

Samara Marrye Aguiar Alexandre

**Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto
Rhizoctonia solani: extração, purificação e atividade
biológica**

**São José do Rio Preto
2015**

Samara Marrye Aguiar Alexandre

**Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto
Rhizoctonia solani: extração, purificação e atividade
biológica**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora:

**Prof^a Dra. Maria de Lourdes Corradi
Custodio da Silva.**

Co-orientadora:

Prof^a Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos.

**São José do Rio Preto
2015**

Alexandre, Samara Marrye Aguiar.

Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani* : extração, purificação e atividade biológica / Samara Marrye Aguiar Alexandre. -- São José do Rio Preto, 2015
105 f. : il., tabs.

Orientador: Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva

Coorientadora: Ana Flora Dalberto Vasconcelos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química. 2. Polissacarídeos. 3. Biomassa. 4. Citotoxicidade.
5. *Rhizoctonia solani*. 6. Cromatografia em gel. I. Silva, Maria de Lourdes Corradi Custodio da. II. Vasconcelos, Ana Flora Dalberto.
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 547.458

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Samara Marrye Aguiar Alexandre

**Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto
Rhizoctonia solani: extração, purificação e atividade
biológica**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a Dra. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva

UNESP – Presidente Prudente

Orientadora

Prof^a Dra. Beatriz Eleutério Goi

UNESP – Presidente Prudente

Prof. Dr. Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer

UEL – Londrina

São José do Rio Preto, 27 de março de 2015

À Deus, por estar sempre presente em minha vida, pelo privilégio que Ele me concedeu de ter realizado este trabalho, pelo Seu cuidado em colocar no meu caminho pessoas do bem, que vieram para acrescentar algo na minha vida, como também me ajudar aqui em Presidente Prudente. Senhor palavras nunca serão suficientes para agradecer todo o seu amor!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir que eu vivesse este sonho, por me presentear com uma família maravilhosa, com bons amigos, pela sua proteção e cuidado, por derramar tantas bênçãos na minha vida mesmo sem eu merecer!

À minha **mãe Josefina**, que não mediu esforços para que eu pudesse estudar em uma universidade pública longe de casa. Mãe obrigada pelo seu apoio incondicional, por me encorajar nos momentos difíceis, pelas suas orações, por nunca ter me cobrado “estar em casa” nos feriados que não pude estar...pelo seu exemplo de ser humano! Te amo muito!

Ao meu **pai Hélio**, por me incentivar a estudar desde a infância, por me mostrar que o conhecimento é algo precioso, por ter despertado em mim a vontade de ingressar em uma universidade pública...e por suas orações! Obrigada pai!

À minha **orientadora profª Dra. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva**, pela sua dedicação como orientadora, pelos ensinamentos, paciência, ajuda, compreensão e disponibilidade em ajudar e sanar minhas dúvidas. Por permitir que eu compartilhasse minhas aflições, pelos conselhos, por dividir momentos da sua vida, pelas correções e incentivo. Pelo seu exemplo como pesquisadora, profissional e pessoa. Por nos contagiar com esse amor pelos Carboidratos!

À minha **co-orientadora profª Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos**, por fornecer a matéria prima deste trabalho! Por me apresentar o mundo dos fungos, pelos ensinamentos, conselhos, dicas, momentos descontraídos, análises de GPC, ajuda nas figuras e por trazer leveza nos momentos tribulados.

À **profª Dra. Ana Maria Pires** por ter se disponibilizado em me orientar no início, tornando possível o início deste sonho.

Ao meu **namorado Johnny**, por todo seu amor, carinho, atenção, amizade e incentivo. Por estar ao meu lado durante esses anos e por ter aceitado “entrar no mestrado” junto comigo! Obrigada por viver este sonho ao meu lado, mesmo que ele tenha prolongado a data do nosso casamento! Obrigada por acreditar na nossa história, no nosso amor, por estar sempre de braços abertos me esperando e por me amar! I Love You!

Ao meu **irmão Victor Hugo**, pelo seu amor, carinho e torcida. Por trazer momentos divertidos a minha vida, por não cobrar minhas ausências! A Tata te ama muito!

Aos meus **avós, Dona Morena e Sr. Aristides**! Obrigada por todo o amor e carinho que vocês me deram! Obrigada por cuidarem de mim até hoje, obrigada por “adivinhar” o que preciso! Obrigada por me incentivar a estar aqui! Vocês são meu porto seguro!

À minha **prima-irmã Monica**, por todo seu apoio, amizade, carinho, companheirismo, paciência e orações! Mo conviver com você durante esses cinco anos foi um presente de Deus.

Aos meus **primos (Ca, Ma, Jota, Fabinho)** por deixarem meus finais de semana mais alegres, e aos demais primos, que mesmo morando longe, estão na torcida!

Às minhas **tias (Cida, Dada, Rosa e Vanda)** pelas inúmeras orações, conselhos e amor!

Aos meus **tios (Edinho, Sérgio)** pelo amor e carinho.

À minha **amiga do coração Gi queridinha!** Por estar sempre presente (mesmo a km de distância), pelas conversas animadoras, pela companhia (via WhatsApp) e principalmente, pela amizade e carinho!

À minha **amiga Li**, pela amizade, torcida, companhia (nas noites intermináveis de “finalização” das nossas dissertações), por ter encarado comigo um semestre de viagens a Rio Preto, por me encorajar e pelo carinho!

À **minha amiga Luluzinha**, pela amizade durante a graduação (que se estendeu até aqui né Lulu!), torcida e orações.

À **Nagyla**, por fazer do nosso lar (junto com a Mo e a Li) um ambiente tranquilo, onde o respeito sempre esteve presente. Pela amizade, carinho, conversas reflexivas e momentos felizes! Agradeço também aos seus pais (**Silvia e Seu Carlito**) e ao Gabriel, por nos socorrerem nos momentos onde os problemas domésticos surgiram.

Aos **irmãos da Primeira Igreja Batista de Presidente Prudente e Igreja Batista de Nova Independência**, pelas orações e carinho. Agradeço em especial a **Andreza, Gabi, Lislie e Shellei**, as quais tive mais contato em PP, pela torcida, e principalmente, pelas orações! As amigas de vocês ficaram para sempre em meu coração! Obrigada meninas!

Às **amigas do laboratório** de Química de Carboidratos do DFQB: **Aline, Angélica, Jéssica, Paty e Monica**, por fazer do “nosso lab” um ambiente agradável, divertido e mais doce (com os bolos deliciosos da Angélica!). Foi um privilégio trabalhar com vocês meninas! Agradeço a Paty e a Monica por terem me ajudado no início das colunas, em especial, a Monica por sempre me ajudar nos momentos que o tempo estava limitado, organizando minhas coisas após os experimentos!

À **técnica de laboratório Marilsa de Stefani Cardoso**, por me proporcionar a melhor base que um profissional de Química precisa para o trabalho de laboratório e pesquisa! Pela sua amizade e exemplo de profissional criterioso, disciplinado, dedicado, educado, responsável e metódico (principalmente né Má!)

À **Fer** e à **Gisele**, pela amizade, conversas, carinho e orações!

À **Ravelly**, pela amizade, conversas, conselhos, companhia nos almoços, carinho e torcida!

Ao **Diego Degli Exposti**, pela amizade, dicas, momentos de descontração e paciência ao me

apresentar o mundo da cromatografia de filtração em gel. Ao **Gabriel Aranda Selverio** pelo cultivo do fungo, auxílio em algumas análises de GPC e DIONEX, pela amizade, conversas e conselhos. Ao **Nilson Kobori Monteiro** pelo auxílio nas análises de FTIR, amizade e conversas. Foi muito bacana trabalhar com vocês!

Ao **prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti**, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelas análises de RMN e disponibilidade em discutir e contribuir com os resultados do trabalho.

Ao **prof. Dr. Ramon Kaneno**, do Laboratório de Imunologia de Tumores, do Instituto de Biociências (UNESP-Botucatu), pela realização dos experimentos de atividade biológica e pela prontidão em responder meus inúmeros e-mails.

À **Dra. Alicia Prieto, Dr. Jesús Jiménez-Barbero, Dr. Javier Cañada e Dra. Maria D. D. Hernandez**, do Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC-Madri), pelas análises de GC-MS e RMN.

À **profª Dra. Beatriz Eleutério Goi e prof. Dr. Marcio José Tiera** pela disponibilidade e contribuição na etapa de qualificação do trabalho e ao **prof. Dr. Cesar Augusto Tischer** pela disponibilidade em participar da banca de defesa, pela contribuição e sugestões. Em especial, agradeço a **profª Dra. Beatriz Eleutério Goi** por ter participado de ambas etapas, enriquecendo o trabalho.

Às **secretárias do DFQB, Juvanir e Fernanda**, e a **funcionária Dona Margarida**, por sempre ajudarem quando necessário, e também pela torcida!

Aos **técnicos da Central de Laboratórios da UNESP-FCT: Sidney** por sempre estar disponível a ajudar, **Gabriel** por ter me ajudado desde a graduação nas aulas de laboratório (principalmente em quali!) e **Murilo** pela ajuda nos gráficos do Excel e MestreNova.

Aos **funcionários do IBILCE**, em especial ao **Alex e Mauro** (seção de Pós-Graduação), pela disponibilidade em ajudar, à **Luciane** (Biblioteca), por facilitar a última burocracia com tanta solicitude e a **profª Dra. Marcia Cabrera**, pelo agradável convívio durante suas aulas!

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial a **profª Dra. Márcia Cristina Bisinoti**, pelo auxílio sempre que necessário.

Aos **professores** do curso de **graduação de Química da UNESP (Presidente Prudente)** por preparem seus alunos de forma a obter êxito nos processos seletivos da pós-graduação.

Aos **colegas e amigos da Química Inorgânica (Grupo LLuMeS) e Química Orgânica (Carina e Rebeca)** pela companhia nos almoços e torcida!

Aos **colegas do curso de Pós-Graduação**, Alessandra, Eliane, Tone e Wesley, pela companhia nas idas a Rio Preto, troca de informações e ajuda.

À **Capes** pelo auxílio financeiro.

“Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão”.

Isaías 40.31, Bíblia.

RESUMO

O fungo *Rhizoctonia solani*, é um fitopatógeno que ataca diversas culturas, provocando o tombamento de plântulas. Há vários estudos visando o combate deste micro-organismo, no entanto, não há relatos da composição química de sua biomassa. De acordo com a literatura a biomassa fúngica pode ser uma fonte promissora de moléculas para aplicação em ensaios biológicos. A partir disso, um estudo inédito da composição química da biomassa do *R. solani*, principalmente em relação aos polissacarídeos, foi realizado. O micro-organismo foi cultivado em meio mínimo de Vogel com glucose como fonte de carbono. A biomassa resultante de vários cultivos foi tratada consecutivamente com etanol (1:20 m/v, 78 °C, 12h, 1x), e água destilada a quente (1:20 m/v, 100 °C, 4h, 4x). O extrato aquoso foi submetido a ciclos de congelamento e descongelamento de maneira a separar o material insolúvel da fração solúvel que foi precipitada em etanol e denominada PE_{H2O} (precipitado etanólico do extrato aquoso). A fração solúvel foi analisada por GPC, cujos resultados indicaram a necessidade de purificação adicional. A cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B, a pressão normal, separou o PE_{H2O} em cinco frações distintas, denominadas de P_I a P_V, eluídas em ordem decrescente de suas massas moleculares. A análise cromatográfica para verificar o grau de homogeneidade de cada pico (GPC) indicou que tanto P_{III} quanto P_V estavam puros e aptos a serem quimicamente caracterizados. A hidrólise ácida e os resultados das análises de metilação e ressonância magnética nuclear uni e bidimensional mostraram que P_{III} é uma β -D-glucana com cadeia principal formada por ligações (1→3), (1→6) e parcialmente substituída em O-6 por cadeias laterais β -D-glucopiranosídicas e P_V uma fucomanogalactana com a cadeia principal formada por resíduos α -D-galactopiranosídicos (1→6) ligados, parcialmente substituídos em O-2 por unidades terminais não redutoras α -L-fucopiranosídicas e α -D-manopiranosídicas. Algumas unidades galactopiranosídicas da cadeia principal estavam parcialmente metiladas em OH-3. Ambos polissacarídeos mostraram ação citotóxica contra células tumorais de cólon humano (HT-29 e HCT-116), porém, não foram capazes de inibir o crescimento das células de câncer pulmonar murino (3LL) por contato direto.

Palavras-chave: cromatografia de filtração em gel, fucomanogalactana, glucana, RMN, *Rhizoctonia solani*, atividade citotóxica.

ABSTRACT

The *Rhizoctonia solani* is a phytopathogenic fungus that attacks various crops, causing the tipping of seedlings. There are several studies related to the combat this microorganism, however, no reports of its biomass chemical composition. According to the literature the fungal biomass can be a promising source of molecules for the use in biological studies. Then a novel study of the chemical composition from *R. solani* biomass, mainly in relation to the polysaccharides, was conducted. The microorganism was grown in Vogel minimal salts medium with glucose as carbon source. Biomass resulting from various cultivations was treated consecutively with ethanol (1:20 w/v), 78 °C, 12h, 1x) and hot distilled water (1:20 w/v, 100 °C, 4h, 4x). The aqueous extract was subjected to freezing and thawing cycles in order to separate the insoluble material. The soluble fraction was precipitated in ethanol and named PE_{H₂O} (ethanolic precipitated from aqueous extract). That fraction was analyzed by GPC and the results indicated that an additional purification procedure would be necessary. Gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B at normal pressure, separated the PE_{H₂O} in five distinct fractions named P_I to P_V, which eluted in decreasing order of their molecular weight. The chromatographic analysis to verify the homogeneity degree of each peak (GPC) indicated that both P_{III} as P_V were pure and able to be chemically characterized. The results from acid hydrolysis, methylation analysis and uni- and bidimensional nuclear magnetic resonance experiments showed that P_{III} is a glucan with β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-linked main chain, partially substituted at O-6 by β -D-Glcp side chains and P_V a fucomannogalactan with a main chain composed by (1 $\rightarrow$ 6)-linked α -D-Galp partially substituted in O-2 by non-reducing end-units of α -L-Fucp and α -D-Manp. Some Galp units from main chain were partially methylated at OH-3. Both polysaccharides showed cytotoxic activity for human colon cancer cells lines (HT-29 and HCT-116), although they are not able to kill lung cancer cells (3LL) by direct contact.

Keywords: Gel filtration chromatography, fucomannogalactan, glucan, NMR, *Rhizoctonia solani*, cytotoxic activity.

LISTA DE ABREVIÇÕES

COSY	-Homonuclear correlation spectroscopy
^{13}C RMN	-Ressonância magnética nuclear de carbono 13
DEPT	-Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	-Dimetil sulfóxido
DQF-COSY	-Cosy double quantum filter
D ₂ O	-Água deuterada/Água pesada/Óxido de deutério
FTIR	-Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GC-MS	-Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GPC	-Cromatografia de permeação em gel
HCl	-Ácido clorídrico
HMBC	-Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	-Heteronuclear multiple-quantum correlation
HPAEC/PAD	-Cromatografia líquida de íons a alta pressão com detecção amperométrica pulsada
HPSEC/RID	-Cromatografia de exclusão molecular a alta pressão acoplada a detector de índice de refração
HOD	-Água deuterada
^1H RMN	-Ressonância magnética nuclear de próton
HSQC	-Heteronuclear single quantum Coherence
H ₂ SO ₄	-Ácido sulfúrico
m/z	-Massa carga
NaBD ₄	-Borohidreto de sódio deuterado
NABH ₄	-Borohidreto de sódio
NaIO ₄	-Periodato de sódio
NaOH	-Hidróxido de sódio

NOESY	-Nuclear overhauser effect spectroscopy
P _{H2O}	-Precipitado etanólico do extrato aquoso
P _{III}	-Glucana
P _v	-Fucomanogalactana
<i>R. solani</i>	- <i>Rhizoctonia solani</i>
ROESY	-Rotational frame nuclear overhauser effect spectroscopy
TFA	-Ácido trifluoroacético
TOCSY	-Total correlation spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hifas do basidiomiceto <i>Rhizoctonia solani</i> AG4. Fonte: GOULART et al., 2011.	10
Figura 2 - Sintomas de tombamento provocado por <i>Rhizoctonia solani</i> . Fonte: LOBO JUNIOR (2005).	25
Figura 3 - Cultivo do micro-organismo <i>Rhizoctonia solani</i> . a) Micro-organismo crescido na placa de Petri. b) Pré-inóculo de 48 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm 48 horas. c-d) Inóculo de 72 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm.	31
Figura 4 - Biomassa do <i>Rhizoctonia solani</i> . a) antes e b) após secagem em estufa a 50 °C.	32
Figura 5 - Extração etanólica da biomassa fúngica em Sistema Soxhlet (1:20 m/v, 78 °C, 12 horas).	34
Figura 6 - Esquema da sequência de reações para obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, onde Ac representa $-\text{COCH}_3$. Fonte: Adaptado de CUI (2005).	40
Figura 7 - Esquema do protocolo de extrações dos polissacarídeos da biomassa do <i>R. solani</i> . Fonte: Autoria própria.	46
Figura 8 - Mecanismo geral de hidrólise ácida de glicosídeos proposto por Edward (1955). Fonte: EDWARD, 1955 apud CORRÊA, 1971.	48
Figura 9 - Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida do $\text{PE}_{\text{H}_2\text{O}}$ por HPAEC com detecção amperométrica pulsada (PAD). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 2 mol/L, 2 h, 120 °C.	48
Figura 10 - a) Perfil de eluição por GPC do $\text{PE}_{\text{H}_2\text{O}}$ e b) Curva de calibração (log mm x tempo de eluição) dos padrões de dextrana com diferentes massas molares.	49
Figura 11 - Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do $\text{PE}_{\text{H}_2\text{O}}$. Vol. coluna: 220 mL, Material aplicado: 12 mg; Fluxo: 1,0 mL/min; Vol. fração: 2,5 mL; Vol. morto: 83 mL.	50
Figura 12 - Análise por HPAEC/PAD dos produtos de hidrólise dos picos I a V. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise:	

TFA 4 mol/L, 2 h, 100 °C. Padrões de açúcares neutros (tempo de retenção em minutos): L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose, D-glucose e D-manose.	51
Figura 13 - Perfil de eluição dos picos I a V por GPC. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de 7.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 Da. Material aplicado: 200 µg em 200 µL; fluxo: 0,6 mL/min a 37 °C. Eluente: NaNO ₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,03%.	52
Figura 14 - a) Espectro de infravermelho da glucana (P _{III}) na região de 4000 a 500 cm ⁻¹ ; b) Região de impressão digital referente ao sinal da configuração β.	53
Figura 15 - Cromatograma gasoso dos acetatos de alditóis parcialmente metilados da glucana (P _{III}) extraída do <i>R. solani</i>	54
Figura 16 - Esquema das fissões entre carbonos metoxilados e acetoxilados, onde Ac representa -COCH ₃ . Fonte: JANSSON et al., 1976.	55
Figura 17 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.	56
Figura 18 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,4,6-tri-O-metil-glucitol.	57
Figura 19 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4-tri-O-metil-glucitol.	58
Figura 20 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,4-di-O-metil-glucitol.	59
Figura 21 - Espectro de ¹ H RMN (500 MHz, D ₂ O, 25 °C) da glucana (P _{III}) obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do <i>R. solani</i> . Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.	62
Figura 22 - Espectros da glucana (P _{III}) obtidos do extrato aquoso do <i>R. solani</i> realizados a 30° C: a) ¹³ C RMN e b) ¹³ C-DEPT RMN.	62
Figura 23 - Espectro bidimensional heteronuclear (HSQC-DEPT) da glucana (P _{III}) obtida do extrato aquoso do <i>R. solani</i> , em D ₂ O a 25 °C.	63

Figura 24 - Possíveis resíduos que fazem parte da estrutura da glucana.	63
Figura 25 - a) Espectro de infravermelho de P _V na região de 4000 a 500 cm ⁻¹ ; b) Região de impressão digital referente ao sinal da configuração α	67
Figura 26 - Cromatograma gasoso dos acetatos de alditóis parcialmente metilados da fucomanogalactana (P _V) extraída do <i>R. solani</i>	67
Figura 27 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4-tri- <i>O</i> -metil-fucitol.	68
Figura 28 - Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-manitol.	69
Figura 29 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4-tri- <i>O</i> -metil-galactitol.	70
Figura 30 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 3,4-di- <i>O</i> -metil-galactitol.	71
Figura 31 - Espectro de ¹ H RMN (500 MHz, D ₂ O, 25 °C) da fucomanogalactana (P _V) obtido por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do <i>R. solani</i>	74
Figura 32 - Espectros da fucomanogalactana obtida do extrato aquoso do <i>Rhizoctonia solani</i> , realizados a 30° C: a) ¹³ C RMN. b) Região de CH ₃ -6 das unidades de fucose. c) ¹³ C-DEPT RMN.	74
Figura 33 - Espectro bidimensional heteronuclear (HSQC-DEPT) da fucomanogalactana obtida do extrato aquoso do <i>R. solani</i> , em D ₂ O a 25 °C . a) Região anomérica. b) Correlação dos sinais C-6/H-6 da fucose. c) Correlação dos demais sinais.	75
Figura 34 - Possíveis resíduos que fazem parte da estrutura da fucomanogalactana.	76
Figura 35 - Efeito citotóxico da β -glucana nas linhagens de células de câncer de cólon humano (HT-29 e HCT-116) e câncer pulmonar murino 3LL.	78
Figura 36 - Efeito citotóxico da fucomanogalactana nas linhagens de células de câncer de cólon humano (HT-29 e HCT-116) e câncer pulmonar murino 3LL.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Glucanas extraídas de basidiomicetos.....	14
Tabela 2 - Galactanas extraídas de basidiomicetos.	19
Tabela 3 - Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da glucana extraída do <i>R. solani</i>	60
Tabela 4 - Assinalamentos de C/H da glucana isolada do <i>R. solani</i> , baseados nas análises de RMN.....	63
Tabela 5 - Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da fucomanogalactana extraída do <i>R. solani</i>	72
Tabela 6 - Assinalamentos de C/H da fucomanogalactana isolada do <i>R. solani</i> , baseados nas análises de RMN.....	75

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1.1 FUNGOS.....	7
1.1.1 Quitridiomycetos.....	8
1.1.2 Zigomicetos	9
1.1.3 Ascomycetos	9
1.1.4 Basidiomicetos	10
1.2 BIOMASSA E PAREDE CELULAR FÚNGICA	11
1.3 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS	12
1.3.1 Glucanas	13
1.3.1.1 Glucanas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) com substituição em O-6	14
1.3.1.2 β -Glucanas com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal	16
1.3.1.3 α,β -Glucanas	16
1.3.1.4 Glucanas lineares	17
1.3.2 Heteropolissacarídeos de basidiomicetos.....	19
1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS.....	21
1.5 <i>Rhizoctonia solani</i>	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 MATERIAIS.....	28
3.1.1 Micro-organismo	28
3.1.2 Reagentes.....	28
3.1.3 Equipamentos	28
3.2 MÉTODOS GERAIS	30
3.2.1 Manutenção do micro-organismo.....	30
3.2.2 Cultivo do micro-organismo para obtenção de biomassa	30
3.2.3 Isolamento da biomassa fúngica	31
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
3.3.1 Quantificação de proteínas - Método de Bradford	32

3.3.2 Quantificação de açúcares totais - Método do fenol-ácido sulfúrico	33
3.4 EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS	33
3.4.1 Extração etanólica	33
3.4.2 Extração aquosa	34
3.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS NO EXTRATO AQUOSO	35
3.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos por tratamentos consecutivos de congelamento e descongelamento	35
3.5.2 Fracionamento dos polissacarídeos obtidos no congelamento e descongelamento por cromatografia de filtração em gel	36
3.5.3 Teste de homogeneidade por cromatografia de permeação em gel.....	36
3.5.4 Hidrólise ácida total	37
3.5.5 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC/PAD)	38
3.5.6 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	38
3.5.7 Determinação da posição e da configuração das ligações glicosídicas dos polissacarídeos purificados	39
3.5.7.1 Metilação pelo Método de Ciucanu e Kerek (1984)	39
3.5.7.2 Hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos metilados	39
3.5.7.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	41
3.6 Degradação do tipo Smith Controlada da fração P _{III}	41
3.7 Teste biológico: Atividade citotóxica	42
3.7.1 Cultura de células tumorais.....	42
3.7.2 Teste de viabilidade celular.....	42
3.7.3 Análises estatísticas.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA.....	44
4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	45
4.2.1 Extração etanólica	45
4.2.2 Extração aquosa a quente	46
4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NO PE _{H2O}	47
4.3.1 Análise da composição monossacarídica e do grau de homogeneidade do PE _{H2O}	47
4.3.2 Purificação do PE _{H2O} por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B	49

4.3.3 Análises da glucana (P _{III}) obtida por cromatografia de filtração em gel a pressão normal do PE _{H₂O}	53
4.3.3.1 Análise da composição monossacarídica, massa molecular, grau de polidispersividade e FTIR da glucana	53
4.3.3.2 Determinação da posição das ligações glicosídicas da glucana	54
4.3.3.3 Caracterização química por RMN da glucana	61
4.3.4 Análises da fucomanogalactana (P _V) obtida por cromatografia de filtração em gel a pressão normal do PE _{H₂O}	66
4.3.4.1 Análise da composição monossacarídica, massa molecular, grau de polidispersividade e FTIR da fucomanogalactana	66
4.3.4.2 Determinação da posição das ligações glicosídicas da fucomanogalactana.....	67
4.3.4.3 Caracterização química por RMN da fucomanogalactana	72
4.4 TESTE BIOLÓGICO: ATIVIDADE CITOTÓXICA	77
4.4.1 Teste de viabilidade celular da glucana	77
4.4.2 Teste de viabilidade celular da fucomanogalactana	79
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FUNGOS

Os fungos constituem um grupo diversificado e disseminado de organismos eucariotos tais como bolores, cogumelos e leveduras. Eles podem ser encontrados em diferentes *habitat*: algumas espécies são aquáticas, encontradas principalmente em água doce, no entanto, grande parte vive em ambientes terrestres realizando a mineralização do carbono orgânico (MADIGAN et al., 2010).

Na natureza, os fungos se relacionam de diferentes maneiras com os seres vivos: por meio do mutualismo que é uma relação de simbiose entre fungos, algas ou cianobactérias, resultando nos líquens; micorrizas, um tipo de simbiose entre os fungos com as raízes de plantas; predação, quando os fungos capturam a presa para se alimentarem, e o parasitismo, uma associação de fungos com plantas ou animais, onde uma das espécies é prejudicada. Neste caso, muitos fungos causam doenças que podem matar o hospedeiro, por isto, são chamados de agentes patogênicos (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Grande parte dos fungos são organismos aeróbicos pluricelulares formados por uma rede de filamentos envolvida por membrana plasmática, chamados de hifas. Quando as hifas são septadas por paredes transversais, as células são separadas umas das outras, no entanto, não deixam de se comunicar fisiologicamente. Em alguns fungos são encontradas hifas chamadas de cenocíticas, neste caso elas não possuem septos e são encontradas como células longas, contínuas, contendo vários núcleos (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). O desenvolvimento das hifas acontece a partir de suas extremidades, onde fragmentos com núcleos podem crescer em um novo organismo (PELCZAR, CHAN, KRIEG et al., 1997).

Ao longo do crescimento individual das hifas ocorrem ramificações entre elas, que posteriormente se unem formando uma massa compacta denominada micélio. A partir do micélio, as ramificações podem se expandir sobre a superfície que o fungo está se desenvolvendo, podendo ocorrer nessas ramificações aéreas a formação dos

esporos (unidades reprodutivas), que tem como função realizar a dispersão dos fungos para outros ambientes (MADIGAN et al., 2010).

Alguns fungos podem apresentar estruturas reprodutivas macroscópicas, designadas corpos de frutificação (cogumelos, por exemplo), onde os esporos são formados e disseminados (MADIGAN et al., 2010).

Por serem organismos quimiorganotróficos, os fungos captam o alimento pela absorção de nutrientes processados por enzimas extracelulares, que são secretadas para degradar macromoléculas como polissacarídeos e proteínas. As células fúngicas então absorvem os monômeros como fontes de energia, carbono, nitrogênio e demais nutrientes. Além disso, em fungos chamados de sapróbios ou saprófitas, essas enzimas realizam a degradação da matéria orgânica recuperando nutrientes que poderão ser usados por outros organismos (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A ação decompositora dos fungos no ecossistema florestal é de extrema importância visto que há uma grande quantidade de árvores e que são constituídas por celulose e lignina. Todos os anos, toneladas desses dois materiais são desprezadas no ambiente, porém são degradadas em moléculas menores pelos fungos, podendo ser reutilizadas. Este fato destaca os fungos na cadeia alimentar que, juntamente com as bactérias, são os principais agentes de decomposição da matéria orgânica presente na natureza (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Apesar da biodiversidade encontrada no reino Fungi, somente cerca de 100.000 espécies foram descritas, das 1,5 milhões estimadas (MADIGAN et al., 2010). Este reino é dividido em quatro principais grupos: Quitridiomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos.

