

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CARLA MAÍSA CAMELINI

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE VASCULOGÊNICA
DE β -D-GLUCANAS ISOLADAS DE FRUTIFICAÇÕES DE *Agaricus brasiliensis* EM DIFERENTES
ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO:
IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE NUTRICÊUTICOS.**

Florianópolis

2005

CARLA MAÍSA CAMELINI

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE VASCULOGÊNICA
DE β -D-GLUCANAS ISOLADAS DE FRUTIFICAÇÕES DE *Agaricus brasiliensis* EM DIFERENTES
ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO:
IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE NUTRICÊUTICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof.^a. PhD. Margarida Matos de Mendonça**

Co-orientadores: **Prof. Dr. Marcelo Maraschin**

Prof. Dr. Paulo Fernando Dias

Florianópolis

2005

Camelini, Máisa Camelini

Caracterização estrutural e atividade vasculogênica de β -D-glucanas isoladas de frutificações de *Agaricus brasiliensis* em diferentes estágios de maturação: implicações na produção de nutricêuticos/Carla Máisa Camelini - Florianópolis, 2005.

Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

1. β -D-glucanas. 2. *Agaricus brasiliensis*. 3. Nutricêuticos
82 p.

“Só os chapéus fechados podem ser abertos”.

Carla Maísa Camelini

Dedicatória

A Marlene e João Carlos por terem me dado amor, raízes e asas, e ao Dudu por proporcionar um eterno vôo de amor.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pelo constante incentivo, apoio recebido e compreensão, em especial à prof. Margarida Matos de Mendonça que idealizou esta pesquisa junto a mim.

Ao Marcelo Maraschin e a Paulo Fernando Dias por aceitar o desafio da co-orientação e dar suporte para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCAR, principalmente ao Giba e a Leila que sempre foram tão atenciosos e dispostos a ajudar na pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (UFSC) no qual passei a maioria das horas destes 2 últimos anos.

Ao pessoal do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais da UFSC (Valeu Jean!).

Reconhecimento com carinho às amigas Liana, Liz, Gladys, Magali, Alessandra, Betina, Márcia, Renata e Melissa.

Um super agradecimento aos meus pais Marlene e João Carlos, ao meu irmão Carlos Eduardo, pelo apoio e reconhecimento à minha capacidade de continuar no caminho dos estudos acadêmico-científicos.

Um super beijo ao Dudu que esteve sempre presente quando esquecia-me de comer devido ao empenho nessa pesquisa.

Agradeço a Loreta por dar orientação necessária para o meu retorno aos fungos. E a Tereza que através do Taijiquan , ajudo-me ter a prática da repetição, da constância e força interna.

À compreensão de Alfa e Beta, Aska e Foska, cachorras e gatas respectivamente, que muitas vezes sentiram minha ausência na casa e que festejavam minha chegada.

Ao CNPq pela bolsa de estudo que me sustentou financeiramente nestes 2 anos de pesquisa.

RESUMO

Agaricus brasiliensis (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.), popularmente conhecido no Brasil como Cogumelo Medicinal, Cogumelo do Sol[®], é um fungo de cultivo expressivo no país devido às suas propriedades medicinais, evidenciadas em diversos trabalhos científicos, e vem ganhando importância em diversos países, principalmente para uso nutracêutico. Estes produtos são obtidos dos cogumelos, minimamente processados e encapsulados para serem consumidos como suplementos dietéticos. São utilizados principalmente devido ao potencial terapêutico como imunomodulatórios e anti-tumoral. As frutificações de *A. brasiliensis* são coletadas no Brasil principalmente no estágio imaturo, quando o píleo ainda está fechado, atendendo a padrões morfológicos pré-estabelecidos. No entanto, essas frutificações imaturas ainda não atingiram máxima eficiência da biomassa fúngica, mas é nesse estágio que se obtém maior valor comercial para exportação. As frutificações maduras são geralmente de menor valor comercial, sendo muitas vezes descartadas pelos produtores ou aproveitadas na produção de nutracêuticos. A qualidade desses nutracêuticos é dependente da composição química das frutificações, particularmente em relação ao conteúdo de β -D-glucanas que constituem a parede celular do fungo. No presente estudo, foram utilizadas frutificações de *A. brasiliensis* (estirpe UFSC 51), coletadas em diferentes estágios de maturação - imaturas SI (píleo fechado), maduras (píleo aberto) com esporos imaturos SII e maduras com esporos maduros SIII, para se avaliar o rendimento e as características estruturais dos polissacarídeos solúveis em água a 100°C antes e após a purificação das β -D-glucanas usando-se cromatografia líquida, identificação por espectrometria (FTIR e RMN de ¹³C e ¹H), peso molecular e teor de proteínas. Identificou-se a presença de um polímero de peso molecular superior a 1.000.000 Daltons, e estrutura (1→6)-

(1→3)- β -D-glucanas, com baixo teor de proteínas (em média 0,61%), nos três estágios de maturação, porém com aumento do rendimento das β -D-glucanas no estágio SII e de (1→3)- β -D-glucanas nos estágios SII e SIII. Como consequência, frutificações maduras de *A. brasiliensis* que também contêm estas importantes β -D-glucanas devem ser utilizadas na elaboração de produtos nutracêuticos. As β -D-glucanas extraídas e purificadas destas frutificações nos diferentes estágios foram avaliadas quanto à bioatividade, qualitativa e quantitativamente, sobre o processo de vascularização inicial em embriões de galinha (*Gallus domesticus*). Foram constatados efeitos pró-vasculogênico, com consequente aumento do crescimento dos embriões para todos os estágios de maturação, inclusive nas diferentes concentrações testadas para os estágios SI e SII. Estes resultados sugerem que as β -D-glucanas, isoladas das frutificações nos diferentes estágios de maturação interferem positivamente na formação de vasos sanguíneos e que o efeito pode ser mediado pela atividade imunomoduladora. Em conclusão, as frutificações maduras, que também possuem atividade pró-vasculogênica, devem ser incluídas na produção de nutracêuticos propiciando a utilização otimizada da biomassa do cogumelo.

Palavras chave: *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis*, β -glucanas, nutracêuticos, vasculogênese

ABSTRACT

Agaricus brasiliensis (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.), known in Brazil as Cogumelo Medicinal, Cogumelo do Sol[®], has been widely cultivated in the country because of its medicinal properties, which have been reported on several scientific publications. The mushroom is commercialized in several countries as a nutraceutical product. A nutraceutical is a novel class of dietary supplements, which includes a partially refined extract or dried biomass from the mushroom made into a capsule or tablet. It is utilized because of its potential therapeutical benefits such as immunomodulatory and antitumoral. The fruiting bodies of *A. brasiliensis* are harvested in Brazil mostly in the immature stage, when the cap is still closed to attend morphological standards. Although immature fruiting bodies did not yet achieve their highest biomass, it is at this stage that they reach the highest market value for exportation. The mature fruiting bodies are generally less valued products, sometimes discarded by the farmer or used in the production of nutraceutical products. The quality of a nutraceutical is dependent on the chemical composition of the fruiting body, particularly in relation to the content of β -D-glucans in the cell walls. In this study, we examined the yields and structural composition of water-soluble polysaccharides extracted at 100°C (such as β -D-glucans), of *A. brasiliensis* (strain UFSC-51), in three different stages of fruiting body maturity - immature SI (cap closed) and mature (cap opened): immature spore (SII) and mature spore (SIII). Characterization was performed using spectroscopy techniques (FTIR, ¹³C and ¹H NMR). Additionally, molecular weight of β -D-glucans and protein content were determined in each stage. It was identified a polymer of molecular weight highest than 1,000,000 Daltons, a (1→6)-(1→3)- β -D-glucan, with a low protein content (average 0.61%), in the three maturity stages, with an increase in yields in stage SII and of (1→3)- β -D-

glucans, particularly in stages SII and SIII. As a consequence, mature fruiting bodies of *A. brasiliensis* should be used for nutraceutical production because they contain glucans of important bioactivity. A bioactive test using β -D-glucans from fruiting bodies in different stages and chick embryos (*Gallus domesticus*) was performed to evaluate their vascularization ability. It was observed that β -D-glucans purified from frutifications of *A. brasiliensis* in the three maturity stages selected, showed pro-vasculonogenesis activity, increased embryos growth, in all concentrations tested with fruiting bodies at SI and SII stages. Our results suggest that immunomodulatory activity may act as a mediator in the vasculogenesis process. As a consequence nutraceuticals including a combination of mature fruiting bodies may have the potential of highest vasculogenesis activity and provide the farmers with a more efficient utilization of the mushroom biomass produced.

Key words: *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis*, β -glucan, nutraceutical, vasculogenesis.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. β -D-GLUCANAS EM FUNGOS.....	5
3.2. DESENVOLVIMENTO FÚNGICO.....	13
3.3. MECANISMO DE AÇÃO.....	16
3.4. PROPRIEDADES DE <i>A. blazei</i>	17
3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS β -D-GLUCANAS de <i>A. blazei</i>	22
3.6. BIOENSAIOS COM <i>A. blazei</i>	25
3.6.1. Pré-clínicos.....	25
3.6.2. Clínicos.....	28
3.7. VASCULOGÊNESE.....	30
3.7.1. Aspectos gerais.....	30
3.7.2. Bioensaio em modelos.....	33
3.7.2.1. Bioensaios de <i>A. blazei</i>	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	35

4.2. COLETA DAS FRUTIFICAÇÕES.....	35
4.3. PROCESSAMENTO.....	36
4.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	36
4.4.1. Extração e fracionamento.....	36
4.4.2. Cromatografia de troca iônica.....	37
4.4.3. Cromatografia de exclusão molecular.....	38
4.4.4. Cromatografia de afinidade.....	38
4.5. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DAS AMOSTRAS.....	38
4.6. RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	38
4.7. PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	39
4.8. DOSAGEM DE PROTEÍNA NAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	39
4.8.1. Curva de calibração.....	40
4.8.2. Dosagem.....	40
4.9. ANÁLISE ESTRUTURAL	40
4.9.1. Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	40
4.9.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H	41
4.10. BIOENSAIO DE VASCULOGÊNESE.....	42
4.10.1. Material biológico.....	42
4.10.2. Preparação dos discos de metilcelulose.....	42
4.10.3. Cálculo das dosagens de β -D-glucanas.....	42

4.10.4. Protocolo de implantação nos embriões dos discos contendo β -D-glucanas.....	43
4.10.5. Avaliação da vasculogênese.....	44
4.10.6. Análise estatística dos dados.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	45
5.2. PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	46
5.3. CONTEÚDO DE PROTEÍNAS CONTEÚDO DE PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS.....	47
5.4. ANÁLISE ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE FTIR E RMN DE ^{13}C E ^1H	47
5.5. EFEITOS DAS FRAÇÕES DE β -D-GLUCANAS SOBRE A VASCULOGENESE E O COMPRIMENTO EMBRIONÁRIO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Agaricus brasiliensis Wasser & Didukh (WASSER et al., 2002) (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.), popularmente conhecido como Cogumelo Medicinal, Cogumelo do Sol[®], Himematsutake, é um fungo de cultivo expressivo no Brasil e nativo do continente americano. O fungo, devido às suas propriedades medicinais evidenciadas em diversos trabalhos científicos (WASSER; WEIS, 1999), vem ganhando importância em diversos países que utilizam os cogumelos, principalmente, como nutracêutico. Esse termo é usado para uma nova classe de subprodutos que são obtidos de frutificações (cogumelos) ou do micélio, minimamente processados, e encapsulados para serem consumidos como suplementos dietéticos com propósito terapêutico. As frutificações produzidas pelo fungo podem também ser consumidos *in natura*, constituindo um alimento muito apreciado em diversos países, pelo seu sabor, tornando-se assim um alimento funcional ou nutracêutico (CHANG; BUSWELL, 1996).

Na preparação dos nutracêuticos são utilizadas frutificações em diferentes estágios de maturação, fato que pode influenciar na qualidade desses subprodutos. Pesquisas já foram realizadas envolvendo outras espécies de fungos relacionando os estágios maturação e a quantidade de substância ativa, tendo-se verificado, por exemplo, que existe variação no teor, na estrutura e na atividade biológica das β -D-glucanas (MINATO et al., 2001; MOL, 1989). A produção e o desenvolvimento de nutracêuticos de qualidade requer um conhecimento adequado dos componentes com atividade terapêutica, assim como um controle da qualidade dos produtos finais obtidos a partir do fungo.

Segundo Chang (2000), em 1999, o mercado mundial movimentou cerca de USD 6 bilhões e os EUA cerca de USD 35 milhões no comércio de cogumelos medicinais e subprodutos. A produção e as exportações no Brasil, que é o maior produtor mundial desta espécie, aumentaram

nos últimos anos, passando a sua produção/exportação em 1996 de 7.440 Kg para 32.602 Kg em 2001, porém houve um decréscimo para 20.072 Kg em 2003 (CACE, 2001, 2004).

O interesse na espécie é devido às propriedades anti-mutagênicas, anti-tumorais, anti-virais, anti-trombótica, hipocolesterolêmica, hipolipidêmica e anti-oxidante, atividades essas relacionadas a uma ampla gama de substâncias, como ésteres, ácido linoleico e oleico, proteínas, enzimas, vitaminas e polissacarídeos (BRUM, 2005; CHEN et al., 2004; DELMANTO et al., 2001; EGUCHI et al., 1999; GUTERREZ et al., 2004; HUANG et al., 2004; LUIZ et al., 2003; MATSUI et al., 2003; STAMETS, 1997; WASSER; WEIS, 1999).

Dentre essas substâncias ativas, os polissacarídeos, como as β -D-glucanas, os heteropolissacarídeos e as glicoproteínas, são os principais responsáveis pela atividade anti-tumoral. As β -D-glucanas são constituintes naturais da parede celular de bactérias, fungos e plantas, diferindo entre si pelo tipo de ligações e ramificações, características que lhes conferem estruturas específicas e ações biológicas distintas, sendo, portanto, a característica estrutural um fator fundamental para a ação das β -D-glucanas no sistema imunológico (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; JONG, 2002).

As principais substâncias anti-tumorais presentes nas frutificações de *A. brasiliensis* são o complexo (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana-proteína, na fração insolúvel em água, e na fração solúvel em água, a (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana, sendo esta um referencial importante da atividade antitumoral, pois é responsável por 96,77 % de ação inibitória do crescimento de alguns tipos de tumores (MIZUNO et al., 1990a, 1990b). Já que esta fração contém menor quantidade de proteína, e, portanto, de maior homogenidade, a mesma foi selecionada, com o objetivo de averiguar o rendimento e caracterizá-la estruturalmente em diferentes estágios de maturação das frutificações de *A. brasiliensis*.

O mercado consumidor é exigente quanto aos padrões morfológicos da frutificação, particularmente o estágio de maturação do píleo (chapéu) das frutificações, valorizando as frutificações com píleos fechados - frutificações ainda imaturas, com maior rigidez, porém, com menor rendimento de biomassa. No entanto, as utilizações de frutificações em estágios de maturação mais avançadas (píleo aberto) poderiam viabilizar o maior aproveitamento da biomassa fúngica na produção de nutracêuticos.

Para garantir a qualidade deste nutracêutico, é fundamental averiguar o rendimento e identificar a estrutura das β -D-glucanas nos três estágios de maturação das frutificações – imaturas (píleo fechado), maduras (píleo aberto) com esporos imaturos, e maduras com esporos maduros. É importante ressaltar que existem diversas publicações que apresentam a caracterização estrutural das β -D-glucanas com bioatividade, em diversas espécies de fungos que produzem cogumelos, e aquelas que dispõem de ramificações na cadeia principal e elevado peso molecular têm maior potencial para bioatividade.

Neste trabalho procurou-se, ainda, efetuar um bioensaio de vasculogênese em embriões de *Gallus domesticus* utilizando-se as β -D-glucanas purificadas de *A. brasiliensis*, para averiguar a atividade biológica destas, nos diferentes estágios de maturação das frutificações. Visto que, o processo de vascularização, mais precisamente a neo-angiogênese, está relacionado ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores, algumas substâncias podem inibir ou estimular este processo agindo por diferentes mecanismos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação do rendimento e caracterização estrutural das β -D-glucanas, solúveis em água a 100° C, presentes nas frutificações de *A. brasiliensis* em diferentes estágios de maturação.

Determinação da bioatividade destas β -D-glucanas no processo de vasculogênese em embriões de galinha (espécie *Gallus domesticus*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coleta das frutificações, em diferentes estágios de maturação, frutificações imaturas SI (píleo fechado) e maduras (píleo aberto) SII, esporos imaturos e SIII, esporos maduros.
- Definição de protocolos de extração e purificação de β -D-glucanas solúveis em água a 100° C.
- Avaliação do rendimento das frações de polissacarídeos antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas.
- Caracterização estrutural das β -D-glucanas por espectrometria no infravermelho (FTIR) e de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C .
- Análise do peso molecular e dosagem de proteínas nas frações de polissacarídeos antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas.
- Bioensaios de β -D-glucanas em embriões de galinha para avaliação da vascularização inicial (vasculogênese).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. β -D-GLUCANAS EM FUNGOS

As β -D-glucanas foram identificadas pela primeira vez há 40 anos, e suas atividades imunomoduladora, anti-tumoral e anti-infecções têm sido amplamente estudadas e utilizadas na prática. A maioria das β -D-glucanas com atividade biológica são derivadas de fungos, particularmente as leveduras e estas substâncias são denominadas de modificadores da resposta biológica (*BRM, Biological Response Modifier*), pois interagem e modificam a resposta imunológica (biorregulação) do hospedeiro, controlam a homeostase, regulam o biorritmo, prevenindo várias doenças (DIJKGRAAF et al., 2002; JONG, 2002; ROSS et al., 1999; WASSER; WEIS, 1999).

Desde 1940, cientistas vêm pesquisando um produto obtido a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comercializado como Zymosan® na Europa. Este produto inclui a parede celular da levedura, e é constituído por proteínas, lipídios e polissacarídeos, com capacidade de ativar células independentes do tipo de agressor, vírus, bactérias, fungos, parasitas e células tumorais. Em 1960, foi descoberto que a substância ativa da levedura era o polissacarídeo β -D-glucana, e em 1975, este composto foi testado na forma injetável, em nove pacientes com câncer maligno de pele, no *National Cancer Institute*, obtendo-se significativa redução das lesões, em curto período de tempo (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003). As β -D-glucanas de *S. cerevisiae* estão disponíveis em larga escala já que esta levedura é resíduo da indústria de fermentação cervejeira, e vêm sendo muito utilizado como nutracêuticos (MASON, 2004).

Os cogumelos são consumidos há mais de 2.000 anos na China, como alimentos com benefícios à saúde (alimentos funcionais ou nutracêuticos), sendo que nas últimas décadas têm

sido consumidos como nutracêuticos (suplementos dietéticos) e medicamentos, pois incluem em sua constituição as D-glucanas (CHANG; BUSWELL, 1996, CHANG, 2001). No Japão, as β -D-glucanas são utilizadas no tratamento de câncer desde a década de 70. O primeiro medicamento desenvolvido e que inclui esta substância tem o nome comercial Krestin[®] (Sankyo, Kureha), e provém do fungo *Trametes versicolor*. Também são comercializados o Lentinan[®] (Ajinomoto, Yamanouchi, Morishita), obtido a partir de *Lentinula edodes*, e o Sonifilan[®] (Taito, Kaken) de *Schizophyllum commune* os quais vêm sendo utilizados como medicamentos desde a década de 80 (MIZUNO, 1999). Estes medicamentos são utilizados em pacientes com câncer, como imunoterápicos e como agentes profiláticos na prevenção de infecções (AHN et al., 2004; JONG, 2002).

Geralmente, as β -D-glucanas são consumidas como parte integral dos cogumelos, na dieta normal como nutracêuticos (MILES; CHANG, 1997; WASSER; WEIS, 1999), ou também como nutracêuticos. Esse termo é utilizado para uma nova classe de subprodutos que são obtidos do cogumelo ou do micélio, minimamente processados podendo ser encapsulados para serem consumidos como suplementos dietéticos com propósito terapêutico (CHANG; BUSWELL, 1996; MILES; CHANG, 1997). Esses nutracêuticos obtidos dos cogumelos com propriedades medicinais tem baixa toxicidade, e são consumidos como suplemento alimentar com fins terapêuticos principalmente devido a atividade das β -D-glucanas (CHANG; BUSWELL, 1996; CHANG, 2001).

Nutracêuticos contendo β -D-glucanas são geralmente reconhecidos como seguros (*GRAS, Generally Recognized as Safe*) pelo *Food and Drug Administration (FDA)* nos Estados Unidos, onde são comercializados na forma de extratos, cápsulas ou tabletes (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; BOREK, 2003).

Os nutricêuticos, inclusive aqueles oriundos de cogumelos, tiveram um crescente consumo nos últimos anos, com estimativas de ter movimentado nos Estados Unidos cerca de US\$ 14 bilhões em 2000, com produtos reconhecidos e comercializados na Europa e na Ásia. (ZEISEL, 1999). Existe uma estimativa dos valores totais envolvendo os países asiáticos no mercado mundial de cogumelos medicinais em torno de US\$ 1.600 milhões em 1995 (CHANG, 2001).

