

**JEAN MARY FACCHINI**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS  
DE *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 SOBRE TUMOR ASCÍTICO  
DE EHRLICH E SARCOMA 180**

**JOINVILLE  
2011**

**JEAN MARY FACCHINI**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS  
DE *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 SOBRE TUMOR ASCÍTICO  
DE EHRLICH E SARCOMA 180**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE. Área de concentração: Biotecnologia. Orientadora: Profa. Dra. Sandra Aparecida Furlan. Co-Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck.

**JOINVILLE  
2011**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

F138a Facchini, Jean Mary.  
Atividade antitumoral de frações polissacarídicas de pleurotus ostreatus DSM 1833 sobre tumor ascítico de ehrlich e sarcoma 180 / Jean Mary Facchini ; orientadora Dra. Sandra Aparecida Furlan ; co-orientadora Dra. Elisabeth Wisbeck. – Joinville: UNIVILLE, 2011.

92 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Sandra Aparecida Furlan  
Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente –  
Universidade da Região de Joinville

1. Câncer. 2. Sarcoma – Tratamento intraperitoneal. 3. Neoplasias. I. Furlan, Sandra Aparecida (orient.). II. Wisbeck, , Elisabeth (co-orient.). III. Título.

CDD 616.994

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus que me permite a vitória em cada desafio!*

*Aos meus filhos, à minha esposa e aos meus pais que são a razão do meu existir.*

*E a todos que fazem da pesquisa científica seu alimento, o prazer do conhecimento e a alegria das respostas.*

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta pesquisa só foi possível porque contou com o apoio, orientação e carinho de muitas pessoas que de uma forma ou de outra se envolveram junto comigo nas diversas etapas do trabalho.

Primeiramente quero agradecer a todos os meus familiares pelo apoio recebido.

Especialmente à minha esposa Annelise e meus filhos Jhonatas e Jesiel que conseguiram suportar todos os meus lamentos, e foram um porto seguro nos inúmeros momentos de dificuldades. À eles serei eternamente grato.

Aos meus pais Boanerges e Rosa e aos meus irmãos Ivan, Rosemari e Líndia por estarem sempre presentes em minha vida

Agradeço à minha Orientadora Profa. Dra. Sandra A. Furlan pela orientação e pelo carinho e confiança.

À minha Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Wisbeck pelo carinho, paciência e dedicação em me ensinar a desvendar o cultivo de *Pleurotus* e os mistérios dos polissacarídeos. Acima de tudo pela amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Márcia L. Lange Silveira pelo apoio e orientação nas inúmeras horas de trabalho durante o tratamento *in vivo* no laboratório do Centro Cirúrgico Experimental da UNIVILLE.

Às colegas Endi P. Alves e Charlise Aguilera pela valorosa colaboração nos trabalhos de extração dos polissacarídeos.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e ao Professor Dr. Mauro de Souza L. Pinho que gentilmente aceitaram o convite para participar desta banca de avaliação.

Aos ótimos professores que ministraram as disciplinas durante esse período.

Aos colegas de mestrando pelo ótimo convívio.

Ao programa de pós-graduação da UNIVILLE e ao projeto PRONEX pelo apoio financeiro através de bolsa de estudo.

Aos meus colegas de profissão, principalmente às diretoras Marcilene Campregher e Zenaide Pezente e ao Coordenador Juliano Cristofolini pela compreensão das muitas vezes em que foi necessário me ausentar do trabalho em função desta pesquisa.

Ao meu amigo Sidnei Lopes pela companhia nas tantas idas e vindas de Jaraguá do Sul a Joinville durante este período.

Acima de tudo quero agradecer ao Pai Eterno e a seu Filho Jesus Cristo, meu Mestre, Salvador, Incentivador e Inspirador, cuja fé me fortaleceu nos momentos de dificuldade.

A todos que de alguma forma fizeram parte desta etapa científica. Muito obrigado a todos!

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A minha Co-orientadora, prima e amiga Elisabeth Wisbeck, por toda a atenção, apoio e incentivo nesta caminhada.

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”  
(Julio Verne)



"Confia no Deus eterno de todo o seu coração e não se apóie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo." (Prov. 3:5-6)

## RESUMO

No Brasil o câncer é a segunda causa de morte por doença. Estimativas para 2011, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam ocorrência de cerca de 490 mil novos casos da doença no país. Diante disso, busca-se constantemente o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos mais seguros e eficazes, que possam gerar produtos inovadores e com possibilidade de aplicação antitumoral, diminuindo as reações adversas típicas dos tratamentos convencionais e com um custo mais acessível para a população necessitada. A busca por novas substâncias biologicamente ativas aumentou o interesse no uso dos cogumelos devido aos seus vários efeitos terapêuticos. As propriedades medicinais de fungos do gênero *Pleurotus* têm despertado grande interesse da comunidade científica por possuírem capacidade de modular o sistema imunológico, atividade hipoglicêmica e antitrombótica, capacidade de diminuir a pressão arterial e o colesterol sanguíneo, possuindo também ação antiinflamatória, antimicrobiana e antitumoral. Polissacarídeos sintetizados por *Pleurotus*, entre eles os  $\beta$ -glucanos, são considerados os principais responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de frações polissacarídicas, provenientes da biomassa micelial congelada de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, na redução do desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e do Sarcoma 180. Foi avaliada a atividade antitumoral de seis frações polissacarídicas (FC, FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2) administradas em camundongos por via intraperitoneal. O tratamento dos animais foi iniciado 24 horas após o implante tumoral e foi conduzido durante 10 dias, na dose de 30 mg/Kg<sup>-1</sup>. A avaliação do desenvolvimento tumoral foi realizada 21 dias após a indução do tumor pela determinação do volume e da massa tumoral. A fração polissacarídica que promoveu maior eficácia foi testada, também, nas doses de 10 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, a fim de determinar a dose capaz de proporcionar maior regressão tumoral. Os resultados mostraram que as frações FC, FI e FII, na dose de 30 mg/Kg<sup>-1</sup>, proporcionaram um valor médio de 70 % de inibição do desenvolvimento do TAE, enquanto as frações FII e FIII-2, na mesma dose, resultaram no valor médio de 90% de inibição do Sarcoma 180. As doses de 10 e 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, da fração FII, promoveram a maior inibição do Sarcoma 180, cerca de 75%, sem diferença significativa entre si, sendo a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, a que representa a necessidade de uma menor massa para a realização do tratamento.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus*, frações polissacarídicas, câncer, tratamento intraperitoneal, Sarcoma 180, Tumor Ascítico de Ehrlich.

## ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death by disease in Brazil. Estimates for 2011, according to the National Cancer Institute (NCI), indicate the occurrence of about 490.000 new cases of the disease in the country. Therefore, we seek to constantly develop new therapeutic systems, safer and more effective, that can generate innovative products with the possibility of anti-tumor application, reducing the typical side effects of conventional treatments and with a more affordable cost to the needy. The search for new biologically active substances increased interest in the use of mushrooms because of their various therapeutic effects. The medicinal properties of fungi of *Pleurotus* genus have attracted great interest from the scientific community due to their ability to modulate the immune system, the hypoglycemic and antithrombotic activity, the ability to lower blood pressure and blood cholesterol, the anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor effects. Polysaccharides synthesized by *Pleurotus*, including the  $\beta$ -glucans, are considered primarily responsible for its therapeutic properties. This study aimed to evaluate the efficacy of polysaccharide fractions from frozen mycelial biomass of *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 in reducing the development of Ehrlich ascitic tumor (TAE) and Sarcoma 180. We evaluated the antitumor activity of six polysaccharide fractions (FC, FS, FI, FII, FIII-1 and FIII-2) administered to mice intraperitoneally. Treatment of animals was started 24 hours after tumor implantation and was conducted for 10 days at a dose of 30 mg.Kg<sup>-1</sup>. Evaluation of tumor development was carried out for 21 days after tumor induction by determining the volume and mass. The polysaccharide fraction that presented the highest efficacy was also analyzed in doses of 10 and 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, to determine the dose able to promote the highest tumor regression. The results showed that FC, FI and FII fractions at 30 mg/Kg<sup>-1</sup> provided a mean value of 70% inhibition of TAE development, while FII and FIII-2, at the same dose resulted about 90% inhibition of Sarcoma 180. Doses of 10 and 30 mg.Kg<sup>-1</sup> of FII promoted the highest inhibition of Sarcoma 180, about 75%, without significant difference between them and the dose of 10 mg.Kg<sup>-1</sup> represents the need for a smaller mass for the treatment.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, polysaccharide fractions, cancer, intraperitoneal treatment, Sarcoma 180, Ehrlich ascites tumor.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Efeito antitumoral de polissacarídeos de <i>Pleurotus citrinupileatus</i> contra Sarcoma 180.....	44
<b>Tabela 2</b>	Atividade antitumoral de <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>P. sajor caju</i> .....	59
<b>Tabela 3</b>	Valores de massa do Sarcoma 180 após o tratamento de camundongos com substâncias extraídas de diferentes espécies de <i>Pleurotus</i> .....	61
<b>Tabela 4</b>	Percentuais de inibição de S 180 ( I %) por substâncias obtidas de diferentes espécies de <i>Pleurotus</i> .....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Classificação dos fungos segundo Alexopoulos <i>et al.</i> (1996).....	30
<b>Figura 2</b>	Estrutura dos basidiomicetos.....	31
<b>Figura 3</b>	Esquema da função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos através da morfogênese dos basidiomicetos.....	32
<b>Figura 4</b>	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>H1</i> (A); <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> (B); <i>P. citrinopileatus</i> (C); <i>P. eryngii</i> (D) e <i>P. ostreatoroseus</i> (E).....	34
<b>Figura 5</b>	<i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em pacotes plásticos.....	35
<b>Figura 6</b>	Unidades estruturais de $\beta$ -glucanos encontrados em microrganismos.....	41
<b>Figura 7</b>	Extração fracionada de polissacarídeos.....	43
<b>Figura 8</b>	Extração fracionada de polissacarídeos de cogumelos.....	48
<b>Figura 9</b>	Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> em biorreator. (A) tempo inicial, (B) tempo final.....	52
<b>Figura 10</b>	Extração fracionada de polissacarídeos da biomassa micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	53
<b>Figura 11</b>	(A) volumes ( $\text{cm}^3$ ), (B) massas (g) e percentuais de inibição (%) do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) após o tratamento dos animais com $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de FC (caldo de cultivo), FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 (biomassa micelial), obtidas de <i>Pleurotus ostreatus</i> . As barras indicam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais indicam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.....	58
<b>Figura 12</b>	(A) volumes ( $\text{cm}^3$ ), (B) massas (g) e percentuais de inibição (I %) do Sarcoma 180 (S 180) após o tratamento dos animais com $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de FC (caldo de cultivo), FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 (biomassa micelial), obtidas de <i>Pleurotus ostreatus</i> . As barras indicam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais indicam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.....	60
<b>Figura 13</b>	(A) volumes ( $\text{cm}^3$ ), (B) massas (g) e percentuais de inibição (I %) do Sarcoma 180 (S 180) após o tratamento dos animais com 10, 30 e $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$ da fração FII, obtida da biomassa micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> . As barras indicam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais indicam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.....	65
<b>Figura 14</b>	Evolução da massa corporal (g) dos animais dos grupos controle negativo e controle substância em função do tempo de tratamento (dias) utilizando 30 e $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . da fração FII.....	67
<b>Figura 15</b>	Rendimentos (%) das frações FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 obtidas da biomassa micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

C - Massa do tumor do grupo controle positivo (g)

CS - Grupo Controle Substância

CP - Grupo Controle Positivo

CN - Grupo Controle Negativo

GT - Grupo Teste

I - Percentual de inibição (%)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MB - massa seca da biomassa micelial.

MF - massa seca da fração

MHC - “Major Histocompatibility Complex”

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - “Phosphate Buffer Solution”

S 180 - Sarcoma 180

T - Massa do tumor do grupo teste (g)

TAE - Tumor Ascítico de Ehrlich

TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná

i.p. - Intraperitoneal

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
3.1 Neoplasias.....	19
3.1.1 <i>O câncer no Brasil e no mundo</i> .....	19
3.1.2 <i>Classificação e morfologia</i> .....	20
3.1.3 <i>Modelos tumorais para estudo in vivo</i> .....	22
3.1.3.1 <u>Sarcoma 180</u> .....	23
3.1.3.2 <u>Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)</u> .....	23
3.1.4 Terapias.....	25
3.1.4.1 <u>Cirurgia</u> .....	26
3.1.4.2 <u>Radioterapia</u> .....	27
3.1.4.3 <u>Quimioterapia</u> .....	28
3.2 Fungos.....	29
3.2.1 <i>Fungos da classe dos basidiomicetos</i> .....	31
3.2.1.1 <u>Fungos do gênero <i>Pleurotus</i></u> .....	33
a) <i>Cultivo de <i>Pleurotus</i></i> .....	34
b) <i><i>Pleurotus</i> e suas aplicações</i> .....	36

3.3 Polissacarídeos.....	39
3.3.1 Polissacarídeos de origem fúngica.....	39
3.3.2 $\beta$ -glucanos.....	40
3.4 Atividade antitumoral de polissacarídeos de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> .....	42
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>50</b>
4.1 Microrganismo e manutenção.....	50
4.2 Meios e condições de cultivo.....	50
4.2.1 Meios de cultivo.....	50
4.2.2 Preparo do inóculo.....	51
4.2.3 Condições de cultivo.....	51
4.3 Separação dos polissacarídeos.....	52
4.4 Avaliação da atividade antitumoral.....	54
4.4.1 Tumores e manutenção.....	54
4.4.2 Substância e doses de tratamento.....	54
4.4.3 Animais e manutenção.....	54
4.4.4 Delineamento experimental.....	55
a) <u>Avaliação das frações</u> .....	55
b) <u>Avaliação da dosagem</u> .....	55
4.4.5 Avaliação do desenvolvimento tumoral.....	56
4.5 Análise estatística.....	57
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
5.1 Avaliação da atividade antitumoral das frações polissacarídicas.....	58
5.2 Avaliação da atividade antitumoral da fração FII em diferentes doses.....	64
5.3 Avaliação do rendimento das frações polissacarídicas.....	68
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>72</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>91</b>



## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil o câncer é a segunda causa de morte por doença, perdendo apenas para doenças cardio e cérebro-vasculares (INCA, 2009).

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) a cada ano ocorrem cerca de sete milhões de novos casos da doença, sendo a metade destes, em países em desenvolvimento como o Brasil. Nos dias atuais, há cerca de 14 milhões de pacientes com câncer no mundo. Estimativas para o ano de 2010, válidas também para 2011, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam ocorrência, no Brasil, de 489.270 novos casos da doença, sendo 253.030 novos casos para o sexo feminino e 236.240 para o sexo masculino (INCA, 2009).

Entre as terapias convencionais mais utilizadas hoje para o tratamento ou prevenção do câncer destacam-se, além da cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, que utilizam agentes químicos e físicos, isolados ou em combinação, produzindo efeitos colaterais ou tóxicos indesejáveis, que geralmente não são bem aceitos pelos pacientes (BONASSA, 2001), além de apresentarem alto custo.

Diante disso, busca-se constantemente o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos menos agressivos, que possam gerar produtos inovadores e com possibilidade de aplicação antitumoral, diminuindo as reações adversas típicas dos tratamentos convencionais e com um custo mais acessível para a população necessitada.

O estudo da literatura tem revelado que o uso de produtos naturais para o tratamento de diversos tipos de doenças é associado à medicina popular em todo o mundo, além de evidenciar o uso de substâncias ativas de origem natural com potencial atividade antitumoral (CECHINEL, 2000; MONTANARI *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2002; VIEGAS *et al.*, 2004; VIEGAS *et al.*, 2006).

Recentemente, estudos epidemiológicos e testes pré-clínicos têm revelado um grande potencial dos compostos naturais no combate ao câncer (THANGAPAZHAN *et al.*, 2006).

Produtos naturais extraídos de fungos também têm sido utilizados em preparações farmacêuticas na forma de compostos puros ou extratos (VIEGAS *et al.*, 2006).

As propriedades medicinais de fungos do gênero *Pleurotus* têm despertado grande interesse da comunidade científica por possuírem capacidade de modular o sistema imunológico, atividade hipoglicêmica e antitrombótica, capacidade de diminuir a pressão arterial e o colesterol sanguíneo, possuindo também ação antiinflamatória, antimicrobiana e antitumoral (ZHANG *et al.*, 1994; OOI e LIU, 2000).

Trabalhos envolvendo a ação antineoplásica dos polissacarídeos de fungos têm sido reportados desde 1957 (OOI e LIU, 2000).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para o cultivo de *Pleurotus* em meio sólido (SANTOS, 2000; BONATI *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2008) e em meio líquido (MAZIERO *et al.*, 1999; WISBECK, 2003; GERN *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2006; CONFORTIN *et al.*, 2008), como também, para a extração de polissacarídeos, como  $\beta$ -glucanos, produzidos por este gênero (BURNS *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1994). Paralelamente, sua capacidade antitumoral tem sido demonstrada em experimentos *in vivo* (MIZUNO, 1999; ZHANG *et al.*, 2004a; SALMONES *et al.*, 2005; WOLF *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009; DALONSO, *et al.*, 2010, DE BARBA *et al.* 2011).

Diante do exposto, no presente trabalho, propôs-se a sintetizar e extrair frações polissacarídicas de *Pleurotus ostreatus* e avaliar sua eficácia na redução do desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e do Sarcoma 180.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de frações polissacarídicas de *Pleurotus ostreatus* na redução do desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e do Sarcoma 180.

### 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar *Pleurotus ostreatus* em meio líquido para obtenção de caldo de cultivo e da biomassa micelial; precipitar os polissacarídeos do caldo de cultivo e extrair os polissacarídeos da biomassa micelial.
- Testar as frações polissacarídicas na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> a fim de avaliar sua eficácia na regressão do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos;
- Testar as frações polissacarídicas na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> a fim de avaliar sua eficácia na regressão de Sarcoma 180 em camundongos;
- Testar, nas doses de 10 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, a fração polissacarídica que apresentar maior eficácia na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, a fim de avaliar qual dose apresenta maior regressão sobre o tumor com resposta mais efetiva na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Neoplasias**

Neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais e persiste, da mesma maneira excessiva, após o término do estímulo que induziu a alteração, privando o hospedeiro do seu suprimento de energia e substrato nutricional (COTRAN *et al.*, 2000).

O câncer é definido como sendo uma neoplasia que pode provocar alterações no sistema de regulação da proliferação e de diferenciação celular. Enquanto, na maioria dos tecidos, as células dividem-se de forma controlada, no câncer, esse mecanismo de controle é perdido, ocorrendo proliferação celular acima das necessidades do tecido (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001).

Todos os tecidos no organismo podem gerar malignidade, sendo que alguns destes podem produzir vários tipos de neoplasias, algumas carcinogênicas. Apesar disso, cada tipo de câncer tem características únicas, mas os processos básicos que dão origem aos tumores parecem ser bastante semelhantes (WEINBERG, 1996).

As características de cada câncer refletem a sua origem e mesmo que um câncer se torne metastático, sua origem pode geralmente ser determinada como sendo de um tumor primário originado em um determinado órgão e, conseqüentemente, derivado por divisão de uma única célula que sofreu mutação, crescendo excessivamente mais que as células normais (ALBERTS *et al.*, 1997).

#### **3.1.1 O câncer no Brasil e no mundo**

Tratando-se de um país em desenvolvimento, o Brasil enfrenta hoje um quadro sanitário que combina doenças crônico-degenerativas, sendo exemplo deste grupo o câncer que, tanto nos países desenvolvidos, como no Brasil, já é considerado a segunda causa de morte (INCA, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano ocorrem cerca de sete milhões de novos casos de câncer, sendo que a metade destes em países em desenvolvimento. Atualmente, no mundo, há cerca de 14 milhões de pacientes com câncer, dos quais aproximadamente dois terços são casos terminais (INCA, 2009).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009), o número de novos casos de câncer estimado para 2011, no Brasil, é de 489.270. Para o sexo masculino, espera-se um número de 236.240 novos casos e para a população feminina estima-se um número de 253.030 novos casos.

A assistência ao paciente com câncer é complexa e engloba, além da área médica, outras áreas do conhecimento como a psicologia e a sociologia (SILVA, 2001a). Dados epidemiológicos disponíveis ressaltam a importância do câncer como problema de saúde pública, que necessita de assistência global, seja ela social, econômica, política, física ou emocional (INCA, 2009).

### **3.1.2 Classificação e morfologia**

De acordo com Evans (1993) “os cânceres são conseqüências de alterações genéticas e epigenéticas, envolvendo uma variedade de genes que são fundamentais para o processo de crescimento, de diferenciação celular e de remoção celular programada”.

Vários fatores favorecem o aparecimento do câncer: ambientais, como agentes físicos (raio ultravioleta, radiação ionizante), químicos (aflatoxinas) e biológicos (vírus); culturais (alimentação, estresse, tabagismo); raciais (possivelmente genéticos) e, principalmente, fatores como a idade e a hereditariedade, que podem culminar em sucessivas mutações, contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (COTRAN *et al.*, 2000).

De acordo com Hahn e Weinberg (2002) e Leroi *et al.* (2003) o câncer é caracterizado por um acúmulo de alterações genéticas, conferindo à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostáticos, garantindo a sua própria sobrevivência e proliferação. Para o seu surgimento é necessário que ocorra todo um processo, envolvendo várias etapas, denominado carcinogênese.

O processo de carcinogênese pode ser dividido em 4 fases: iniciação, promoção, manutenção e progressão (FARBER, 1984; BELTRÃO-BRAGA *et al.*, 2004).

Na etapa de iniciação, ocorrem alterações no DNA por meio de mutações, porém é necessário que estas mutações sejam herdáveis, ou seja, transmitidas para as células filhas, para gerar-se a doença (COTRAN *et al.*, 1989; BELTRÃO-BRAGA *et al.*, 2004). A promoção corresponde à etapa em que as células iniciadas proliferam em resposta a agentes promotores; na etapa de manutenção, estas células alteradas são mantidas na população, de maneira que o acúmulo de mutações decorrentes destas alterações é responsável pela progressão tumoral (BELTRÃO-BRAGA *et al.*, 2004).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), as alterações adquiridas por uma célula cancerosa podem ser agrupadas em auto-suficiência quanto a fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação, evasão da apoptose, potencial replicativo infinito, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase.

