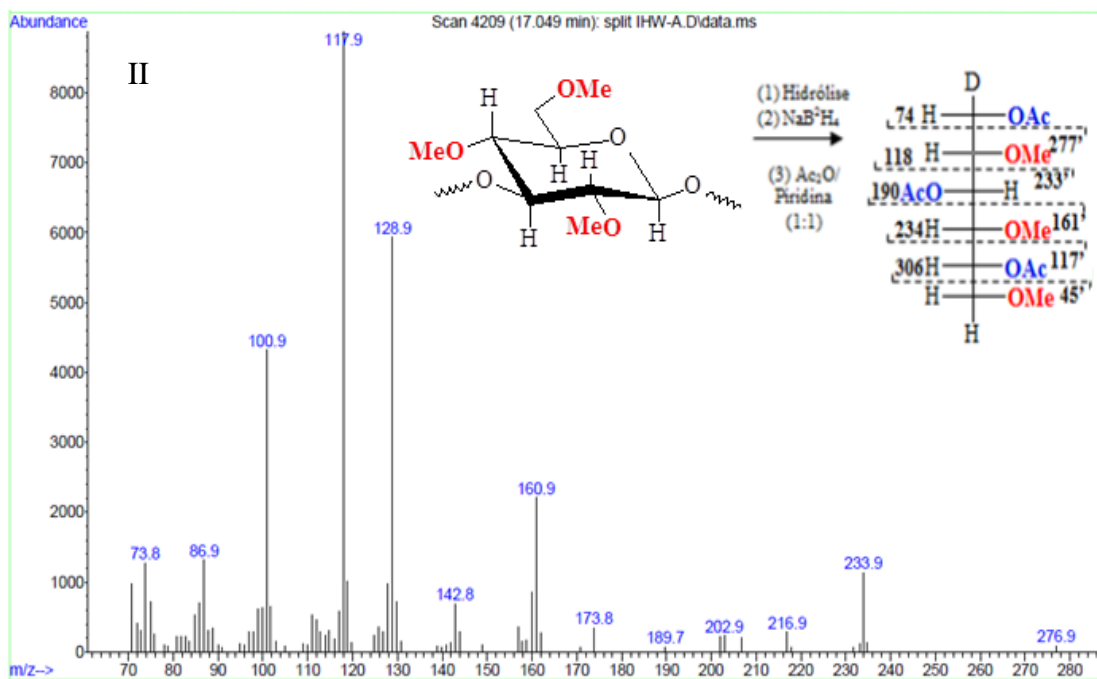


Figura 31- Espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (I: 2,3,4,6-Me₄Glc; II: 2,4,6-Me₃Glc obtidos após derivatização química (metilação)