No entanto, no Brasil, conforme informe técnico nº 6, de 31 de janeiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os procedimentos sobre cogumelos, inclusive *A. blazei*, nas formas dessecadas inteiras ou fragmentadas e em conserva são considerados alimentos e estão dispensadas da obrigatoriedade de registro (Resolução nº 23/00). Quando avaliados e aprovados pela ANVISA, não são permitidas alegações medicamentosas e ou terapêuticas nos rótulos e no material publicitário dos cogumelos nas formas consideradas alimentos. As formas de apresentação como pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e líquidos, dentre outras, não são considerados alimentos.

Existe polêmica no uso de produtos nutricêuticos, quanto à finalidade terapêutica recomendada aos consumidores, havendo necessidade de estudos das substâncias ativas para cada espécie, que indiquem a eficácia e segurança para tais recomendações terapêuticas (HOLT, 1995, ZEISEL, 1999).

O termo “polissacarídeo” é aplicado aos polímeros de carboidratos que contêm estruturas repetidas, periodicamente, em que as ligações são principalmente do tipo *O*-glicosídica. São compostos basicamente por unidades de açúcares (álcoois ciclizados), que podem estar ligados a peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Muitos açúcares constituintes dos polissacarídeos ocorrem somente numa forma enantiomérica, e usualmente insere-se o prefixo D ou L, apesar de somente a forma D ser encontrada em plantas e fungos. Também se ter

conhecido a estereo-química do carbono anomérico adiciona-se o prefixo α ou β (ASPINALL, 1982).

Os polissacarídeos têm função estrutural, de reserva ou ainda são secretados exogenamente. Os polissacarídeos estruturais incluem a celulose nas plantas superiores e algumas algas, assim como a quitina e as β -D-glucanas em fungos e leveduras (ASPINALL, 1982; JONG, 2002).

As β -D-glucanas dos fungos são polissacarídeos com função estrutural na parede celular do micélio, das frutificações, ou também podem ser exo-polissacarídeos. São estruturas altamente ordenadas, formadas principalmente por resíduos de açúcares D-glucose (anéis do tipo β -D-glucopiranosose), e diferenciam-se pelo tipo de ligações entre as unidades destes açúcares da cadeia principal e por possuírem ramificações (unidade glucosila) conectadas à essa cadeia, com elevado peso molecular (PM), características que lhes conferem estruturas específicas e ações biológicas distintas, sendo, portanto, a característica estrutural um fator fundamental para a atividade das β -D-glucanas no sistema imunológico (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; BROWN; GORDON, 2001; PELOSI et al., 2003).

As β -D-glucanas podem ser solúveis em água originando frações neutras e ácidas, ou insolúveis em água contendo maiores proporções de proteínas (proteoglicanas ou glicoproteínas), ou quitina, sendo neste caso necessário soluções alcalinas para serem extraídas (ASPINALL, 1982).

As β -D-glucanas das frutificações de *Lentinula edodes*, com atividade antitumoral, conhecidas como lentinan, possuem cadeia principal formada por unidades de β -D-glucopiranosose com ligações do tipo (1 \rightarrow 3)- β - e ramificações (1 \rightarrow 6)- β - a cada três unidades de açúcares da cadeia principal (Figura 1). Esta é uma fração do extrato aquoso (100°C) com PM entre 500.000

a 1.000.000 Daltons e estrutura em tripla-hélice, formando gel em solução (CHIARA et al., 1970; MIZUNO, 1999; SAITÔ et al., 1977).

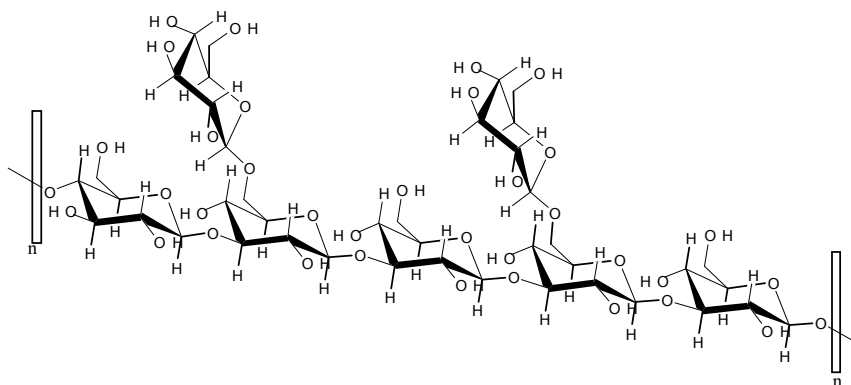


Figura 1. Estrutura da (1→3)-(1→6)-β-D-glucana de *L. edodes*

O fungo *S. commune* secreta o exo-polissacarídeo anti-tumoral conhecido como schizophyllan. Esta β-D-glucana solúvel em água tem estrutura semelhante ao lentinan, PM entre 600.000 e 1.200.000 Daltons, também com estrutura em tripla-hélice e formação de gel (RAU, 2002).

A β-D-glucana da parede celular das frutificações de *Grifola frondosa* também possui atividade anti-tumoral com estrutura primária semelhante ao lentinan e schizophyllan, porém, não foi relatada a estrutura em tripla-hélice e formação de gel (OHNO et al., 1985a). Análises de Ohno et al. (1985b) sugerem que as β-D-glucanas solúveis em água quente e em meio básico tanto a frio como a quente, possuem a mesma estrutura primária de cadeia principal com ligações (1→3)-β- e ramificações do tipo (1→6)-β- a cada três unidades de açúcares da cadeia principal, também descrita por Mizuno et al. (1986) e possuem PM entre 1.000.000 e 2.000.000 Daltons.

Porém, segundo Shigesue, Kodama e Nanba (2000), uma fração do polissacarídeo, β -D-glucanas das frutificações de *G. frondosa*, denominada de Fração-D, possui cadeia principal com ligações do tipo (1 \rightarrow 6)- β - e ramificações (1 \rightarrow 3)- β -, com 30% de proteína, e PM molecular de 1.000.000 Daltons. Esta Fração-D foi extraída com água, em autoclave por 30 minutos, e separada por coluna de cromatografia de troca iônica, utilizando a fração eluída com tampão Tris-HCl (12,5 mM) em pH 7,25 dializada, com rendimento de 30 mg.g⁻¹ das frutificações. Esta fração-D possui grande capacidade de estimular células do sistema imunológico, com estimulação da angiogênese e atividade anti-tumoral, e tem sido comercializada como nutracêutico (Nutrimart[®]).

Heteropolissacarídeos, glicoproteínas e proteoglicanas são geralmente frações insolúveis em água contendo β -D-glucanas com outros açúcares como xilose, manose, ácido urônico, maior quantidade de proteínas, e RNA que também podem possuir atividade biológica (MIZUNO et al., 1990b; MIZUNO, 1999).

As frações de β -D-glucanas ligadas a proteínas possuem maior atividade imunomoduladora quando administradas oralmente do que as frações de β -D-glucanas livres (JONG, 2002). Esta atividade pode estar relacionada com a maior imunogenicidade das proteínas no sistema imunológico (AUDBERT; LISE, 1993). Um exemplo é o polissacarídeo do micélio de *T. versicolor*, conhecido como PSK (Krestin[®]), composto de ramificações (1 \rightarrow 3)- β - e (1 \rightarrow 6)- β - na cadeia principal (1 \rightarrow 4)- α -D-glucanas ligada a 38 % de proteína e PM de 100.000 Daltons que tem sido administrado oralmente no tratamento de câncer nos órgãos do sistema digestório, pulmão e coloretal.

As principais substâncias anti-tumorais presentes nas frutificações de *A. blazei* são o complexo (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana-proteína na fração insolúvel em água, e a estrutura (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)-

β -D-glucana (PM de 2.000.000 Daltons) na fração solúvel em água. Ambas apresentaram potente ação inibitória de crescimento de tumores quando administradas intraperitonealmente e oralmente em ratos (MIZUNO et al., 1990a, 1990b).

Como podemos notar, as β -D-glucanas com ramificações (unidades glucosila) conectadas a cadeia principal por ligações do tipo (1 \rightarrow 3)- β - ou (1 \rightarrow 6)- β - conferem aos fungos o diferencial quanto à bioatividade, pois estas ramificações estabelecem a diferença em relação à estrutura de outros polímeros, tal como a celulose, β -D-glucanas de cadeia linear (JONG, 2002). O grau de ramificações também pode ser um modulador da bioatividade como demonstrado para *S. cerevisiae* que aumentou a atividade das células do sistema imunológico proporcionalmente ao aumento no grau de ramificações (CLEARY; GRAHAM; HUSBAND, 1999).

O peso molecular das β -D-glucanas também é uma característica importante para atividade biológica (CLEARY; GRAHAM; HUSBAND, 1999; SHU et al., 2003). Lentinan e schizophyllan têm baixa atividade quando administrado oralmente devido ao elevado peso molecular das β -D-glucanas (superior a 1.000.000 Daltons), devendo ser administrados de forma intravenosa e intramuscular, respectivamente, para se obter atividade anti-tumoral. Por outro lado, o PSK tem peso molecular inferior (100.000 Daltons) e elevada atividade anti-tumoral quando administrado oralmente (JONG, 2002; MIZUNO, 1999).

Dentre os principais métodos de identificação da estrutura dos polissacarídeos estão a espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e de ressonância magnética nuclear (RMN) (GORIN, 1981; PERLIN; CASU, 1982).

A espectrometria no infravermelho é fundamentada na interação da radiação no infravermelho com a matéria, no caso, a amostra. Radiação eletromagnética com frequências características interagem com a molécula resultando numa absorção desta radiação. As

frequências características para uma molécula em particular dependem de sua vibração, da massa de seus átomos, da geometria espacial, e da força de suas ligações. Tratamentos matemáticos, como a transformada de Fourier, resultam num espectro com frequências características na região do infravermelho entre 4000 cm^{-1} e 200 cm^{-1} (COATES, 2000)

O espectro no infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos de átomos dão origem a absorções que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. A presença destas absorções características, como também a ausência de determinadas absorções de grupos funcionais permite informações estruturais úteis para a identificação de substâncias (COATES, 2000; SILVERSTEIN, 1994).

Espectrometria de RMN é uma forma de espectrometria de absorção onde, sob condições apropriadas fornecidas pelo espectrômetro, núcleos atômicos das moléculas podem absorver radiação eletromagnética na região da radiofrequência determinada por suas características estruturais, e pelos campos eletromagnéticos existentes em sua vizinhança, ou seja, alguns ocasionados por agentes externos e outros intrínsecos ao material analisado (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000; FREITAS; BONAGAMBA, 1999). O espectro de RMN é obtido registrando-se graficamente as frequências dos picos de absorção e intensidades mediante tratamento matemático utilizando a transformada de Fourier (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

A espectrometria de RMN, principalmente de ^{13}C , pode ser usada no monitoramento da pureza de preparações de polissacarídeos. As similaridades de multicomponentes de sistemas biológicos, como existe na parede celular de fungos, podem ser analisadas quanto à variação de cada polissacarídeo, uma vez que os sinais característicos são identificados. É um método não-destrutivo da amostra, possibilitando examinar o polímero sem modificar ou degradar sua estrutura, recuperando o material intacto (GORIN, 1981; PERLIN; CASU, 1982).

3.2. DESENVOLVIMENTO FÚNGICO

No cultivo de uma espécie com o objetivo de produzir frutificações (ou cogumelos) diversos parâmetros ambientais devem ser considerados, distintos para diferentes fungos, tal como a temperatura, umidade, trocas de ar e luminosidade específicos, em cada fase do cultivo. A primeira fase no processo de cultivo denomina-se incubação, ou corrida miceliana, com duração de 30-40 dias e envolve o crescimento miceliano no substrato. A segunda fase consiste em propiciar o desenvolvimento dos primórdios, estrutura que precede a frutificação. Para que isso aconteça, procedimentos apropriados de indução, geralmente envolvendo modificações ambientais, como a adição de uma camada de cobertura ao substrato, e o aumento de ventilação para redução da concentração de CO₂, um inibidor de frutificação, devem ser propiciados. Esta fase denomina-se indução. A terceira e última fase consiste no crescimento do corpo de frutificação, que se denominou inicialmente primórdio e que crescendo apresenta diversos estágios tal como: botão, seguidamente o cogumelo imaturo (véu fechado, píleo fechado, e esporos imaturos) e por último o cogumelo completamente maduro (píleo aberto e esporos deiscentes) (IWADE; MIZUNO, 1997; STAMETS, 2000).

Mol (1989) observou que o micélio de *Agaricus bisporus* (*champignon*), fungo com características morfológicas semelhantes a *A. brasiliensis* colonizou o substrato principalmente pelo crescimento apical das hifas distribuídas no substrato em ramificações filamentosas frouxas. No decorrer do desenvolvimento, as hifas formaram os primórdios (1 - 2 mm de diâmetro), um agregado de hifas que se orientaram para a formação do botão (5 mm de diâmetro), no qual o fungo já se encontrava morfogeneticamente completo, havendo apenas diferenciação do estípote (pé), píleo e lamelas que são estruturas encontradas nas frutificações em maturidade. Estas estruturas desenvolveram-se a partir de um processo de expansão das hifas existentes. A expansão das frutificações ocorreu após uma alongação continuada da estípote durante 7 – 8 dias.

Depois deste período, o píleo se abriu, estendendo-se o véu ou anel e após o seu rompimento ocorreu a liberação dos basidiosporos (esporos) marrons escuros, durante 2 – 3 dias.

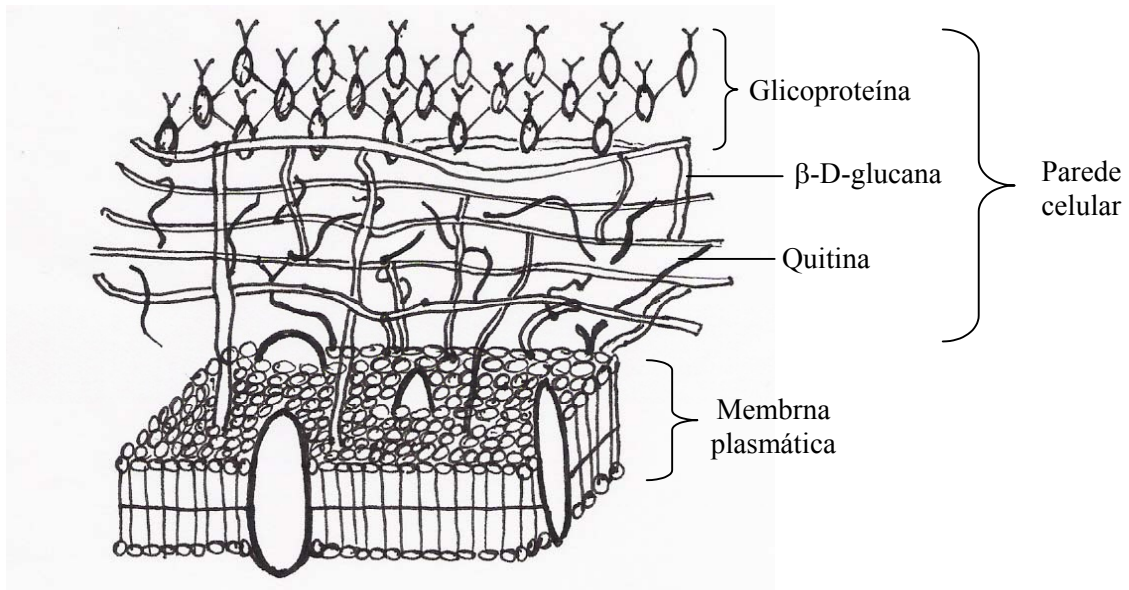


Figura 2. Esquema da estrutura da parede celular de fungos baseado em Yamaguchi (2003)

A parede celular dos fungos é formada basicamente por β -D-glucanas ligadas a quitina (glucosaminaglicana), e proteínas (Figura 2). A rápida expansão das frutificações, sobre pressão de turgor, adquire certo grau de plasticidade devido ao crescimento em extensão da parede celular, diferente das hifas do micélio. As diferenças foram encontradas no complexo glucana-glucosaminaglicana, estrutura morfogeneticamente importante, que dispõe de menor número de ligações nas frutificações e de uma reorientação da parede, aumentando a flexibilidade, permitindo alongação axial, e inserção de novos polímeros até um máximo de expansão (MOL; VERMEULEM; WESSELS, 1990). Para tanto, entre outras mudanças químicas/enzimáticas, existe um aumento na proporção de ramificações do tipo (1→6)- β - na cadeia principal (1→3)- β -

D-glucanas, no caso de *Agaricus bisporus* (MOL; WESSELS, 1990). A reestruturação das β -D-glucanas é requerida durante o crescimento das frutificações, micélio, esporulação, e envolve glucanases e gluconosiltransferase localizadas na superfície celular (DIJKGRAAF; HUIJUAN; BUSSEY, 2002).

Minato et al. (2001) verificaram nas espécies medicinais de cogumelos, *L. edodes* (Berk.) Sing e *G. frondosa* (Dicks:Fr.) S.F. Gray, que as concentrações de β -D-glucanas, determinadas por imunoenaios (ELISA), aumentaram durante a maturação das frutificações seguida de diminuição no final da maturação (Tabela 1). Também para o estágio II (píleo aberto moderadamente), de ambos os cogumelos, a atividade biológica *in vitro* foi máxima na estimulação de macrófagos.

Gunde-Cimerman e Cimerman (1995) verificaram que a lovastatina, substância de interesse terapêutico, obtida do fungo *Pleurotus ostreatus* encontrou-se distribuída em diferentes concentrações no micélio vegetativo, nas diversas fases de maturação das frutificações, assim como nas diferentes partes estruturais da frutificação, píleo e estípite.

Tabela 1. β -D-glucanas de *L. edodes* e *G. frondosa* em diferentes estágios de maturação da frutificação

Estágio de maturação	Glucanas (mg.g ⁻¹ peso fresco)	
	<i>L. edodes</i>	<i>G. frondosa</i>
Estágio I (píleo fechado)	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Estágio II (píleo aberto moderadamente)	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,8
Estágio III (píleo aberto completamente)	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1

Fonte: Minato et al. (2001)

3.3. MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo de ação anti-tumoral das β -D-glucanas é diferente da quimioterapia convencional, já que atua ativando e reforçando as diversas funções imunológicas do hospedeiro constituindo-se, portanto, em um tratamento do tipo imunoterápico, na ativação de células NK, macrófagos, liberação de citocinas/interleucinas, estimulação de células T, produção de anticorpos (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; JONG, 2002; MIZUNO, 1999).

As β -D-glucanas são reconhecidas pelo sistema imune inato de vertebrados através de receptores de superfície celular, designados primariamente para o controle de patógenos fúngicos (ADEREM; ULEVITCH, 2000). Elas reconhecem e se ligam a receptores de diversas células humanas, principalmente leucócitos do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos, e NK (*Natural Killer*), como também de células não-imunes como as endoteliais, e os fibroblastos (BROWN; GORDON, 2003). Recentemente, foram descobertos os receptores de β -D-glucanas: CR3, dectin-1 e lactosilceramida.

Os CR3 são receptores celulares responsáveis por diversas atividades *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas (TNF- α , IFN- α , IFN- γ , e IL-6) em células NK, principalmente na presença de patógenos (ROSS et al., 1999).

Os receptores do tipo dectin-1 possuem um ligante para polissacarídeos exógenos e outro ligante co-estimulatório para células T. Estão presentes nas células dendríticas (CD), apresentadoras de antígenos, com potente capacidade de ativar células T do baço e timo, nas células de Langerhans da pele (ARIIZUMI et al., 2000) e também em macrófagos, principalmente do fígado, pulmão e timo (BROWN; GORDON, 2001).

Alguns estudos (BROWN; GORDON, 2003; ZIMMERMAN et al., 1998) demonstraram que os receptores celulares do sistema imunológico, dectin-1 de monócitos e macrófagos e

lactosilceramida de linfócitos, por exemplo, reconhecem principalmente as ligações do tipo (1→3)- β - e (1→6)- β -. No entanto, não há um consenso sobre a estrutura básica requerida para a atividade biológica das β -D-glucanas. Características importantes das β -D-glucanas que interferem na bioatividade são o peso molecular, o tipo de ligação e o grau de ramificação da cadeia principal (BROWN; GORDON, 2001; MATSUI, 2001; MIZUNO, 1999; PELOSI et al., 2003).

3.4. PROPRIEDADES DE *A blazei*

Segundo Freeman (1979), o primeiro espécime de *A. blazei* foi coletado na Flórida por R.W. Blaze e descrito por Murrill em 1945. Nas décadas de 60-70 foram coletados no Brasil (Piedade, São Paulo), espécimes de cogumelos denominados *Agaricus blazei* ss. Heinem., e levados para o Japão por pesquisadores interessados nas propriedades medicinais e no cultivo deste cogumelo. Desde então diversos trabalhos científicos têm sido publicados relacionando as atividades biológicas, principalmente anti-tumorais, às β -D-glucanas da parede celular da espécie (MIZUNO et al., 1990a; 1990b; KAWAGISHI et al., 1990, OHNO et al, 2001) e diversas patentes descrevem a produção e o uso dessas β -D-glucanas (Tabela 2). Na década de 90, iniciou-se o cultivo da espécie no Brasil, devido às condições climáticas ótimas, já que é uma espécie nativa do continente americano (IWADE; MIZUNO, 1997).