As metástases são os aspectos mais insidiosos e ameaçadores do câncer, sendo a principal causa de morbidade, mortalidade e de falhas em tratamento de pacientes com neoplasia, uma vez que a cada dez mortes pela doença nove são resultados de metástases (GIBBS, 2003).

A expressão “metástase” foi proposta por Joseph Claude Recamier, um médico francês que foi o primeiro a prover evidência anatômica de que as metástases eram causadas por células malignas que entram na circulação e migram para locais distantes no organismo (LIOTTA, 1992; VAN KEMPEN e COUSSENS, 2002). Cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico de tumores malignos sólidos (com exceção do câncer de pele não-melanoma) desenvolve metástases, fato que reduz acentuadamente a possibilidade de cura (COTRAN *et al.*, 2000).

A metástase constitui um processo multietapas, caracterizado por interações entre as células neoplásicas, as células normais e a matriz extracelular. Enzimas proteolíticas possuem papel fundamental na degradação da matriz extracelular, sendo necessárias para que o tumor ultrapasse a barreira tecidual, composta pela membrana basal e a própria matriz extracelular (WANG *et al.*, 1996).

Outro fator importante para a circulação de células neoplásicas dentro do organismo é a atividade do citoesqueleto, particularmente a formação, desintegração, contração e relaxamento de géis de actina e feixes de filamentos de actina, pois

associados a ela existem diferentes proteínas que na maioria das vezes é regulada diretamente por concentrações de  $Ca^{2+}$  ou indiretamente via calmodulina (ROOS, 1984).

Para produzir lesões clinicamente relevantes, células metastáticas precisam completar todos os passos de progressão tumoral, até atingir o crescimento para a formação da massa tumoral em sítios distantes do tumor primário. Esta, por sua vez, deve alcançar 1 mm de diâmetro para que estimule a angiogênese pela secreção de fatores pró-angiogênicos e pela inibição de fatores anti-angiogênicos (FIDLER, 2002).

Tumores histologicamente comparáveis podem ter potencial metastático extremamente divergente, dependendo do genótipo e das influências ambientais locais. O potencial metastático é influenciado pelo micro-ambiente local, angiogênese, interações tumor-estroma, elaboração de citocinas pelo tecido local e, mais significativamente, por seu genótipo molecular (LIOTTA e KOHW, 2000).

A compreensão da biologia do câncer, assim como a identificação e o estudo de potenciais agentes anti-neoplásicos, está sendo realizada graças, em parte, à disponibilidade de modelos experimentais, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (PELCZAR *et al.*, 1996).

### **3.1.3 Modelos tumorais para estudo *in vivo***

A oncologia é a ciência que estuda a biologia, o desenvolvimento, o comportamento clínico e o tratamento das neoplasias. A oncologia experimental é um ramo desta ciência que utiliza modelos experimentais para a realização de seus estudos (BRENTANI *et al.*, 2006).

Na tentativa de se obter modelos experimentais que permitissem o estudo de neoplasias, vários tipos de tumores transplantáveis como o de Ehrlich, Sarcoma de Yoshida, Sarcoma 180, Hepatomas etc., utilizando animais de laboratório, foram desenvolvidos. Esses tumores têm permitido uma melhor compreensão da biologia tumoral, assim como o estudo dos efeitos de diversos agentes sobre a patogenia do processo (PELCZAR *et al.*, 1996).

### **3.1.3.1 Sarcoma 180**

Os sarcomas referem-se a neoplasias malignas do tecido mesenquimal. A palavra deriva do grego “*sa*” que significa carnosos, visto que possuem pouco estroma de tecido conjuntivo e, portanto, são carnosos (CONTRAN *et al.*, 2000).

O sarcoma 180 (S-180) ou tumor de Crocker é uma neoplasia pouco diferenciada, descoberta em 1914 no “Godcer Laboratory” (Columbia University, NY). Foi encontrado inicialmente como uma massa sólida localizada na região axilar de um camundongo albino (SUGIURA e STOCK, 1954).

No início foi classificado como carcinoma mamário, mas após vários transplantes subcutâneos, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram peculiares de um tumor sarcomatoso, passando, então a ser chamado Sarcoma 180 (1919). Desde então sua nomenclatura não sofreu alterações (SUGIURA, 1994).

O tumor invade o músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, essa neoplasia não produz metástase (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982).

Suas células são de fácil obtenção, sendo utilizadas em vários centros de pesquisa e, após a inoculação, o tumor desenvolve-se em 90 a 100% dos casos (BUCCHI, 2002).

Pode ser transplantado por inoculação subcutânea, havendo um regresso natural em 8% a 10% desses. Em geral ocorre ulceração da pele próximo ao 28º dia após a inoculação subcutânea e os animais morrem em geral em 280 a 300 dias (KAWAKUBO *et al.*, 1980).

A forma sólida do Sarcoma 180 é pouco hemorrágica e se caracteriza pelo próprio crescimento, atingindo 18x14x10 mm por volta de sete dias após a inoculação (O’ PESSOA, 1992).

### **3.1.3.2 Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)**

O tumor de Ehrlich foi desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906 como um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932 o tumor foi convertido para a forma ascítica (DAGLI, 1989).



O tumor na forma ascítica é intensamente utilizado em sistemas experimentais, uma vez que facilita a definição da quantidade de células que serão transplantadas, o que permite certo grau de controle. O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos (MATSUZAKI *et al.*, 2003) e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (DAGLI, 1989; RIZZO, 2000; MATSUZAKI *et al.*, 2003; BERGAMI-SANTOS *et al.*, 2004).

O termo ascite (do grego *askites*, que significa bexiga, barriga ou bolsa) é definido como sendo o acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (HAUSBERGER *et al.*, 2001).

O tumor ascítico geralmente cresce em 100% dos animais inoculados, não regredindo espontaneamente. Após a inoculação de fluido ascítico fresco contendo cerca de um milhão de células neoplásicas, os camundongos acumulam cerca de 5 a 20 mL de líquido ascítico viscoso e às vezes hemorrágico em 7 a 14 dias, morrendo em 10 a 20 dias (DAGLI, 1989).

O tumor de Ehrlich, em sua forma ascítica, leva o hospedeiro à morte em um período de tempo mais curto quando comparado ao de animais portadores deste tumor na forma sólida (KLEIN e KLEIN, 1951). Os animais portadores do tumor ascítico vêm a óbito por diferentes fatores como: pressão mecânica exercida pelo aumento progressivo do fluido ascítico, processo de hemorragia intraperitoneal ou por substâncias tóxicas liberadas pelas células tumorais degeneradas (HARVEIT, 1965; MAYER, 1966).

Harveit (1965) demonstrou que animais que apresentavam uma menor sobrevida após a inoculação de células tumorais intraperitonealmente, apresentavam um fluido ascítico mais hemorrágico, sugerindo que estes animais vinham a óbito devido à intensa hemorragia intraperitoneal. Nos animais que vinham a óbito mais tardiamente, o fluido ascítico era menos hemorrágico. A autora, no entanto, atribuiu à pressão mecânica exercida pelo fluido ascítico a causa de morte nestes animais.

Segundo Sugiura (1965) *apud* Gentile (2001), não há ocorrência de metástases no coração, rins, adrenais, fígado ou baço. Além disso, é sabido que as células do tumor de Ehrlich podem ser inoculadas intravenosamente, sendo de grande utilidade nos estudos sobre migração de células e desenvolvimento de metástases, visto que na forma sólida não há ocorrência de crescimento secundário (RIZZO, 2000). Dentre outros modelos, o tumor ascítico de Ehrlich é utilizado para auxiliar na investigação de novas

modalidades terapêuticas em biologia tumoral (SAAD-HOSSNE, 2002) e, principalmente, na fisiopatologia do câncer e das metástases.

Este modelo é utilizado para o estudo de metástases pulmonares tendo como via a disseminação hematogênica (RIZZO, 2000). Entretanto, Cotran *et al.* (2000) ressaltam a probabilidade de haver uma interconexão entre o sistema vascular e o linfático, podendo ocasionar um aumento em linfonodos tanto por disseminação e crescimento de células neoplásicas quanto por hiperplasia reativa.

O tumor ascítico de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente, devido à perda da expressão do MHC (“Major Histocompatibility Complex”) que é o complexo de histocompatibilidade principal, que irá identificar e se ligar aos demais linfócitos T. Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, que é o de atacar as células que se tornam tumorais, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor ascítico de Ehrlich (BERGAMI-SANTOS *et al.*, 2004).

Em avaliação histopatológica, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose, oriundas da morte de células neoplásicas, bastante intensas já na primeira semana pós-inoculação. O tumor apresenta células com intensa atipia, possui poucas células inflamatórias, estroma escasso e alto índice mitótico (DAGLI, 1989).

Estima-se que 10% de todos os casos de ascite em humanos, são de origem neoplásica, sendo a maioria destas provenientes de tumores gastrointestinais e ovarianos (SAAD-HOSSNE *et al.*, 2003).

Várias doenças estão associadas à ascite, dentre elas a carcinomatose peritoneal que é responsável por causar uma exsudação de fluido proteináceo das células tumorais, fazendo com que o líquido extracelular entre na cavidade peritoneal para restabelecer o balanço osmótico. Em metástases maciças no fígado e no carcinoma hepatocelular ocorre hipertensão portal secundária, desencadeando um mecanismo semelhante ao da cirrose, que ocasiona aumento dos níveis de óxido nítrico, causando uma vasodilatação que simula um decréscimo no volume arterial efetivo e possivelmente leva ao aumento do hormônio retentor de sódio, diminuindo a filtração renal. A ascite quilosa secundária ao linfoma maligno aparece como conseqüência da obstrução dos linfonodos pelo tumor e pela ruptura dos vasos linfáticos (HAUSBERGER *et al.*, 2001).

### **3.1.4 Terapias**

Após a Segunda Guerra Mundial, a medicina obteve progressos memoráveis que culminaram na cura de diversas doenças, melhorando a expectativa média de vida das pessoas. Dessa forma, passou a utilizar métodos de diagnóstico e tratamentos altamente sofisticados, porém, agressivos para o paciente, prolongando a vida, mas aumentando o seu sofrimento (SOFFIATTI, 2000).

Os tratamentos básicos para o câncer são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, sendo a cirurgia e a radioterapia consideradas como tratamentos locais e a quimioterapia, como tratamento sistêmico. No câncer essas terapêuticas são usadas de forma isolada ou associada (BONASSA, 1998).

#### **3.1.4.1 Cirurgia**

De acordo com Bertino e Hait (2005), a cirurgia é um método seguro de remover tumores sólidos quando o tumor está restrito a um local específico, no entanto na maior parte dos tumores sólidos há existência de metástases, sendo importante a avaliação risco/benefício do paciente. Porém, Fauci *et al.* (1998) afirmam que a intervenção cirúrgica é ainda o principal tratamento dentro da oncologia para a grande maioria dos tumores sólidos.

As cirurgias oncológicas apresentam-se em diversas formas e procedimentos de acordo com as características do câncer e do paciente, podendo ser para tratamento antineoplásico em casos de profilaxia, diagnóstico, estadiamento, tratamento curativo ou definitivo, tratamentos em caso de recorrência, terapia paliativa, reconstrução, reabilitação, biópsias para obtenção de amostras de tecidos para exames e para remoção de tumores ou determinação do estágio de desenvolvimento (GATES e FINK, 2009).

A cirurgia oncológica depende de treinamento longo e especializado em centros de referência e é capaz de aumentar a sobrevida e diminuir a morbidade. Assim, o sucesso do tratamento cirúrgico depende diretamente do treinamento do cirurgião, sendo este o fator prognóstico mais importante (INCA, 2010).

### **3.1.4.2 Radioterapia**

Segundo INCA (2010), a radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada.

Andrade e Romero (2009) definem-na como uma terapia realizada por meio dos raios X e outras formas de radiação capazes de interagir com as células e tecidos do corpo humano. O princípio fundamental desse procedimento médico é a destruição das células doentes pela absorção da energia da radiação. É necessário atingir a região em várias direções para aperfeiçoar o processo e minimizar a quantidade de energia que atinge as células saudáveis e a distância da fonte de radiação pode variar para diferentes casos.

A radioterapia também causa injúrias à população de células normais provocando efeitos colaterais e complicações variadas após o tratamento (SPOLIDORIO *et al.*, 2001).

Os efeitos colaterais podem ser classificados em imediatos e tardios. Os efeitos imediatos são observados nos tecidos que apresentam maior capacidade proliferativa, como as gônadas, a epiderme, as mucosas dos trato digestivo, urinário e genital, e a medula óssea. Eles ocorrem somente se estes tecidos estiverem incluídos no campo de irradiação e podem ser potencializados pela administração simultânea de quimioterápicos. Manifestam-se clinicamente por anovulação ou azoospermia, epitelites, mucosites e mielodepressão (leucopenia e plaquetopenia) e devem ser tratados

sintomaticamente, pois geralmente são bem tolerados e reversíveis. Já os efeitos tardios são raros e ocorrem quando as doses de tolerância dos tecidos normais são ultrapassadas. Os efeitos tardios manifestam-se por atrofias e fibroses. As alterações de caráter genético e o desenvolvimento de outros tumores malignos são raramente observados (INCA, 2010).

### **3.1.4.3 Quimioterapia**

Segundo Bonassa (1998), a quimioterapia é definida como o emprego de substâncias químicas isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. Porém, de acordo com Silva (2001b), essas drogas atuam a nível celular, interferindo no seu processo de crescimento e divisão, contudo sem especificidade, não destruindo seletivamente ou exclusivamente as células tumorais, Assim, agredem as células normais que possuem características semelhantes às tumorais.

Muito embora já existam drogas específicas com mecanismos de ação diferentes, não lesando tanto as células normais e, portanto, não causando tantos efeitos adversos para o câncer de mama, essas drogas ainda são de difícil acesso e nem são indicadas para qualquer estadiamento (BARROS *et al.*, 2009).

Apesar dos inúmeros estudos que a indústria farmacêutica vem desenvolvendo juntamente com os grandes centros de pesquisa, no intuito de aumentar a eficácia e diminuir os efeitos colaterais das drogas quimioterápicas, sabe-se que, até hoje, a ação desses medicamentos é sistêmica e que não agem somente nas células anormais mas, também, nas normais, causando transtornos para o paciente. Assim sendo, os efeitos colaterais são praticamente inevitáveis e os prejuízos para a qualidade de vida são observados nos relatos dos próprios pacientes. Com a possibilidade de cura para o câncer, os pacientes ficaram sujeitos a doses maciças de drogas citotóxicas que provocam uma variedade de efeitos colaterais, desde os mais leves até aqueles que trazem risco de vida, requerendo, portanto, uma análise entre risco e benefício (SOFFIATTI, 2000).

Com relação à sua classificação, as drogas quimioterápicas podem ser agrupadas conforme a sua especificidade no ciclo celular, ou de acordo com a função e estrutura química (BONASSA, 1998; GOUGH *et al.*, 2001).

Com relação à diversidade de tratamento, a quimioterapia pode ser classificada como adjuvante, neoadjuvante, prévia, citorrredutora e curativa. Essas denominações são relacionadas ao tempo em que o tratamento será realizado e o seu objetivo (BONASSA, 1998; HAHN e WEINBERG, 2002).

Segundo Leroi *et al.* (2003), a toxicidade que os quimioterápicos apresentam depende do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga, podendo ser dividida em imediata (com início em horas), precoce (com início em dias e semanas), tardia (semanas a meses) e ultra-tardia (meses a anos) conforme menciona Delgado (1988).

Como principais efeitos colaterais da quimioterapia encontram-se a toxicidade hematológica, gastrintestinal, cardíaca, pulmonar, vesical, renal e dermatológica, disfunção reprodutiva, alterações metabólicas, dermatológicas, reações alérgicas e anafilaxia (DELGADO, 1988; MICHOR *et al.*, 2004).

Devido aos efeitos colaterais da quimioterapia, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando à produção e extração de polissacarídeos naturais de origem fúngica, como os  $\beta$ -glucanos (BURNS *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1994) e avaliação de sua capacidade antitumoral *in vivo* (MIZUNO, 1999; ZHANG *et al.*, 2004b; SALMONES *et al.*, 2005; WOLFF *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009; DALONSO *et al.*, 2010).

### **3.2 Fungos**

Os fungos foram agrupados em um único reino, o Reino Fungi, por Whittaker em 1969, que reuniu todos os fungos com características típicas. Alexopoulos *et al.* em 1996 propôs uma classificação que agrupa no Reino Fungi os filos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota e em cada um deles as classes e ordens, como mostrado na Figura 1 (SILVA e COELHO, 2006).

**Reino Fungi**

- Filo Chytridiomycota
  - Classe Chytridiomycetes
- Filo Zygomycota
  - Classe Zygomycetes
    - Ordens: Mucorales
      - Entomophthorales
      - Zoopagales
      - Dimargaritales
      - Endogonales
      - Kickxellales
      - Glomales
  - Classe Tricomycetes
    - Ordens: Harpellales
      - Amoebidiales
      - Asellariales
      - Eccrinales
- Filo Basidiomycota
  - Classe Basidiomycetes
    - Ordens: Agaricales
      - Boletales
      - Russulales
      - Aphylophorales
      - Auriculariales
      - Cerotobasidiales
      - Tremellales
      - Tulasnellales
      - Lycoperdales
      - Tulostomatales
      - Sclerodermatales
      - Phallales
      - Nidulariales
    - Classe Teliomycetes
      - Ordens: Uredinales
        - Septobasidiales
    - Classe Ustomycetes
      - Ordens: Cryptobasidiales
        - Cryptomycocolacales
        - Exobasidiales
        - Graphiolales
        - Platyglloeales
        - Sporidiales
        - Ustilaginales

**Figura 1** – Classificação dos fungos segundo Alexopoulos *et al.* (1996).  
 Fonte: SILVA e COELHO (2006).

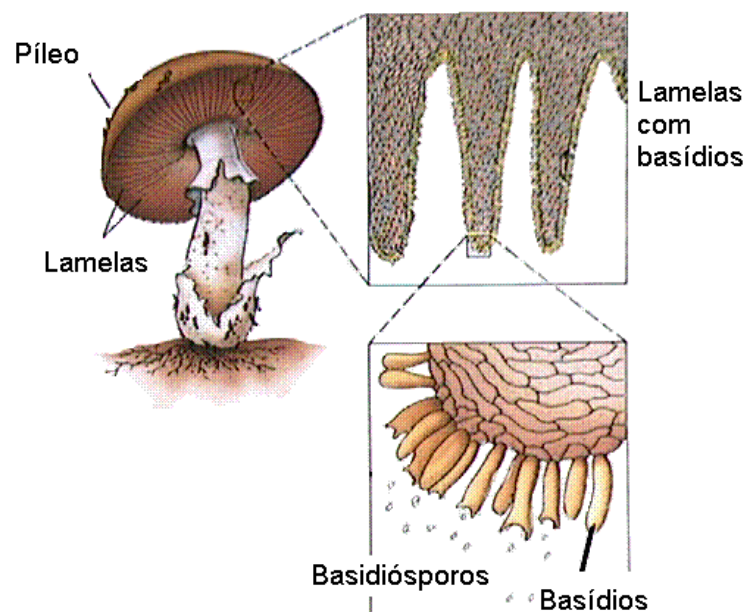
O reino Fungi é extremamente importante, influenciando todos os processos biológicos, desde a origem do solo (intemperização das rochas), passando pela formação e manutenção de sua estrutura, até a decomposição de resíduos orgânicos, reciclagem de nutrientes, biorremediação de poluentes etc. (ATTIWILL e ADAMS, 1993).

A classe dos basidiomicetos inclui os cogumelos comestíveis (MARTÍNEZ e BALLESTER, 2004).

### 3.2.1 Fungos da classe dos basidiomicetos

Os basidiomicetos reproduzem-se sexuadamente, por intermédio de esporos, ou assexuadamente (reprodução vegetativa), pela multiplicação de qualquer fragmento do corpo de frutificação ou do micélio (EIRA, 2003). São fungos de hifas septadas, que se reproduzem por esporos exógenos (basidiósporos) formados sobre uma hifa especial denominada basídio (SILVA e COELHO, 2006).

São caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos, que são liberados violentamente dos basídios, seja nas lamelas das *Agaricales* ou nos poros das *Aplyllophorales*. Também existem os denominados estatimosporos, liberados passivamente (BONONI e GRANDI, 1998). A Figura 2 mostra as principais estruturas dos basidiomicetos.



**Figura 2** - Estrutura dos basidiomicetos.  
*Fonte:* Adaptado de TRABULSI *et al.*, 1996.

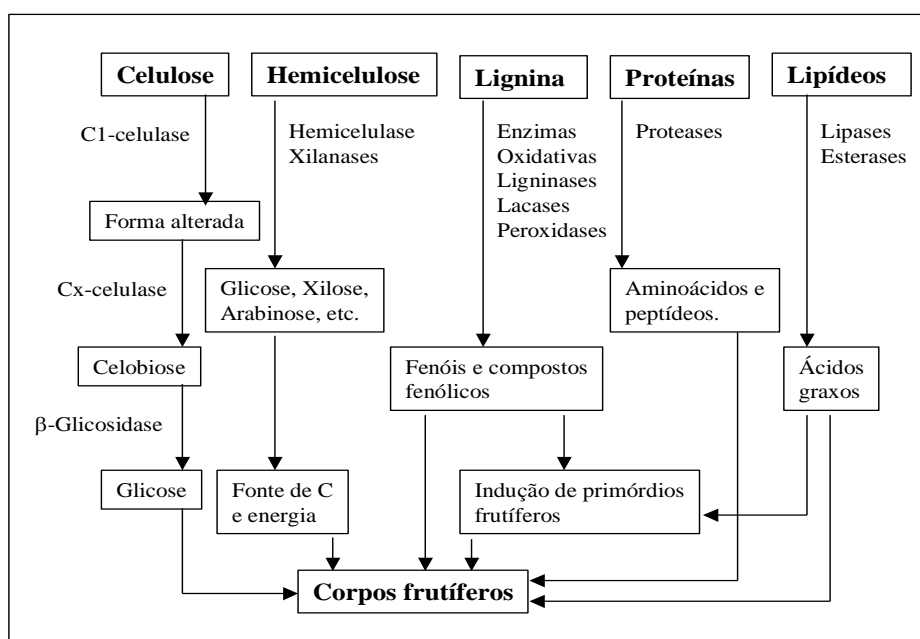
Os basidiomicetos são classificados por características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (MELO e AZEVEDO, 2008). Esses basidiomicetos oxidam compostos fenólicos,



relacionados à lignina, pela ação de enzimas extracelulares lignocelulolíticas (JORGENSEN *et al.*, 2005).

