

**RAFAEL DIAS**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO LENTINAN DE COGUMELOS  
SHIITAKE CULTIVADOS EM SANTA CATARINA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA

ORIENTADOR: Prof. Dr. CÉSAR ZUCCO

**FLORIANÓPOLIS – SC – BRASIL**

**2005**

Rafael Dias

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO LENTINAN DE COGUMELOS SHIITAKE  
CULTIVADOS EM SANTA CATARINA**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de  
**Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 15 de Setembro de 2005.

---

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. César Zucco  
Orientador

---

Prof. Dr. Adriano Martendal  
(UNISUL)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Uieara

---

Prof. Dr. Hugo Gallardo

**"Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância"**

**Aos meus Pais,**

**José e Nelci**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. César Zucco pela amizade, pela paciência e dedicação com que me acompanhou durante o Mestrado. Pelo apoio incondicional em todos os momentos deste trabalho.

Às professoras Clara Bica e Nadya Silveira e demais colegas do laboratório de instrumentação e dinâmica molecular (LINDIM) da UFRGS pela ajuda e acolhida.

Aos professores Valdir Soldi, Miguel Caro, Dino Zanetti, Alfredo Tiburcio, Edson Minatti e José Gesser pelo apoio ao longo do trabalho.

Aos funcionários da central de análises do departamento de Química da UFSC, pela boa convivência.

Ao Jadir e à Graça, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas Verdi, Cabeludo, Marlon, Gargamel, Alessandro, Gusboy, Cabeça, Jair Miotto, Domingas, Juan, Césinha, Pássaro, Vavá, Sérgio, Aline, Marli, Gilson Batata, por todo apoio.

Aos amigos Fabrício e Adriano pela amizade e pelas muitas horas compartilhadas no laboratório.

Aos amigos Wallace, Pedro e Cristian, companheiros de muitas viagens.

À minha família sempre presente.

À CLAS, Ricardo, Leonardo, por uma vida de amizade.

À Dianne pela dedicação, carinho, amor e paciência desde nosso primeiro encontro.

## RESUMO

O polissacarídeo Lentinan foi isolado a partir do extrato aquoso de cogumelos shiitake cultivados em Santa Catarina. As metodologias de extração foram as desenvolvidas por Chiahara e Yap. O método de Yap mostrou-se mais eficiente, pois foram obtidos maiores rendimento e pureza. A amostra, de cor branca, apresenta-se volumosa, é solúvel em água quente e em DMSO. O produto da hidrólise ácida, analisado por HPLC e TLC, formou exclusivamente a D-Glicose. A espectroscopia de infravermelho mostrou que todas as ligações glicosídicas da cadeia têm configuração  $\beta$ . As análises de RMN  $C^{13}$  demonstraram que para cada cinco moléculas de glicose ligadas em posição 1 $\rightarrow$ 3 na cadeia principal, outras duas estão ligadas em posição 1 $\rightarrow$ 6 como ramificação. A concentração crítica ( $^*C$ ) do Lentinan foi estudada por viscosimetria, onde o valor da  $^*C$  para a concentração 20mM de NaOH foi de 1,1mg/mL. Os resultados de espalhamento de luz revelaram que o Lentinan existe como dupla hélice e como cadeia aleatória em concentrações de NaOH menores que 20mM e maiores que 100mM, respectivamente. Pelas medidas de espalhamento também foi determinado a massa molar média ponderada do polissacarídeo como  $4,46 \times 10^6 \text{g.mol}^{-1}$ .

Palavras-chave: Lentinan;  $\beta$ -D-glucana; shiitake.

## ABSTRACT

The polysaccharide Lentinan was isolated from the water extract of shiitake mushrooms cultivated in Santa Catarina. The extraction methods applied were developed by Chihara and YAP. Yap's method was shown to be more efficient, since it gave a higher yield and no impurities. The main characteristics of the sample were that it was white, voluminous and soluble in hot water and DMSO. The product of acid hydrolysis was analyzed by HPLC and TLC, and only D-glucose molecules were found to be present. Infrared spectroscopy showed that all glucosidic linkages of the chain have a  $\beta$  configuration. The  $^{13}\text{C}$  NMR analysis demonstrated that for every five glucose molecules bound in position 1 $\rightarrow$ 3 in the main chain, two molecules are bound in position 1 $\rightarrow$ 6 as branching. The critical concentration ( $^*C$ ) of Lentinan was studied by viscosimetry, and the  $^*C$  value for a 20mM NaOH concentration was 1.1 mg/mL. The light scattering results revealed that Lentinan is present as a double helix and as a random chain at NaOH concentrations below 20 mM and above 100 mM, respectively. The scattering measurements also allowed the determination of the molar mass weighted mean for the polysaccharide ( $4.46 \times 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Keywords: Lentinan;  $\beta$ -D-glucan; shiitake.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cogumelos shiitake_____	19
<b>Figura 2.</b> Estrutura da eritadenina, composto com atividade redutora do colesterol_____	22
<b>Figura 3.</b> Estrutura da D-glicose, cadeia aberta, $\alpha$ - e $\beta$ -D-glucopiranoses, cadeias fechadas, e do dímero com ligação glicosídica em posição 1 $\rightarrow$ 3_____	24
<b>Figura 4.</b> Estrutura do Lentinan_____	31
<b>Figura 5.</b> Produtos comerciais contendo Lentinan, no Japão_____	32
<b>Figura 6.</b> Representação de um gráfico de Zimm_____	39
<b>Figura 7.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de uma $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana sintetizada <i>in vitro</i> , 75,5 MHz, 295K, em DMSO-d6 _____	40
<b>Figura 8.</b> Fluxograma da metodologia de Yap_____	44
<b>Figura 9.</b> Fluxograma da metodologia de Chihara_____	46
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra obtida pelo método de Chihara_____	53
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de hidrólise de um dissacarídeo_____	55
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Lentinan_____	58
<b>Figura13.</b> Espectro de Infravermelho do Lentinan_____	59
<b>Figura 14.</b> Gráfico da viscosidade relativa vs. taxa de cisalhamento para os sistemas Lentinan/NaOH_____	62

<b>Figura 15.</b> Gráfico da viscosidade relativa vs. concentração de NaOH, em soluções contendo 1,0 mg por mL de Lentinan_____	63
<b>Figura 16.</b> Gráfico da viscosidade reduzida vs. concentração de Lentinan em solução 20mM de NaOH_____	64
<b>Figura 17.</b> Gráfico de Zimm da amostra de Lentinan em 20mM de NaOH_____	65
<b>Figura 18.</b> Dependência da $M_w$ com a concentração de NaOH_____	67
<b>Figura 19.</b> Dependência de $A_2$ com a concentração de NaOH_____	68
<b>Figura 20.</b> Dependência do $R_g$ com a concentração de NaOH_____	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção mundial de cogumelos comestíveis cultivados, em 1986 e em 1997_____	17
<b>Tabela 2.</b> Composição do shiitake por 100g do cogumelo fresco_____	18
<b>Tabela 3.</b> Produção estimada <sup>2</sup> de shiitake em alguns países, em 1997_____	20
<b>Tabela 4.</b> Glucanas e respectivas espécies de origem <sup>20</sup> _____	26
<b>Tabela 5.</b> $\beta$ -Glucanas exploradas comercialmente no Japão_____	28
<b>Tabela 6.</b> Comparação dos resultados obtidos para as metodologias de extração de Yap e Chihara para 100g do cogumelo fresco_____	52
<b>Tabela 7.</b> Deslocamento químico dos sinais de RMN de <sup>13</sup> C de D-Glucanas lineares_____	56
<b>Tabela 8.</b> Principais bandas de absorção no Infravermelho observadas para D-Glucanas_____	60
<b>Tabela 9.</b> $R_g$ , $M_w$ , $A_2$ obtidos por espalhamento de luz estático para soluções de Lentinan 20, 60, 100 e 500mM de NaOH_____	65

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
$A_2$	Segundo coeficiente virial
AZT	3'-azido-3'-deoxitimidina
CTA-OH	Hidróxido de cetiltrimetilamônio
CCD	Cromatografia de camada delgada
DP	Grau de polimerização
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
dn/dc	Incremento do índice de refração
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
K	Constante de contraste ótico
$\bar{M}_w$	Massa molecular ponderal média
$R_g$	Raio de giro
$R_\theta$	Razão de Rayleigh
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono
Rf	Fator de retenção
SLS	Espalhamento de luz estático
TFA	Ácido trifluoroacético
ton	Tonelada

$\eta$	Viscosidade
$\tau$	Tensão de cisalhamento
$\gamma$	Taxa de cisalhamento
$\eta_r$	Viscosidade relativa
$\eta_{\text{esp}}$	Viscosidade específica
$\eta_{\text{red}}$	Viscosidade reduzida
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução _____	15
1.1 Cogumelos _____	15
1.2 Produção _____	16
1.3 Composição _____	17
1.4 Shiitake _____	19
1.5 Polissacarídeos _____	22
1.5.1 Nomenclatura _____	23
1.5.2 Beta Glucanas _____	26
1.5.3 Correlação Estrutura e Atividade Antitumor dos Polissacarídeos de Cogumelos _____	29
1.6 Lentinan _____	30
1.6.1 Atividade do Lentinan _____	32
1.7 Técnicas de Extração e Análise Estrutural _____	34
1.7.1 Extração _____	34
1.7.2 Caracterização Estrutural _____	35
1.7.2.1 Viscosidade _____	36
1.7.2.2 Espalhamento de Luz _____	37
1.7.3 Extração _____	34

1.7.4	Extração	34
1.7.5	Caracterização Estrutural	35
1.7.5.1	Viscosidade	36
1.7.5.2	Espalhamento de Luz	37
1.7.5.3	Espalhamento de Luz Estático	38
1.7.5.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
2.	Justificativas	41
3.	Objetivos	42
4.	Parte Experimental	43
5.	Resultados e Discussão	51
5.1	Extração	51
5.2	Hidrólise Total	54
5.3	RMN <sup>13</sup> C	55
5.4	Infravermelho	58
5.5	Viscosidade	61
5.6	Espalhamento de Luz Estático	64
6.	Conclusões	71
7.	Bibliografia	72

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 COGUMELOS

O consumo e a comercialização de cogumelos, como especiaria, são parte da história de várias civilizações em todo o mundo e do desenvolvimento da sociedade mercantilista.

Tanto no Oriente quanto na Europa, os fungos eram utilizados, na Antigüidade, como alimento de alto valor nutritivo e terapêutico. Segundo várias fontes, cultivos racionais com finalidade comercial são relatados a partir do século VI, quando a primeira espécie cultivada foi a *Auricularia auricula*. Cerca de 200 a 300 anos mais tarde, a espécie *Flamulina velutipes* (enokitake) começou a ser explorada. A terceira espécie a ser cultivada foi o shiitake (*Lentinula edodes*), por volta do ano 1100, na China.<sup>1</sup>

A literatura especializada cita aproximadamente duas mil espécies de cogumelos potencialmente comestíveis, porém apenas 25 delas são normalmente utilizadas na alimentação humana, e um número ainda menor tem sido comercialmente cultivado.<sup>1</sup>

Um primeiro esclarecimento muito importante é diferenciar cogumelo e fungo. O primeiro é parte do segundo e é característico de apenas algumas espécies de fungos. Trata-se de uma estrutura de reprodução, que produz os esporos, pequenos grãos que se desenvolvem e perpetuam a espécie.

Os cogumelos comestíveis, apreciados em muitas dietas européias e orientais, vêm crescendo em importância nos últimos anos, já que o seu cultivo possibilita reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agro-industriais. Sob o ponto de vista

nutricional, considerando o elevado conteúdo protéico dos cogumelos comestíveis, seu cultivo tem sido apontado como uma alternativa para incrementar a oferta de proteínas às populações de países em desenvolvimento e com alto índice de desnutrição. A cultura é considerada uma atividade de meio ambiente protegido e tem mostrado um notável incremento em diversos países.<sup>2</sup>

No mercado, distinguem-se claramente dois nichos: o do Champignon (*white botton*) – *Agaricus bisporus* –, a espécie mais explorada e comercializada no mundo; e o dos exóticos ou de especialidade, que engloba espécies como *Auricularia spp.*, *Flamulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp.*, *Pholiota nameko*, *Tremella fuciformis* e *Volvariella spp.*, cujo volume de produção e comercialização está em escala muito inferior ao do primeiro.<sup>3</sup>

## 1.2 PRODUÇÃO

A produção comercial de cogumelos no mundo aumentou mais de 2.000% nas últimas décadas, passando de 350.000 toneladas, em 1965, para aproximadamente 7,5 milhões de toneladas em 2000. A maior parte deste aumento ocorreu nos últimos 15 anos. A maior produção é da espécie *Agaricus bisporus* (champignon), cuja produção, no ano de 1979, equivalia a 70% da produção mundial; atualmente corresponde a 32% (Tabela 1).<sup>2, 3</sup>

Tabela 1. Produção mundial de cogumelos comestíveis cultivados, em 1986 e em 1997.

Espécie	Cogumelo fresco (x10 <sup>-3</sup> ton)				Aumento
	1986		1997		%
<i>Agaricus bisporus</i>	1.227	(56,2%)	1.956	(31,8%)	59,4
<i>Lentinula edodes</i>	314	(14,4%)	1.564	(25,4%)	398,1
<i>Pleurotus spp.</i>	169	(7,7%)	876	(14,2%)	418,3
<i>Auricularia spp.</i>	119	(5,5%)	485	(7,9%)	307,6
<i>Volvariella volvacea</i>	178	(8,2%)	181	(3,0%)	1,7
<i>Flammulina velutipes</i>	100	(4,6%)	285	(4,6%)	130,0
<i>Tremella fuciformis</i>	40	(1,8%)	130	(2,1%)	225,0
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	--	--	74	(1,2%)	--
<i>Pholiota nameko</i>	25	(1,1%)	56	(0,9%)	124,0
<i>Grifola frondosa</i>	--	--	33	(0,5%)	--
Outros	10	(0,5%)	518	(8,4%)	5.080,0
Total	2.182	(100,0%)	6.158	(100,0%)	182,2

### 1.3 COMPOSIÇÃO

Cogumelos têm sido classificados como alimentos altamente nutritivos e saborosos. <sup>4</sup> São considerados excelente fonte de proteínas digeríveis cujo conteúdo é acima da maioria dos vegetais, e pouco menor que a maioria das carnes e leite (Tabela 2).

Tabela 2. Composição do shiitake por 100g do cogumelo fresco.