Taxonomicamente, o fungo é classificado na classe dos Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Agarycomycetidae, tribo Agariceae, seção Arvenses, gênero *Agaricus*, espécie *Agaricus blazei* ss. Heinem. Recentemente, Wasser et al. (2002) propuseram para as linhagens brasileiras uma nova denominação, *Agaricus brasiliensis*. No presente trabalho a denominação *A. blazei* é utilizada quando se refere a trabalhos já publicados com tal denominação taxonômica, e a

denominação *A. brasiliensis* é utilizada para a estirpe relacionada, identificada anteriormente por Neves (2000).

Tabela 2. Patentes de cultivo e produtos de *A. blazei* registradas nos Estados Unidos

Número da Patente	Portador	Inventores	Título	Data
U.S. Patent 5,048,227		Okubo, J.; Kazukuni, K.; Ohkubo, S.	Método de cultivo do cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	1991
U.S. Patent 6,093,694	Surimoto Forestry Co., Ltd., Japan	Fujimiya, Y.; Ebina, T.	Substâncias com atividade anti-tumoral	2000
U.S. Patent 6,120,772	H. Ito; Iwade Research Institute of Mycology Co., Ltd., Japan	Ito, H.; Sumiya, T.	Droga oral para tratamento da AIDS	2000
U.S. Patent 6,197,571	Agaricus Laboratories Co., Ltd., Japan	Hikichi, M.; Okubo, S.; Hiroe, E.	Polissacarídeo-proteína	2001
U.S. Patent 6,378,244	IMB Kabushiki Gaisha, Japan	Iwata, M.; Furuya, K.	Método de cultivo de frutificações de <i>Agaricus blazei</i> em câmara de cultivo artificial	2002
U.S. Patent 6,465,218	Japan Applied Microbiology Research Institute Co., Ltd., Japan	Horiuchi, I.; Suyama, T.; Morio, T.	Substância biologicamente ativa e processo de preparação do mesmo	2002
U.S. Patent 6,490,824	Tsukuba Biosystems, Ltd., Japan	Maekawa, T.; Intabon, K.	Método de cultivo do fungo basidiomiceto em meio de cultura líquido.	2002
U.S. Patent 6,558,943	Sun Tem Pharmaceutical Co., Ltd., Taiwan	Li, P.; Shen, C.	Método de propagação do fungo usando fermentação em meio sólido	2003
U.S. Patent Application 20020119164	Japan	Uchiyama, S.; Haramaki, K.	Uso de <i>Agaricus blazei</i> Murrill para prevenir e tratar a pele e outras desordens	2002
U.S. Patent Application 20020110564	China	Itokawa, M.	Composição nutricional e métodos	2002
U.S. Patent Application 20020188025	Japan	Ozeki, M.; Yao, H.; Okubo, T.; Juneja, L. R.	Composição de promotores do sono	2002
U.S. Patent Application 20030017249	Japan	Ichinose, T.; Naoki, Y.; Mizoguchi, T.; Nanba, Y.; Kubota, H.	Composição de bebida/alimento	2003
U.S. Patent Application 20030064484	Japan	Horiuchi, I.; Suyama, T.; Morio, T.	Processo de preparação de substância biologicamente ativa	2003
U.S. Patent Application 20030104006	Japan	Maekawa, T.; Isoda, H.	Atividade da Hialuronidas e inibição da atividade de células alergênicas	2003
U.S. Patent Application 20030082793	Japan	Maekawa, T.; Isoda, H.	Método para preparação de extrato aquoso ativo fisiologicamente e para potenciar a atividade desta	2003

Este cogumelo pode ser consumido como nutracêutico, nutricêutico, e possui elevado potencial na área da indústria farmacêutica como medicamento e cosmético, obtidos a partir de suas frutificações ou ainda da biomassa miceliana de fermentação líquida ou sólida.

O termo nutracêutico se refere aos alimentos funcionais que são consumidos como parte da dieta normal, têm elevados valores nutricionais e beneficiam a saúde (MILES; CHANG, 1997; WASSER; WEIS, 1999), sendo assim *A. blazei* é consumido pelo valor protéico, mineral, vitamínico, além de apresentar grandes quantidades de polissacarídeos importantes e ergosterol (tabela 3).

Os carboidratos de *A. blazei* contêm os açúcares glicerol, manitol, inositol e trealose. Na composição das proteínas são encontrados todos os aminoácidos, exceto o triptofano. O aminoácido mais abundante em *A. blazei* é o arginina ($9,3 \mu\text{mol.g}^{-1}$ peso seco), seguido de glicina, ácido glutâmico, prolina, e pequenas quantidades de aminoácidos contendo enxofre. Os lipídios apresentam importantes óleos essenciais para o metabolismo celular dos vertebrados como ácidos oleico, linolenico e linoleico (CHO; JANG; PARK, 2004).

Tabela 3. Composição do cogumelo *A. blazei* desidratado

Componentes	Quantidade		
	%	ppm	mg
Água	7 - 10		
Proteínas	40 - 45		
Carboidratos	38 - 45		
Lipídios	3 - 4		
Fibras	6 - 8		
Cinzas	5 - 7		
Potássio	2,97		
Ergosterol (pró-vitamina D)	0,1 - 0,2		
Fósforo		7486	
Magnésio		528	
Sódio		118	
Manganês		2	
Cobre		14	
Ferro		6	
Vitamina B ₁			0,3
Vitamina B ₂			3,2
Niacina			49,2

Fonte: Mizuno et al. (1990a)

Para a legalização de produtos com propriedades e alegações terapêuticas, tanto para o uso nutricional como farmacêutico (APÊNDICE A) são necessários estudos pré-clínicos e clínicos que comprovem a atividade biológica das substâncias ativas presentes nestes produtos.

A. blazei é conhecido principalmente por suas propriedades anti-mutagênicas, anti-clastogênica, anti-tumoral, anti-viral (utilizada conjuntamente com vacinas anti-hepatite), anti-oxidante, hipocolesterolêmica, hipolipidêmica, hepatoprotetora e anti-trombótica (CHEN; SHAO; SU, 2004; DELMANTO et al., 2001; EGUCHI et al., 1999; GUTERREZ et al., 2004; HUANG et al., 2004; LUIZ et al., 2003; MATSUI et al., 2003; STAMETS, 1997; WASSER; WEIS, 1999).

Estudos pré-clínicos utilizando *A. blazei* têm demonstrado eficácia e segurança (baixa toxicidade), sendo pré-requisitos para os testes clínicos que viabilizam seu uso terapêutico em pacientes e também como nutricêuticos. No país existem diversos trabalhos comprovando atividade hepatoprotetora, anti-carcinogênica e anti-mutagênica dos extratos aquosos, e de frutificações pulverizadas consumidos por via oral (DELMANTO et al., 2001; LUIZ et al. 2003; RIBEIRO; SALVADORI, 2003). Esses bioensaios em animais experimentais podem assegurar a subsequente realização dos testes clínicos, e ambos dão suporte à legalização dos produtos nutricêuticos no país.

Algumas empresas que possuem marcas registradas de nutricêuticos registraram na ANVISA através da Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999, registro de ‘novos alimentos’ e após o vencimento do prazo de dois anos, obtiveram liminar para continuar comercializando seus produtos nutricêuticos. Mais recentemente, outras empresas não obtiveram o registro de seus nutricêuticos devido às alegações da ANVISA de que não existem estudos científicos que comprovem as propriedades medicinais de *A. blazei*.

No entanto, a maioria dos estudos não foram realizados com β -D-glucanas purificadas, mas somente com os extratos brutos das frutificações de *A. blazei*. A potencialidade das β -D-glucanas de *A. blazei* dependem dos testes pré-clínicos e clínicos, da otimização do cultivo e do

estabelecimento de métodos de extração destes polissacarídeos em escala comercial, ou também da produção comercial de quantidades suficientes destes polissacarídeos obtidos a partir de biomassa miceliana por fermentação líquida e/ou sólida.

3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS β -D-GLUCANAS DE *A. blazei*

No corpo de frutificação de *A. blazei* encontram-se as β -D-glucanas, β -D-glucanas ligadas a proteínas, e α -D-glucanas; por outro lado na biomassa micelial de cultura submersa (fermentação líquida) foi encontrado um complexo glucomanana-proteínas (ATOM) (MIZUNO et al., 1990a; MIZUNO, 1999; WASSER; WEIS, 1999; OHNO et al., 2001).

A estrutura das β -D-glucanas encontradas nas frutificações depende da solubilidade e do método de extração havendo um consenso que as β -(1 \rightarrow 6)-D-glucanas compõem a cadeia principal (MIZUNO et al., 1990a; 1990b; KAWAGISHI et al., 1990, OHNO et al, 2001). Assim *A. blazei* é uma das poucas espécies que dispõe desta estrutura em sua cadeia principal, sendo que recentemente Shigesue, Kodama e Namba (2000) descreveram estrutura semelhante para a fração-D de *G. frondosa*, porém com maior quantidade de ramificações (1 \rightarrow 3)- β - na cadeia principal (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana, conferindo intensa bioatividade.

As principais β -D-glucanas presentes nas frutificações de *A. blazei* são (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas solúveis em água a 100°C (MIZUNO et al., 1990a; OHNO et al. 2001) e (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana-proteína, insolúvel em água, porém solúvel em meio básico. Esta fração possui 43,3% de proteína e 50,2% de polissacarídeo constituído de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana, porém sem ramificações (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas (MIZUNO et al., 1990b; KAWAGISHI et al., 1990).

Ohno et al. (2001) analisando a estrutura das β -D-glucanas de *A. blazei* confirmou a presença de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana como cadeia principal, mas não constatou nos espectros de

RMN de ^{13}C o sinal da ramificação (1→3)- β -, tanto das frações solúveis como das insolúveis em água. Considerando que a cadeia linear (1→6)- β -D-glucana extraída do fungo *Penicillium islandicum* não possuiu bioatividade (OHNO et al., 1986), procurou-se identificar a estrutura que conferiu bioatividade confirmando-se a presença das (1→3)- β -glucanas por imunoenaios, métodos enzimáticos e reações químicas de identificação de *O*-substituições do polissacarídeo. Desta forma foi confirmada a estrutura (1→6)-(1→3)- β -D-glucanas também para as frações insolúveis em água.

Dong et al. (2002) investigaram as β -D-glucanas solúveis em água a 100°C, por diversos tipos de análises como composição dos açúcares, metilação, degradação de Smith, hidrólise branda e espectroscopia de RMN de ^{13}C . Essa fração composta principalmente por unidades de D-glucose, possuiu estrutura (1→6)-(1→3)- β -D-glucana, sendo proposta pelos autores a cadeia principal com ligações (1→6)- β - e duas unidades glucosilas do tipo (1→3)- β - ligada a cada três unidades de D-glucose da cadeia principal (Figura 3).

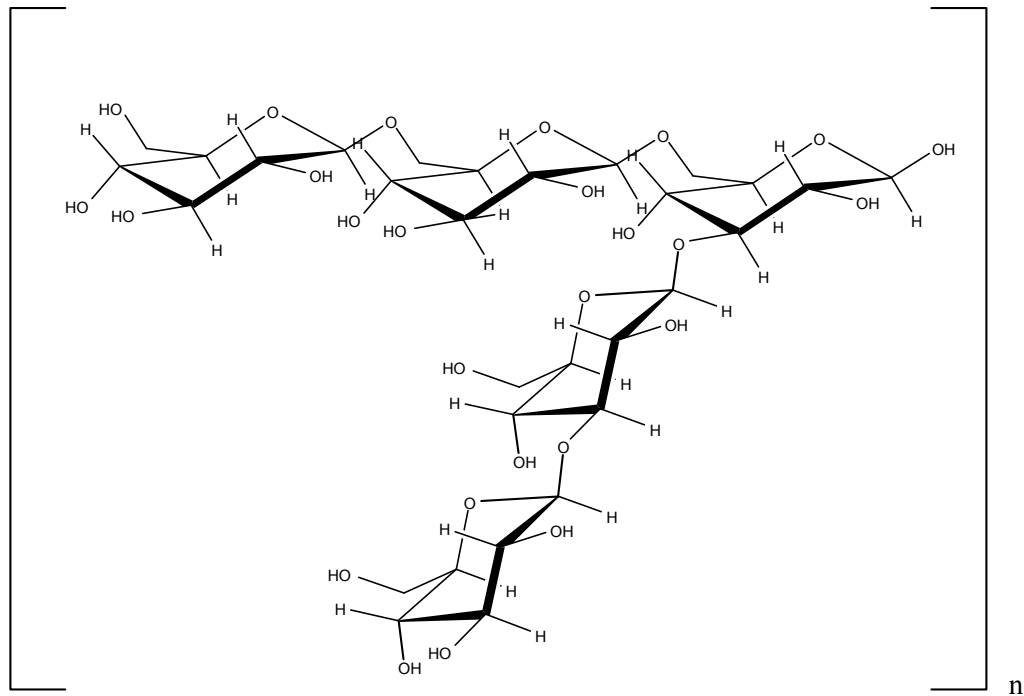


Figura 3. Estrutura química da (1→6)-(1→3)-β-D-glucanas, extraídas em água a 100°C das frutificações de *A.blazei*, com cadeia principal de ligações do tipo (1→6)-β- e duas unidades glucosilas (1→3)-β- ligada a cada três unidades de D-glucose, proposta por Dong et al. (2002)

No entanto, não existem trabalhos que demonstrem diferenças qualitativas e quantitativas em relação à β-D-glucanas desta espécie em diferentes estágios de maturação das frutificações. As β-D-glucanas de *A. blazei* com píleo fechado deve ter sido o estágio utilizado pela maioria dos autores que apresentam trabalhos de identificação de estrutura.

Um dos objetivos do isolamento de um polissacarídeo, como de outras macromoléculas, é obter maior rendimento possível, com maior pureza e homogeneidade do material, facilitando os estudos de suas características estruturais e atividade biológica. Para tanto, alguns problemas devem ser evitados como a degradação dos polissacarídeos e também os contaminantes constituintes do fungo como os lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e quitina (ASPINALL, 1982).

A extração do polissacarídeo solúvel em água tem vantagens porque desta forma se mantém a estrutura química sem quebra das ligações covalentes interpoliméricas, pois extrações em condições ácidas ou alcalinas propiciam modificações na estrutura ou degradação do polissacarídeo (ASPINALL, 1982).

A solubilidade também é importante quando se almeja maior pureza das β -D-glucanas. As frações de polissacarídeos de *A. blazei* solúveis em água a 100°C, separada por sais de NaCl (fração levemente ácida), possuem menor quantidade de proteínas do que as frações insolúveis em água a 100°C (MIZUNO et al., 1990a; 1990b; KAWAGISHI et al., 1990, OHNO et al., 2001). No entanto, se o objetivo é obter somente β -D-glucanas para estudos de estrutura e bioensaios, um máximo de pureza e homogeneidade da amostra são requeridas.

3.6. BIOENSAIOS COM *A. blazei*

3.6.1. Pré-clínicos

O principal efeito terapêutico do *A. blazei* está relacionado com a atividade biológica dos polissacarídeos, principalmente (1→6)-(1→3)- β -D-glucanas presentes nas frutificações. A fração solúvel em água a 100°C, avaliada sobre o Sarcoma 180 em ratos, apresentou 96,77 % de ação inibitória do crescimento de tumores sólidos, além de um aumento significativo na proliferação de linfócitos T e B *in vitro*, o que constitui um referencial importante de atividade anti-tumoral das β -D-glucanas (DONG et al., 2002; MIZUNO et al., 1990a).

Fujimiya et al. (1998) avaliaram a atividade da fração ácida do polissacarídeo solúvel em água a 100°C obtido das frutificações de *A. blazei* que contêm (1→6)- β -D-glucana e (1→4)- α -D-glucana, sobre células tumorais da linhagem MethA para indução de tumores em ratos. A inibição do tumor primário e da metástase se mostrou relacionada com o aumento das células

NK (efeito citotóxico) no local do tumor primário e em locais distantes. Estas D-glucanas também demonstraram ação inibitória direta sobre a proliferação de células tumorais através da apoptose, sem afetar células normais, indicando uma ação citotóxica seletiva.

Nakajima et al. (2002) avaliaram *in vivo* o extrato solúvel em água a 100°C, contendo β -D-glucanas, administradas intra-peritonealmente em ratas fêmeas saudáveis. Os resultados obtidos sugerem que os polissacarídeos de *A. blazei* possuem ação imunomodulatória, estimulando as células T e aumentando a expressão de citocinas/interleucinas IL-6 e IL-1 β , a diferenciação de células B e produção de anticorpos, e também dos receptores CR3 (Mac-1), B7-1 e CD25, marcadores de superfície que reconhecem células tumorais e patógenos (JANEWAY et al. 2002).

Em outra abordagem referente à atividade anti-tumoral (sobre tumor sólido de Sarcoma 180 em ratos) de *A. blazei*, Kawagishi et al. (1989) e Mizuno et al. (1990b), demonstraram que o polissacarídeo solúvel na fração alcalina, obtida da fração insolúvel em água a 100°C, com maior atividade é o composto (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana-proteína. Esse complexo, quando fracionado por hidrólise ácida para separar proteína (43,3 %) de polissacarídeos (50,5 %), demonstrou que as β -D-glucanas isoladas ainda apresentaram ação anti-tumoral, ou seja, de 52,5 % de inibição do crescimento tumoral (KAWAGISHI et al., 1990). No entanto, Ohno et al. (2001) demonstraram através do mesmo modelo que o polissacarídeo desta fração insolúvel com atividade anti-tumoral possui cadeia principal (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana com ramificações (1 \rightarrow 3)- β -.

Partículas da frutificação e do micélio de *A. blazei* foram testadas *in vitro* e demonstrou a inibição da proliferação de células de tumor da linhagem TCP – 1, na presença de células do soro humano. As partículas de *A. blazei* converteram fator B em fator B-ativado do soro humano (células nucleadas periféricas) e ativaram C3 à iC3b, com formação do complexo iC3b – *A.*

blazei, e este complexo atuou em células tumorais. Os resultados sugerem que a ativação do sistema complemento ocorreu através de uma via alternativa, dose e tempo-dependentes, com citotoxicidade específica sobre células tumorais (SHIMIZU et al., 2002).

Testes *in vitro* também foram realizados, tais como, o monitoramento da capacidade do polissacarídeo de ativar macrófagos e conseqüentemente liberar citocinas (TNF- α), sendo que a maior liberação de TNF- α ocorreu na presença de polissacarídeo de peso molecular superior a 1.000.000 Daltons. A atividade biológica dos polissacarídeos micelianos produzidos por fermentação líquida dependeram do seu peso molecular, o qual, por sua vez, foi relacionado ao tempo de fermentação (SHU; WEN; LIN, 2003).

A tabela 4 resume os principais experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados com β -D-glucanas de *A. blazei* e o seu mecanismo de ação. Em alguns destes trabalhos foram relatados que as β -D-glucanas de *A. blazei* apresentaram citotoxicidade específica sobre células tumorais, contudo, não apresentaram toxicidade para células normais (FUJIMIYA et al., 1998; SHIMIZU et al., 2002).

Tabela 4. Principais experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* com β -D-glucanas de *A. blazei* e mecanismo de ação

Glucanas	Atividade		Mecanismo de Ação	Autores
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
(1→6)- β -D-glucana-proteína		Anti-tumor Sarcoma 180		Kawagishi et al. (1989, 1990); Mizuno et al. (1990b)
(1→6)-(1→3)- β -D-glucana		Anti-tumor Sarcoma 180		Mizuno et al. (1990a)
(1→6)- β -D-glucana-proteína		Anti-tumor Meth A	↑ linfócitos T _{aux.} ↓ linfócitos T _{supres.}	Itoh et al. (1994)
(1→4)- α -D-glucana (1→6)- β -D-glucana-proteína		Anti-metástase Meth A (intra-tumoral)	Imunoestimuladora com citotoxicidade seletiva	Ebina et al. (1998)
(1→4)- α -D-glucana (1→6)- β -D-glucana-proteína	Tumoricida em células de tumor Meth A	Anti-tumor e anti-metástase Meth A	Citotoxicidade seletiva, ↑ NK e apoptose	Fujimiya et al. (1998, 1999)
(1→6)-(1→3)- β -D-glucana e (1→6)-(1→3)- β -D-glucana-proteínas		Anti-tumor Sarcoma 180	Imunoestimuladora	Ohno et al. (2001)
(1→6)-(1→3)- β -D-glucana	Proliferação de linfócitos T e B			Dong et al. (2002)

3.6.2. Clínicos

Estudos clínicos, no Japão e China realizados entre 1992 e 2003, demonstraram que pacientes com tumores malignos que utilizaram *A. blazei*, juntamente com tratamento quimioterápico ou radioterápico, diminuíram os efeitos colaterais, promovendo hematopoiese, em comparação ao grupo de pacientes que utilizaram somente o tratamento quimioterápico (JING et al., 1994; RONG et al., 1995; RUWEI et al., 2002; AHN et al., 2004).