Estes fungos são aptos para crescer em uma grande variedade de resíduos agrícolas. A utilização de substratos lignocelulósicos depende de sua capacidade de secretar enzimas lignocelulolíticas tais como: celulasas, hemicelulasas, lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Estas enzimas, ao degradarem os compostos lignocelulósicos, liberam nutrientes para o crescimento fúngico (BUSWELL e CHANG, 1996). Um esquema ilustrativo, onde se observa a função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos foi elaborado por Rajarathnam *et al.* (1992) e é apresentado na Figura 3.

Atualmente, diversas enzimas extraídas de fungos têm assumido importante papel na indústria, através de processos biotecnológicos. A conversão enzimática de materiais lignocelulósicos vem recebendo considerável interesse, pois esses materiais representam uma vasta fonte de substratos brutos, obtidos a baixo custo, podendo ser convertidos em açúcares fermentáveis e usados como fonte renovável de produtos químicos, combustíveis e alimento (XAVIER-SANTOS, 2003).



**Figura 3** - Esquema da função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos através da morfogênese dos basidiomicetos.  
*Fonte:* RAJARATHNAM *et al.* (1992).

Os fungos xilófagos constituem o principal grupo com a capacidade de degradar madeira e, de forma geral, são classificados em: os que mancham a madeira, os que causam a podridão mole, a podridão parda e a podridão branca. Esta classificação, proposta por Martínez *et al.* (2005), considera o gênero *Pleurotus* como sendo um fungo xilófago causador de podridão branca. Neste caso, a madeira colonizada apresenta uma coloração desbotada em relação a original, o aspecto é úmido, mole e esponjoso, com perda da resistência após a colonização.

Dentro do grupo dos fungos que causam podridão branca, existem aqueles, como *Pleurotus*, que atacam tanto madeiras do tipo mole como dura e que se caracterizam por degradarem inicialmente a hemicelulose e a lignina e, posteriormente, a celulose. (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

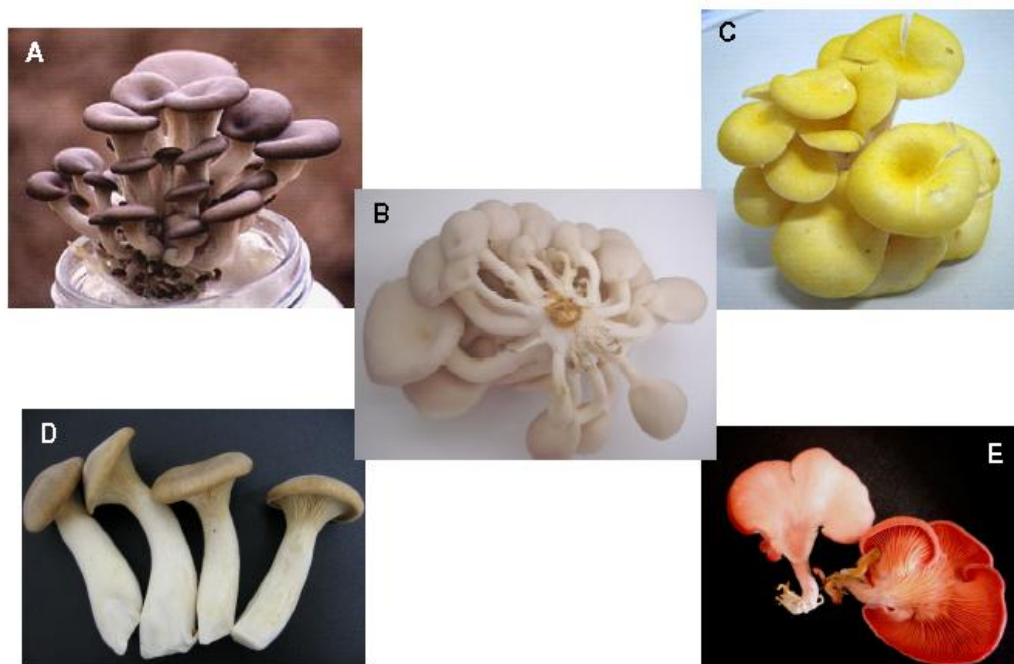
### **3.2.1.1 Fungos do gênero *Pleurotus***

Mais de 1000 espécies de *Pleurotus* já foram descritas, porém aproximadamente 50 são reconhecidas como válidas para este gênero (GUZMAN, 2000).

Estudos de biogeografia demonstram que o gênero *Pleurotus* possui ampla distribuição geográfica pelo mundo. Entretanto, as estirpes relacionadas à espécie *P. ostreatus* ocorrem, principalmente, na América do Norte e norte da Europa (VILGALYS e SUN, 1994; BAO *et al.*, 2004). Porém, várias são as citações de espécies deste gênero, incluindo a espécie *P. ostreatus*, no Brasil (GUERRERO e HOMRICH 1983; BONONI e GRANDI, 1998). Inclusive, Pereira (1988) reporta espécies de *Pleurotus* do estado do Rio Grande do Sul.

A maioria das espécies do gênero *Pleurotus* é comestível, sendo *Pleurotus ostreatus* uma das mais consumidas. Outras espécies como *P. ostreatoroseus*, *P. citrinupileatus* e *P. eryngii*, também são comumente encontradas, como também *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (KOMURA, 2009).

A Figura 4 mostra imagens de diversas espécies e variedades de fungos do gênero *Pleurotus*.



**Figura 4** – *Pleurotus ostreatus* var. *H1* (A); *P. ostreatus* var. *florida* (B); *P. citrinopileatus* (C); *P. eryngii* (D) e *P. ostreatoroseus* (E).  
Fonte: KOMURA, 2009.

Os “cogumelos ostra”, nome pelo qual são conhecidos os cogumelos do gênero *Pleurotus*, são apreciados, não somente pelo seu sabor, mas também pelo seu elevado valor nutricional (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

#### a) Cultivo de *Pleurotus*

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam grande potencial de cultivo no Brasil em razão de sua maior rusticidade e facilidade de cultivo (EIRA, 2003).

Inicialmente o gênero *Pleurotus* era cultivado em troncos de árvore, mas com o aumento de seu consumo, Bisaria e Madan (1983) desenvolveram uma metodologia de cultivo em substratos compostos de palhas acondicionados em sacos plásticos (Figura 5).



**Figura 5** – *Pleurotus ostreatus* cultivado em pacotes plásticos.  
*Fonte:* Grupo de Pesquisa Processos Biotecnológicos da UNIVILLE.

Diversos são os resíduos utilizados hoje em dia para o cultivo sólido de *Pleurotus*. Scariot *et al.* (2000) conseguiram produzir corpos frutíferos de *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus* em resíduo de algodão. Santos (2000) e Bonatti (2001) estudaram as espécies *Pleurotus ostreatus* e *P. sajor-caju*, adaptando-as às condições ambientais da região nordeste catarinense, que apresenta abundância em resíduos lignocelulósicos, como por exemplo, palha de arroz e palha de bananeira.

No entanto, além do cultivo em resíduos lignocelulósicos (cultivo sólido) para a produção dos corpos frutíferos (basidiomas), as espécies de *Pleurotus* vêm sendo cultivadas em meio líquido (cultivo submerso), sendo *Pleurotus ostreatus* uma das espécies mais estudadas para obtenção de biomassa micelial e produção de substâncias com propriedades terapêuticas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1996, ROSADO *et al.*, 2003, GERN *et al.*, 2008, BORGES, 2009).

Este tipo de cultivo apresenta controles mais apurados como os de pH, temperatura, agitação e aeração, adição de carboidratos, entre outros, que são utilizados para otimizar o processo, diminuindo o tempo de cultivo e favorecendo uma maior produção de biomassa micelial em espaço reduzido, tempo de cultivo mais curto e menores chances de contaminação (WU *et al.*, 2008).

Segundo Martin (1983), o cultivo submerso de *Pleurotus* apresenta baixo custo de produção, pois é considerado um método rápido e alternativo para a obtenção de biomassa fúngica com qualidade consistente. Além disso, a velocidade do crescimento do fungo em meio líquido é frequentemente elevada, quando comparada com o meio sólido, além da independência de variações sazonais.

Por outro lado, Leonowicz *et al.* (1991) afirmam que o cultivo submerso demanda mais trabalho e energia do que o cultivo sólido.

No cultivo submerso, o estágio de frutificação não ocorre, mas a biomassa e os polissacarídeos extracelulares produzidos podem ser recuperados. Além disso, a biomassa produzida pode ser diretamente usada como inóculo em novos processos produtivos, como fonte para a produção de metabólitos intermediários, como complemento alimentar ou em alimentos enriquecidos e para extração de aromas e sabores (MAZIERO *et al.*, 1999; ROSADO *et al.*, 2003).

Wisbeck (2003) definiu como condições que maximizam a produção de polissacarídeos extracelulares por *P. ostreatus*, as seguintes: meio POL (5,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 1,0 g.L<sup>-1</sup> de peptona; 1,0 g.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>) pH 4,0, concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup> e k<sub>L</sub>a (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) inicial de 15 h<sup>-1</sup>. Estas condições promoveram a produção de 1,35 g.L<sup>-1</sup> de polissacarídeos extracelulares.

Já, Gern *et al.* (2008) obtiveram, com o mesmo microrganismo, maior concentração de polissacarídeos extracelulares (1,2 g.L<sup>-1</sup>) quando o meio de cultivo à base de extrato de trigo foi suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de milhocina (fonte de nitrogênio) e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose (fonte de carbono), na ausência de sulfato de amônio, com K<sub>L</sub>a inicial de 10,2 h<sup>-1</sup>.

## b) *Pleurotus* e suas aplicações

No que tange as aplicações biotecnológicas, o cultivo de cogumelos representa uma das possibilidades para a utilização de resíduos da agricultura, pois estes transformam a biomassa caracterizada como agente poluente, em alimento, além de representar uma opção para pequenos agricultores. Entre os cogumelos mais cultivados no mundo, *P. ostreatus* ocupa a segunda posição sendo apenas superado pela

produção de *Agaricus bisporus* (LARRAYA *et al.*, 2000). Neste sentido, Rajarantnam e Bano (1989) enfatizaram a viabilidade do cultivo de *Pleurotus* spp. pela sua habilidade de conversão de resíduos agroindustriais do tipo lignocelulósico.

Segundo Gunde-Cimermann (1999), os fungos do gênero *Pleurotus* são eficientes na degradação de lignina por produzirem enzimas extracelulares como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases. Por apresentarem estas características, muitos cogumelos deste gênero têm sido utilizados na degradação de resíduos de matéria orgânica oriunda da agricultura, agropecuária e de processos agroindustriais, tais como esterco, casca de café, palhas de trigo, arroz, milho, algodão, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, entre outros (CROAN, 2000; LABARÈRE e BOIS, 2002; EIRA, 2003).

Desta forma, o cultivo de *Pleurotus* sp. vem se tornando uma forma de utilizar melhor estes recursos. Além disso, os resíduos orgânicos produzidos pelo fungo podem ser utilizados na alimentação bovina, uma vez que tem se observado que este material tem uma melhor digestibilidade comparado ao material não colonizado pelo cogumelo (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984).

A forma, então, de condução do cultivo de *Pleurotus* dependerá do produto desejado. O cultivo sólido, utilizando resíduos agroindustriais, vem sendo utilizado para a produção de corpos frutíferos para fins alimentares (SILVEIRA, 2003; RAGUNATHAN e SWAMINATHAN, 2003; BONATTI *et al.*, 2004; MENDEZ *et al.*, 2005; SHASHIREKHA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2007; HOLTZ *et al.*, 2009, RAMPINELLI *et al.*, 2010), para a extração de enzimas como celulasas e xilanases (GHOSH, *et al.*, 1998; TSIKLAURI *et al.*, 1999; ALEXANDRINO *et al.*, 2007), para extração de princípios terapêuticos (LAVI, *et al.*, 2006; AJITH e JANARDHANAN, 2007; MORADALI *et al.*, 2007; WOLFF, *et al.*, 2008; SELEGEAN *et al.*, 2009; TONG *et al.*, 2009; DALONSO *et al.*, 2010; DE BARBA, 2010; ZHANG *et al.*, 2011a; ZHANG *et al.*, 2011b) e para a bioconversão de resíduos lignocelulósicos de um modo geral (THOMAS *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2007; SALES-CAMPOS *et al.* 2010).

Segundo Chang e Miles (1993), cogumelos do gênero *Pleurotus* representam um alimento de baixo custo, que contém alto teor de proteínas de boa qualidade (19 – 35%), todos os aminoácidos essenciais, elevada proporção de ácidos graxos insaturados, diversas vitaminas e minerais, além de baixos teores de gorduras, colesterol, ácidos nucléicos e calorias.

Segundo Bonatti *et al.* (2004) *Pleurotus ostreatus* cultivado em palha de bananeira possui elevado valor nutricional com 16,9% de proteína bruta, além de conter fibras (9,4%) e baixo teor de gorduras (5,97%). Já, Rampinelli *et al.* (2010), ao cultivar *P. djamor* em palha de bananeira, verificaram que pode ser considerado fonte de P e K, além de apresentar baixo teor de açúcar, não conter gordura e contribuir com o aporte de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

Outra área de aplicação do gênero *Pleurotus* é a ambiental, que pode utilizar tanto cultivo sólido quanto submerso. *Pleurotus spp.* são bons candidatos para aplicações em biorremediação do solo, degradação de corantes oriundos de tingimento industrial, de compostos fenólicos e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (COHEN *et al.*, 2002). Já foram relatadas na literatura sua capacidade de degradação de compostos aromáticos, tais como o 2,4 diclorofenol (SILVA *et al.*, 2009), bem como, polímeros como o poli-(tereftalato) de etileno (PET) (REYS, 2003) e poliuretanos (PU) (KLOSS, 2007).

O cultivo submerso de *Pleurotus* vem sendo realizado principalmente para síntese de substâncias bioativas para posterior verificação da atividade terapêutica. Estudos mostram que os polissacarídeos sintetizados pelo gênero *Pleurotus* possuem capacidade de modular o sistema imunológico (MORRIS *et al.*, 2003; SHAMTSYAN *et al.*, 2004; SARANGI *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2011); atividade antiinflamatória (SHAMTSYAN *et al.*, 2004), capacidade hipoglicêmica e antitrombótica, além de diminuir a pressão arterial e o colesterol sanguíneo (GUNDE-CIMERMAN, 1999); ação antimicrobiana (HARA *et al.*, 1987; GARCIA *et al.*, 1998; WISBECK *et al.*, 2002) e antitumoral (WANG *et al.*, 2000; OOI e LIU, 2000; ZHANG *et al.*, 2004a; ZHANG *et al.*, 2004b; WANG *et al.*, 2005; TAO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; WOLFF *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2010).

A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, tem levado a intensivos estudos relacionados à sua extração e caracterização (ZHANG *et al.*, 1994; GUTIÉRREZ *et al.*, 1996; MAZIERO, 1996; GERN *et al.* 2008; WOLFF *et al.*, 2008; SMIDERLE, 2008; FUKUDA, *et al.*, 2009; KOMURA, 2009; TONG *et al.*, 2009; DALONSO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011a; ZHANG *et al.*, 2011b).

### **3.3 Polissacarídeos**

Os polissacarídeos representam os mais abundantes compostos orgânicos da biosfera, exibindo importantes propriedades e diferentes aplicações, relacionadas com suas características químicas (FUKUDA *et al.*, 2009).

Polissacarídeos são polímeros constituídos de resíduos de monossacarídeos interligados por ligações glicosídicas. Estas ligações são formadas pela eliminação de moléculas de água entre o grupo hidroxila hemiacetil de um resíduo e um grupo hidroxila primário ou secundário do resíduo adjacente (SUTHERLAND, 1985). Os tipos de ligações entre os monômeros, a variação de composição, o tipo e a quantidade de ramificações, influenciam na estrutura secundária e terciária dos polissacarídeos determinando suas propriedades físicas e, conseqüentemente, suas atividades biológicas (SUTHERLAND e ELLWOOD, 1979).

#### **3.3.1 Polissacarídeos de origem fúngica**

Os polissacarídeos de origem fúngica concentram-se basicamente na parede celular, sendo a composição química bastante complexa, podendo estar ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons orgânicos, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004).

Nos fungos da classe dos basidiomicetos, os polissacarídeos podem ser encontrados na forma de homopolímeros, heteropolímeros, glicoproteínas, peptideopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (GOW e GADD, 1995).

O conhecimento da constituição química da parede celular, principalmente em relação à presença de polissacarídeos, é importante para o emprego biotecnológico dos fungos, pois estas moléculas podem ser utilizadas em diversos processos industriais ou, ainda, ser úteis para a classificação taxonômica desses organismos (MADIGAN *et al.*, 2004).

Gutiérrez *et al.* (1996) afirmam que nos fungos, os polissacarídeos constituem um percentual importante da biomassa, onde a parede da hifa é formada por mais de 75% dessas moléculas, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como um suporte para a hifa, essas macromoléculas também podem constituir uma “capa” extracelular ao redor do micélio.



Várias pesquisas já demonstram a viabilidade técnica da extração e/ou aplicação de polissacarídeos de leveduras (DURAN e NOBLEGA, 2004; KIM e YUN, 2005; NOMBELA *et al.*, 2006) e de fungos filamentosos como *Cryphonectria parasítica* (MOLINARO *et al.*, 2000), *Gonoderma lucidium* (ZHANG *et al.*, 2000), *Agaricus blazei* (DONG *et al.*, 2002) *Agaricus bisporus* (FELIPPE, 1999), *Verticillium fungicola* (DOMENECH *et al.*, 2002), *Termitomyces eurhizus* (MONDAL *et al.*, 2004), *Astroeus hygrometricus* (CHAKRABORTY *et al.*, 2004), *Inonotus obliquus* (KIM *et al.*, 2006), *Pleurotus eryngii* (JEONG *et al.*, 2010), *Pleurotus geesteranus* (ZHANG *et al.*, 2011a), *Pleurotus citrinopileatus* (LI *et al.*, 2008), *Pleurotus sajor-caju* (AZEVEDO *et al.*, 2009), *Pleurotus pulmonarius* (SMIDERLE, 2008); *Pleurotus tuber-regium* (ZHANG *et al.*, 2004a; ZHANG *et al.*, 2004b) e *Pleurotus ostreatus* (WANG *et al.*, 2000; WISBECK, 2003; GERN, 2005; LAVI *et al.*, 2006; WOLFF, 2007; TONG *et al.*, 2009).

Segundo Gutiérrez (1995) e Gutiérrez *et al.* (1996), existe uma correlação entre os polissacarídeos componentes da parede celular com os polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos. Os autores verificaram que os polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação apresentaram os mesmos tipos de monômeros e de ligações que os dos polissacarídeos extracelulares obtidos em cultura submersa, havendo, no entanto, alguma variação na proporção dos tipos de ligações presentes nos polímeros

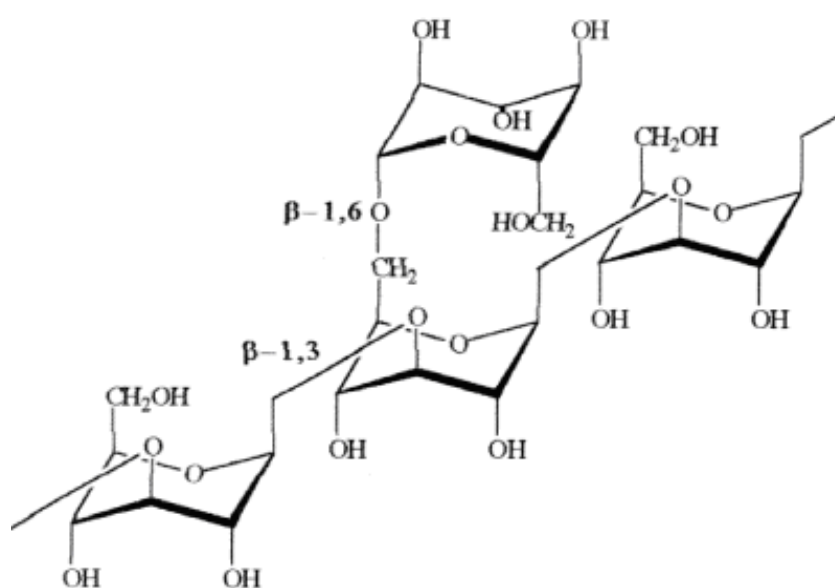
### 3.3.2 $\beta$ -glucanos

$\beta$ -glucanos são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de fungos e certos cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (MAGNANI *et al.*, 2008).

A maioria dos cereais contém quantidades variáveis de  $\beta$ -glucanos. Esses polissacarídeos são comuns entre os cereais e ocorrem em grande quantidade no endosperma e na parede celular de cevada, trigo e aveia, por exemplo (HENRY, 1987; CARR *et al.*, 1990).

Amplamente distribuídos na natureza, os  $\beta$ -glucanos estão presentes em fungos, leveduras, algas, bactérias e plantas superiores apresentando diferentes estruturas (MIURA *et al.*, 2003).

Dentre os polissacarídeos encontrados na parede celular fúngica os glucanos são os homopolissacarídeos mais comuns. A maioria é linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ). Os  $\beta$ -glucanos são a forma predominante, podendo estar livres ou associados às proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos (WILLIAMS, 1997). Na Figura 6 a estrutura de um  $\beta$ -glucano é apresentada.



**Figura 6** – Unidades estruturais de  $\beta$ -glucanos encontrados em microrganismos. Fonte: Park *et al.* (2003).

As propriedades biológicas de preparações brutas de  $\beta(1-3)$  glucanos vem sendo estudadas desde a década de 50 (PILLEMER *et al.*, 1956). De acordo com Manzi e Pizzoferrato (2000), os cogumelos comestíveis apresentam compostos que têm propriedades funcionais, em particular os homo e hetero-glucanos com ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-3)$  e  $\beta(1-6)$ .

Entre as atividades farmacológicas relacionadas a diversas espécies de fungos que contém  $\beta$ -glucano, está a atividade antitumoral (YOSHIOKA *et al.*, 1985; KAWAGISHI *et al.*, 1989; MIZUNO, 1999; MANZI e PIZZOFERRATO, 2000; ZHANG *et al.*, 2004b).