Descrição	Quantidade
Calorias	55kcal
Proteínas	1,55g
Carboidratos	14,3g
Acido pantotênico	3,5mg
Vitamina C	0,3mg
Cálcio	3mg
Gordura	0,219g
Fibras	4g
Cobre	0,897mg
Ferro	0,44mg
Niacina	1,5mg
Magnésio	14mg
Fósforo	29mg
Vitamina B6	0,158mg
Folacina	20,6mg

O teor de proteína pode variar de 10-40% do peso seco. Cogumelos contêm os aminoácidos essenciais, cistina e metionina.<sup>4,5</sup> Cogumelos frescos contêm aproximadamente 3-21% de carboidratos e 3-35% de fibra em relação ao peso seco. Têm um baixo valor calórico, pois boa parte dos carboidratos presentes no cogumelo consiste de fibras dietéticas que não são facilmente digeridas pelo organismo. Contêm

vários minerais, incluindo quantidade considerável de fósforo e potássio, e baixa quantidade de ferro e cálcio. Cogumelos são também excelente fonte de vitaminas, especialmente tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina, biotina e ácido ascórbico (vitamina C). Todas as principais classes de lipídios são encontradas, incluindo-se ácidos graxos livres, mono-, di- e triglicerídeos, esterol e fosfolipídios, porém, os teores são geralmente baixos, cerca de 2-8% do peso seco.<sup>5</sup>

#### 1.4 SHIITAKE



Figura 1. Cogumelos shiitake.

*Lentinula edodes* é um fungo decompositor primário, isto é, decompõe tecidos vegetais intactos que ainda não sofreram prévia decomposição por outros microorganismos. Popularmente conhecido no Brasil como shiitake (Figura 1), também é chamado de *Cogumelo Preto*, *Hua Gu*, *Pyogo*, *Cogumelo Japonês da floresta*, *Siang*

*Gu* (cogumelo perfumado). O seu cultivo foi iniciado na China há aproximadamente 900 anos. <sup>2</sup> Atualmente, existem dois métodos para a cultura de shiitake: o tradicional, em toras de madeira; e o método de produção intensiva. O primeiro origina uma produção mais ou menos sazonal, e o segundo, tendo como base substratos constituídos à base de serragem enriquecida com outros materiais, permite produções ao longo de todo ano. <sup>6,7</sup>

Este cogumelo tem sido consumido no Japão e na China por centenas de anos como alimento e como medicamento. Possui um sabor exótico, sendo ingrediente principal em muitas refeições de países orientais e, mais recentemente, no ocidente. É indiscutivelmente o principal cogumelo universal que pode ser utilizado tanto como alimento nutritivo quanto como um medicamento eficaz.

Tabela 3. Produção estimada de shiitake em alguns países, em 1997. <sup>2</sup>

País	Produção	
	Tonelada ( $\times 10^{-3}$ )	%
China	1.397,0	89.3
Japão	115,3	7.4
Resto da Ásia	47,4	3.0
América do Norte	3,6	0.3
América Latina	0,3	--
União europeia	0,5	--
Resto da Europa	0,3	--
Total	1.564,4	100.0

Segundo dados, em 1997 a China era o maior produtor do cogumelo shiitake e produziu naquele ano, 1,39 milhões de toneladas, ou seja, aproximadamente 89,3% da produção mundial (Tabela 3).<sup>2</sup>

Os cultivos de shiitake no Brasil, na sua maioria, são feitos em pequenas propriedades e de maneira rudimentar, utilizando-se instalações já existentes ou adaptadas. O Estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor nacional, onde muitos descendentes de imigrantes orientais produzem o cogumelo em sistema familiar de pequenas propriedades, trabalhando em mutirão.<sup>3</sup>

A classificação<sup>2</sup> sistemática desse fungo pode ser assim especificada:

Reino: Fungi

Divisão: Eumycota

Sub-divisão: Basidiomycota

Classe: Hymenomycetes

Sub-classe: Holobasidiomycetidae

Ordem: Agaricales

Família: Tricolmataceae

Gênero: *Lentinula*

Espécie: *edodes*

Muitos benefícios à saúde têm sido atribuídos ao cogumelo shiitake e a compostos dele isolados. Por enquanto, os trabalhos estão sendo voltados para descrever as propriedades imunológicas e antitumoral de polissacarídeos de alto peso molecular, porém, esse cogumelo também oferece um grande número de importantes propriedades terapêuticas tais como anti-hipertensiva, antiinflamatória, antidiabética,

antiviral e antimicrobial.<sup>8,9,10</sup> Existem substanciais evidências que o consumo do cogumelo shiitake reduz o colesterol.<sup>11,12</sup> O composto primário no shiitake responsável pelo abaixamento do colesterol é a eritadenina (Figura 2), um metabólito secundário com características estruturais similares às da adenina. Eritadenina diminui o colesterol pela aceleração do seu metabolismo no fígado.<sup>13,14</sup>

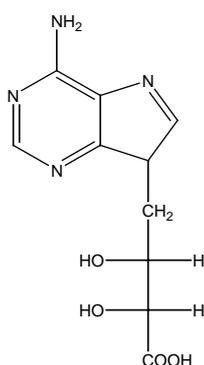


Figura 2. Estrutura da eritadenina, composto com atividade redutora do colesterol.

## 1.5 POLISSACARÍDEOS

Um dos principais grupos de compostos encontrados em cogumelos são os carboidratos de alto peso molecular, denominados polissacarídeos. Têm função estrutural, ou de reserva, ou, ainda, são substâncias de proteção. Apresentam uma alta capacidade para carregar informações biológicas visto que têm um ótimo potencial para variabilidade estrutural. Os aminoácidos, nas proteínas, e os nucleotídeos, nos ácidos nucléicos, podem se ligar somente por um modo, ao contrário das unidades de monossacarídeos, nos polissacarídeos, que podem se ligar em vários pontos para formar uma ampla variedade de estruturas. Como conseqüência, este enorme potencial

de variabilidade na estrutura lhes permite a flexibilidade necessária para o correto mecanismo regulador de várias interações entre células em organismos superiores como no caso dos humanos.<sup>16</sup>

### 1.5.1 NOMENCLATURA

Para poder entender a nomenclatura e a composição dos polissacarídeos, é necessário conhecer as características dos monômeros que, neste caso, são os monossacarídeos. Os principais monossacarídeos encontrados nos polissacarídeos extraídos de cogumelos são a D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e o ácido D-glucurônico. Esses açúcares levam a nomenclatura D quando o grupo hidróxi ligado ao centro de quiralidade de maior numeração for representado à direita pela projeção de Fisher (Figura 3). A estrutura cíclica desse composto é formada pela reação do grupo OH ligado ao carbono C-5 com a carbonila do carbono C-1, para formar um anel de seis átomos denominado de piranose. O novo centro de quiralidade gerado é denominado carbono anomérico (C-1). Os dois estereoisômeros são denominados como anomeros, designados  $\alpha$  e  $\beta$  de acordo com a relação configuracional entre o centro anomérico e um átomo anomérico específico como referência. No caso da glicose, as duas formas resultantes são a  $\alpha$ -D-glicopiranose e a  $\beta$ -D-glicopiranose (Esquema 1).

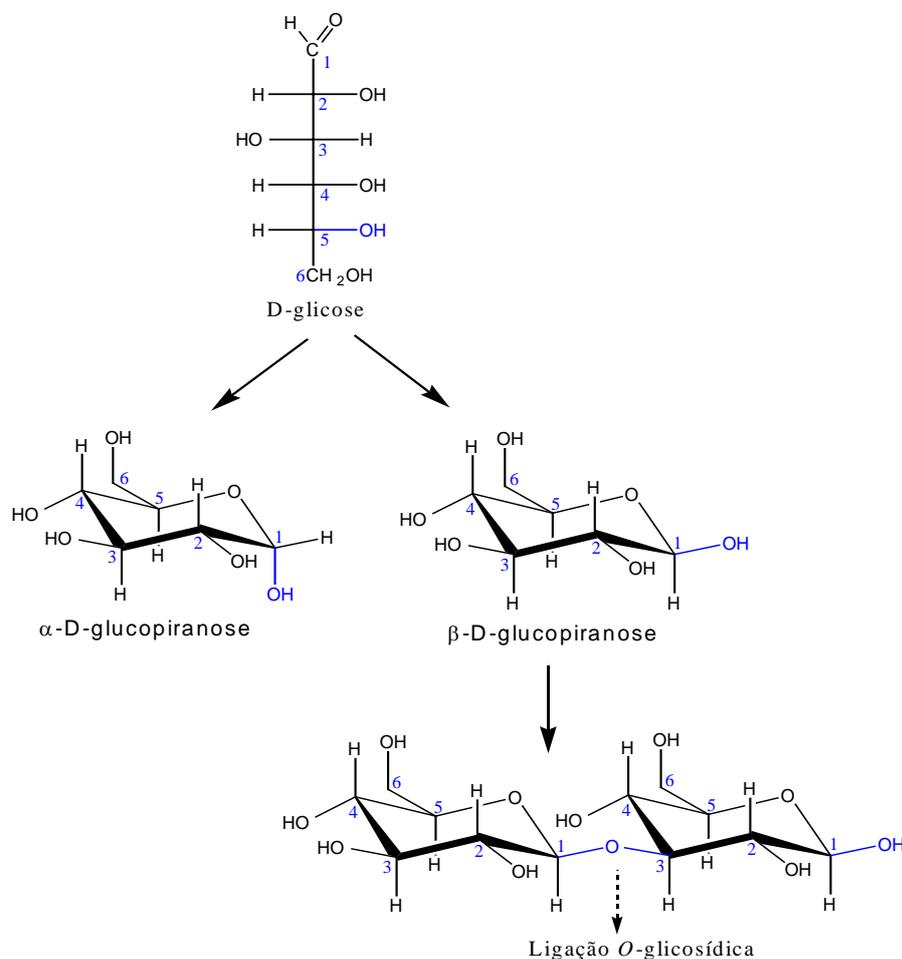


Figura 3. Estrutura da D-glicose, cadeia aberta,  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-glicopiranoses, cadeias fechadas, e do dímero com ligação glicosídica em posição 1 $\rightarrow$ 3.

Esses monômeros cíclicos unem-se por meio de ligações O-glicosídicas. Essas ligações podem ser do tipo 1 $\rightarrow$ 3, quando o carbono 1 (C1) de um monômero liga-se ao carbono 3 (C3) do monômero seguinte; 1 $\rightarrow$ 4, quando o C1 de um monômero liga-se ao C4 do outro; e 1 $\rightarrow$ 6, quando o C1 de um monômero liga-se ao C6 do monômero seguinte. Na maior parte das vezes, observa-se uma cadeia principal com ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), ou misturadas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais (ramificações)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6).

Os polissacarídeos podem consistir em pequeno ou em grande número de unidades de monossacarídeos, e sua estrutura pode ser linear, ramificada ou, ocasionalmente, cíclica. Podem ser classificados como homopolissacarídeos, formados por um único tipo de monossacarídeo. As glucanas, por exemplo, contêm exclusivamente moléculas de D-glucopiranosose. Alternativamente, podem ser heteropolissacarídeos, contendo dois ou mais açúcares na cadeia. Outra espécie importante são os polissacarídeos-peptídeos ou glicoproteínas, que são cadeias de polipeptídeos ou pequenas proteínas, às quais ligam-se estavelmente cadeias de  $\beta$ -D-glucanas. Adicionalmente, vários substituintes como grupos acil, aminoácidos, ou resíduos inorgânicos podem ser adicionados<sup>17</sup>.

Em solução, apresentam diferentes conformações da cadeia, podendo variar de simples-hélice, dupla-hélice, tripla-hélice, aleatória e agregados<sup>18,19</sup>.

Existe uma grande variedade de polissacarídeos extraídos de cogumelos; alguns exemplos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Glucanas e respectivas espécies de origem<sup>20</sup>.

Glucanas	Espécie
$\alpha$ -(1→4)-; $\beta$ -(1→6)-Glucana	<i>Agaricus brasiliensis (blazei)</i>
$\beta$ -(1→6)-; $\beta$ -(1→3)-Glucana	<i>Grifola frondosa</i>
Galactoxiloglucana	<i>Hericium erinaceus</i>
Manogalactoglucana	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
Galactomanoglucana	<i>Flammulina velutipes</i>
$\alpha$ -(1→3)-Glucana	<i>Amanita muscaria</i>
Xiloglucana	<i>Polyporus confluens</i>

### 1.5.2 BETA GLUCANAS

Uma  $\beta$ -D-glucana básica é composta por uma estrutura repetida, com moléculas de D-glicose ligadas em uma cadeia linear por ligações glicosídicas beta ( $\beta$ ). Esses polissacarídeos são sintetizados (biossíntese) por plantas, fungos, algumas algas e bactérias, principalmente, como material estrutural e de armazenagem. O nome  $\beta$ -D-glucana é de fato um nome genérico, pois a nomenclatura muda dependendo da posição em que as moléculas de glicose unem-se ao longo da cadeia. Dependendo da origem, esses polissacarídeos são conhecidos por nomes comuns, como, Curdlan,<sup>21</sup> Paramilon,<sup>21</sup> Pachiman,<sup>22</sup> Lentinan, Cotriosphaeran,<sup>23</sup> Laminaram,<sup>21</sup> KS-2.<sup>24</sup> Dentre as

principais  $\beta$ -glucanas, destacam-se o Scleroglucan,<sup>25</sup> Schizophyllan<sup>26</sup> e o Krestin (Tabela 5).<sup>27</sup>

Scleroglucan<sup>25</sup> foi inicialmente relatado por Halleck, que o caracterizou como um polissacarídeo extracelular secretado pelo fungo *Sclerotium glucanicum*. Esse é um homopolissacarídeo neutro de glicose com cadeia principal  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) com uma ramificação  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6), a cada três unidades do açúcar, na cadeia principal. Tem peso molecular que varia de  $5-12 \times 10^6$  Daltons e estrutura de tripla hélice linear, em água.

O schizophyllan,<sup>26</sup> obtido a partir do fungo *Schizophyllum commune*, é de longe a glucana mais estudada. De estrutura idêntica ao scleroglucan, este polissacarídeo foi utilizado como um polímero aditivo na recuperação de óleo, e, atualmente, devido às suas propriedades imunoestimulantes é largamente utilizado pela indústria farmacêutica.

Krestin<sup>27</sup> ou PSK é isolado do fungo *Trametes versicolor* e é constituído de aproximadamente 62% de polissacarídeo e 38% de proteína. A glucana consiste de uma cadeia principal  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) e cadeia lateral  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3), com ramificações  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) que são ligadas aos polipeptídeos através de ligações O-N-glicosídicas. A porção polipeptídica é rica em ácido aspártico e glutâmico, e tem peso molecular entre 94.000 e 100.000 Daltons.

Tabela 5.  $\beta$ -glucanas exploradas comercialmente no Japão.