O retardo na hematopoiese, causado pela quimioterapia em pacientes com tumor maligno no trato alimentar (n = 20), foi diminuído no grupo experimental tratado com chá obtido de extração aquosa a 100°C de *A. blazei* (20 g/dia) e, conseqüentemente houve um aumento na concentração de hemoglobinas, glóbulos brancos do sangue (leucócitos - células do sistema imunológico), e plaquetas. Nesses pacientes, as imunoglobulinas (IgG, IgM, IgE) não aumentaram significativamente, mas também não diminuíram como ocorreu com o grupo controle (sem suporte de *A. blazei*). Além disso, a relação albumina/globulina se manteve normal, indicando uma possível inibição do processo tumoral, sem disfunção hepática (JING et al., 1994).

Pacientes com leucemia aguda não-linfocítica (n = 20) receberam além da quimioterapia, tratamento simultâneo com *A. blazei*, também na forma de chá obtido de extração aquosa a 100°C de 20 g de cogumelo por dia, durante 3 meses (grupo experimental, n = 10) e foram comparados ao grupo controle que recebeu tratamento suporte padrão para redução dos efeitos da quimioterapia. No grupo experimental, além do aumento do número de células sanguíneas, houve uma diminuição nos casos de infecções pulmonares, faringolaríngeas e intestinais (RONG et al., 1995).

Testes clínicos também foram realizados em pacientes (n = 56) com tumores em diferentes órgãos (nasofaringe, pulmão, estômago, fígado e intestino), sob tratamento quimioterápico. O grupo controle recebeu tratamento com um imunoestimulador padrão (Polyactin-A[®]) usado na China. Para o grupo experimental (n = 30) foram administrados tabletes (6 g/dia) contendo β -D-glucanas e α -D-glucanas, de uma mistura de fungos com atividade imunoestimuladora, na qual o *A. blazei* compunha 40 % da formulação. Este último grupo apresentou aumento no número de

leucócitos, diminuição do número de episódios de vômito por dia e aumento do apetite, comparados ao grupo controle (RUWEI et al., 2002).

Em outra abordagem experimental, um grupo de cem mulheres portadoras de diversos tipos de câncer ginecológico (ovariano, endometrial e cervical) foi submetido à quimioterapia, sem ou com consumo oral de *A. blazei* (grupo experimental, n = 39), no período de 3 e 6 semanas. No grupo que recebeu tratamento associado ao consumo de *A. blazei* foi observado um aumento significativo nas células NK ativas, comparado ao grupo não tratado com *A. blazei* (grupo placebo, n = 61). As maiores diferenças observadas foram referentes às condições físicas e psicológicas das pacientes com redução dos efeitos como insônia, perda do apetite, alopecia, perda de peso, náusea, vômito e desconforto (AHN et al., 2004).

A maioria desses testes clínicos demonstrou a atividade de *A. blazei* como protetor da hematopoiese e imunestimulador, visando a legalização da espécie para fins terapêuticos, e disponibilizando-a para o comércio, pois os nutracêuticos oriundos deste fungo são consumidos, com segurança, em outros países que importam a produção de cogumelos do Brasil.

3.7. VASCULOGÊNESE

3.7.1. Aspectos gerais

A vasculogênese é um termo referente à vascularização primordial, a partir de células progenitoras endoteliais (angioblastos), durante o desenvolvimento embrionário, que atualmente tem sido usado para descrever processos similares em adultos (ZAMMARETTI; ZISCH, 2004). Em tecidos de adultos as células precursoras endoteliais circulantes podem contribuir para a formação de novos vasos juntamente com a angiogênese e a arteriogênese, ou seja, na

neoformação de vasos a partir dos pré-existentes, como no caso de doenças cardiovasculares (SIMONS; WARE, 2003).

Vasculogênese e angiogênese estão intimamente relacionadas na fase embrionária, principalmente devido à atuação comum dos fatores de crescimento angiogênicos como VEGF e FGF, considerados fatores importantes de ativação na formação de vasos nos dois períodos, estimulando os mecanismos de proliferação, migração e diferenciação de células progenitoras endoteliais. Citocinas como GM-CSF (fatores estimuladores de colônia de macrófagos e células T), também estimulam a divisão e a diferenciação dessas células-tronco (ZAMMARETTI; ZISCH, 2004; CARMELIET, 2003).

Células progenitoras endoteliais em adultos normalmente residem na medula óssea, mas podem ser mobilizadas, devido a danos nos vasos e doenças isquêmicas, para a circulação, através de sinais como citocinas, fatores de crescimento angiogênicos, hormônios, ou drogas, incorporadas nos locais de atividade angiogênica, onde ocorre a diferenciação em células endoteliais que formarão novos vasos durante a regeneração de tecidos e, também, em casos de tumores (FOLKMAN, 1971; ZAMMARETTI; ZISCH, 2004).

Durante o desenvolvimento embrionário a angiogênese está relacionada à remodelagem da vascularização primária com a formação de novos capilares, importante no desenvolvimento dos órgãos e sistemas. No adulto, o processo de angiogênese ocorre nos ciclos de reprodução (proliferação do endométrio), na gravidez (desenvolvimento placentário), no crescimento dos cabelos, inflamação e na cicatrização. O desenvolvimento dos vasos sanguíneos é estritamente regulado por um equilíbrio dinâmico entre a ativação e a inibição do processo de formação de vasos. Este é mediado por fatores (sinais) pró-angiogênicos - tais como o fator de crescimento

vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) - e anti-angiogênicos, como a angiostatina (KERBEL; FOLKMAN, 2002).

O desequilíbrio nesta regulação entre fatores pró e anti-angiogênicos pode estar relacionado com o desencadeamento de enfermidades, devido ao fato de que a expansão do sistema vascular está envolvido em processos fisiopatológicos como a oncogênese ou o crescimento de metástases de tumores (FOLKMAN, 1971). Também pode fazer parte de processos patológicos, como endometriose, retinopatias em quadros de diabetes, psoríase, e artrite reumatóide (CARMELIET, 2003; DIAS et al., 2003). Drogas anti-tumorais com atividade anti-estrogênica não-esteroidal como o clomifeno, tamoxifeno e nafoxidine (antagonistas parciais de receptor de estrógenos) e outros, esteroidais, também demonstraram ação inibitória da angiogênese, em membranas corialantóicas (CAM) de embriões de galinha (GAGLIARDI; COLLINS, 1993).

Por outro lado, a terapia pró-angiogênica pode ser uma solução viável em casos de isquemias cardiovasculares, no sentido de estimular a formação de vasos sanguíneos com a finalidade de restaurar determinados tecidos, acelerar a cicatrização e reverter a isquemia (JANAVEL et al, 2001). O desenvolvimento de drogas capazes de estimular a revascularização destas regiões isquêmicas tem sido o alvo de terapias cardiovasculares. Testes clínicos vêm sendo realizados com proteínas recombinantes ou transferência de genes, numa combinação de vias intracoronária e intravenosa, dos fatores angiogênicos VEGF e FGF, no entanto, a sua eficácia não foi comprovada (SIMONS; WARE, 2003). Recentemente, tanto estudos pré-clínicos como clínicos têm sido realizados na área de terapia celular, visando a reparação da vascularização de tecidos, através da introdução de células progenitoras endoteliais e

hematopoiéticas, intravenosamente ou diretamente em órgãos isquêmicos, i.e. retina, membros e miocárdio (RAFFI; LYDEN, 2003).

Não só medicamentos, como também produtos nutricêuticos vêm sendo uma alternativa terapêutica, com potencial aplicação como agentes anti-angiogênicos ou pró-angiogênicos capazes de modular a formação de vasos sanguíneos *in vivo*. Produtos nutricêuticos como a cartilagem de tubarão, cartilagem bovina, algas marinhas e isoflavonas de soja são alguns dos candidatos para investigação como agentes anti-angiogênicos (HOLT, 1995; DIAS et al., 2003). Polissacarídeos extraídos da parede celular da alga marinha *Sargassum* sp. entre outros polissacarídeos heparinóides, exercem atividade anti-angiogênica, possivelmente devido ao seqüestro dos mediadores e fatores angiogênicos no microambiente das células endoteliais (DIAS et al., 2005; FOLKMAN; SHING, 1992).

Por outro lado, a fração-D do fungo *G. frondosa*, induziu angiogênese *in vivo* (ratos da linhagem C3H/HeJ) e aumentou a capacidade de proliferação e a quimiotaxia (capacidade de migração) das células vasculares endoteliais humanas *in vitro*. A fração estimulou a atividade de macrófagos, e aumentou a concentração de VEGF e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no plasma com conseqüente redução no tamanho dos tumores (MATSUI; KODAMA; NANBA, 2001).

3.7.2. Bioensaio em modelos

A administração de substâncias vasoativas sobre a vesícula vitelínica, assim como na membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha (espécie *Gallus domesticus*), tem sido usada como modelo experimental, pois essas membranas extra-embriônicas são tecidos nos quais se estabelece uma rede capilar sanguínea que viabiliza a avaliação dos efeitos de

tratamentos sobre a vasculogênese e a angiogênese *in vivo*, respectivamente (CHAPMAN et al., 2001; LEIGHTON; NASSAUER; TCHAO, 1985; RIBATTI et al., 1987).

O desenvolvimento embrionário de *G. domesticus* prossegue após a postura do ovo em condições favoráveis de incubação (temperatura de 37,5°C e 30% de umidade) com a progressiva modelagem do embrião depois das primeiras 24 horas.

Com 48 horas (2º dia) de incubação, os anexos embrionários, vesícula vitelínica e âmnio já estão se organizando, e o plexo de ilhotas sangüíneas – primórdios dos vasos iniciais, formados por angioblastos - está em processo de diferenciação, na região periférica do embrião, formando os primeiros vasos sangüíneos que se conectam ao embrião marcado pelo ritmo cardíaco, e responsável pelas trocas respiratórias.

Após 96 horas de incubação (idade de 4 dias), o embrião de galinha pesa 42 mg, já possui flexões cefálica, cervical e caudal pronunciadas, e eixo de simetria perpendicular ao grande eixo do ovo (BEIG; GARCIA, 1986; HOVILLON, 1972). Durante o processo de vasculogênese, que decorre entre o 2º e 4º dia de incubação são observadas atividades biológicas de substâncias vasoativas, através da contagem do número de vasos e avaliação da morfogênese (comprimento dos embriões).

3.7.2.1. Bioensaios com *A. blazei*

No caso de *A. blazei*, foi demonstrada a atividade anti-angiogênica nas frações lipídicas contendo ergosterol, administradas por via oral resultando na redução do crescimento (volume) de tumores em camundongos portando o tumor Sarcoma-180. Segundo os autores Takaku, Kimura e Okuda (2001), essa atividade foi devida a uma inibição direta da angiogênese induzida por tumores sólidos e a administração oral ou intra-peritoneal desta fração não causou efeitos adversos, como redução do tamanho dos animais.

No entanto, não existem estudos envolvendo β -D-glucanas das frutificações de *A. blazei* na formação de vasos. Neste contexto, as β -D-glucanas de diferentes estágios de maturação das frutificações, em diferentes dosagens foram testadas qualitativa e quantitativamente sobre o processo de vasculogênese na vesícula vitelínica de embriões de galinha na idade de 4 dias de incubação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Agaricus brasiliensis utilizado neste experimento foi depositado na coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob código UFSC 51 e mantido em tubos com meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) inclinados, incubados a 8°C.

4.2. COLETA DAS FRUTIFICAÇÕES

Amostras das frutificações de *A. brasiliensis* foram coletadas no cultivo comercial do produtor José Carlos Maia, cuja propriedade se encontra localizada em Biguaçu, Santa Catarina, em diferentes estágios de maturação. Esses estágios incluíram: frutificações imaturas SI (píleo fechado) e maduras (píleo aberto), esporo imaturo SII e esporo maduro SIII (Figura 4).

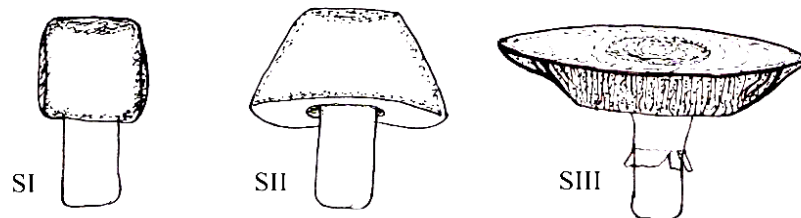


Figura 4. Frutificações de *A. brasiliensis* imaturas SI (píleo fechado) e maduras (píleo aberto), esporo imaturo SII e esporo maduro SIII

4.3. PROCESSAMENTO

As frutificações nos diferentes estágios de maturação foram coletadas por torção leve e cuidadosa rente à camada de cobertura. Após coleta foram colocadas em sacos de papel sob refrigeração a 8°C, por 30 min, para retirar o calor de campo e diminuir a atividade enzimática, e transportadas ao laboratório, em bolsa térmica.

As frutificações foram lavadas e escovadas para remoção total dos restos da camada de cobertura e da coloração marrom do píleo, tal como é requerido pelos padrões do consumidor. Em seguida, foram seccionadas longitudinalmente em duas partes e desidratadas em estufa digital (Quimis), com ventilação forçada, e aumento gradual de temperatura iniciando-se a 41° C, atingindo os 50°C ao final de 4 horas, deixando-se durante a noite a 53° C, e finalizando a 60° C durante 2 horas.

As amostras foram embaladas em sacos plásticos, seladas e armazenadas em câmara fria a – 80°C.

4.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

O método para obtenção de β -D-glucanas das frutificações de *A. brasiliensis* foi definido por Mizuno et al. (1986, 1990a) e encontra-se esquematizado no Apêndice B.

4.4.1. Extração e fracionamento

Foram pesadas aproximadamente 20 g de frutificações de *A. brasiliensis* desidratadas e lavados com 120 ml de EtOH 85% durante 10 min, em agitador magnético, seguido de filtração a vácuo. O resíduo foi colocado em balão extrator com 350 ml de EtOH 85% (v/v), aquecido a

80°C durante 3 horas e filtrado a vácuo, separando-se e descartando-se a fase líquida. Esta etapa foi repetida 3 vezes.

O extrato foi obtido da fase sólida, com 350 ml de H₂O destilada, aquecido a 100°C, por 3 horas, em extrator de refluxo, e filtrado a vácuo. À fase líquida foram adicionados 4 volumes (1350 ml) de EtOH 96° GL e deixado precipitar durante a noite, a 4°C. A fração líquida foi coletada e concentrada em evaporador rotativo reduzindo-se o volume a 150 ml, e congelado a –10°C. Esta etapa foi repetida 3 vezes.

Reunidos os 3 volumes (450 ml), reduziu-se o volume a 90ml, em estufa a 75°C (com porta entreaberta), durante 3 dias, adicionando-se 2 gotas de azida sódica por dia para impedir a proliferação de microrganismos. Este volume foi dialisado em sistema de membranas (Cut-off 12.000, Hoefer Scientific Instruments, USA), durante 3 dias, com troca diária de H₂O destilada. Subseqüentemente, a amostra foi liofilizada e pesada. As frações das frutificações dos estágios SI, SII e SIII até esta etapa, antes da purificação, foram denominadas de AP.

4.4.2. Cromatografia de troca iônica

Seguindo a purificação, foi pesado 1,0 g da amostra liofilizada, triturada em graal de vidro, dissolvida em 5 ml de H₂O destilada a 70°C, agitada por 10 min e filtrada em funil de vidro sinterizado, a vácuo.

Reduzido o volume para 3,5 mL por evaporação rápida, a amostra foi eluída em coluna (35 cm de comprimento por 2 cm de largura) de troca iônica DEAE – celulose (Sigma) utilizando-se primeiramente H₂O destilada (105 mL) como fase móvel, e descartando esta fração neutra. Na continuidade, utilizou-se um gradiente de eluição de 0,25; 0,5; 0,75 M de NaCl (105 mL de cada fração). Essas frações foram dialisadas e concentradas em estufas (75°C), com redução do volume da amostra para 3,5 mL.

4.4.3. Cromatografia de exclusão molecular

A amostra foi fracionada segundo o peso molecular de seus componentes, utilizando-se coluna com 35 mL (35 cm de comprimento por 2 cm de largura) da fase estacionária Toyopear HW-65F (Tosoh), desprezando-se o volume morto avaliado com Blue Dextran (Sigma), e coletando os primeiros 35 mL para se obter a fração do polissacarídeo com maior peso molecular.

4.4.4. Cromatografia de afinidade

Utilizando coluna de cromatografia de afinidade com fase estacionária de 10 mL (10 cm de altura e 1 cm de largura) de Concanavalina A-Sepharose 4B (Fluka Biochemika) a amostra foi separada em α -glucana ácida (adsorvida) e β -glucana ácida (não adsorvida). Foram coletados 40 mL da amostra utilizando-se água destilada como fase móvel. Os volumes de todas as frações dos estágios SI, SII e SIII foram liofilizados e denominados após a purificação de P.

4.5. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DAS AMOSTRAS

A determinação da umidade foi baseada no método gravimétrico a 105° C. Foi pesado 0,5 g de cada amostra (frutificações dos estágios SI, SII e SIII) em triplicata e desidratadas a 105° C, em placas de Petri (dessecadas e taradas), até peso constante, ou seja, aproximadamente 5 horas. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre o peso inicial e o peso seco da amostra.

4.5. RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

O rendimento das frações dos estágios SI, SII e SIII antes (AP) e após a purificação (P) foi calculado em relação ao peso da amostra inicial (frutificações desidratadas), considerando o teor de umidade de cada amostra.

4.7. PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

O peso molecular foi analisado utilizando uma coluna de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de exclusão por peso molecular TSK-Gel 5000 PW – 7,8mm x 30cm (Tosoh Bioscience) num equipamento modelo 110B (Beckman) com detector por índice de refração. Para a curva de calibração foram utilizados padrões de polímeros de peso molecular de 20.000 a 1.035.000 Daltons.

4.8. DOSAGEM DE PROTEÍNA NAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

Pelo Método de Bradford (1976), foram dosadas proteínas totais nos extratos. Este método possibilita a quantificação de microgramas de proteínas, utilizando o princípio da ligação destas macromoléculas ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A reação de ligação da proteína ao corante converte sua coloração vermelha para azul.

4.8.1. Curva de calibração

A quantidade total de proteínas contidas nas amostras foi calculada a partir de uma amostra padrão de albumina de soro bovino (Sigma) em concentrações 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 μ g/0,1 mL. A solução estoque de BSA foi de 100 μ g/0,1 mL de NaCl 0,15 M.

Foram utilizadas as médias de duas repetições de cada concentração de BSA para a elaboração da curva de calibração, realizando a leitura no espectrofotômetro modelo UV1203 (Shimadzu). Os resultados foram plotados em um gráfico para obter a equação $y=a+bx$, sendo necessário ajustá-la para o intercepto (coeficiente linear) passar pelo vértice (0,0 dos eixos “x” e “y”).

4.8.2. Dosagem

Um volume de 5 mL do Reagente de Proteínas de Bradford (Coomasie Brilliant Blue G-250) foi adicionado em 1 mL da amostra, contendo 1 mg de β -D-glucanas liofilizadas, em cada tubo. O branco é preparado com 1 mL de solução salina em 5 mL de reagente. Cada tubo foi homogenizado e abrigado da luz, em temperatura ambiente. Aguardou-se 5 a 10 min para a reação ocorrer. A mistura foi transferida para as cubetas e iniciou-se a leitura no espectrofotômetro, medindo-se a absorbância em 595 nm.

Foram utilizados a média de três avaliações da absorbância, e os valores foram plotados na curva de calibração.

4.9. ANÁLISE ESTRUTURAL

4.9.1. Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas por espectrometria na região do infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR), utilizando o equipamento FTLA 2000 (ABD BOMEM INC.),

as análises foram realizadas pela Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Para tal, foram necessárias 3 mg de cada amostra liofilizada para a confecção das pastilhas de KBr. Para leitura dos espectros FTIR foi utilizado o programa IR SearchMaster (BIORAD).

4.9.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de RMN, no Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Foram obtidas medidas de RMN de ^1H e de ^{13}C das amostras dos estágios SI, SII, e SIII antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas. As análises foram realizadas num equipamento Bruker, modelo DRX400 operando em 9,4T (400,13 MHz para a frequência do hidrogênio), em temperatura de 298 K, usando TSPAd₄ como referência interna, e sequência de pulso zgpg30. Os FIDs foram submetidos a transformada de Fourier utilizando o programa MestreC-Magnetic Resonance Companion (NMR, Santiago de Compostela, Espanha).

Medidas de RMN de ^{13}C das amostras foram realizadas utilizando aproximadamente 120 mg das amostras diluídas em 600 μl de D_2O , e transferidas para um tubo de 5 mm de diâmetro interno.

Medidas de RMN de ^1H foram realizadas utilizando aproximadamente 30 mg das amostras diluídas em 600 μl de D_2O , e transferidas para um tubo de 5mm de diâmetro interno. Análises foram realizadas em triplicata das amostras SI, SII e SIII purificadas (P) para se obter a quimiometria, por análises dos componentes principais (PCA), para a região das β -D-glucanas entre 4,60 e 3,25 ppm (MIZUNO et al., 1990a).