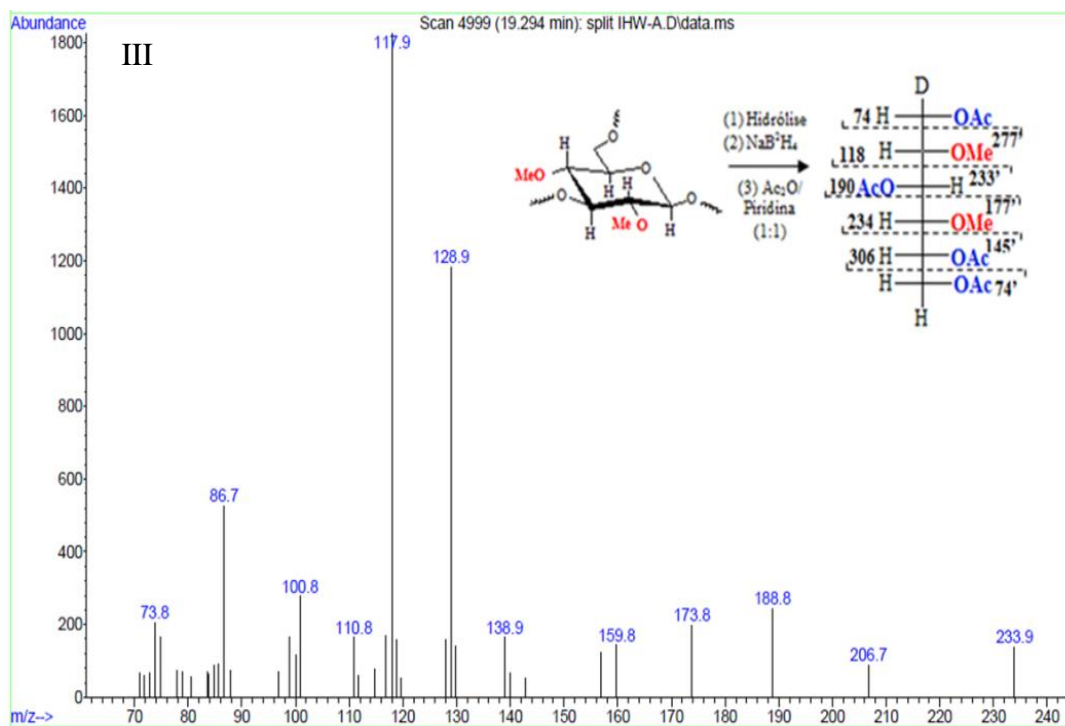
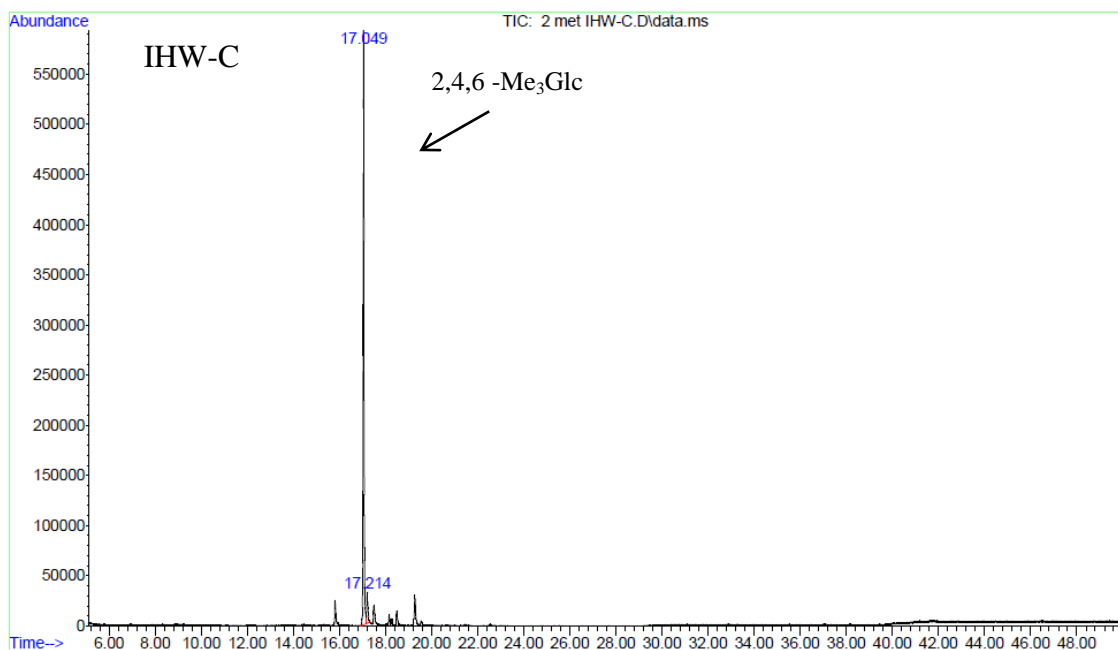


Figura 32- Espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (III: 2,4-Me₂Glc) obtidos após derivatização química (metilação)

Tabela 10- Análise por metilação das glucanas isoladas dos corpos de frutificação das amostras IHW-A, B e C. Analisado em CG-EM (coluna HP5) após metilação, hidrólise ácida total (ácido fórmico 45% por 18h), redução (NaB₂H₄) e acetilação.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ^(a)	Tipo de ligação ^(a)	T _R ^(b)	mol(%)		
			IHW-A	IHW-B	IHW-C
2,3,4,6-Me ₄ Glc	β-D-Glcp-(1→	15,821	13,8	7,9	4,3
2,4,6- Me ₃ Glc	→3)-β-D-Glcp-(1→	17,052	73,3	80,7	95,6
2,4-Me ₂ Glc	→3,6)-β-D-Glcp(1→	19,291	12,8	11,3	-

^aBaseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilado. ^bTempo de retenção de 10 a 30 min. (IHW-A) fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (IHW-B) fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em marupá, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo. (IHW-C) fração insolúvel de *L. strigosus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.