1.1.1 Quitridiomicetos

Os quitridiomicetos podem ser encontrados como espécies unicelulares ou formando colônias com hifas, diferindo dos demais fungos por possuírem esporos móveis e flagelados, denominados zoósporos. Essa característica pode ser um vestígio da adaptação desses organismos em ambientes aquáticos e solos úmidos, habitat onde

geralmente são encontrados decompondo matéria orgânica ou parasitando animais, plantas e protistas (MADIGAN et al., 2010).

Ao longo do ciclo de vida aquático, vários quitridiomycetos estabelecem relação de parasitismo com larvas de pernilongo, e assim colaboram no combate de doenças, como por exemplo, a dengue. Em outros casos eles podem parasitar grãos de pólen, algas ou causar uma doença chamada de quitridiomicose em anfíbios (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

1.1.2 Zigomicetos

Os zigomicetos podem ser parasitas, mutualistas ou sapróbios, geralmente sendo encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição. Normalmente, são os primeiros a se desenvolverem em ambientes que ofereçam fonte de açúcar, sendo conhecidos por decompor alimentos, como por exemplo, o bolor preto do pão causado por *Rhizopus stolonifer* (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Por apresentarem hifas não septadas, os zigomicetos são considerados cenocíticos. A característica que diferencia as espécies do grupo é a presença de zigósporos, que são esporos grandes formados a partir da união de núcleos de duas células morfológicamente parecidas (MADIGAN et al., 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

1.1.3 Ascomycetos

As espécies que pertencem ao grupo dos ascomycetos são formadas por hifas septadas e podem ser encontradas em habitat aquáticos ou terrestres. A característica principal desse grupo é o tipo de estrutura onde são produzidos seus esporos (chamados de ascósporos), denominada de asco. O asco tem a forma semelhante a um saco e por isso os ascomycetos também são chamados de “fungos de saco” (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010; TORTORA, FUNKE CASE, 2012).

O papel desempenhado pelos ascomycetos no ambiente ecológico baseia-se na decomposição de matéria vegetal morta. Além disso, estabelecem relações micorrizas

com árvores florestais e são os maiores representantes de fungos que realizam simbiose com algas verdes e cianobactérias para a formação dos líquens (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

1.1.4 Basidiomicetos

Assim como os ascomicetos, os basidiomicetos possuem hifas septadas (Figura 1). A principal característica que define o grupo é a presença de uma estrutura reprodutiva normalmente unicelular chamada de basídio, sendo este o local onde ocorre a formação de esporos, chamados basidiósporos. Os basidiósporos são correspondentes aos ascósporos dos ascomicetos, no entanto, não possuem revestimento e por isso ficam em contato com o ambiente (MADIGAN et al., 2010; PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

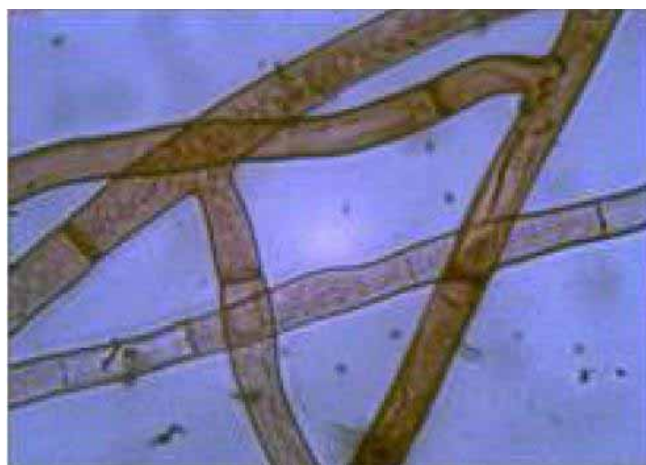


Figura 1 - Hifas do basidiomiceto *Rhizoctonia solani* AG4. Fonte: GOULART et al., 2011.

Os basidiomicetos, conhecidos como cogumelos, orelhas-de-pau, fungos gelatinosos, ferrugem e fuligem, formam um amplo grupo com mais de 30.000 espécies relatadas, tendo papel de destaque na atividade ecológica, por realizar a decomposição da madeira, papel, tecidos e demais produtos provenientes desses materiais, que poderão ser usados como fontes de carbono e energia através da lignina e celulose presentes (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

Os basidiomicetos agrupam parte das espécies fúngicas capazes de degradar celulose e lignina, sendo chamados fungos da podridão branca. Aqueles que degradam preferencialmente celulose, não metabolizando lignina, são chamados de fungos da podridão parda (MADIGAN et al., 2010; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

O conhecimento do processo de degradação de substratos lignocelulósicos por alguns basidiomicetos, levou a descoberta de seu possível uso na degradação de poluentes ambientais devido à similaridade entre a estrutura molecular da lignina com moléculas orgânicas sintéticas, como o pentaclorofenol (PCF), pireno e alguns inseticidas (TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

No grupo dos basidiomicetos algumas espécies são comestíveis como o *Agaricus bisporus* (champignon) (RUTHES et al., 2012), outras são utilizadas por suas propriedades medicinais, como *Grifola frondosa* (WANG et al., 2014a) e outras ainda são patógenas, como as do gênero *Amanita* (MADIGAN et al., 2010).

Os basidiomicetos são bastante estudados em razão do interesse medicinal, que está relacionado à presença de polissacarídeos provenientes da biomassa ou de macromoléculas secretadas (exopolissacarídeos). Dentre os benefícios atribuídos a esses constituintes estão as atividades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (GHOSH et al., 2014; KOMURA et al., 2010; MAITY et al., 2014; YANG et al., 2013; YOU et al., 2013). Portanto, estudar a biomassa e os polissacarídeos secretados gera uma rede de possibilidades de utilização desses micro-organismos como fonte de produtos naturais e/ou compostos bioativos.

1.2 BIOMASSA E PAREDE CELULAR FÚNGICA

Além de atuarem no equilíbrio ambiental, os fungos são utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e na biorremediação de produtos nocivos, sedimentados nos solos e mananciais. O uso desses organismos se faz por meio de seu material celular, conhecido também como biomassa, ou pelos metabólitos procedentes do metabolismo fúngico (FUKUDA et al., 2009; TERÇARIOLI, PALEARI, BAGAGLI, 2010).

O material celular fúngico ou biomassa é constituído por citossol, membrana plasmática e parede celular, sendo esta última uma estrutura rígida (FUKUDA et al.,

2009) que confere o formato da célula, dando-lhe proteção contra mudanças climáticas, tais como calor e frio, ações mecânicas, variação da pressão osmótica, (FREE, 2013; PÉREZ, RIBAS, 2013) dissecação e/ou ataque de micro-organismos. Apesar da rigidez, a parede tem flexibilidade suficiente para garantir que ocorram mudanças morfológicas ao longo do crescimento dos fungos e do seu ciclo de vida. A parede é constituída principalmente por polissacarídeos (70-90%) e glicoproteínas (30-10%). Além das proteínas, os polissacarídeos podem estar ligados a lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação da parede, podendo variar de acordo com as condições de crescimento do micro-organismo. (MADIGAN et al., 2010; PÉREZ, RIBAS, 2013). Dentre os polissacarídeos encontrados estão as glucanas, que podem ser α , β , ou α e β , fucogalactanas, fucomanogalactanas, galactomananas, mananas, quitina e quitosana (LATGÉ, 2007).

Comparando-se a parede celular dos fungos com a dos vegetais, ambas são similares quanto à estrutura e função básica, no entanto, são quimicamente diferentes. A quitina, um polímero de *N*-acetilglicosamina, é o polissacarídeo estrutural mais encontrado na parede celular dos fungos, se dispondo como feixes microfibrilares de modo análogo à celulose nas paredes das células vegetais, podendo ser substituída por polissacarídeos como mananas, galactanas e quitosanas. Em razão da aplicação dos fungos na biotecnologia, o conhecimento da composição química da parede celular desses micro-organismos é fundamental para auxiliar seu uso tanto em pesquisas como na indústria. (MADIGAN et al., 2010).

1.3 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Os polissacarídeos são macromoléculas encontradas em todos os seres vivos. Eles podem se diferenciar quanto aos monossacarídeos que o compõem, tamanho da cadeia, configuração, posição das ligações glicosídicas, grau de ramificação, tipo de estereoisômero e presença de grupamentos químicos. Os polissacarídeos microbianos podem exibir propriedades física e/ou química semelhantes ou melhores que os sintetizados por vegetais e algas marinhas, uma vez que as condições de cultivo são estabelecidas de acordo com os objetivos do estudo. Dessa forma as moléculas

sintetizadas por micro-organismos apresentam características químicas mais homogêneas, favorecendo suas aplicações nos setores alimentício, farmacêutico, médico e ambiental (GUIMARÃES et al., 2009).

1.3.1 Glucanas

As glucanas fúngicas estão presentes no citossol, como fonte de reserva energética, na parede celular do micélio e podem ser secretadas na forma de exopolissacarídeos. Apesar de serem constituídas de unidades de glucose, diferem entre si quanto à conformação, configuração da ligação glicosídica, sequência das ligações entre as unidades de glucose ao longo da cadeia e o grau de ramificação. (SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M.; 2013). Ao longo desta seção serão descritos exemplos de glucanas isoladas de basidiomicetos, sendo algumas ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Glucanas extraídas de basidiomicetos.

Espécie (Referência)	Estrutura
<i>Calocybe indica</i> (Mandal et al., 2012)	$\rightarrow[6\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1)}_2\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow[4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1)}_2\rightarrow$ 6 ↑ 1 $\alpha\text{-D-Glcp}$
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Alquini et al., 2004)	$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$
<i>Pleurotus pulmonaris</i> (Smiderle et al., 2008)	$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ 6 ↑ 1 $\beta\text{-D-Glcp}$
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Pramanik et al., 2007)	B $\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ A 6 ↑ 1 $\beta\text{-D-Glcp}$ D C $\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$
<i>Termitomyces robustus</i> (Bhanja et al., 2012)	$\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$
<i>Tricholoma crassum</i> (Samanta et al., 2013)	$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ 6 ↑ 1 $\beta\text{-D-Glcp}$

1.3.1.1 Glucanas do tipo $\beta\text{-(1}\rightarrow 3)$ com substituição em O-6

Entre os principais polissacarídeos da parede celular fúngica estão as β -glucanas, que em basidiomicetos, ocorrem principalmente com ligações do tipo $(1\rightarrow 3)$

sendo substituída em O-6 por um ou mais resíduos de glucose (GOODAY, 1995), como a encontrada no corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum* (LIU et al., 2014a). Tal polímero foi obtido por extração aquosa a quente, seguida de tratamentos de purificação. Os resultados da metilação indicaram que a glucana era do tipo (1→3) com substituição em O-6 a cada três unidades monossacarídicas da cadeia principal. A configuração β das unidades glucopiranosídicas foi confirmada pela presença dos sinais de ^1H RMN e ^{13}C na região anomérica em δ 4,5 ppm/ δ 4,2 ppm e δ 102,96 ppm, respectivamente (LIU et al., 2014a).

Glucana semelhante foi obtida a partir da fração insolúvel (PS-II) do *Termitomyces robustus*. O espectro de infravermelho confirmou a configuração β das ligações glicosídicas, pela presença do sinal em 890 cm^{-1} . Os resultados das análises de metilação e RMN uni e bidimensionais, mostraram que a cada três unidades β -D-Glcp(1→3) ligadas, da cadeia principal, uma era substituída em O-6, também por resíduos únicos D-glucosídicos (BHANJA et al., 2012).

Uma fração polissacarídica obtida por extração aquosa a quente, do *Pleurotus pulmonaris*, seguida de ciclos de congelamento e descongelamento, apresentou em sua composição xilose (2%), galactose (3%), manose (5%) e glucose (90%). A solução aquosa dessa fração comportou-se como um gel, inviabilizando sua aplicação em experimentos biológicos. Portanto, para a obtenção de um material solúvel, a fração foi tratada com hidróxido de sódio a 2%, 80 °C, 3 horas e ressubmetida a ciclos de congelamento e descongelamento. A fração solúvel obtida a partir deste tratamento comportou-se como um material homogêneo por cromatografia de permeação em gel e por hidrólise ácida apresentou glucose como seu principal constituinte. Os resultados de metilação e RMN (^{13}C , HMQC), evidenciaram que a glucana é formada por ligações do tipo β -D-(1→3) com substituição em O-6 por unidades β -D-glucopiranosídicas. A presença de seis sinais no espectro de ^{13}C do produto da degradação de Smith controlada, indicou a predominância de ligações β -(1→3) na cadeia principal (SMIDERLE et al., 2008).

1.3.1.2 β -Glucanas com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal

Uma β -glucana obtida por extração aquosa a quente do corpo de frutificação do basidiomiceto ectomicorrízico *Tricholoma crassum*, foi purificada por cromatografia de filtração em gel. Seus acetatos de alditóis parcialmente metilados, analisados por GC-MS, indicaram que a glucana é formada por ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) e (1 $\rightarrow$ 3,6), confirmadas pelo experimento de oxidação com periodato. Os dois sinais de carbonos anoméricos em δ 102,9 e δ 103,2 ppm do produto da degradação de Smith controlada, comprovaram que a cadeia principal da glucana é formada por ligações com configuração β . Sustentada pelos resultados de hidrólise, metilação, degradação de Smith controlada e experimentos de RMN uni e bidimensionais, a elucidação estrutural da β -glucana resultou em uma molécula com a cadeia principal formada por ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) sendo substituída em O-6 nos resíduos β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 3) da cadeia principal (SAMANTA et al., 2013).

De *Lentinus squarrosulus*, foi isolada de seu extrato alcalino uma β -glucana com massa molecular aparente de $1,98 \times 10^5$ Da (BHUNIA et al., 2011). A análise por GC-MS exibiu os derivados 1,3,5,6-tetra-O-acetil-2,4-di-O-metil-glucitol, 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-glucitol, 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-metil-glucitol, 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol, mostrando a presença de ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3,6), (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) e terminais não redutores D-glucopiranosídicos, na proporção de 1:2:1:1. Os resultados das análises de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT-135, DQF-COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HMQC e HMBC) confirmaram a estrutura como uma β -glucana formada por ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal com substituição em O-6.

1.3.1.3 α,β -Glucanas

A glucana obtida do extrato aquoso a quente de *Calocybe indica* foi caracterizada como tendo configuração α e β , em sua estrutura. Os derivados metilados encontrados na proporção de 2:1:2:1, foram respectivamente, 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-glucitol, 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-glucitol, 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-glucitol e 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol,

sugerindo a presença de ligações glicosídicas dos tipos (1→4), (1→4,6), (1→6) e resíduos terminais D-glucosídicos. Os experimentos de RMN confirmaram os tipos e as configurações das ligações glicosídicas, sendo a cadeia principal formada por resíduos α -(1→4), β -(1→4,6), β -(1→6) com terminais α -D-glucosídicos (MANDAL et al., 2012).

A extração aquosa a quente de *Pleurotus sajor-caju* resultou em uma glucana com massa molecular aparente de $2,4 \times 10^5$ Da, estimada a partir de uma curva padrão de dextranas, com diferentes massas moleculares (PRAMANIK et al., 2007). Os quatro sinais na região anomérica no espectro de ^{13}C sugeriram que quatro resíduos compõem a estrutura da glucana que os autores denominaram de A, B, C e D. Os deslocamentos químicos dos prótons anoméricos de A e B na região de alta frequência mostraram que ambos possuem resíduos de configuração α , já os resíduos C e D possuem a configuração β , comprovada pelos sinais em baixa frequência de seus prótons anoméricos. Os resultados dos produtos metilados mostraram que ligações do tipo (1→2,6), (1→6), (1→3) e resíduos não redutores fazem parte da estrutura da glucana. A análise dos experimentos de RMN constatou que os resíduos A, B, C e D são respectivamente, formados por unidades α -(1→2,6), α -(1→6), β -(1→3) e extremidades não-redutoras β -D-glucopiranosídicas (PRAMANIK et al., 2007).

1.3.1.4 Glucanas lineares

Na literatura há também registros de glucanas lineares. A partir do corpo de frutificação do *Laetiporus sulphureus* foi isolada do extrato aquoso, seguida de procedimentos de congelamento e descongelamento, uma fração insolúvel constituída de glucose (98%). O espectro de ^{13}C RMN apresentou seis sinais típicos de homopolímero de hexose. A presença de 99,7% do derivado 1,3,5-di-O-acetil-2,4,6-tetra-O-metil-glucitol nos resultados de metilação e o sinal de deslocamento químico em δ 86 ppm, confirmaram a estrutura linear do tipo β -(1→3) da glucana, identificada como laminarana (ALQUINI et al., 2004).

A purificação por cromatografia de filtração em gel de Sepharose 6B da fração solúvel (PS-I) de *Termitomyces robustus*, isolou um homopolímero de glucose. Os

resultados de RMN com um único sinal de deslocamento químico na região de carbono anomérico em δ 103,4 ppm e nenhum sinal de C-6 livre, bem como a identificação do derivado 1,5,6-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol por GC-MS, levaram a conclusão de que as ligações glicosídicas são do tipo (1→6) e em configuração β , a qual foi confirmada pelo sinal em 900 cm⁻¹ do espectro de infravermelho (BHANJA et al., 2012).

Estruturas similares foram obtidas de *Agaricus bisporus* e *Agaricus brasiliensis* por meio da extração aquosa a quente (SMIDERLE et al., 2013). Tratamentos de purificação com dimetilsulfóxido e congelamento e descongelamento foram realizados com o intuito de obter as β -glucanas, que se mostraram homogêneas na cromatografia de permeação em gel acoplada ao detector de índice de refração. Os sinais em alta frequência dos carbonos anoméricos e a presença de seis sinais no mesmo espectro, comprovaram que ambas moléculas possuem, respectivamente, a configuração β e a estrutura linear formada por ligações do tipo β -(1→6).

Glucanas lineares com configuração α podem compor o micélio de basidiomicetos. Do extrato aquoso a quente, proveniente do corpo de frutificação de *Termitomyces eurhizus*, foram obtidas, após purificação em coluna de gel Sephadex G-50, duas frações denominadas PS-I e PS-II. Os resultados de metilação e ¹³C RMN e ¹H (uni e bidimensionais) mostraram que ambas são lineares: PS-I é uma glucana formada por unidades α -(1→6) e α -(1→3) e PS-II é constituído apenas por ligações glicosídicas do tipo α -(1→6) (MONDAL et al., 2004).

Por meio da digestão enzimática, Palacios e colaboradores (2012) investigaram a configuração anomérica da glucana isolada do extrato aquoso a quente de *Pleurotus ostreatus*. A presença de produtos hidrolisados pela α -glicosidase indicou a configuração α das ligações glicosídicas. A análise por GC-MS detectou o derivado 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-*O*-metil-glucitol, típico de ligações (1→4). Os resultados de RMN uni e bidimensionais, confirmaram a estrutura linear com ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) da glucana (PALACIOS et al., 2012).

1.3.2 Heteropolissacarídeos de basidiomicetos

Entre os heteropolímeros as galactanas são as mais frequentes em basidiomicetos. Geralmente têm cadeia principal de unidades α -D-Galp-(1→6) ligadas (podendo algumas dessas unidades conter grupos O-metila) com ramificações em O-2 por diferentes substituintes como fucose e/ou manose (KOMURA, et al., 2010; RUTHES et al., 2012; ZHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014). A Tabela 2 mostra exemplos de galactanas isoladas de basidiomicetos.

Tabela 2 - Galactanas extraídas de basidiomicetos.

Espécie (Referência)	Estrutura		
<i>Coprinus comatus</i> (Zhou et al., 2013)	$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ 2 ↑ $\alpha\text{-L-Fucp}$		
<i>Lentinus edodes</i> (Carbonero et al., 2008)	A $\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	B $\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ 2 ↑ 1 $\beta\text{-D-Manp}$	C $\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ 2 ↑ 1 $\alpha\text{-L-Fucp}$
<i>Pleurotus geesteranus</i> (Zhang et al., 2013)	$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-3-O-Me-D-Galp-(1}\rightarrow$ 2 ↑ 1 $\beta\text{-D-Manp}$		

Foi isolada uma fucogalactana (CC30w-1), do corpo de frutificação de *Coprinus comatus*, com massa molecular de $1,03 \times 10^4$ Da. O heteropolissacarídeo purificado por cromatografia de permeação em gel Sephacryl S-400 foi caracterizado como tendo a cadeia principal formada por unidades de α -D-Galp-(1→6) ligadas e substituídas em O-2 por unidades α -L-Fucp (ZHOU et al., 2013).

Por apresentar um perfil heterogêneo na cromatografia de permeação em gel, o extrato aquoso a frio de *Lentinus edodes* foi purificado com solução de Fehling. O

precipitado de Fehling resultante, após descomplexação dos íons cobre, teve sua estrutura química investigada por análise de sua composição monossacarídica, experimentos de metilação e RMN. A presença dos derivados parcialmente metilados 2,3,4-Me₃-Fuc (11%), 2,3,4,6-Me₄-Man (21%), 2,3,4,6-Me₄-Gal (1%), 3,4-Me₂-Gal (33%) e 2,3,4-Me₃-Gal (34%) indicaram elevado grau de ramificação da molécula cuja cadeia principal era constituída por resíduos de galactose. Os espectros de RMN forneceram os dados complementares para elucidar a estrutura química, que foi considerada como uma fucomanogalactana com a cadeia principal formada por unidades α -D-galactopiranosídicas ligadas em (1 $\rightarrow$ 6), substituídas em O-2 por unidades β -D-manopiranosídicas ou α -L-fucopiranosídicas (CARBONERO et al., 2008).

O precipitado obtido do tratamento de Fehling proveniente da fração solúvel do extrato aquoso, a quente, de *Amanita muscaria* teve sua estrutura química definida por resultados de metilação e espectroscopia de RMN, uni e bidimensionais. Tal estrutura foi semelhante aquela relatada por Carbonero e colaboradores (2008), uma fucomanogalactana formada por resíduos α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6) parcialmente substituídos em O-2 por cadeias laterais de α -L-Fucp e β -D-Manp. Neste caso, as unidades β -D-Manp (8,9%) estavam presentes em menor quantidade do que as α -L-Fucp (21,6%) (RUTHES et al., 2013a).

O avanço nas técnicas de caracterização tem facilitado a elucidação estrutural dos polissacarídeos, auxiliando na compreensão de suas funções e de seus mecanismos de ação em bioensaios (DIMITRIU, 2005). Por exemplo, pequenas diferenças estruturais entre fucogalactanas isoladas de *Agaricus brasiliensis* (EPF-Ab) e *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (EPF-Ah) foram relacionadas com o fato de apenas (EPF-Ah) apresentar efeitos anti-inflamatórios (KOMURA, et al., 2010). A Influência da estrutura também foi relatada em glucanas obtidas do basidiomiceto *Lactarius rufus*: a maior solubilidade de uma delas aumentou o efeito anti-inflamatório contra dor induzida por formalina (RUTHES et al., 2013b).

A busca por polissacarídeos com propriedades biologicamente ativas tem tornado os basidiomicetos o alvo de muitas pesquisas, isto porque biomoléculas isoladas desse grupo de fungos têm apresentado resultados satisfatórios quando

submetidas a ensaios de atividade biológica, dessa forma, alguns exemplos que enfatizem essas propriedades serão descritos.

1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Um dos primeiros trabalhos investigando propriedades antitumorais de compostos isolados de basidiomicetos ocorreu em 1957. Nesse trabalho foi utilizado o extrato obtido do corpo de frutificação de *Boletus edulis*, que apresentou resultados positivos no tratamento contra uma linhagem de sarcoma 180, em camundongos (LUCAS, 1957 apud WASSER, WEIS, 1999). Posteriormente, os mesmos autores isolaram de *Calvatia gigantea*, o composto denominado calvacina, considerado um possível agente anticancerígeno nos testes utilizando tumores como sarcoma 180, adenocarcinoma mamário 755, leucemia L-1210 e linhagens de células HeLa (LUCAS, 1959 apud WASSER, WEIS, 1999). As propriedades antitumorais de calvacina tornaram-na um produto natural bem visado na década de 60 (LUCAS, 1959 apud LEMIESZEK, RZESKI, 2012).

Há estudos que indicam que as propriedades antitumorais de extratos obtidos de basidiomicetos são provenientes de seus polissacarídeos, e que seus efeitos bioativos dependem de inúmeros fatores tais como a composição monossacarídica, massa molecular, solubilidade em água, tipos de ligação, presença ou não de ramificação e outros ligantes, como as proteínas, e por fim, a modificação química. (LEMIESZEK, RZESKI, 2012; ZHANG et al., 2007).

Pesquisas realizadas com cinco β -glucanas extraídas de *Lentinus edodes* mostraram que todas promoviam efeito citotóxico na viabilidade de células tumorais (sarcoma 180 e hepatoma 22), no entanto o melhor resultado veio dos polissacarídeos com massas moleculares maiores. A conformação em tripla hélice favorecia a ação antitumoral. A β -glucana que mostrou ação citotóxica mais eficaz, denominada LST1, foi selecionada para testes *in vivo* cujos resultados indicaram um aumento das células imune e preservação das células normais. O grupo tratado com citoxano (quimioterápico) agiu como imunossupressor, diminuindo a eficiência do sistema imunológico (WANG, et al., 2014b).

Para otimizar as propriedades antitumorais da glucana β -D-(1 $\rightarrow$ 4; 1 $\rightarrow$ 6) 3-O substituída por resíduos β -D-glucosídicos, extraída de *Phellinus ribis*, procedimentos de sulfatação foram realizados. Derivados com diferentes graus de substituição (DS) foram obtidos e dois deles, com DS 0,96 e 1,62, foram ensaiados para a inibição de tumores *in vivo* cujas taxas de inibição foram de 54,6 e 60,6%, respectivamente, em uma dose de 20 mg/kg (camundongos com carcinoma hepatocelular H22 inoculado). Segundo os autores (LIU et al., 2014b) a atividade antiangiogênica, apresentada por essas moléculas, pode ser um dos fatores que contribuíram para esses resultados, visto que há uma diminuição na formação de novos vasos sanguíneos, assim evitando a propagação do tumor.

Glicoproteínas, solúveis em água, isoladas de *Pleurotus tuber-regium* mostraram atividade citotóxica frente às células com sarcoma 180. No entanto, o efeito mais pronunciado veio de seus derivados carboximetilados e sulfatados. A entrada de grupos iônicos na estrutura do complexo polissacarídeo-proteína pode ter proporcionado um aumento na interação entre os receptores das células tumorais com os agentes anticancerígenos (TAO, ZHANG, ZHANG, 2009).

A β -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucana com ramificação em C-6 por resíduos β -D-glucosídicos, extraída de *Ganoderma lucidum*, mostrou-se capaz de ativar a liberação de óxido nítrico por células de macrófagos da linhagem RAW264.7 (LIU et al., 2014a). Dentre as funções do óxido nítrico no organismo destaca-se a de neurotransmissor, atuando na regulação de processos de inflamação e nos mecanismos de autoimunidade (FLORA FILHO, ZILBERSTEIN, 2000).

A atividade antitumoral do heteropolissacarídeo, proveniente de *Pleurotus eryngii*, contra câncer renal pode ter relação com sua atuação no sistema imunológico. A molécula de $2,5 \times 10^4$ Da constituída pelos monossacarídeos galactose, manose e arabinose estimulou a proliferação de esclerócitos, as respostas imunes celular e humoral, além de ativar as células natural killer (YANG et al., 2013).

Embora o heteropolissacarídeo homogêneo constituído de glucose, manose e ramnose, extraído do fungo *Inonotus obliquus*, não tenha apresentado efeito citotóxico significativo nos testes *in vitro* com células SGC- 7901, após dez dias de ensaios *in vivo* ele dificultou o crescimento das mesmas células, com um fator de

inibição de 54,45% para a concentração de 100 mg/kg de camundongo. Também foi capaz de potencializar a atividade do sistema imunológico estimulando a produção de macrófagos peritoneais, a secreção de TNF- α por macrófagos e a proliferação de linfócitos, com ou sem o estímulo de concanavalina (Con A), reforçando a ideia de que o efeito antitumoral, observado no ensaio *in vivo*, pode estar indiretamente relacionado com os estímulos provocados no sistema imunológico (FAN et al., 2012).

Uma glucoarabinogalactana, extraída de *Trametes robiniophila* (Huaier), desacelerou o crescimento de três linhagens de células humanas com carcinoma, preservando as células normais e mostrando-se não citotóxica. Nos demais ensaios seu efeito como agente imunorregulador foi evidenciado pela capacidade de potencializar a proliferação de linfócitos, a fagocitose de macrófagos e a atividade da enzima óxido nítrico sintetase, comprovada pela produção de óxido nítrico nos macrófagos (SUN et al., 2013).

A purificação do material obtido do corpo de frutificação do *Tricholoma matsutake*, resultou em três frações polissacarídicas (TM-P1-P3) constituídas de glucose, galactose e manose, que apresentaram atividade antioxidante e reagiram contra as linhagens de célula de hepatoma (HepG2) e de câncer de pulmão humano (A549), sendo o aumento da atividade antiproliferativa dependente da concentração dos polissacarídeos. Em ambos os ensaios a fração TM-P2 apresentou os melhores resultados e segundo os autores (YOU et al., 2013) esse desempenho poderia estar relacionado com pequenas diferenças na composição química das moléculas, na presença de proteína, ácido glucurônico e massa molecular.