A introdução de biomoduladores combinados com a quimioterapia contribuiu significativamente para a terapia antitumoral. Dentre os compostos imunomoduladores, os  $\beta$ -glucanos extraídos da parede celular de fungos vêm sendo avaliados por sua atividade antitumoral (MIADOKOVÁ *et al.* 2005).

Diversas pesquisas realizadas, principalmente no Japão, comprovaram que  $\beta$ -glucanos realçam os efeitos do tratamento quimioterápico e melhoram a qualidade da sobrevivência de pacientes com câncer tratados com radiação (KIM *et al.*, 2006).

Conforme Miadoková *et al.* (2005), os derivados de  $\beta$ -glucanos pertencem a uma das mais abundantes classes de biopolímeros que podem contribuir para a prevenção e terapia do câncer.

### **3.4 Atividade antitumoral de polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus***

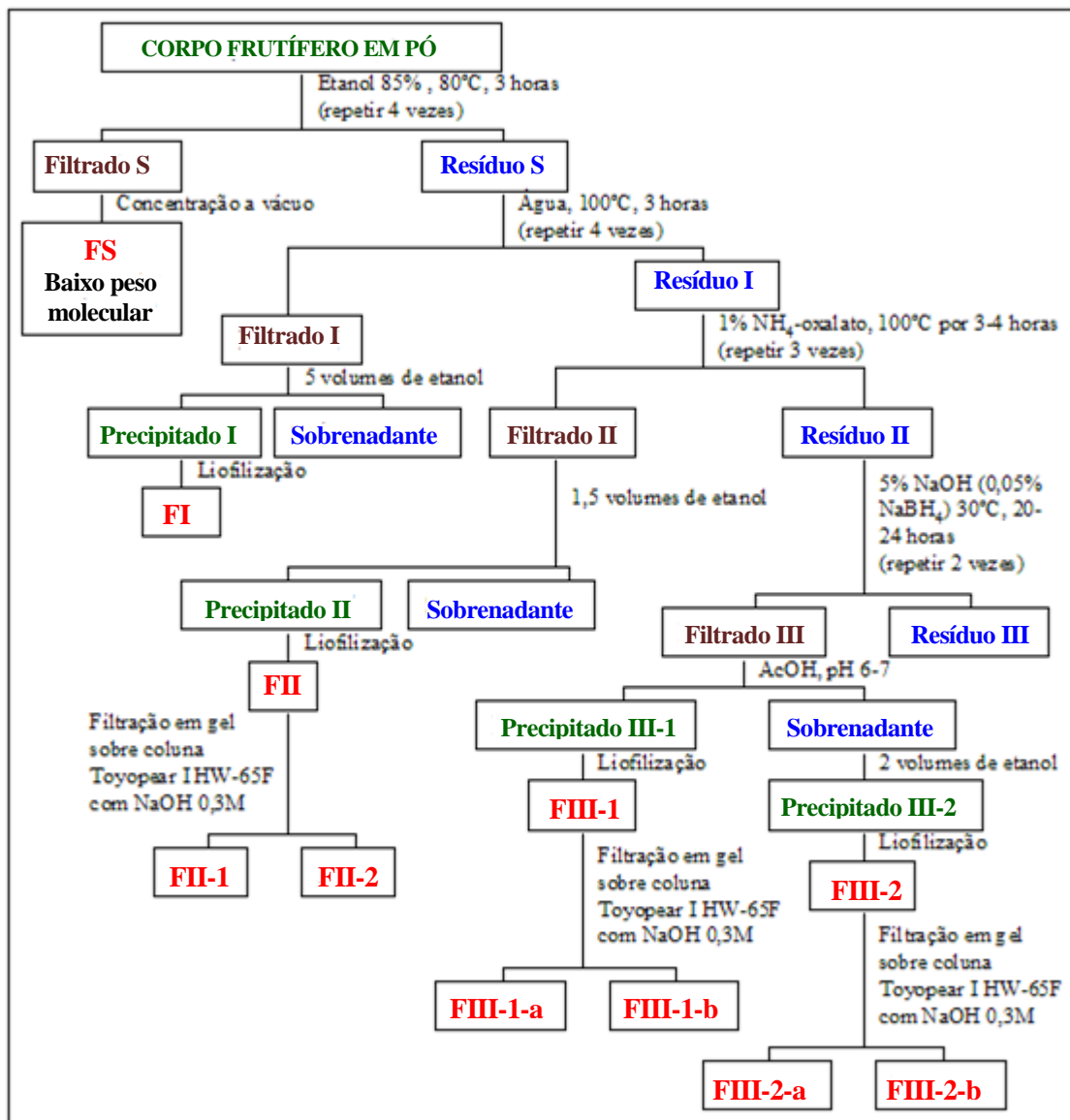
Estudos *in vitro* (LAVI *et al.*, 2006; TONG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011a) e *in vivo* comprovaram as propriedades antitumorais de polissacarídeos sintetizados por fungos do gênero *Pleurotus*, provenientes de corpos frutíferos (IKEKAWA *et al.*, 1969; YOSHIOKA *et al.*, 1985; ZHANG *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2004a; ZHANG *et al.*, 2004b; SHAMTSYAN *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2006; WOLFF *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2010), da biomassa micelial (ZHANG *et al.*, 2004a; SARANGI *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2010) e do caldo de cultivo (WANG *et al.*, 2005; WOLFF *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009; DE BARBA *et al.*, 2011).

Corpos frutíferos de *P. ostreatus* foram submetidos à extração aquosa por 4,5 horas a 97°C. O extrato aquoso inibiu em 75,3% o desenvolvimento do Sarcoma 180 na forma sólida, transplantado subcutaneamente em camundongos. O tratamento intraperitoneal foi de 10 dias, iniciado 24 h após a inoculação do tumor, a uma dose diária de 200 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A avaliação ocorreu 5 semanas após o início do tratamento (IKEKAWA *et al.*, 1969).

Yoshioka *et al.* (1985) isolaram  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucano com cadeias laterais  $\beta(1\rightarrow6)$  de corpos frutíferos de *P. ostreatus*, sendo a purificação do polissacarídeo realizada por extrações com 20% de solução de cloreto de sódio saturada com timol e por precipitação com etanol a partir da solução de dimetilsulfóxido. A atividade antitumoral desta fração foi confirmada com a inibição de 95% de Sarcoma 180

inoculado subcutaneamente na concentração de  $5 \times 10^6$  cel.animal<sup>-1</sup> em camundongos fêmeas. O tratamento intraperitoneal foi por 10 dias, iniciado 24 h após a inoculação do tumor, na dose diária de  $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e avaliados após 5 semanas do início do tratamento.

Zhang *et al.* (1994) fracionaram corpos frutíferos secos de *P. citrinupileatus* (Figura 7) e avaliaram a atividade antitumoral de cada fração polissacarídica contra o Sarcoma 180, na forma sólida, inoculado subcutâneamente, na concentração de  $2 \times 10^6$  cel.animal<sup>-1</sup> em camundongos.



**Figura 7** - Extração fracionada de polissacarídeos.

Fonte: Zhang *et al.* (1994).

O tratamento dos animais foi durante 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação do tumor, com doses diárias de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> e avaliados após 3 semanas do início do tratamento. Na Tabela 1 pode-se observar alguns resultados obtidos pelos autores.

**Tabela 1** – Efeito antitumoral de polissacarídeos de *Pleurotus citrinupileatus* contra Sarcoma 180.

Fração	Inibição tumoral em 3 semanas (%)	Regressão completa do tumor em 5 semanas	Mortalidade dos animais em 9 semanas
FI	23,0	0/7	6/7
FII	24,1	0/7	5/7
FIII-1	79,5	5/7	1/7
FIII-2	93,5	6/7	0/7

Wang *et al.* (2000) extraíram, de corpos frutíferos frescos de *P. ostreatus*, uma proteína denominada lectina. A extração foi realizada com NaCl (0,15 mol.L<sup>-1</sup>) e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio. O precipitado foi dissolvido e liofilizado. A proteína foi purificada por cromatografia de troca iônica. A atividade antitumoral da lectina foi avaliada contra Sarcoma 180 (S 180) e Hepatoma 22 (H 22), na forma sólida. Os tumores foram inoculados subcutaneamente (5 x 10<sup>7</sup> cel.animal<sup>-1</sup>) em camundongos ICR. Após 24 h da inoculação do tumor, os animais foram tratados com injeções intraperitoneais diárias da substância na dose de 1,5 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 20 dias. A avaliação ocorreu no 21º dia após o início do tratamento e os autores observaram inibição de 88,5 e 75,4% no desenvolvimento de tumores S 180 e H 22, respectivamente.

Frações polissacarídicas foram extraídas de corpos frutíferos secos e de biomassa micelial em pó de *P. tuber-regium* por Zhang *et al.* (2004b). As amostras foram tratadas durante 4 h com éter dietílico e acetona. Após a separação dos solventes, as amostras foram ressuspensas em NaCl 0,9% e submetidas a 100°C por 3 h. O sobrenadante foi dializado e liofilizado. A atividade antitumoral contra Sarcoma 180 na forma sólida foi avaliada em camundongos inoculados subcutaneamente (1x10<sup>5</sup> cel.animal<sup>-1</sup>). Após 24 h da inoculação do tumor, os animais

foram tratados intraperitonealmente por 10 dias com dose diária de 20 mg.Kg<sup>-1</sup> e a avaliação ocorreu no 7º dia, após o término do tratamento. Os autores observaram uma inibição do desenvolvimento do tumor de 65,4 e 55,3% para as frações polissacarídicas da biomassa micelial e de corpos frutíferos, respectivamente.

Seis extratos alcalinos obtidos a quente, provenientes de corpos frutíferos de *P. tuber-regium*, foram carboximetilados e testados contra Sarcoma 180 induzido subcutaneamente (1 x 10<sup>5</sup> cel.animal<sup>-1</sup>) em camundongos BALB/c por Zhang *et al.* (2004a). O tratamento foi realizado por via intraperitoneal durante 10 dias, iniciado 24 h após a inoculação do tumor, numa dose diária de 20 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A avaliação foi realizada no 7º dia após o término do tratamento e a inibição do desenvolvimento do tumor variou de 43 a 75% nas frações testadas.

Corpos frutíferos secos de *Pleurotus ostreatus* foram tratados com 85% de etanol a 80°C por 8 h por Shamtsyan *et al.* (2004). Após a separação do solvente, foi realizada a extração aquosa em água a 100°C durante 3 h, duas vezes. A fração polissacarídica foi obtida pela precipitação do sobrenadante com 5 volumes de etanol. A atividade antitumoral foi avaliada contra melanoma B16 transplantado subcutaneamente (1 x 10<sup>6</sup> cel.animal<sup>-1</sup>) em camundongos fêmeas C57BL, após duas semanas de tratamento via oral com 100 mg de extrato.(Kg animal<sup>-1</sup>). O volume do tumor foi medido de 8 a 40 dias após o transplante. A inibição do tumor aumentou, do 8º ao 26º dia, de 30 para 80%, respectivamente, em relação ao grupo controle, que não recebeu tratamento prévio. Após este período os animais do grupo controle não sobreviveram e o volume do tumor nos animais previamente tratados seguiu diminuindo até o 40º dia de experimento.

Wang *et al.* (2005) utilizaram o precipitado do caldo de cultivo (precipitação com etanol na proporção caldo:etanol de 1:4) de *P. citrinopileatus* contra Sarcoma 180, na forma ascítica, inoculado em camundongos na concentração de 3x10<sup>6</sup> cel.animal<sup>-1</sup>. Após 20 dias de tratamento via oral com doses diárias de 5, 15 ou 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, observaram redução de 35, 63 e 74%, respectivamente, de inibição do desenvolvimento tumoral.

A atividade antitumoral de diferentes extratos miceliais de *Pleurotus ostreatus* foi avaliada por Sarangi *et al.* (2006). Biomassa micelial fresca foi esmagada em solução tampão fosfato (PBS) com o auxílio de um pistilo. O extrato foi coletado, misturado com etanol e mantido por 24 h a 3°C. O precipitado foi coletado por centrifugação, dializado e passado através de uma coluna de troca iônica. O tumor

utilizado foi Sarcoma 180, inoculado intraperitonealmente em camundongos na concentração de  $2 \times 10^6$  cel.animal<sup>-1</sup>. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com doses diárias de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> por 6 dias e avaliados no dia seguinte ao término do tratamento. A fração que apresentou maior atividade antitumoral foi, segundo os autores, a mais purificada, alcançando cerca de 98% de redução do número de células tumorais.

Tao *et al.* (2006) avaliaram a ação antitumoral de diversas frações polissacarídicas de corpos frutíferos de *Pleurotus tuber-regium*. A fração lipídica de corpos frutíferos secos foi retirada por extração em Soxhlet com acetato de etila e acetona. O resíduo resultante foi tratado com NaCl (0,15 M) a 120°C, obtendo-se, após separação por centrifugação e precipitação com 3 volumes de etanol, a fração TM3 que formou duas fases a TM3a (solúvel em água) e a TM3b (insolúvel em água). A fase TM3b foi fracionada em 8 frações (F1 a F8) que foram testadas contra Sarcoma 180 inoculado subcutaneamente em camundongos numa concentração de  $1 \times 10^5$  cel.animal<sup>-1</sup>. Os animais foram tratados, intraperitonealmente, com doses diárias de 20 e 60 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 8 dias. O tratamento teve início 24 h após a inoculação do tumor e a avaliação ocorreu no dia seguinte ao término do tratamento. A fração que promoveu a maior inibição (72,1%) foi a F2 na dose de 60 mg.Kg<sup>-1</sup>. Esta mesma fração, na dose de 20 mg.Kg<sup>-1</sup>, levou a apenas 21,6% de inibição do desenvolvimento tumoral. Este comportamento foi verificado para maioria das frações testadas.

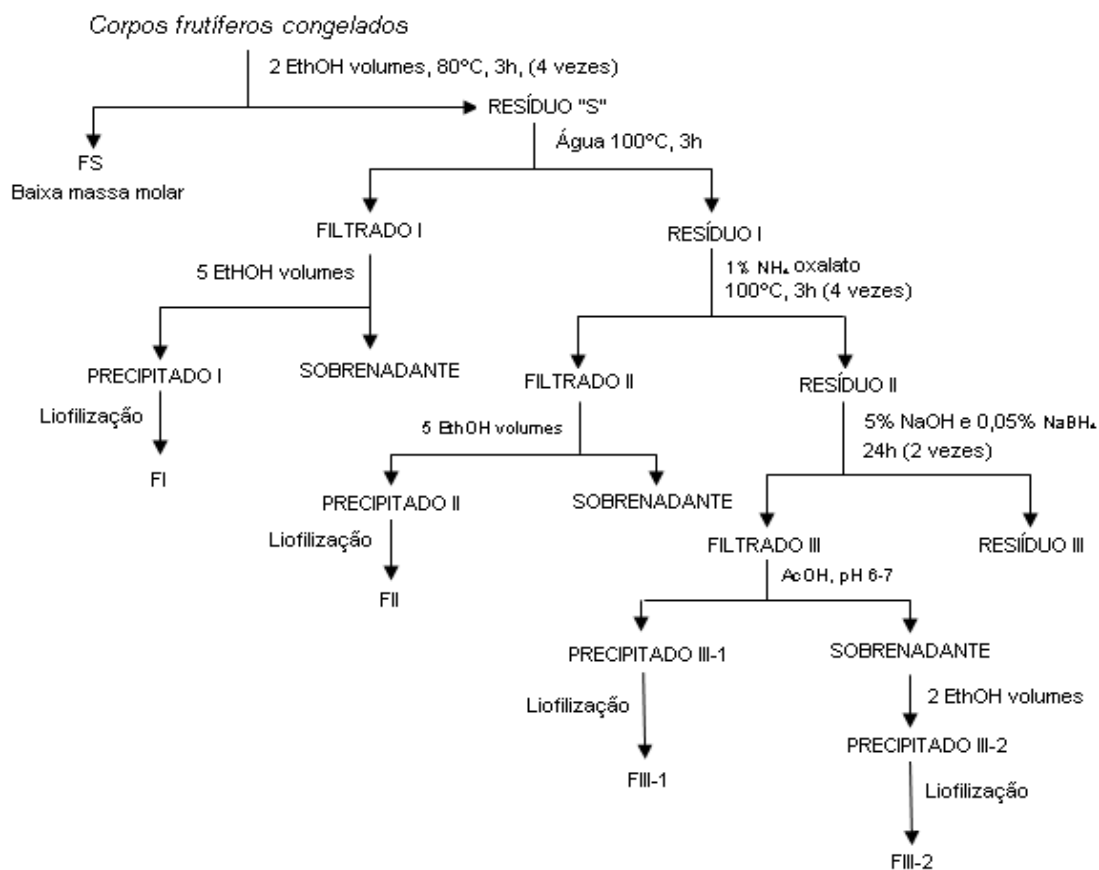
Wolff *et al.* (2008) avaliaram a ação antitumoral do caldo de cultivo *in natura* (CBIN), do precipitado polissacarídico do caldo de cultivo (ECB) e de polissacarídeos obtidos de corpos frutíferos (EFB) de *Pleurotus ostreatus* contra o tumor ascítico de Ehrlich (TAE). ECB foi obtido pela precipitação do caldo de cultivo por 4 volumes de acetona. EFB pela precipitação com 5 volumes de etanol do sobrenadante resultante de extração aquosa (100°C por 4 h) de corpos frutíferos frescos. O tumor foi inoculado no peritônio de camundongos Albinos Swiss fêmeas na concentração de  $5 \times 10^6$  cel/animal. O tratamento, por via intraperitoneal, foi iniciado 24 h após a inoculação do tumor, nas doses de 10 mL.Kg<sup>-1</sup> para CBIN e de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> para ECB e EFB, foi realizado durante 6 dias e o animal foi sacrificado no dia seguinte ao término do tratamento. Os autores observaram maior inibição do desenvolvimento do tumor, 76%, com ECB, seguido de 71% com EFB e 70% com CBIN.

A atividade antitumoral da proteína lectina, obtida de corpos frutíferos de *P. citrinopileatus*, também foi avaliada contra Sarcoma 180 inoculado subcutaneamente em camundongos ICR na concentração de  $5 \times 10^6$  cel.animal<sup>-1</sup>. Após a inoculação os animais receberam doses diárias ( $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) de lectina, por via intraperitoneal, durante 20 dias e a avaliação foi realizada no dia seguinte. Inibição do desenvolvimento tumoral de 78,5% foi observada pelos autores (LI *et al.*, 2008).

No trabalho de Furlan *et al.* (2009) o caldo de cultivo *in natura* (CBIN) e o precipitado polissacarídico do caldo de cultivo (ECB), obtido pela precipitação do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor caju* com 4 volumes de acetona, foram avaliados quanto à sua atividade antitumoral contra o tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Camundongos foram inoculados com  $5 \times 10^6$  cel.animal<sup>-1</sup>. O tratamento foi conduzido por 6 dias nas doses de  $10 \text{ mL.Kg}^{-1}$  para CBIN e de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  para ECB e a avaliação foi realizada no dia seguinte. Foi verificada uma inibição do desenvolvimento tumoral de 86% para CBIN e 81% para ECB.

Dalonso *et al.* (2010) utilizaram, para a extração de polissacarídeos de corpos frutíferos congelados, uma metodologia baseada em Zhang *et al.* (1994) com algumas modificações conforme apresentado na Figura 8. Os autores avaliaram a ação antitumoral das frações (FI, FII, FIII-1 e FIII-2) contra o tumor ascítico Ehrlich (TAE). O tumor foi inoculado ( $5 \times 10^6$  cel.animal<sup>-1</sup>) em camundongos que foram tratados com as frações polissacarídicas durante 6 dias com dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e a avaliação foi realizada no dia seguinte. Os autores observaram que as frações FI e FII apresentaram maiores percentuais de inibição do desenvolvimento do tumor, 86 e 85%, respectivamente, enquanto a fração FIII-I inibiu o desenvolvimento tumoral em 54% e a FIII-II em 52%.





**Figura 8** - Extração fracionada de polissacarídeos de cogumelos.  
 Fonte: Dalonso *et al.* (2010).

Fração polissacarídica obtida de biomassa micelial de *P. eryngii* foi avaliada contra Sarcoma 180 por Jeong *et al.* (2010). A extração foi realizada em água quente sendo o sobrenadante tratado com 4 volumes de etanol para obtenção do precipitado polissacarídico. Camundongos machos BALB/c receberam  $6 \times 10^6$  células de Sarcoma 180 por via subcutânea e, 24 horas após iniciou-se o tratamento, por via intraperitoneal, com 10 a  $80 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de extrato de *P. eryngii*, durante 28 dias. A avaliação foi realizada 28 dias após o término do tratamento e a dose de  $40 \text{ mg/Kg}$  promoveu a maior inibição do desenvolvimento do tumor (53,1%), enquanto  $80 \text{ mg.Kg}^{-1}$  inibiu apenas 25,7%.

De Barba (2010) avaliou a atividade antitumoral de substâncias precipitadas com etanol (PE1) e com acetona (PE2), do caldo de cultivo de *Pleurotus djamor*, pelo método dose x resposta, nas doses de 3, 10, 30 e  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Os camundongos foram inoculados com solução de  $25 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ , tratados com as substâncias PE1 e PE2 durante 10 dias e a avaliação tumoral foi realizada no 21º dia após o início do tratamento.

A autora verificou que a dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> foi a que promoveu as menores massas tumorais, alcançando 94 e 93% de inibição do tumor, com as substâncias PE1 e PE2, respectivamente. No entanto, De Barba *et al.* (2011) ao realizarem o teste de sobrevivência nas doses de 30, 100 e 300 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 30 dias, concluíram que o aumento da dose da substância PE2 teve efeito nocivo sobre os animais saudáveis, sendo este efeito maior com o aumento da dosagem.