	Krestin	Lentinan	Schizophyllan
Empresa	Sankyo, Kureha	Ajinomoto, Yamanouchi, Morishita	Taito, Kaken
Data de Comercialização	maio 1977	dezembro 1985	abril 1986
Fungo de origem	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Schizophyllum Commune</i>
Polissacarídeo	$\beta$ -glucana-proteína	$\beta$ -glucana	$\beta$ -glucana
Massa Molecular	100.000	500.000	450.000
Câncer tratado	Câncer do aparelho digestivo e pulmão	Câncer do Estomago	Câncer cervical

Diferentes aproximações para o aperfeiçoamento da atividade antitumoral das  $\beta$ -glucanas por meio de modificação química têm sido descritas na literatura<sup>8</sup>. Os mais satisfatórios esquemas para o aperfeiçoamento químico dos polissacarídeos foram desenvolvidos para os cogumelos *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* e *Leucopaxillus giganteus*. Esses esquemas incluem dois procedimentos principais: modificação dos polissacarídeos por degradação de Smith<sup>28</sup> e ativação por formólise.<sup>8</sup>

Carboximetilação é um outro método químico usado para transformar  $\beta$ -glucanas. Glucanas carboximetiladas do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (pleuran) exibem efeitos imunomodulatórios, especialmente aumentando a atividade fagocítica.<sup>7,8</sup>

Outra modificação importante é a sulfatação de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanas. O Schizophyllan, quando sulfatado, pode ser usado como um agente anti-HIV para o tratamento de hemofílicos infectados com o vírus da AIDS.<sup>1</sup>

### 1.5.3 CORRELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE ANTITUMOR DOS POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS

Polissacarídeos com ação antitumoral diferem consideravelmente em sua composição química e configuração, e também em suas propriedades físicas. Uma ampla classe desses compostos apresenta atividade antitumoral, estendendo-se dos homopolímeros até os altamente complexos heteropolímeros.<sup>15</sup>

Diferenças na atividade podem ser correlacionadas com a solubilidade em água, tamanho das moléculas, taxa de ramificação e conformação. Ainda que seja difícil correlacionar a estrutura com a atividade antitumoral dos polissacarídeos, algumas relações podem ser inferidas.<sup>29</sup>

De acordo com os resultados descritos na literatura, glucanas com cadeia principal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e pontos de ramificação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) apresentam forte ação antitumoral.  $\beta$ -Glucanas contendo principalmente ligações 1 $\rightarrow$ 6 têm menor atividade.<sup>8</sup> Glucanas de

alta massa molar parecem ser mais efetivas do que aquelas de baixa massa molar.<sup>30</sup> Sasaki<sup>31</sup> estudou a atividade antitumoral do Lentinan e de suas frações hidrolisadas na inibição do crescimento de um tumor conhecido como Sarcoma-180. O Lentinan de massa molar  $1.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$  reduziu em 84% o crescimento do tumor, enquanto uma fração de baixa massa molar ( $16.200 \text{ g.mol}^{-1}$ ) reduziu em 58%.

A correlação entre a atividade antitumoral e a estrutura de tripla hélice foi obtida por investigação do Schizophyllan,<sup>32</sup> que foi fundamental para sua atividade imunoestimulante. Quando o Lentinan foi desnaturado com dimetil sulfóxido, uréia ou hidróxido de sódio, a estrutura terciária foi perdida enquanto a estrutura primária não foi afetada; entretanto, as propriedades de inibição tumoral foram perdidas com a progressiva desnaturação.<sup>33,34</sup> Uma série de outras atividades biológicas e imunofarmacológicas descritas para  $\beta$ -(1→3)-D-glucanas são dependentes da conformação de tripla hélice.<sup>8</sup>

## 1.6 LENTINAN

Lentinan, composto extraído da parede celular de cogumelos shiitake, é um polissacarídeo que possui alta massa molar ( $1.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) contendo somente moléculas de D-glucopiranosose com ligações  $\beta$ -(1→3) na cadeia principal, e cadeia lateral com ligações  $\beta$ -(1→6) (Figura 4).<sup>35,36</sup> O Lentinan não possui proteínas ligadas

em sua estrutura, além de ser completamente livre de nitrogênio, fósforo e enxofre.<sup>36</sup>

Lentinan é solúvel em água, estável ao calor, estável frente a ácidos e bases fracas.<sup>36</sup>

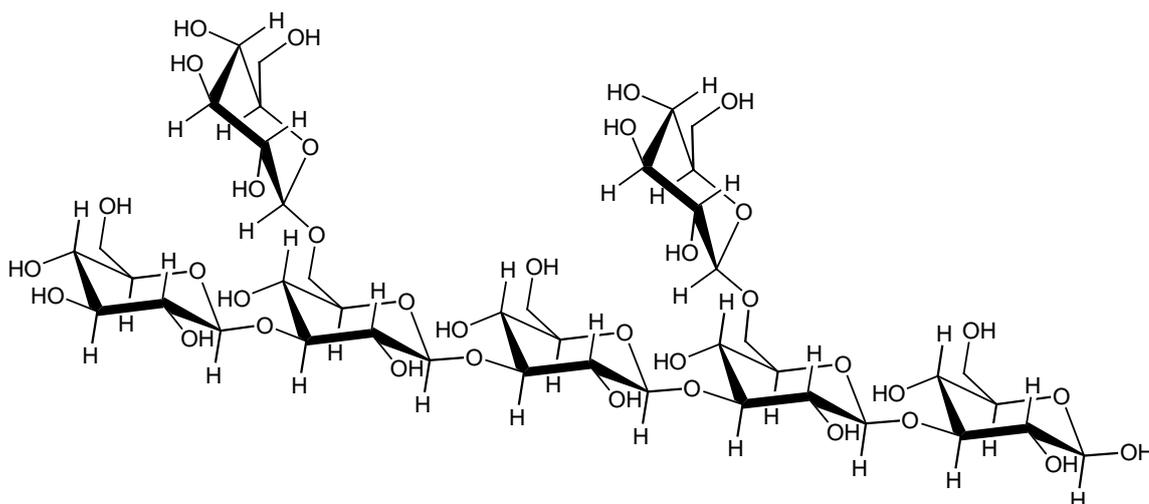


Figura 4. Estrutura do Lentinan.

No Japão, o Lentinan é comercializado pela companhia Ajinomoto, custando cerca de 9.500,00 ienes, o que equivale a 200,00 reais, por um frasco com 1,0mg (Figura 5).

Recente estudo de Zhang e colaboradores confirmou que o Lentinan em solução aquosa encontra-se em uma conformação de tripla hélice, enquanto que em dimetilsulfóxido (DMSO) a conformação é aleatória.<sup>33,37</sup>

A transição de conformação do Lentinan em soluções aquosas de NaOH foi estudada por microscopia de força atômica (AFM), viscosidade, espalhamento de luz e rotação ótica. Os resultados revelaram que o Lentinan existe como uma cadeia de tripla

hélice a concentrações menores que 0,05M e com conformação aleatória em concentrações maiores que 0,08M de NaOH.<sup>38</sup>

Mizuno e colaboradores utilizaram o método ELISA<sup>39</sup> para quantificar o Lentinan em extratos do cogumelo shiitake (Figura 5). A quantidade encontrada foi de 1,5mg por grama do cogumelo fresco.<sup>40</sup>

Recentes estudos demonstraram que a concentração de Lentinan no shiitake diminui com o armazenamento do cogumelo a 20°C por sete dias; contudo, a concentração não decresce quando o cogumelo é armazenado a baixas temperaturas (1-5°C). Este decréscimo na concentração é atribuído à degradação do polissacarídeo pela atividade interna da enzima  $\beta$ -glucanase.<sup>40,41</sup>



Figura 5. Produtos comerciais contendo Lentinan, no Japão.

#### 1.6.1 ATIVIDADE DO LENTINAN

Excelentes resultados têm sido obtidos usando-se o Lentinan no tratamento de hepatite crônica e hepatite B viral. Em adição, o Lentinan mostrou atividade antiviral em

camundongos contra vírus como o VSV (*Vesicular stomatitis virus*), o vírus da encefalite, e estimulou resistência não-específica contra infecções virais respiratórias.<sup>8</sup>

É efetivo contra o vírus da AIDS pela inibição da replicação viral e fusão celular.<sup>42</sup> A azidotimidina (AZT), ou seja, 3'-azido-3'-deoxitimidina, em combinação com o Lentinan, suprimiu a expressão superficial do HIV sobre células-T em maior intensidade do que usada sozinha.<sup>42</sup>

Existe um grande número de artigos relatando os efeitos anticancerígenos do Lentinan em animais e humanos. O primeiro estudo da atividade antitumoral do Lentinan foi realizado por CHIHARA. Ele demonstrou que o Lentinan possui forte atividade contra o tumor Sarcoma 180 em ratos, sendo que, dependendo da dosagem aplicada, pode promover a regressão total do tumor. Além disso, o polissacarídeo não é tóxico.<sup>43</sup>

O Lentinan tem atividade antitumoral indireta sobre células tumorais, ou seja, atua como potenciador do sistema imunológico, estimulando macrófagos, monócitos, e células NK, que possuem citotoxicidade específica em células tumorais, e também contra outros agressores como vírus e bactérias.<sup>39</sup>

O Lentinan também estimulou a atividade de outras células do sistema imunológico, como linfócitos T, T citotóxicas, e linfócitos B, em pacientes com câncer gástrico, imunodeprimidos, que realizavam tratamento quimioterápico.<sup>39</sup>

## 1.7 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL

### 1.7.1 EXTRAÇÃO

Desde que se descobriu, na década de 1960, que o princípio ativo responsável pela atividade antiimunoestimuladora da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma glucana presente na parede celular, muitos processos para o isolamento e purificação de polissacarídeos foram desenvolvidos.<sup>44</sup> A maioria desses processos utiliza água, solução alcalina ou ácida.

Mizuno<sup>8</sup> realizou a extração de polissacarídeos de 13 espécies de cogumelos utilizando água quente, soluções de oxalato de amônia 1% e hidróxido de sódio 5%. A purificação foi feita pela combinação de técnicas, incluindo precipitação fracionada com etanol, precipitação com solução ácida, cromatografia de troca iônica, filtração em gel e cromatografia de afinidade.

Freimund<sup>44</sup> desenvolveu uma metodologia para extração de uma glucana linear, com cadeia principal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* combinando extração com água quente e solventes orgânicos com tratamento enzimático. Além da glucana, obtida com alto teor de pureza, foi obtido também um complexo manoproteína como subproduto.

Existem duas metodologias principais para extração de Lentinan de cogumelos shiitake. Primeiramente, CHIHARA,<sup>36</sup> em 1970, desenvolveu um método a partir da extração com água, por 16h a 100°C, seguida de sucessivas precipitações com etanol, com o surfactante hidróxido de cetiltetrametilamônio (CTA-OH), com ácido acético e,

por fim, desproteinização pelo método de Sevag.<sup>36</sup> Foram obtidos 4mg de Lentinan, com 99,23% de pureza, para cada 100g do cogumelo fresco.

Yap,<sup>45,46</sup> 30 anos depois, desenvolveu uma metodologia muito mais simples, sem o uso de reagentes, baseada na extração com água quente, precipitação com etanol e liofilização da amostra. O rendimento obtido foi de 325mg de Lentinan para cada 100g do cogumelo fresco, sendo que a pureza da amostra foi de 87,65%.

### 1.7.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Para a completa elucidação da estrutura molecular de um polissacarídeo, as principais características estruturais a serem determinadas são: tipo de monossacarídeo, número de resíduos por molécula ou grau de polimerização (DP), posição da ligação glicosídica entre os resíduos, seqüência dos monossacarídeos na cadeia e configuração anomérica da ligação glicosídica.<sup>47,48</sup>

Dentre as técnicas analíticas utilizadas comumente para a caracterização de polissacarídeos destacam-se a ressonância magnética nuclear, a espectrometria de infravermelho, o espalhamento de luz e a viscosidade.

### 1.7.2.1 VISCOSIDADE

A viscosimetria pode fornecer informações importantes a respeito da morfologia da partícula hidrodinâmica, refletindo a contribuição do soluto para a viscosidade do solvente.<sup>49</sup> A simplicidade desta técnica permite sua ampla utilização na caracterização de macromoléculas.

A viscosidade de um fluido é a medida de sua resistência ao escoamento quando uma força de cisalhamento é aplicada. Em um viscosímetro rotacional, a viscosidade  $[\eta]$  é a derivada do gráfico da força de cisalhamento por unidade de área entre dois planos paralelos de líquido em movimento relativo (tensão de cisalhamento,  $\tau$ ) *versus* o gradiente de velocidade  $dv/dx$  (taxa de cisalhamento,  $\gamma$ ) entre os planos,<sup>50</sup> onde:

$$\eta = \frac{d\tau}{d\gamma} = \frac{\mathbf{F} / \mathbf{A}}{d\mathbf{v} / d\mathbf{x}} \quad \text{Pa.s (pascal segundo)} \quad (1)$$

A partir dessas medidas físicas são determinados vários parâmetros:

- Viscosidade relativa ( $\eta_r$ ): parâmetro adimensional

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_{\text{sol}}} \quad (2)$$

- Viscosidade específica ( $\eta_{\text{esp}}$ ): parâmetro adimensional

$$\eta_{\text{esp}} = \eta_r - 1 \quad (3)$$

- Viscosidade reduzida ( $\eta_{\text{red}}$ ): tem como unidade o inverso da concentração

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{esp}}}{\mathbf{C}} \quad (4)$$

A solução de um polímero pode ser dividida em três regimes de concentração. Em um regime diluído, as cadeias do polímero estão separadas e isoladas uma das outras. Com o aumento da concentração, as cadeias começam a se sobrepor e a entrelaçar-se, e, finalmente, são empacotadas em soluções mais concentradas.<sup>50,51</sup> Uma mudança na inclinação do gráfico da viscosidade reduzida pela concentração do polímero ( $\frac{\eta_{esp}}{C}$  vs.  $C$ ), indo de um regime diluído para um regime semidiluído, ocorre em torno da concentração de sobreposição. A concentração de sobreposição ( $C^*$ ), ou concentração crítica, é inversamente proporcional ao efetivo volume ocupado pela macromolécula em solução. Zhang<sup>52</sup> determinou a concentração de sobreposição para a  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana extraída do *Lentinula edodes*. A  $C^*$  encontrada para a amostra L-FV-II em solução aquosa de NaOH 0,5M foi  $1,2 \times 10^{-3} \text{g/cm}^3$ .

#### 1.7.2.2 ESPALHAMENTO DE LUZ

O espalhamento de luz (LS) é um fenômeno que relaciona várias técnicas experimentais e tem sido largamente empregado na análise de inúmeros sistemas nos últimos anos. Em face do seu constante desenvolvimento, o espalhamento de luz se estabeleceu como uma valiosa ferramenta para o estudo da dinâmica e da estrutura de macromoléculas, especialmente em sistemas poliméricos. A técnica permite medir dimensões entre 1 Å e 1 $\mu\text{m}$ , que cobrem uma grande faixa de massa molar (20.000 até vários milhões), além de não necessitar de padrões de calibração.<sup>50</sup>

### 1.7.2.3 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO

Nos experimentos de espalhamento de luz estático (SLS), considera-se apenas a intensidade média da luz espalhada em uma direção, sem levar em conta as flutuações ou distribuições da frequência da luz.<sup>49</sup>

É um dos métodos mais utilizados para a caracterização de polímeros. Conhecendo-se o incremento do índice de refração ( $dn/dc$ ) do sistema polimérico-solvente, o método é capaz de relacionar em um único experimento, por meio da equação de Zimm (equação 5), a massa molar média ponderada ( $\bar{M}_w$ ) e o segundo coeficiente virial ( $A_2$ ), com a intensidade de luz espalhada em diferentes ângulos de espalhamento e em várias concentrações para uma dada amostra.<sup>50,51</sup> Se o raio do polímero apresentar-se maior que  $\lambda/20$ ,  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente, pode-se obter uma medida do tamanho da cadeia polimérica por meio do raio de giro ( $R_g$ ). Esses três parâmetros fundamentais descrevem a cadeia em detalhes; ademais, medidas concomitantes não são possíveis com qualquer outro método de caracterização.