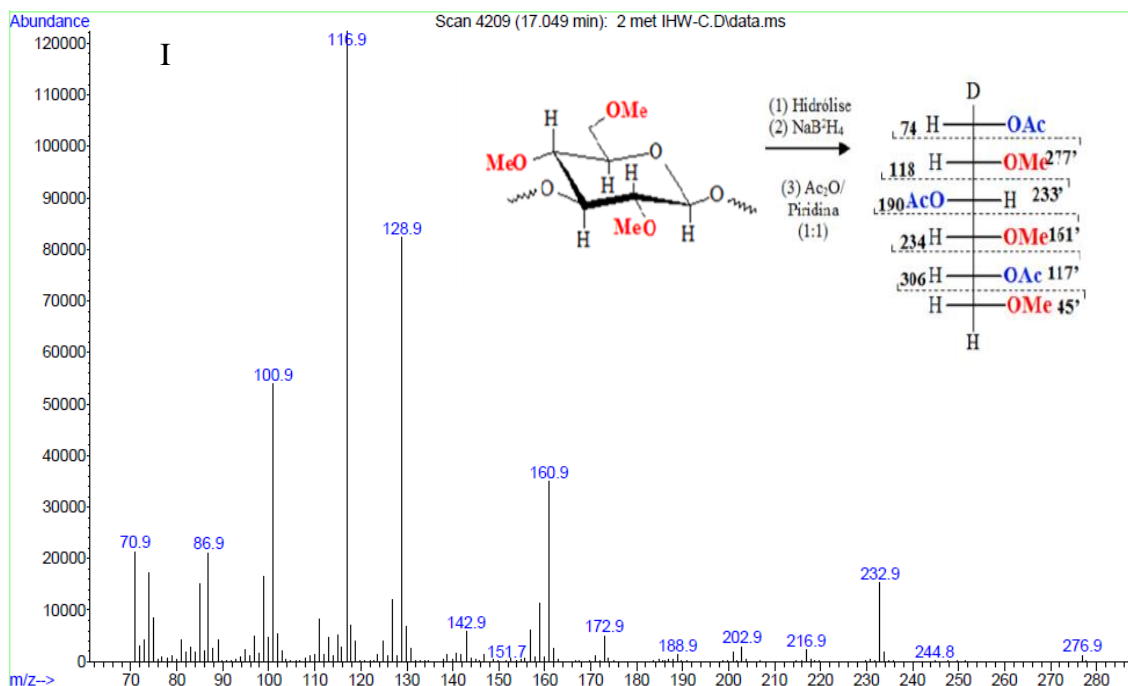


Figura 33- Cromatograma obtido por CG-EM da fração IHW-C e espectro de massa dos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (I: 2,4,6-Me₃Glc) obtidos após derivatização química (metilação).

Estas frações foram analisadas por RMN de ¹³C, as quais as frações IHW-A e IHW-B mostraram-se similares (Figura 34) com sinais na região anomérica (C-1) correspondentes aos terminais não redutores β-D-Glcp (δ 103,0) e às unidades de β-Glcp 3-O- e 3,6-di-O-substituídas (δ 103,0). Os sinais em δ 86,6, δ 86,3 e δ 86,0, correspondentes ao C-3 ligado das unidades da cadeia principal, sugerem a presença de ligações glicosídicas do tipo (1→3). Sinais de CH₂ (C-6) substituídos foram observados em δ 60,8; 60,9; 61,1 e 68,5, confirmando os dados de metilação quanto à presença de ligação (1→6). Os sinais no δ 76,5, 76,4, 76,1, 74,8 correspondem ao C-5, nos δ 73,7, 72,9 e 72,7 ao C-2, em δ 70,2 C-4 do terminal não-redutor e em δ 68,7 e 68,5 ao C-4 e C-6 das unidades da cadeia principal (Tabela 11 e Figura 34) (CARBONERO *et al*, 2012; CARBONERO *et al*, 2006; YOSHIOKA *et al*, 1985).