Assis (2011), utilizando um precipitado etanólico do caldo de cultivo de *P. sajor caju* nas doses de 10, 30 e 100 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, durante 10 dias, obteve 79, 86 e 86% de inibição do Sarcoma 180 na forma sólida, respectivamente. Os camundongos haviam sido inoculados com suspensão de 5x10<sup>6</sup> cel/animal, tratados com o precipitado durante 10 dias e a avaliação tumoral foi realizada no 21º dia, após o início do tratamento.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismo e manutenção

A espécie *Pleurotus ostreatus* foi obtida da “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, Alemanha, sob o código DSM 1833 e mantida em meio sólido TDA (Trigo Dextrose Agar), com a seguinte composição (FURLAN *et al.*, 1997): 20 g de glicose, 15 g de ágar e 1 L de extrato de trigo, com o pH entre 6,0 e 6,5.

Para obtenção do extrato de trigo, os grãos de trigo foram previamente lavados e imersos em água destilada na proporção 1:2 (m/v). Após 10 minutos de fervura, a mistura foi filtrada em papel filtro comum. O líquido resultante era o extrato de trigo.

A cultura foi mantida sob refrigeração (4°C) e os repiques feitos a cada três meses.

### 4.2 Meios e condições de cultivo

#### 4.2.1 Meios de cultivo

. Meio POL utilizado para o preparo do inóculo (CAVAZZONI e ADAMI, 1992): 5,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de peptona; pH 6,5 – 7,0), com concentração inicial de glicose igual a  $20 \text{ g L}^{-1}$ .

. Meio POL modificado utilizado para a produção de biomassa e caldo de cultivo (WISBECK, 2003): 5,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de peptona; 1,0 g de  $\text{CaCO}_3$ ; pH 6,5 – 7,0), com concentração inicial de glicose igual a  $40 \text{ g L}^{-1}$ .

#### **4.2.2 Preparo do inóculo**

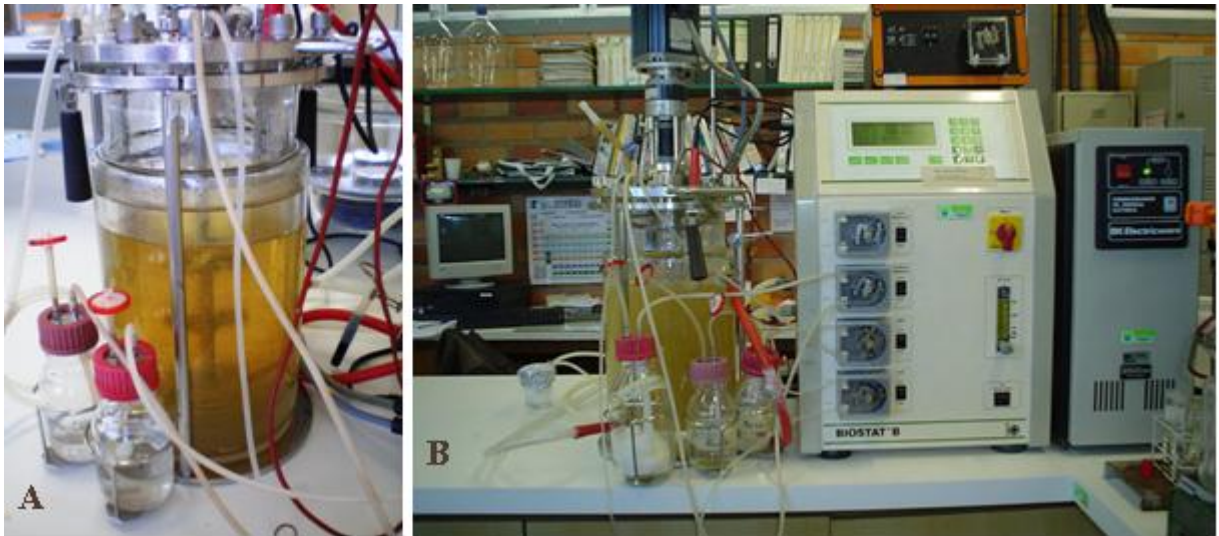
O inóculo foi preparado em frasco da marca Durán de 2 L contendo 400 mL de meio POL e esterilizado a 121°C por 20 min. O meio foi inoculado com todo o micélio contido em uma placa de Petri, após 7 dias de incubação. O micélio foi transferido da placa de Petri para o frasco com o auxílio de uma espátula, previamente esterilizada. Após a inoculação, realizada em condições assépticas, o frasco foi incubado a 30°C e mantido sob agitação recíproca de 120 min<sup>-1</sup>, por seis dias. A fração de inóculo utilizada para dar início ao cultivo em biorreator foi de 10%, ou seja, 400 mL para um volume final de 4 L (WISBECK, 2003).

#### **4.2.3 Condições de cultivo**

O biorreator de mistura completa modelo Biostat B da B. BRAUN, com volume útil de 5,0 L e volume de trabalho de 4,0 L, contendo 1,5 L de água destilada foi esterilizado em autoclave a gás a 121°C por 20 min. Neste processo, os sensores de temperatura, oxigênio e pH foram esterilizados juntamente com o biorreator. O meio de cultivo (POL modificado), concentrado em 1,5 L, a solução de glicose, concentrada em 0,4 L e a solução de CaCO<sub>3</sub>, concentrada em 0,2 L, foram esterilizados separadamente. O volume de inóculo foi de 0,4 L, completando o volume de trabalho de 4 L.

O valor do pH foi controlado em 4,0 pela da adição automática de NaOH 6 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 12 N e a temperatura foi mantida em 30 °C. A vazão de ar foi mantida em 0,25 L.min<sup>-1</sup> e a frequência de agitação em 300 min<sup>-1</sup>, proporcionando um valor de K<sub>L</sub>a de 15 h<sup>-1</sup> (WISBECK, 2003).

Os cultivos foram finalizados após 8 dias, pois, conforme Wisbeck (2003), neste tempo, para as condições descritas acima, maior concentração de polissacarídeos extracelulares é acumulada no meio de cultivo. Na Figura 9 pode-se observar o aparato experimental utilizado para o cultivo.

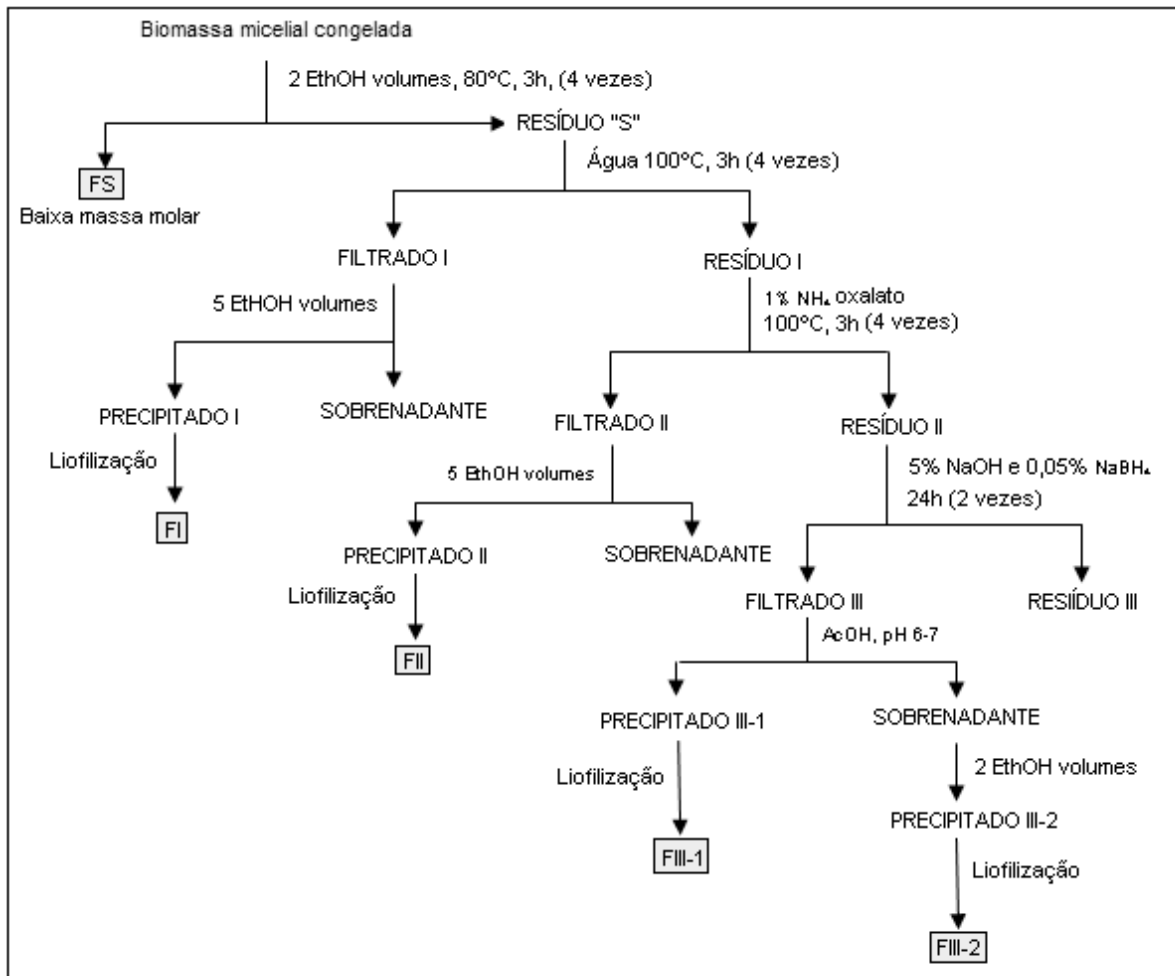


**Figura 9** – Cultivo de *Pleurotus ostreatus* em biorreator. (A) tempo inicial, (B) tempo final.

### 4.3 Separação dos polissacarídeos

A biomassa foi separada do caldo de cultivo por filtração a vácuo em papel Whatmann nº 1, lavada com água destilada e congelada. A biomassa micelial congelada foi fracionada conforme metodologia proposta por Zhang *et al.* (1994), modificada por Dalonso *et al.* (2010), totalizando cinco frações: FS (tratamento com etanol a 80°C por 3 h, 4 vezes), FI (extração aquosa a 100°C por 3 h, 4 vezes), FII (extração com NH<sub>4</sub>-oxalato a 100°C por 3 h, 4 vezes), FIII-1 (extração com NaOH e NaBH<sub>4</sub> a temperatura ambiente por 24 h, 2 vezes e precipitação com AcOH até pH 6) e FIII-2 (precipitação com etanol do sobrenadante de FIII-1), que estão em destaque na Figura 10. Os precipitados de cada fração foram liofilizados para posterior utilização.

O caldo de cultivo, após a separação da biomassa, foi adicionado de etanol na proporção etanol:caldo de cultivo de 4:1 (v/v). Após 24 horas sob refrigeração a 4°C, para precipitação dos polissacarídeos, a mistura foi centrifugada e lavada duas vezes com uma solução acetona:álcool:água destilada na proporção 3:1:1 (v/v/v) (CAVAZZONI e ADAMI, 1992). O precipitado obtido, chamado de FC (fração do caldo de cultivo) foi, também, liofilizado para posterior utilização.



**Figura 10** - Extração fracionada de polissacarídeos da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus*.  
 Fonte: Dalonso et al. (2010).

O rendimento de cada fração polissacarídica foi calculado de acordo com a Equação (1) partindo-se de uma massa conhecida de biomassa micelial.

$$R (\%) = \frac{MF}{MB} * 100 \quad (1)$$

Onde:

MF = massa seca da fração

MB = massa seca da biomassa micelial.

## **4.4 Avaliação da atividade antitumoral**

### **4.4.1 Tumores e manutenção**

Os tumores utilizados foram o tumor ascítico de Erlich (TAE) e o Sarcoma 180, ambos na forma sólida. As linhagens foram cedidas pelo Departamento de Farmacologia da UNIVALLI (Itajaí – SC) e mantidas, via intraperitoneal, em camundongos.

### **4.4.2 Substâncias e doses de tratamento**

As frações obtidas (FC, FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2) foram solubilizadas em solução tampão fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,0) e testadas na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> nos dois tumores (TAE e Sarcoma 180).

A fração que promoveu maior atividade antitumoral foi testada, também, nas doses de 10 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup> contra o tumor apresentou maior regressão.

As frações foram preparadas na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> para as doses de 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup> e de 1 g. L<sup>-1</sup> para a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>.

### **4.4.3 Animais e manutenção**

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, com peso de 30 ± 5 g, obtidos do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR. Os animais foram mantidos no laboratório de Tratamento Crônico da UNIVILLE, com água e ração *ad libitum*, controle de temperatura em 22° ± 1°C, umidade em 60 ± 5% e fotoperíodo de 12 horas. Este trabalho teve a aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade (Anexo).

#### **4.4.4 Delineamento experimental**

As frações polissacarídicas foram avaliadas pelo teste dose x resposta. O tratamento foi realizado por meio da administração diária de 10, 30 ou 50 mg.Kg<sup>-1</sup> da fração polissacarídica via intraperitoneal (i.p.) durante 10 dias (ZHANG *et al.*, 1994, HUANG *et al.*, 2007), iniciando-se 24 h após a indução tumoral. A indução tumoral foi realizada, via subcutânea, no dorso de cada camundongo dos grupos teste e controle positivo (NAKAMURA *et al.*, 2004), na concentração de 5 x 10<sup>6</sup> cel.animal<sup>-1</sup>, conforme Unursaikhan *et al.* (2006).

##### **a) Avaliação das frações**

Todas as frações polissacarídicas obtidas conforme descrito no item 4.3 (FC, FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2) foram testadas sobre cada tumor (TAE e S 180).

Para a avaliação das frações, 105 animais foram utilizados, sendo divididos em quatro grupos:

. **Grupo Teste (GT)** - Composto por 5 animais para cada tumor nos quais foi realizada a indução tumoral e a administração das frações polissacarídicas na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>.

. **Grupo Controle Substância (CS)** - Composto por 5 animais para cada fração polissacarídica nos quais foi realizada apenas a administração das frações na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, porém sem indução tumoral.

. **Grupo Controle Positivo (CP)** - Composto por 5 animais para cada tumor nos quais foi realizada a indução tumoral e a administração de PBS na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>.

. **Grupo Controle Negativo (CN)** - Composto por 5 animais nos quais foi realizada a administração de PBS na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, porém sem a indução tumoral.



## **b) Avaliação da dosagem**

A fração polissacarídica que apresentou melhor desempenho foi avaliada em diferentes doses sobre o tumor que apresentou maior regressão com base no descrito no item (a).

Para a avaliação das doses utilizou-se 80 animais divididos em quatro grupos:

. **Grupo Teste (GT)** - Composto por 10 animais nos quais foi realizada a indução do tumor selecionado e a administração da fração polissacarídica escolhida nas doses de 10, 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>.

. **Grupo Controle Substância (CS)** - Composto por 10 animais nos quais foi realizada apenas a administração da fração polissacarídica escolhida nas doses de 10, 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, porém sem indução tumoral.

. **Grupo Controle Positivo (CP)** - Composto por 10 animais nos quais foi realizada a indução do tumor selecionado e a administração de PBS na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>.

. **Grupo Controle Negativo (CN)** - Composto por 10 animais nos quais foi realizada a administração de PBS na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, porém sem a indução tumoral.

### **4.4.5 Avaliação do desenvolvimento tumoral**

A avaliação do desenvolvimento tumoral foi realizada 21 dias após a indução tumoral, ou seja, 10 dias após o início do tratamento (HARHAJI *et al.*, 2008). Foi feita através da determinação da massa (g) do tumor segundo Misaki *et al.* (1984), do volume tumoral (cm<sup>3</sup>) e do percentual de inibição (%), segundo Mizuno (1999).

Para a determinação da massa tumoral (g), após a retirada dos tumores com auxílio de bisturi, estes foram pesados utilizando-se uma balança de precisão.

Para a determinação do volume tumoral (cm<sup>3</sup>), utilizou-se um paquímetro, com o qual foram medidos o menor e o maior diâmetro do tumor. Estes dados foram utilizados para o cálculo do volume a partir da Equação 2:

$$V \text{ (cm}^3\text{)} = \frac{4}{3} \pi \frac{(a^2 * b)}{2} \quad (2)$$

Onde:

a = menor diâmetro do tumor (cm),

b = maior diâmetro do tumor (cm).

O percentual de inibição foi definido de acordo com a Equação 3:

$$I \text{ (%) } = \frac{C - T}{C} * 100 \quad (3)$$

Onde:

C = massa do tumor do grupo controle positivo (g),

T = massa do tumor do grupo teste (g).

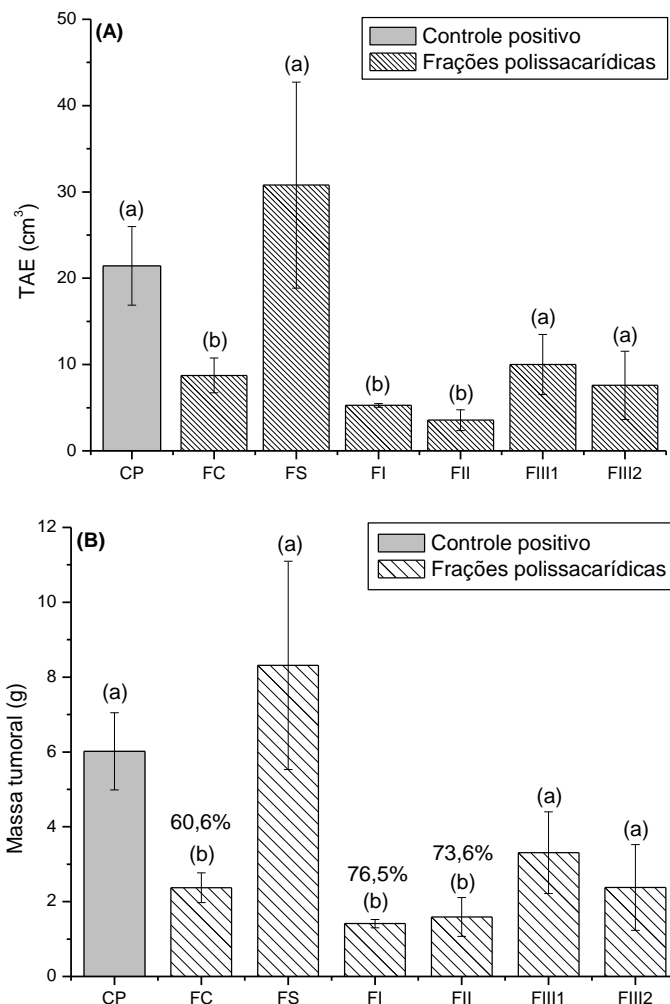
#### **4.5 Análise estatística**

Os dados obtidos foram avaliados pelo teste estatístico para rejeição de valores desviantes, denominado Teste 'Q' de Dixon, com nível de confiança de 95% (RORABACHER, 1991). Os resultados foram, ainda, submetidos à análise de variância (ANOVA) de valores médios, através do Teste de Tukey com nível de significância de 5% (p<0,05).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da atividade antitumoral das frações Polissacarídicas

Na Figura 11 estão apresentados os valores dos volumes ( $\text{cm}^3$ ), das massas (g) e dos percentuais de inibição (%) do TAE nos animais tratados com  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$  das frações polissacarídicas, FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2, por via intraperitoneal (i.p.).



**Figura 11** – (A) volumes ( $\text{cm}^3$ ), (B) massas (g) e percentuais de inibição (%) do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) após o tratamento dos animais com  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de FC (caldo de cultivo), FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 (biomassa micelial), obtidas de *Pleurotus ostreatus*. As barras indicam média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais indicam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Observa-se na Figura 11A que as frações FC, FI e FII foram as que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (CP). Estas frações proporcionaram os menores volumes tumorais 8,74, 5,26 e 3,56 (cm<sup>3</sup>), respectivamente. Da mesma forma, estas frações alcançaram as menores massas tumorais 2,37, 1,41, 1,59 g e conseqüentemente os maiores percentuais de inibição de 60,6, 76,5 e 73,6 %, respectivamente (Figura 11B).

Na Tabela 2 são apresentados resultados de diferentes autores com respeito à atividade antitumoral de substâncias obtidas de *Pleurotus ostreatus* e de *P. sajor caju* sobre TAE na forma ascítica. Os experimentos foram conduzidos da seguinte maneira: o tumor foi inoculado no peritônio de camundongos na concentração de 5x10<sup>6</sup> cel.animal<sup>-1</sup>, o tratamento foi realizado durante 6 dias e o animal sacrificado no dia seguinte.

**Tabela 2** – Atividade antitumoral de *Pleurotus ostreatus* e *P. sajor caju*.

Espécie	Fração polissacarídica	Dose (mg ou mL/kg)	Inibição tumoral (%)	Referência
<i>P. ostreatus</i>	Caldo de cultivo <i>in natura</i> (CBIN)	10 mL	70,0	Wolff <i>et al.</i> (2008)
<i>P. ostreatus</i>	Precipitado do caldo de cultivo (FC)	10 mg	76,0	Wolff <i>et al.</i> (2008)
<i>P. ostreatus</i>	Corpos frutíferos fresco (EFB)	10 mg	71,0	Wolff <i>et al.</i> (2008)
<i>P. sajor caju</i>	Caldo de cultivo <i>in natura</i> (CBIN)	10 mL	86,0	Furlan <i>et al.</i> (2009)
<i>P. sajor caju</i>	Precipitado do caldo de cultivo (FC)	10 mg	81,0	Furlan <i>et al.</i> (2009)
<i>P. sajor caju</i>	Corpos frutíferos secos (FI)	10 mg	86,0	Dalonso <i>et al.</i> (2010)
<i>P. sajor caju</i>	Corpos frutíferos secos (FII)	10 mg	85,0	Dalonso <i>et al.</i> (2010)
<i>P. sajor caju</i>	Corpos frutíferos secos (FIII-1)	10 mg	54,0	Dalonso <i>et al.</i> (2010)
<i>P. sajor caju</i>	Corpos frutíferos secos (FIII-2)	10 mg	52,0	Dalonso <i>et al.</i> (2010)

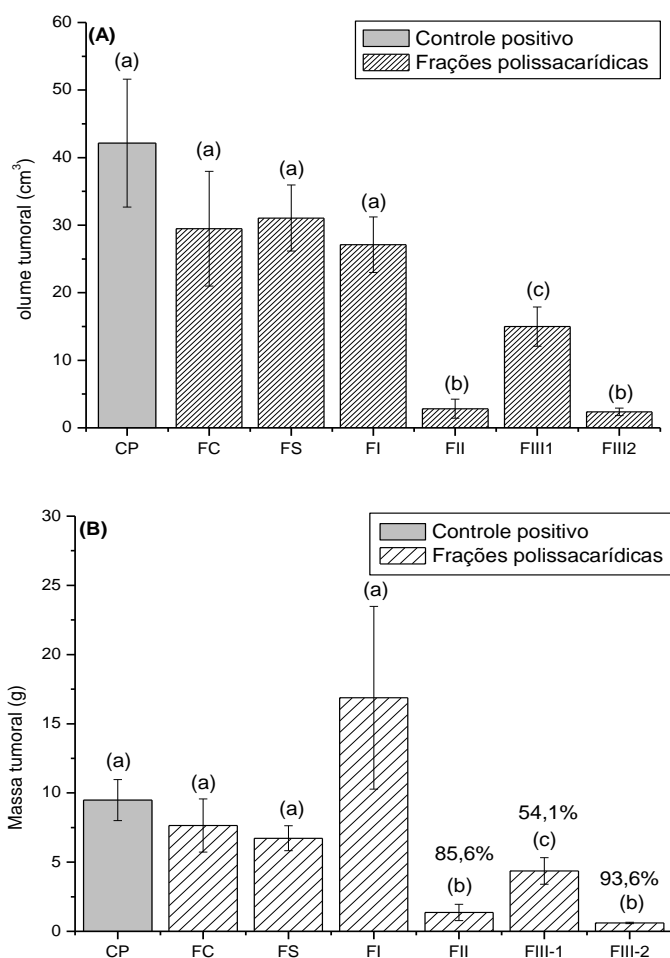
Apesar da diferença de ação das substâncias em tumores nas formas ascítica e sólida, os resultados da Tabela 2 foram comparados com os resultados deste trabalho, devido à dificuldade de encontrar, na literatura, resultados com o tumor TAE na forma sólida.