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left[ 1 + \frac{16\Pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \langle R_g^2 \rangle \text{sen}^2 \frac{\theta}{2} \right] + 2 A_2 C \quad (5)$$

Aplica-se o método traçando-se o gráfico de *Zimm*, conforme Figura 6, que é um gráfico de  $KC/R_\theta$  versus  $\text{sen}^2 (\theta / 2) + k \cdot C$ , sendo  $K$  a constante de contraste ótico,  $R_\theta$

a razão de Rayleigh, dada pela relação entre o excesso de luz espalhada e a intensidade da radiação incidente no sistema, e  $k$  uma constante arbitrária utilizada para a separação gráfica das curvas de espalhamento individuais.<sup>53</sup> A intensidade de luz espalhada por uma série de soluções de diferentes concentrações de soluto ( $C$ ) é medida em diferentes ângulos de espalhamento ( $\theta$ ).

A extrapolação das curvas das diferentes concentrações para ângulo zero permite a obtenção de  $\bar{M}_w$  e  $A_2$ , ao passo que a extrapolação das curvas dos diferentes ângulos para concentração zero permite a obtenção de  $\bar{M}_w$  e  $R_g$ .<sup>53,54</sup>

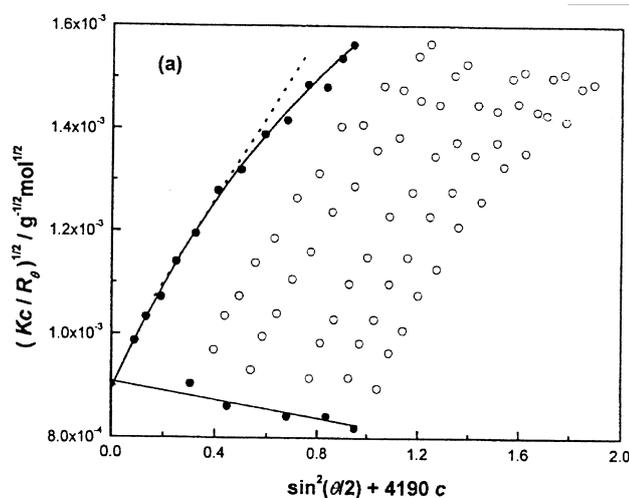


Figura 6. Representação de um gráfico de Zimm.

#### 1.7.2.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de RMN é utilizada como uma técnica não-destrutiva para a determinação da estrutura de polissacarídeos.

A análise de RMN de carbono (RMN- $^{13}\text{C}$ ) não fornece apenas informações sobre a configuração anomérica ou sobre a presença de ramificações na cadeia, mas também fornece informações sobre o monômero da cadeia, sua seqüência, e a conformação completa da molécula.<sup>17,55</sup> A espectroscopia de RMN- $^{13}\text{C}$  também é útil para verificar o grau de pureza das extrações de polissacarídeos.

A caracterização de polissacarídeos por RMN- $^{13}\text{C}$  pode ser exemplificada pela Figura 7, que mostra o espectro característico de uma glucana sintetizada *in vitro*, de cadeia linear com ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). O espectro apresenta os seguintes sinais: 61,0 (C6); 68,5 (C4); 72,9 (C2); 76,4 (C5); 86,3 (C3); e 103,2 (C1).<sup>21,50</sup>

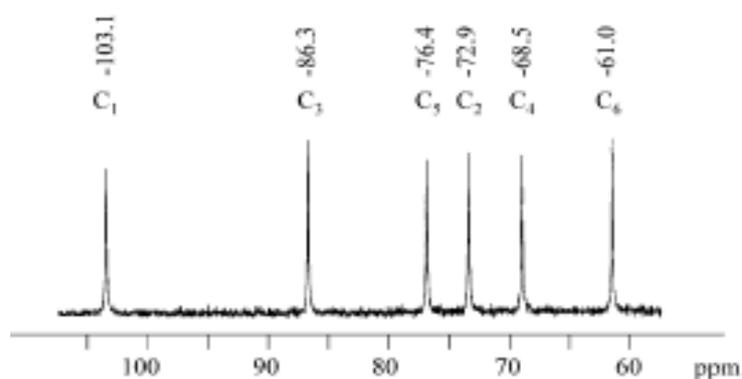


Figura 7. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de uma  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana sintetizada *in vitro*, 75,5 MHz, 295K, em DMSO- $d_6$ .<sup>21</sup>

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H fornece poucas informações estruturais, devido à dificuldade de separação dos sinais de hidrogênio obtidos para moléculas de polissacarídeos.

## **2. JUSTIFICATIVAS**

O plano de trabalho desenvolvido no período de fevereiro de 2003 a agosto de 2005 tratou de uma nova linha de pesquisa implantada no Grupo de Catálise e Mecanismos de Reações Orgânicas do Departamento de Química da UFSC.

Como mostrado acima, os cogumelos shiitake vêm despertando interesse comercial também no mercado brasileiro, devido às suas propriedades nutritivas e terapêuticas. O Lentinan, princípio ativo desses cogumelos, nunca foi isolado e caracterizado em cogumelos produzidos no Brasil. Sempre que se faz referências às propriedades do shiitake, essas estão baseadas na literatura internacional. Daí a necessidade de se proceder um estudo detalhado qualitativo e quantitativo desse constituinte do shiitake produzido em território nacional, mais especificamente, em Santa Catarina. Além disso, há que se destacar que cogumelos shiitake provenientes de diferentes regiões apresentam diferenças em sua composição, o que justifica a prospecção e a caracterização de seus constituintes mais importantes..

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem por objetivo isolar e caracterizar estruturalmente o polissacarídeo conhecido como “Lentinan” de cogumelos shiitake cultivados em Santa Catarina. Para a caracterização estrutural serão utilizadas técnicas de análise por RMN, IV, espalhamento de luz e hidrólise ácida.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extrair o polissacarídeo Lentinan por duas metodologias diferentes existentes na literatura – adaptando-as na medida do possível – e determinar experimentalmente a melhor delas.
- b) Caracterizar a cadeia principal e as ramificações do polissacarídeo por RMN-<sup>13</sup>C.
- c) Determinar a configuração da ligação glicosídica por IV.
- d) Determinar a massa molar e a conformação do polissacarídeo por meio da técnica de espalhamento de luz.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no processo de extração do polissacarídeo foram os seguintes:

- balança Precisa XB 120-A;
- banho termostaticado Microquímica MQBTZ99-20;
- liofilizador Edwards, modelo MICRO MODULYO;
- centrífuga Du Pont, SORVALL RT6000B.

### 4.2 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO DE YAP<sup>46</sup>

A metodologia inicial empregada na extração do Lentinan foi a desenvolvida por Yap,<sup>46</sup> com modificações.

Em um balão de 2L foram refluxados, por 24h, 100g do chapéu de cogumelo shiitake fresco, homogeneizados em um liquidificador com 600mL de água destilada. Após o término do refluxo, a solução foi filtrada e concentrada por evaporação da água a um volume de 300mL. À solução restante adicionou-se igual volume de etanol absoluto, filtrando-se o precipitado gelatinoso formado. O precipitado foi dissolvido em 100mL de água a 80°C, sob agitação, e centrifugado a fim de se retirar matrizes insolúveis. A solução foi então liofilizada. Esse processo de solubilização, precipitação

com etanol e liofilização foi repetido por mais duas vezes. Por fim, a amostra foi dissolvida em solução  $1,0\text{mol.L}^{-1}$  de NaOH e dialisada em água por três dias e, em seguida, novamente liofilizada. Foram obtidos 0,115g do polissacarídeo, com rendimento de 0,12% em relação ao cogumelo fresco.

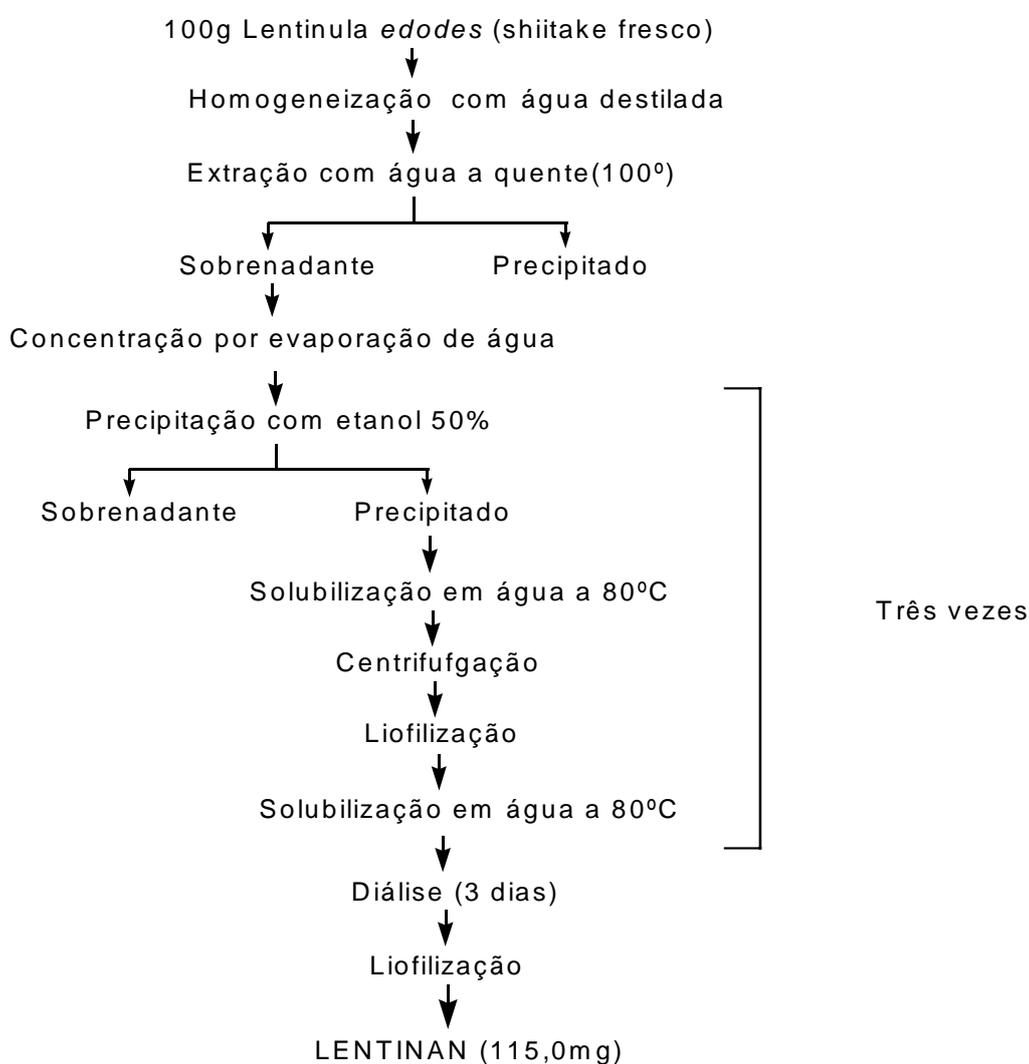


Figura 8. Fluxograma da metodologia de Yap.<sup>46</sup>

#### 4.3 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO DE CHIAHARA<sup>36</sup>

Em um balão de 2L foram refluxados, por 24h, 100g do chapéu de cogumelo shiitake fresco homogeneizados em um liquidificador com 600mL de água destilada. Após o término do refluxo, a solução foi filtrada e concentrada por evaporação da água a um volume de 300mL. À solução restante adicionou-se igual volume de etanol absoluto e filtrou-se o precipitado gelatinoso formado. O precipitado obtido foi dissolvido em 100mL de água a 80°C, sob agitação. Centrifugou-se a solução para retirada de impurezas sólidas, e foram adicionados 50mL de solução 0,2mol.L<sup>-1</sup> de CTA-OH. Filtrou-se o precipitado formado, ao qual foram adicionados, sob agitação, durante 30 min, 20mL de ácido 20%. Filtrou-se novamente a solução, adicionando-se, sob agitação, 20mL de ácido acético 50%, num período de 10min. O filtrado foi dissolvido em 30mL de NaOH 6%. Centrifugou-se a solução, adicionando-se, em seguida, 45mL de etanol ao sobrenadante. Obteve-se um precipitado em forma de pó branco, que foi filtrado em membrana de nylon. Possíveis resíduos de proteína na amostra foram retirados pelo método de Sevag, lavando-se o precipitado com solução 4:1 de clorofórmio:butanol, e, posteriormente, com metanol seguido de éter. A amostra foi dialisada em água, por três dias, com posterior liofilização. A massa do polissacarídeo obtida foi de 0,061g, rendimento de 0,061% em relação ao cogumelo fresco.

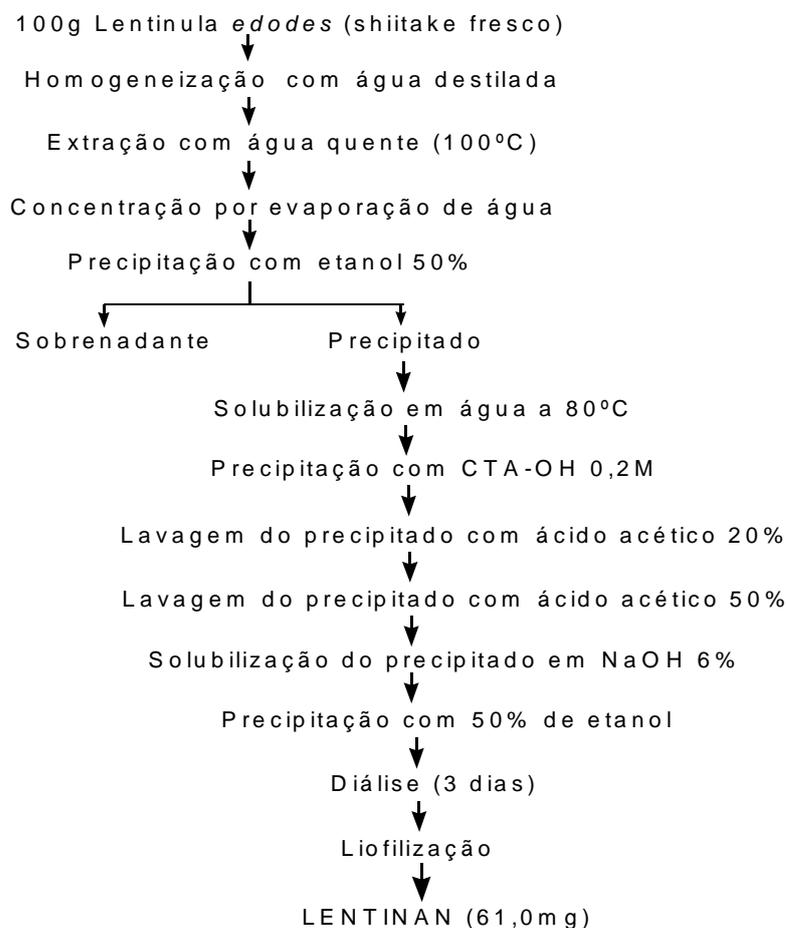


Figura 9. Fluxograma da metodologia de Chihara.<sup>36</sup>

#### 4.4 HIDRÓLISE TOTAL

A uma amostra de 20mg do polissacarídeo foram adicionados 5mL de uma solução  $2\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A mistura foi posta em um tubo kimax selado e colocado em um banho de óleo, a  $100^\circ\text{C}$ , por 6 horas. Ao término, neutralizou-se o sobrenadante com  $\text{BaCO}_3$  e centrifugou-se a solução.