4.10. BIOENSAIO DE VASCULOGÊNESE

4.10.1. Material biológico

Para realização dos experimentos foram utilizados ovos de galinha da espécie *G. domesticus*, linhagem Ross, fertilizados, de tamanhos médios, padrão, obtidos junto à empresa Macedo Koerich S.A. (Distrito Industrial de São José, Santa Catarina, Brasil).

4.10.2. Preparação dos discos de metilcelulose

Para a preparação da solução estoque 11,25 % de Metilcelulose (Mc) foram pesadas 112,5 mg de metilcelulose (Aldrich, VIS 440 CP, Mn=140 mil/160 mil/Mol) e diluídas em 5 ml de água ultrafiltrada estéril (pH 7,2). Colocou-se em frasco (15 ml) e deixou-se agitando durante a noite, sendo o volume completado para 10 mL. A solução foi esterelizada em autoclave (15 min), e congelada para estoque.

Para se obter a solução de 0,45 % de Mc, necessária para a preparação dos discos, utilizou-se 1 parte da solução estoque e 1,5 parte de água esterelizada.

4.10.3. Cálculo das dosagens de β -D-glucanas

As doses de β -D-glucanas para adsorção em cada disco de metilcelulose implantado em embriões de galinha foram calculadas pela dosagem de 100 mg/Kg.dia de β -D-glucanas com base em resultados obtidos por Mizuno et al. (1990a) quanto à atividade antitumoral, e também por Hunter, Gault e Berner (2002), que relataram a necessidade de uma dosagem de 10 mg de β -D-glucanas para um homem de 75 Kg, para se obter um aumento na atividade dos macrófagos. Considerando que o peso médio do embrião de *G. domesticus* na idade de 4 dias é de 42 mg, as concentrações para os tratamentos utilizados no experimento, tiveram como referência a concentração de 6 μ g para se obter atividade biológica no embrião.

Para os estágios SI e SII após purificação (P), β -D-glucanas propriamente ditas, foram experimentadas as doses de 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g e 20 μ g para disco de 5 μ l de Mc (0,45 %) em embriões de galinha. Para o estágio SIIIP foi testada a dose de 10 μ g em cada disco e comparada com os estágios SI e SII, e com o controle. Para todas as dosagens foram utilizados 6 ovos (unidades amostrais).

4.10.4. Protocolo de implantação nos embriões dos discos contendo β -D-glucanas

Os ovos foram coletados logo após a postura e, após 24 horas, incubados sobre suportes plásticos, em estufa, à temperatura de 37,5° C, 30 % de umidade relativa do ar e ventilação mecânica, sendo estes parâmetros controlados por meio de um processador digital. O período total de incubação foi de 4 dias, de acordo com o protocolo de avaliação do processo de vasculogênese.

Após um período inicial de incubação de 2 dias, os ovos foram retirados da incubadora para abertura de um orifício (janela) na casca, de aproximadamente 10 mm de diâmetro.

As substâncias em estudo foram adsorvidas (volume = 5 μ l) em suportes de metilcelulose na concentração final de 0,45 %. Na polimerização desses suportes, a secagem da solução é feita ao ar (fluxo laminar) em uma bandeja de metal revestida de Teflon™. Os tratamentos consistiam de uma única dose por ovo, em cada concentração. Os suportes foram preparados previamente ao início dos experimentos e mantidos a -18° C, na ausência de luz. Suportes de metilcelulose contendo somente água ultra-filtrada (pH 7,2) foram utilizados como controle.

Concluído o tratamento, as janelas, feitas nas cascas dos ovos, foram fechadas com fita adesiva opaca e os ovos retornaram à posição original na incubadora, permanecendo neste ambiente até o final do período total de 4 dias.

Ao término desse período de incubação cada ovo foi retirado da estufa, e levado ao microscópio estereoscópico (35x), onde a cobertura de fita adesiva foi retirada, para a realização da análise.

4.10.5. Avaliação da vasculogênese

A avaliação das respostas foi feita com base na quantificação dos vasos da vesícula (saco) vitelínico ao redor do suporte de metilcelulose e na biometria dos embriões nas idades de 4 dias de incubação.

Após a análise, cada ovo foi resfriado em *freezer* e o embrião sacrificado sendo a fixação (procedimento histológico), realizada em solução de formol a 10%, para posterior registro das medidas de comprimento embrionário em relação aos eixos cefálico - cervical – caudal.

Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos em protocolo de número 256 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC).

4.10.6. Análise estatística dos dados

Embora o número de unidades amostrais (n) em cada um dos tratamentos corresponda a 6 embriões, foi necessário avaliar cerca de $2 \times n$, de acordo com o critério de uniformidade para seleção do material manipulado. Entre os critérios para exclusão constam as ocorrências de ovos não fertilizados ou contendo embriões que não se desenvolveram, discos que não se fixaram à membrana vascularizada (móveis), ou deslocamento dos discos para regiões não vascularizadas. Excetuando os casos acima todos os resultados foram plotados em planilha.

Todos os resultados foram expressos como média e erro padrão da média e comparados através da análise de variância (*ANOVA*) e análise dos desvios, utilizando-se o teste '*post hoc*' –

Tukey, sendo que valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa STATISTICA 6.0, e para a confecção dos gráficos o PRISMA GRAPH 3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

O rendimento das frações antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas de *A. brasiliensis* nos diferentes estágios de maturação SI, SII e SIII podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Rendimento das frações de polissacarídeos de *A. brasiliensis* nos estágios imaturos SI (píleo fechado), e maduros (píleo aberto) esporo imaturo SII e esporo maduro SII, antes (AP) e após a purificação (P)

Estágios De Maturação		Rendimento ($mg.g^{-1}$)
SI	AP	102,2
	P	41,9
SII	AP	105,9
	P	43,4
SIII	AP	111,3
	P	40,6

Os rendimentos das frações antes da purificação (AP) para todos os estágios SI, SII e SIII foram superiores ao rendimento da mesma fração obtida por Mizuno et al. (1990a) de $65 mg.g^{-1}$ (cogumelo desidratado). O rendimento das β -D-glucanas de *A. brasiliensis* - frações dos diferentes estágios purificadas (P) - foram superiores ao rendimento encontrado pelas análises realizadas pelo Projeto Temático financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (EIRA, 2003) cujas concentrações para β -D-glucanas foram em média 5

mg.g⁻¹ peso seco, obtidos pela análise enzimática de β -glucosidase, ou compatíveis aos resultados obtidos pelo método enzimático indireto de α -glucosidase de 39,03 a 67,98 mg.g⁻¹ de β -glucanas, resultados estes dependentes das estirpes analisadas, porém com elevados desvios das médias entre as repetições das amostras (triplicata), indicando que estes métodos de análises não foram repetitivos e confiáveis. O rendimento das β -D-glucanas de *A.brasiliensis* também foram superiores ao encontrado para a Fração-D oriunda das frutificações de *G. frondosa* de 30 mg.g⁻¹ (SHIGESUE; KODAMA; NANBA, 2000).

Também para *A. brasiliensis* foi demonstrado um aumento no rendimento das β -D-glucanas durante a maturação das frutificações (estágio SII) seguida de diminuição no final, assim como, para *L. edodes* e *G. frondosa* (MINATO et al., 2001).

5.2. PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

Todas as frações de polissacarídeos dos estágios SI, SII e SIII antes e após a purificação das β -D-glucanas possuíram peso molecular superior a 1.000.000 Daltons. Sendo que, os padrões utilizados na curva de calibração foram inferiores ao peso molecular dessas frações, não podemos ser precisos quanto a essa grandeza. Porém, tais resultados, conferem ao elevado peso molecular, obtido por Mizuno et al. (1990a), para essa fração (2.000.000 Daltons).

Esses polissacarídeos não formaram gel em nenhuma etapa da extração e/ou purificação e foram facilmente resolubilizáveis em água, com grande potencialidade para a área farmacêutica, pois essas são características favoráveis para administração de forma injetável (MIZUNO, 1999).

5.3. CONTEÚDO DE PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO DAS β -D-GLUCANAS

As frações de polissacarídeos das frutificações nos estágios SI, SII e SIII, antes e após a purificação das β -D-glucanas, apresentaram pequena quantidade de proteínas totais. Foi obtido um teor de proteína de 6,0; 7,2 e 9,9 mg.g⁻¹ peso seco nas frações antes de serem purificadas e 5,8; 6,0 e 6,7 mg.g⁻¹ peso seco nas frações após a purificação das β -D-glucanas das frutificações nos estágios SI, SII e SIII respectivamente. Resultados confirmados pelos os espectros de FTIR (abaixo). Estes resultados evidenciaram que os polissacarídeos das frações possuem baixo teor de proteína, em média 0,61% após a purificação das β -D-glucanas, enquanto a fração obtida por Mizuno et al. (1990a) apresentou uma proporção maior de proteínas (6,3%). Podemos assim considerar que foi obtido, no procedimento selecionado, elevada homogeneidade das frações purificadas, ou seja, maior proporção de β -D-glucanas nas frações.

5.4. ANALISE ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE FTIR E RMN DE ¹³C E ¹H

Todos os espectros de FTIR das frações antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas, dos estágios SI, SII e SIII (Figura 5) apresentaram uma absorção de deformação axial do O-H intensa e muito larga na região de 3100 – 3600 cm⁻¹, centrada em 3430 ± 3 cm⁻¹, correspondente aos açúcares ciclizados (SILVERSTEIN, 1994). Os espectros apontaram a presença da deformação axial do metil (-CH₃) e/ou do metileno (-CH₂-) indicado pela absorção em 2927 ± 4 cm⁻¹, também característica de freqüências de grupos funcionais comumente encontradas em polissacarídeos (PERLIN; CASU, 1982).

Os espectros sugerem a ausência de ácidos urônicos, pois não apresentaram absorção acima de 1700 cm^{-1} e pequena quantidade de proteína (absorção a 1540 cm^{-1}) (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTLNEZ, 1996).

A absorção em 1400 cm^{-1} evidenciou a presença de β -D-glucanas. Absorção em 1240 cm^{-1} pode estar relacionada com a vibração da deformação axial do grupo C-O-C presente em um anel de seis átomos, característico das β -D-glucanas. Absorção características das β -D-glucanas também ocorrem na região entre $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$, devido às unidades de D-glucose com *O*-substituições. Alguns espectros, como no caso do estágio SI antes da purificação AP (figura 5a) apresentaram absorção fraca em 890 cm^{-1} revelando configuração β e em 910 cm^{-1} e 850 cm^{-1} revelando configuração α (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTLNEZ, 1996; PERLIN; CASU, 1982; ZHANG; ZHANG; CHENG, 1999).

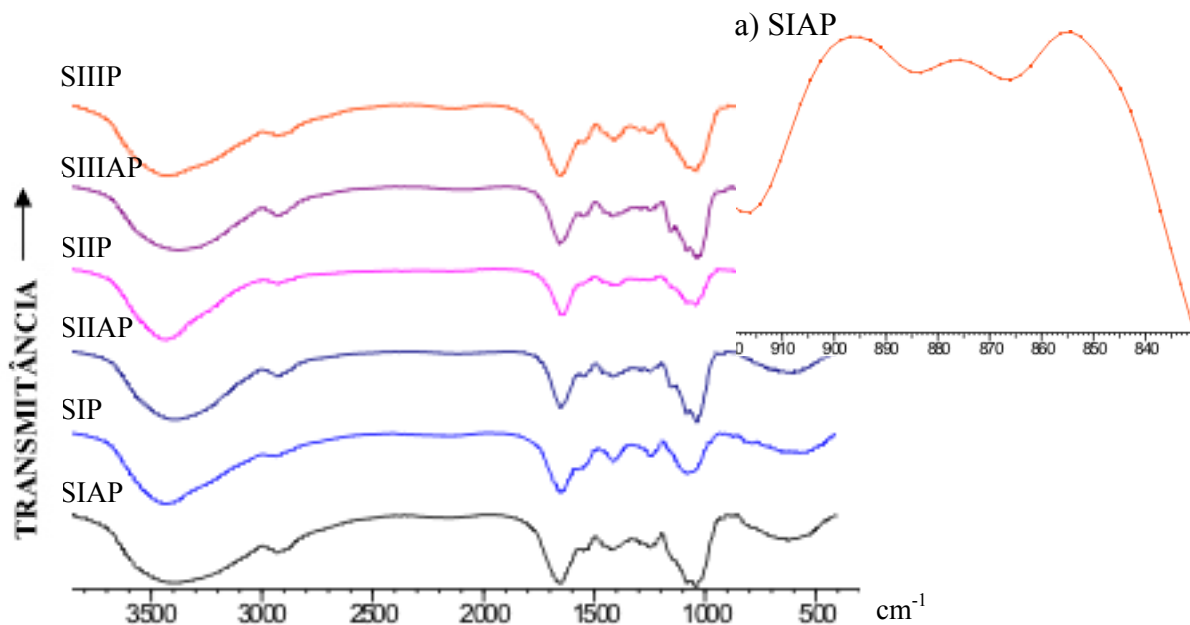


Figura 5. Espectros de FTIR das frações de dos polissacarídeos das frutificações de *A. brasiliensis* nos estágios imaturos SI (píleo fechado), e maduros (píleo aberto) esporo imaturo SII e esporo maduro SIII, antes (AP) e após a purificação (P).^a Espectro da fração SIAP apresentando banda fraca em 910, 890 e 850 cm^{-1}

A principal diferença encontrada nos espectros de FTIR das frações das frutificações nos estágios SI, SII e SIII foram nas regiões das D-glucanas entre $1000 - 1150 \text{ cm}^{-1}$. Nota-se na figura 6 a relação entre os sinais de absorção $1040 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ e $1080 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$. No estágio SI a relação entre esses dois sinais foi menor do que no estágio SII e SIII, antes da purificação (AP). No estágio SI após a purificação (P) a absorção em 1040 cm^{-1} praticamente desapareceu, enquanto nos outros estágios SII e SIII a proporção entre os dois sinais (1040 e 1080 cm^{-1}) também diminuiu, mas a absorção em 1080 cm^{-1} ainda é proeminente. Com isso podemos inferir que a absorção referente as $(1 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-glucanas}$ se definiu em $1080 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ e referente as $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucanas}$ se definiu em $1040 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$.

A absorção em 1140 cm^{-1} diminuiu e desapareceu completamente em SI e SIII após a purificação (P) indicando, ser esse, um sinal correspondente às $\alpha\text{-D-glucanas}$ (PERLIN; CASU, 1982).

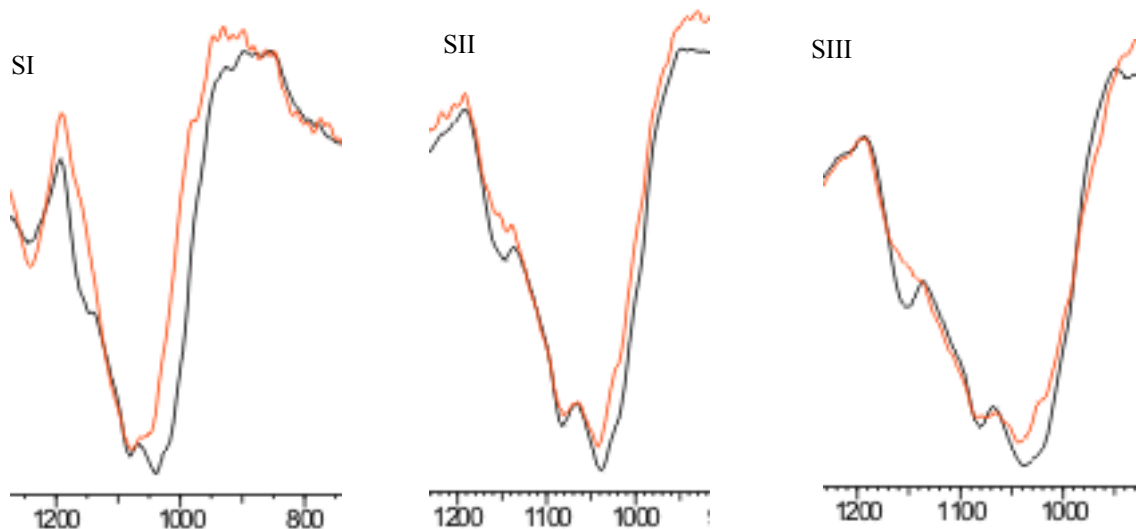


Figura 6. Comparação da região entre $1000\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros de FTIR das frações de polissacarídeos antes (em preto) e após a purificação (em vermelho) das $\beta\text{-D-glucanas}$ para os estágios imaturos SI (píleo fechado), e maduros (píleo aberto) esporo imaturo SII e esporo maduro SIII

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos das frações de polissacarídeos de *A. brasiliensis* para cada estágio de maturidade SI, SII e SIII, antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas, estão apresentados na figura 7.

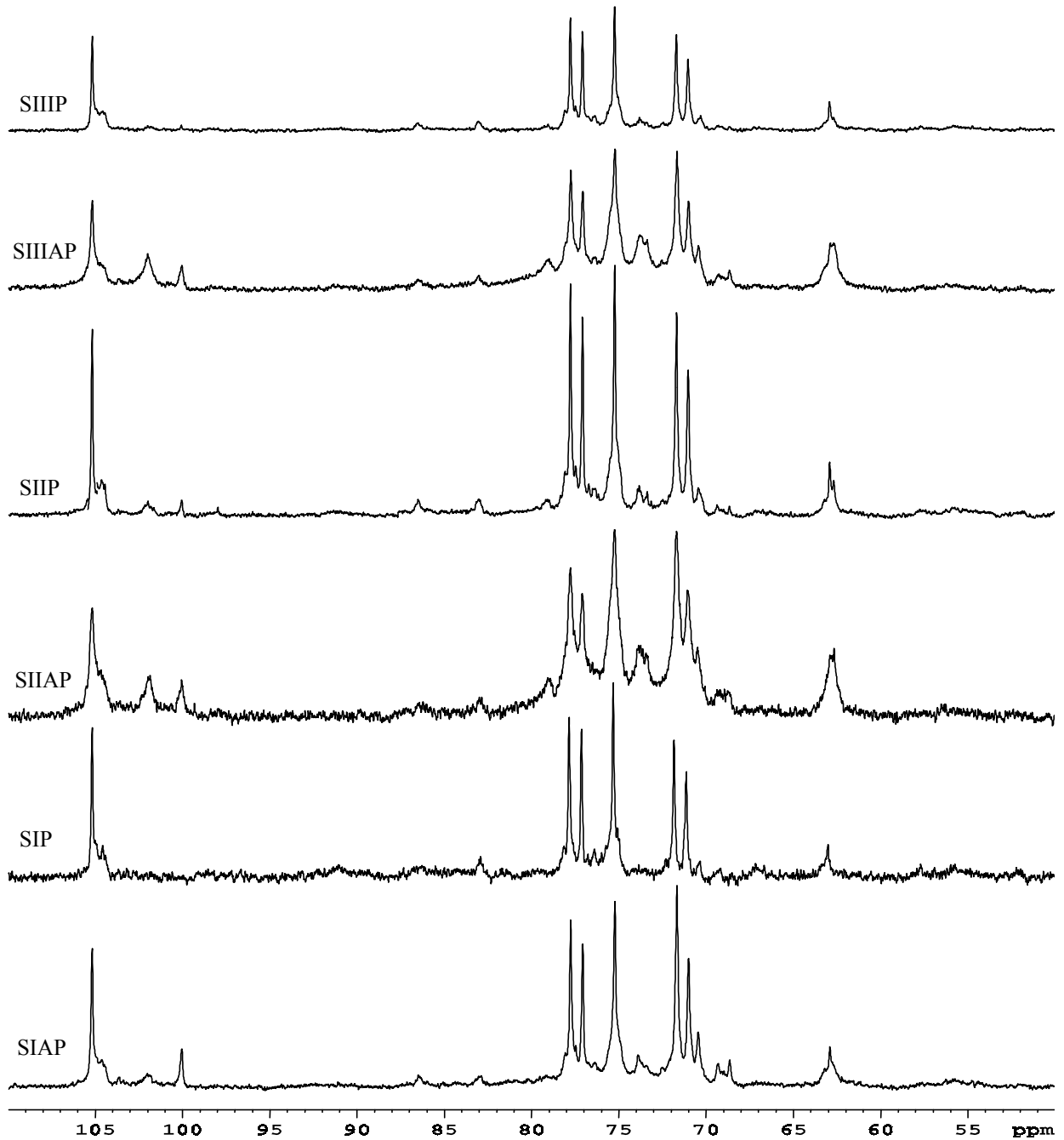


Figura 7. Espectros de RMN de ^{13}C , utilizando o solvente D_2O , obtidos das frações de polissacarídeos das frutificações de *A. brasiliensis* imaturas SI (píleo fechado), maduras (píleo aberto) esporo imaturo SII e esporo maduro SIII, antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações de polissacarídeos de *A. brasiliensis* foram comparados com outros espectros publicados (DONG et al., 2002; GORIN, 1981; MIZUNO et al., 1990a; OHNO et al., 1985b, 2001; SAITO et al., 1976; YORK, 1995). A tabela 6 exemplifica os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C atribuídos aos carbonos (C) das glucanas encontradas na literatura e nas amostras das frações de polissacarídeos das frutificações de *A. brasiliensis* nos diferentes estágios de maturação, SI, SII e SIII, antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas.