Wolff *et al.* (2008) e Furlan *et al.* (2009) obtiveram percentuais de inibição do tumor, na forma ascítica, de 76 e 81%, com as espécies *P. ostreatus* e *P. sajor caju*, respectivamente, quando os animais foram tratados com o precipitado do caldo de cultivo (FC). Neste trabalho (Figura 11B) verifica-se que o tumor ascítico de Erlich (TAE) foi inibido em 60,6%, quando tratado com FC, no entanto, com o tumor na forma sólida.

Observa-se na Tabela 2 que os maiores percentuais de inibição (86%) foram obtidos com a espécie *P. sajor caju*, tanto com caldo de cultivo *in natura* (CBIN), quanto com a fração FI obtida do fracionamento de corpos frutíferos secos. Na Figura 11B,

verifica-se que a fração FI, obtida da biomassa micelial, promoveu uma inibição de 76,5%, inferior a alcançada com a fração FI de corpos frutíferos de *P. sajor caju*, 86,0% (Dalonso *et al.*, 2010). Comparando-se, ainda, os resultados de Dalonso *et al.* (2010) com os apresentados na Figura 11B, verifica-se que a fração FII, obtida de corpos frutíferos de *P. sajor caju* alcançou um percentual de inibição de 85%, enquanto a mesma fração obtida da biomassa micelial de *P. ostreatus*, chegou a 73,6%.

Na Figura 12 estão apresentados os valores dos volumes ( $\text{cm}^3$ ), das massas (g) e dos percentuais de inibição (%) do Sarcoma 180 (S 180) nos animais tratados com as frações polissacarídicas, por via intraperitoneal (i.p.) na dose de  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ .



**Figura 12** – (A) volumes ( $\text{cm}^3$ ), (B) massas (g) e percentuais de inibição (%) do Sarcoma 180 (S 180) após o tratamento dos animais com  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de FC (caldo de cultivo), FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 (biomassa micelial), obtidas de *Pleurotus ostreatus*. As barras indicam média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais indicam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Observa-se que para Sarcoma 180 (Figura 12A) apenas as frações FII, FIII-1 e FIII-2 apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle positivo (CP), alcançando os menores volumes tumorais 2,83, 14,98 e 2,37 ( $\text{cm}^3$ ), respectivamente. Da

mesma forma, estas frações (FII, FIII-1 e FIII-2) proporcionaram as menores massas tumorais 1,37, 4,35 e 0,60 g e os maiores percentuais de inibição, 85,6, 54,1 e 93,6%, respectivamente. Verifica-se, ainda, que as frações FII e FIII-2 alcançaram os maiores percentuais de inibição, sem diferença significativa entre elas, em torno de 90%.

Na Tabela 3 são apresentados resultados de diferentes autores com respeito à massa de Sarcoma 180 após o tratamento de animais com substâncias obtidas de diferentes espécies de *Pleurotus*.

**Tabela 3** – Valores de massa do Sarcoma 180 após o tratamento de camundongos com substâncias extraídas de diferentes espécies de *Pleurotus*.

<b>Espécie</b>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>P. eryngii</i>
<b>Substância</b>	Lectina de corpos frutíferos	Lectina de corpos frutíferos	Extrato aquoso de biomassa micelial
<b>Tratamento (dias)</b>	20	20	28
<b>Inoculação (cel.animal<sup>-1</sup>)</b>	5 x 10 <sup>7</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	6 x 10 <sup>6</sup>
<b>Dose (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	1,5	5	20
<b>Avaliação (dias)</b>	21	21	29
<b>Massa tumor (g)</b>	0,067	0,46	3,17
<b>Referência</b>	Wang <i>et al.</i> (2000)	Li <i>et al.</i> (2008)	Jeong <i>et al.</i> (2010)

Wang *et al.* (2000), utilizando uma dose de lectina de *P. ostreatus* de apenas 1,5 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 20 dias, obtiveram uma massa de 0,067g do tumor. Nesse trabalho, os animais tratados com uma dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, durante 10 dias, com as frações FII e FIII-2 apresentaram um valor médio de massa tumoral de 0,98 g (Figura 12B). Este valor é superior ao encontrado por Li *et al.* (2008), utilizando uma dose diária de lectina de 5 mg.Kg<sup>-1</sup>.

Já, Jeong *et al.* (2010), ao utilizarem extrato aquoso de biomassa micelial de *P. eryngii*, correspondente à fração FI deste trabalho, obtiveram uma massa de tumor de 3,17 g ao tratarem os animais durante 28 dias com doses diárias de 20 mg.Kg<sup>-1</sup>. Neste trabalho a fração FI (Figura 12B) na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, durante 10 dias de tratamento, não apresentou inibição do tumor, por não ter diferença significativa com o controle positivo (CP), proporcionando uma massa de tumor cerca de 530% superior ao encontrado por Jeong *et al.* (2010). Sabe-se que a espécie e o tempo de tratamento podem influenciar na avaliação da atividade antitumoral.

Na Tabela 4 estão apresentados resultados da literatura com respeito ao percentual de inibição (%) do Sarcoma 180 por substâncias obtidas de diferentes espécies de *Pleurotus*.

**Tabela 4** – Percentuais de inibição de S 180 ( I %) por substâncias obtidas de diferentes espécies de *Pleurotus*.

Espécie	Fração polissacarídica	Inoculação do tumor (cel.animal <sup>-1</sup> ) (s ou i.p.)*	Tempo/tipo de administração (dias/i.p.* ou oral)	Dose (mg.kg <sup>-1</sup> )	Tempo de avaliação (dias)**	I (%)	Referência
<i>P. ostreatus</i>	Corpos frutíferos	- (s)	10/i.p.	200	35	75,3	Ikekawa <i>et al.</i> (1969).
<i>P. ostreatus</i>	Corpos frutíferos	5x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	0,2	35	95,0	Yoshioka <i>et al.</i> (1985).
<i>P. citrinupileatus</i>	Corpos frutíferos secos (FI)	2x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	10	21	23,0	Zhang <i>et al.</i> (1994).
<i>P. citrinupileatus</i>	Corpos frutíferos secos (FII)	2x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	10	21	24,1	Zhang <i>et al.</i> (1994).
<i>P. citrinupileatus</i>	Corpos frutíferos secos (FIII-1)	2x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	10	21	79,5	Zhang <i>et al.</i> (1994).
<i>P. citrinupileatus</i>	Corpos frutíferos secos (FIII-2)	2x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	10	21	93,5	Zhang <i>et al.</i> (1994).
<i>P. tuber-regium</i>	Corpos frutíferos secos	1x10 <sup>5</sup> (s)	10/i.p.	20	17	75,0	Zhang <i>et al.</i> (2004a).
<i>P. tuber-regium</i>	Biomassa micelial seca	1x10 <sup>5</sup> (s)	10/i.p.	20	17	65,4	Zhang <i>et al.</i> (2004b).
<i>P. citrinupileatus</i>	Precipitado do caldo de cultivo	3x10 <sup>6</sup> (i.p.)	20/oral	50	20	74,0	Wang <i>et al.</i> (2005).
<i>P. ostreatus</i>	Biomassa micelial fresca	2x10 <sup>6</sup> (i.p.)	6/i.p.	5	7	98,0	Sarangi <i>et al.</i> (2006).
<i>P. tuber-regium</i>	Corpos frutíferos secos	1x10 <sup>5</sup> (s)	8/i.p.	20	9	21,6	Tao <i>et al.</i> (2006).
<i>P. tuber-regium</i>	Corpos frutíferos secos	1x10 <sup>5</sup> (s)	8/i.p.	60	9	72,1	Tao <i>et al.</i> (2006).
<i>P. ostreatus</i>	Precipitado do caldo de cultivo	5x10 <sup>6</sup> (i.p.)	6/i.p.	10	7	72,0	Wolff (2007).
<i>P. djamor</i>	Precipitado do caldo de cultivo	- (s)	10/i.p.	10	21	83,0	De Barba (2010).
<i>P. djamor</i>	Precipitado do caldo de cultivo	- (s)	10/i.p.	30	21	94,0	De Barba (2010).
<i>P. djamor</i>	Precipitado do caldo de cultivo	- (s)	10/i.p.	100	21	64,0	De Barba (2010).
<i>P. eryngii</i>	Biomassa micelial	6x10 <sup>6</sup> (s)	28/i.p.	40	56	53,1	Jeong <i>et al.</i> (2010).
<i>P. eryngii</i>	Biomassa micelial	6x10 <sup>6</sup> (s)	28/i.p.	80	56	25,7	Jeong <i>et al.</i> (2010).
<i>P. sajor caju</i>	Precipitado do caldo de cultivo	5x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	10	21	79,0	Assis (2011).
<i>P. sajor caju</i>	Precipitado do caldo de cultivo	5x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	30	21	86,0	Assis (2011).
<i>P. sajor caju</i>	Precipitado do caldo de cultivo	5x10 <sup>6</sup> (s)	10/i.p.	100	21	86,0	Assis (2011).

\* s = subcutâneo, i.p. = intraperitoneal

\*\* contados a partir do início do tratamento.

Observa-se, na Tabela 4, que o maior percentual de inibição (98%) foi obtido quando extrato da biomassa micelial fresca de *P. ostreatus* foi utilizado na dose de 5 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, durante 6 dias de tratamento de animais inoculados com S 180, por Sarangi *et al.* (2006). Neste trabalho (Figura 12B) o extrato similar seria o FI, obtido de biomassa micelial congelada, porém, não apresentou inibição contra S 180.

Extrato de corpos frutíferos de *P. ostreatus* testado por Yoshioka *et al.* (1985), também proporcionou alto percentual de inibição (95%) com tratamento de 10 dias com 0,2 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (Tabela 4). Elevadas taxas (cerca de 90%) foram obtidas com os extratos FII e FIII-2 neste trabalho (Figura 12B).

No entanto, observando-se os resultados de Zhang *et al.* (1994), apresentado na Tabela 4, com respeito a extratos de corpos frutíferos secos de *P. citrinupileatus*, a fração FII apresentou percentual de inibição (24,1%), 3,5 vezes menor que a mesma fração obtida de biomassa micelial de *P. ostreatus* (85,6%) neste trabalho (Figura 12B). Já a fração FIII-2 apresentou o mesmo percentual de inibição (93,5%) independentemente da espécie e do estágio celular.

O precipitado do caldo de cultivo de *P. citrinupileatus*, testado por Wang *et al.* (2005), com administração oral na dose de 50 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> durante 20 dias (Tabela 4) promoveu 74% de inibição das células de Sarcoma 180. Wolff (2007) avaliou a ação antitumoral do precipitado do caldo de cultivo de *P. ostreatus* contra Sarcoma 180 inoculado no peritônio de camundongos Albinos Swiss fêmeas, na concentração de 5x10<sup>6</sup> cel/animal e dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, durante 6 dias e verificou uma inibição de 72% do desenvolvimento do tumor. De Barba (2010), utilizando um precipitado do caldo de cultivo de *P. djamor* nas doses de 10, 30 e 100 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, durante 10 dias, obteve 83, 94 e 64% de inibição do Sarcoma 180 na forma sólida, respectivamente. Também Assis (2011), ao utilizar precipitado do caldo de cultivo de *P. sajor caju*, nas mesmas doses durante 10 dias, verificou percentuais de inibição do Sarcoma 180 na forma sólida de 79, 86 e 86%, respectivamente. A fração similar (FC), testada neste trabalho, não apresentou inibição do desenvolvimento de Sarcoma 180 (Figura 12B), provavelmente devido à diferença de espécies de *Pleurotus* ou à forma do tumor (sólido ou ascítico).

O mesmo comportamento, ou seja, nenhuma inibição, foi verificada com a fração FI de biomassa micelial congelada (Figura 12B), que é similar à fração obtida da biomassa micelial seca de *P. tuber-regium* por Zhang *et al.* (2004b), a qual apresentou uma inibição 65,4% em 10 dias de tratamento com 20 mg Kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>.



Nakamura *et al.* (2004) testaram algumas frações de micélio de *Phellinus linteus* contra Sarcoma 180, obtendo taxas de inibição que variaram entre 40 e 81%, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho com as frações FII, FIII-1 e FIII-2.

De uma maneira geral, as frações que apresentaram inibição (FII, FIII-1 e FIII-2) neste trabalho (Figura 12B), dadas as diferenças de espécie fúngica, doses e tempo de tratamento, estão de acordo com os resultados da literatura.

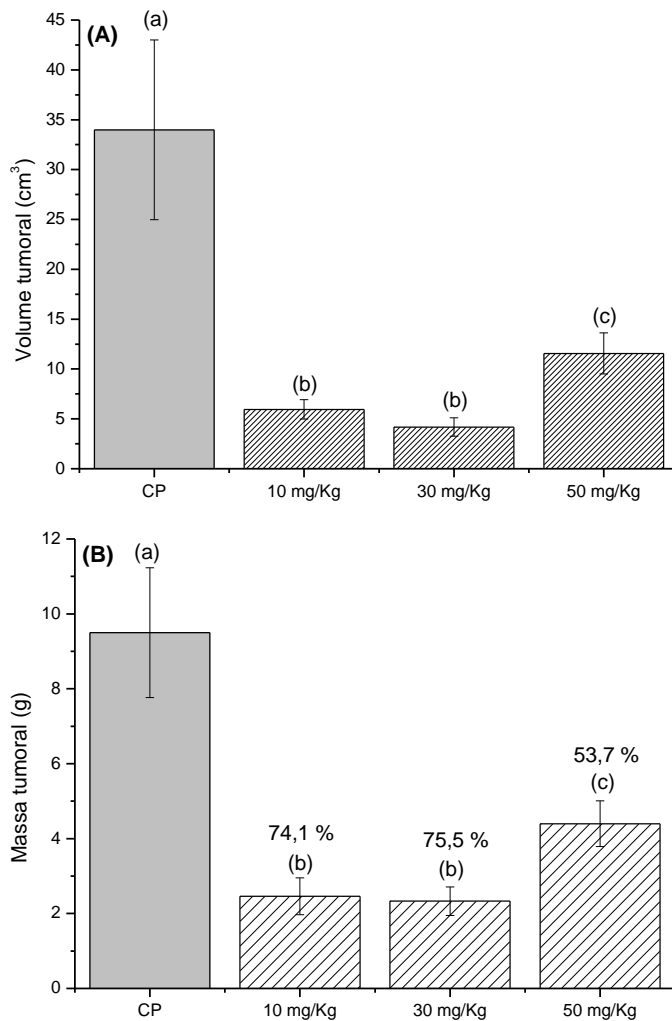
Como mencionado anteriormente, dentre as 6 frações testadas contra o TAE (Figura 11B), as frações FC, FI e FII apresentaram percentuais de inibição, sem diferença significativa entre si, resultando no valor médio de 70%. Contra o Sarcoma 180 (Figura 12B), as frações FII e FIII-2 promoveram os maiores percentuais de inibição, 85,6 e 93,6%, respectivamente, sem diferença significativa entre si, resultando no valor médio de 90%, superior à inibição obtida para o TAE.

Assim, o Sarcoma 180, por proporcionar uma resposta às frações mais efetiva que o TAE, bem como a fração FII, por ser mais facilmente obtida que a fração FIII-2, foram selecionados para dar continuidade aos trabalhos, investigando-se a eficácia da dosagem administrada aos animais.

## **5.2 Avaliação da atividade antitumoral da fração FII em diferentes doses**

A avaliação da atividade antitumoral da fração FII foi realizada através de ensaios dose x resposta nas doses de 10, 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup> e os resultados de volume (cm<sup>3</sup>) e massa tumoral (g) estão apresentados na Figura 13. Na mesma figura são indicados os percentuais de inibição (%) do desenvolvimento tumoral.

Observando-se os dados da Figura 13A verifica-se que todas as doses apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (CP). As doses de 10 e 30 mg.Kg<sup>-1</sup> promoveram a maior taxa de inibição, cerca de 75%, sem diferença significativa entre si e a maior dose, 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, promoveu uma menor taxa de inibição (53,7%) (Figura 13B).



**Figura 13** – (A) volumes (cm<sup>3</sup>), (B) massas (g) e percentuais de inibição (%) do Sarcoma 180 (S 180) após o tratamento dos animais com 10, 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup> da fração FII, obtida da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus*. As barras indicam média ± erro padrão. Letras iguais indicam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Tao *et al.* (2006) avaliaram a ação antitumoral de diversas frações polissacarídicas de corpos frutíferos de *Pleurotus tuber-regium* contra Sarcoma 180 inoculado em camundongos. Os animais foram tratados com doses diárias de 20 e 60 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 8 dias e a avaliação ocorreu no dia seguinte ao término do tratamento. A fração que promoveu a maior inibição (72,1%) foi a F2 na dose de 60 mg.Kg<sup>-1</sup>. Esta mesma fração, na dose de 20 mg.Kg<sup>-1</sup>, levou a apenas 21,6% de inibição do desenvolvimento tumoral (Tabela 4). Este comportamento foi verificado para maioria das frações testadas. O comportamento observado pelos autores é o

oposto ao verificado na Figura 13A, onde observa-se que o aumento da dose de 30 para 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, promoveu diminuição do percentual de inibição. Porém, os resultados deste trabalho com as doses de 10 e 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, são superiores aos encontrados por Tao *et al.* (2006) utilizando dose mais elevada (60 mg.Kg<sup>-1</sup>).

Uma fração polissacarídica obtida de biomassa micelial de *P. eryngii* foi avaliada contra Sarcoma 180 por Jeong *et al.* (2010). A extração foi realizada em água quente sendo o sobrenadante tratado com 4 volumes de etanol para obtenção do precipitado polissacarídico. Os animais foram tratados com 10 a 80 mg.Kg<sup>-1</sup> de extrato micelial durante 28 dias. A dose de 40 mg.Kg<sup>-1</sup> promoveu a maior inibição do desenvolvimento do tumor (53,1%), enquanto 80 mg.Kg<sup>-1</sup> inibiu apenas 25,7% (Tabela 4). Neste trabalho, a dose de 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, da fração FII, promoveu inibição de 53,7%, similar à dose de 40 mg.Kg<sup>-1</sup> do trabalho de Jeong *et al.* (2010), no entanto, doses menores (10 e 30 mg.Kg<sup>-1</sup>), utilizadas neste trabalho, favoreceram a inibição do tumor, chegando a 75,5% (Figura 13B). Cabe lembrar que a fração FII foi obtida após extração com 1% de NH<sub>4</sub>-oxalato a 100°C por 3 h, repetidas 4 vezes, e precipitação com 5 volumes de etanol. O precipitado obtido por Jeong *et al.* (2010) além de ser proveniente de outra espécie fúngica, foi obtido após extração aquosa à quente, similar a fração FI deste trabalho, que não apresentou atividade contra Sarcoma 180 (Figura 12B).

De Barba (2010) ao avaliar a atividade antitumoral do precipitado etanólico do caldo de cultivo de *Pleurotus djamor*, contra Sarcoma 180 nas doses de 10, 30 e 100 mg.Kg<sup>-1</sup> (Tabela 4), em camundongos, também observou que a dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> foi a que promoveu maior inibição do desenvolvimento tumoral (94%). No entanto, verificou uma redução de 30% na taxa de inibição, quando a dose aumentou de 30 para 100 mg.Kg<sup>-1</sup>. Este mesmo comportamento foi observado neste trabalho quando a dose aumentou de 30 para 50 mg.Kg<sup>-1</sup> e houve uma redução de cerca de 22% na taxa de inibição tumoral (Figura 13B).

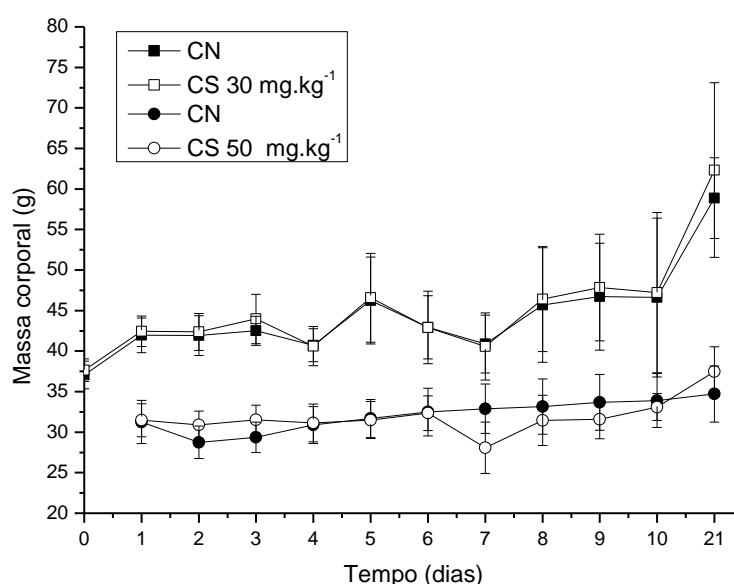
Já, Assis (2011), não verificou diferenças significativas entre os percentuais de inibição do Sarcoma 180 após o tratamento de camundongos com precipitado etanólico do caldo de cultivo de *P. sajor caju* nas doses de 10, 30 e 100 mg.Kg<sup>-1</sup>, chegando a 79, 86 e 86%, respectivamente (Tabela 4).