#### 4.4.1 ANÁLISE DO HIDROLISADO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As soluções hidrolisadas foram analisadas por cromatografia de camada delgada, utilizando-se sílica gel G 60 como fase estacionária e, como fase móvel, uma solução de isopropanol:acetato de etila:nitroetano:ácido acético:água na proporção 45:25:10:1:19. O revelador utilizado foi uma solução de anisaldeído:ácido sulfúrico, tendo-se aquecido a placa para revelar as manchas. Como padrão utilizou-se glicose (Rf. 0,39), manose (Rf. 0,45), xilose (Rf. 0,45), galactose (0,44) e ácido glucurônico (0,12).

#### 4.4.2 ANÁLISE DO HIDROLISADO POR HPLC

A análise da solução hidrolisada por HPLC foi feita em um cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10AD, em uma coluna Supelcogel C-610H (30cm x 7,9mm  $\phi$ ). O solvente utilizado foi uma solução de  $H_3PO_4$  0 1%, com fluxo de 0,5mL/min. Usou-se um refratômetro modelo RID-10A a uma temperatura de 25°C.

#### 4.5 IV

As análises de Infravermelho foram realizadas em um espectrômetro ABD, BOMEM INC., Modelo FTLA 2000. Os espectros foram feitos em pastilha de KBr, com cerca de 3,0mg de amostra.

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 3600-3000; 2950-2900; 1639; 1400-1300; 1161; 1078; 1041; 890.

#### 4.6 RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) das amostras obtidas pelos métodos de Chihara e de Yap foram realizados em um equipamento Varian, modelo Mercury Plus , 400MHz, a 25°C, em um tubo de 5mm. O pulso utilizado foi de 45° com um tempo de relaxação de 1,3s. O tempo de aquisição foi de 14h38min, equivalendo a 40.524 aquisições. As amostras foram preparadas com uma concentração de 12mg/mL, em DMSO-d6.

A análise quantitativa dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foi realizada alterando-se o pulso para 90° e o tempo de relaxação para 10s. O tempo de aquisição foi de 54h, o que equivale a 19.440 aquisições.

## 4.7 VISCOSIDADE

O comportamento e as propriedades reológicas das soluções aquosas de NaOH do Lentinan, item 4.7.1, foram determinados, a 25°C, com um Reômetro *Brookfield LVDV-IIIICP*, do tipo cone-prato, utilizando-se um cone *CP-40* (volume da amostra de 0,5mL; ângulo do cone de 0,8° e diâmetro do cone de 24mm). O reômetro estava equipado com banho termostaticado para controle da temperatura, acoplado a computador. O processamento dos dados foi realizado pelo *software Rheocalc32*.

### 4.7.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para verificar a mudança na conformação do polissacarídeo, foram preparadas soluções aquosas de NaOH nas concentrações 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 55,0; 60,0; 65,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0mmol.L<sup>-1</sup> de NaOH, sendo a concentração do Lentinan em cada solução de 1,0mg/mL.

A concentração de sobreposição foi determinada analisando-se soluções aquosas de NaOH 20mmol.L<sup>-1</sup>, contendo as seguintes concentrações de Lentinan: 1,28; 1,1; 0,93; 0,75; 0,63; 0,54; 0,41; 0,32; 0,23 e 0,13mg/mL.

## 4.8 ESPALHAMENTO DE LUZ

As medidas de espalhamento de luz foram obtidas em um Espectrômetro da Brookhaven Instruments, utilizando-se uma fonte de luz laser He-Ne, 35mW, Spectra Physics (modelo 127), com  $\lambda_0=632,8\text{nm}$ , nos seguintes ângulos: 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 65°, 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95°, 100°, 110°, 120°, 130°, 140°. As amostras, preparadas segundo o item 4.8.1, foram centradas em uma cuba ótica, termostaticada por um banho de água, contendo decalina, Os dados coletados no espalhamento de luz estático foram tratados no *software* BI-ZP, versão 4.0. As coletas foram realizadas a uma temperatura de 25°C. Usou-se o tolueno como líquido de referência para calibração do aparelho.

### 4.8.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As soluções foram preparadas com quatro concentrações de NaOH: 20mmol.L<sup>-1</sup>, 60mmol.L<sup>-1</sup>, 100mmol.L<sup>-1</sup> e 500mmol.L<sup>-1</sup>. Para cada solução de NaOH, variou-se a concentração do Lentinan de 0,025mg/L, 0,05mg/L, 0,1mg/L, 0,2mg/L e 0,3mg/L. A filtração foi feita utilizando-se filtros Millipore de éster de celulose, porosidade 1,0 $\mu\text{m}$  e 13mm de diâmetro. Cada solução foi centrifugada por 2h a 4.000rpm.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO

O principal objetivo do isolamento de um polissacarídeo – como, aliás, de qualquer outro tipo de macromolécula – é obter um material com um alto rendimento e quimicamente puro. A metodologia a ser escolhida deve isolar o composto sem degradá-lo e garantir que a amostra esteja livre de material contaminante, como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, ou de outro polissacarídeo com cadeia polimérica semelhante.

Como mencionado anteriormente, os dois principais métodos de extração do Lentinan de cogumelos shiitake são os desenvolvidos por Chihara<sup>36</sup> e Yap<sup>46</sup>. Em ambos os métodos, o fracionamento baseia-se na diferença de solubilidade dos polissacarídeos extraídos em fase aquosa, ou seja, o fracionamento é feito por precipitações seletivas, sem o uso de procedimentos cromatográficos. Neste trabalho, foram reproduzidos esses dois métodos, com o intuito de compará-los quanto à pureza do isolado, ao rendimento e ao tempo de extração. As extrações para ambos os métodos foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

A metodologia desenvolvida por Chihara é anterior a de Yap. Caracteriza-se, experimentalmente, pela extração com água quente, seguida de precipitação fracionada de polissacarídeos por meio de um derivado de amônio quaternário, o CTA-OH, e posterior precipitação com ácido acético e etanol. O rendimento de Lentinan obtido foi

de 61,0mg para cada 100g do cogumelo fresco. O tempo de isolamento do Lentinan, incluindo-se extração e purificação, foi de sete dias.

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos para as metodologias de extração de Yap e Chihara para 100g do cogumelo fresco.

	CHIHARA	YAP
Tempo consumido na extração	7 dias	8 dias
Rendimento	61,0mg	115,0mg

Considerando que ao longo do processo de extração e purificação do Lentinan foram usados vários reagentes, pode ter acontecido algum processo de contaminação por adsorção de espécies do meio pela cadeia polimérica do Lentinan, por meio das ligações de hidrogênio. Observou-se um elevado grau de insolubilidade do polímero extraído, quando em água e em DMSO. Por isso, foi necessário purificar o polímero por diálise.

O principal método espectrométrico de análise do Lentinan foi a RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 10). Observa-se no espectro da amostra obtida pelo método Chihara, além dos sinais característicos do Lentinan, a presença, em 79,9ppm, de um sinal característico de C-4 de uma glucana ligada, lateralmente, em posição 1→4. Análise completa do espectro de  $^{13}\text{C}$  do Lentinan será realizada no item 5.3.

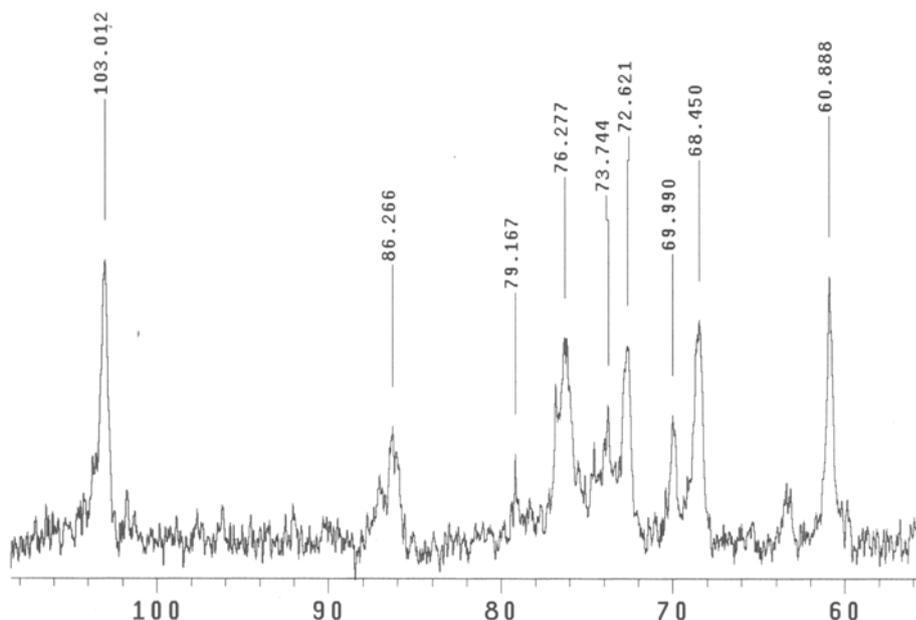


Figura 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra obtida pelo método de Chihara, em DMSO-d<sub>6</sub>.

O método de Yap baseia-se simplesmente no fracionamento do extrato por precipitação com etanol, seguida de liofilização da amostra. O tempo de extração, incluindo a purificação do Lentinan, foi de oito dias, com rendimento de 115,0mg por 100g do cogumelo fresco. A amostra obtida apresentou pureza maior que a amostra obtida pelo método de Chihara, não havendo presença de sinais característicos de impurezas no espectro de RMN  $\text{C}^{13}$ . Este resultado determinou que esta amostra fosse utilizada em todos os testes de caracterização estrutural do Lentinan.

O Lentinan obtido é um sólido de cor branca, com textura esponjosa. Apresentou melhor solubilidade em solução aquosa de NaOH. Mostrou-se pouco solúvel em água e DMSO, observando-se a formação de uma solução bastante viscosa a baixas

concentrações, 10mg/mL, o que é característico de Glucanas de alto peso molecular. Em outros solventes orgânicos e soluções aquosas ácidas a amostra foi insolúvel.

## 5.2 HIDRÓLISE TOTAL

A hidrólise total do polissacarídeo Lentinan, obtido neste trabalho, foi realizada em ácido sulfúrico  $2\text{mol.L}^{-1}$ , a  $100^{\circ}\text{C}$ . Realizou-se, também, a hidrólise com a utilização de ácido trifluoroacético (TFA); porém, mesmo após horas de reação, podia-se observar a presença de material insolúvel.

A hidrólise ácida ocorre pelo ataque do íon  $\text{H}_3\text{O}^+$  ao oxigênio da ligação O-glicosídica, seguida da adição de uma molécula de água a um dos carbonos do grupo éter, provocando a quebra da ligação entre os monômeros, que podem, então, ser analisados (Figura 11). A análise do hidrolisado foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de camada delgada (CCD). Como os açúcares em geral não absorvem na região do UV, utilizou-se como revelador uma solução de ácido sulfúrico/anisaldeído. Foram analisados os padrões de todos os açúcares comumente encontrados em polissacarídeos como D-glicose, D-manose, D-galactose, D-xilose e o ácido D-glucurônico. Todavia o monômero obtido foi exclusivamente o da D-glicose (Rf. 0,39), confirmando que o polímero isolado é uma glucana, consistente com o Lentinan.

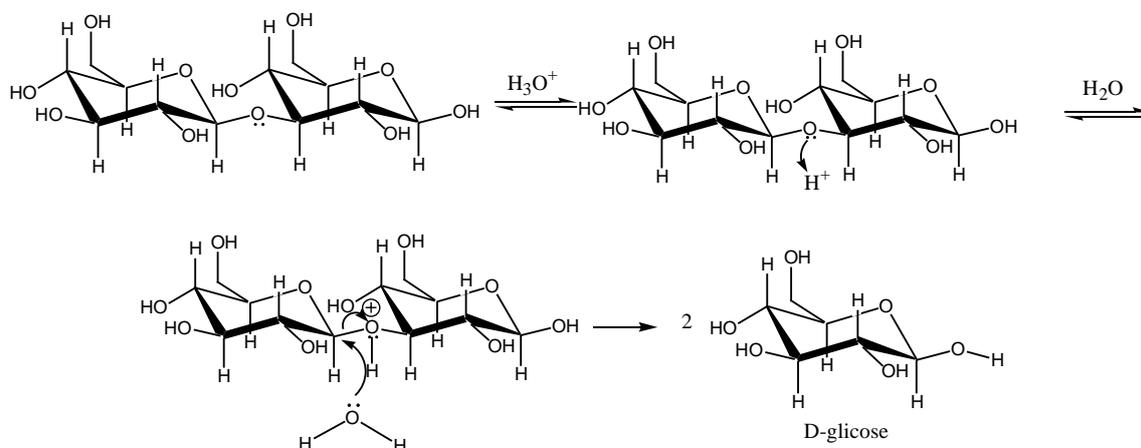


Figura 11. Mecanismo de hidrólise de um dissacarídeo.

### 5.3 RMN $^{13}\text{C}$

A amostra foi preparada com uma concentração do polissacarídeo de 12mg/mL de DMSO- $d_6$ . Nesta concentração, a solução torna-se muito viscosa, com textura de um gel. Por isso, mesmo num aparelho de 400MHz e com elevado número de aquisições, em torno de 40.000, o espectro apresentou uma baixa relação sinal/ruído, devido à imobilidade da cadeia do polímero em solução. Esse problema é característico de polissacarídeos de alta massa molar, com conformação ordenada<sup>18,21</sup>.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de um polissacarídeo, contendo ligações glicosídicas em diferentes posições, pode ser interpretado tomando-se como referência o espectro de homopolímeros. A Tabela 7 apresenta uma relação de  $\alpha$  e  $\beta$ -D-glucanas com os respectivos sinais de  $^{13}\text{C}$ .

A Figura 12 registra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra do Lentinan obtida pelo método de Yap. Observa-se a presença de um único sinal para o carbono anomérico,

C-1, em 103,0ppm. Esse sinal é o mais característico de glucanas com configuração  $\beta$ , sendo que as com configuração  $\alpha$  têm o C-1 em 101,0ppm.