As frutificações de *A. brasiliensis*, nos diferentes estágios de maturação (SI, SII e SIII), incluíram β -D-glucanas e também α -D-glucanas. Para as β -D-glucanas, os espectros das frações de polissacarídeos antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas apresentaram seis intensos sinais, atribuídos aos carbonos (C) das (1 \rightarrow 6)- β -D-glucanas. O sinal do C-1 anomérico ao redor de 105,1 ppm com outros dois sinais próximos, localizados em 104,7 ppm e 104,4 ppm podem ser atribuídos a configuração β . O sinal do C-6 substituído pode ser identificado a 71,0 ppm através do experimento DEPT135CH₂ e do sinal do C-6 não-substituído, referente ao CH₂, em 62,9 ppm, sugerindo uma maior quantidade de ligações do tipo (1 \rightarrow 6)- β - do que de outras ligações. Todos os espectros apresentaram sinal em 83,0 ppm, possivelmente identificado como ligação (1 \rightarrow 2)- β -glicosídica, confirmada no espectro do estágio SI após a purificação (AP) das β -D-glucanas, no qual apresenta somente sinais para a configuração anomérica β .

Tabela 6. Sinais de carbono de (C) das glucanas dos espectros de RMN de ^{13}C encontrados na literatura e nas amostras das frações de polissacarídeos das frutificações de *A. brasiliensis* nos estágios de maturação SI, SII e SIII, antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas

	Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
(1→6)- β -D-glucana ^a	105,1	75,2	77,7	71,8	77,1	70,9
(1→3)- β -D-glucana ^a	105,1	75,2	86,5	71,8	77,1	62,9
(1→2)- β -D-glucana ^b	103,8	83,5	76,6	70,2	77,1	61,5
(1→4)- α -D-glucana ^c	98,8	74,0	77,8	80,2	71,6	61,4
(1→6)- α -D-glucana ^c	98,8	74,0	74,9	80,2	71,6	69,2
(1→4)- α -ligações glicosídicas ^d	101,9	74,2	~74	80,7	~72	~61
(1→4)- α -D-glucana ^e	102,0			80,0		
SIAP	105,1	83,0*	86,5	79,0	77,0	71,0
	100,2	75,2	77,8	71,7		70,3
						62,9
SIP	105,1	83,0	-	-	77,0	71,0
		75,2	77,8	71,7		62,9
SIIAP	105,1	83,0	86,5	79,0	77,0	71,0
	102,0	75,2	77,8	71,7		70,3
	100,2					62,9
SIIP	105,1	83,0	86,5	79,0	77,0	71,0
	102,0	75,2	77,8	71,7		62,9
SIIIAP	105,1	83,0	86,5	79,0	77,0	71,0
	102,0	75,2	77,8	71,7		70,3
	100,2					62,9
SIIIP	105,1	83,0	86,5	79,0	77,0	71,0
	102,0	75,2	77,8	71,7		62,9

* Escrito em cinza quando o sinal foi pouco intenso

Fontes: ^aDong et al. (2002)

^bGlucanas de *Xanthomonas campestris* citado por York (1995)

^cFração da proteoglucana de *A. blazei* citado por Mizuno et al. (1998)

^dCadeia lateral de (1→3)- β -D-glucana de *Pleurotus ostreatus* citado por Saitô et al. (1976)

^eOhno et al. (1985)

Os espectros RMN de ^{13}C das frações das frutificações nos estágios SI, SII, e SIII, exceto no estágio SI após a purificação (P), apresentaram sinal em 86,5 ppm, atribuído ao C-3 substituído, que foram menos intensos que o sinal em 77,8 ppm atribuídos ao C-3 não-substituído. Isto sugere que a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana está presente em menor quantidade, nas frações, em relação às ligações do tipo (1 \rightarrow 6)- β -, evidenciado pelo fraco sinal atribuído ao C-3 substituído. Os espectros conferem com os principais sinais para (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana conforme a referência (ANEXO A) de Mizuno et al. (1990a), na qual as extrações foram protocoladas.

No entanto, o sinal em 86,5 ppm não foi detectado na fração das frutificações imaturas (SI) após a purificação (P) das β -D-glucanas, (Figura 8), sugerindo uma menor quantidade de ramificações (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas neste estágio do que nas frutificações maduras.

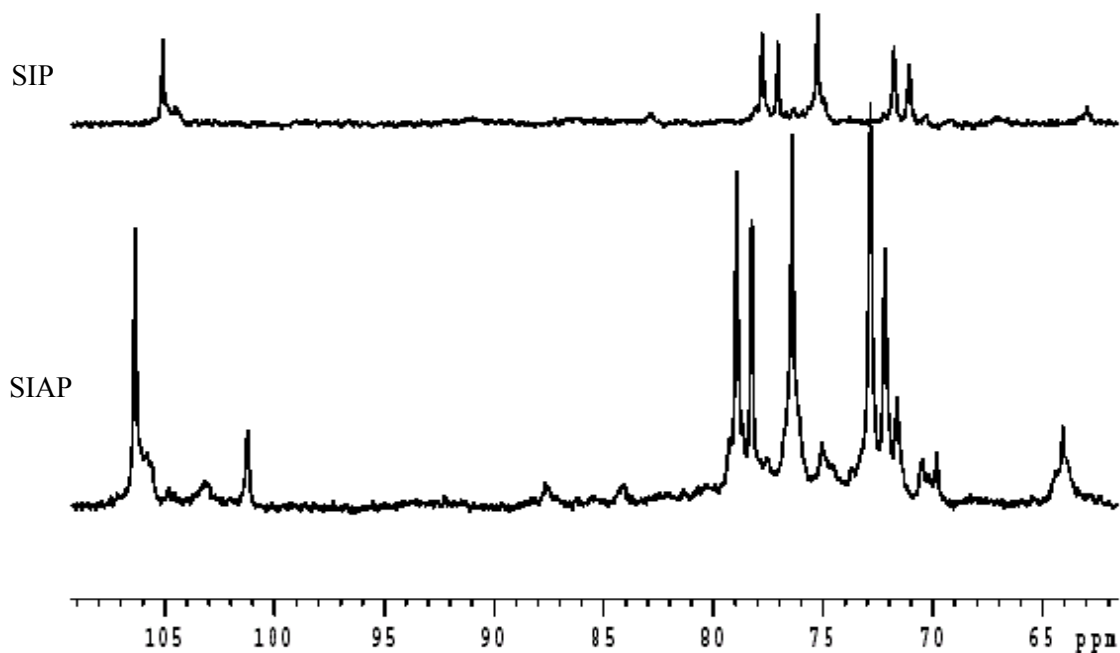


Figura 8. Espectros de RMN de ^{13}C obtidos das frações de polissacarídeos de *A. brasiliensis* para o estágio SI (píleo fechado), antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas

Analisando os espectros RMN de ^{13}C (Figura 7) em relação as α -D-glucanas, os sinais em 102,0 ppm e 100,2 ppm foram atribuídos à configuração α , com sinais característicos de (1 \rightarrow 4)- α -D-glucana e (1 \rightarrow 6)- α -D-glucana em 79,0 ppm e 68,0 ppm, respectivamente. Frutificações nos estágios maduros (SII e SIII) apresentaram um aumento no sinal do C-1 da ligação (1 \rightarrow 4)- α -glicosídica, sugerindo um aumento desta glucana após a maturação dos esporos, polissacarídeo também com atividade anti-tumoral (MIZUNO et al., 1990a).

Os espectros de RMN de ^1H para todos os espectros tiveram sinais característicos de configuração anomérica β na região entre 4,60 ppm e 3,25 ppm, segundo Mizuno et al. (1990a), confirmando a presença das β -D-glucanas (Figura 9).

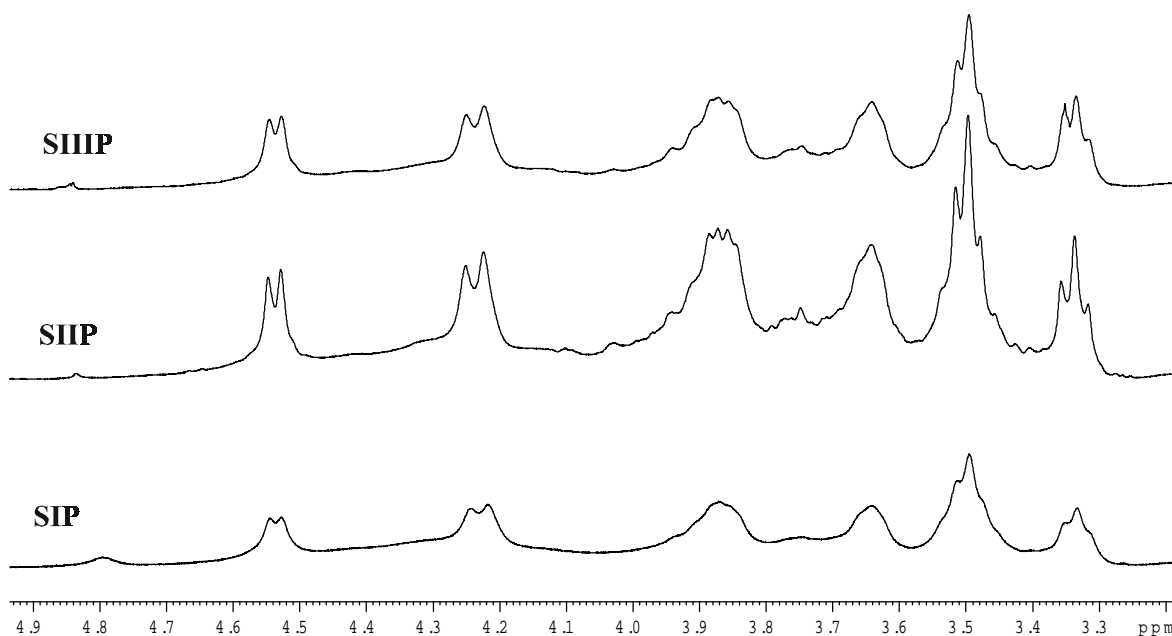


Figura 9. Espectros de RMN de ^1H , em solvente D_2O , obtidos das frações de polissacarídeos após a purificação (P) das β -D-glucanas de *A. brasiliensis* nos estágios, imaturos SI (píleo fechado), maduros (píleo aberto) esporo imaturo SII e esporo maduro SIII, referente à região da configuração anomérica β (entre 4,6 ppm a 3,2 ppm)

Para análises dos componentes principais (PCA), dessa região, encontrou-se diferenças para as frações de polissacarídeos após a purificação (P) das β -D-glucanas das frutificações nos estágios SI, SII e SIII. A reprodutibilidade das medidas é mostrada pela proximidade entre as triplicatas (similaridade de 99,94%) e a diferença entre as amostras é dada pela distância entre elas no gráfico (Figura 10). Podemos afirmar que as frações dos diferentes estágios SI, SII e SIII formaram grupos distintos, possibilitando afirmar que as β -D-glucanas das frações são diferentes.

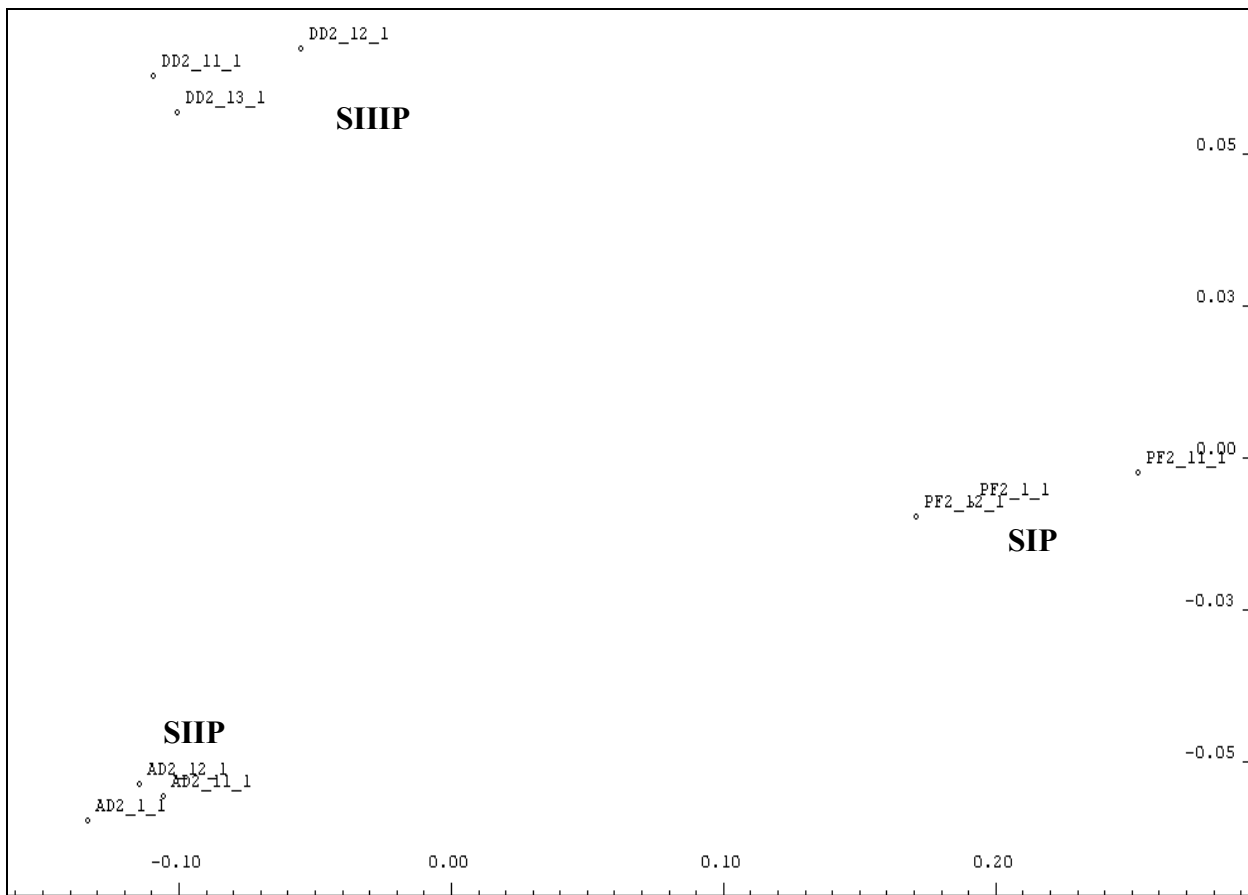


Figura 10. Análise de PCA considerando a região referente a configuração anomérica β (entre 4,6 ppm a 3,2 ppm), para o gráfico de escores de PC1 (74,59% eixo x) versus PC3 (8,13% eixo y) referentes aos espectros de RMN de ^1H das frações purificadas (P) dos estágios SI, SII e SIII (em triplicata)

Estas diferenças na análise de PCA para a região das β -D-glucanas das frações purificadas (P) podem estar relacionadas à variação na quantidade de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas nos estágios SI, SII, e SIII, confirmando as análises dos espectros de RMN de ^{13}C .

A tabela 7 resume as características das D-glucanas encontradas em diferentes estágios de maturação das frutificações (SI, SII e SIII), o rendimento das frações antes (AP) e após putificação (P) das β -D-glucanas, e a quantidade de proteína.

Tabela 7. Caracterização estrutural das glucanas de *A. brasiliensis*, em diferentes estágios de maturação, frutificações imaturas (SI) e maduras, esporo imaturo (SII) e esporo maduro (SIII), o rendimento de cada fração solúvel em água a 100°C, antes (AP) e após a purificação (BP) das β -D-glucanas e o teor de proteínas nas frações

Estágios de Maturação	D-glucanas					Rendimento (mg.g ⁻¹) ^a	Proteína (mg.g ⁻¹) ^b
	(1 \rightarrow 6)- β -	(1 \rightarrow 2)- β -	(1 \rightarrow 3)- β -	(1 \rightarrow 4)- α -	(1 \rightarrow 6)- α -		
SI AP	+++	+	+	-	+	102,2	6,0
SI P	+++	+	-	-	-	41,9	5,8
SII AP	+++	+	++	++	+	105,9	7,2
SII P	+++	+	++	+	-	43,4	6,0
SIII AP	+++	+	++	+++	+	111,3	9,9
SIII P	+++	+	++	+	-	40,6	6,7

+++ grande quantidade, ++ quantidade intermediária, + pouca quantidade, - nenhuma D-glucana presente nos estágios SI, SII, e SIII. ^a mg de glucana por g de frutificação (peso seco); ^b mg de proteina por g de D-glucana.

Nas frutificações maduras (SII e SIII) houve um aumento das (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas, confirmada após a purificação. É importante enfatizar que a cadeia linear (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana extraído de *Penicillium islandicum* não apresentou bioatividade, como, descrito por Ohno et al. (1986). No entanto, as ramificações (1 \rightarrow 3)- β - são estruturalmente importantes e responsáveis pelo aumento da atividade imunomodulatória destes polissacarídeos (DONG et al., 2002).

Foi evidenciado que as frutificações em todos os estágios de maturação de *A. brasiliensis* possuem a estrutura (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana que dispõe de elevada atividade anti-tumoral

(MIZUNO et al., 1990a) e devem ser utilizadas no processamento de nutracêuticos. No entanto, para a otimização da eficiência biológica e comercial, os estágios maduros podem ser preferencialmente processados, pois os píleos abertos são mais quebradiços. Já o estágio imaturo, com píleo fechado, é menos frágil e mais fácil de manter sua estrutura morfológica até o consumidor e pode ser consumido como nutracêutico, ou seja, um alimento com propriedades medicinais.

Um significativo aumento de (1→4)- α -D-glucanas solúveis em água a 100°C também ocorreu durante a maturação dos estágios SII para SIII, polissacarídeo também com atividade anti-tumoral (MIZUNO et al., 1990a). Desta forma, *A. brasiliensis* dispõe nas frutificações maduras de uma diversidade de polissacarídeos com atividade anti-tumoral.

Este trabalho evidenciou que as frutificações de todos os estágios de maturação de *A. brasiliensis* podem e devem ser utilizadas no processamento de nutracêuticos. Essa estratégia suprirá o consumidor com grande diversidade de estruturas de D-glucanas, otimizando a bioatividade e permitindo ao produtor um eficiente e rentável uso da biomassa fúngica.

5.5. EFEITOS DAS FRAÇÕES DE β -D-GLUCANAS SOBRE A VASCULOGENESE E O COMPRIMENTO EMBRIONÁRIO

A avaliação das respostas foi realizada com base na quantificação dos vasos sanguíneos das membranas vitelínicas ao redor do suporte de metilcelulose e na biometria (medidas de comprimento total em relação aos eixos cefálico - cervical – caudal) dos embriões com 4 dias de incubação com avaliações apresentadas na tabela 7.

A análise dos tratamentos em relação aos números de vasos (Figura 11), demonstra que houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os grupos tratados com β -D-glucanas das

frutificações de *A. brasiliensis*, nos estágios SI, SII e SIII, em relação ao grupo controle (veículo), mas não ocorreu diferença significativa entre os grupos tratados nos diferentes estágios de maturação. Também entre os grupos de um mesmo estágio, seja SI ou SII, não foram detectadas diferenças significativas em relação às diferentes concentrações utilizadas nos tratamentos. Nos limites do disco (suportes de metilcelulose) implantados nas membranas do controle foram registrados, em média, 102 vasos capilares (Tabela 7).

Tabela 7. Média e erro padrão da média (EPM) do número de vasos sanguíneos e do comprimento total dos embriões de galinha tratados com β -D-glucanas das frutificações de *A. brasiliensis*, nos estágios SI, SII e SIII, e do grupo controle (contendo somente água)

Tratamentos (Estágio- μ g/disco)	N° Vasos	Comprimento total (mm)
Controle	102 \pm 4,03	11,9 \pm 0,48
SI 1	129 \pm 4,10	14,5 \pm 0,46
SI 5	135 \pm 5,38	12,8 \pm 0,30
SI 10	133 \pm 0,79	13,4 \pm 0,19
SI 15	124 \pm 1,90	14,0 \pm 0,21
SI 20	129 \pm 1,51	13,9 \pm 0,13
SII 1	135 \pm 3,81	14,5 \pm 0,28
SII 5	127 \pm 0,84	14,5 \pm 0,42
SII 10	130 \pm 2,34	14,0 \pm 0,37
SII 15	129 \pm 3,20	15,1 \pm 0,27
SII 20	129 \pm 3,92	15,5 \pm 0,30
SIII 10	127 \pm 0,92	13,9 \pm 0,30

As vesículas vitelínicas expostas aos tratamentos com β -D-glucanas (frações de polissacarídeos após a purificação) das frutificações de *A. brasiliensis*, nos estágios SI, SII e SIII, apresentaram um número de vasos sanguíneos significativamente superiores ao observado no controle (Tabela 7; Figura 11), evidenciando um efeito pró-vasculogênico. Tanto para SI como

para SII esse efeito não foi dose-dependente e apresentou uma dose-resposta homogênea para todos os tratamentos (estágios e dosagens). Até mesmo em elevadas concentrações, de 20 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de $\beta\text{-D}$ -glucanas, superior ao dobro da dosagem estabelecida (6 $\mu\text{g}/\text{disco}$) para se obter atividade biológica, os efeitos foram pró-angiogênicos sem causar danos aos embriões de galinha. A dosagem de 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ para o estágio SI resultou no maior número de vasos (133 vasos), considerando a homogeneidade dos dados, devido ao menor erro padrão da média (0,79) correspondendo a um aumento de 30,4 % no número de vasos em relação ao controle (102 vasos).