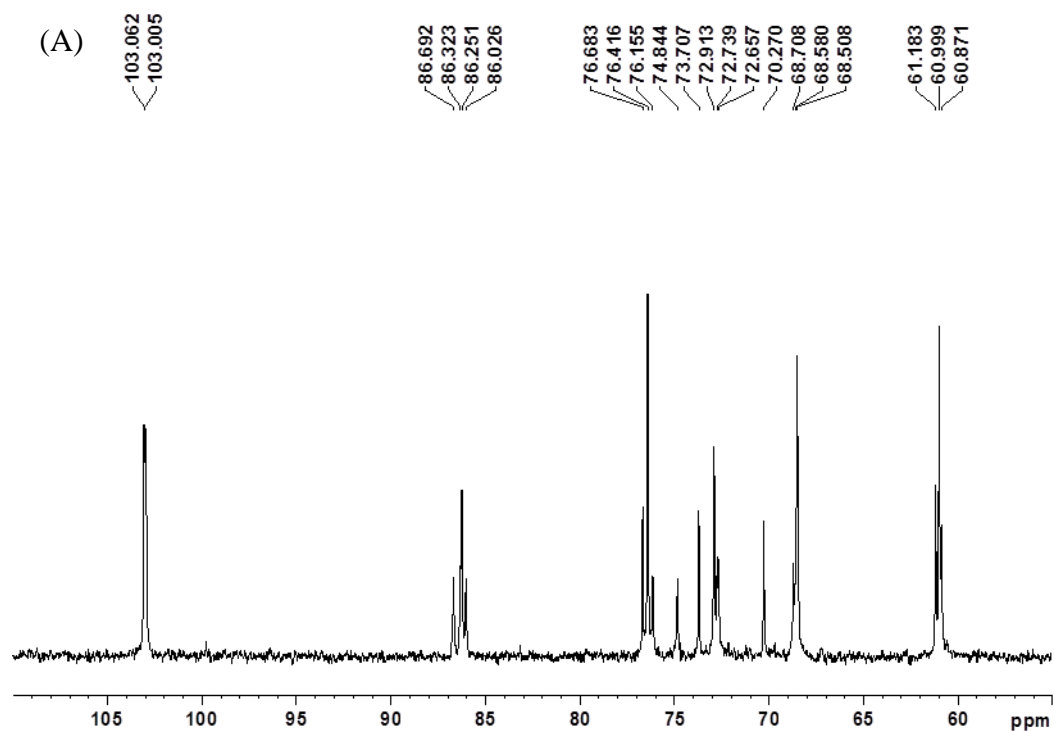


Figura 34-Espectro de RMN de ^{13}C da fração (A) IHW-A analisada em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C . Fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.

Tabela 11- Assinalamentos do espectro de RMN de ^{13}C da fração IHW-A. Fração insolúvel de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow)$	103,0	72,9/72,7	86,6/86,3	68,7	76,5/76,4	60,9/60,8
$\rightarrow 3,6\text{-}\beta\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow)$	103,0	72,7	86,0	68,7	74,8	68,5
$\beta\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow)$	103,0	73,7	76,6	70,2	76,1	61,1

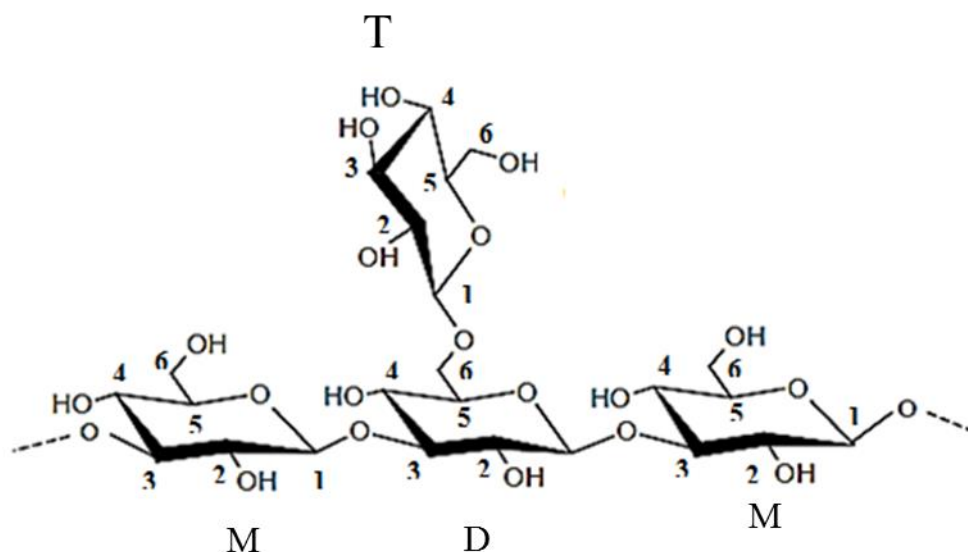


Figura 35- Estrutura química da β -glucana (1 \rightarrow 3) com ramificação em O-6 por terminais não redutores isolada das extrações a quente de *P. ostreatus* em cajuí e marupá. M, D e T correspondem as unidades \rightarrow 3)- β -Glc p -(1 \rightarrow ; \rightarrow 3,6)- β -Glc p (1 \rightarrow e β -Glc p -(1 \rightarrow , respectivamente.

As glucanas isoladas das amostras A e B são similares as comumente encontradas, correspondendo a β -glucanas contendo uma cadeia principal (1 \rightarrow 3), com ramificações em O-6 por terminais não redutores (Figura 35) (CARBONERO *et al*, 2006; SILVEIRA *et al*, 2014), podendo apresentar uma aplicabilidade na indústria química e farmacêutica (KAGIMURA *et al*, 2015).

Em relação à amostra C sugere ser uma β -glucana (1 \rightarrow 3) linear, sendo constituída majoritariamente (95,6 %) por unidades \rightarrow 3)- β -D-Glc p -(1 \rightarrow (ver Tabela 10 e Figura 36).

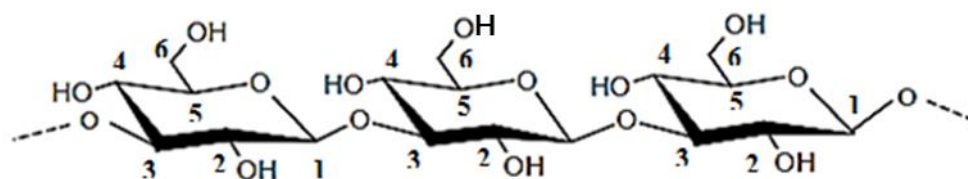


Figura 36- Provável estrutura química da β -glucana (1 \rightarrow 3) linear isolada das extrações a quente de *L.strigosus* em cajuí.