Tabela 7. Deslocamento químico dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  de D-Glucanas lineares.

	Deslocamento Químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
(1→3)- $\beta$ -D-Glucana <sup>21</sup>	103,2	72,9	86,3	68,5	76,4	61,0
(1→6)- $\beta$ -D-Glucana <sup>30</sup>	104,2	74,2	76,8	70,7	76,1	70,0
(1→4)- $\beta$ -D-Glucana <sup>65</sup>	103,4	74,3	76,1	79,9	75,4	61,5
(1→3)- $\alpha$ -D-Glucana <sup>65</sup>	101,3	72,2	83,2	71,7	73,7	62,2

O deslocamento do C-2 nas moléculas de glicose ligadas em posição 1→3, 73,0ppm, é menor que o deslocamento do C-2 quando as ligações são em posição 1→6, 73,9ppm, devido à mudança na vizinhança do C-2.<sup>17</sup>

Os sinais na região em torno de 86,0ppm são referentes aos carbonos C-3<sub>i</sub>, C-3<sub>ii</sub> e C-3<sub>iii</sub> do monômero de glicose quando ligado em posição 1→3. Pela comparação da intensidade destes sinais com a intensidade do sinal do carbono C-3<sub>iv</sub>, que não se encontra substituído, em 77,0ppm, pode-se confirmar a cadeia principal como sendo 1→3.

Os átomos de C-4 encontram-se em 68, 7ppm, enquanto que o sinal dos C-5 fica em 76,4ppm.

O sinal em 70,1ppm é referente ao C-6<sub>II</sub> substituído. Isso evidencia a presença da ramificação 1→6. Os átomos de carbono C-6 livres, ou sem ramificação, aparecem em 61,1ppm.

Como dito anteriormente, a presença de sinais em 80ppm caracteriza a existência de impurezas na amostra. Observa-se, na tabela 7, que o carbono 4, quando substituído, desloca-se para 79,9ppm o que comprova tal afirmação.

Em outro experimento de  $^{13}\text{C}$ , alteraram-se as condições experimentais aumentando-se o tempo de relaxação para 10s, com pulsos em  $90^\circ$ . Nessas condições, os núcleos de  $^{13}\text{C}$ , cujas constantes de tempo de relaxação ( $T_1$ ) variam em uma ampla faixa, sofrem o mesmo grau de relaxação e a integração das áreas dos sinais correspondem ao número correto de átomos de carbono<sup>65</sup>. Assim, relacionando-se a área do sinal em 103,0ppm, referente a todos os C-1 da molécula, com a área do sinal em 86,0ppm, referente a todos os C-3 substituídos, pode-se obter o grau de ramificação da molécula. Para os C-1, a área obtida foi igual a 1,00, estabelecida como sendo 100%, enquanto que para os C-3 substituídos foi de 0,71; portanto, a razão 1,0:0,71 implica dois monômeros de glicose ligados 1→6 a cada cinco monômeros da cadeia principal 1→3. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Saito<sup>30</sup> para a estrutura do Lentinan.

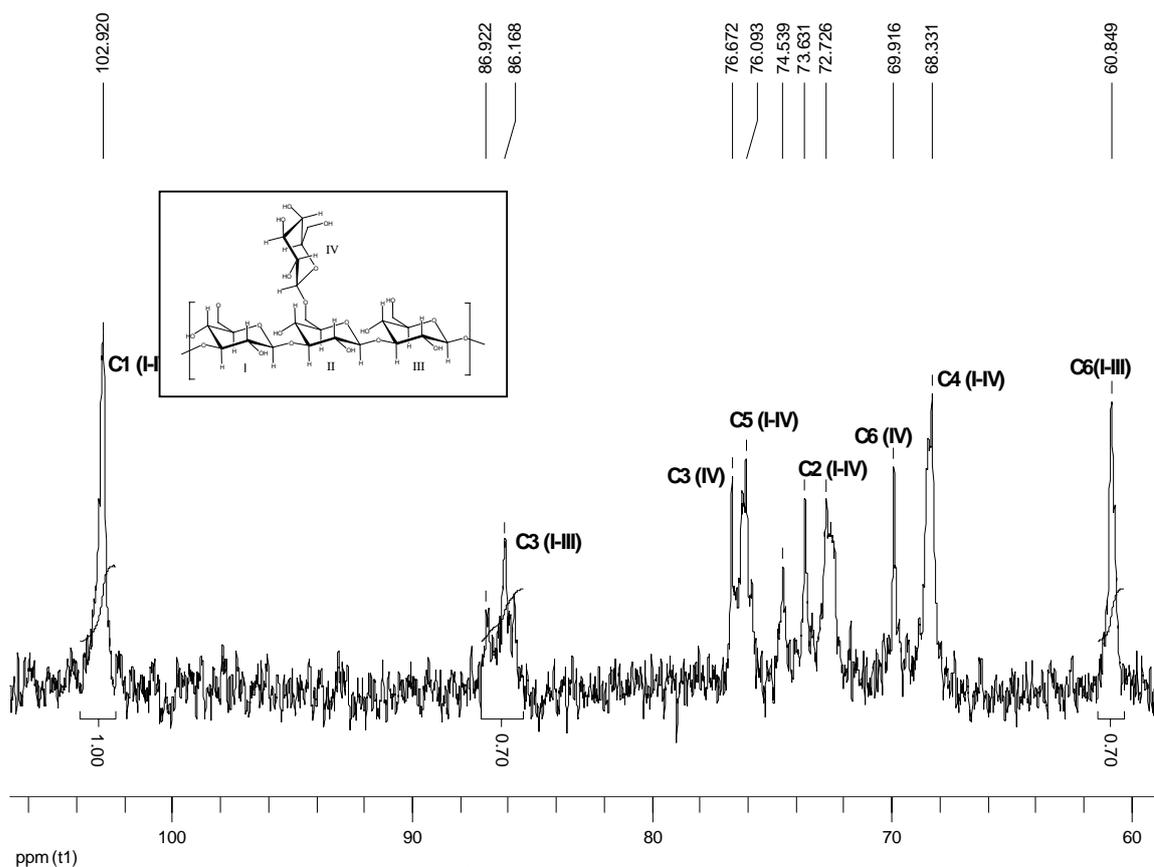


Figura 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do Lentinan em  $\text{DMSO-d}_6$ .

#### 5.4 INFRAVERMELHO

A análise por espectroscopia de Infravermelho (IV) permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura do polissacarídeo. As atribuições das principais absorções são características de estruturas glicosídicas. A Figura 13 é o espectro de infravermelho do Lentinan obtido pelo método de Yap.

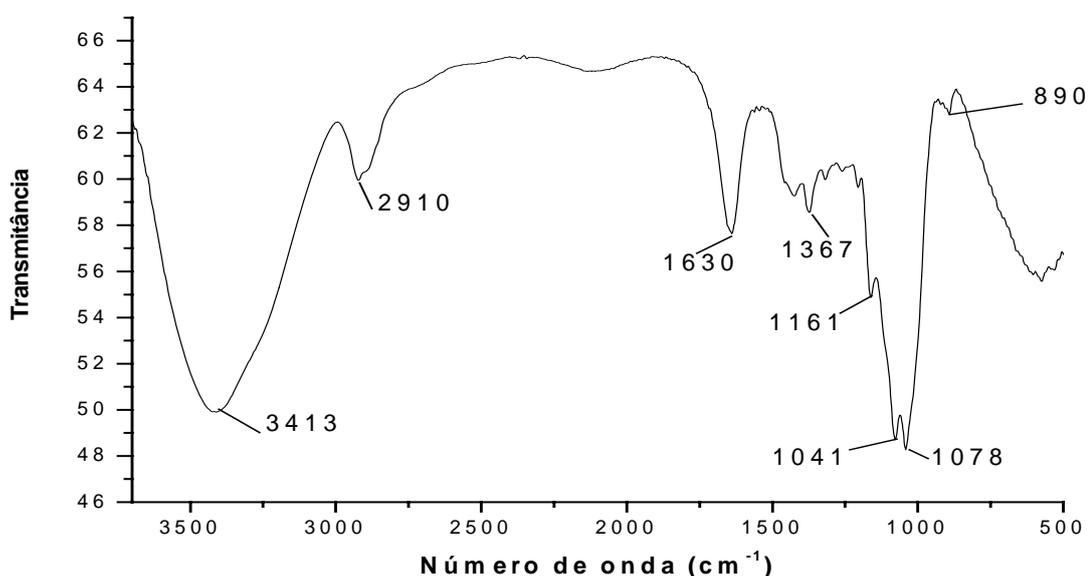


Figura 13. Espectro de Infravermelho do Lentinan em pastilha de KBr.

Os principais sinais obtidos no espectro de Infravermelho estão apresentados na Tabela 8. O sinal entre  $3.000$  e  $3.600\text{cm}^{-1}$  é característico da deformação axial da ligação O-H. Sendo largo e intenso, evidencia a presença de ligações de hidrogênio intermolecular. Outras bandas relativas à deformação angular da hidroxila de álcoois primários e secundários aparecem na região de  $1.639\text{cm}^{-1}$ ; entretanto, essas bandas não contribuem significativamente para a caracterização do composto por espectroscopia de infravermelho. Outra banda presente no espectro de carboidratos é a relativa ao estiramento de ligação entre carbono e oxigênio próxima a  $1.000\text{cm}^{-1}$ . As ligações C-O-C, características da função éter presentes na cadeia polimérica, apresentam banda de média intensidade em  $1.161\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 8. Principais bandas de absorção no Infravermelho observadas para D-glucanas.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo de observação
3600-3000	deformação axial O-H
2950-2900	estiramento assimétrico C-H (metileno)
1639	deformação angular O-H
1400-1300	deformação angular C-H (metileno)
1161	estiramento C-O-C
1041-1078	deformação axial C-H (C anomérico)
890	deformação angular C-H (C anomérico)

As bandas relativas às vibrações das ligações entre carbono e hidrogênio também auxiliam na caracterização. A banda de estiramento assimétrico do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) encontra-se na região de 2.900 a 2.950 $\text{cm}^{-1}$ . Na região entre 1.300 a 1.400 $\text{cm}^{-1}$  aparecem as bandas de deformação angular dessas ligações.

As vibrações que fornecem os sinais mais valiosos para este trabalho são aquelas referentes à deformação angular e axial da ligação C-H do carbono anomérico (C-1). A banda em 890 $\text{cm}^{-1}$ , causada pela deformação angular dessa ligação, é característica da configuração  $\beta$  da ligação glicosídica<sup>19</sup>. Gonzaga<sup>45</sup> (2005) atribuiu, para a configuração  $\alpha$ , sinais em 930 e 850 $\text{cm}^{-1}$ . Os sinais em 1.041 e 1.078 $\text{cm}^{-1}$  são referentes a deformação axial da ligação C-H no carbono anomérico (C-1). O sinal em 1.041 $\text{cm}^{-1}$  é característico da ligação 1 $\rightarrow$ 6, enquanto que o sinal em 1.078 $\text{cm}^{-1}$  é da ligação 1 $\rightarrow$ 3<sup>45</sup>.

O não-aparecimento de sinal em  $1.733\text{cm}^{-1}$  elimina a possibilidade da presença de ácido glucurônico na cadeia<sup>44</sup>.

## 5.5 VISCOSIDIDADE

A  $25^\circ\text{C}$ , a viscosidade relativa dos sistemas  $1,0\text{mg/mL}$  de Lentinan/NaOH  $20\text{mM}$  e  $1,0\text{mg/mL}$  de Lentinan/NaOH  $500\text{mM}$ ,  $\eta/\eta_0$ , está apresentada na Figura 14. O gráfico mostra a dependência da viscosidade relativa com a taxa de cisalhamento.

Pode-se observar que as soluções possuem um comportamento diferenciado. A viscosidade da solução com concentração de NaOH  $20\text{mM}$  diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Esse fenômeno caracteriza a presença de agregados em solução, e o aumento da taxa de cisalhamento provoca um fracionamento desses agregados. Shaw<sup>49</sup> cita, para o caso de um sistema agregado, que a diminuição da quantidade de líquido retida pelos agregados, devido à quebra desses agregados, através da agitação, provoca uma diminuição da viscosidade; tal comportamento é característico para fluidos não-newtonianos.

Já a solução de concentração de NaOH  $500\text{mM}$  mostra comportamento de um fluido newtoniano, ou seja, a viscosidade não varia com o aumento da taxa de cisalhamento, o que leva à conclusão de que, em concentrações maiores de NaOH, não há a formação de agregados.

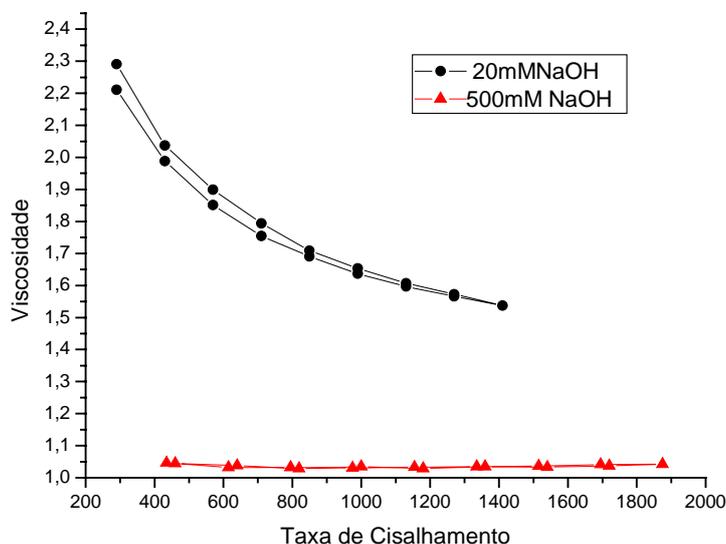


Figura 14. Gráfico da viscosidade relativa vs. a taxa de cisalhamento para os sistemas Lentinan/NaOH.

O estudo da viscosidade de soluções de Lentinan em diferentes concentrações de NaOH fornece a faixa de concentração onde ocorre a dissociação do agregado (Figura 15). Esse gráfico mostra a dependência da viscosidade relativa com a concentração de NaOH. Com o aumento da concentração de NaOH, observa-se diminuição da viscosidade até a concentração de 80mM. Isso implica a existência de uma faixa de concentração, entre 20 e 80mM de NaOH, em que ocorre a quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que mantêm as moléculas de Lentinan agregadas. Em concentrações acima dessa faixa, a viscosidade torna-se constante, ocorrendo quebra completa das ligações de hidrogênio, com dissociação dos agregados.