A β -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana substituída em C-3 por resíduos β -D-Glcp, proveniente do extrato alcalino de *Entoloma lividoalbum*, foi considerada um antioxidante natural promissor. A biomolécula inibiu a produção do radical superóxido em 64,4% com uma dose de 200 μ g/mL e eliminou metade dos radicais hidroxila na concentração (EC₅₀) de 480 μ g/mL. A capacidade redutiva da molécula pode ser um indício de sua forte ação antioxidante (MAITY et al., 2014).

A β -glucana parcialmente ligada a proteínas, de *Geastrum saccatum*, apresentou características antioxidantes e anti-inflamatórias. Com uma dose de 0,27 mg/mL a molécula inibiu a peroxidação lipídica em 59% e protegeu as células contra o

estresse oxidativo em 88%. O efeito anti-inflamatório, no edema auditivo induzido por óleo de cróton, foi reduzido a 60% quando injetado em doses de 10 mg/kg e 76% quando administrada em doses de 30 mg/kg (GUERRA DORE et al., 2007).

A descoberta de que polissacarídeos, isolados de basidiomicetos, podem atuar como agentes antimicrobianos levou a investigação de novas espécies fúngicas. Os polissacarídeos extraídos de *Polyporus mori*, *Coltricia perennis* e *Onnia tomentosa* foram analisados frente ao cultivo de algumas bactérias e aquele extraído do *Polyporus mori* apresentou maior inibição sobre o crescimento da bactéria gram-negativa *Ralstonia solanacearum*, responsável pela doença murcho-bacteriana em plantas, como por exemplo, na berinjela. Segundo os autores (GHOSH, 2014), pesquisas adicionais serão realizadas para aplicação das biomoléculas.

Glucanas de *Phellinus linteus* (REIS et al., 2014) responderam positivamente ao tratamento antifúngico contra *Trichoderma viride*, com uma concentração inibitória mínima de 0,11 mg/mL. Os polissacarídeos de *Pleurotus australis* exibiram atividade antibacteriana ao *Staphylococcus epidermidis* com dose mínima de 0,469 mg/mL (REN et al., 2014). O uso de agentes antimicrobianos naturais é uma alternativa para a diminuição dos efeitos tóxicos causados por produtos sintéticos utilizados na agricultura e setores industriais (REIS et al., 2014).

1.5 *Rhizoctonia solani*

O gênero *Rhizoctonia* foi relatado, pela primeira vez, em 1815 por De Candolle, sendo a espécie *Rhizoctonia solani* descrita mais tarde por Kuhn, em 1858 (OGOSHI, 1996). O basidiomiceto *Rhizoctonia solani* é um fitopatógeno natural do solo que pode agredir diversas espécies vegetais e por isso é chamado de fungo polífago. Através da sua ação como saprófita, realiza a degradação de matéria orgânica e, com isso, mantém-se no solo mesmo sem a presença de hospedeiros e em situações desfavoráveis (LUCON, 2008; GOULART, 2001).

R. solani é um dos fitopatógenos radiculares mais frequentes e de maior destaque na lavoura do feijão, provocando dentre outras coisas, deterioração de sementes, raízes e tombamento de plântulas (BOTELHO et al., 2001). Goulart (2001)

classifica o micro-organismo como o principal agente causador do tombamento de plântulas (embrião de uma planta, contido na semente) no Brasil, particularmente em situações que envolvem o algodão do cerrado, sendo responsável por mais de 95% dos casos e por ocasionar estragos no início do cultivo (Figura 2). Seu crescimento é capaz de diminuir a área de cultivo e, em muitos casos, torna-se necessário realizar a ressemeadura. Infelizmente, o crescimento do fungo *R. solani* não é impedido pelo procedimento de rotação de culturas porque a espécie pode se comportar como saprófita e se adaptar a um novo substrato, permanecendo no solo por mais tempo. Apesar disso, esse procedimento ainda é viável, pois se empregado corretamente, pode estimular uma mudança qualitativa na microflora do solo, favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos prejudiciais ao *R. solani* e diminuindo as doenças provocadas pelo fitopatógeno. Uma das formas mais usadas para o combate do tombamento provocado pelo *R. solani* é a utilização de fungicidas eficazes nas sementes das plantas. Esse procedimento é utilizado mundialmente e identificado como um dos mais apropriados para o controle da doença (GOULART, 2001).



Figura 2 - Sintomas de tombamento provocado por *Rhizoctonia solani*. Fonte: LOBO JUNIOR (2005).

Estudos posteriores mostraram que a mistura de agentes antifúngicos pode controlar o desenvolvimento de espécies patogênicas encontradas em sementes e no

solo, proporcionando melhores condições de plantio aos agricultores, no processo de busca pela lavoura ideal (GOULART, 2002).

Goudjal e colaboradores (2014) usaram raízes de plantas para obter cepas de actinomicetos endofíticos, com a finalidade de usá-los contra o tombamento causado pelo *R. solani*, em mudas de tomate. Todas as cepas apresentaram bons resultados para o controle biológico de *R. solani*, provocando uma diminuição dos efeitos da doença e estimulando o desenvolvimento das mudas de tomate. Os resultados sugerem que as cepas podem exercer funções antagônicas e eficientes no combate aos fungos do solo e que seu uso pode colaborar para a melhoria do crescimento de seus hospedeiros vegetais.

Há, sem dúvida, muitas pesquisas voltadas para os estudos das fitopatologias causadas pelo *R. solani* com o objetivo de testar compostos e formas eficazes de combate. Entretanto, não há na literatura nenhum registro sobre a composição da biomassa e, conseqüentemente, da parede celular do fungo, principalmente em relação aos seus polissacarídeos.

Considerando que a parede é uma barreira para atingir a célula e que, se sua composição química for conhecida, agentes químicos mais eficazes e “alvo dirigidos” poderão ser utilizados. Além disso, a biomassa do *R. solani* poderá ser uma excelente matéria prima para obtenção de compostos bioativos, entre eles os polissacarídeos, objeto desse estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho tem por objetivo principal a extração, purificação, caracterização e realização de testes de atividade biológica com os polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*.

2.2 Específicos

Remover compostos de natureza lipídica por extração etanólica.

Extrair os polissacarídeos, por meio da extração aquosa.

Realizar a purificação dos polissacarídeos obtidos na extração aquosa utilizando ciclos de congelamento e descongelamento e cromatografia de filtração em gel.

Determinar os constituintes monossacarídicos por cromatografia líquida de troca iônica em alta pressão, após hidrólise ácida total dos polissacarídeos.

Determinar o grau de homogeneidade dos polissacarídeos por cromatografia de permeação em gel (GPC).

Determinar a posição da ligação glicosídica dos polissacarídeos analisando os acetatos de alditóis parcialmente metilados, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

Determinar a configuração da ligação glicosídica por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Determinar a estrutura dos polissacarídeos por ressonância magnética nuclear uni (^{13}C RMN, ^1H RMN) e bidimensional (HSQC).

Realizar ensaios biológicos com os polissacarídeos puros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Micro-organismo

O basidiomiceto *Rhizoctonia solani*, isolado do melão, foi obtido através da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, registrado sob nº 4014.

3.1.2 Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo dos meios de cultivo, das soluções e dos experimentos foram de grau analítico. Na cromatografia de filtração em gel a pressão normal utilizou-se o gel Sepharose CL-6B.

3.1.3 Equipamentos

Aagitadores magnéticos Quimis, modelo Q261-22 e Fisatom, modelo 752.

Aagitador de tubos Phoenix, modelo AP-56.

Autoclaves verticais Fabbe (modelo 103) e Phoenix (modelo AV-50), condições de uso: 121 °C, 15 a 20 minutos.

Balança analítica Mettler-Toledo, modelo AB204.

Balança semi-analítica Gehaka BG 2000.

Câmara de fluxo laminar Marconi, modelo 1552/120.

Centrífuga refrigerada Cientec, modelo 5000R e microcentrífuga Beckman, modelo 365606.

Cromatografia de filtração em gel: desenvolvida em coluna de vidro preenchida com gel Sepharose CL-6B, com auxílio da bomba peristáltica Pump P-1, Amersham Pharmacia Biotech e coletor Frac-100, Amersham Pharmacia Biotech.

Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa Agilent, modelo 7980A-5975C.

Cromatógrafo líquido de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC-High Pressure Size Exclusion Chromatography) Shimadzu, equipado com detector de índice de refração diferencial, Shimadzu, modelo RID-10A, para análises de cromatografia de permeação em gel (GPC).

Cromatógrafo líquido de troca iônica com detector eletroquímico, modelo ED 40, bomba gradiente, modelo GP 40 e integrador Dionex, modelo 4600.

Deionizador marca Labconco, Water Pro Ps.

Destilador Quimis

Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-Vis 1601.

Espectrômetro de infravermelho IRAffinity – 1, Shimadzu. A aquisição dos dados foi realizada através do programa IR Solution.

Estufa bacteriológica Cienlab, modelo CE-210/64-I.

Estufa Nova Ética, modelo 400/*ND.

Evaporador rotativo Buchi, modelo R-114, com auxílio do banho-maria Büchi, modelo B-169.

Fotocolorímetro Micronal, modelo B440.

Incubadora Shaker SP Labor, modelo SP-222.

Liofilizador Edwards, modelo E-C.

Sistema para filtração a vácuo.

3.2 MÉTODOS GERAIS

3.2.1 Manutenção do micro-organismo

O fungo *Rhizoctonia solani* foi mantido em BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado, a 4 °C, com repiques trimestrais.

3.2.2 Cultivo do micro-organismo para obtenção de biomassa

Para a obtenção da biomassa, o micro-organismo foi cultivado segundo Steluti e colaboradores (2004) com modificações: o fungo foi transferido para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), glucose 1% (m/v) e ágar 2% (m/v). As placas foram incubadas durante 5 dias a 28 ± 2 °C em estufa bacteriológica. Após este período, foram transferidas pequenas porções de hifas do fungo da superfície das placas, para frascos de erlenmeyer de 125 mL, contendo meio mínimo de Vogel e glucose 1% (m/v). Os frascos foram mantidos sob agitação constante (180 rpm) por 48 horas a 28 ± 2 °C.

Os micélios foram transferidos assepticamente para um homogeneizador de células (blender) previamente autoclavado, sendo homogeneizados por 30 segundos a velocidade máxima. O homogeinato foi centrifugado (4 °C, 30 minutos, $4800 \times g$), os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em solução salina fisiológica estéril. A suspensão de células homogeneizadas foi diluída em solução salina fisiológica estéril até se obter um valor de absorbância entre 0,4 a 0,5 em 400 nm. A solução de células obtida foi inoculada em frascos de erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio mínimo de Vogel acrescido de glucose 5% (m/v) e extrato de levedura 0,7% (m/v). Cada frasco foi inoculado com 4 mL de solução de células (1 mL de solução de células para cada 25 mL de meio). Os cultivos foram mantidos sob agitação constante (180 rpm) por 72 horas a 28 ± 2 °C (Figura 3).

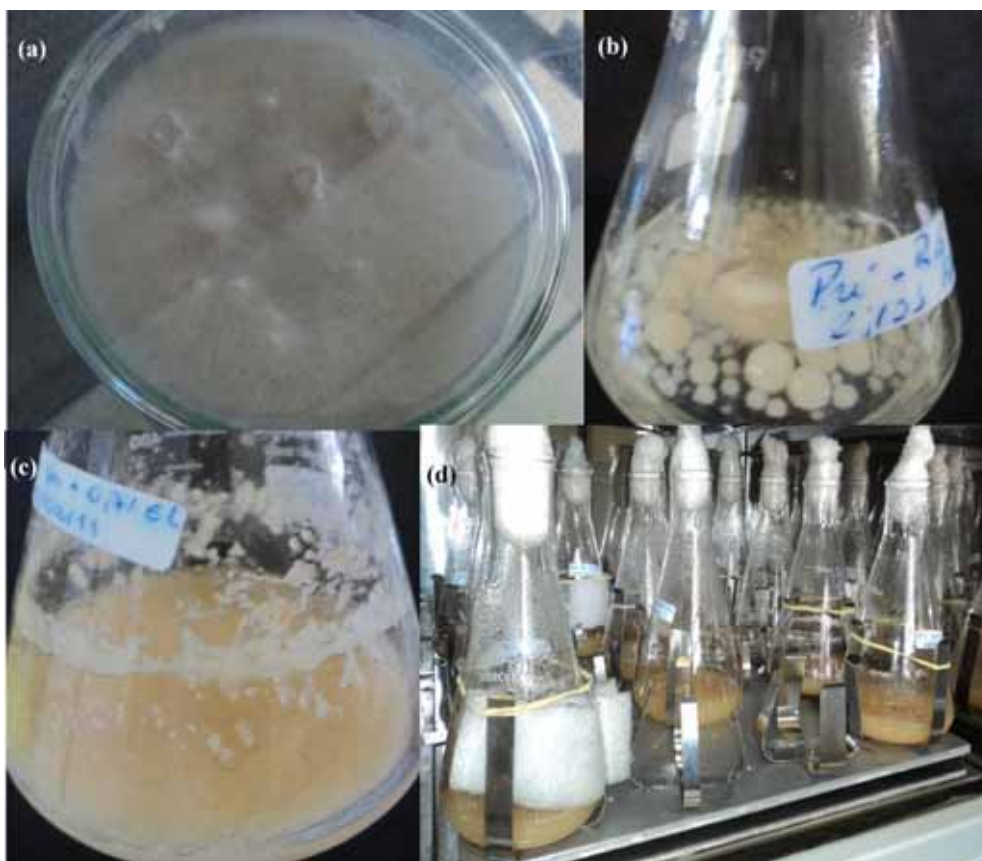


Figura 3 - Cultivo do micro-organismo *Rhizoctonia solani*. a) Micro-organismo crescido na placa de Petri. b) Pré-inóculo de 48 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm 48 horas. c-d) Inóculo de 72 horas a 28 ± 2 °C, 180 rpm.

3.2.3 Isolamento da biomassa fúngica

Os cultivos foram interrompidos através de centrifugação (4 °C, 30 minutos, $4800 \times g$) obtendo-se o precipitado contendo a biomassa que foi lavada exaustivamente com água destilada, para total remoção do meio de cultivo e resíduos metabólicos produzidos pelo micro-organismo. Este procedimento foi repetido até que a água de lavagem não apresentasse nenhum açúcar, determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após a lavagem com água destilada (Figura 7) a biomassa foi seca em estufa a 50 °C (Figura 4).

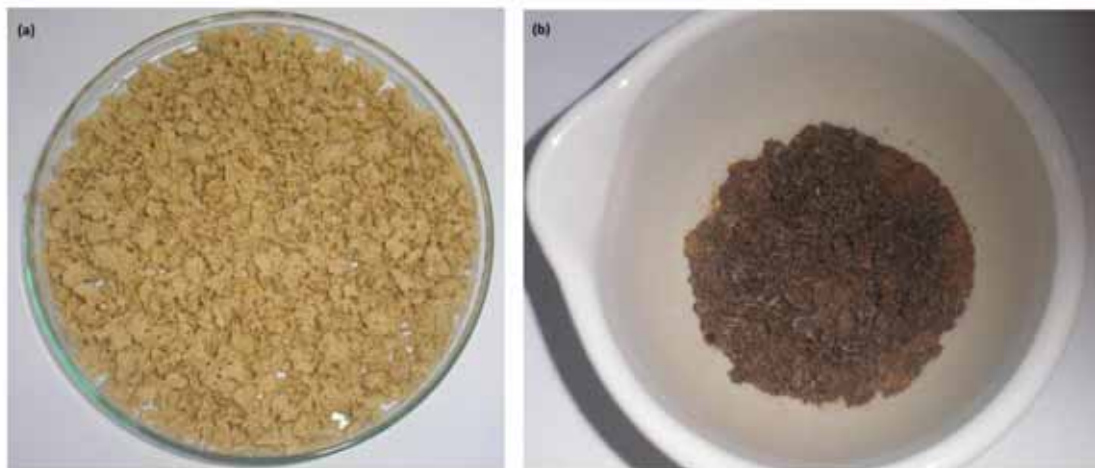


Figura 4 - Biomassa do *Rhizoctonia solani*. a) antes e b) após secagem em estufa a 50 °C.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Quantificação de proteínas - Método de Bradford

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas do extrato aquoso. O princípio do método se baseia na interação do corante (Coomassie Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul.

Solução estoque: 40 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto. Foram adicionados 40 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada para completar 100 mL de solução. Solução de uso: foi realizada uma diluição (1:4, v/v) da solução estoque em água e, em seguida, filtrada em papel de filtro.

Procedimento: foi adicionado 1 mL da solução de uso, contendo o corante, à 100 µL da amostra e, em seguida, foi efetuada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Para calcular a concentração de proteína foi utilizada uma curva de calibração com albumina bovina (BSA) (1 mg/mL) na faixa de concentração de 5 a 50 µg.

3.3.2 Quantificação de açúcares totais - Método do fenol-ácido sulfúrico

O método do fenol-ácido sulfúrico ou de Dubois e colaboradores (1956) foi utilizado para detectar e quantificar a concentração de carboidratos totais nas etapas de extração, purificação e caracterização dos polissacarídeos. O método consiste na formação do derivado hidroximetil furfural, a partir de hexoses, ou furfural, a partir de pentoses, pela presença de H_2SO_4 concentrado, que reage com o fenol, formando um complexo de coloração amarela.

Reagentes: solução de fenol 5% e H_2SO_4 concentrado. Procedimento: foram adicionados 0,5 mL de solução de fenol 5% a 0,5 mL de amostra (diluída em água destilada para perfazer uma solução de dosagem de açúcar dentro da faixa de concentração da curva padrão) e, através de um jato único, 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado. Após 20 minutos de repouso, as leituras foram efetuadas no fotocolorímetro a 480 nm. Para calcular a concentração de açúcar total, foi utilizada uma curva de calibração de glucose (0,1 mg/mL) na faixa de concentração de 5 a 50 μg .

3.4 EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Extração etanólica

Aproximadamente 18 g de biomassa seca e macerada foi submetida a extração etanólica (1:20 m/v) a 78 °C (Figura 5), utilizando um sistema Soxhlet, por um período de 12 horas. O extrato etanólico, denominado E_{EtOH} , foi então concentrado para redução do volume, seco em estufa a 50 °C, pesado e armazenado. O resíduo da extração etanólica (R_1) foi macerado e seco a 50 °C.



Figura 5 - Extração etanólica da biomassa fúngica em Sistema Soxhlet (1:20 m/v, 78 °C, 12 horas).

3.4.2 Extração aquosa

O resíduo da extração etanólica, R_1 , foi tratado com água destilada (1:20 m/v) a 100 °C por um período de 4 horas. Após a extração, foi filtrado ainda quente com papel de filtro, e o resíduo resultante foi submetido ao mesmo procedimento extrativo, por mais três vezes.

Os extratos obtidos foram reunidos em uma única porção, denominada E_{H_2O} , tendo o volume reduzido por evaporação a baixa pressão, liofilizado e pesado para iniciar o procedimento de congelamento e descongelamento.

O resíduo das extrações aquosas a quente, denominado R_2 , foi seco em estufa a 50 °C, pesado e armazenado.

3.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ENCONTRADOS NO EXTRATO AQUOSO

3.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos por tratamentos consecutivos de congelamento e descongelamento

O extrato aquoso (E_{H_2O}) foi solubilizado em água destilada, congelado (overnight) e, então, descongelado a temperatura ambiente (CORRADI DA SILVA et al., 2008). Após este procedimento, houve a formação de uma fração insolúvel que foi separada por centrifugação (4 °C, 30 minutos, 4800 x g). Na parte insolúvel foi adicionada mais água destilada e, novamente, ambas as partes solúvel e insolúvel, foram congeladas (overnight) e descongeladas a temperatura ambiente. A fração insolúvel foi separada novamente por centrifugação e o sobrenadante e precipitado (sempre acrescido de mais água) foram congelados, separadamente.

Este processo foi repetido várias vezes até que a fração solúvel do extrato aquoso (E_{H_2O}) não apresentasse precipitado durante o descongelamento e a fração insolúvel não mais apresentasse açúcar solúvel (detectado pelo método do fenol-ácido sulfúrico) nas águas de solubilização.

A fração solúvel do tratamento acima (congelamento e descongelamento) foi reduzida a pequeno volume e adicionada a 3 volumes de álcool etílico absoluto, para precipitação dos polissacarídeos. Após centrifugação, o precipitado etanólico do extrato aquoso, denominado PE_{H_2O} , contendo os polissacarídeos, foi liofilizado, pesado e solubilizado em volume conhecido de água destilada. Desta fração, foram retiradas alíquotas para: dosagem de açúcar total e proteína, determinar a composição monossacarídica após hidrólise ácida total, verificar o grau de homogeneidade por cromatografia de permeação em gel e analisar a configuração da ligação glicosídica por FTIR.

3.5.2 Fracionamento dos polissacarídeos obtidos no congelamento e descongelamento por cromatografia de filtração em gel

O gel Sepharose CL-6B é composto por aproximadamente 6% de agarose, sendo estabilizado por ligações de hidrogênio. Possui ampla faixa de fracionamento, variando de 1×10^4 a 4×10^6 Da para peptídeos e proteínas globulares e de 1×10^4 a 1×10^6 Da para dextranas (BOYER, 1993; CHAMBERS, RICKWOOD, 1993).

Condição da coluna: a coluna de vidro utilizada (45 cm x 2,5 cm di) apresentou volume aproximado de 220 mL. A água destilada foi utilizada como eluente, o fluxo de 1,0 mL/min e volume de 2,5 mL por fração coletada. Para verificar a eficiência no empacotamento da coluna, foi aplicado 500 µL de uma solução de 1 mg/mL de Blue Dextran, que é uma dextrana com alta massa molecular, portanto, eluída no volume morto da coluna.

Procedimento: 12 mg de açúcar total do PE_{H2O} solubilizados em 2,0 mL de água destilada foram centrifugados (5100 x *g*, 5 minutos) e o sobrenadante aplicado na coluna de gel Sepharose CL-6B. O experimento ocorreu em ambiente climatizado (24±2 °C).

Alíquotas das frações foram retiradas e analisadas para carboidrato pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS, et al., 1956). Após determinar o perfil de eluição, as frações correspondentes a cada pico foram reunidas e liofilizadas. Alíquotas de cada pico foram retiradas para determinar a composição monossacarídica, após hidrólise ácida total, e o grau de homogeneidade por GPC.

3.5.3 Teste de homogeneidade por cromatografia de permeação em gel

Alíquotas de PE_{H2O}, em seus diferentes estágios de purificação, foram solubilizadas em água deionizada (1 mg de açúcar total/mL) e filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) com 0,22 µm de porosidade. Alíquotas de 200 µL foram injetadas em cromatógrafo líquido de exclusão estérica a alta pressão (HPSEC – High Pressure Size Exclusion Chromatography), marca SHIMADZU, equipado com detector de índice de refração diferencial, SHIMADZU modelo RID 10A. Foram utilizadas 4

colunas de gel permeação marca WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da, dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (0,1 M), contendo azida sódica (0,03%) foi utilizada como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 37 °C. A aquisição de dados foi realizada pela utilização do programa LC Solution (SHIMADZU CORPORATION). Padrões de dextrana de massa molecular entre $9,4 \times 10^3$ e $6,7 \times 10^5$ Da foram utilizados para construir a curva de calibração para determinação da massa molecular dos polissacarídeos.

3.5.4 Hidrólise ácida total

Para a hidrólise ácida, foram utilizadas alíquotas liofilizadas, contendo cerca de 50 µg de açúcares totais, distribuídas em tubos próprios para hidrólise completamente selados.

Condição 1: foram adicionados 300 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol/L na amostra liofilizada. Após solubilização, os tubos foram selados e colocados na estufa a 120 °C por 2 horas.

Condição 2: foram adicionados 300 µL de TFA 4 mol/L na amostra liofilizada. Após solubilização, os tubos foram selados e colocados na estufa a 100 °C por 2 horas. Durante os experimentos a condição 2 mostrou-se mais apropriada para os polissacarídeos estudados.

Após hidrólise, o ácido foi removido por evaporação à baixa pressão seguida de adição e evaporação consecutivas de água deionizada, para completa eliminação do ácido. Após a remoção total do ácido a amostra foi solubilizada em água deionizada e analisada por cromatografia líquida de íons em alta pressão com detecção amperométrica pulsada.

3.5.5 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC/PAD)

Para análise dos monossacarídeos obtidos na hidrólise ácida total foi utilizado um sistema Dionex DX500 (cromatografia líquida de íons) e um detector de amperometria pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente, usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm) equipada com guarda coluna PA1 ao fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas utilizando 93% de H₂O deionizada (eluente 1) e 7% NaOH 200 mM/L (eluente 2), resultando em uma fase móvel com NaOH 14 mM/L, e corridas de 25 minutos. A coluna foi regenerada por 10 minutos, após o término da corrida, com 100% do eluente 2 e em seguida, submetida as condições iniciais da análise (93% do eluente 1 e 7% do eluente 2), durante 15 minutos (para equilibrar a coluna) antes da injeção da amostra.

Procedimento: alíquotas de 25 µL da amostra foram injetadas no cromatógrafo líquido.

Padrões: para detecção e quantificação dos monossacarídeos, utilizou-se como padrão uma mistura de açúcares neutros contendo 167 ng/25 µL de cada um dos monossacarídeos: L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose, D-glucose e D-manose, totalizando 1,0 µg/25 µL de açúcares totais.

3.5.6 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Esta análise foi realizada para confirmar a configuração anomérica das ligações glicosídicas dos polissacarídeos (BHANJA et al., 2012; CORRADI DA SILVA et al., 2008; CORRADI DA SILVA et al., 2013; DONG et al., 2002).

A espectroscopia no infravermelho foi realizada em espectrômetro IRAffinity – 1, marca SHIMADZU e a aquisição dos dados foi feita pelo programa IR Solution.

Para as análises, foram preparadas pastilhas contendo 0,8 mg de material macerado e misturado a 250 mg de KBr, grau espectroscópico. Pastilhas translúcidas

foram obtidas com aplicação de uma pressão de 60 KN por 180 segundos. Os espectros de infravermelho foram obtidos no modo transmitância na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

3.5.7 Determinação da posição e da configuração das ligações glicosídicas dos polissacarídeos purificados

3.5.7.1 Metilação pelo Método de Ciucanu e Kerek (1984)

Amostras de 1 a 3 mg de cada polissacarídeo foram colocadas em tubos de ensaio próprios para o procedimento de metilação e dissolvidas em 1 mL de DMSO (para auxiliar a solubilização foi utilizado banho de ultrassom (de 3000 Hz)). Após completa solubilização foi adicionada uma pequena espátula de NaOH, finamente pulverizado, e então, a amostra foi submetida ao banho de ultrassom por um período de 2 horas. Nos tubos já frios, adicionou-se 1 mL de iodeto de metila e foram novamente submetidos ao banho de ultrassom por um período de 1 a 2 horas (a reação foi acompanhada pelo aparecimento da cor alaranjada, quando então, foi interrompida). A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de água deionizada e o polissacarídeo metilado foi recuperado pela extração com 1,5 mL de diclorometano (4x). A fase orgânica foi recuperada e lavada com água deionizada (3x). Para a remoção da água residual, utilizou-se sulfato de sódio anidro, sendo retirado posteriormente por filtração com algodão. A fase orgânica, já isenta de sais, foi seca no evaporador rotativo.

3.5.7.2 Hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos metilados

Os polissacarídeos completamente metilados e secos foram submetidos à hidrólise ácida com TFA 3 mol/L (1 mL) e colocados em estufa a 120 °C, durante 1 hora. Após esse tempo o ácido foi eliminado em evaporador rotativo e o material reduzido com borohidreto de sódio deuterado (1,5 mg de NaBD_4 para cada 1 mg de amostra) com o objetivo de marcar o carbono anomérico. A reação permaneceu em repouso

“overnight” a temperatura ambiente. Após este período, gotas de HCl concentrado foram adicionadas para neutralização do sistema. O material foi evaporado a secura e lavado (3x) com 2 mL de metanol para eliminar os boratos na forma de borato de trimetila. Por fim, a amostra foi acetilada com 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético (1:1), e deixada em reação a 100 °C durante 1 hora. O produto final foi evaporado a secura e dissolvido em 0,1 a 0,2 mL de clorofórmio para ser injetado no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa Agilent, modelo 7980A-5975C.

Para a análise foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida preenchida com HP5-MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm espessor de filme) usando hélio como gás de arraste. Programa de temperatura: 160 °C (1 min) - 2 °C/min - 210 °C. A Figura 6 mostra as etapas dos processos descritos nos itens 3.5.7.1 e 3.5.7.2.