Estas glucanas são comumente encontradas em fungos, podendo as mesmas apresentar a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (SILVEIRA *et al.*, 2014; SYNYTSYA & NOVAK, 2014). No entanto, até o presente momento não há ainda qualquer informação sobre as propriedades biológicas da β -(1 \rightarrow 3)-glucana linear da espécie *L. strigosus*.

Ainda são necessários mais estudos das glucanas isoladas das amostras A, B e C com objetivo de saber se as frações solúveis em água quente são semelhantes às frações insolúveis, pois ao submeter as frações solúveis a RMN de ^{13}C estas apresentaram espectros diferentes das frações insolúveis (Figura 37).

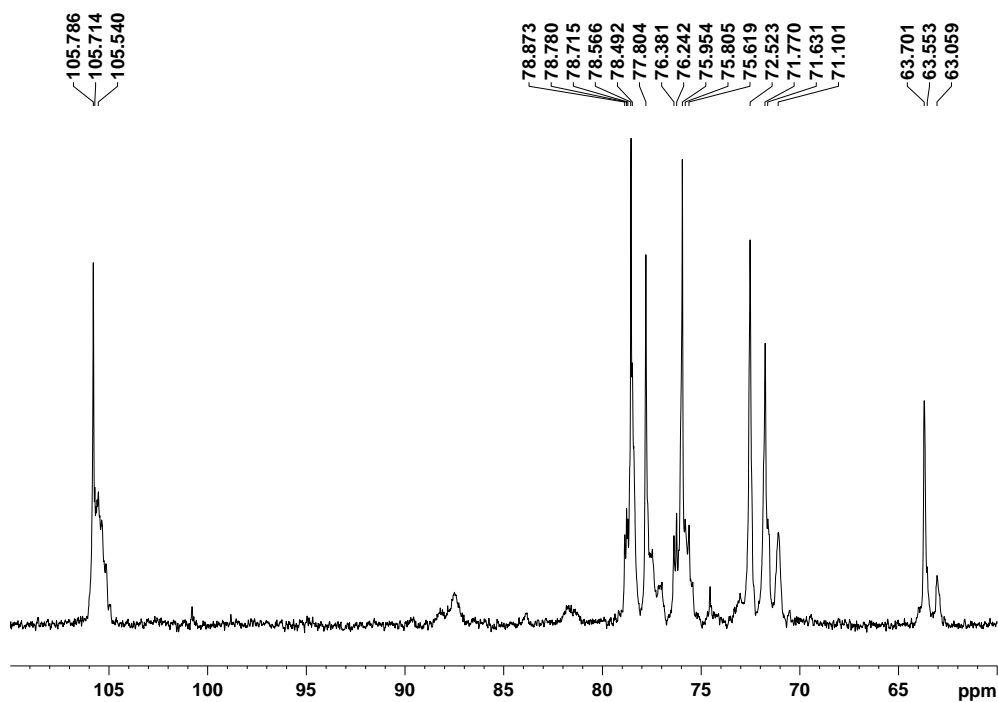


Figura 37- Espectro de RMN de ^{13}C da fração SHW-A. Fração solúvel de *P. ostreatus* cultivado em cajuí, oriunda da extração a quente, após o congelamento/degelo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *L. strigosus* não se desenvolveu em substrato contendo serragem de marupá;
- *P. ostreatus* desenvolveu-se igualmente bem em substrato contendo marupá e cajuí;

- Os basidiomas de *P. ostreatus* e *L. strigosus* cultivado em substratos regionais em cajuí e marupá apresentaram as seguintes estruturas:

- Galactana linear parcialmente metilada foi isolada de *P. ostreatus* cultivado em cajuí;

- β -glucanas (1 \rightarrow 3) com ramificação em O-6 por terminais não redutores isoladas de *P. ostreatus* nos substratos de marupá (IHW-B) e cajuí (IHW-A). A fração IHW-C sugere ser uma β -glucana (1 \rightarrow 3) linear.

As moléculas deste estudo podem apresentar atividade imunomoduladora e antitumoral, semelhante as que são relatadas na literatura.

7. REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, Constantine John; MIMS, Charles W.; BLACKWELL, Meredith. Introductory mycology. 4 ed. New York: Wiley, 1996. 868 p.

ALVES, Maria Jose, et al. A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Current Topics in Medicinal Chemistry, Pennsylvania, v. 13, n.21, 2012. 2648-59.

ARANGO, Carolina Suárez; NIETO, Ivonne Jeannette. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos, Revista Iberoamericana de Micología, Barcelona, v. 30, n. 1, Jan 2013. 1-8.