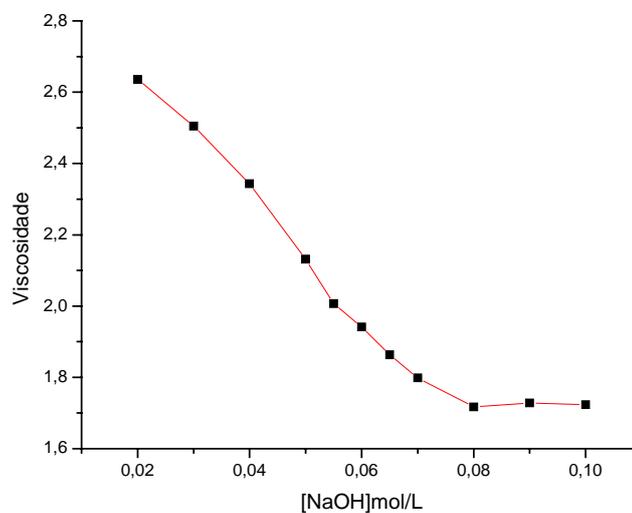


Figura 15. Gráfico da viscosidade relativa vs. concentração de NaOH, 1,0mg por mL de Lentinan.

De acordo com a literatura, existem três regimes dinâmicos de concentração para uma solução polimérica: diluído, semidiluído e concentrado. Basicamente, a diferença entre os regimes está relacionada às interações entre as macromoléculas em solução. Como dito anteriormente, a concentração crítica,  $*C$ , é a concentração de transição entre o regime diluído e o semidiluído<sup>50</sup>. Em valores abaixo da  $*C$ , as interações entre as macromoléculas em solução são muito pequenas. Para tanto, foram feitas medidas viscosimétricas de soluções 20mM de NaOH, variando-se a concentração de Lentinan (Figura 16). A quebra na inclinação da reta do gráfico da viscosidade reduzida ( $\eta_{\text{esp}}/C$ ) versus a concentração do Lentinan fornece a  $*C$ . O valor da  $*C$  do Lentinan para uma concentração 20mM de NaOH foi de 1,1mg/mL.

A determinação da concentração crítica é fundamental para a preparação das soluções a serem analisadas por espalhamento de luz, pois essas medidas dependem

da forma e do tamanho das partículas em solução. Portanto, soluções em um regime semidiluído proporcionariam interações entre as moléculas de Lentinan causando erros nas medidas.

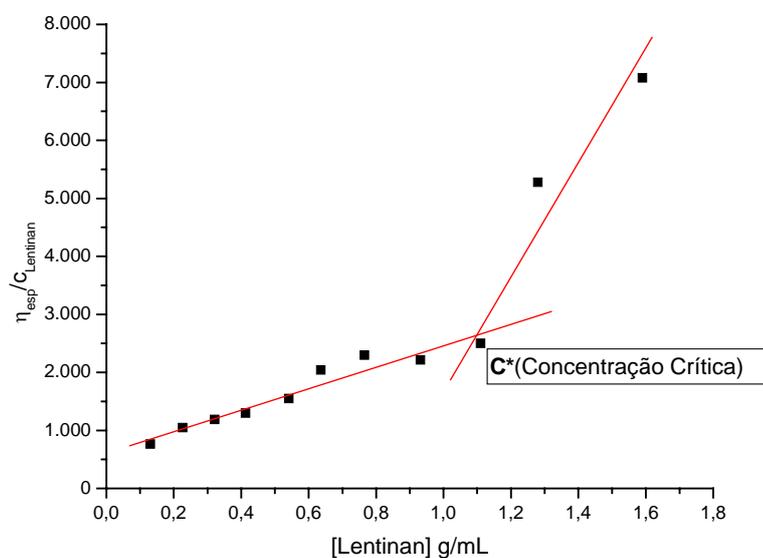


Figura 16. Gráfico da viscosidade reduzida vs. a concentração de Lentinan em solução 20mM de NaOH.

## 5.6 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO

Os resultados do espalhamento de luz estático (SLS) foram obtidos pelo método de Zimm, aplicando-se a equação (5). A Figura 17 mostra o gráfico de Zimm, obtido para o Lentinan, utilizando-se como solvente uma solução 20mM de NaOH. Na Tabela

9, encontram-se os parâmetros obtidos por SLS, como a massa molar média ponderada ( $\bar{M}_w$ ), o raio de giro ( $R_g$ ) e o segundo coeficiente virial ( $A_2$ ).

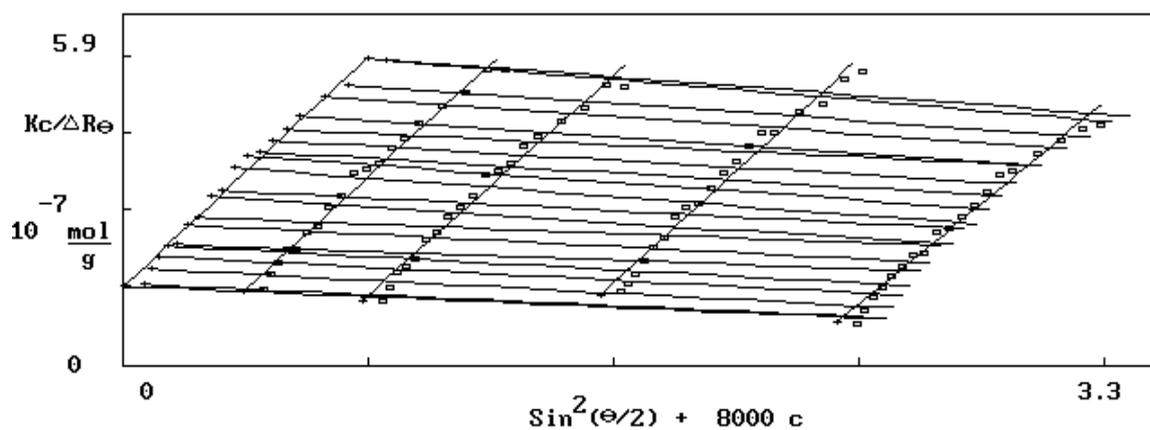


Figura 17. Gráfico de Zimm da amostra de Lentinan em 20 mM de NaOH.

Tabela 9.  $R_g$ ,  $\bar{M}_w$ ,  $A_2$  obtidos por espalhamento de luz estático para soluções de Lentinan 20, 60, 100 e 500mM de NaOH.

[NaOH]	$R_g$ (nm)	$\bar{M}_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )( x 10 <sup>-6</sup> )	$A_2$ (cm <sup>3</sup> mol.g <sup>-2</sup> ) (x 10 <sup>5</sup> )
20mM	138,5	8,14 (± 12%)	-9,81
60mM	113,4	5,62 (± 8,7%)	4,40
100mM	99,1	4,47 (± 11,0%)	9,00
500mM	98,5	4,43 (± 6,2%)	9,20

### 5.6.1 MASSA MOLECULAR

A massa molar de polissacarídeos é uma característica muito importante, pois, juntamente com as características de configuração, é a principal responsável por sua atividade biológica.

Os polissacarídeos, diferentemente dos compostos puros de baixa massa molar, não exibem apenas uma massa molar, mas uma distribuição de diferentes valores. Assim, os métodos para o cálculo dessa grandeza apresentam um valor médio. Por espalhamento de luz obtêm-se a massa molar média ponderada ( $\bar{M}_w$ ).

A dependência do  $\bar{M}_w$  do Lentinan com a concentração de NaOH em solução aquosa é apresentado na Figura 18. Pode-se observar claramente a diminuição da massa molar com o aumento da concentração de NaOH. Em concentração de 20 mM, a  $\bar{M}_w$  obtida para o Lentinan foi de  $8,14 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ . A 100mM, a massa molar cai praticamente pela metade, ficando em  $4,47 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ . Aumentando-se a concentração de NaOH para 500mM, o  $\bar{M}_w$  é de  $4,43 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ , mantendo-se praticamente constante. Isso leva à conclusão de que, em baixas concentrações de NaOH, diferentemente do resultado obtido por Zhang<sup>33.38</sup>, onde a conformação encontrada para o Lentinan era de tripla hélice, as cadeias do Lentinan juntam-se duas a duas por ligações de hidrogênio intramolecular tomando uma conformação de dupla hélice.

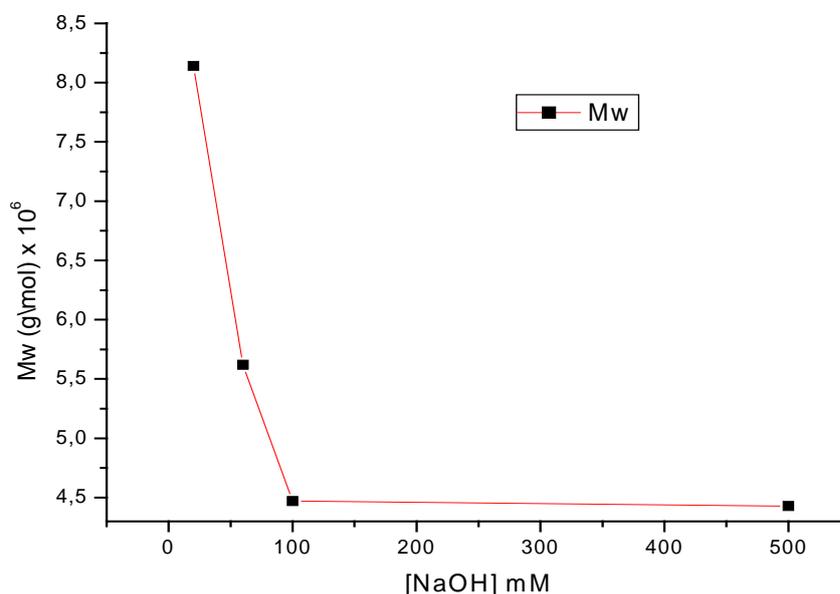


Figura 18. Dependência da  $\bar{M}_w$  com a concentração de NaOH.

Com o aumento da concentração de NaOH, as ligações de hidrogênio intermoleculares que mantêm as moléculas juntas são quebradas, deixando-as livres em solução; ocorre, então, a conversão da conformação de dupla hélice para aleatória. Esse resultado é coerente com o obtido pelas análises viscosimétricas, onde também se observa a quebra do agregado, com mudança de conformação na faixa de concentração de 20,0–80,0mM de NaOH.

Considerando a fórmula molecular mínima de um polissacarídeo,  $C_6H_{10}O_5$ , 162  $g.mol^{-1}$ , e a massa molar do Lentinan, 4.430.000  $g.mol^{-1}$ , podemos estimar o grau de polimerização (DP) do Lentinan obtido neste trabalho como 27.346, ou seja, em cada cadeia isolada do polissacarídeo encontram-se 27.346 resíduos de glicose.

### 5.6.2 SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL $A_2$

O segundo coeficiente virial ( $A_2$ ) pode ser descrito em termos das forças entre o solvente e a cadeia polimérica, ou seja, interações polímero-polímero e polímero-solvente. Se a interação polímero-solvente é grande, o novelo estará estendido e o solvente é adequado e, nesse caso,  $A_2$  possui um valor positivo. De modo oposto, se as forças polímero-polímero dominam as interações na solução, as interações entre as cadeias podem quebrar intermolecular e ou intramolecularmente. Nesse caso, o segundo coeficiente virial será negativo. Um solvente que produz um valor negativo para  $A_2$  para uma cadeia polimérica é considerado um solvente pobre.

A Figura 19 apresenta a variação do segundo coeficiente virial com a concentração de NaOH.

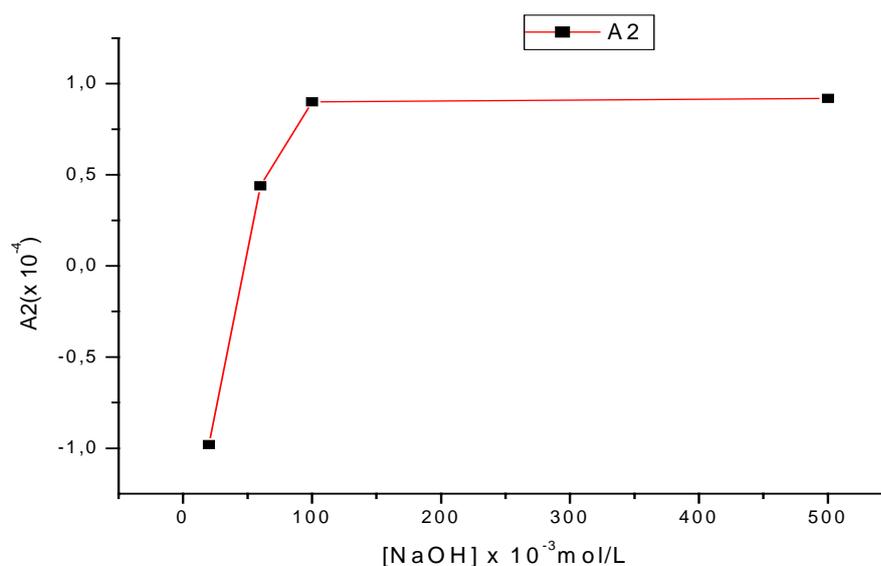


Figura 19. Dependência de  $A_2$  com a concentração de NaOH.

O aumento de  $A_2$  com o aumento da concentração de NaOH da solução é devido à quebra das ligações inter e intramoleculares, indicando um aumento na interação polímero-solvente e, portanto, na solubilidade do polímero. Observa-se que para soluções com concentração superior a 50mM de NaOH,  $A_2$  torna-se positivo, o que indica que soluções acima desta concentração são bons solventes para o Lentinan.

### 5.6.3 RAIOS DE GIRO $R_g$

A variação do raio de giro com a concentração de NaOH (Figura 20) segue um comportamento semelhante à variação da  $\bar{M}_w$ . A abrupta mudança no gráfico reflete a dissociação da dupla hélice em duas moléculas isoladas do polissacarídeo com conformação aleatória.

Apesar de a mudança no gráfico ser semelhante para a massa molecular ponderal média ( $\bar{M}_w$ ) e para o raio de giro ( $R_g$ ), a magnitude deste decréscimo é diferente. O valor da massa molar cai pela metade, enquanto que, para o raio de giro, este decréscimo não é tão intenso. O valor de  $R_g$  (que é uma medida do tamanho da cadeia em solução), a uma concentração de 20mM de NaOH, em que as cadeias do polímero estão em conformação de dupla hélice, é de 138,5nm; a concentrações superiores a 100mM de NaOH, onde o  $R_g$  passa a ser de uma cadeia do polímero individual, o valor é de 98,5nm. Observa-se que, apesar da massa molar ponderal média cair pela metade, o  $R_g$  tem um pequeno decréscimo. Isto se deve ao fato de as moléculas do

polímero livre em solução encontrarem-se estendidas pela quebra das ligações de hidrogênio intramoleculares.