Wolff (2007) avaliou a ação antitumoral do precipitado polissacarídico do caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* contra Sarcoma 180. O tumor foi inoculado no peritônio de camundongos Albinos Swiss fêmeas na concentração de 5x10<sup>6</sup> cel/animal e o tratamento na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> foi realizado durante 6 dias e

o animal sacrificado no dia seguinte. A autora observou inibição de 72% do desenvolvimento do tumor.

Os resultados apresentados na literatura, utilizando precipitados etanólicos de extratos de espécies de *Pleurotus*, são similares ao obtido com a fração FII na dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> deste trabalho, 85,6% (Figura 12B) e 75,5% (Figura 13B). Percebe-se, no entanto, que o percentual de inibição caiu de 85,6% para 75,5%, entre um experimento e outro. De acordo com a metodologia descrita no item 4.4.4, o experimento que avaliou a atividade das frações polissacarídicas e resultou, para a fração FII, 85,6% de inibição, foi realizado com 5 animais. Já, o experimento que avaliou a atividade antitumoral da fração FII em diferentes doses e resultou em 75,5% de inibição para a dose de 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, utilizou 10 animais. Porém, estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Pode-se observar na Figura 14 a evolução da massa corporal dos animais dos grupos controle negativo (CN) e controle substância (CS), durante o tratamento com a fração FII a 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>. Verifica-se que a fração FII, aparentemente, não apresentou efeito tóxico sobre os animais saudáveis, uma vez que, não há diferença significativa entre as massas corporais dos animais dos grupos CN e CS. Para a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> este experimento não se fez necessário, já que para doses maiores o efeito tóxico não foi verificado.



**Figura 14** – Evolução da massa corporal (g) dos animais dos grupos controle negativo (CN) e controle substância (CS) em função do tempo de tratamento (dias) utilizando 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup> da fração FII. As barras indicam o desvio padrão da média.

Alguns trabalhos, avaliando a atividade antitumoral, foram realizados com substâncias bioativas provenientes de outras espécies fúngicas.

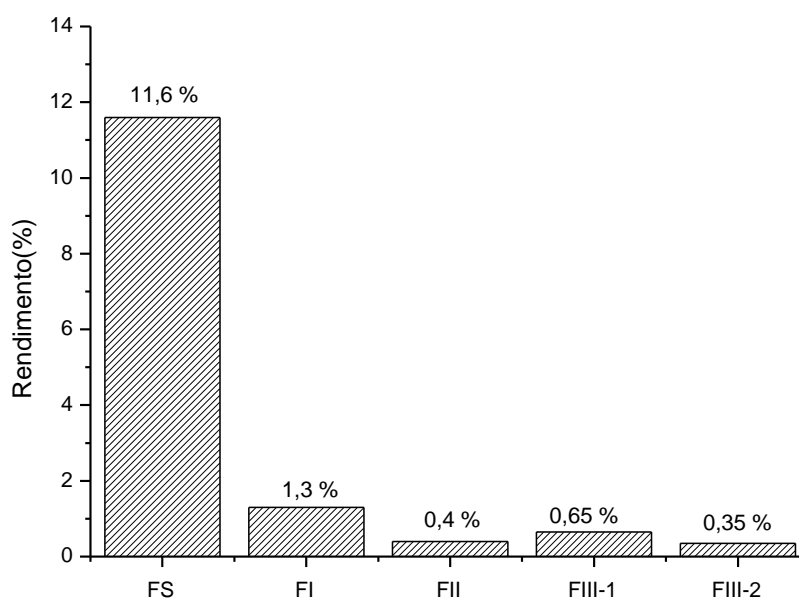
Fan *et al.* (2007) obtiveram redução de 72,2% do crescimento de Sarcoma 180 quando realizaram o tratamento com extratos do caldo de cultivo de *Agaricus brasiliensis*. Gonzaga *et al.* (2009) avaliaram as propriedades antineoplásicas de um polissacarídeo, ( $\alpha$ -(1→4)-glucan- $\beta$ -(1→6)-glucan-protein), obtido de *Agaricus blazei*, em camundongos inoculados com Sarcoma 180 e obtiveram inibição de 42,1 e 47,2% para as doses de 25 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Ainda, Niu *et al.* (2009) testaram uma substância polissacarídica, do mesmo fungo, nas doses de 50, 100 e 200 mg.Kg<sup>-1</sup> que promoveram 9,5, 23 e 32% de inibição tumoral, respectivamente. Todos estes resultados foram consideravelmente inferiores aos obtidos neste trabalho, com as doses de 10, 30 e 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, da fração FII de *P. ostreatus*.

Ao comparar os resultados da literatura, referentes à inibição de Sarcoma 180 promovida por extratos ou precipitados fúngicos, com os resultados deste trabalho, verifica-se que a fração FII, obtida da biomassa micelial congelada de *P. ostreatus*, tem potencial antitumoral, principalmente nas doses de 10 e 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, sugerindo-se o uso de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, o que representa a necessidade de uma menor massa para a realização do tratamento.

### **5.3 Avaliação do rendimento das frações polissacarídicas**

Na Figura 15 pode-se observar os rendimentos das frações FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 (%) obtidas da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus*.

Observa-se, na Figura 15, que a fração FS apresentou o maior rendimento e, segundo Zhang *et al.* (1994) é composta por substâncias de baixa massa molar. Porém, apesar do elevado rendimento desta fração, ela não apresentou atividade contra TAE (Figura 11), nem contra Sarcoma 180 (Figura 12).



**Figura 15** – Rendimentos (%) das frações FS, FI, FII, FIII-1 e FIII-2 obtidas da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus*.

Zhang *et al.* (1994) não apresentaram resultados de rendimento das frações e sim valores das massas obtidas. No entanto comparando os resultados de Zhang *et al.* (1994) com os apresentados na Figura 15, observou-se que a fração FIII-1, de seus experimentos, foi maior que FII e que FIII-2 deste trabalho e, também que FIII-2 apresentou a mesma massa que FII, assim como o observado na Figura 15. Cabe lembrar que o fracionamento realizado por Zhang *et al.* (1994) foi de corpos frutíferos secos de *Pleurotus citrinopileatus* e não de biomassa micelial congelada de *P. ostreatus*, como neste trabalho.

Dalonso *et al.* (2010) ao fracionarem corpos frutíferos congelados de *P. sajor caju* alcançaram cerca de 0,5% de FI, 0,44% de FII, 0,38% de FIII-1 e 0,48% de FIII-2, valores próximos aos obtidos neste trabalho partindo-se de biomassa micelial congelada de *P. ostreatus*.

De acordo com Wasser (2002) a atividade dos polissacarídeos pode estar relacionada a diversos fatores como a solubilidade em água, o tamanho das moléculas, a proporção de ligações e também à forma destas moléculas, tornando difícil uma correlação entre a estrutura e a atividade antitumoral de polissacarídeos complexos.

No trabalho de Zhang *et al.* (1994) foi realizada a caracterização das frações em termos de composição monossacarídica. A fração II, obtida de corpos frutíferos secos de *P. citrinopileatus*, equivalente à fração FII deste trabalho, obtida de biomassa congelada de *P. ostreatus*, apresentou 83,5% de monossacarídeos sendo glicose, fucose, manose e galactose. Ainda, esta fração apresentou 16,5% de proteínas. De acordo com Zhang *et al.* (2007), em algumas espécies de cogumelos, os polissacarídeos são ligados a proteínas ou peptídeos, o que proporciona elevado potencial antitumoral. Os autores sugerem ainda que os polissacarídeos que contêm glicose e manose podem ter maior ação antitumoral, como um receptor de polissacarídeos encontrado em macrófagos humanos, o que demonstrou uma alta especificidade para estes monossacarídeos. Características estruturais, tais como ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) na cadeia principal do polissacarídeo e ramificações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), têm sido apontados como fatores importantes na ação antitumoral.

Dalonso *et al.* (2010) também caracterizaram as frações FI e FII, pois foram as que apresentaram maior inibição do TAE. A fração FII, obtida de corpos frutíferos congelados de *P. sajor caju*, similar à fração FII deste trabalho, obtida de biomassa micelial congelada de *P. ostreatus*, apresentou 71,4% de glicose, 15,5% de galactose, 9,5% de manose e 4,2% de proteínas. Verificou-se, ainda, um sinal anomérico, mais intenso, na região da configuração  $\beta$  do espectro. Os autores sugeriram que, devido à complexidade dos espectros e à composição monossacarídica ser de glicose, galactose e manose, a fração FII fosse uma mistura de polissacarídeos, incluindo a possibilidade de ser um heteropolímero.

Mizuno e Zhuang (1995) verificaram, ao avaliar a atividade antitumoral de extratos de corpos frutíferos de *P. sajor caju*, que estes, tinham em sua composição, polissacarídeos associados a proteínas. Sarangi *et al.* (2006) demonstraram a presença de proteoglicanas nas frações dos extratos etanólicos da biomassa de *P. ostreatus*. Refaie *et al.* (2009) caracterizaram o precipitado etanólico do caldo de cultivo de *P. ostreatus* e constataram que o precipitado era composto por 93% de carboidratos (galactose, glucose, manose, xilose e arabinose) e 2,5% de proteínas. Wisbeck (2003) caracterizou, em termos de monossacarídeos, o precipitado do caldo de cultivo de *P. ostreatus*, obtido por adição de acetona e verificou que continha 49% de manose, 35% de glicose, 12% de galactose, 2% de xilose, 1,5% de fucose e 0,5% de arabinose.

Apesar da caracterização química das frações não ser objeto de estudo deste trabalho, com base no exposto, sugere-se que a fração FII é composta por polissacarídeo contendo glicose, manose, galactose e proteínas. Principalmente, visto a similaridade, em termos de condições de extração da fração FII deste trabalho, com as condições de extração da fração FII dos trabalhos de Zhang *et al.* (1994) e de Dalonso *et al.* (2010), e ainda, em termos de espécie fúngica (*P. ostreatus*) utilizada nos trabalhos de Wisbeck (2003) e Refaie *et al.* (2009). Pode-se dizer ainda que, o resultado de cerca de 75% de inibição do tumor Sarcoma 180, após tratamento por 10 dias com doses de 10 ou 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, é promissor e mostra o potencial antineoplásico de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As frações FC, FI e FII, na dose de  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , comparativamente às demais frações, proporcionaram os menores volumes tumorais 8,74, 5,26 e 3,56 ( $\text{cm}^3$ ), as menores massas tumorais 2,37, 1,41, 1,59 g e, conseqüentemente, os maiores percentuais de inibição do desenvolvimento do TAE, 60,6, 76,5 e 73,6%, respectivamente, sem diferença significativa entre si, resultando no valor médio de 70%.

As frações FII e FIII-2, na dose de  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , comparativamente às demais frações, promoveram os menores volumes tumorais 2,83 e 2,37 ( $\text{cm}^3$ ), as menores massas tumorais 1,37 e 0,60 g e, conseqüentemente, os maiores percentuais de inibição do Sarcoma 180, 85,6 e 93,6%, sem diferença significativa entre si, resultando no valor médio de 90%.

Os testes conduzidos com a fração FII nas doses de 10, 30 e  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  sobre Sarcoma 180, revelaram que as doses de 10 e  $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$  promoveram maior inibição do desenvolvimento tumoral, cerca de 75%, sem diferença significativa entre si, sendo a dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , a que representa a necessidade de uma menor massa para a realização do tratamento.

A fração FII, nas concentrações de 30 e  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , não apresentou efeito tóxico sobre os animais saudáveis.

A fração FII apresentou 0,4% de rendimento de extração, podendo, segundo a literatura, ser composta por glicose, manose, galactose e proteínas, o que pode estar relacionado ao seu potencial antitumoral.

Como perspectivas de continuidade deste trabalho propõe-se:

A fim de confirmar a estrutura polissacarídica da fração FII, realizar análises da composição monossacarídica, de proteínas, de NMR (Ressonância Magnética Nuclear) e FTIR (Infravermelho por Transformada de Fourier) para identificar a estrutura molecular.

Com o intuito de avaliar a eficácia do tratamento e verificar se as células normais foram preservadas, após alcançar a redução total do tumor, observar, durante vários meses, o desenvolvimento dos animais.

## 7 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology Reading*, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

AJITH, T.A., JANARDHANAN, K.K. Indian Medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 40, p. 157-162, 2007.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 963-1006. 1997.

ALEXANDRINO, A.M., FARIA, H.G., SOUZA, C.G.M., PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

ANDRADE, R., ROMERO, T.R.L. Físicos da alegria: Projeto de ensino sobre radiologia para crianças do Hospital do Câncer. XVIII Simpósio Nacional de Ensino de Física. Vitória ES. SNEF, 2009.

ASSIS, I.S. Síntese e avaliação in vivo de substâncias bioativas de *Pleurotus sajor caju*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 78p., 2011.

ATTIWILL, P.M., ADAMS, M.A. Nutrient cycling in forests: Transley Review. *New Phytologist*, v.124, n.50, p.561-582, 1993.

AZEVEDO, R.S., ÁVILA, C.L.S., DIAS, E.S., BERTECHINI, G., SCHWAN, R.F. Utilização do composto exaurido de *Pleurotus sajor-caju* em rações de frangos de corte e seus efeitos no desempenho dessas aves. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 31, n. 2, p. 139-144, 2009.

BAO, S., OUYANG, G., BAI, X., HUANG, Z., MA, C., LIU, M., SHAO, R., ANDERSON, R., RICH, J., WANG, X. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, v. 5, n. 4, p. 329-339, 2004.

BARROS, A.C.S.D., BARBOSA, E.M., GEBRIM, L.H. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Disponível em: <[http:// w.w.w. projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/024.pdf](http://w.w.w.projetoDiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/024.pdf)> Acesso em 06 set., 2009.

BELTRÃO-BRAGA, P.C.B., TEIXEIRA, V.R., CHAMMAS, R. Aspectos Moleculares da Transformação Celular: Conceitos e Implicações. In: WEITZBERG, D.L. Dieta, Nutrição e Câncer. São Paulo: Editora Atheneu, p. 79-87, 2004.

BERGAMI-SANTOS, P.C., MARIANO, M., BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sciences*, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.

BERTINO, J.R., HAIT, W. Oncologia: Princípios do Tratamento do Câncer. ... GOLDMAN, L., AUSIELLO, D. CECIL tratado de medicina interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

BISARIA, R., MADAN, M. Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. *Enzyme Microbiology Technology*, v.5, p.251-259, 1983.

BONASSA, E.M.A. Enfermagem em quimioterapia. São Paulo: Atheneu, 1998.

BONASSA, E.M.A. Enfermagem em terapêutica oncológica. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

BONATTI, M. Estudo do potencial nutricional de cogumelos do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos agro-industriais. 147p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BONATTI, M., KARNOPP, P., SOARES, H.M., FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, v. 88, p. 425-428, 2004.

BONONI, V.L.R., GRANDI, R.A.P. (coords.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, São Paulo, 1998.

BORGES, G.M. Produção de polissacarídeos extracelulares por *pleurotus djamor* univille 001 em processo descontínuo. Dissertação (mestrado em Saúde e Meio Ambiente) UNIVILLE – Universidade da Região de Joinville. 78 p. Joinville, 2009.

BRENTANI, M.M., COELHO, F.R.G., KOWALSKI, L.P. Bases de oncologia. 2 ed. Tecmedd Editora, 452 p. São Paulo, 2006.

BUCCHI, D.F. Efeitos do medicamento homeopático. Método Canova em camundongos normais e portadores do tumor Sarcoma 180. Dissertação (mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal do Paraná. 132 p. Curitiba, 2002.

BURNS, P.J., YEO, P., KESHAVARZ, T., ROLLER, S., EVANS, C.S. Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus* sp. *Florida*; effect of C and N source on polysaccharide production for potential as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 34, p. 566-572, 1994.

- BUSWELL, J.A., CHANG, S.T. Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, n. 12, p. 473-476, 1996.
- CARR, J.M., GLATTER, S., JERACI, J.L., LEWIS, B.A. Enzymatic determination of  $\beta$ -glucan in cereal-based food-products. *Cereal Chemistry*, v. 67, n. 3, p. 226-229, 1990.
- CARVALHO, F.H., RECCO-PIMENTEL, M.S. A célula. p. 27. São Paulo: Manole, 2001.
- CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. *Italian Journal of Food Science*, v. 1, p. 9-15, 1992.
- CECHINEL, V.F. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.
- CHAKRABORTY, I., MONDAL, S., PRAMANIK, M., ROUT, D., ISLAM, S.S. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom: *Astraeus hygrometricus*. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 13, p. 2249-2254, 2004.
- CHANG, S.T., MILES, P.G. Mushrooms: Trends in production and technological development. *Genetic Engineering and Biotechnology Monitor*, v. 41/42, p. 73-81, 1993.
- COHEN, R., PERSKY, L., HADAR, Y. Biotechnological applications and potencial of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.5 8, n. 5, p. 582-594, 2002.
- CONFORTIN, F.G., MARCHETTO, R., BETTIN, F., CAMASSOLA, M., SALVADOR, M., DILLON, A.J.P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1149–1155, 2008.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 233-293, 2000.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Neoplasia. In Robbins pathologic basis of disease. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 239-305, 1989.
- CROAN, S.C. Conversion of woods waste into value-added products by edible and medicinal *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. Species (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 2, p. 73-80, 2000.
- DAGLI, M.I.Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental, 1989. 148 f. Tese (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- DALONSO, N., SOUZA, R., SILVEIRA, M.L.L., RUZZA, A.A., WAGNER, T.M., WISBECK, E., FURLAN, S.A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 8, p. 2265–2274, 2010.

DE BARBA, F.F.M. Estudo da atividade antitumoral de substâncias bioativas de *Pleurotus djamor* sobre sarcoma 180 *in vivo*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) UNIVILLE – Universidade da Região de Joinville. 60 p. Joinville. 2010.

DE BARBA, F.F.M., SILVEIRA, M.L.L., PILONI, B.U., FURLAN, S.A., PINHO, M.S.L. Influence os *Pleurotus djamor* bioactive substances on the survival time of mice inoculated with Sarcoma 180. *International Journal of Pharmacology*, v. 7, n. 4, p.478-484, 2011.

DELGADO, G.L. Síndrome de toxicidade precoce induzida por quimioterapia antineoplásica. *Revista de Actualidades em Cancerologia*, n. 10, p. 14-16, 1988.

DOMENECH, J., PRIETO, A., GÓMEZ-MIRANDA, B., LEAL, J.A., AHRAZEM, O., JIMÉNEZ-BARBERO, J., BERNABÉ, M. Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of three strains of *Verticillium fungicola*. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, n. 2, p. 209-212, 2002.

DONG, Q., YAO, J., YANG, X.T., FANG, J.N. Structural characterization of a water soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research*, v. 337, n. 15, p. 1417-1421, 2002.

DURAN, A., NOBLEGA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology*, v. 150, n. 10, p. 3099-3103, 2004.

EIRA, A. F. *Cultivo do "cogumelo-do-sol" Agaricus blazei (Murrill) ss. Heinemann*. Viçosa: Aprenda Fácil, 203 p., 2003.

EVANS, H.J. Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Franck Rose Lecture. *British Journal of Cancer*, v. 68, p.1051-1060, 1993.

FAN, L., SOCCOL, A.T., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Effect os nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT*, v. 40, p. 30-35, 2007.

FARBER, E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Research*, v. 44, p. 4217-4223, 1984.

FAUCI, A., BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K., WILSON, J., KASPER, D., HAUSER, S., LONGO, D.H. *Medicina Interna*. 14, Ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 3066 p.,1998.

FELIPPE, J.J. *Agaricus* – Cogumelo brasileiro com alguns efeitos anti-câncer. *Journal of Biomolecular Medicine Free radicals*, v. 5, n. 2, p. 36-37, 1999.

FIDLER, I.J. Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, v. 12, p. 89-96, 2002.

FUKUDA, E.K., VASCONCELOS, A.F.D., MATIAS, A.C., BARBOSA, A.M., DEKKER, R.F.H., SILVA, M.L.C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

FURLAN, S.A., SILVEIRA, M.L.L., WISBECK, E., WOLFF, E.R.S., DALONSO, N., RUZZA, A.A., PINHO, M.S.L. Antitumor activity of *Pleurotus spp.* In: PANDEY, A., LARROCHE, C. SOCCOL, C.R., DUSSAP, C-G. (Org.). *New Horizons in Biotechnology*. 1a ed. New Delhi: *Asiatech Publishers Inc*, p. 429-439, 2009.

FURLAN, S.A., VIRMOND, L.J., MIERS, D.A., BONATTI, M., GERN, R.M.M., JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p. 689-692, 1997.

GARCIA, I., CISNEROS, F., SEDRÉS, J.M. Estudio de la actividad antimicrobiana en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* HB 184. *Alimentaria*, p.63-65, 1998.

GATES, R.A., FINK, R.M. Segredos em Enfermagem Oncológica. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 652 p., 2009.

GENTILE, L.F. Modulação por PGEz no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Botucatu, UNESP, 2001, 101 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) Universidade Estadual Paulista, 2001.

GERN, R.M. Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. 156 p. Tese (doutorado em engenharia química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GERN, R.M., WISBECK, E., RAMPINELLI, J., NINOW, J.L., FURLAN, S.A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 76-82, 2008.

GHOSH, M., MUKHERJEE, R., NANDI, B. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnologica*, v. 18, n.3, p. 243-254, 1998.

GIBBS, W.W. Desvendando as raízes do câncer. *Scientific American*, v. 2, n. 15, p. 39-47, 2003.

GONZAGA, M.L., BEZERRA, D.P., ALVES, A.P., DE ALENCAR, N.M., MESQUITA, R.D.E.O., LIMA, M.W., SOARES, S.D.E.A., PESSOA, C., DE MORAES, M.O., COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *Journal of Natural Medicines*, v.63, n. 1, p. 32-40, 2009.