BARI, Ehsan, et al. Influence of xylem ray integrity and degree of polymerization on bending strength of beech wood decayed by *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*, International Biodeterioration & Biodegradation, Amsterdam, v. 90, n. 90, May 2015. 299-306.

BONTÉ, Frédéric, et al. *Simarouba amara* extract increases human skin keratinocyte differentiation, Journal of Ethnopharmacology, Amsterdam, v. 53, n. 2, Aug 1996. 65-74.

BOYLE, C. David; KROPP, Bradley R. Development and comparison of methods for measuring growth of filamentous fungi on wood, Canadian Journal of Microbiology, Ontario, v. 38, n. 10, Oct 1992. 1053-1060.

BOYLE, C. David. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood, Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, v. 30, n. 6, 1998. 817-823.

CARBONERO, Elaine Rosechrer, et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*, Carbohydrate Polymers, Amsterdam, v. 66, n. 2, Oct 2006. 252-257.

CARBONERO, Elaine Rosechrer, et al. Unusual partially 3-O-methylated α -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*, Phytochemistry, Amsterdam, v. 69, n. 1, Jan 2008. 252-257.

CARBONERO, Elaine Rosechrer. Polissacarídeos de Fungos Liqueenizados Contendo Diferentes Fotobiontes. 2005. 143 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia

Molecular)-Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba.

CARBONERO, Elaine Rosechrer, et al. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, Carbohydrate Polymers, Amsterdam, v. 90, n. 2, Oct 2012. 814-819. 2012.

CARDOZO, Francielle Tramontini Gomes de Sousa, et al. Antiherpetic mechanism of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* fruiting bodies polysaccharide, Intervirology, Paris, v. 57, n. 6, Oct 2014. 375-83.

CARDOZO, Francielle Tramontini Gomes de Sousa, et al. Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*, International Journal of Biological Macromolecules, Amsterdam, v. 57, Jun 2013. 265-72.

CARVALHO, Cristiane Suely Melo de, et al. Applicability of the use of waste from different banana cultivars for the cultivation of the oyster mushroom, Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 43, n. 2, Apr/June 2012. 819-26.

CIUCANU, Ionel; KEREK Francisc. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydrate Research, Amsterdam, v. 131, n. 2, Aug 1984. 209-217.

COHEN, Roni; PERSKY, Limor; HADAR, Yitzhak. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*, Applied Microbiology Biotechnology, Heidelberg, v. 58, n. 5, Apr 2002. 582-594.

COTA, Betania Barros, et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, May 2008. 263-70.

CUNHA, Pablyana Leila R. da, et al. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico, Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009. 649-660.

DEVI, K. Sanjana P, et al. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia, Carbohydrate Polymers, Amsterdam, v. 94, n. 2, May 2013. 857-65.

DONINI, Lorena Pastorini, et al. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos, Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 6, Jun 2006, 995-999.

FANG, Jianping, et al. Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- κ B signaling, Glycoconjugate Journal, London, v. 29, n. 5, Aug 2012. 365-77.

FU, Haitian, et al. Immunomodulatory activities on RAW 264.7 macrophages of a polysaccharide from Veiled Lady Mushroom, *Dictyophora indusiata* (Higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 17, n. 2, 2015. 151-60.

GROSVENOR, Sumieya N. J, et al. Tirucallane, apotirucallane, and octanorapotirucallane triterpenes of *Simarouba amara*, Journal of Natural Products, Washington, v.69, n. 9, 2006.1315–1318.

HANSSSEN, Hans-Peter. Sesquiterpene alcohols from *Lentinus lepideus*, Phytochemistry, Amsterdam, v. 24, n. 6, Sep 1985. 1293-1294.

HANSSSEN, Hans-Peter. Sesquiterpene hydrocarbons from *Lentinus lepideus*, Phytochemistry, Amsterdam, v. 21, n. 5, Jun 1982. 1159-1160.

HEITMAN, Joseph. Microbial pathogens in the fungal kingdom, Fungal biology reviews, USA, v. 25, n. 1, Mar 2011. 48-60.

HOLTZ, Marcos et al. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil, Revista de ciências ambientais, Canoas, v. 3, n. 1, 2009. 37-51.

JEDINAK, Andrej; SLIVA, Daniel. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway, International Journal of Oncology, London, v.33, n. 6, Dec 2008.1307–1313.

JESUS, Maria Aparecida, et al. Durabilidade natural de 46 espécies de madeiras amazônicas em contato com o solo em ambiente florestal, *Scientia Forestalis*, São Paulo, n. 54, Dec 1998. 81-91.

JONES, J.K.N; STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, n. 36, 1965.

KAGIMURA, Francini Yumi, et al. Biological activities of derivatized D-glucans: a review, *International Journal of Biological Macromolecules*, Amsterdam, v. 72, Jan 2015. 588-598.