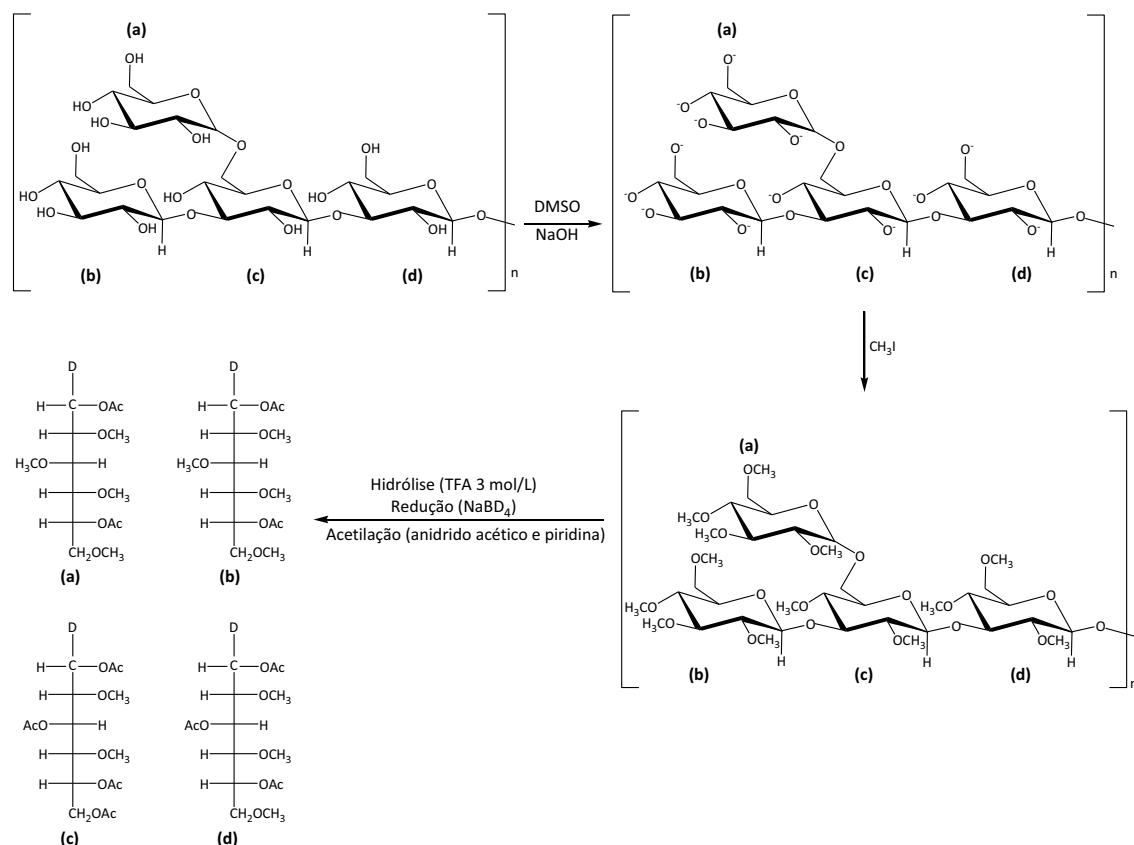


Figura 6 - Esquema da sequência de reações para obtenção dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, onde Ac representa $-\text{COCH}_3$. Fonte: Adaptado de CUI (2005).

3.5.7.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Cerca de 10 mg de cada polissacarídeo foram dissolvidas em D₂O (óxido de deutério), centrifugados e liofilizados. O processo foi repetido duas vezes e a amostra final foi dissolvida em 250 µL de D₂O. Os experimentos de ¹H RMN uni e bidimensionais foram conduzidos em espectrômetros Bruker 500 MHz (500/125 MHz, H/C), com probe de 5 mm di. Os experimentos bidimensionais foram realizados utilizando um software da Bruker. Os espectros ¹H, ¹³C, DEPT e HSQC foram registrados em D₂O a 25 °C. O espectro de próton foi registrado por supressão do sinal HOD (fixado em 4,75 ppm).

Algumas análises espectroscópicas de ¹³C RMN e ¹³C-DEPT RMN foram efetuadas em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400, com probe 5 mm, operando em 100,63 MHz para esta análise. As análises foram feitas a 30 °C com amostras de aproximadamente 20 mg sendo solubilizadas em D₂O. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D₂O foram expressos em δ (ppm) relativos ao padrão interno de acetona com deslocamento químico em δ 30,2 ppm. Os dados foram analisados através de um software da Bruker.

3.6 Degradação do tipo Smith Controlada da fração P_{III}

A metodologia utilizada para este experimento foi segundo Ruthes e colaboradores (2013a), com algumas modificações: cerca de 37 mg da fração P_{III}, proveniente do PE_{H2O}, foi solubilizada em 12,5 mL de água destilada e oxidada a polialdeído através da adição de 12,5 mL de NaIO₄ 0,1 mol/L, perfazendo uma solução com concentração final de 0,05 mol/L. A reação foi mantida por aproximadamente 89 horas, à temperatura ambiente, na ausência de luz. O excesso de agente oxidante foi destruído pela adição de etilenoglicol (2,5 mL) e a solução oxidada foi dialisada contra água corrente utilizando-se tubos de diálise de 12.000 MWCO, por 72 horas. Após a diálise, a solução contendo o polialdeído teve seu volume concentrado a baixa pressão e, em seguida, foi reduzida com NaBH₄ por 22 horas. O excesso de agente redutor foi destruído pela adição, sob-banho de gelo, de ácido acético glacial até pH 7,0. A solução

foi novamente dialisada em tubos de diálise de 12.000 MWCO, contra água corrente, durante 23 horas.

A fração não dialisável foi parcialmente hidrolisada com TFA pH 2,0 por 30 minutos a 100 °C. A fração hidrolisada foi dialisada em sistema fechado utilizando tubo de diálise de 1.000 MWCO. Após a diálise, a fração não dialisada foi precipitada em etanol (1:3 v/v).

3.7 Teste biológico: Atividade citotóxica

Os ensaios biológicos foram realizados pelo Prof. Dr. Colaborador Ramon Kaneno, no Laboratório de Imunologia de Tumores localizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu.

3.7.1 Cultura de células tumorais

Células de câncer de cólon humano linhagens HCT-116 e HT-29 e de pulmão murino (camundongos) 3LL foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina 200 µM, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de piruvato de sódio, 25 mM de HEPES e 40 mg/L de gentamicina (meio completo), a 37 °C, sob tensão de 5% de CO₂. No momento do uso, as células foram descoladas da superfície das garrafas de cultura por tratamento das células com tripsina 0,05% e lavadas com solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS), seguido de lavagem em meio completo para preparação da suspensão de uso.

3.7.2 Teste de viabilidade celular

A atividade citotóxica dos extratos sobre as diferentes linhagens de células tumorais foi avaliada pelo teste colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Mosmann (1983), com modificações adequadas ao presente estudo. Durante o ensaio o MTT é incorporado

nas mitocôndrias das células ativas sendo reduzido a formazana, com o surgimento de cristais no interior das células. Visto que apenas as células viáveis mantêm a atividade metabólica para realizar a reação de redução, infere-se que a concentração dos cristais reflete a viabilidade das células.

Brevemente, as células foram ajustadas à concentração de 2×10^5 células/mL e distribuídas em placas de cultura de 96 poços de fundo chato (100 μ L/mL). Após 18h de culturas, para adesão das células na superfície da placa, foram adicionados 100 μ L de amostra dissolvida em meio completo, de modo que sua concentração final ficasse em 100, 50, 25 ou 12,5 μ g/mL. Após 24 h de cultura, o sobrenadante das culturas foi cuidadosamente removido, seguindo-se a adição de solução de 100 μ L de MTT a 1 μ g/mL. A placa foi mantida em cultura por um período adicional de 2 h, quando o sobrenadante foi novamente removido e adicionado 100 μ L de dimetilsulfóxido, para solubilização dos cristais de formazana formados no interior das células. Após 5 min, a placa foi lida em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 540 nm (leitor de ELISA). Os dados estão expressos em porcentagem de células viáveis, calculadas a partir da densidade óptica obtida.

3.7.3 Análises estatísticas

A homogeneidade de variância foi verificada pelo teste de Bartlett (ZAR, 1999). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de erro foram inferiores a 5% ($<0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA

Durante muito tempo a parede celular fúngica foi considerada um esqueleto inerte. No entanto, pesquisas voltadas para o assunto revelaram que essa estrutura sofre alterações contínuas de acordo com as mudanças nas condições de cultivo e estresse ambiental. Com isso, a parede celular passou a ser considerada uma estrutura dinâmica que participa ativamente do ciclo de vida dos fungos, exercendo papel fundamental no crescimento e morfologia da célula fúngica. O papel biológico desempenhado pela parede celular na fisiologia fúngica destaca essa estrutura como alvo para a produção de agentes antifúngicos (BOWMAN, FREE, 2006; LATGÉ, 2007).

O basidiomiceto *Rhizoctonia solani* é um dos principais fitopatógenos naturais do solo, podendo se desenvolver e agredir diversas culturas (CAO et al., 2004). O tombamento de plântulas é normalmente a doença mais provocada por *R. solani* (CAO et al., 2004) e, por isso, há muitas pesquisas voltadas para formas eficientes em seu combate (BREWER, LARKIN, 2005; GOUDJAL et al., 2014; HUANG et al., 2012). No entanto, não há nenhum registro na literatura sobre a composição de sua biomassa, principalmente em polissacarídeos.

Considerando os inúmeros danos que esse micro-organismo pode causar a natureza, principalmente como hospedeiro de alimentos, a proposta deste trabalho foi investigar, utilizando processos tradicionais da química de carboidratos, a composição química em polissacarídeos da parede celular do *R. solani*. Esta informação poderá transferir conhecimento para a síntese de compostos mais apropriados e rápidos no combate ao fungo, além de fornecer moléculas que poderão atuar como agentes terapêuticos.

De acordo com o habitat natural onde vivem, os micro-organismos se adequam as quantidades de carbono, nitrogênio, microelementos, oxigênio, entre outros fatores. Para a obtenção da biomassa fúngica em laboratório, o meio de cultivo deve ser adaptado para que os nutrientes fornecidos sejam semelhantes aos oferecidos ao fungo em seu ambiente natural (BARBOSA et al., 2004). Considerando esses aspectos,

quantidades significativas (18 g) da biomassa do micro-organismo *R. solani* foram obtidas. Após o cultivo, a biomassa foi lavada com água destilada até que nenhum resíduo de açúcar fosse detectado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), significando a total remoção de polissacarídeos secretados pelo micro-organismo.

4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.2.1 Extração etanólica

A biomassa fúngica é constituída por proteínas, lipídeos e, principalmente, por polissacarídeos. Diferentes métodos químicos e bioquímicos são aplicados para o isolamento, purificação e caracterização dessas moléculas (FUKUDA et al., 2009). Neste trabalho as extrações foram realizadas com o intuito de separar os polissacarídeos de acordo com suas características químicas de solubilidade. Como o objetivo final é efetuar ensaios biológicos com os polissacarídeos isolados, a solubilidade em água foi um fator determinante. A primeira extração, em etanol, foi realizada para a remoção de pigmentos e alguns compostos de natureza lipídica. Procedimentos similares foram efetuados com os corpos de frutificação dos basidiomicetos *Hericium erinaceus* (ZHANG et al., 2012), *Pleurotus geesteranus* (ZHANG et al., 2013) e *Coprinus comatus* (ZHOU et al., 2013).

Cerca de 7% de pigmentos e compostos hidrofóbicos foram removidos por extração etanólica, sob-refluxo, da biomassa do *R. solani*. O extrato etanólico (E_{EtOH}) de coloração marrom (1,3 g) foi armazenado e não investigado, uma vez que polissacarídeos não são solúveis em etanol.

O resíduo da extração etanólica, denominado R_1 , após secagem em estufa a 50 °C, foi finamente triturado e submetido à extração aquosa a quente, conforme esquema ilustrativo (Figura 7).

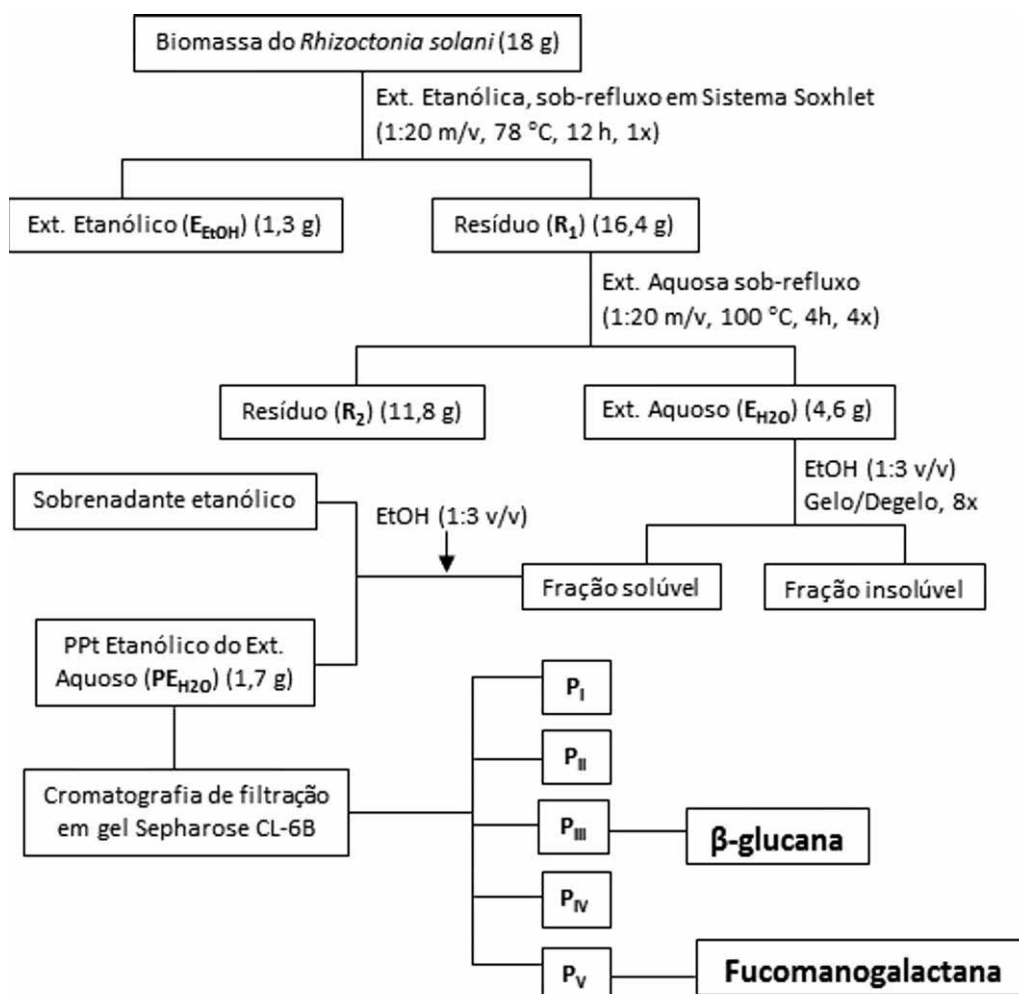


Figura 7 - Esquema do protocolo de extrações dos polissacarídeos da biomassa do *R. solani*.
Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Extração aquosa a quente

A extração aquosa a quente, mais branda que a extração alcalina (que rompe a parede celular, saponifica a membrana da célula fúngica e expõe seu conteúdo intracelular), pode remover β-glucanas, e parte das galactanas e mananas presentes na parede celular (CORRADI DA SILVA, GORIN, IACOMINI, 1993 apud FUKUDA, 2007). O resíduo proveniente da extração etanólica (R₁) foi submetido ao procedimento de extração aquosa a quente por quatro vezes e os respectivos extratos (E_{H2O}) foram reunidos, concentrados a pressão reduzida e liofilizados. Smiderle e colaboradores (2013) isolaram glucanas do tipo β-D-(1→6), com atividade imunoestimuladora, dos

extratos aquosos a quente dos basidiomicetos *Agaricus bisporus* e *Agaricus brasiliensis*.

O extrato aquoso (E_{H_2O}) liofilizado pesou 4,6 g, indicando que o procedimento foi eficiente para separação de aproximadamente 28% de material. O resíduo das extrações aquosas, denominado R_2 , foi armazenado, para estudos futuros.

Após o E_{H_2O} ser solubilizado em água e armazenado a temperatura de freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ocorreu o surgimento de um material insolúvel, que não se desfazia a temperatura ambiente. Desta forma, foi estabelecido como primeiro procedimento de purificação a alternância de tratamentos de congelamento e descongelamento. Esta técnica vem sendo utilizada de maneira eficiente para separar polissacarídeos solúveis de moléculas com baixa e/ou nenhuma solubilidade em água (CORRADI DA SILVA et al., 2008; CORRADI DA SILVA et al., 2013; RUTHES, et al., 2012).

Os polissacarídeos presentes na fração solúvel do tratamento de congelamento e descongelamento foram precipitados com 3 volumes de etanol absoluto. A fração precipitada passou a ser denominada de precipitado etanólico do extrato aquoso (PE_{H_2O}) e pesou 1,7 g.

Os resultados da quantificação de açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS, et al., 1956) e de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) mostraram, respectivamente, que 86% do PE_{H_2O} corresponde a carboidratos e 14% a proteínas.

4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NO PE_{H_2O}

4.3.1 Análise da composição monossacarídica e do grau de homogeneidade do PE_{H_2O}

Para conhecer a composição em açúcares dos polissacarídeos presentes no PE_{H_2O} o primeiro procedimento foi submeter a amostra à hidrólise química, a quente, usando um ácido orgânico volátil (TFA 2 mol/L, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h). Nessas condições (PAZUR, 1994), as ligações glicosídicas que formam os polissacarídeos são rompidas (Figura 8) e os monossacarídeos livres são identificados e quantificados por cromatografia líquida de íons em alta pressão (HPAEC), com detecção por amperometria pulsada (PAD),

comparando-os com os tempos de retenção de uma mistura de padrões de monossacarídeos, analisados nas mesmas condições.

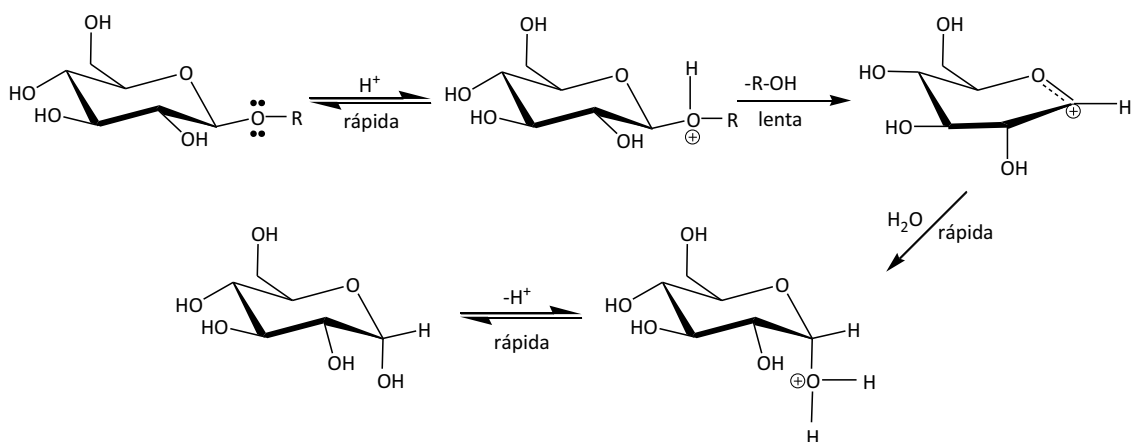


Figura 8 - Mecanismo geral de hidrólise ácida de glicosídeos proposto por Edward (1955). Fonte: EDWARD, 1955 apud CORRÊA, 1971.

O material hidrolisado apresentou picos com tempos de retenção de 5,24, 13,36 e 14,49 minutos, correspondendo respectivamente, aos tempos de retenção dos padrões de L-fucose (5,31 min), D-galactose (13,61 min) e D-glucose (14,93 min). Os resultados mostraram que o $\text{PE}_{\text{H}_2\text{O}}$ tem em sua composição cerca de 79% de glucose, 14% de galactose, 7% de fucose e traços de manose (< 1%), desde que no perfil cromatográfico aparece um pico no tempo de retenção da manose (16,08 min) (Figura 9).

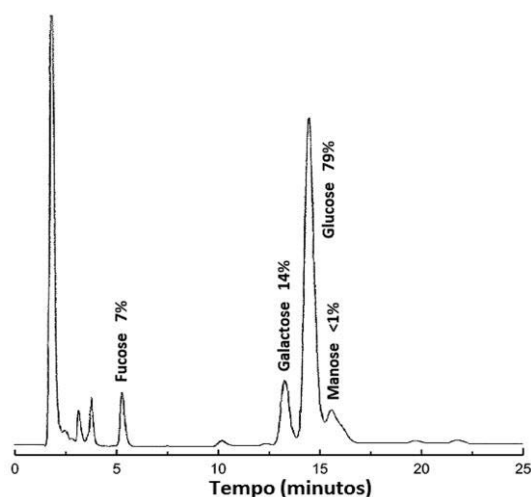


Figura 9 - Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida do $\text{PE}_{\text{H}_2\text{O}}$ por HPAEC com detecção amperométrica pulsada (PAD). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: Carbowac PA1. Condições de hidrólise: TFA 2 mol/L, 2 h, 120 °C.

Para proceder à caracterização química é importante avaliar a homogeneidade do material. Para os polissacarídeos, a cromatografia de permeação em gel, é uma das técnicas mais utilizadas. Além de informar o grau de homogeneidade e, conseqüentemente, a pureza do material, esse experimento fornece a massa molecular aparente do polissacarídeo através da comparação com os tempos de eluição de diferentes padrões, com massas moleculares conhecidas (PAZUR, 1994). Neste trabalho foram utilizados padrões de dextranas com massas moleculares entre $9,4 \times 10^3$ e $6,7 \times 10^5$ Da. O PE_{H_2O} eluiu em 54,58 minutos (Figura 10a) e teve sua massa molecular aparente estimada em $1,73 \times 10^4$ Da através da curva de calibração (Figura 10b) obtida com os padrões de dextranas.

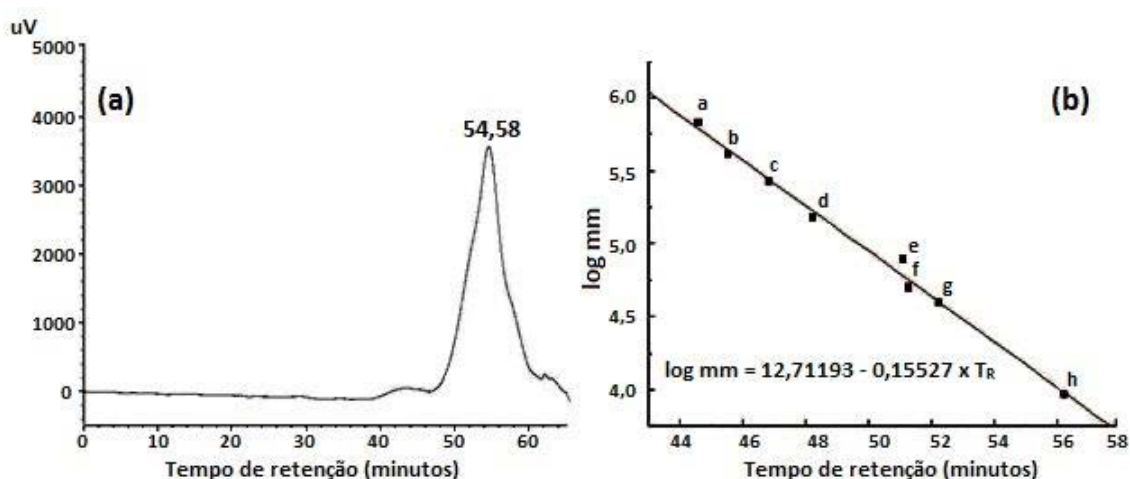


Figura 10 - a) Perfil de eluição por GPC do PE_{H_2O} e b) Curva de calibração (log mm x tempo de eluição) dos padrões de dextrana com diferentes massas molares.

A presença de um único pico no cromatograma do PE_{H_2O} sugere um material homogêneo. Entretanto, considerando que este material provém de um extrato bruto, o procedimento de purificação por cromatografia de filtração em gel a pressão normal, foi selecionado como próxima etapa.

4.3.2 Purificação do PE_{H_2O} por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B

A cromatografia de filtração em gel é uma técnica que separa os polissacarídeos de acordo com a ordem decrescente de suas massas moleculares. O gel Sepharose CL-6B foi escolhido por possuir uma faixa de fracionamento adequada a

massa molecular aparente do PE_{H_2O} , permitindo que os polissacarídeos fossem separados.

A coluna preenchida com gel Sepharose CL-6B separou o PE_{H_2O} em cinco picos principais denominados de P_I a P_V (Figura 11). Várias colunas foram realizadas e os picos correspondentes reunidos.

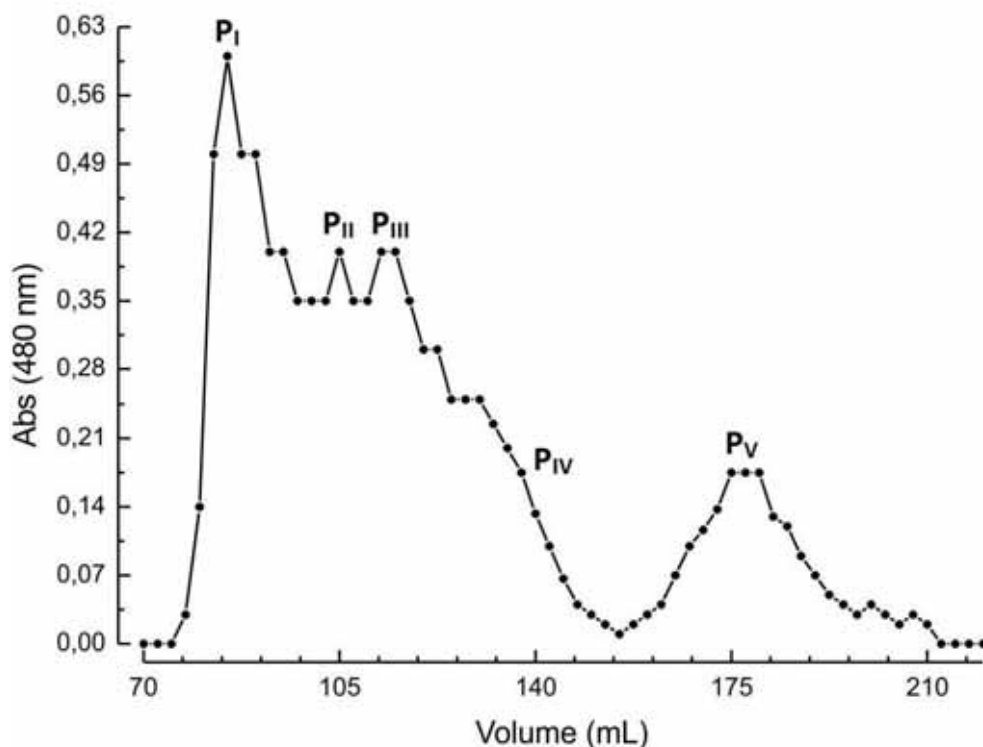


Figura 11 - Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do PE_{H_2O} . Vol. coluna: 220 mL, Material aplicado: 12 mg; Fluxo: 1,0 mL/min; Vol. fração: 2,5 mL; Vol. morto: 83 mL.

Para conhecer a composição monossacarídica de cada pico ou fração, alíquotas foram separadas, hidrolisadas (TFA 4 mol/L, 100 °C, 2 h) e analisadas por HPAEC/PAD (Figura 12). Os resultados mostraram que glucanas (P_{II} e P_{III}) e fucomanogalactana (P_V) são os principais polissacarídeos encontrados no extrato aquoso do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*, uma vez que glucose e fucose/galactose foram, respectivamente, os principais monossacarídeos detectados nessas frações.