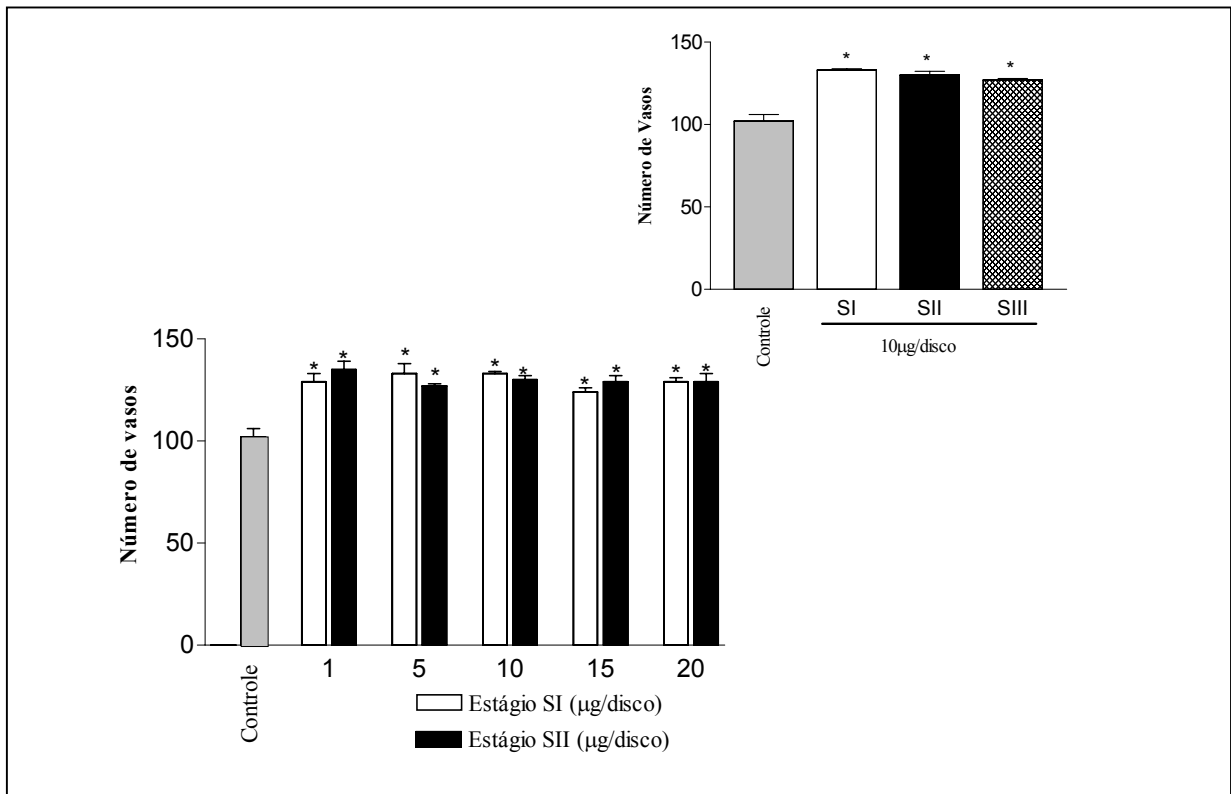


Figura 11. Número de vasos vitelínicos de embriões de *G. domesticus* nos tratamentos (2 – 4 dias de incubação), com $\beta\text{-D}$ -glucanas dos estágios SI e SII de *A. brasiliensis* (1 – 20 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e discos de metilcelulose (suportes) contendo somente água ultrafiltrada (veículo), utilizados como controle. No detalhe a comparação dos estágios SI, SII e SIII nas dosagens de 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Cada coluna e barra vertical representa a média \pm E.P.M. de 6 embriões e os asteriscos denotam uma modificação estatisticamente significativa no processo de vasculogênese, ao nível de ***P < 0,05 **P < 0,01 e *P < 0,001 em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)

Para avaliar se a elevação na atividade vasculogênica dos ovos de *G. domesticus* tratados com β -D-glucanas, das frutificações de *A. brasiliensis*, refletiria com o padrão de comprimento embrionário, foi determinada a medida de comprimento total (soma das medidas obtidas nos segmentos cefálico-cervical e cervical-caudal) dos embriões com 4 dias de incubação e comparados com o controle, que corresponde em média, a 11,9 mm (Tabela 7; Figura 12).

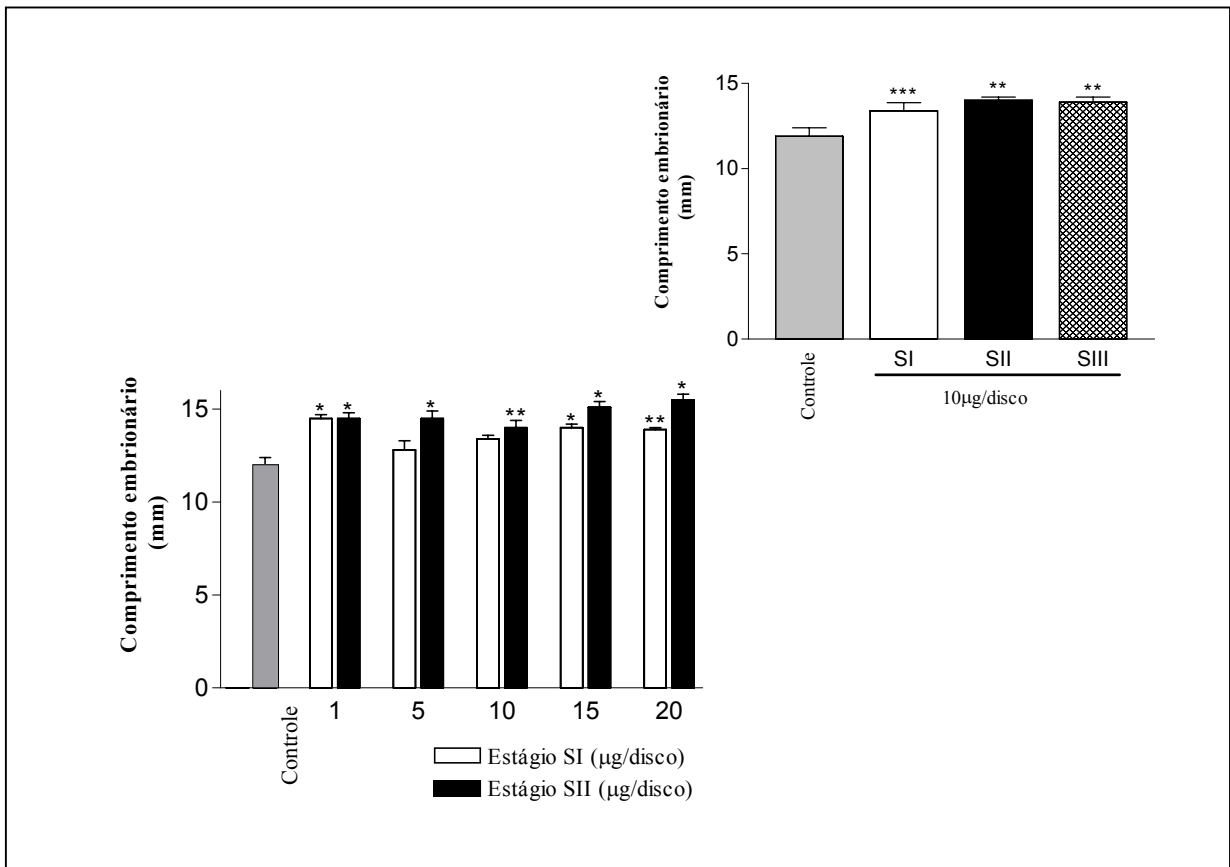


Figura 12. Comprimento total (mm) dos embriões de *G. domesticus* nos tratamentos (2 – 4 dias de incubação), com β -D-glucanas dos estágios SI e SII de *A. brasiliensis* (1 – 20 μ g/disco) e discos de metilcelulose (suportes) contendo somente água ultrafiltrada (veículo), utilizados como controle. Definidos através da soma dos segmentos cefálico-cervical e cervical-caudal. No detalhe a comparação dos estágios SI, SII e SIII nas dosagens de 10 μ g/disco. Cada coluna e barra vertical representa a média \pm EPM de 6 embriões e os asteriscos denotam um aumento estatisticamente significativo do comprimento, ao nível de ***P < 0,05 **P < 0,01 e *P < 0,001 em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)

Observou-se que as medidas do comprimento dos embriões tratados com as β -D-glucanas foram superiores às dos embriões controle. Foi possível encontrar uma correlação direta entre o crescimento dos embriões e a formação dos vasos nas amostras expostas às β -D-glucanas de todos os estágios, SI, SII e SIII de *A. brasiliensis*, exceto nas dosagens de 5 e 10 μ g de β -D-glucanas do grupo tratado com a fração do estágio SI (Figura 12).

A atividade pró-vasculogênica encontrada nas frações dos estágios SI, SII, e SIII, pode ser traduzida como ação promotora da formação de vasos primordiais originados de células precursoras, desencadeado por numerosos fatores (CARMELIET, 2003) e sugere fortemente uma atividade pró-vasculogênica por parte das β -D-glucanas das frações que possuem efeitos hematopoéticos referentes a estimulação e aumento de células nucleadas totais, de células tronco pluripotentes (CFU-s), de células formadoras de colônias de macrófagos, e de macrófagos-granulócitos (M-CFC e GM-CFC) relatadas por Patchen e MacVittie (1983). Além disso, os receptores celulares de β -D-glucanas, i.e. CR3, mostraram-se responsáveis por diversas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas como TNF- α , IFN- α , IFN- γ , e IL-6 em células NK (ROSS et al., 1999).

Mesmo que a vasculogênese seja considerada um processo, cuja ocorrência em organismos adultos normais é menos intensa comparada à angiogênese (FOLKMAN; SHING, 1992), o processo de vasculogênese vêm sendo relacionado principalmente a condições fisiopatológicas também em adultos, como tumores e doenças cardiovasculares (RAFFI; LYDEN, 2003).

Face aos resultados já publicados sobre a atividade das β -D-glucanas, é possível que o efeito pró-vasculogênico de *A. brasiliensis* esteja relacionado com a atividade imunomodulatória, anti-tumoral destas β -D-glucanas (DONG et al., 2002; FUJIMIYA et al., 1998; MIZUNO et al., 1990a). Esta atividade pode ser comparada à atividade pró-angiogênica,

porém anti-tumoral da Fração-D de *G. frondosa*, que segundo Matsui, Kodama e Nanba (2001), inclui β -D-glucanas com estrutura semelhantes àsquelas de *A. brasiliensis* no que se refere a cadeia principal e ramificações.

Pode ainda estar relacionada com a atividade hematopoética uma vez que esta já foi evidenciada em diversos pacientes imunologicamente deprimidos com tumores, que utilizaram como tratamento suporte, extratos obtidos de *A. blazei* (JING et al., 1994; RONG et al., 1995).

Já foi demonstrado que os polissacarídeos de elevado peso molecular de *A. blazei* (fermentação líquida) ativaram macrófagos e estimularam a liberação da citocina TNF- α (SHU; WEN; LIN, 2003). Além disso, macrófagos ativados também produzem citocina IL-8, fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), e fator de crescimento de fibroblastos - tipo básico (bFGF), sinais pró-angiogênicos, bem conhecidos que influenciam vários estágios da vascularização (MATSUI; KODAMA; NANBA, 2001; ONO, et al., 1999).

Também foi relatado que macrófagos, quando ativados, podem influenciar positiva ou negativamente vários estágios da vascularização, sendo capazes de modular eventos na matriz extracelular através das citocinas liberadas, correlacionando diretamente os eventos como a infiltração de macrófagos e a densidade de microvasos na região de tumores como o melanoma (ONO, et al., 1999). No entanto, no estágio inicial da formação de tumores, os macrófagos possuem capacidade de mediar citotoxicidade específica sobre tumores e/ou estimular a atividade anti-tumoral de linfócitos.

As citocinas IL-12 e IL-18 liberadas por macrófagos, associados a tumores, estimulam a produção de IFN- γ , inibindo a angiogenese com conseqüente efeito antitumoral (WAHL; KLEINMAN, 1998).

Os resultados concernentes aos efeitos pró-vasculogênicos e ao crescimento dos embriões obtidos no presente estudo, permitem inferir que as β -D-glucanas, de todos os estágios de maturação das frutificações de *A. brasiliensis*, possam estar atuando positivamente na formação de vasos sanguíneos e que esse efeito seja mediado pela atividade imunogênica.

A bioatividade das β -D-glucanas das frutificações de *A. brasiliensis* nos diferentes estágios de maturação apontam para o aproveitamento destas para a produção de nutracêuticos. Podemos especular que estas frutificações consumidas na íntegra, ou pulverizadas podem modular a vascularização devido ao efeito anti-angiogênico do ergosterol e pró-vasculogênico das β -D-glucanas.

A luz dos resultados é possível compreender o uso de *A. brasiliensis* como alimentos com propriedades medicinais fazendo parte de uma alimentação saudável, como nutracêutico na prevenção de doenças, e também como tratamento suporte na quimio e radioterapia em pacientes com tumores, condições em que os pacientes apresentam uma redução na capacidade de ingestão, digestão, absorção ou metabolização dos nutrientes provenientes de uma dieta convencional (JONG, 2002).

6. CONCLUSÕES

Os métodos de extração e purificação das β -D-glucanas requereram uma laboriosa e cuidadosa repetição do protocolo estabelecido, possibilitando a comparação dos rendimentos das frações obtidas de cada estágio de maturação das frutificações de *A. brasiliensis*.

Todas as frações de polissacarídeos das frutificações de *A. brasiliensis* nos estágios imaturos SI (píleo fechado), e maduros (píleo aberto) esporo imaturo SII e esporo maduro SIII,

antes (AP) e após a purificação (P) das β -D-glucanas possuem elevado peso molecular, ou seja, superior a 1.000.000 Daltons.

A pequena quantidade de proteínas nas frações, em média 0,77% antes da purificação e 0,61% após a purificação das β -D-glucanas, indicou que os rendimentos das frações são referentes, principalmente, às D-glucanas das frutificações de *A. brasiliensis*. Essas frações são facilmente resolubilizadas em água, principalmente após a purificação das β -D-glucanas.

No entanto, conforme a maturação das frutificações foi observado um aumento no rendimento das β -D-glucanas, obtendo-se 41,9 mg.g⁻¹ no estágio SI, 43,4 mg.g⁻¹ no estágio SII e uma diminuição para 40,6 mg.g⁻¹ no estágio SIII.

Foi confirmada a estrutura (1→6)-(1→3)- β -D-glucana encontrada por Mizuno et al. (1990a) para esta fração solúvel em água a 100°C. Nas frutificações maduras (estágios SII e SIII) houve um aumento das (1→3)- β -D-glucanas, confirmada após a purificação, e, portanto, a (1→6)-(1→3)- β -D-glucana que dispõe de elevada atividade anti-tumoral, também se encontrou presente nesses estágios podendo contribuir de forma importante na elaboração dos nutracêuticos.

Um significativo aumento de (1→4)- α -D-glucanas solúveis em água a 100°C também ocorreu durante a maturação dos estágios SII para SIII. Desta forma, *A. brasiliensis* dispõe nas frutificações maduras de uma diversidade de polissacarídeos com atividade anti-tumoral.

Este trabalho consiste no primeiro relato do efeito pró-vasculogênico das β -D-glucanas de *A. brasiliensis*, considerando-se todos os estágios de maturação das frutificações, tal como, já relatada atividade pró-angiogênica para a fração-D de *G. frondosa*.

Considerando que a Fração-D de *G. frondosa* vem sendo comercializada e foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como nutracêutico devido as suas β -D-glucanas,

semelhantes à estrutura e bioatividade das β -D-glucanas de *A. brasiliensis*, os resultados obtidos podem ser considerados um subsídio para a legalização dos nutricêuticos de *A. brasiliensis*, no país.

Ficou evidenciado que frutificações em todos os estágios de maturação de *A. brasiliensis* devem ser utilizadas no processamento de nutricêuticos. Esta estratégia suprirá o consumidor com grande quantidade e importantes estruturas de glucanas, otimizando a bioatividade e permitindo ao produtor um eficiente e rentável uso da biomassa fúngica.

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.

AHN, W. S.; KIM, D. J.; CHAE, G. T.; LEE, J. M.; BAE, S. M.; SIN, J. I.; KIM, Y. W.; NAMKOONG, S. E.; LEE, I. P. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Muril Kyowa, in a gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. **International Journal of Gynecology Cancer**, v. 14, p. 589-594, 2004.

ARIIZUMI, K.; SHEN, G. L.; SHIKANO, S.; XU, S.; RITTER III, R.; KUMAMOTO, T.; EDELBAUM D.; MORITA, A.; BERGSTRESSER, P.R.; TAKASHIMA A. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20157-20167, 2000.

ASPINALL, G. O. General introduction In: **The polysaccharides**. New York: Academic Press, Inc., 1982. v. 1. p. 1-18.

AUDIBERT, F. M.; LISE, L.D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology Today**, v. 14, p. 281-284, 1993.

BEIG, D.; GARCIA, F. C. M. **O embrião de galinha**. Campo Grande: UFMS/Imprensa Universitária, 1986. 36 p.

BELLINI, M. F.; GIACOMINI, N.L.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MATOVANI, M.S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-kl cells, studying different developmental phases of the mushroom. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 4, p. 465-469, 2003.

BETA GLUCAN RESEARCH. **Review year 2003**: Beta glucan Research Papers, Patents and Patent Applicator. Disponível em: <http://www.betaglucan.org> Acesso em: 23 de ago. de 2003.

BOREK, C. Beta-glucan boosts immunity. **Nutrition Science News**, jan. 2003. Disponível em: <http://www.newhope.com/nutritionsciencenews> Acesso em: 17 de dezembro de 2004.

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.

BRASIL. Informe técnico n° 6, 31 de janeiro de 2003. **Procedimentos sobre cogumelos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/31012003_2.htm. Acesso em: 03 de julho de 2003.

BRASIL. Resolução n° 16, 30 de abril de 1999. **Procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/leg/res/16_99.htm. Acesso em: 03 de julho de 2003.

BRASIL. Informe técnico n° 6, 31 de janeiro de 2003. **Registro de medicamentos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registros/doc_novo.htm. Acesso em: 03 de julho de 2003.

BROWN, G. D; GORDON, S. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, p. 36–37, 2001.

BROWN, G. D; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.

BRUM, A. A. **Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos**. 2005. 117 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CACE MILTON PAIVA/SISTEMA ALICE/SERPRO/MDIC-DECEX. **Exportação de Cogumelo no Brasil**. Acesso em: 2001 e 2004. Gráfico.

CAO, Y.; CAO, R.; BRÄKENHJELM, E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 380-390, 2002.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, p. 653-660, 2003.

CHANG, S. T., BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 473-476, 1996.

CHANG, S. T. **World markets for mushroom nutraceuticals: dietary supplements.** [2000?] Disponível em: <http://www.uow.edu.au/research/centres/smartfoods> Acesso em: 29 de maio 2003.

CHANG, S. T. **Products of medicinal mushrooms as a good source of dietary supplements** [2001?]. Disponível em <http://www.hri.ac.uk/isms/article2> Acesso em: 19 de dez. de 2004.

CHAPMAN, S. C.; COLLIGNON, J.; SCHOENWOLF, G. C.; LUMSDEN, A. Improved method for chick whole-embryo using a filter paper carrier. **Developmental Dynamics**, v. 220, p. 284-289, 2001.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus code protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 403-409, 2004.

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 & Utilization**, v. 8, n. 4, p. 347-359, 2000.

CHO, S. M.; JANG, K. Y.; PARK, J. S. **Analyses of chemical constituents of *Agaricus blazei*** <http://www.mushworld.com> Acesso em: 26 de novembro de 2004.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. Ressonância Magnética Nuclear In: **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. p. 417-458.

CHIARA, 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* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CLEARY, J. A.; GRAHAM, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. **Immunology and Cell Biology**, v. 77, p. 395-403, 1999.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: **Encyclopedia of analytical chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000. p. 10815-10837.

DELMANTO, R.; LIMA, P.; SUGUI, M.; EIRA, A.; SALVADORI, D.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v. 496, p. 15-21, 2001.

DIAS, P. F.; MARASCHIN, R. P.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Na formação de vasos sanguíneos, fronteiras entre saúde e doença. **Ciência Hoje**, SBPC, v. 32, p. 22-27, 2003.