KALÁČ, Pavel. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, *Journal of the Science of Food and Agriculture, USA*, v. 93, n. 2, Jan 2013. 209-18.

KIHO, Tadashi; SOBUE, Satoshi; UKAI, Shigoe. Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*, *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 251, Jan 1994. 81-7.

KITAMURA, Shinichi, et al. An antitumor, branched (1-->3)-beta-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*, *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 263, n. 1, Oct 1994. 111-21.

KOMURA, Dirce L, et al. Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* var. florida mycelial biomass, *International Journal of Biological Macromolecules*, Amsterdam, v. 70, Sep 2014. 354-9.

LARANJEIRA, Mauro. C. M; FÁVERE, Valfredo T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009. 672-678.

LINDEQUIST, Ulrike, et al. The pharmacological potential of mushrooms, *Evidence – based complementary and alternative medicine, USA*, v. 2, n. 3, Sep 2005.285-299.

LIU, Yuhong, et al. Isolation, structural characterization and neurotrophic activity of a polysaccharide from *Phellinus ribis*, *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 127, Aug 2015. 145-51.

MARANHÃO, Claudia de Albuquerque. Estudo químico, antimicrobiano, larvicida e antitermítico do cerne da madeira de lei *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne. 2009. 139 f. Tese. (Doutorado em Química) – Curso Pós-graduação em Química Recife, Universidade Federal de Pernambuco.

MARANHÃO, Héliida M, et al. Hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Simarouba amara* Aublet (Simaroubaceae) stem bark against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage in rats, *Molecules*, Switzerland, v.19, n. 11, Oct 2014. 17735-46.

MAEDA, Yukiko Y, et al. Denaturation and Renaturation of a β -1,6;1,3-Glucan, Lentinan, Associated with Expression of T-Cell-mediated Responses, *Cancer Research*, USA, v. 48, n. 3, Feb 1988. 671–675.

MAITY, Kousik, et al. Chemical analysis and study of immunoenhancing and antioxidant property of a glucan isolated from an alkaline extract of a somatic hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* variety APK2, *International Journal of Biological Macromolecules*, Amsterdam, v. 49, n. 4, Nov 2011. 555-60. 2011.

MIYAZAKI, Toshio; NISHIJIMA, Motohiro. Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*, *Carbohydrates Research*, Amsterdam, v. 109, 1982. 290–4.

MONTINI, Renato Mamede de Castro. Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade do cultivo axênico de Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. 2001. 97 f. Tese. (Doutorado em Ciências Agrônômicas) – Curso em Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1137139>. Acesso em: 15 junho de 2016.

NELSON, David L; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 235-251 p.

OOI, Vincent E; LIU, Fang. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes, *Current Medicinal Chemistry*, China, v. 7, n. 7, Jul 2000. 715-29.

PATRA, Sukesh, et al. A heteroglycan from the mycelia of *Pleurotus ostreatus*: structure determination and study of antioxidant properties, *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 368, Mar 2013. 16-21.

REN, Lu; PERERA, Conrad; HEMAR, Yacine. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review, *Food & Function*, London, v. 3, n. 11, Nov 2012. 1118-30.

ROUPAS, Peter, et al. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence, *Journal of Functional Foods*, Amsterdam, v. 4, n. 4, Oct 2012. 687-709.

RIVAS, Priscila Marlys Sá, et al. Avaliação de substratos pectocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* sp. (agaricales). *Cadernos de Pesquisa*, São Luís, v. 17, n. 3, Set/Dez 2010.78-83

ROSADO^a, Fábio R, et al. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing, *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 221, n. 1, Apr 2003. 119-24.

ROSADO^b, Fábio R, et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer, *Journal Basic Microbiology*, USA, v. 43, n. 3, 2003. 230-7.

RUTHES^a, Andrea Caroline, et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: structure and inflammatory pain inhibition, *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 98, n. 1, Oct 2013. 761-769.

RUTHES^b, Andrea Caroline, et al. *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)-β-D-glucans: structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects, *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 94, n. 1, Apr 2013. 129-136.

RUTHES, Andrea Caroline; SMIDERLE, Fhernanda R; IACOMINI, Marcello. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effect, *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 136, Jan 2016. 358-75.

RUTHES, Andrea Caroline; SMIDERLE, Fhernanda R; IACOMINI, Marcello. D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches, *Carbohydrates Polymers*, Amsterdam, v. 117, Mar 2015. 753-761.

SAITÔ, Hazime, et al. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study of a gel-forming branched (1 leads to 3)-beta-D-glucan, A3, from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel: determination of side-chains and conformation of the polymer-chain in relation to gel-structure, *FEBS Lett*, Amsterdam, v. 68, n. 1, Sep 1976. 15-8.