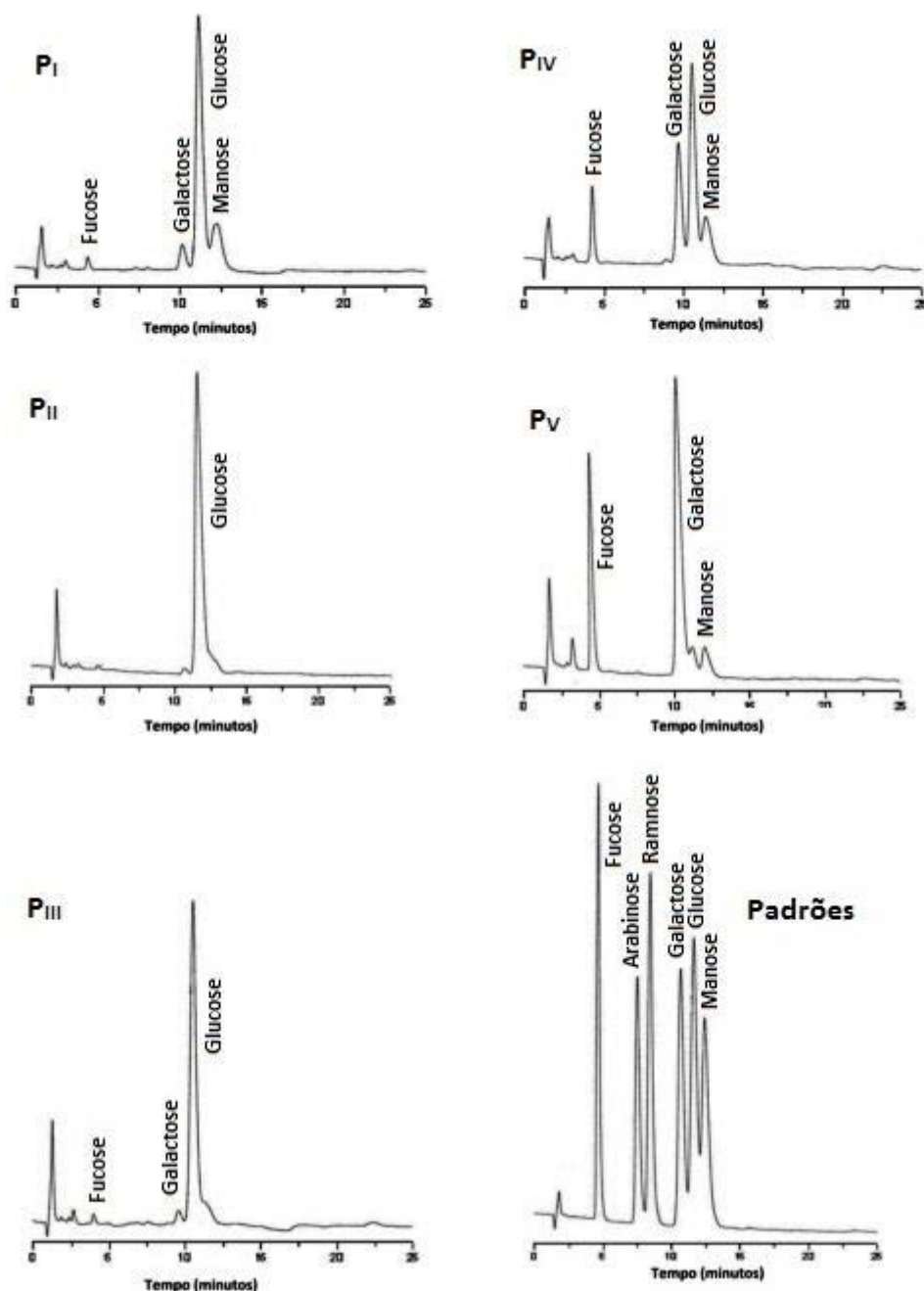


Figura 12 - Análise por HPAEC/PAD dos produtos de hidrólise dos picos I a V. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 4 mol/L, 2 h, 100 °C. Padrões de açúcares neutros (tempo de retenção em minutos): L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose, D-glucose e D-manose.

Para avaliar o grau de homogeneidade de cada pico, análises por GPC foram efetuadas. A partir dos cromatogramas mostrados na Figura 13 percebe-se que P_{II}, P_{III} e P_V parecem homogêneos, e P_V o menos polidisperso. A simetria apresentada no perfil de eluição de P_V confirma seu alto grau de homogeneidade (PAZUR, 1994). Desta

forma P_{II}, P_{III} e P_V estariam aptos a serem caracterizados já que a pureza do material é um requisito fundamental para a confiabilidade nos resultados de caracterização. No entanto, P_{II} não foi selecionado para a continuidade dos experimentos, visto que a quantidade de material correspondente a essa fração não foi suficiente para submetê-la aos demais experimentos e análises de caracterização.

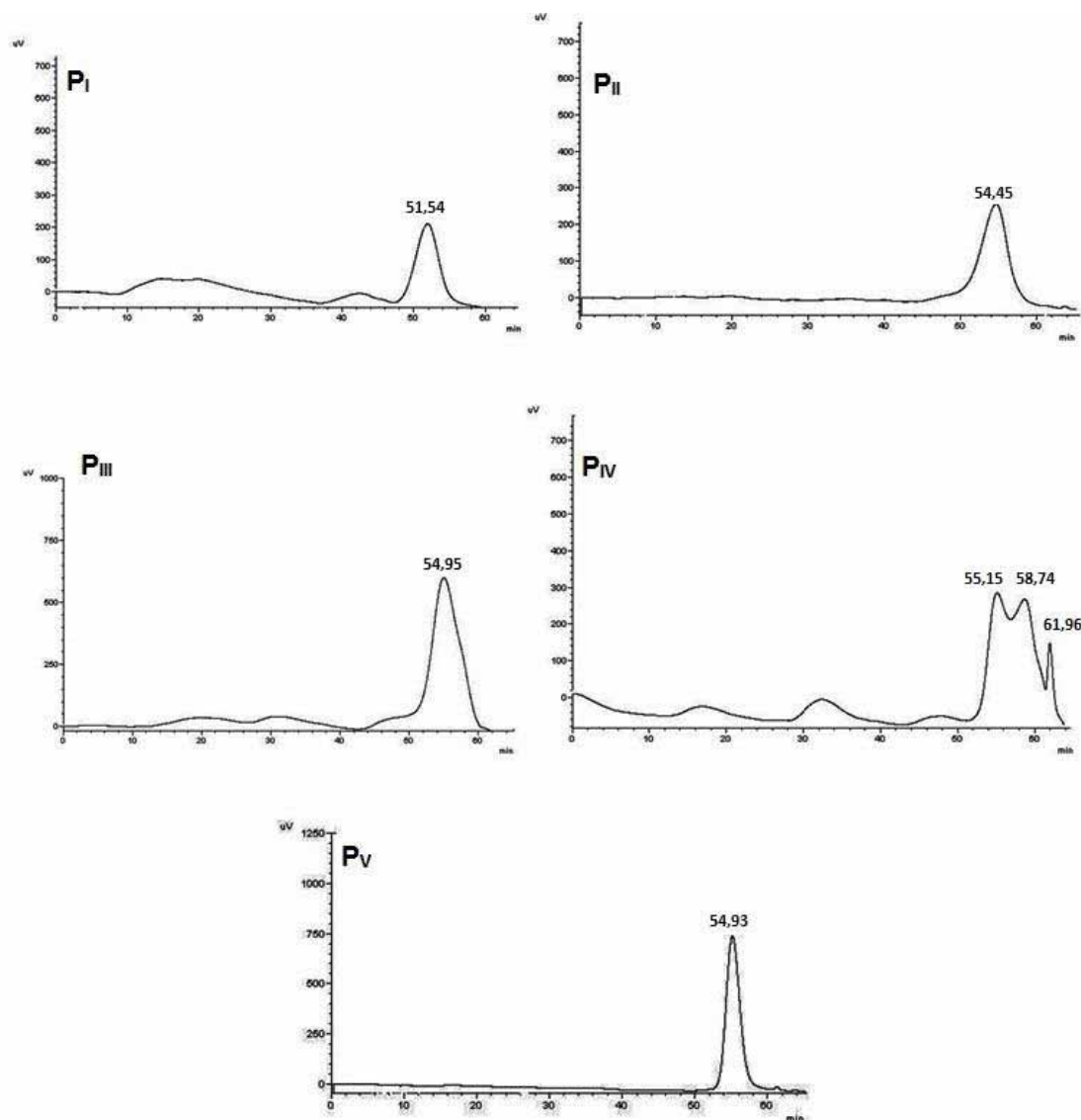


Figura 13 - Perfil de eluição dos picos I a V por GPC. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da. Material aplicado: 200 μ g em 200 μ L; fluxo: 0,6 mL/min a 37 °C. Eluente: NaNO₃ 0,1 M contendo azida sódica 0,03%.

4.3.3 Análises da glucana (P_{III}) obtida por cromatografia de filtração em gel a pressão normal do PE_{H2O}

4.3.3.1 Análise da composição monossacarídica, massa molecular, grau de polidispersividade e FTIR da glucana

Na cromatografia de permeação em gel a alta pressão (Figura 13), P_{III} eluiu com um tempo de retenção de 54,95 minutos, com massa molecular aparente de $1,51 \times 10^4$ Da. O valor do índice de polidispersividade (M_w/M_n) de 1,13, indica uma distribuição de massa molecular (M_w) bastante estreita, ou seja, pouco polidisperso (CANEVAROLO JUNIOR, 2006). A análise por HPAEC/PAD (Figura 12) dos produtos de hidrólise de P_{III} (TFA 4 mol/L, 2 h, 100 °C) mostrou que esta fração tem glucose como componente majoritário (97%).

A espectroscopia de infravermelho é uma análise que, para os carboidratos, fornece espectros de difícil interpretação e os dados se limitam, principalmente, à identificação da configuração das ligações glicosídicas (α e/ou β), presença de ácido urônico ou pirúvico, através do sinal típico da carbonila em 1750 cm^{-1} (MONTEIRO, 2011), e de grupamentos sulfato, com sinal em 1249 cm^{-1} (MENDES et al., 2009). O espectro de infravermelho do P_{III} (Figura 14) apresentou uma banda de absorção em 894 cm^{-1} , característica de ligações do tipo β (BHANJA, et al., 2012; DONG, et al., 2002).

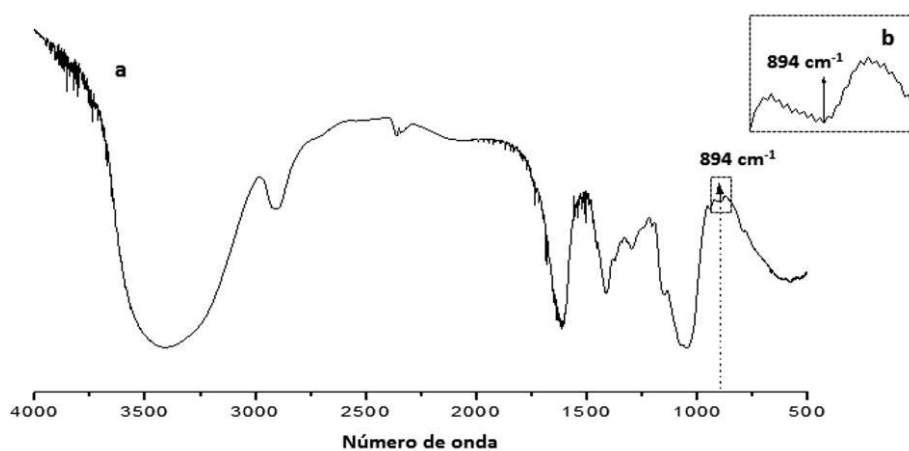


Figura 14 - a) Espectro de infravermelho da glucana (P_{III}) na região de 4000 a 500 cm^{-1} ; b) Região de impressão digital referente ao sinal da configuração β .

4.3.3.2 Determinação da posição das ligações glicosídicas da glucana

A metilação é um dos métodos mais utilizados quando se procura caracterizar estruturalmente os polissacarídeos. O método consiste em determinar as posições das ligações glicosídicas (LINDBERG, 1972), e para isso é fundamental que o polissacarídeo seja totalmente metilado. Isto ocorre quando todos os hidrogênios das hidroxilas livres forem substituídos por grupos metila. O polissacarídeo metilado é então hidrolisado e os monossacarídeos parcialmente metilados são submetidos à reação de redução, sendo convertidos em alditóis. Em seguida, os alditóis parcialmente metilados sofrem reação de acetilação para obtenção do produto final, acetatos de alditóis parcialmente metilados, que posteriormente são analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (PAZUR, 1994).

A análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados por cromatografia gasosa (Figura 15) e espectrometria de massa mostraram que P_{III} é uma glucana mono- e dissubstituída. Os picos eluídos nos tempos 7,51, 9,71, 10,47 e 13,27 minutos correspondem, respectivamente, aos derivados acetilados de 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-glucitol (20%), 2,4,6-tri-*O*-metil-glucitol (35%), 2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol (24%) e 2,4-di-*O*-metil-glucitol (21%).

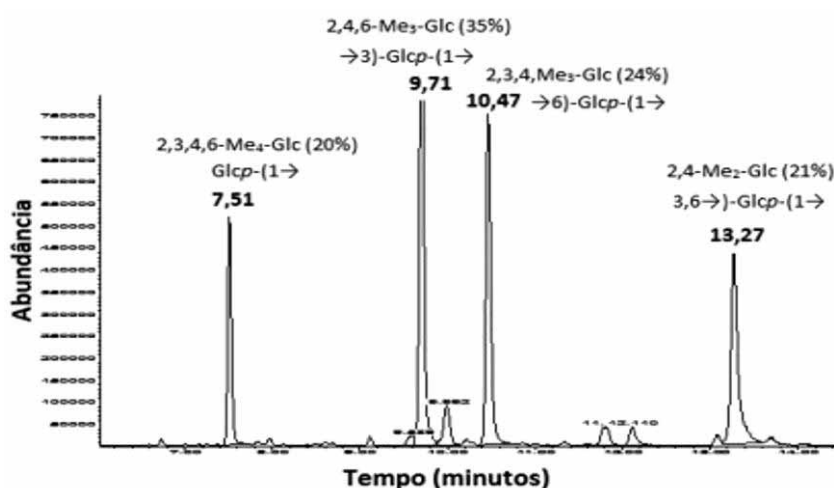


Figura 15 - Cromatograma gasoso dos acetatos de alditóis parcialmente metilados da glucana (P_{III}) extraída do *R. solani*.

Os resultados encontrados a partir da cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados são informativos, no entanto, podem não permitir uma

identificação clara dos componentes. Informação adicional é geralmente alcançada a partir do espectro de massa de cada componente, normalmente realizada pela combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (GC-MS) (JANSSON et al., 1976).

A análise da fragmentação por impacto de elétrons dos acetatos de alditóis parcialmente metilados vem sendo estudada de forma aprofundada utilizando a técnica por marcação com deutério (BJÖRNDAL, LINDBERG, SVENSSON, 1967 apud JANSSON, et al., 1976; AXBERG et al., 1972 apud JANSSON et al., 1976). Através das fragmentações primárias e secundárias, o padrão de substituição dos acetatos de alditóis parcialmente metilados pode ser facilmente determinado (JANSSON et al., 1976).

Os fragmentos primários são gerados pela fissão entre átomos de carbono na cadeia na seguinte ordem de abundância: fissão entre dois carbonos metoxilados (I), seguida da fissão entre um carbono metoxilado e outro acetoxilado (II), e por fim, a fissão menos abundante ocorre entre dois átomos de carbono acetoxilados (III). No primeiro caso (I), ambos fragmentos são considerados íons fortes. No segundo (II), apenas o fragmento metoxilado é considerado íon forte. Já no último caso (III), ambos íons são considerados fracos, exceto para acetatos de alditóis e acetatos de alditóis mono-*O*-metilados, no qual o grupo metoxila ocupa a posição terminal. Os fragmentos primários originam os fragmentos secundários normalmente a partir da eliminação única ou consecutiva de ácido acético, metanol, cetene ou formaldeído (JANSSON et al., 1976). A Figura 16 ilustra os tipos de fissões descritas.

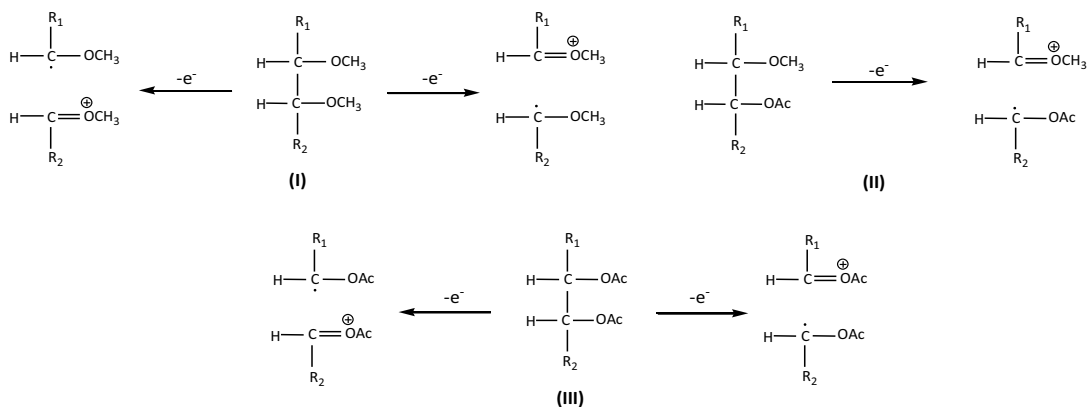


Figura 16 - Esquema das fissões entre carbonos metoxilados e acetoxilados, onde Ac representa $-COCH_3$. Fonte: JANSSON et al., 1976.

Os espectros de massa bem como esquemas de fragmentação de cada derivado acetato de alditol, provenientes da glucana metilada, são mostrados nas Figuras 17 a 20. É importante lembrar que a redução ocorreu com borohidreto de sódio deuterado e, portanto, os fragmentos provenientes da parte contendo o carbono anomérico (C-1) terão sempre uma unidade de massa a mais.

O derivado I apresentou principais fragmentos primários (m/z 118, 161, 162, 205) e secundários (m/z 87, 102, 129 e 145) característicos de 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucitol (Figura 17).

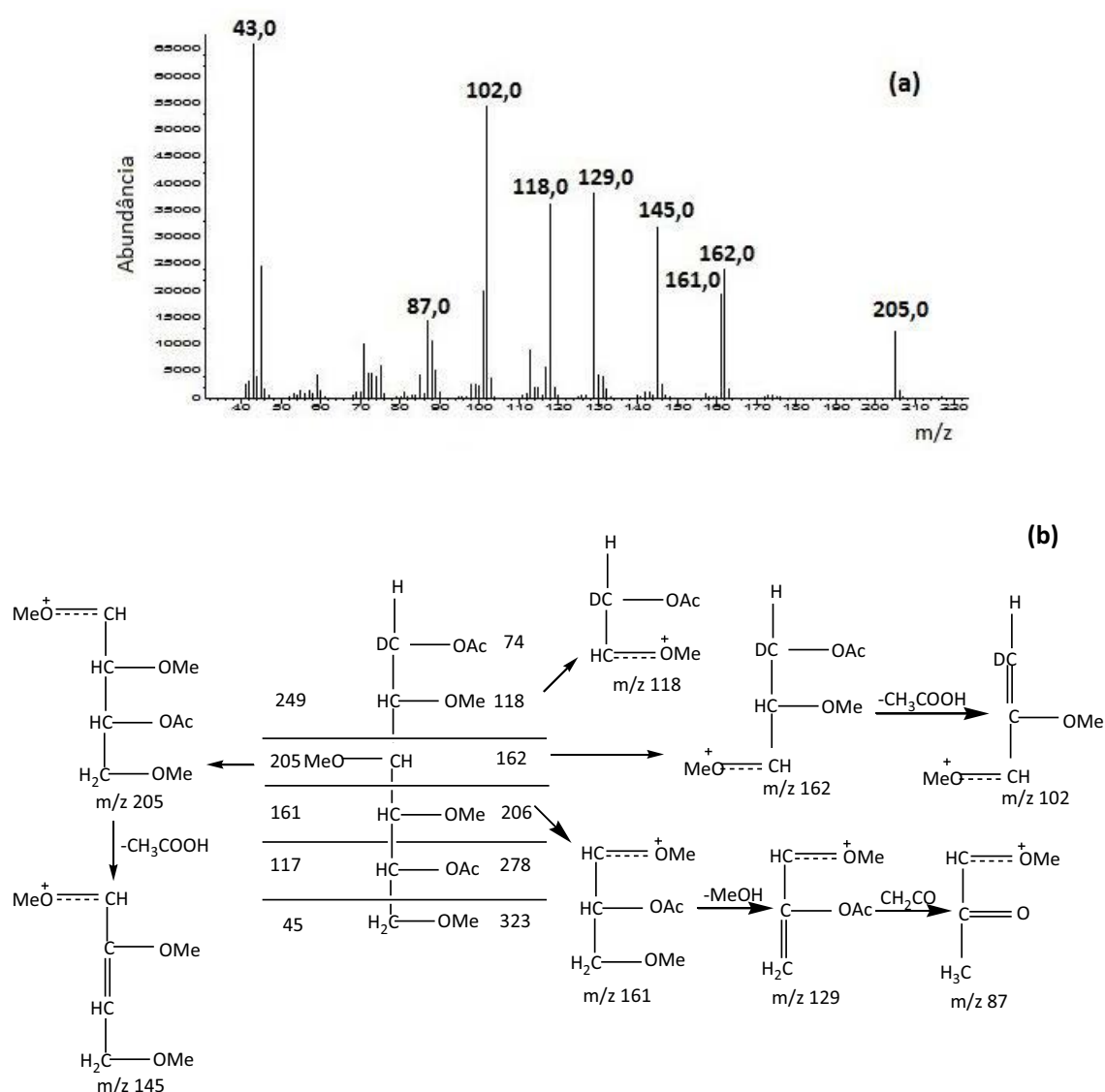


Figura 17 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-glucitol.

O derivado II teve os principais fragmentos primários (m/z 118, 161, 234) e secundários (m/z 101, 129) compatíveis com o 2,4,6-tri-*O*-metil-glucitol (Figura 18).

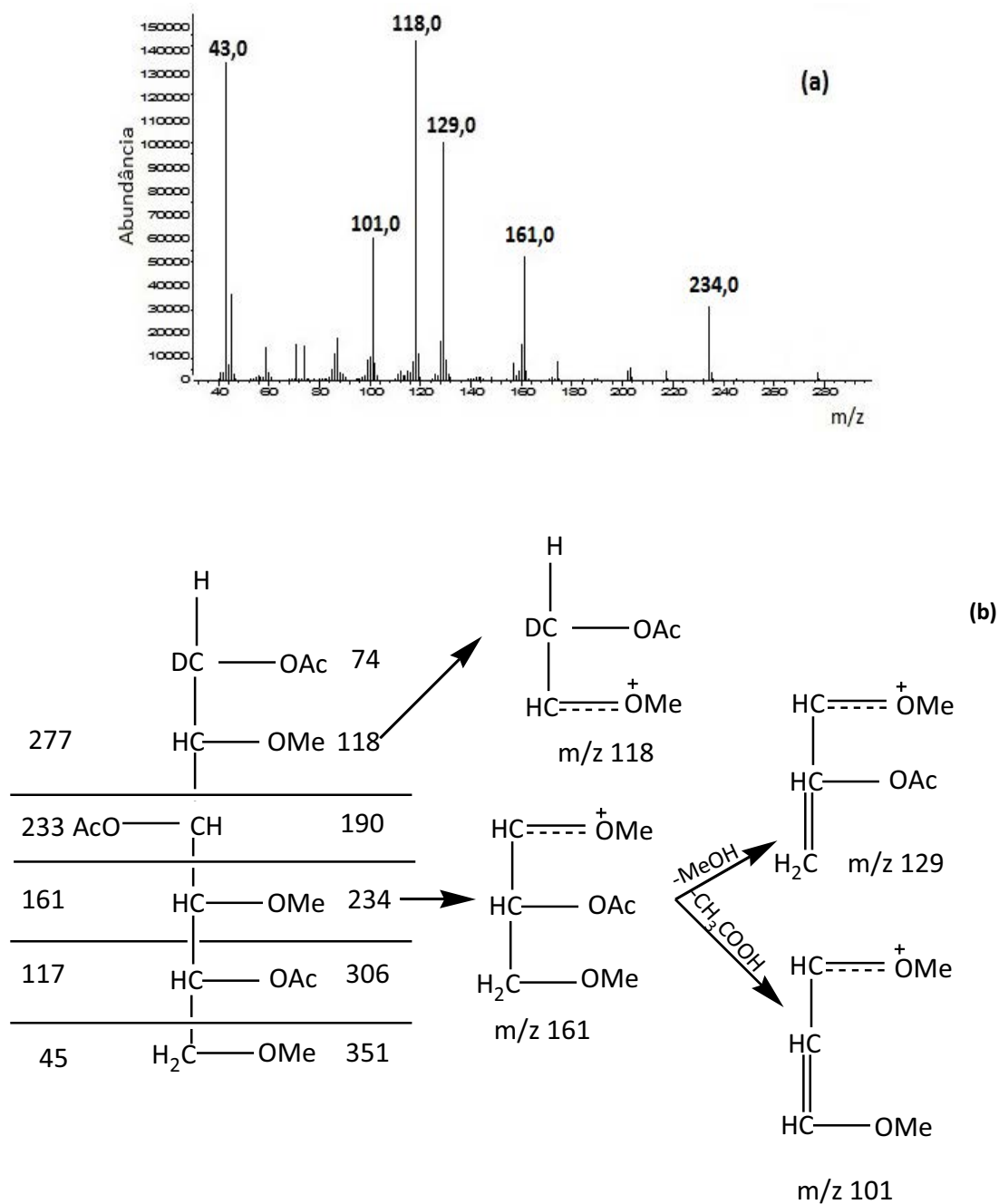
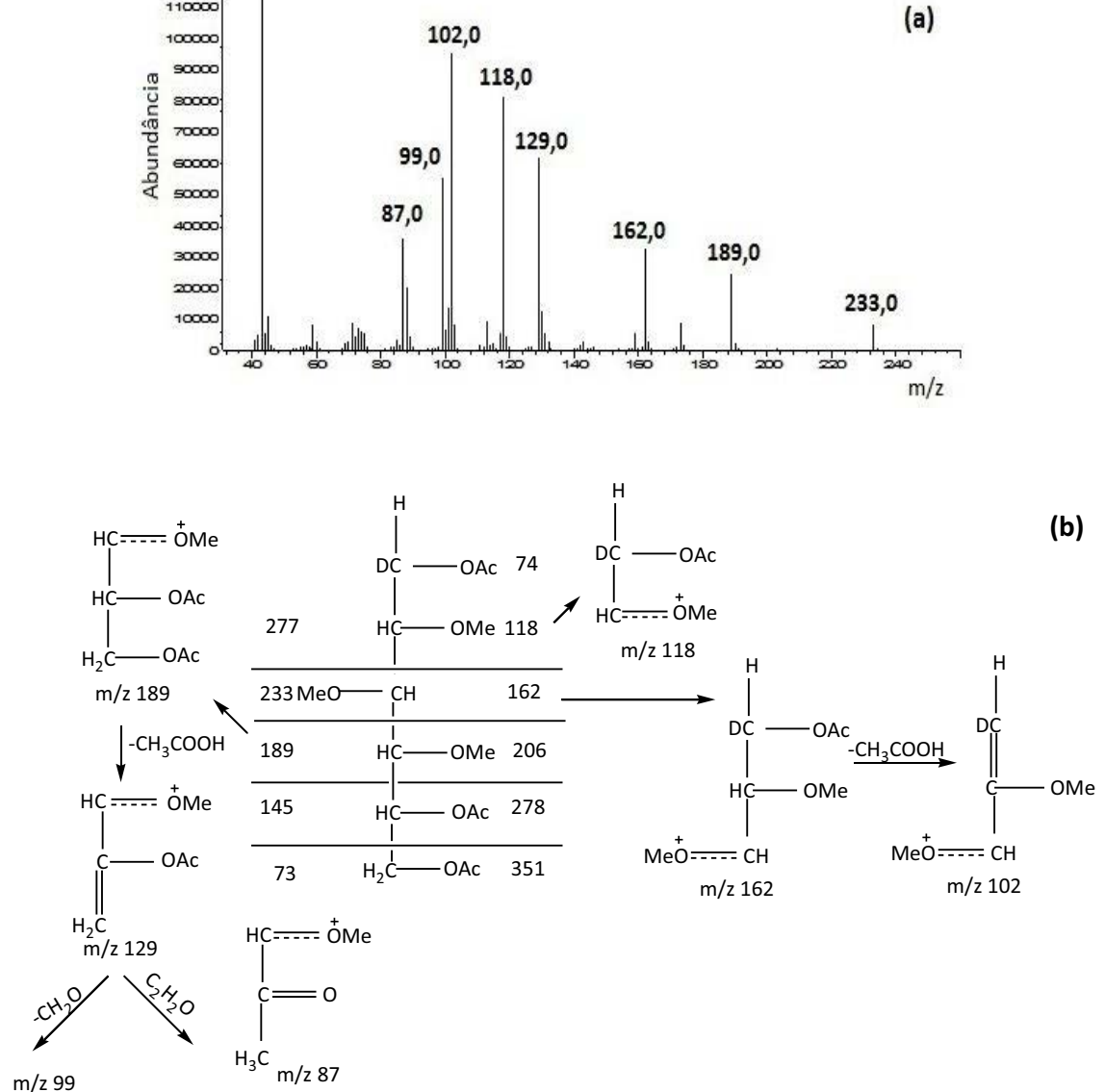


Figura 18 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-glucitol.



O derivado IV (Figura 20) teve os principais fragmentos primários (m/z 118, 189, 234) e secundários (m/z 87, 129) compatíveis com o 2,4-di-*O*-metil-glucitol.