DIAS, P. F.; SIQUEIRA, J. M.; VENDRUSCOLO, L. F.; NEIVA, T. J.; MARASCHIN, M.; GAGLIARDI, A. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2005, No Prelo.

DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall β -glucans of *Saccharomyces cerevisiae* In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 6. p. 179-213. 636 p.

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

EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grated tumor system in mice. **Biotherapy**, v. 11, p. 259-265, 1998.

EGUCHI, F.; WATANABE, Y.; ZHANG, J.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMOTO, H.; FUKUHARA, T.; & HIGAKI, M. Inhibitory effects of hot water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Traditional Medicines**, v. 16, p. 201–207, 1999.

EIRA, A. F. da. **Cultivo de cogumelos: compostagem, condução e ambiente**. Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. Mogi das Cruzes, SP, 2000. p. 83-95.

EIRA, A. F. da. **Cultivo do cogumelo medicinal: *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 398 p.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Advanced Experiments on Medicine Biology**, v. 333, p. 355-364, 1992.

FREEMAN, A.E. H. *Agaricus* in the Southern United States. **Mycotaxon**, v. 8, p. 50-118, 1979.

FREITAS, J. C. C.; BONAGAMBA, T. J. **Fundamentos e aplicações da ressonância magnética nuclear**. Rio de Janeiro: AUREMN, 1999. v. 1. 94 p.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; NAKASHIMA, H.; MATUMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; EBINA, T.; KATAKURA, R. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 46, p.147-159, 1998.

FUJIMIYA, Y.; EBINA, T. Surimoto Forestry Co., Ltd., Japan. **Antitumor active substances**. U.S. Patent 6,093,694. 2000.

GAGLIARDI, A.; COLLINS, D. C. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. **Cancer Research**, v. 53, p. 533-535, 1993.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides In: TIPSON, S.; HORTON, D. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York: Academic Press, 1981. v. 38, p. 13-104.

GUNDE-CIMERMAN N.; CIMERMAN A. Pleurotus fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3- methylglutaryl-coenzyme A reductase – Lovastatin. **Experimental Mycology**, v. 19, p. 1-6, 1995.

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTLNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 143-154, 1996.

GUTERREZ, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 301-309, 2004.

HANTER, K. W. Jr.; GAULT, R. A. BERNER, M. D. Preparation of microparticulate [beta]-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 267-271, 2002.

HIKICHI, M.; OKUBO, S.; HIROE, E. Agaricus Laboratories Co., Ltd., Japan. **Protein polysaccharide**. U.S. Patent 6,197,571. 2001.

HOLT, S. Nutraceuticals and angiogenesis: new therapeutic horizons. **Alternative & Complimentary Therapies**, jun./jul. 1995.

HORIUCHI, I.; SUYAMA, T.; MORIO, T. Japan Applied Microbiology Research Institute Co., Ltd., Japan; **Biologically active substance and process of preparing the same**. U.S. Patent 6,465,218. 2002.

HORIUCHI, I.; SUYAMA, T.; MORIO, T. Japan. **Process of preparing biologically active substance**. U.S. Patent Application 20030064484. 2003.

HOVILLON, C. **Embriologia**: desenvolvimento de aves e de mamíferos. Paris: Ed. Edgard Blücher Ltda. 1972, p. 60-99.

HUNTER, K.W.; DUPRE, S.; REDELMAN, D. Microparticulate β -glucan upregulates the expression of B7.1, B7.2, B7-H1, but not B7.DC on cultured murine peritoneal macrophages. **Immunology Letters**, v. 93, p. 71-78, 2004.

HUNTER, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 267-271, 2002.

HUANG, S. J.; HUANG, L. C.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. <http://www.mushworld.com> Acesso em: 26 de março de 2004.

ICHINOSE, T.; NAOKI, Y.; MIZOGUCHI, T.; NANBA, Y.; KUBOTA, H. Japan. **Composition for drinking /eating and beverage/food.** U.S. Patent Application 20030017249. 2003.

ITO, H., SUMIYA, T. H. Ito; Iwade Research Institute of Mycology Co., Ltd., Japan. **Oral drugs for treating AIDS patients.** U.S. Patent 6,120,772. 2000.

ITOKAWA, M. China. **Nutriceutical composition and methods.** U.S. Patent Application 20020110564. 2002.

IWADE, I.; MIZUNO, T. Cultivation of Kawariharatake (*Agaricus blazei* Murill). **Food Review International**, v. 13, n. 3, p. 383-390, 1997.

IWATA, M.; FURUYA, K. IMB Kabushiki Gaisha, Japan; **Method of cultivating fruit bodies of *Agaricus blazei* in artificial mushroom cultivation bed.** U.S. Patent 6,378,244. 2002.

JANAVEL, G. L. V.; DEL VALLE, H. F.; LASCANO, E. C.; NEGRONI, J. A.; CASAS, J. C. L.; CROTTOGINI, A. J. Angiogénesis terapéutica en la cardiopatía isquémica. **Revision de la Federacion Argentina del Cardiopatía**, v. 30, p. 245-251, 2001.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.** Tradução Cristina Bonorino et al. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767 p.

JING, W.; MIN, M. X.; ZHENG, C. R.; ZHI, W. J.; ITO, H.; SHIMURA, K. **Observation on treatment effect of *Agaricus blazei* Murill against alimentary tract tumor.** [1994 ?] <http://www.atlasworldusa.com> Acesso em: 09 de setembro de 2003.

JONG, C. S. Fungal cell wall glycans In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes.** Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH., 2002. v. 6. p. 159-178. 636 p.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T. Fraction and antitumor activity of the water-insoluble residuo of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v. 186, p. 267-273, 1989.

KAWAGISHI, T.; KANDO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1→6)-β-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 393–403, 1990.

KERBEL, R.; FOLKMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 727-739, 2002

LEIGHTON, J.L.; NASSAUER, J.; TCHAO R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 293-298, 1985.

LI, P.; SHEN, C. Sun Tem Pharmaceutical Co., Ltd., Taiwan. **Method for propagating fungi using solid state fermentation**. U.S. Patent 6,558,943. 2003

LUIZ, R. C.; JORDÃO, B. Q.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K₁) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mutation Research**, v. 528, p. 75-79, 2003.

MAEKAWA, T.; INTABON, K. Tsukuba Biosystems, Ltd., Japan. **Method for culturing a basidiomycetous fungus in a liquid culture medium**. U.S. Patent 6,490,824. 2002

MAEKAWA, T.; ISODA, H. Japan. **Hyaluronidase activity and allergenic cell activity inhibitor**. U.S. Patent Application 20030104006. 2003

MAEKAWA, T.; ISODA, H. Japan. **Method for preparation of physiologically active water-base extract and method for potentiating the activity thereof**. U.S. Patent Application 20030082793. 2003

MASON, R. **Will the real beta glucan please stand up?** Disponível em: <http://www.thenaturalwoman.com/article> Acesso em: 18 de dez. de 2004.

MATSUI, K.; KODAMA, N.; NANBA, H. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 172, p. 193-198, 2001

MATSUI, T. O.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 133-144, 2003.

MILES, P. G.; CHANG, Shu-Ting. **Mushroom biotechnology and Mushroom Biology: concise basics and current development**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1997, 194 p. ISBN 981-02-2877-5.

MINATO, K.; MIZUNO, M.; KAWAKAMI, S.; TATSUOKA, S.; DEMPO, Y.; TOKIMATO, K.; TSUCHIDA, H. Changes in immunomodulating activities and content of antitumor polysaccharides during growth of two mushrooms, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing and *Grifola frondosa* (Dicks;Fr) S.F. Gray. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, p. 1 - 7, 2001.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N.; KUBOYAMA, R. Fractionation of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 50, p. 1679-1688, 1986.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2897-2905, 1990b.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T cell subsets in mice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 434-437, 1998.

MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 7, n. 4, p. 707-714, 1999.

MOL, P.C. **Hyphal wall elongation during expansion growth of the common mushroom (*Agaricus bisporus*)**. 1989. 115 p. Tese (Doutorado). Universidade de Groningen, Alemanha.

MOL, P.C.; VERMEULEM, C. A; WESSELS, J. G. Diffuse extension of hyphae in stipes of *Agaricus bisporus* may be based on unique wall structure. **Mycological Research**, v. 94, p. 480-488, 1990.

MOL, P. C.; WESSELS, J. G. H. Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, v. 94, p. 472-479, 1990.

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M.; TAKEUCHI, M. Effect of water from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 8, p. 1205-1211, 2002.

NEVES, M. A. **Caracterização ecológica, fisiológica e genética de *Agaricus blazei* Murrill através de estirpes provenientes de diferentes empresas de produção de cogumelos**. Florianópolis, 2000. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

NUTRIMART[®]. **Diagram of maitake D-fraction molecule**. <http://www.nutrimart.com/D-fract.htm> Acesso em: 23 de janeiro de 2004.

OHNO, N.; HAYASHI, M.; IINO, K.; SUZUKI, I.; OIKAWA, S.; SATO, K.; SUZUKI, Y.; YADOMAE, T. Effect of glucans on the antitumor activity of Grifolan. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 2149-2154, 1985a.

OHNO, N.; IINO, K.; TAKEYAMA, T.; SUZUKI, I.; SATO, K.; OIKAWA, S.; MIYAZAKI, T.; YADOMAE, T. Structural characterization and antitumor activity of the extracts from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 3395-3401, 1985b.

OHNO, N.; HAYASHI, M.; IINO, K.; SUZUKI, I.; OIKAWA, S.; SATO, K.; YADOMAE, T. Effect of glucans on the antitumor activity of Grifolan. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, 2149-2154, 1986.

OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N.N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M. & YADOMAE, T. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.

ONO, M.; TORISU, H.; FUKUSHI, J.; NISHIE, A.; KUWANO, M. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 43, 69-71, 1999.

OKUBO, J.; KAZUKUNI, K.; OHKUBO, S. **Method of cultivating *Agaricus blazei* mushroom**. U.S. Patent 5,048,227. 1991.

OOI, V. E. C.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 195-206, 1999.

OZEKI, M.; YAO, H.; OKUBO, T.; JUNEJA, L. R. Japan. **Compositions for promoting sleep**. U.S. Patent Application 20020188025. 2002.

PATCHEN, M. L.; MacVITTIE, T. J. Dose-dependent responses of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of the immunomodulating agent glucan. **Immunopharmacology**, v. 5, p. 303 – 313, 1983.

PELOSI, L.; IMAI, T., CHANZY, H.; HEUX, L.; BUHLER, E.; BULONE, V. Structural and morphological diversity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans synthesized in vitro by enzymes from *Saprolegnia monoïca*: comparison with a corresponding *in vitro* product from blackberry (*Rubus fruticosus*). **Biochemistry**, v. 42, p. 6274-6274, 2003.

PERLIN, A. S.; CASU, B. Spectroscopic methods In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press Inc., 1982. v.1. p. 133-186.

RAFII, S.; LYDEN, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 702-712, 2003.

RAU, U. Schizophyllan In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 6. p. 61-69. 636 p.

RIBATTI, D.; RONCALI, L.; NICO, B.; BERTOSSI, M. //effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of choroallantoic membrane. **Acta Anatomica**, v. 130, p. 257-263, 1987.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. **Mutation Research**, v. 544, p. 195-201, 2003.

RONG, W. L.; RONG F. Q.; LIANG, M. H.; ZHI, W. J.; ITO, H.; SHIMURA, K. **Observation on the treatment effect of Agaricus blazei Murill to the liver function of chronic hepatitis.**[1995?] <http://www.atlasworldusa.com> Acesso em: 09 de setembro de 2003.

ROSS, G. D.; VĚTVIČKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VĚTVIČKOVÁ, J. Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer (Review). **Immunopharmacology**, v. 42, p. 61 – 74, 1999.

RUWEI, W.; YIHYAN, X.; PEIJUN, J.; XINGLI, W.; HOLLIDAY, J. C. **Immune Fx Clinical Trial of immune assist (a specific mixture of 6 medicinal mushroom extracts).** [2002?] http://www.biomedicallabs.com/immune_fx_clinical_trial.htm Acesso em: 11 de setembro de 2003.

SAITO, H.; OHKI, T.; YOSHIOKA, Y.; FUKUOKA, F. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study of a gel-forming branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from *Pleurotus ostreatus* (fr.):determination of side-chains and conformation of the polymer-chain in relation to gel-structure. **FEBS Letters**, v. 68, n.1, p. 15-18, 1976.

SAITO, H.; OHKI, T.; TAKASUKA, N.; SASAKI, T. A ^{13}C -NMR-spectral study of a gel-forming, branched (1 \rightarrow 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, p. 293 – 305, 1977.

SHIGESUE, K.; KODAMA, N.; NAMBA, H. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 84, p. 293-300, 2000.

SHIMIZU, S.; KITADA, H.; YOKOTA, H.; YAMAKAWA, J.; MURAYAMA, T.; SUGIYAMA, K.; IZUMI, H.; YAMAGUCHI, N. Activation of the alternative complement pathway by Agaricus blazei Murill. **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 9, p. 536-545, 2002.

SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7. **Biotechnology letters**, v. 25, p. 2061-2064, 2003.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.

SIMONS, M.; WARE, A. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. **Nature reviews/Drug discovery**, v. 2, p. 1-9, 2003.

STAMETS, P. **Mycomedicinals**: an informational booklet on medicinal mushrooms. Cross-Index of Mushrooms and Targeted Disease Complexes, 1997. p. 4.

STAMETS, P. **Growing gourmet & Medicinal mushrooms**: Growth parameters for gourmet and medicinal mushroom species. USA: Ten Speed Press, 2000. p. 212-217.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Journal of Nutritional**, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

UCHIYAMA, S.; HARAMAKI, K. Japan. **Use of *Agaricus blazei* Murrill to prevent or treat skin and others disorders**. U.S. Patent Application 20020119164. 2002.

YAMAGUCHI, H. **Schematic structure of fungus cell wall**. [2003?] <http://www.sambomed.co.kr> Acesso em: 15 de setembro de 2004.

YORK, W. S. A conformational model for cyclic β -(1 \rightarrow 2)-linked glucans based on NMR analysis of the glucans produced by *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 278, p. 205-225, 1995.

WAHL, L. M.; KLEINMAN, H. K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 21, 1998.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 31-62, 1999.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 297-90, 2002.

ZAMMARETTI, P.; ZISCH, A. H. Adult endothelial progenitor cells renewing vasculature. **The international Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 3, p. 493-503, 2005.

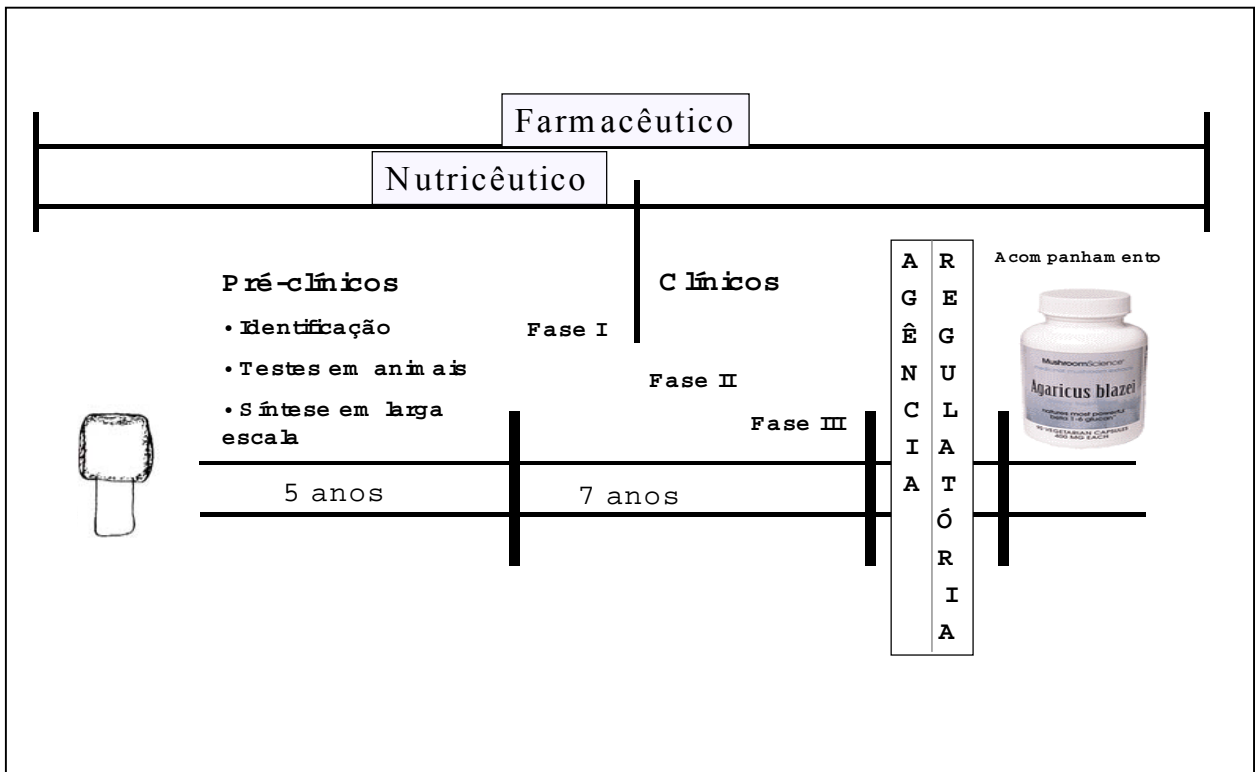
ZEISEL, S. H. Regulation of “nutraceuticals”. **Science**, v. 285, p. 1853-1855, 1999.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Chemical structure and molecular weights of α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Lentinus edodes*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 1197-1202, 1999.

ZIMMERMAN, J. W.; LINDERMUTH, J.; FISH, P. A.; PALACE, G. P.; STEVENSON, T. T.; DeMONG, D. E. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β -(1 \rightarrow 3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 22014-22020, 1998.

APÊNDICE A

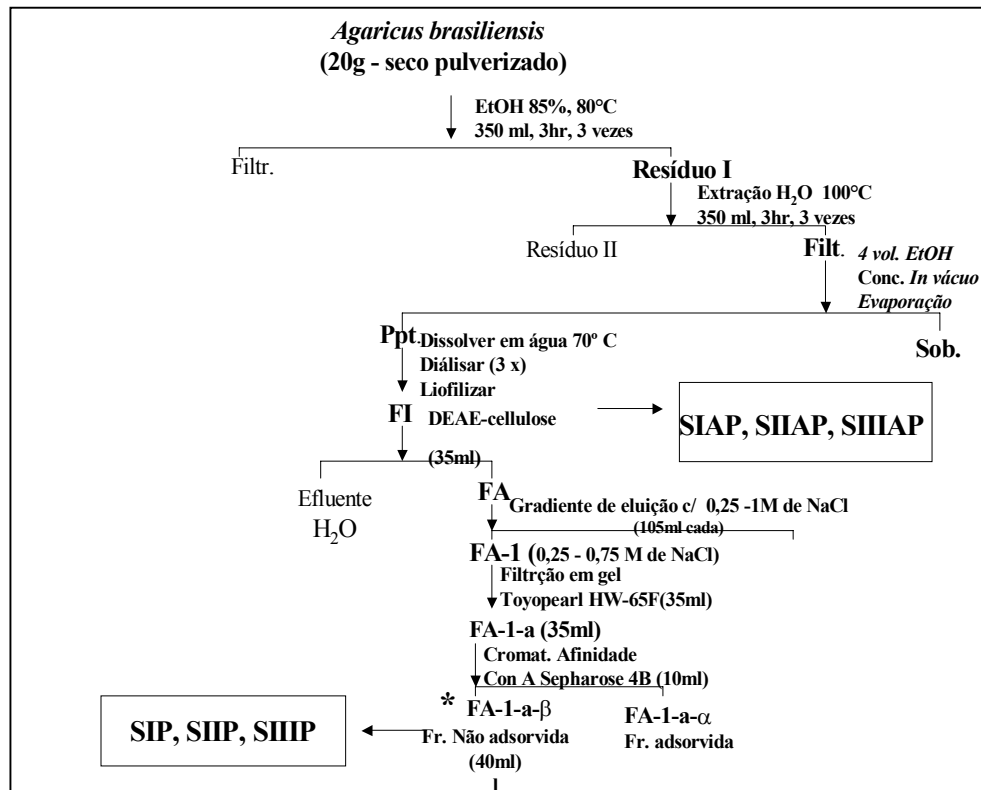
Esquema das etapas necessárias para a legalização de um produto farmacêutico e/ou nutricêutico no Brasil. Fonte: ANVISA (2003)



APÊNDICE B

Fluxograma da extração e purificação dos polissacarídeos das frutificações de *A. brasiliensis* imaturas SI (píleo fechado), maduras (píleo aberto), SII esporo imaturo e SIII esporo maduro, AP antes e P após a purificação.

Fonte: Mizuno et al. (1986, 1990a)



ANEXO A

Espectro de RMN de ^{13}C de (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas solúvel em água de *A. blazei*. Fonte: Mizuno et al. (1990a).