SALES-CAMPOS, Ceci 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*, Rio de Janeiro, v.85, n. 4, Oct 2013. 1537-1544.

SALES-CAMPOS, Ceci. Aproveitamento de Resíduos Madeireiros e da Agroindústria Regional para o cultivo de Fungos Comestíveis de Ocorrência na Região Amazônica 2008. 197 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SALES-CAMPOS Ceci; ANDRADE, Meire Cristina Nogueira de. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia, *Acta Amazonica*, Manaus, v. 41, n. 1, Mar 2011. 1-8.

SALES-CAMPOS, Ceci, et al. Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos, *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 78, n. 1, Jan/Mar 2011. 141-145.

SALES-CAMPOS, Ceci; MINHONI, Marli Teixeira de Almeida; ANDRADE, Meire Cristina Nogueira de Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia, *Interciencia*, Caracas, Mar 2010. 198-201.

SÁNCHEZ, Carmen. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms, *Applied Microbiology Biotechnology*, London, v. 85, n. 5, Feb 2010. 1321–1337.

SATITMANWIWAT, Saranya, et al. Improved purity and immunostimulatory activity of β -(1→3)(1→6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 21, May 2012. 5423-30.

SCHMIDT, Olaf. Wood and tree fungi: Biology, damage, protection, and use. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

SILVA, Maria de Lourdes Corradi da, et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas, *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, Jan/Feb 2006. 85-92.

SILVA, Sara, et al. Production, purification and characterisation of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity, *Journal of the Science of Food Agriculture, USA*, v. 92, n. 9, Jul 2012. 1826-32.

SILVA Estefânia Viano da. Estudo químico de carboidratos isolados do micélio do cogumelo medicinal *Grifola frondosa* (“Maitake”). 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Catalão.

SILVA, Hélio S. R. Costa, et al. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços, *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 4, Jul/Aug 2006. 776-785.

SILVEIRA, Marcia L. L, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*, *Carbohydrates Polymers*, Amsterdam, v. 113, Nov 2014. 588-596.

SMIDERLE, Fhernanda R, et al. Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, *Phytochemistry*, Amsterdam, v. 67, n. 19, Oct 2006. 2189-96.

SMIDERLE, Fhernanda R, et al. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect, *Phytochemistry*, Amsterdam, v. 69, n. 15, Nov 2008. 2731-6.

SOUZA-FAGUNDES, Elaine M, et al. *In vitro* activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy, *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, Riberão Preto, v. 43, n. 11, Nov 2010. 1054-61.

SUN, Yongxu; LIU, Jicheng. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, Amsterdam, v. 100, n. 2, Jan 2009. 983-6.

SYNYTSYA, Andriy; NOVAK, Miroslav. Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine*. v. 2, n. 2, Feb 2014. 1-14.

SZWENGIEL, Arthur; STACHOWIAK, Barbara. Deproteinization of water-soluble β -glucan during acid extraction from fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms, *Carbohydrates Polymers*, Amsterdam, v. 146, Aug 2016. 310-9.

TONG, Haibin, et al. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*, *Bioresource Technology*, Amsterdam, v. 100, n. 4, Feb 2009. 1682-6.

VARGAS-ISLA, Ruby, et al. Relationship between *Panus lecomtei* and *P. strigellus* inferred from their morphological, molecular and biological characteristics, *Mycoscience*, Amsterdam, v. 56, n. 6, Nov 2015. 561-571.

VARGAS-ISLA, Ruby; HANADA, Rogério Eiji; ISHIKAWA, Noemia Kazue. Sawdust and fruit residues of Central Amazonian for *Panus strigellus* spawn's production, *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, v. 32, n. 70, Abr/Jun 2012. 7-12.

VANNUCCI, Luca et al. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans, *International Journal Oncology*, v. 43, n. 2, Aug 2013. 357-64.

VERMA, Nidhi; SHUKLA, Sudhir. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, Amsterdam, v. 2, n. 4, Dec 2015. 105-113.

WASSER, Salomon P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, Sep 2002. 258-273.

WIATER, Adrian, et al. α -(1 \rightarrow 3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products, *Biotechnology Letters*, London, v. 33, n. 4, Oct 2011. 787-795.

YAMAC, Mustafa, et al. Hypoglycemic effect of *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. Crude exopolysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Medicinal Food*, USA, v. 11, n. 3, Sep 2008. 513-7.

YANG, Qi, et al. Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats, *International Journal of Biology Macromolecules*, Amsterdam, v. 50, n. 5, Jun 2012. 1224-8.

YOSHIOKA, Yuko, et al. Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.), *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 43, n. 2, Sep 1975. 305-320.

ZHANG, An-qiang, et al. Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*, *Carbohydrate Polymers*, v. 92, n. 1, Jan 2013. 236-40.