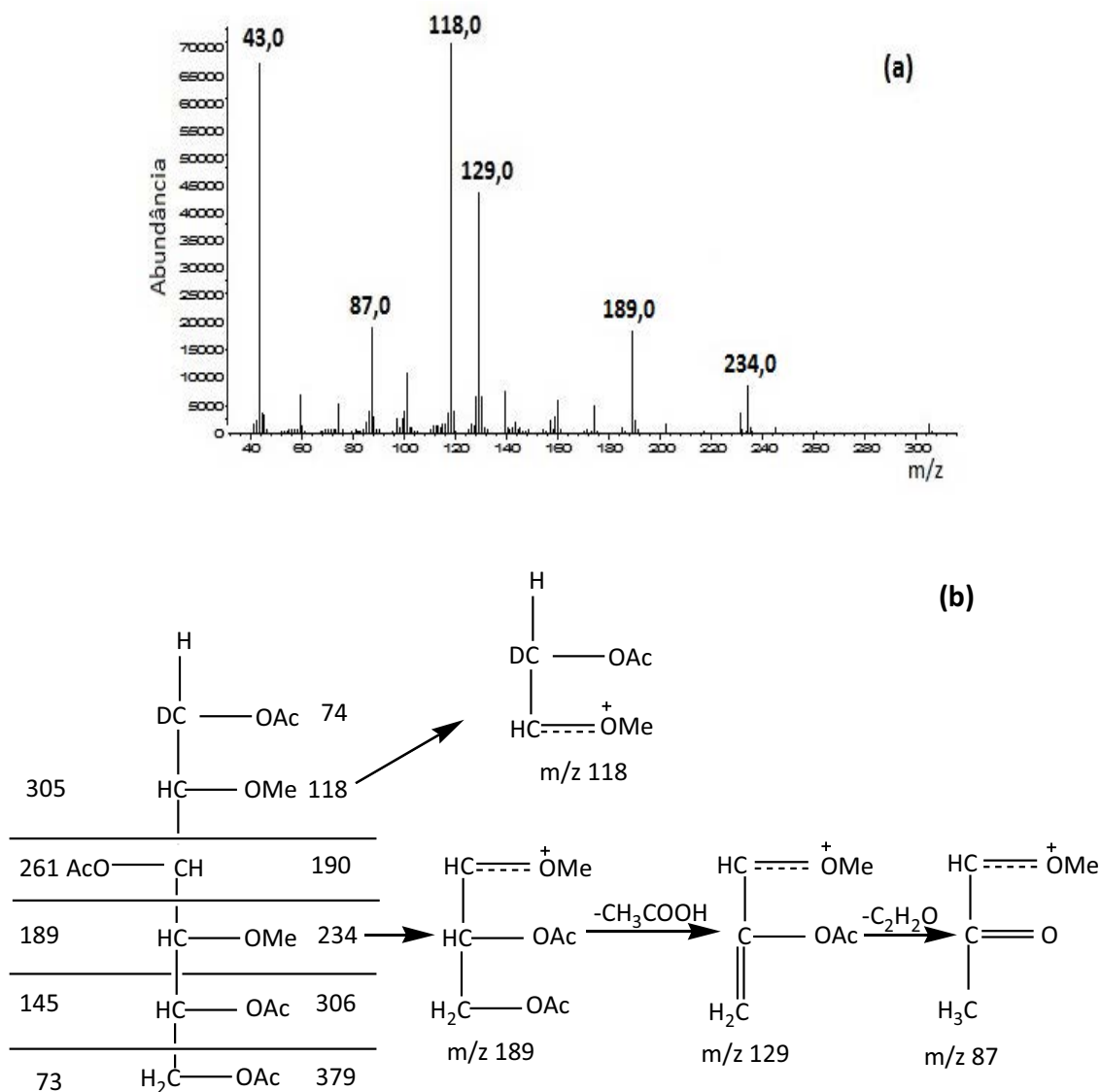


Figura 20 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,4-di-*O*-metil-glucitol.

A Tabela 3 resume os principais fragmentos encontrados por espectrometria de massa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados provenientes do P_{III}.

Tabela 3 - Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da glucana extraída do *R. solani*.

Tempo de retenção (min)	Derivados metilados	Tipos de ligação	% da área dos derivados	Fragmentos de massa (m/z)
7,51	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc _p -(1→	20	87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205
9,71	2,4,6-Me ₃ -Glc	3→)-Glc _p -(1→	35	101, 118, 129, 161, 234
10,47	2,3,4-Me ₃ -Glc	6→)-Glc _p -(1→	24	87, 99, 102, 118, 129, 162, 189, 233
13,27	2,4-Me ₂ -Glc	3,6→)-Glc _p -(1→	21	87, 118, 129, 189, 234

A partir desses resultados pode-se sugerir que a glucana tem uma cadeia principal com ligação 1→3, entre as unidades de glucose, sendo algumas dessas substituídas em C-6 por resíduos glucosídicos. Considerando que 2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol, representa o derivado com ligações 1→6 e que encontra-se num percentual ligeiramente maior que os componentes tetrametilado e dimetilado, existe a possibilidade da ligação 1→6, fazer parte da cadeia principal, além de estar nos pontos de ramificação.

Para esclarecer essas possibilidades um experimento de Degradação do tipo Smith controlada foi efetuado. Essa análise envolve a redução com NaBH₄ dos grupos aldeídicos resultantes da oxidação do polissacarídeo com periodato, seguida da hidrólise ácida parcial. Os produtos provenientes dessa degradação formam uma mistura de polióis e glicolaldeídos, que correspondem as unidades oxidadas pelo periodato, e de um polissacarídeo remanescente, quando o polímero original contém unidades resistentes a oxidação (CÔRREA, 1971). Para a glucana em questão, a ausência de um polissacarídeo residual sinaliza que o derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol, faz parte da cadeia principal, ao invés de estar presente como uma cadeia lateral de gentiobiose.

4.3.3.3 Caracterização química por RMN da glucana

O espectro de ^1H RMN da glucana (P_{III}) apresentou quatro sinais anoméricos principais em δ 4,54, 4,53, 4,51 e 4,50 ppm (Figura 21). No espectro de ^{13}C RMN (Figura 22a) foram encontrados na região anomérica quatro sinais em δ 102,9, 102,8, 102,6 e 102,3 ppm que correspondem a quatro resíduos de açúcar. Os deslocamentos químicos referentes aos prótons anoméricos mostraram correlação com o sinal na região de carbono anomérico no espectro HSQC (Figura 23). Os sinais em alta frequência dos carbonos anoméricos no espectro de ^{13}C RMN sugerem que todos os resíduos presentes na estrutura estejam em configuração β (BHUNIA et al., 2011; RUTHES et al., 2013a; SAMANTA et al., 2013).

O espectro de ^{13}C -DEPT RMN, mostrou dois sinais invertidos (Figura 22b), em δ 68,8 e 61,1 ppm correspondendo, respectivamente, aos C-6 substituídos e livres. Os mesmos sinais são visualizados no espectro bidimensional, heteronuclear (Figura 23), representados em vermelho, em 68,8/4,22 (H-6a) ppm e 68,8/3,88 (H-6b) e 61,1/3,91 (H-6a) e 61,1/3,73 (H-6b).

O sinal em δ 84,9 ppm confirma os dados da metilação em relação a presença de ligações (1 $\rightarrow$ 3) (RUTHES et al., 2013a; KOMURA et al., 2014), entre os resíduos glucopiranosídicos. No espectro bidimensional (Figura 23) há correlação entre δ 84,9 e 3,74 ppm.

Dos resultados da metilação e RMN, podemos confirmar que o polissacarídeo isolado por extração aquosa a quente, do *R. solani*, é uma glucana formada por unidades β -D-glucopiranosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal, com cerca de 20% de substituição em O-6 por resíduos glucosídicos nas unidades β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3). A Tabela 4 mostra os principais assinalamentos atribuídos para a β -glucana e a Figura 24 ilustra os possíveis resíduos presentes na estrutura da β -glucana.

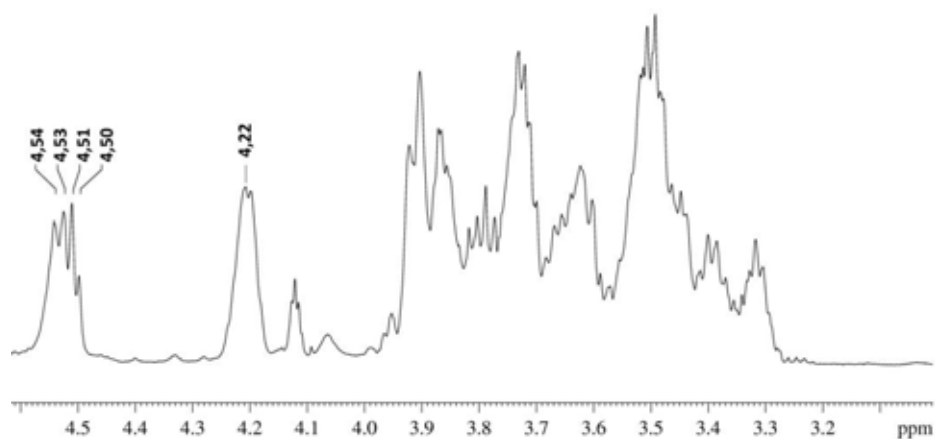


Figura 21 - Espectro de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , 25 °C) da glucana (P_{III}) obtida por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do *R. solani*. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

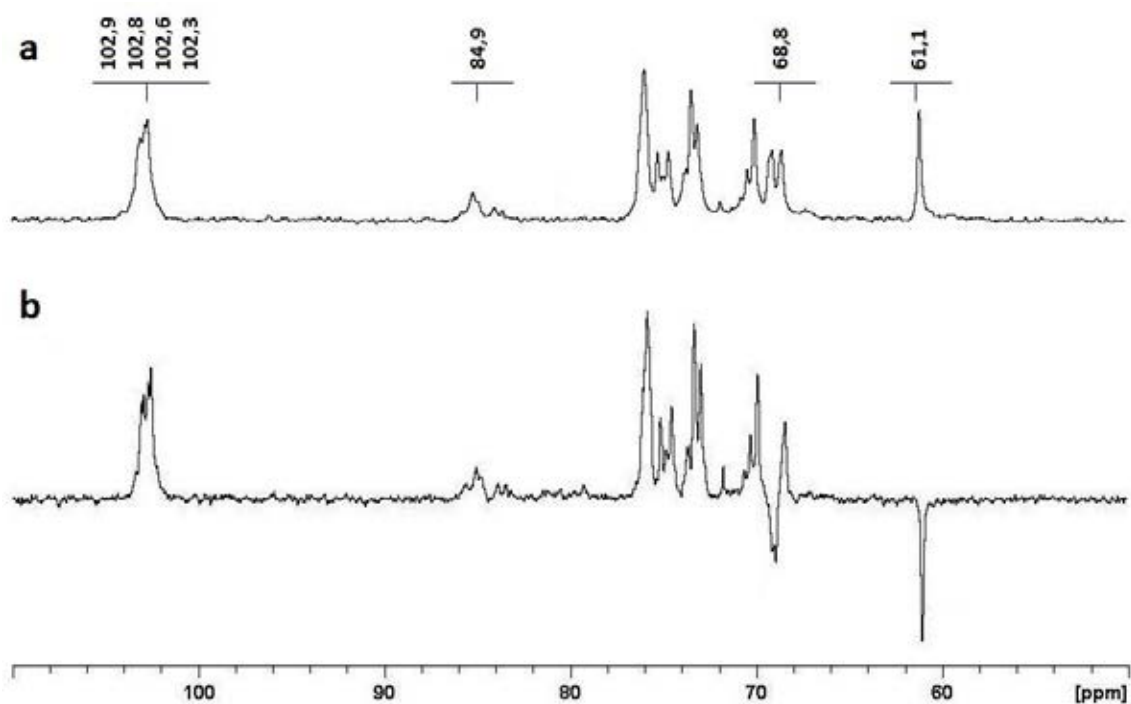


Figura 22 - Espectros da glucana (P_{III}) obtidos do extrato aquoso do *R. solani* realizados a 30° C: a) ^{13}C RMN e b) ^{13}C -DEPT RMN.

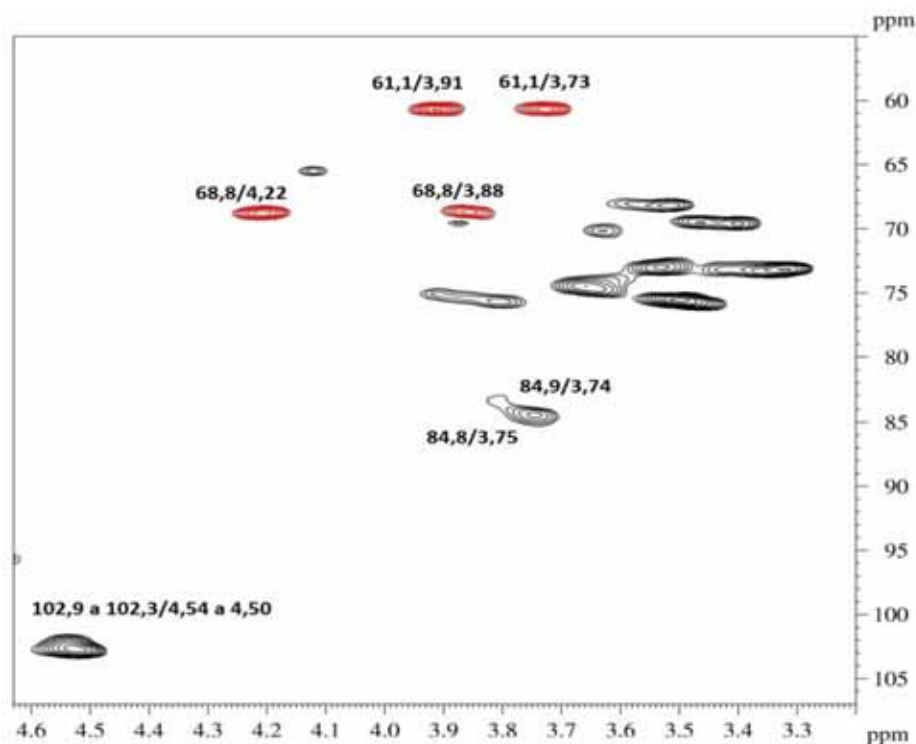


Figura 23 - Espectro bidimensional heteronuclear (HSQC-DEPT) da glucana (P_{III}) obtida do extrato aquoso do *R. solani*, em D_2O a 25 °C.

Tabela 4 - Assinalamentos de C/H da glucana isolada do *R. solani*, baseados nas análises de RMN.

Resíduos	Deslocamentos químicos (δ , ppm)		
	C-1/H-1	C-3/H-3	C-6/H-6
β -D-Glcp-(1→	102,3/4,50	-----	61,1/3,73 e 3,91
→3)- β -D-Glcp-(1→	102,6/4,51	84,9/3,74	61,1/3,73 e 3,91
3,6→)- β -D-Glcp-(1→	102,9/4,54	84,8/3,75	68,8/3,88 e 4,22
→6)- β -D-Glcp-(1→	102,8/4,53	-----	68,8/3,88 e 4,22

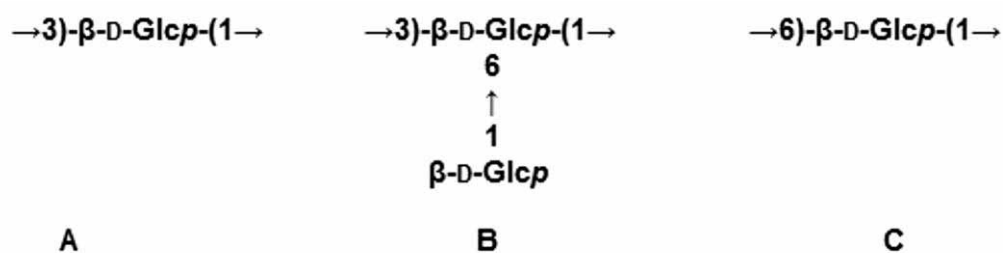


Figura 24 - Possíveis resíduos que fazem parte da estrutura da glucana.

Glucanas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 6) com substituição em O-3 e β -(1 $\rightarrow$ 3) com substituição em O-6, têm sido extraídas da parede celular de fungos (BHANJA et al., 2012; DONG, et al., 2002; LIU et al., 2014a; SMIDERLE et al., 2008) e líquens (REIS et al., 2002).

Uma glucana β -(1 $\rightarrow$ 6) com ramificação em O-3 obtida do extrato aquoso a quente de *Agaricus blazei* teve sua homogeneidade avaliada por cromatografia de permeação em gel em pressão elevada, apresentando-se como um material homogêneo devido a simetria do pico. Os deslocamentos químicos em δ 105,1, 104,7 e 104,4 ppm na região anomérica do espectro de ^{13}C RMN e a banda em 890 cm^{-1} no espectro de FTIR, indicaram a configuração β das ligações (DONG, et al., 2002).

Glucanas β -(1 $\rightarrow$ 3) com aproximadamente 33% de ramificação em O-6 foram isoladas dos extratos aquosos a quente dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*. Ambos os polissacarídeos passaram por procedimentos de purificação antes de serem submetidos a testes de atividade prebiótica, que resultaram em dados positivos quanto ao estímulo do crescimento de diferentes linhagens do *Lactobacillus* (SYNYTSYA, et al., 2009).

Além dos extratos aquosos a quente, a extração alcalina também tem se destacado como um poderoso método para o isolamento de glucanas. Através dos tratamentos de purificação com ciclos de congelamento e descongelamento, solução de Fehling e degradação enzimática, Komura e colaboradores (2014) isolaram do extrato alcalino de *Pleurotus ostreatus* variedade *florida* uma glucana com a cadeia principal formada por ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3), confirmadas pela presença do derivado 2,4,6-O-metil-glucitol e pelo sinal em δ 84,4 ppm no espectro de ^{13}C RMN. Além disso, os resultados de cromatografia gasosa e espectrometria de massa mostraram que aproximadamente 18,3% de sua estrutura correspondem ao derivado 2,4-dimetil-glucitol, sugerindo, portanto, uma estrutura com ramificação em O-6, confirmada pelos sinais de inversão no espectro de DEPT.

Glucanas com cadeia principal contendo ambas as ligações são menos comuns, entretanto foi isolado do extrato alcalino do fungo comestível *Lentinus squarrosulus* um polissacarídeo com cadeia principal formada por unidades glucopiranosídicas β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 6) ligadas na proporção de 3:1, com 20% de substituição em C-6 por unidades β -D-glucopiranosídicas. Com uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, esse polímero

apresentou em testes de atividade biológica, ativação de macrófagos, proliferação de esplenócitos e células do timo (BHUNIA et al., 2011).

A glucana proveniente da purificação do extrato aquoso a quente de *Tricholoma crassum* com massa molecular aparente de $1,74 \times 10^5$ Da, e estrutura similar à encontrada por Bhunia e colaboradores (2011), também respondeu positivamente a ativação de macrófagos e ensaios de proliferação de esplenócitos e timócitos, no entanto, maiores concentrações do polissacarídeo foram requeridas, sendo respectivamente, 50 e 100 µg/mL, os valores considerados eficientes para a atividade (SAMANTA et al., 2013).

Tendo em vista a expressiva aplicação das glucanas como agentes anti-inflamatórios (RUTHES et al., 2013a; SMIDERLE et al., 2008), antioxidantes (MAITY et al., 2014), imunomoduladores (HAN et al., 2011; MANDAL et al., 2012; SAMANTA et al., 2013; SMIDERLE et al., 2013) antitumorais (LIU et al., 2014b; WANG et al., 2014c), entre outros, pode-se considerar que o material encontrado em P_{III}, uma glucana com ligações (1→3) e (1→6) na cadeia principal, sendo parcialmente substituída em O-6, tem potencial para apresentar atividade biológica.

4.3.4 Análises da fucomanogalactana (P_V) obtida por cromatografia de filtração em gel a pressão normal do PE_{H_2O}

4.3.4.1 Análise da composição monossacarídica, massa molecular, grau de polidispersividade e FTIR da fucomanogalactana

Polissacarídeos isolados de basidiomicetos vêm apresentando inúmeras aplicações biológicas, no entanto, a caracterização química desses polímeros é fundamental para entender os mecanismos da ação biológica de cada molécula. Diferenças na estrutura (KOMURA et al., 2010; YOU et al., 2013), solubilidade (RUTHES et al., 2013b), massa molecular (WANG et al., 2014b) e procedimentos de derivatização (TAO, ZHANG, ZHANG, 2009), são fatores determinantes para a avaliação da atividade. Desta forma, a caracterização do polissacarídeo presente no P_V se mostrou primordial para a sua posterior aplicação.

Das frações eluídas do PE_{H_2O} por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B a pressão normal (Figura 11), a denominada P_V foi a que mais se destacou quanto ao perfil de eluição por GPC (Figura 13), isto porque além de apresentar-se simétrica e consequentemente, homogênea (PAZUR, 1994), P_V apresentou-se pouca polidispersa (1,1). Através do tempo de eluição (54,93 minutos) e a comparação com os padrões de dextrana, a massa molecular aparente de P_V foi estimada em $1,52 \times 10^4$ Da. Os resultados da hidrólise ácida total (TFA 4 mol/L, 100 °C, 2 horas) e análise por HPAEC/PAD (Figura 12), mostraram que P_V tem em sua composição monômeros de galactose (64%), fucose (30%), manose (6%) e traços de glucose (menos de 1%). O espectro de infravermelho mostrou uma banda de absorção na região de 860 cm^{-1} (Figura 25) sugerindo que as configurações das ligações glicosídicas de P_V são do tipo α (WANG et al., 2014c).

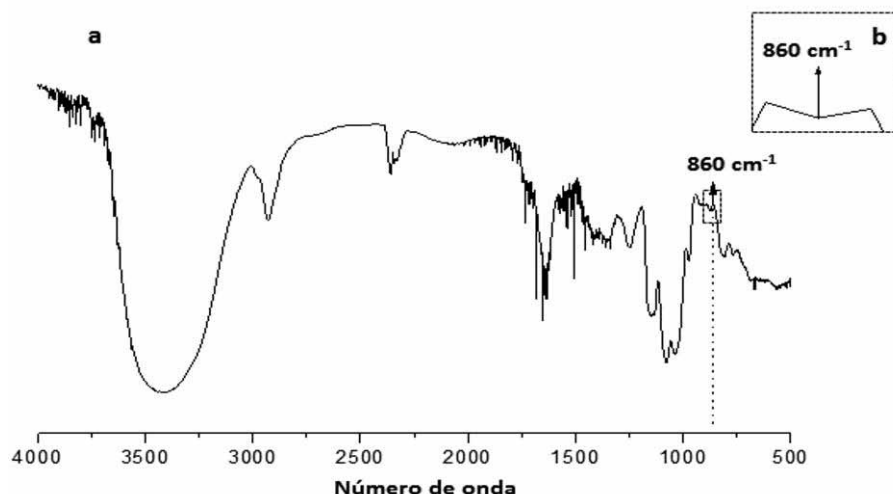


Figura 25 - a) Espectro de infravermelho de P_V na região de 4000 a 500 cm^{-1} ; b) Região de impressão digital referente ao sinal da configuração α .

4.3.4.2 Determinação da posição das ligações glicosídicas da fucomanogalactana

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados, provenientes do P_V , analisados por cromatografia gasosa (Figura 26) eluíram como 4 componentes correspondendo a um deoxi-açúcar trimetilado (5,51 min), e hexoses tetrametilada (7,53 min), trimetilada (11,33 min) e dimetilada (14,05 min), respectivamente, fucose, manose e galactoses.

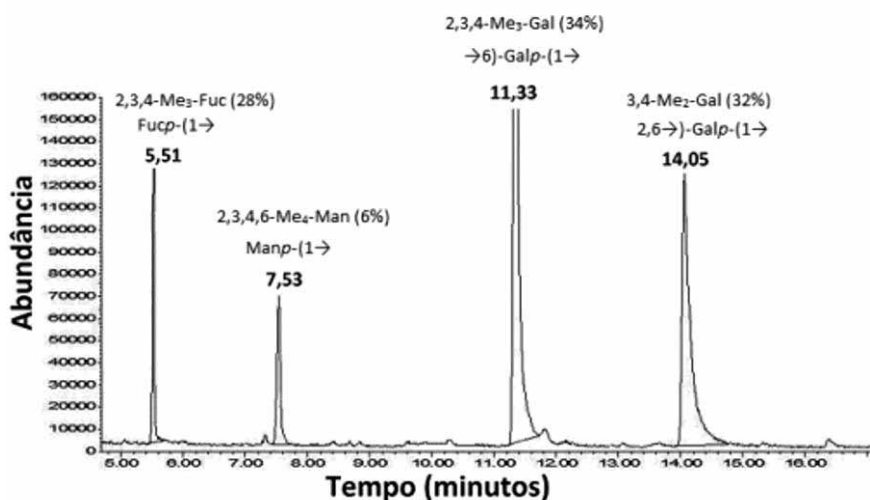


Figura 26 - Cromatograma gasoso dos acetatos de alditóis parcialmente metilados da fucomanogalactana (P_V) extraída do *R. solani*.

O espectro de massa do primeiro derivado mostrou fragmentos primários (118, 131, 162) e secundário (102) compatíveis com o derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-fucitol (Figura 27).

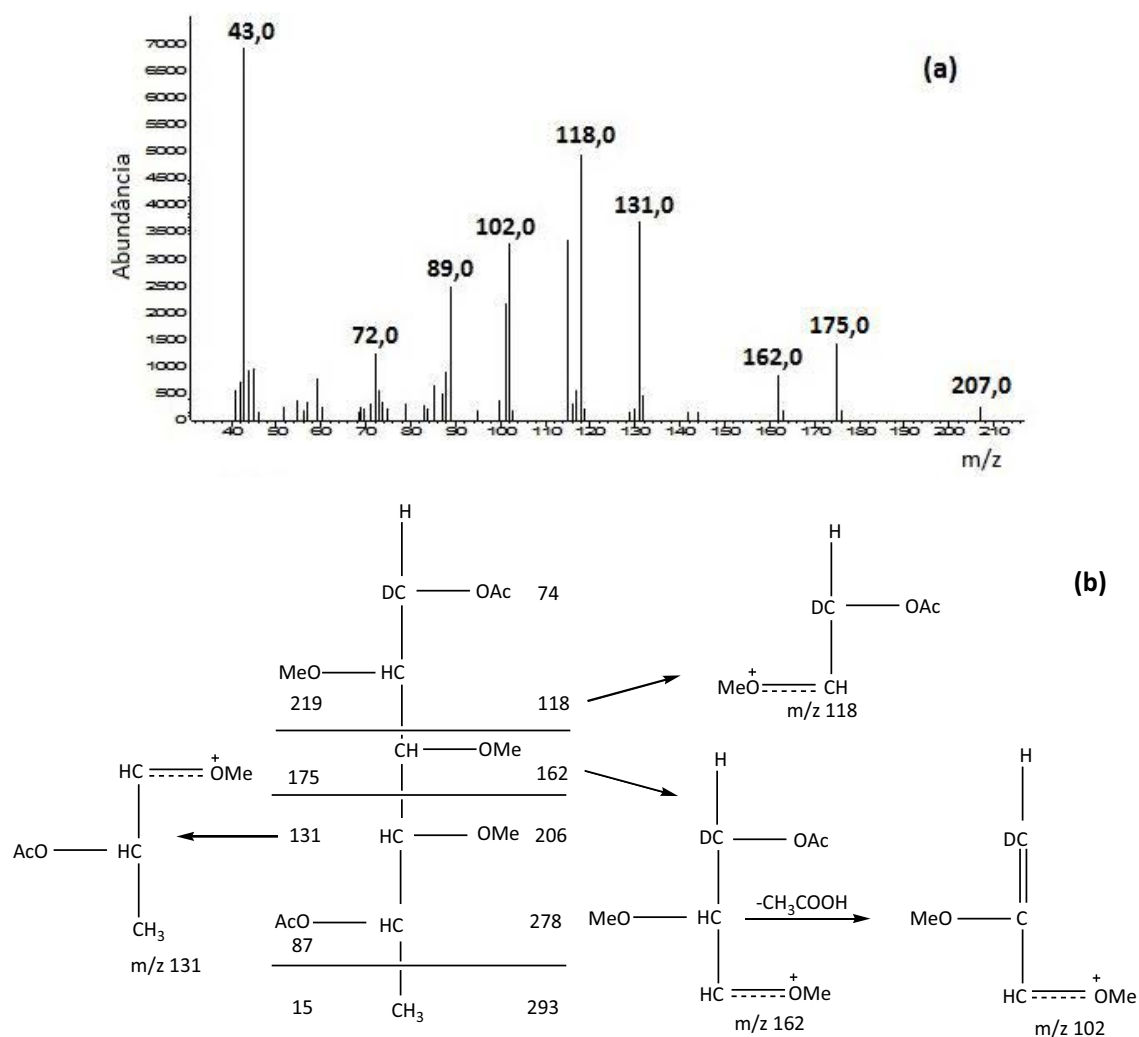


Figura 27 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-fucitol.

O derivado II apresentou fragmentos primários (118, 161, 162, 205) e secundários (87, 102, 129, 145) correspondentes ao derivado 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-manitol (Figura 28).