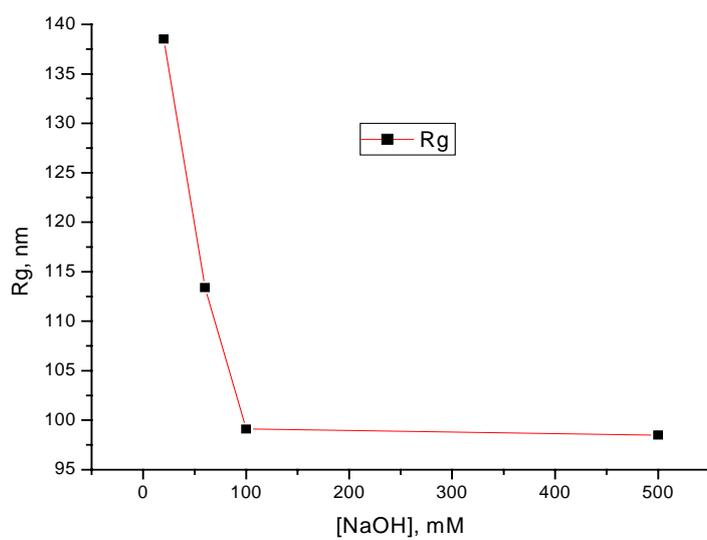


Figura 20. Dependência do  $R_g$  com a concentração de NaOH.

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Dentre as técnicas de extração do Lentinan empregadas neste trabalho, a metodologia desenvolvida por Yap mostrou-se mais eficiente e seletiva: proporcionou um maior rendimento na extração e uma amostra mais limpa.
- 2- A caracterização estrutural do polissacarídeo, feita por hidrólise ácida, ressonância magnética nuclear e infravermelho, revelou se tratar de uma  $\beta$ -D-glucana, com cadeia principal 1 $\rightarrow$ 3, e cadeia lateral 1 $\rightarrow$ 6. Revelou, ainda, que, para cada cinco moléculas de glicose ligadas em posição 1 $\rightarrow$ 3, existem duas moléculas ligadas em posição 1 $\rightarrow$ 6.
- 3- As análises viscosimétricas revelaram a baixa solubilidade do Lentinan e a formação, em solução, de agregados.
- 4- A massa molecular do Lentinan obtida neste trabalho pelo uso da técnica de espalhamento de luz estático foi de  $4,43 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ .
- 5- A baixas concentrações de NaOH, a conformação do Lentinan em solução é de dupla-hélice, sendo que, com o aumento da concentração de NaOH, esta conformação é perdida.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. WASSER, S. – *Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, 258-274, 2002.
2. CHANG, S.T.; *World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* in china*, **International J. of Medicinal Mushrooms**, v.1, 291-300, 1999.
3. PAULA, D.P.; TARSITANO, M.A.A.; GRACIOLLI, L.A. – *Viabilidade econômica do cultivo de Shiitake em diferentes escalas de produção*, **Scientia Agrícola**, v.58, n.2, 431-436, 2001.
4. LI, G. S. F.; CHANG, S. T. – *The nucleic acid content of some edible mushrooms*, **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.15, n.4, 237-240, 1982.
5. BREENE, W.M. – *Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms*, **Journal of Food Protection**, v.53, n.10, 883-894, 1990.
6. CHEN, Y.; CHEFETZ, B.; ROSARIO, R.; VAN HEEMST, J.D.H.; ROMAINE, C.P.; HATCHER, P.G. – *Chemical nature and composition of compost during mushroom growth*, **Compost Science and Utilization**, v.8, n.4, 347-359, 2000.
7. CHEN, A.W. – *Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic logs*, **The Mushroom Growers Newsletter**, v.X, n.4, 3-9, 2001.
8. WASSER, S.; WEIS, A. – *Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives*, **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, 31-62, 1999.

9. DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A.; VANDAMME, E.J. – *Biopolymers* v.6, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
10. MIZUNO, T. – *The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan*, **International journal of medicinal mushrooms**, v.1, 9-29, 1999.
11. AOYAGI, Y.; SASAKI, H.; SUGAHARA, T. – *Isolation and identification of nicotianine and cystathionine from lentinus edodes*, **Agricultural and Biologic Chemistry**, v.41, n.1, 213-214, 1977.
12. SHOUJI, N.; TAKADA, K.; FUKUSHIMA, K.; HIRASAWA, M. – *Anticaries effect of a component from Shiitake*, **Caries Research**, v.34, 94 – 98, 2000.
13. KAMIYA, T.; SAITO, Y.; HASHIMOTO, M.; SEKI, H. – *Hypocholesterolemic alkaloids of lentinus edodes – Structure and synthesis of eritadenine*, **Tetrahedron**, v.28, 899-906, 1972.
14. ROKUJO, T.; KIKUCHI, H.; TENSUO, <sup>a</sup>; TSUKITANI, Y.; TAKENAWA, T.; YOSHIDA, K.; KAMIYA, T. – *Lentysine: a new hypolipidemic agent from a mushroom*, **Life Sciences**, v.9, n.2, 379-385, 1970.
15. MIZUNO, T.; SAITO, H.; NISHITOBA, T.; KAWAGISHI, H. – *Antitumor active substances from mushrooms*, **Food Reviews International**, v.11, n.1, 23-61, 1995.
16. SHARON, N.; LIS, H. – *Carbohydrates in cell recognition*, **Scientific American**, 74-81, January 1993.
17. ASPINALL, G.O.; - *The Polysaccharides* v.1, Academic Press, New York, 1982.
18. SAITO, H.; OHKI, T.; SASAKI, T. – *A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study of gel-forming (1→3)-β-D-Glucan. Evidence of the presence of single-helical conformation*

- in a resilient gel of a curdlan-type polysaccharide 13140 from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140*, **Biochemistry**, v.16, n.5, 908-914, 1977.
19. ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. – *Chemical structure and molecular weights of  $\alpha$ -(1→3)-D-Glucan from *Lentinus edodes**, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.63, n.7, 1197-1202, 1999.
20. BOHN, J.A.; BEMILLER, J.N. – *(1→3)- $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships*, **Carbohydrate Polymers**, v.28, 3-14, 1995.
21. PELOSI, L.; IMAI, T.; CHANZI, H.; HEUX, L.; BUHLER, E.; BULONE, V. – *Structural and morphological diversity of (1→3)- $\beta$ -D-Glucans synthesized in vitro by enzymes from *Saprolegnia monoica*. Comparison with a corresponding in vitro product from blackberry (*Rubus fruticosus*)*, **Biochemistry**, v.42, 6264- 6274, 2003.
22. CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. – *Antitumour polysaccharide derived chemically from natural glucan (*Pachyman*)*, **Nature**, v.225, 943-944, 1970.
23. BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.; SILVA, M.L.C. – *Structural characterization of botryosphaeran: a (1→3;1→6)- $\beta$ -D-glucan produced by the ascomyceteou fungu, *Botryosphaeria* sp.*, **Carbohydrate Research**, v.338, 1691-1698, 2003.
24. FUJII, T.; MAEDA, H.; SUZUKI, F.; ISHIDA, N. – *Isolation and characterization of a new antitumorpolysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes**, **The Journal of Antibiotics**, v.31, n.11, 1079-1090, 1978.

25. STOKKE, B.; ELSGAETER, A.; BJORNESTAD, E.; LUND, T. – *Reology of xanthan gum and scleroglucan in synthetic sea water*, **Carbohydrate Polymers**, v.17, 209-220, 1992.
26. KASHIWAGI, Y.; NORISUYE, T.; FUJITA, H. – *Triple helix of Schizophyllum commune polysaccharide in dilute solution: light scattering and viscosity in dilute aqueous sodium hydroxide*, **Macromolecules**, v.14, 1220-1225, 1981.
27. TSUKAGOSHI, S.; HASHIMOTO, Y.; FUJII, G.; KOBAYASHI, H. NOMOTO, K. – *Krestin (PSK)*, **Cancer Treatment Reviews**, v.11, n.2, 131-155, 1984.
28. MISAKI, A.; KAKUTA, M.; SASAKI, T.; TANAKA, M.; MIYAJI, H. – *Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: Antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)-β-D-Glucan of Auricularia auricularia-judae, and other polysaccharides containing of (1→3)-Glycosidic linkages*, **Carbohydrate Research**, v.92, 115-29, 1981. **Carbohydrate Research** (1991), 217 181-90
29. SAITO, H.; YOSHIOKA, Y.; UEHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. – *Relationship between conformation and biological response for (1 → 3)-β-D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant*, **Carbohydrate Research**, v.217, 181-190, 1991.
30. SAITO, H.; OHKI, T.; TAKASUKA, N.; SASAKI, T. – *A <sup>13</sup>C-N.M.R.-Spectral study of a gel-forming, branched (1→3)-β-D-Glucan, (Lentinan) from Lentinus edodes and its acid-degraded fractions. Structure and dependence of conformation on the molecular weight*, **Carbohydrate Research**, v.58, 293-305, 1977.

31. SASAKI, T.; TAKASUKA, N.; CHIHARA, G.; MAEDA, Y. – *Antitumor activity of degraded products of lentinan: its correlation with molecular weight*, **Gann**, v.67, 191-195, 1976.
32. YANAKI, T.; ITO, W.; TABATA, K. – *Correlation between the antitumor activity of schizophyllan and its triple helix*, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.59, n.9, 2415-2416, 1986.
33. ZHANG, L.; LI, X.; ZHOU, Q.; ZHANG, X.; CHEN, R. – *Transition from triple helix to coil of lentinan in solution measured by SEC, viscometry, and <sup>13</sup>C NMR*, **Polymer Journal**, v.34, n.6, 443-449, 2002.
34. XU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; WU, C. – *Collapse and association of denatured lentinan in water/dimethylsulfoxide solutions*, **Biomacromolecules**, v.5, 1893-1898, 2004.
35. ZHAO, W.; YANG, G.; KONG, F. – *Synthesis of two heptasaccharide analogues of the lentina repeating unit*, **Carbohydrate Research**, v.338, 2813-2823, 2003.
36. CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. – *Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes**, **Cancer Research**, v.30, 2776-2781, 1970.
37. ZHANG, L.; ZHANG, X.; ZHOU, Q.; ZHANG, P.; ZHANG, M.; LI, X. – *Triple helix of  $\beta$ -D-Glucan from *Lentinus edodes* in 0,5 M NaCl aqueous solution characterized by light scattering*, **Polymer Journal**, v.33, n.4, 317- 321, 2001.
38. ZHANG, X.; ZHANG, L.; XU, X. – *Morphologies and conformation transition of lentinan in aqueous NaOH solution*, **Biopolymers**, v.75, 187-195, 2004.

39. MIZUNO, M.; MINATO, K-I.; TSUCHIDA, H. – *Preparation and specificity of antibodies to an anti-tumor  $\beta$ -glucan, lentinan*, **Biochemistry and Biology International**, v.39, n.4, 679-685, 1996.
40. ZHANG, L.; YANG, L.; DING, Q.; CHEN, X. – *Studies on molecular weights of polysaccharides of *Auricularia auricularia-judae**, **Carbohydrate Research**, v.270, 1-10, 1995.
41. GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. – *Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei murill**, **Carbohydrate Polymers**, Article in Press, 1-7, 2005.
42. JONG, S.; BIRMINGHAM, J.M. – *Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom*, **Advanced and Applied Microbiology**, v.39, 153-184, 1993.
43. CHIHARA, G.; MAEDA, Y.; HAMURO, J.; FUKUOKA, F.; SASAKI, T. – *Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* sing*, **Nature**, v.222, 637- 638, 1969.
44. FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. – *A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae**, v.54, 159-171, 2003.
45. YAP, A.-T.; CHANDRAMOHAN, S.K. – *Partially purified lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) still retain antitumor activity*, The 3<sup>o</sup> ICMBMP, 1999.
46. YAP, A.-T.; NG, M.-L.M. – *An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing*, **International J. of Medicinal Mushrooms**, v.3, 9-19, 2001.

47. ZHANG, L.; YANG, L.; DING, Q.; CHEN, X. – *Studies on molecular weights of polysaccharides of *Auricularia auricularia-judae**, **Carbohydrate Research**, v.270, 1-10, 1995.
48. GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. – *Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei murill**, **Carbohydrate Polymers**, Article in Press, 1-7, 2005.
49. SHAW, D.J. – *Introdução a química de colóides e superfícies*, Edgard Blucher, São Paulo, 1976.
50. MARTINS, R.M. – *Estudo da agregação de surfactantes aniônicos em presença de (hidroxipropil) celulose*. Tese (Mestrado em Química) – **UFRGS**, 2002.
51. VILLETTI, M.A. – *Propriedades estáticas e dinâmicas dos polímeros naturais xantana, hialuronato de sódio e metilcelulose por espalhamento de luz e raio-X a baixos ângulos*. Tese (Doutorado em Química) – **UFSC**, 2001.
52. ZHANG, P.-Y.; ZHANG, L.-N.; CHENG, S.-Y. – *Critical concentrations of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glucan from *Lentinus edodes* in NaOH aqueous solution*, **Chinese Journal of Polymer Science**, v.18, n.6, 501- 507, 2000.
53. BERTH, G.; DAUTZENBERG, H.; CHRISTENSEN, B.E.; HARDING, S.E.; ROTHER, G. – *Static light studies on xanthan in aqueous solutions*, **Macromolecules**, v.29, 3491-3498, 1996.
54. ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. – *Effects of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glucan from *Lentinus edodes* in aqueous solution*, **Carbohydrate Research**, v.327, 431-438, 2000.

55. PIZOFERRATO, L.; MANZI, P.; BERTOCCHI, F.; FANELLI, C.; ROTILIO, G.; PACI, M. – *Solid-State <sup>13</sup>C CP MAS NMR spectroscopy of mushrooms gives directly the ratio between protein and polysaccharides*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, 5484-5488, 2000.
56. BRAUER, D.; KIMMONS, T.; PHILLIPS, M. – *Effects of management on the yield and high-molecular-weight-polysaccharide content of shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.39, 5333-5337, 2002.
57. MARTINSEN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. – *Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates*, **Carbohydrate Polymers**, v.15, 171-193, 1991.
58. BROWN, G.; GORDON, S. – *A new receptor for  $\beta$ -Glucans*, **Nature**, v.413, 36-37, 2001.
59. YAP, A-T.; NG, M-L.M. – *An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing*, **International J. of Medicinal Mushrooms**, v.3, 9-19, 2001.
60. CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. – *Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes**, **Cancer Research**, v.30, 2776-2781, 1970.
61. MIZUNO, M.; MINATO, K-I.; TSUCHIDA, H. – *Preparation and specificity of antibodies to an anti-tumor  $\beta$ -glucan, lentinan*, **Biochemistry and Biology International**, v.39, n.4, 679-685, 1996.

62. MINATO, K-I.; KAWAKAMI, S.; NOMURA, K.; TSUCHIDA, H.; MIZUNO, M. – *An exo  $\beta$ -1,3-glucanase synthesized de novo degrades lentinan during storage of Lentinule edodes and diminishes immunomodulating activity of the mushroom*, **Carbohydrate Polymers**, v.56, 279-286, 2004
63. OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N.N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. – *Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of Agaricus blazei*, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.7, 820-828, 2001.
64. KEREKGYARTO, C.; VIRAG, L.; TANKO, L.; CHIHARA, G; FACHET, J. – *Strain differences in the citotoxic activity and TNF production of murine macrophages stimulated by Lentinan*, **International Journal Immunopharmacology**, v. 18, n.6/7, 347-353, 1996.
65. TIPSON, R.S.; HORTON, D. – *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* v.38, Academic Press, New York, 1981.