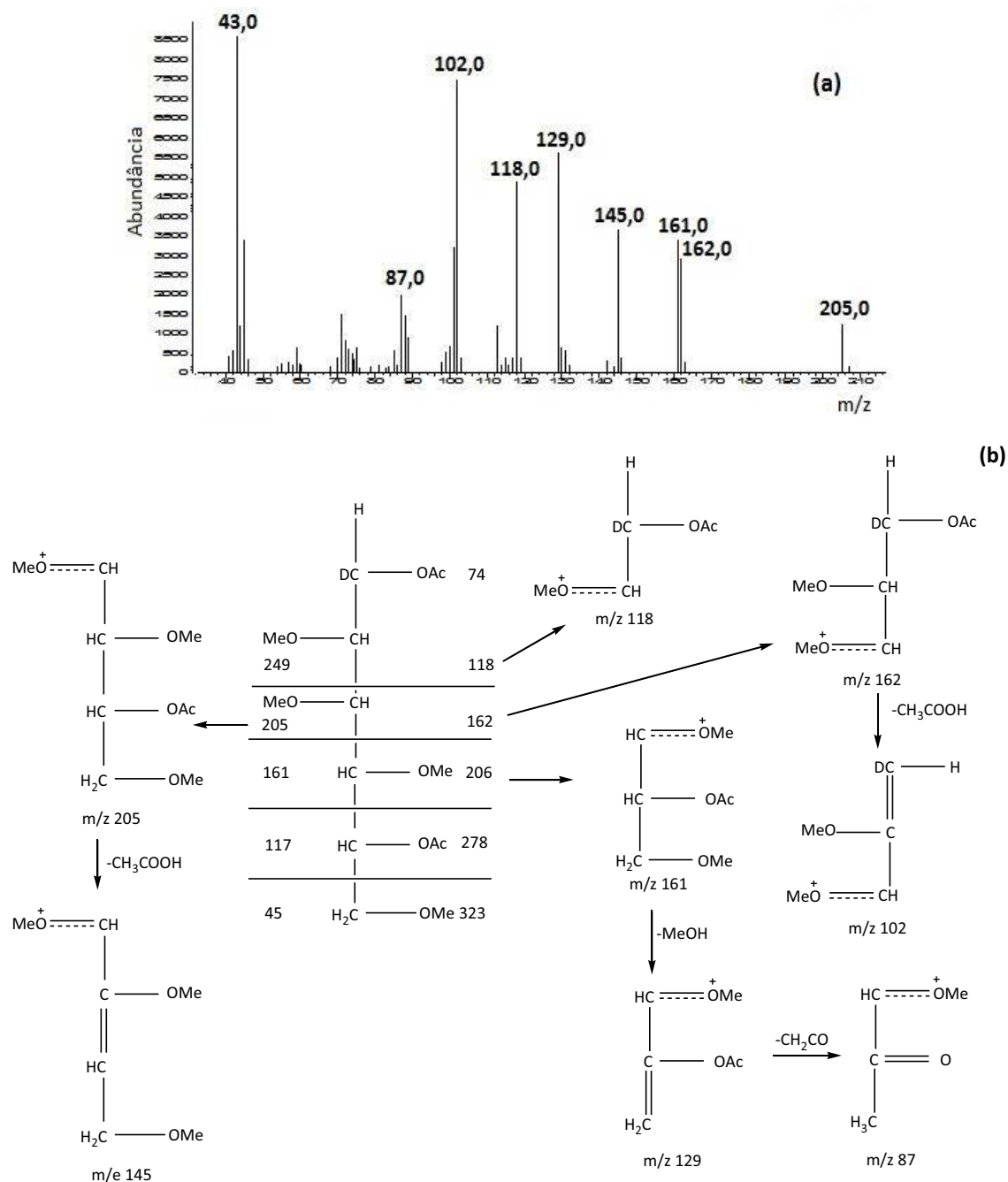


Figura 28 - Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-manitol.

O derivado III apresentou fragmentos primários (118, 162, 189) e secundários (87, 99, 102, 129) correspondentes ao derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-galactitol (Figura 29).

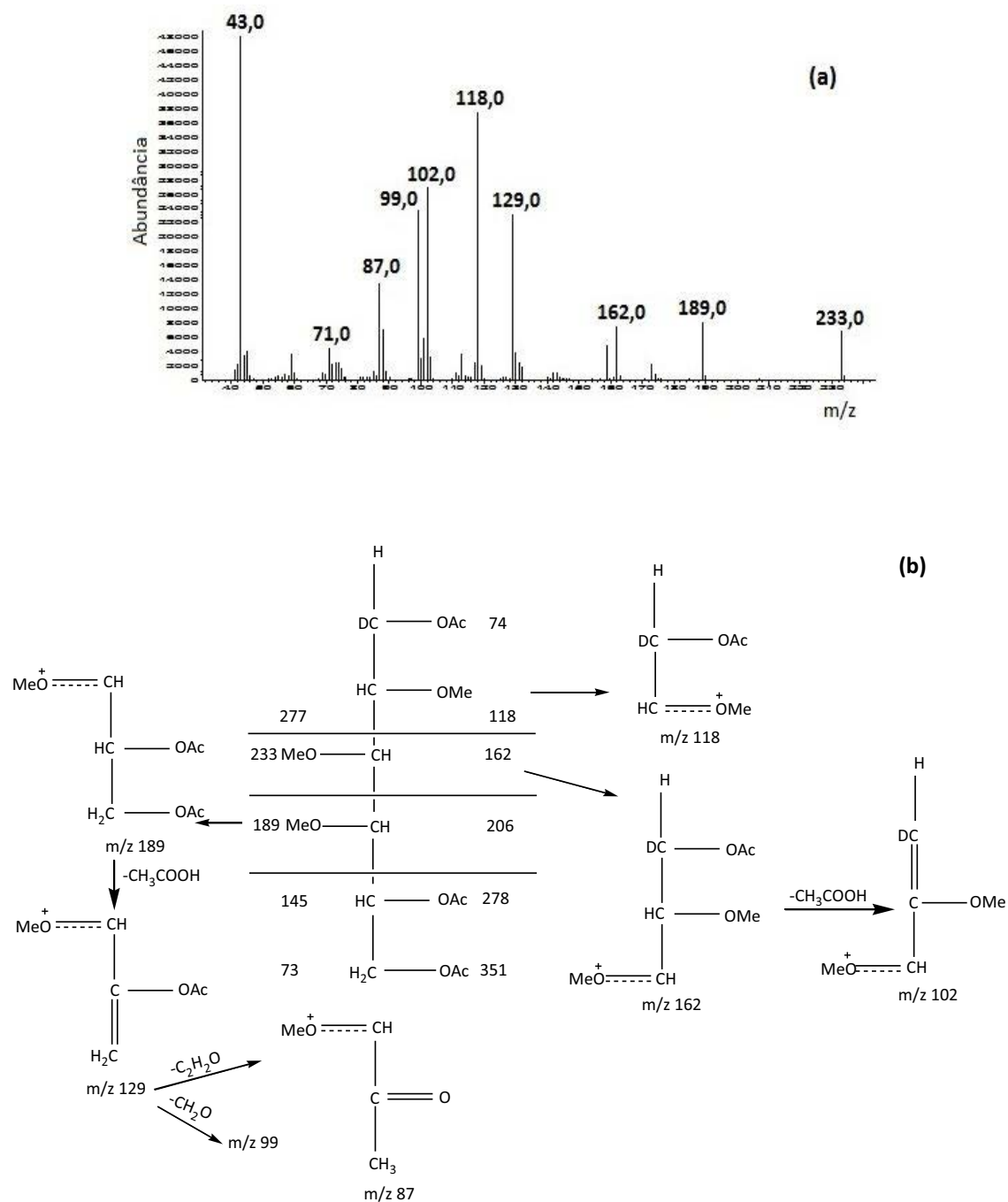


Figura 29 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 2,3,4-tri-*O*-metil-galactitol.

O derivado IV apresentou fragmentos primários (189, 234) e secundários (87, 99, 129) correspondentes ao derivado 3,4-di-*O*-metil-galactitol (Figura 30).

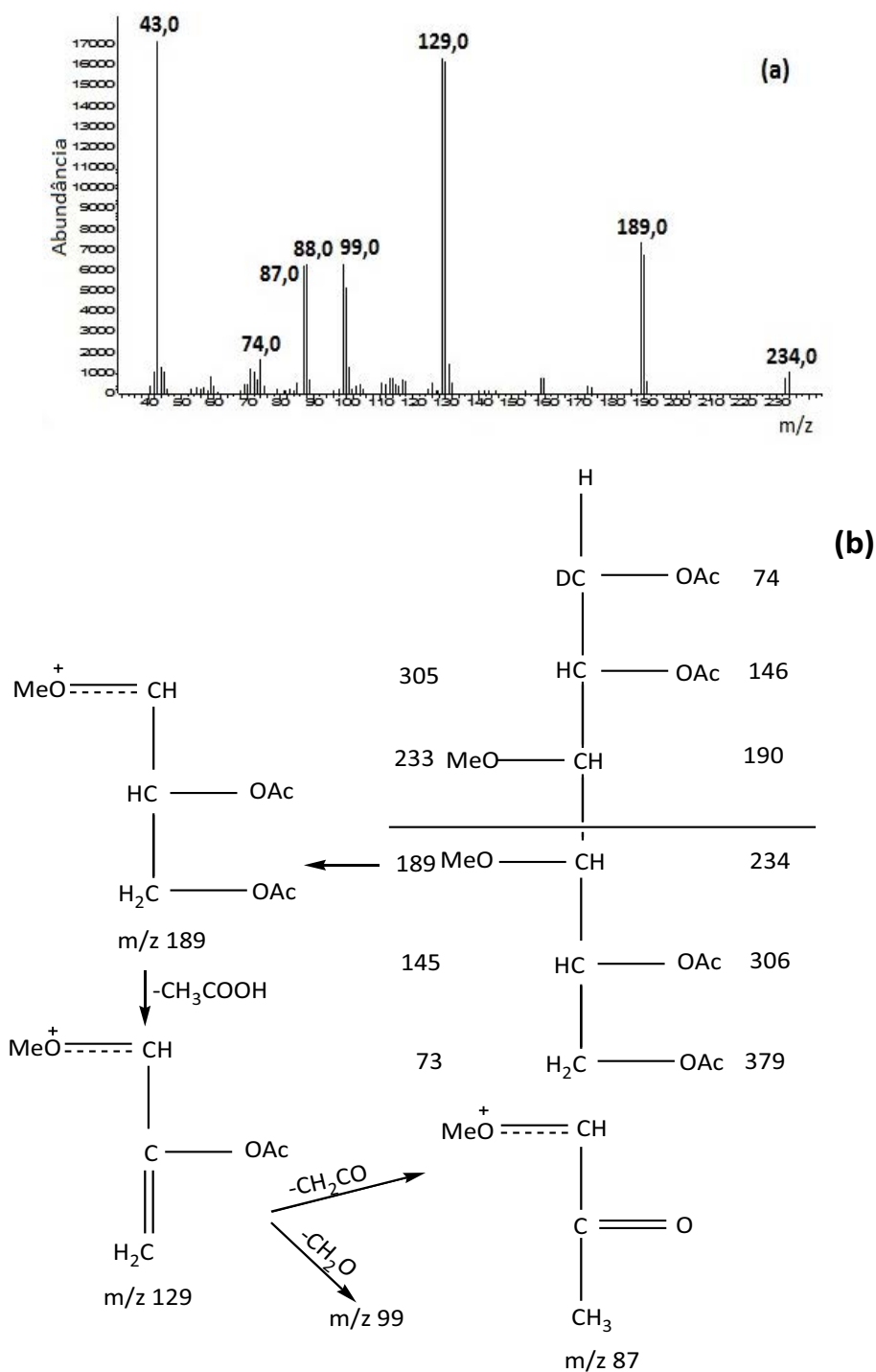


Figura 30 - a) Espectro de massa e b) Esquema de fragmentação do derivado 3,4-di-*O*-metil-galactitol.

A Tabela 5 resume as informações encontradas por espectrometria de massa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados provenientes do P_V.

Tabela 5 - Acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na metilação da fucomanogalactana extraída do *R. solani*.

Tempo de retenção (min)	Derivados metilados	Tipos de ligação	% da área dos derivados	Fragmentos de massa (m/z)
5,51	2,3,4-Me ₃ -Fuc	Fucp-(1→	28	72, 89, 102, 118, 131, 162, 175, 207
7,53	2,3,4,6-Me ₄ -Man	Manp-(1→	6	87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205
11,33	2,3,4-Me ₃ -Gal	6→)-Galp-(1→	34	71, 87, 99, 102, 118, 129, 162, 189, 233
14,05	3,4-Me ₂ -Gal	2,6→)-Galp-(1→	32	74, 87, 99, 129, 189, 234

Esses resultados indicam que o polissacarídeo presente em P_V é formado por uma cadeia principal com resíduos galactopiranosídicos 1→6 ligados, sendo aproximadamente 32% substituído em C-2 por unidades fucopiranosídicas (28%) e manopiranosídicas (6%).

4.3.4.3 Caracterização química por RMN da fucomanogalactana

As análises de ¹H RMN (Figura 31), ¹³C RMN (Figura 32) e HSQC (Figura 33) em conjunto com os dados da literatura, ajudaram a confirmar a estrutura da fucomanogalactana. O espectro de prótons mostrou 4 sinais na região anomérica (δ 5,13, 5,09, 5,07 e 5,00 ppm), todos com valores de deslocamentos químicos atribuídos a configuração α. O sinal intenso em δ 1,26 ppm corresponde aos H-6 da fucose. O sinal em δ 3,47 ppm foi atribuído aos hidrogênios dos grupos O-metila presentes em unidades de galactose (KOMURA et al., 2010; RUTHES et al., 2012; ZHANG et al., 2006).

Os espectros de ¹³C RMN (Figura 32) e de HSQC (Figura 33) do pico V mostraram similaridades com os espectros de heterogalactanas extraídas do corpo de frutificação de fungos basidiomicetos (ALQUINI et al., 2004; KOMURA et al., 2010;

RUTHES et al., 2013a), que foram, portanto, utilizados como comparação para a interpretação dos resultados do P_V , uma fucomanogalactana. A região C-1/H-1 apresentou quatro sinais correlacionados em δ 105,4/5,13; 104,4/5,09; 101,0/5,00 e 101,0/5,07 ppm atribuídos à presença de unidades terminais de α -D-Manp, α -L-Fucp e unidades galactopiranosídicas 6-O e 2,6-di-O-substituídas respectivamente (Figura 33a). De acordo com a literatura o acoplamento C-1/H-1 em δ 101,0/5,00 pode também estar relacionado aos anoméricos das unidades de 3-Me-Galp. As unidades terminais não redutoras Manp têm configuração α (sinal de H-1 em campo baixo (δ 5,13 ppm). Todos os demais sinais de H-1 apresentaram-se também em campo baixo, δ 5,09 ppm para as unidades Fucp, δ 5,07 ppm e δ 5,00 ppm para as unidades Galp, indicando que todas as unidades estão respectivamente, em configuração α , como observado no espectro de ^1H RMN (Figura 31) e de infravermelho (Figura 25).

Outras correlações foram atribuídas a partir do espectro heteronuclear, bidimensional (HSQC), tais como CH_3 das unidades de Fucp em δ 18,7/1,26 ppm (Figura 33b) e os grupos C-6/H-6 das unidades galactopiranosídicas 6-O substituídas, que apresentaram sinais em δ 70,4/3,99, 70,4/3,65, 69,7/3,88, 69,6/3,77 e 69,5/3,94 (Figura 33c). O dublete em δ 64,0/3,77/3,92 ppm corresponde aos C-6 livres das unidades terminais não redutoras dos resíduos α -Manp (Figura 33c). As ramificações de fucose e manose, ligadas em O-2 da cadeia principal puderam ser confirmadas pelo acoplamento, em campo baixo, C-2/H-2 das unidades D-galactopiranosídicas em 81,0/3,84 ppm. O acoplamento em δ 58,9/3,47 ppm, indica a presença de algumas unidades de galactose naturalmente metiladas, como já encontrada em fucogalactanas (KOMURA et al., 2010; RUTHES et al., 2012). A posição desses grupamentos em C-3/H-3 pode ser confirmada pelo acoplamento dos sinais δ 81,6/3,60 (Figura 33c). Os principais assinalamentos descritos estão resumidos na Tabela 6. Os demais sinais visualizados no espectro bidimensional (não atribuídos) correspondem aos demais carbonos e prótons das unidades do heteropolímero.

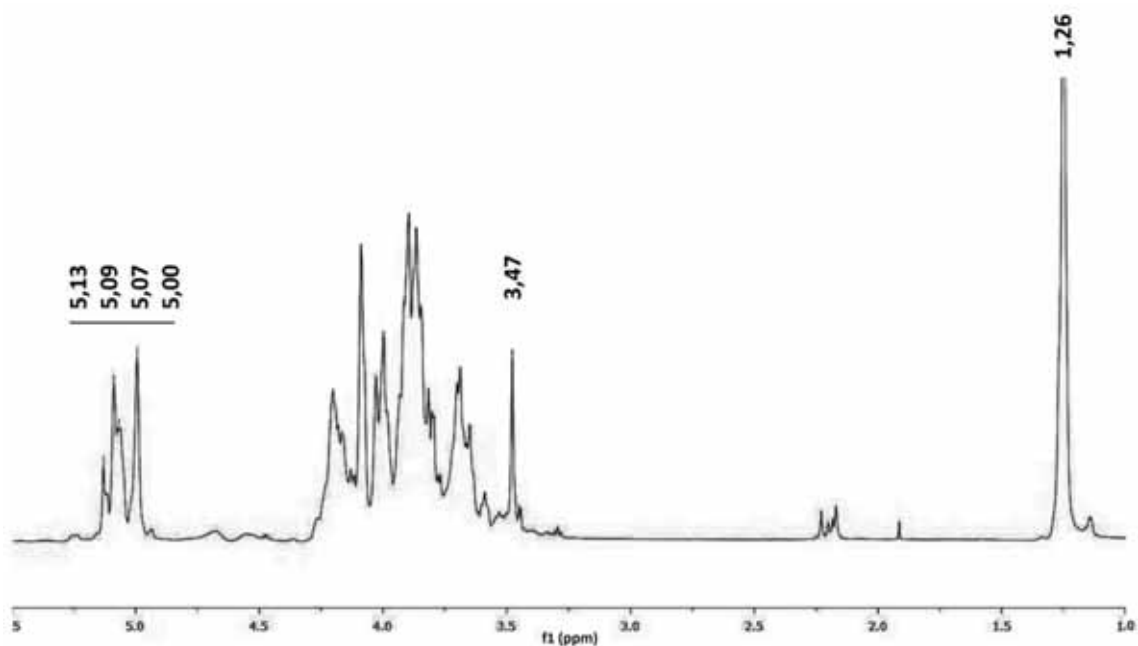


Figura 31 - Espectro de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , 25 °C) da fucomanogalactana (P_V) obtido por cromatografia de filtração em gel Sepharose CL-6B do extrato aquoso do *R. solani*.

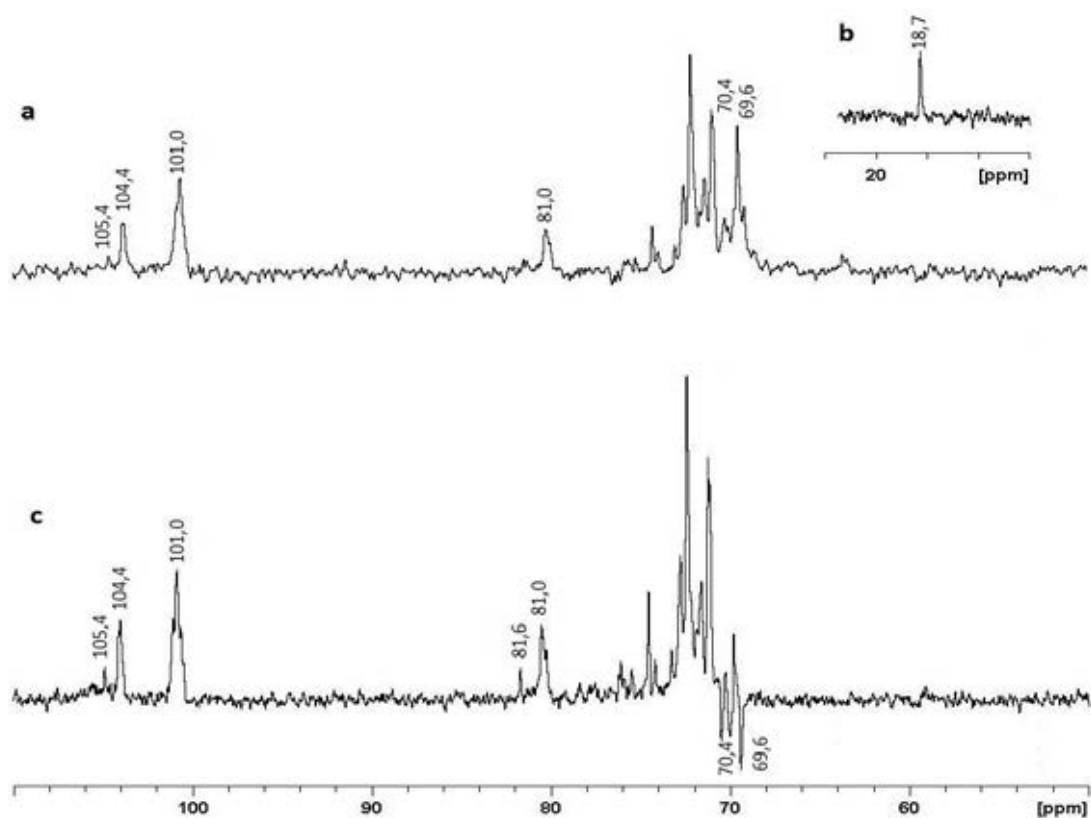


Figura 32 - Espectros da fucomanogalactana obtida do extrato aquoso do *Rhizoctonia solani*, realizados a 30° C: a) ^{13}C RMN. b) Região de $\text{CH}_3\text{-6}$ das unidades de fucose. c) ^{13}C -DEPT RMN.

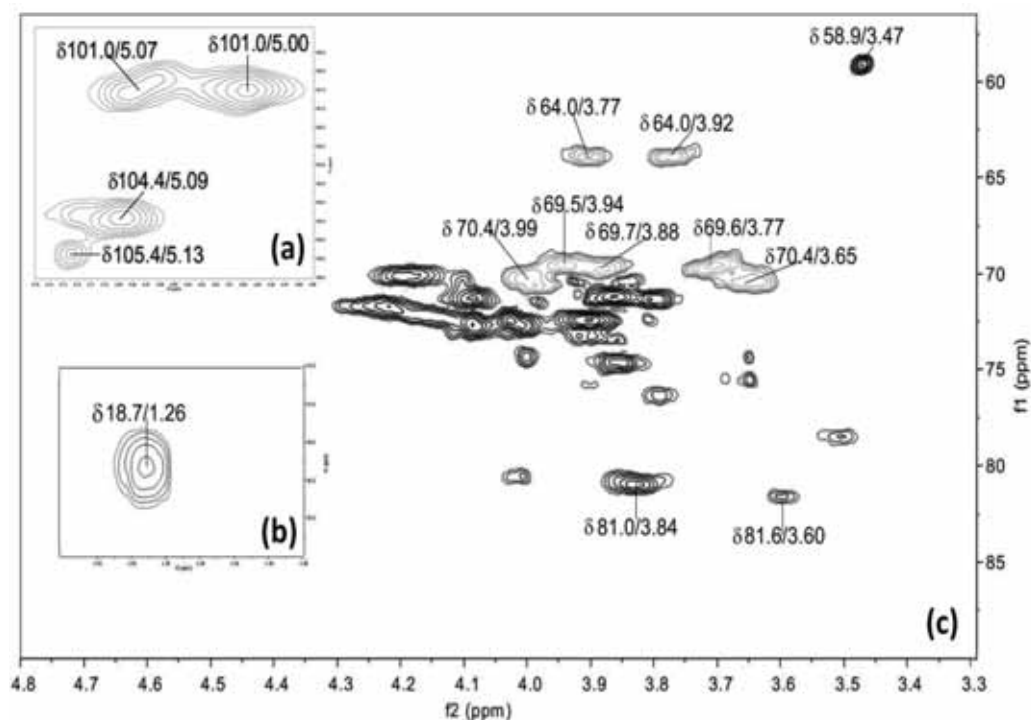


Figura 33 - Espectro bidimensional heteronuclear (HSQC-DEPT) da fucomanogalactana obtida do extrato aquoso do *R. solani*, em D₂O a 25 °C . a) Região anomérica. b) Correlação dos sinais C-6/H-6 da fucose. c) Correlação dos demais sinais.

Tabela 6 - Assinalamentos de C/H da fucomanogalactana isolada do *R. solani*, baseados nas análises de RMN.

Sinal (C/H)*	Assinalamentos
105,4/5,13	C-1/H-1 α-D-Manp-(1→
104,4/5,09	C-1/H-1 α-L-Fucp-(1→
101,0/5,07	C-1/H-1 2,6→)-α-D-Galp-(1→
101,0/5,00	C-1/H-1 6→)-α-D-Galp-(1→
	C-1/H-1 6→)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→
81,6/3,60	C-3/H-3 6→)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→
81,0/3,84	C-2/H-2 2,6→)-α-D-Galp-(1→
58,9/3,47	C/H dos grupos -CH ₃ das unidades 6→)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→
64,4/3,77 e 3,92	C-6/H-6 α-D-Manp-(1→
18,7/1,26	C-6/H-6 α-L-Fucp-(1→

* Frequências expressas em ppm (δ).

Os resultados das análises efetuadas em P_V mostram que esse polímero é constituído por uma cadeia principal de resíduos α -D-galactopiranosídicos (1→6) ligados, parcialmente substituídos em O-2 por unidades terminais não redutoras de α -L-Fucp e α -D-Manp. É possível, também, deduzir que alguns resíduos de α -D-Galp da cadeia principal são parcialmente metilados em OH-3. A Figura 34 mostra os possíveis resíduos que formam a estrutura da fucomanogalactana.

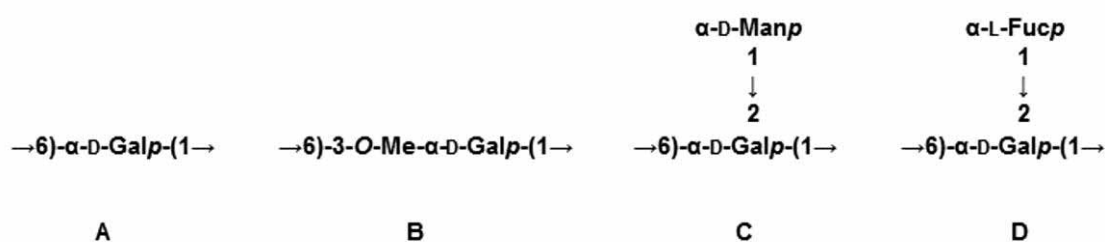


Figura 34 - Possíveis resíduos que fazem parte da estrutura da fucomanogalactana.

Há vários registros na literatura sobre a extração de galactanas da parede celular de fungos. A maioria é formada por cadeia principal de α -D-Galp-(1→6) contendo diferentes substituintes, principalmente fucose e/ou manose (CARBONERO et al., 2008; WASSER, 2002; ZHANG et al., 2007). Heterogalactanas com a mesma cadeia principal, mas apresentando grupos metilas como substituintes naturais foram isoladas de *Pleurotus ostreatoroseus* e *P. ostreatos* var. *florida* (ROSADO et al., 2003) e *Agaricus bisporus* (RUTHES et al., 2012).

A investigação das propriedades biologicamente ativas de fucogalactanas e fucomanogalactanas vem ocorrendo com frequência nos últimos anos. Esses estudos mostram que as variações estruturais dessas moléculas podem influenciar quanto aos seus efeitos biológicos (KOMURA et al., 2010; RUTHES et al., 2012; RUTHES, et al., 2013a). Portanto, diante de vários resultados promissores encontrados na literatura com moléculas estruturalmente similares a fucomanogalactana isolada do *R. solani*, testes para avaliar a citotoxicidade dessa molécula foram realizados.

4.4 TESTE BIOLÓGICO: ATIVIDADE CITOTÓXICA

Câncer é um termo utilizado para designar um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que afetam o crescimento de células normais, provocando um rápido desenvolvimento de células anormais com potencial agressivo. Os desenvolvimentos desses vários tipos de câncer são consequência da interação entre elementos endógenos e ambientais. No Brasil, a previsão para 2014 (válida para 2015), era de 33.000 novos casos de câncer de cólon e reto e de 27.000 para câncer de pulmão, sendo que esses tipos ocuparam, respectivamente, o quarto e quinto lugar na lista dos mais frequentes (INCA, 2014).

Considerando a grande ocorrência do câncer de cólon e reto e de pulmão no Brasil (INCA, 2014), da importância em encontrar moléculas que atuem contra este problema e de inúmeras pesquisas onde polissacarídeos isolados de basidiomicetos tem apresentado respostas positivas na diminuição da viabilidade celular dessas células anormais, células de câncer de cólon humano das linhagens HT-29 e HCT-116 e células de câncer de pulmão murino 3LL, foram selecionadas para os testes de viabilidade celular, onde a atividade citotóxica da β -glucana e fucomanogalactana isoladas do basidiomiceto *R. solani* foram avaliadas.

4.4.1 Teste de viabilidade celular da glucana

Os resultados ilustrados na Figura 35 mostraram que a β -glucana nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentou atividade citotóxica direta sobre células de câncer de cólon humano (tanto para HT-29 quanto HCT-116). A concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se incapaz de alterar a viabilidade dessas células. Embora discreto esse efeito reforça o potencial antitumoral atribuído às β -glucanas, indicando que em concentrações adequadas, essa molécula pode servir como um adjuvante ao tratamento de tumores gastro-intestinais.

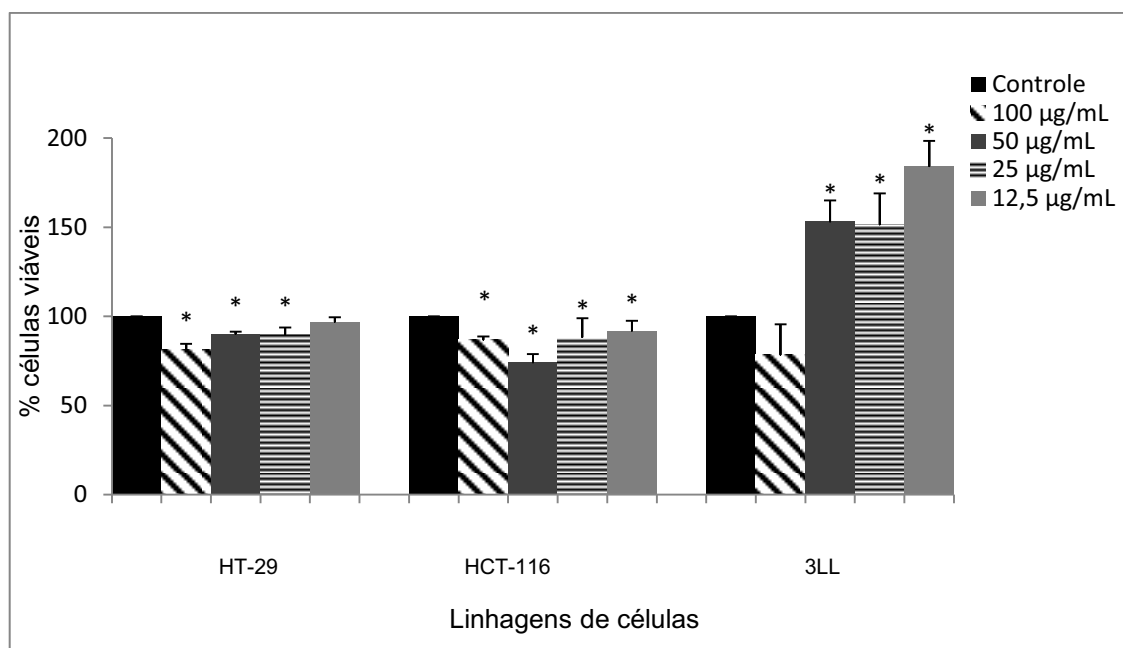


Figura 35 - Efeito citotóxico da β -glucana nas linhagens de células de câncer de cólon humano (HT-29 e HCT-116) e câncer pulmonar murino 3LL.

Lee e colaboradores (2009) avaliaram a ação citotóxica do extrato aquoso à quente de *Inonotus obliquus* frente às células de câncer cólon humano HT-29. O extrato aquoso mostrou-se efetivo, diminuindo a viabilidade celular para 56% quando usado uma concentração de 1 mg/mL. Neste caso, como o teste foi realizado com o extrato bruto, não se pode afirmar qual molécula é responsável pelo efeito citotóxico.

Os derivados da β -glucana isolada do basidiomiceto *Poria cocos* apresentaram melhores efeitos citotóxicos contra as células de carcinoma gástrico (linhagens MKN e SGC-7901) quando comparados com o provocado pela molécula nativa, sem modificação. A insolubilidade da β -glucana pode ser um interferente na sua atuação como agente citotóxico, visto que a melhor solubilização dos derivados em água, contribuiu para os resultados (WANG et al., 2004).

Diferentemente das células de câncer cólon humano, a linhagem de células 3LL, derivadas de câncer pulmonar murino (camundongos) não teve sua viabilidade comprometida, mesmo no teste realizado com a concentração mais alta de amostra. Em oposição ao que observou com as células de câncer cólon, essa linhagem teve seu crescimento estimulado pelo contato com a β -glucana, de modo que sua proliferação foi quase 100% superior ao observado no controle (Figura 35).

A diferença de comportamento entre células de origens diferentes sugerem que as células 3LL expressem receptores para as β -glucanas, enquanto as outras, originárias do epitélio intestinal, não as expressem. Essa hipótese é reforçada pela observação prévia de que células de tecido pulmonar normal expressam receptores do tipo dectina-1 (HEYL et al., 2014), considerados os principais receptores para β -glucanas (GOODRIDGE et al., 2009, LEE et al., 2014). A dectina-1 é um dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes na superfície de macrófagos e monócitos e está associada à imunidade inata contra fungos patogênicos, muitos dos quais expressam β -glucanas em sua parede celular (DRUMMOND, BROWN, 2011; PLATO, HARDISON, BROWN, 2014). Visto que o pulmão é uma das principais portas de entrada dos fungos causadores de micoses sistêmicas, a presença de tais receptores no epitélio pulmonar deve contribuir para a eficiência da barreira inata contra esses patógenos. Não encontramos relatos de que a interação da β -glucana com a dectina-1 estimule a proliferação de células pulmonares, mas é possível que essa seja uma resposta comum às células que expressam dectina-1, como ocorre, por exemplo, com queratinócitos estimulados com β -glucana (VAN DEN BERG et al., 2014), possivelmente como um mecanismo de reparo das lesões teciduais. Desse modo, uma vez que células tumorais têm sua origem em tecidos normais, é plausível que as células 3LL mantenham a expressão dos receptores tipo dectina 1, explicando sua resposta proliferativa frente a concentrações adequadas de β -glucana.

4.4.2 Teste de viabilidade celular da fucomanogalactana

Os testes (Figura 36) realizados com a fucomanogalactana mostraram que a fração P_V tem atividade citotóxica direta contra ambas as linhagens de câncer de cólon humano, reduzindo significativamente a viabilidade celular quando adicionada aos poços de cultura na concentração adequada. As células HT-29 apresentaram maior sensibilidade frente a fucomanogalactana do que as células HCT-116, de modo que mesmo a baixa concentração de polissacarídeo (25 μ g/mL) foi capaz de inibir

significativamente o crescimento das células HT-29, enquanto a linhagem HCT-116 exigiu a maior concentração (100 µg/mL) para mostrar inibição.

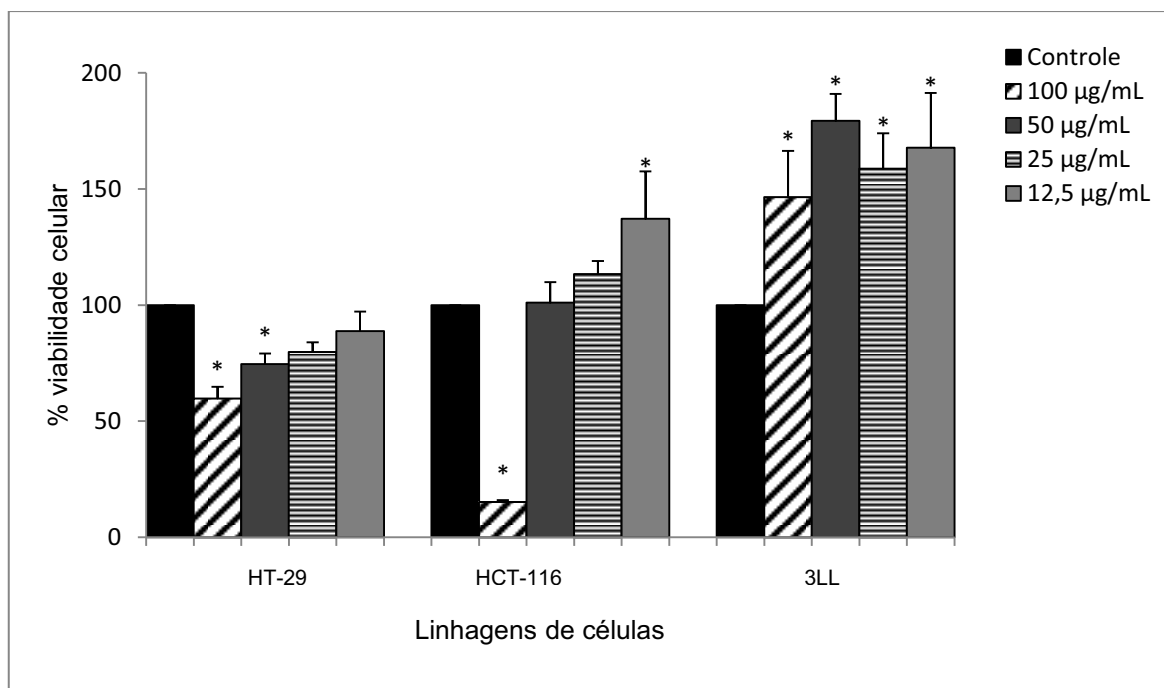


Figura 36 - Efeito citotóxico da fucomanogalactana nas linhagens de células de câncer de cólon humano (HT-29 e HCT-116) e câncer pulmonar murino 3LL.

O resultado do ensaio de citotoxicidade da manogalactoglucana obtida do extrato aquoso a quente de *Lentinus edodes* contra as células HT-29 e HCT-116 resultou em uma inibição de 23 e 14%, respectivamente, em ambos tratamentos foram utilizados 5 mg/mL de polissacarídeo (JEFF et al., 2013).

Com base no ensaio do efeito inibitório contra células HT-29, o proteoglicano isolado de *Phellinus linteus* mostrou resultados promissores, colocando a possibilidade de usá-lo como adjuvante no tratamento quimioterapêutico e como um imunostimulante contra o câncer de cólon (LI et al., 2011).

Em contraste com os resultados observados com as células HT-29 e HCT-116, a fucomanogalactana estimulou o crescimento das células de câncer pulmonar murino 3LL (Figura 36). Li et al. (2008) relataram que o resíduo galactopiranosídico presente em uma fucogalactana naturalmente sulfatada se liga nas células alvo através do receptor de peptídeo de elastina. Embora não existam dados sobre a expressão desses receptores em células pulmonares humanas, Wasano e colaboradores (1992)

observaram que as células do pulmão de rato expressem tais receptores. Assim, é possível que as células 3LL, originárias da transformação maligna de células pulmonares murinas (camundongos), mantenham a expressão desse receptor, e que sua interação com a fucomanogalactana obtida do *R. solani*, induza a proliferação de células cancerosas. Situação semelhante é observada quando outros tipos de polissacarídeos se ligam a receptores de reconhecimento de padrões (PRR), por exemplo, a ligação entre β -glucanas e dectina-1 (GOODRIDGE et al., 2009).

Por outro lado, não há relatos sobre a expressão de receptores de peptídeos elastina nas células intestinais. Assim é possível que a atividade proliferativa desencadeada por P_V seja dependente da expressão desses receptores, explicando o comportamento diferente do P_V frente às células derivadas de câncer de cólon das células de câncer de pulmão murino.

5 CONCLUSÕES

O procedimento extrativo utilizado foi eficiente para a obtenção dos polissacarídeos. Os resultados da hidrólise ácida total e HPAEC/PAD mostraram que glucose, galactose e fucose são os principais constituintes do PE_{H2O}.

A cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-6B, a pressão normal, separou o precipitado etanólico do extrato aquoso em cinco diferentes frações, duas delas em condições de serem quimicamente caracterizadas, pois se comportaram como um material pouco polidisperso por GPC, tratando-se de uma glucana (P_{III}) e uma fucomanogalactana (P_V), comuns em basidiomicetos.

Os resultados da metilação e as análises de ressonância magnética nuclear de próton e carbono treze mostraram que P_{III} é uma β -glucana com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), com substituição em O-6 por resíduos β -glucopiranosídicos e P_V uma galactana- α -(1 $\rightarrow$ 6) com substituição em O-2 por resíduos α -L-fucopiranosídicos e α -D-manopiranosídicos, sendo que algumas unidades de galactose são naturalmente metiladas em OH-3.

Os testes de viabilidade celular mostraram que tanto a β -glucana como a fucomanogalactana foram citotóxicas para células de câncer de cólon humano (HT-29, HCT-116), apresentando melhores resultados quando administrado as doses de 50 e 100 μ g/mL de polissacarídeo. Esses resultados comprovam que a parede celular dos basidiomicetos são matérias primas promissoras para a busca por moléculas potencialmente ativas. Além disso, mostram que apesar de fitopatógeno, o *Rhizoctonia solani* é um micro-organismo que possui em sua estrutura compostos benéficos que podem ser explorados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. FEMMS Microbiology Letters, v. 230, p. 47-52, 2004.
- AXBERG, K.; BJÖRNDAL, H.; PILOTTI, A.; SVENSSON, S. Massa spectra of partially methylated alditol acetates. Part IV. Deuterium labelling experiments on some higher fragments. Acta Chemica Scandinavica, v. 26, p. 1319-1325, 1972 apud JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chemical Communications, n. 8, p. 1-73, 1976.
- BARBOSA, A. M.; DA CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 25, p. 29-42, 2004.
- BHANJA, S. K.; NANDAN, C. K.; MANDAL, S.; BHUNIA, B.; MAITI, T. K.; MONDAL, S.; ISLAM, S. S. Isolation and characterization of the immunostimulant β -glucans of an edible mushroom *Termitomyces robustus* var. Carbohydrate Research, v. 357, p. 83-89, 2012.
- BHUNIA, S. K.; DEY, B.; MAITY, K. K.; PATRA, S.; MANDAL, S.; MAITI, S.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. Isolation and characterization of an immunoenhancing glucan from alkaline extract of an edible mushroom, *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. Carbohydrate Research, v. 346, p. 2039-2044, 2011.
- BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S. Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. Carbohydrate Research, v. 5, n. 4, p. 433-440, 1967 apud JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chemical Communications, n. 8, p. 1-73, 1976.
- BOTELHO, S. A.; RAVA, C. A.; LEANDRO, M. W.; COSTA, J. L. S. Supressividade natural de solos da região centro-oeste a *Rhizoctonia solani* Kühn. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2001.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays, v. 28, p. 799-808, 2006.
- BOYER, R. F. Modern experimental biochemistry. 2 ed. Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1993. 555 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BREWER, M. T.; LARKIN, R. P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection, v. 24, p. 939-950, 2005.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. Ciências dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006. 280 p.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Letters in Applied Microbiology, v. 39, p. 425-430, 2004.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. Food Chemistry, v. 111, p. 531-537, 2008.

CHAMBERS, J. A. A.; RICKWOOD, D. Biochemistry labfax. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1993. 361 p.

CIUCANU, J.; KEREK, F. A. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydrate Research, v. 13, p. 209-217, 1984.

CORRADI DA SILVA, M. L.; GORIN, P. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from *Parmotrema cetratum*. Phytochemistry, v. 34, p. 715-717, 1993 apud FUKUDA, E. K. Extração, purificação e caracterização de polissacarídeos da biomassa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

CORRADI DA SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Carbohydrate Research, v. 343, p. 793-798, 2008.

CORRADI DA SILVA, M. L.; ESPOSTI, D. T. D. VASCONCELOS, A. F. D.; ALEXANDRE, S. M. A.; SILVEIRA, J. L. M.; DUCATTI, D. R. B. Glucogalactan: A polysaccharide isolated from the cell-wall of *Verticillium Lecanii*. Carbohydrate Polymers, v. 98, p. 1353-1369, 2013.

CORRÊA, J. B. C. Métodos químicos para a determinação da estrutura de polissacarídeos. Monografia Didática. Curitiba, 1971. 62 p.

CUI, S. W. Structural analysis of polysaccharides. In CUI, S. W. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. United States of America: Taylor & Francis Group, 2005. p. 105-160.

DIMITRIU, S. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. New York: Marcel Dekker, 2005. 1204 p.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X. T.; FANG, J. N. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. Carbohydrate Research, v. 337, p. 1417-1421, 2002.

DRUMMOND, A. D.; BROWN, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. Current Opinion in Microbiology, v. 14, p. 392-399, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EDWARD, J.T. Stability of glycosides to acid hydrolysis. *Chemistry and Industry*, v. 36, p. 1102-1104, 1955 apud CORRÊA, J. B. C. Métodos químicos para a determinação da estrutura de polissacarídeos. Monografia Didática. Curitiba, 1971. 62 p.

FAN, L.; DING, S.; AI, L.; DENG, K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 870-874, 2012.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FREE, S. J. Chapter Two – Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics*, v. 81, p. 33-82, 2013.

FUKUDA, E. K. Extração, purificação e caracterização de polissacarídeos da biomassa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização, *Semina: Ciências Agrárias*, v. 30, p. 117-134, 2009.

GHOSH, S. M. Isolation of polysaccharides and terpenoids from some basidiomycota and their antibacterial activities. *British Microbiology Research Journal*, v. 4, n. 2, p. 155-166, 2014.

GOODAY, G. W. Part two the architecture of fungal cells: Introduction. In GOW, N. A. R.; GADD, G. M. *The Growing fungus*. London: Chapman & Hall, 1995. p. 41-62.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological Reviews*, v. 230, p. 38-50, 2009.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, v. 169, p. 59-65, 2014.

GOULART, A. C. P. Fungos no algodão. *Cultivar Grandes Culturas*, n. 33, p. 23-26, 2001.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, n. 4, p. 399-402, 2002.

GOULART, A. C. P.; DE ASSIS, J. B.; CIAMPI, M. B.; CERESINI, P. C. Ocorrência de mela causada por *Rhizoctonia solani* AG4-HGI em plântulas de algodoeira no Brasil. *Summa Phytopathol*, v. 37, n. 1, p. 68-69, 2011.

GUERRA DORE, C. M. P. G.; AZEVEDO, T. C. G.; DE SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A.; DE DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 1160-1169, 2007.

GUIMARÃES, L. B. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, p. 94-99, 2009.

HAN, X. Q.; WU, X. M.; CHAI, X. Y.; CHEN, D.; DAI, H.; DONG, H. L.; MA, Z. Z.; GAO, X. M.; TU, P. F. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sacordodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Food Research International*, v. 44, p. 489-493, 2011.

HEYL, K. A.; KLASSER, T. E.; HEINRICH, A.; MÜLLER, M. M.; KLAILE, E.; DIENEMANN, H.; GRÜNEWALD, C.; BALS, R.; SINGER, B. B.; SLEVOGT, H. Dectin-1 is expressed in human lung and mediates the proinflammatory immune response to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *mBio*, v. 5, n. 5, p. 1-9, 2014.

HUANG, X.; ZHANG, N.; YONG, X.; YANG, X.; SHEN, Q. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, v. 167, p. 135-143, 2012.

INCA. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro: INCA, 2014, 124p.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical Communications*, n. 8, p. 1-73, 1976.

JEFF, I. B.; LI, S.; PENG, X.; KASSIM, R. M. R.; LIU, B.; ZHOU, Y. Purification, structural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, v. 84, p. 338-346, 2013.

KOMURA, D.L.; CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; SANTOS, A.R.S.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Bioresource Technology*, v. 101, p.6192-6199, 2010.

KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* var. *florida* mycelial biomass. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 70, p. 354-359, 2014.

LATGÉ, J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, v. 66. P.279-290, 2007.

LEE, S. H.; HWANG, H. S.; YUN, J. W. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytoterapy Research*, v. 23, p. 1784-1789, 2009.

LEE, D. H.; KIM, H. W. Innate immunity induced by fungal β -glucans via Dectin-1 signaling pathway. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2014.

LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the basidiomycetes class. *Wspolczesna Onkol*, v. 16, n. 4, p. 285-289, 2012.

LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. *Methods in enzymology*, v. 28, p.178-195, 1972.

LI, Y.; NISHIURA, H.; TOKITA, K.; KOUJKE, Y.; TANIGUCHI, C.; IWAHARA, M.; NISHINO, N.; HAMA, Y.; ASAKAWA, M.; YAMAMOTO, T. Elastin peptide receptor-directed monocyte chemotactic polysaccharides derived from seaweed sporophyll and from infectious fungus. *Microbial Pathogenesis*, v. 45, p. 423-434, 2008.

LI, Y. G.; JI, D. F.; ZHONG, S.; ZHU, J. X.; CHEN, S.; HU, G. Y. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/AkT signaling pathway in colorectal carcinoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, p. 511-517, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, J.; TANG, Q.; YANG, Y.; GUO, Q.; WANG, Q.; WU, D.; CUI, S. W. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 968-974, 2014a.

LIU, Y.; LIU, Y.; JIANG, H.; XU, L.; CHENG, Y.; WANG, P. G.; WANG, F. Preparation, antiangiogenic and antitumoral activities of the chemically sulfated glucan from *Phellinus ribis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 106, p. 42-48, 2014b.

LOBO JUNIOR, M. Cultivo do feijão irrigado na região noroeste de Minas Gerais. Embrapa Arroz e Feijão, Sistemas de Produção, n. 5, 2005. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/doencas.htm>>. Acesso em: 24 junho 2014.

LUCAS, E. H.; MONTESANO, R.; PEPPER, M. S.; HAFNER, M.; SABLON, E. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiotic Chemotherapy*, v. 7, p. 1-4, 1957 apud WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, v. 19, p. 65-96, 1999.

LUCAS, E. H.; BYERRUM, R. U.; CLARKE, D. A.; REILLY, H. C.; STEVENS, J. A.; STOCK, C. C. Production of oncostatic principles in vivo and in vitro by species of the genus *Calvatia*. *Antibiotics Annual*, v. 6, p. 493-496, 1959 apud LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Wspolczesna Onkol*, v. 16, n. 4, p. 285-289, 2012.

LUCAS, E. H.; BYERRUM, R. U.; CLARKE, D. A.; REILLY, H. C.; STEVENS, J. A.; STOCK, C. C. Production of oncostatic principles in vivo and in vitro by species of the genus *Calvatia*. *Antibiotics Annual*, v. 6, p. 493-496, 1959 apud WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, v. 19, p. 65-96, 1999.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, São Paulo, n. 77, 2008. Disponível em: < www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77>. Acesso em: 24 junho 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. Tradução: Andrea Queiroz Maranhão, Beatriz Dolabela de Lima, Cynthia Maria Kyaw. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MAITY, P.; SAMANTA, S.; NANDI, A. K.; SEN, I. K.; PALOI, S.; ACHARYA, K.; ISLAM, S. S. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble β -D-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 63, p. 140-149, 2014.

MANDAL, E. K.; MAITY, K.; MAITY, S.; GANTAIT, S. K.; BEHERA, B.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. Chemical analysis of an immunostimulating (1 $\rightarrow$ 4)-, (1 $\rightarrow$ 6)-branched glucan from an edible mushroom, *Calocybe indica*. Carbohydrate Research, v. 347, p. 172-177, 2012.

MENDES, S.F.; SANTOS JR, O.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOS, A.F.D.; ARANDA-SILVÉRIO, G.; MONTEIRO, N.K; DEKKER, R.F.H.; PEREIRA, M.S.; TOVAR, A.M.; MOURÃO, P.A.S.; CORRADI DA SILVA, M.L. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. International Journal of Biological Macromolecules, v. 45, p. 305-309, 2009.

MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigation. Carbohydrate Research, v. 339, p. 1135-1140, 2004.

MONTEIRO, N. K. Caracterização estrutural de polissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.

OGOSHI, A. Introduction: The Genus *Rhizoctonia*. In SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. M.; DIJST, G. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996, p. 1-9.

PALACIOS, I.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. Carbohydrate Research, v. 358, p. 72-77, 2012.

PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. Carbohydrate analysis: a practical approach. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1994. p. 73-124.

PLATO, A.; HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. Seminars Immunopathology, v. 37, n. 2, p. 97-106, 2014.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e Aplicações. Tradução de Sueli Fumie Yamada, Tania Ueda Nakamura, Benedito Pardo Dias Filho. Revisão de Celso Vataru Nakamura. v. 1, 2 ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. p. 524.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Fungal cell wall analysis. In GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology. Londres: Springer, 2013. p. 175-196.

PRAMANIK, M.; CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ISLAM, S. S. Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. Carbohydrate Research, v. 342, p. 2670-2675, 2007.

REIS, R. A.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked β-glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. FEMS Microbiology Letters, v. 210, p. 1-5, 2002.

REIS, F. S.; BARREIRA, J. C. M.; CALHELHA, R. C.; VAN GRIENSVEN, L. J. I. D.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; SOKOVIC, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical characterization of the medicinal mushroom *Phellinus linteus* (Bekerley & Curtis) Teng and contribution of different fractions to its bioactivity. LWT- Food Science and Technology, v. 58, p. 478-485, 2014.

REN, L.; HEMAR, Y.; PERERA, C. O.; LEWIS, G.; KRISSANSEN, G. W.; BUCHANAN, P. K. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, v. 3, p. 41-51, 2014.

ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; CLAUDINO, R.F.; TISCHER, C.A.; KEMMELMEIER, C.; IACOMINI, M. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. FEMS Microbiology Letters, v. 221, p. 119- 124, 2003.

RUTHES, A. C.; RATTMANN, Y. D.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. Carbohydrate Polymers, v. 87, p. 1620-1627, 2012.

RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; BAGGIO, C. H.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SANTOS, A. R. S.; IACOMINI, M. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. Carbohydrate Polymers, v. 98, p. 761-769, 2013a.

RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J. IACOMINI, M. *Lactarius rufus* (1→3), (1→6)-β-D-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. Carbohydrate Polymers, v. 94, p. 129-136, 2013b.

SAMANTA, S.; MAITY K.; NANDI, A.K.; SEN, I. K.; DEVI, K. S. P.; MUKHERJEE, S.; MAITI, T. K.; ACHARY, K.; ISLAM, S. S. A glucan from an ectomycorrhizal edible mushroom *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc.: isolation, characterization, and biological studies. Carbohydrate Research, v. 367, p. 33-40, 2013.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R. SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3), (1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonaris*. European Journal of Pharmacology, v. 597, p. 86-91, 2008.

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z. IACOMINI, M.; WICHES, H. J.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. Carbohydrates Polymers, v. 94, p. 91-99, 2013.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources and their partial structural features. Journal of Basic Microbiology, v. 44, p. 480-486, 2004.

SUN, Y.; SUN, T.; WANG, F.; ZHANG, J.; LI, C.; CHEN, X.; LI, Q.; SUN, S. A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects. Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 577-582, 2013.

SYNYTSYA, A.; MÍCKOVÁ, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPEVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘÍKOVÁ, E.; COPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers, v. 76, p. 548-556, 2009.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 792-809, 2013.

TAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, L. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 45, p. 109-115, 2009.

TERÇARIOLI, G. R.; PALEARI, L. M.; BAGAGLI, E. O incrível mundo dos fungos. São Paulo: Unesp, 2010. 125 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Tradução de Aristóboles Mendes da Silva. Supervisão de Flávio Guimarães da Fonseca. v. 1, 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VAN DEN BERG, L. M.; ZIJLSTRA-WILLEMS, E. M.; RICHTERTS, C. D.; ULRICH, M. M. W.; GEIJTENBEEK, T. B. H. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelialization. Cellular Immunology, v. 289, p. 49-54, 2014.

VOGEL, H. J. A. A conveniente growth medium for *Neurospora crassa*. Genetic Bulletin, v. 13, p. 42-47, 1956.

WANG, Y.; ZHANG, L.; LI, Y.; HOU, X.; ZENG, F. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a β -glucan from *Poria cocos* sclerotium. Carbohydrate Research, v. 339, p. 2567-2574, 2004.

- WANG, Y.; SHEN, X.; LIAO, W.; FANG, J.; CHEN, X.; DONG, Q.; DING, K. A heteropolysaccharide, L-fuco-D-manno-1,6- α -D-galactan extracted from *Grifola frondosa* and antiangiogenic activity of its sulfated derivate. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 631-641, 2014a.
- WANG, K. P.; WANG, J.; LI, Q.; ZHANG, Q. L.; YOU, R. X.; CHENG, Y.; LUO, L.; ZHANG, Y. Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Food Research International*, v. 62, p. 223-232, 2014b.
- WANG, D.; SUN, S. Q.; WU, W. Z.; YANG, S. L.; TAN, J. M. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunodulatory activities on renal câncer in mice. *Carbohydrate Polymers*, v. 105, p. 127-134, 2014c.
- WASANO, K.; HIRAKAWA, Y.; NAKAMURA, K. Immunolocalization of 67 kDa elastin-binding protein in perinatal rat lungs. *Cell and Tissue Research*, v. 268, p. 277-281, 1992.
- WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occuring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, v. 19, p. 65-96, 1999.
- WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 258-274, 2002.
- YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; SHU, T.; BI, Y.; SONG, B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydrate Polymers*, v. 95, p. 615-620, 2013.
- YOU, L.; GAO, Q.; FENG, M.; YANG, B.; REN, J.; GU, L.; CUI, C.; ZHAO, M. Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumor activities. *Food Chemistry*, v. 138, p. 2242-2249, 2013.
- ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 4 ed. Nova Jersey: Prentice Hall, 1999. 663 p.
- ZHANG, A. Q.; ZHANG, J. S.; TANG, Q. J.; JIA, W.; YANG, Y.; LIU, Y. F.; FAN, J. M.; PAN, Y. J. Structural elucidation of a novel fucogalactan that contains 3-O-methyl rhamnose isolated from the fruiting bodies of the fungus, *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 645-649, 2006.
- ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 4-19, 2007.
- ZHANG, A. Q.; FU, L.; XU, M.; SUN, P. L.; ZHANG, J. S. Structure of a water-soluble heteropolysaccharide from fruiting bodies of *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 558-561, 2012.
- ZHANG, A.Q.; XU, M.; FU, L.; SUN, P. L. Structural elucidations of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*. *Carbohydrates Polymers*, v. 92, p. 236-240, 2013.

ZHANG, H.; NIE, S. P.; YIN, J. Y.; WANG, Y. X.; XIE, M. Y. Structural characterization of a heterogalactan purified from fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. Food Hydrocolloids, v. 36, p. 339-347, 2014.

ZHOU, S.; LIU, Y.; YANG, Y.; JIA, W.; TANG, Q.; TANG, C.; FENG, N.; ZHANG, J. Separation and structural elucidation of a polysaccharide CC30w-1 from the fruiting body of *Coprinus comatus*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, v. 1, p. 99-104, 2013.