GOUGH, M.J., MELCHER, A.A., AHMED, A., CRITTENDEN, M.R., RIDDLE, D.S., LINARDAKIS, E., RUCHATZ, A.N., EMILIUSEN, L.M., VILE, R.J. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Research*, v. 61, p. 7240-7247, 2001.

GOW. N.A.K., GADD, G.M. The growing fungus. London: Chapman & Hall, 1995.

GUERRERO, R.T., HOMRICH, M.H. *Fungos Macroscópicos no Rio Grande do Sul*. 2.ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS, 126 p., 1983.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales S.I., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 1 p. 69-80, 1999.

GUTIÉRREZ, A. *Exopolisacaridos y metabolitos aromáticos de Pleurotus: naturaleza e función en la degradación de la lignina*. 1995. 121f. Tese de Doutorado – Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, 1995.

GUTIÉRREZ, A., PRIETO, A., MARTINEZ, A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, v. 281, n. 1, p. 143-154, 1996.

GUZMAN, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 2, n. 2, p.95-123, 2000.

HAHN, W., WEINBERG, R.A. Modeling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 331-341, 2002.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARA, M., YOSHIDA, M., MORIMOTO, M., NAKANO, H. 6-deoxylludin M, a new antitumor antibiotic: fermentation, isolation and structural identification. (Communications to the Editor) *The Journal antibiotics*, v. XL, n. 11, p.1643-1646, 1987.

HARHAJI, L.J., MIJATOVIC, S., MAKSIMOVIC-IVANIC, D., STOJANOVIC, I., MOMCILOVIC, M., MAKSIMOVIC V., TUFEGDZIC, S., MARJANOVIC, Z., MOSTARICA-STOJKOVIC M., VUCINIC', Z., STOSIC-GRUJICIC, S. Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: *In vitro* and *in vivo* study. Institute for Multidisciplinary Research, Belgrade, Serbia. *Chemical Toxicology* N.46, 2008.

HARTVEIT, F. The immediate cause of death in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, n.65, p. 359-365, 1965.

HAUSBERGER, R., DE BEM, R.S., ALENCAR, B.L.F., PEDROSO, M.L.A., BOARETTI, A.C., MESSIAS-REASON, L.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 37, n. 3, p.187-196, 2001.

HENRY, R.J. Pentosan and (1-3),(1-4)-beta-glucan concentrations in endosperm and whole grain of wheat, barley, oats and rye. *Journal of Cereal Science*, v. 6, n. 3, p. 253-258, 1987.

HOLTZ, M., BORGES, G.M., FURLAN, S.A., WISBECK, E. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 3, n. 1, p. 37-51, 2009.



HUANG, S., INGBER, D.E. A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks. *Breast Disease*, n.27, p. 27-54, 2007.

IKEKAWA, T., UEHARA, N., MAEDA, Y., NAKANISHI, M., FUKUOKA, F. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, n. 29, p. 734-735, 1969.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil. Profissionais do INCA participam de manual de cirurgia oncológica – 05/10/2006. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/releases/press\\_release\\_view\\_arq.asp?ID=1263](http://www.inca.gov.br/releases/press_release_view_arq.asp?ID=1263) .Acesso em 12 de maio de 2010.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil – Estimativa 2010. (2009). Disponível em <[http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5)> Acesso em 12 de fevereiro de 2011.

JEONG, Y.T., JEONG, S.C., GU, Y.A., ISLAM, R., SONG, C.H. Antitumor and Immunomodulating activities of endo-biopolymers obtained from a submerged culture of *Pleurotus eryngii*. *Food Science and Biotechnology*, v. 19, n. 2, p. 399-404, 2010.

JORGENSEN, H., MORKEBERG, A., KROGH, K., OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p.42-48, 2005.

KAWAGISHI, H., NOMURA, A., YUMEN, T., MIZUNO, T., HAGIWARA, T., NAKAMURA, T. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydrate Research*, v. 186, n. 2, p. 267-273, 1989.

KAWAKUBO, Y., KOMIYAMA, K., UMEZAWA, I., NISHIYAMA, Y. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 5, p. 113-118, 1980.

KIM, H.O., YUN, J.W.A. Comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n. 4, p. 728-738, 2005.

KIM, S.Y., SONG, H.J., LEE, Y.Y., CHO, K.H., ROH, Y.K. Biomedical issues of dietary fiber  $\beta$ -glucan. *Journal Korean of Medical Science*, v. 21, n. 10, p. 781-789, 2006.

KLEIN, G., KLEIN, E. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into an "ascites tumor". *Cancer Research*, v. 11, p. 466-469, 1951.

KLOSS, J. Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de poli( $\epsilon$ -caprolactona). Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KOMURA, D.L. *Pleurotus ostreatus Variedade Flórida*: Caracterização estrutural de polissacarídeos do micélio e exopolissacarídeos. 79 p. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KURASHIGE, S., MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. *Gann Gan*, v. 73, p. 85-90, 1982.

LABARÈRE, J, BOIS, F. La conservacion y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. In: SANCHEZ, J.E., ROYSE D. *La Biología y el Cultivo de Pleurotus* spp. Ecosur – Uteha, México, p. 83-123, 2002.

LARRAYA, L.M., PÉREZ, G., RITTER, E., PISABARRO, A.G., RAMÍREZ, L. Genetic Linkage Map of the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, n. 12, p. 5290-5300, 2000.

LAVI, I., FRIESEM, D., GERESH, S., HADAR, Y., SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, v. 244, p. 61–70, 2006.

LEONOWICZ, A., WOJAS-WASILEWSKA, M., ROGALSKI, J., LUTEREK J. Higher fungi as a potential feed and food source from lignocellulosic wastes. *Environmental Biotechnology*, v. 42, p. 229-255, 1991.

LEROI, A.M., KOUFOPANOU, V., BURT, A. Cancer selection. *Nature Reviews*, v. 3, p.226-231, 2003.

LIOTTA, L.A. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American*, v. 266, n. 2, p. 54-63, 1992.

LIOTTA, L.A., KOHW, E.C. Cancer biology: invasion and metastases. In: BAST, R.C., KUFÉ, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R., HOLLAND, J.F., FREI, E., GANSIER, T.S. *Cancer Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. Canada: BC Decker Inc, 2000.

LI, Y.R., LIU, Q.H., WANG, H.X., NG, T.B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1780, p. 51-57, 2008.

MACIEL, M., PINTO, A.C., VEIGA JR, V.F., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAGNANI, M., CASTRO-GÓMEZ, R.J.H.  $\beta$ -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MANZI, P., PIZZOFERRATO, L.  $\beta$ -glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MARTIN, A.M. Submerged production of edible mushroom mycelium. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, v. 16, n. 3, p. 215-217, 1983.

MARTÍNEZ, M.L., BALLESTER, L.A. Cultivo de Champiñones. 1ª edição. Buenos Aires: Grupo Imaginador de ediciones, 96p, 2004.

MARTÍNEZ, Á.T., SPERANZA, M., J. RUIZ-DUEÑAS, F., FERREIRA, P., CAMARERO, S., GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, M.J., GUTIÉRREZ, A., DEL RÍO, J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, v.8, p.195-204, 2005.

MATSUZAKI, P., AKISUE, G., OLORIS, S.C.S., GÓRNIAK, S., DAGLI, M.L.Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life Sciences*, v. 74, p. 573-579, 2003.

MAYER, K.D. The pathogenicity of the Ehrlich ascites tumour. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 47, p. 537-544, 1966.

MAZIERO, R. *Produção de exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: "Screening", caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr.:Fr)Fr.* 1996. 180p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1996.

MAZIERO, R., CAVAZZONI, V., BONONI, V.L.R. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 1, p. 77-84, 1999.

MELLO, I.S., AZEVEDO, J.L. Microbiologia ambiental. Embrapa – *Meio Ambiente*, v. 2, p. 304-319, 2008.

MENDEZ, L. A., CASTRO, C.A.S., CASSO, R.B., LEAL, C.M.C. Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, p. 447–450, 2005.

MIADOKOVÁ, E., SVIDOVÁ, S., VLCKOVÁ, V., DÜHOVÁ, V., PRAZMÁRIOVÁ, E., TOTHOVÁ, K., NADOVÁ, S., KOGAN, G., RAUKO, P. The role of natural biopolymers in genotoxicity of mutagens/carcinogens elimination. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, v. 149, p. 493-496, 2005.

MICHOR, F., IWASA, Y., NOWAK, M.A. Dynamics of cancer progression. *Nature Reviews*, v.4, p. 197-205, 2004.

MISAKI, A., KAWAGUCHI, K., MIYAJI, H., NAGAE, H., HOKKOKUS, S., KAKUTA, M., SASAKI, T. Structure of pestalotan, a highly branched (1-3)- $\beta$ -D-Glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. *Carbohydrated Research*, v. 129, p. 209-227, 1984.

- MIURA, N.N., ADACHI, Y., YADOMAE, T., TAMURA, H., TANAKA, S., OHNO, N. Structure and biological activities of  $\beta$ -glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Microbiology and Immunology*, v. 47, n. 3, p. 173-182, 2003.
- 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, T., WANG, G., ZHANG, J., KAWAGISHI, H., NISHITOBA, T., LI, J. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*, n. 11, p. 151-166, 1995.
- MIZUNO, T., ZHUANG, C. Houbitake, *Pleurotus sajor caju*: antitumor activity and utilization. *Food Review International*, v. 11., n.1., p.185-187, 1995.
- MOLINARO, A., LANZETTA, R., MANCINO, A., EVIDENTE, A., DI ROSA, M., IANARO, A. Immunostimulant (1.3)-D-glucans from the cell wall of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr strain 263. *Carbohydrate Research*, v. 329, n. 2, p. 441-445, 2000.
- MONDAL, S., CHAKRABORTY, I., PRAMANIK, M., ROUT, D., SYED, S., ISLAM, S.S. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigation. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 6, p. 1135-1140, 2004.
- MONTANARI, C.A., BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MORADALI, M.F., MOSTAFAVI, H., GHODS, S., HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 701-724, 2007.
- MORRIS, H.J., MARCOS, J., LLAURADÓ, G., FONTAINE, R., TAMAYO, V., GARCÍA, N., BERMÚDEZ, R.C. Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micologia Aplicada Internacional*, v. 15, n. 1, p. 7-13, 2003.
- NAKAMURA, T., MATSUGO, S., UZUKA, Y., MATSUO, S., KAWAGOSHO, H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phelinus linteus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, n. 4, p. 868-872, 2004.
- NAPPI, B.P., ZILLOTTO, C.H., RABELLO, G., GONZAGA L.V., MORETTO E., CRUZ, R.C. Composição do lipídio presente na biomassa produzida pelos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricular-judae* em soro de leite. *B.CEPPA*, v. 17, n. 1, p. 93-99, 1999.
- NIU, Y.C., LIU, J.C., ZHAO, X.M., WU, X.X. A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* suppresses tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *Oncology Reports*, v. 21., n. 1, p. 145-152, 2009.

NOMBELA, C., GIL, C., CHAFFIN, W.L. Nonconventional protein secretion in yeast. *Trends in Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2006.

OLIVEIRA, M.A., DONEGA, M.A., PERALTA, R.M., SOUZA, C.G.M. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 84-87, 2007.

OOI, V.E.C., LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer pctivity of Polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, [S.I.], v. 7, n. 7, p. 715-729, 2000.

O'PESSOA, C. Teste "in vivo" e "in vitro" para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará; Fortaleza, 1992.

PARK, Y.K., IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L. Determinação da concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. v. II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 517p., 1996.

PEREIRA, A.B. O Gênero *Pleurotus* (Fr.) Kummer no Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno de Pesquisa, Santa Cruz do Sul, RS*, v. 1, n.1, p 19-45, 1988.

PILLEMER, L., LUM, L., LEPOW, I.H., WURZ, L., TODD, E.W. The properdin system and immunity: III The zymosan assay of properdin. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 103, n. 1, p. 1-13, 1956.

RAGUNATHAN, R., SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. *Food Chemistry*, v. 80, n. 3, p. 371-375, 2003.

RAJARATHNAM, S., BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.

RAJARATHNAM, S., SHASHIREKA, M.N., BANO, Z. Biopotentialities of the Basidiomycetes. *Advances in Applied Microbiology*, v. 37, p. 233-361, 1992.

RAMPINELLI, J.R., SILVEIRA, M.L.L., GERN, R.M.M., FURLAN, S.A., NINOW, J.L., WISBECK, E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. *Alimentos e Nutrição*, v. 21, n. 2, p. 195-200, 2010.

REFAIE, F.M., ESMAT, A.Y., DABA, A.S, TAHA, S.M. Characterization of polysaccharopeptides from *Pleurotus ostreatus* mycelium: assessment of toxicity and immunomodulation *in vivo*. *Micologia Aplicada Internacional*, v. 21, n. 2, p. 67-75, 2009.

REYES, L.J. Estudo da Biodegradação de Polietileno Tereftalato (PET) por fungos Basidiomicetos Ligninolíticos. Dissertação de Mestrado (Especialização em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, SP, 2003.

RIZZO, M.S. Colonização Preferencial e Disseminação do Tumor Transplantável de Ehrlich em Camundongos. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROOS, E. Cellular adhesion, invasion and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 738, p. 263-284, 1984.

RORABACHER, D.B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related sub range ratios at the 95% confidence level. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 2, p. 139-146, 1991.

ROSADO, F.R., CARBONERO, E.R., KEMMELMEIER, C., TISCHER, C.A., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1→4)-linked β-D-galactan and β-D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *FEMS Microbiology Letters*, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROSADO, F.R., GERMANO, S., CARBONERO, E.R., DA COSTA, S.M., IACOMINI, M., KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. And *Pleurotus ostreatus* "Florida" (Jack.:Fr.)Kummer. *Journal of Basic Microbiology*, v. 43, n.3, p. 230-237, 2003.

SAAD-HOSSNE, R. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 4, p. 208-210, 2002.

SAAD-HOSSNE, R., SAAD-HOSSNE, W., PRADO, R.G. Ascite neoplásica. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, n. 6, 518-526.

SALES-CAMPOS, C., MINHONI, M.T.A., ANDRADE, M.C.N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Interciência*, v. 35, n. 3, p. 198-204, 2010.

SALMONES, D., MATA, G., WALISZEWSKI, K.N. Comparative culturing os *Pleurotus spp.* On coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 5, p. 537-544, 2005.

SANTOS, V.M.C.S. Contribuição ao estudo da produção de *Pleurotus spp* em resíduos lignocelulósicos. 1999. [150]f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SARANGI, I., GHOSH, D., BHUTIA, S.K., MALLICK, S.K., MAITI, T.K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*, v. 6. p. 1287-1297, 2006.

SCARIOT, M.R., RAK, L., COSTA, S.M.G., CLEMENTE, E. Composição química de cogumelos comestíveis cultivados em resíduo de algodão. *Acta Scientiarum*, v. 22, n. 2, p. 317-320, 2000.

SELEGEAN, M., PUTZ, M.V., RUGEA, T. Effect of the Polysaccharide Extract from the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* against Infectious Bursal Disease Virus. *International Journal Molecular Sciences*, v. 10, n. 8, p. 3616-3634, 2009.

SHAMTSYAN, M., KONUSOVA, V., MAKSIMOVA, Y., GOLOSHCHEV, A., PANCHENKO, A., SIMBIRTSEV, A., PETRISHCHEV, N., DENISOVA, N. Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology*, v. 113, p. 77-83, 2004.

SHASHIREKHA, M.N.; RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chemistry*, v. 92, n. 2, p. 255–259. 2005.

SILVA, D.M.G.V. Narrativas do viver com diabetes mellitus: experiências pessoais e culturais. Florianópolis: UFSC/Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Série Teses em enfermagem n.27, 188p. 2001(a).

SILVA, H.B.S., SCHNEIDER, A.L.S., WISBECK, E., FURLAN, S.A. Biodegradation of 2,4 dichloropfenol by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 6, p. 1563-1570, 2009.

SILVA, R. C. Plantas medicinais na saúde bucal., Artgraf: Vitória,136p., 2001(b).

SILVA, R.R., COELHO, G.D. Fungos. Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Curso de Capacitação de munitores e educadores. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, São Paulo, 20p., 2006.

SILVEIRA, M.L.L. *Comparação entre o desempenho de inóculo sólido e inóculo líquido para o cultivo de Pleurotus ostreatus DSM 1833*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 90p. 2003.

SILVEIRA, M.L.L., FURLAN. S.A., NINOW, J. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 858-862, 2008.

SILVEIRA, M.L.L., WISBECK, E., NINOW, J.L., GERN, R.M.M., FURLAN, S.A. *Pleurotus* cultivation in submerged culture and nutritional value of fruit bodies cultivated in solid culture. In: LARROCHE, C., PANDEY, A., DUSSAP, C.G. (Org.). *Current topics on bioprocesses in food industry*. New Delhi: *Asiatech Publishers*, Inc., p. 197-203, 2006.

SMIDERLE, R.F. Caracterização estrutural de alguns polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus pulmonarius* e aplicações. 71 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOFFIATTI, N.R.T. Consulta de enfermagem em ambulatório de quimioterapia: ênfase nas ações educativas. *Cogitare Enfermagem*, v. 5, p. 62-72, 2000.

SPOLIDORIO, D.M.P., SPOLIDORIO, L.C., BARBEIRO, R.H., HÖFLING, J.F., BERNARDO, W.L.C., PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *Mutans* e *Candida sp* e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos a radioterapia. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v. 15, n. 4, p. 354-358, 2001.

SUGIURA, K., STOCK, C.C. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer Research*, v. 2, p. 318, 1954

SUGIURA, M., IMAI, S., SAKURADA, K., MIYAZAKI, T., OSATO, T. Cryptic dysfunctional cellular immunity in asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) carriers and its actualization by an environmental immunosuppressive factor. *In vivo*, v. 8, n. 6, p. 1019-1022. 1994.

SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review in Microbiology*, n. 39, p. 243-270, 1985.

SUTHERLAND, I.W., ELLWOOD, D.C. Microbial exopolysaccharides – industrial polymers of current and future potential. In: BULL, A.T., ELLWOOD & RATLEDGE, C. (eds) *Microbial technology: Current Status Future Prospects*. Cambridge: Cambridge University Press, 422 p., 1979.

TAO, Y., ZHANG, L., CHEUNG, P.C.K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 2261-2269, 2006.

THANGAPAZHAM, R.L., SHARMA, A., MAHESHWARI, R.K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS Journal*, n. 8, p. E443-E449, 2006.

THOMAS, G.V., PRABHU, S.R., REENY, M.Z., BOPAIAH, B.M. Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 879-882, 1998.

TONG, H., XIA, F., FENG, K., SUN, G., GAO, X., SUN, L., JIANG, R., TIAN, D., SUN, X. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1682-1686, 2009.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. *Microbiologia*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TSIKLAURI, N.D., KHardzIANI T.S., KACHLISHVILI E. T., ELISASHVILI, V.I. Cellulase and xylanase activities of higher basidiomycetes during bioconversion of plant raw material depending on the carbon source in the nutrient medium. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.35, n.3, p. 291-295, 1999.

UNURSAIKHAN, S., XU, X., ZENG, F., ZHANG, L. Antitumor activities of O-sulfonated derivatives of (1->3)-alpha-D-glucan from different *Lentinus edodes*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 70 n. 1, p. 38-46. 2006.



VAN KEMPEN, L.C.L., COUSSENS, L.M. MMP9 potentiates pulmonary metastasis formation. *Cancer Cell*, v. 2, n. 4, p. 251-252, 2002.

VIEGAS, C., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2. p. 326-337, 2006.

VIEGAS, C., BOLZANI, V.S., FURLAN, M., FRAGA, C.A., BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*, v. 27, n. 4. p. 655-660, 2004.

VIEIRA, E., PAZ, M.F., GIOVANNI, R.N. Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de uva pela técnica Jun-cau. IN: VI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) – Curitiba, PR, 2007.

VILGALYS, R., SUN, B.L. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academi of Sciences*, v. 91, n. 10, p. 4599–4603, 1994.

WANG, H., GAO, J.A., NG, T.B. A new lectin witch highly potent antihepatoma and antisarcoma activites from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 275, n. 3, p. 810-816, 2000.

WANG, J.C., HU, S.H., LIANG, Z.C., YEH C.J. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Applied microbiology and Biotechnology*, v. 67, p. 759-766, 2005.

WANG, T.N., QIAN, X.H., GRANICK, M.S., SOLOMON, M.P., ROTHMAN, V.L., BERGER, D.H., TUSZYNSKI, G.P. Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. *Journal of Surgical Research*, v. 63, p. 39-43, 1996.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as source af antitumor and immunomodulating polysaccharide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p.258-274, 2002.

WEINBERG, R.A. How cancer arises. *Scientific American*, v. 275, n. 3, p. 62-70, 1996.

WILLIAMS, D.L. Overview of (1-3)- $\beta$ -D-glucan immunobiology. *Mediators of Inflammation*, v. 6, n. 4, p. 247-250, 1997.

WISBECK, E. *Estudo do cultivo submerso de Pleurotus ostreatus DSM 1833 para a produção de biomassa e exopolissacarídeos*. 2003. 175 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISBECK, E., ROBERT, A.P., FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 3, n.2, p. 7-10, 2002.

WOLFF, E.R. Estudo *in vivo* da atividade antitumoral de substâncias bioativas de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 87p., 2007.

WOLFF, E.R.S., WISBECK, E., SILVEIRA, M.L.L., GERN, R.M.M., PINHO, M.S.L., FURLAN, S.A. Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n. 2-3, v.151, p. 402-412, 2008.

WONG, K.H., LAI, C.K.M., CHEUNG, P.C.K. Immunomodulatory activities of mushrooms sclerotial polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 150-158, 2011.

WU, C.Y., MAU, J.L., LIANG, Z.C. Influence of cultivation conditions on mycelia growth and exopolysaccharide production of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus citrinopileatus* Singer (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 10, p. 279-292, 2008.

XAVIER-SANTOS, S. Isolamento, identificação e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista - São José do Rio Preto/Mirassol, SP. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

YOSHIOKA, Y., TABETA, R., SAITÔ, H., UEHARA, N., FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (FR.) QUÉL.: isolation and structure of a  $\beta$ -glucan. *Carbohydrate Research*, n. 140, p. 93-100, 1985.

ZADRAZIL, F., KURTZMAN, J.R.H. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: CHANG, S.T., QUIMIO, T.H. *Tropical Mushrooms*. Hong Kong, The Chinese Univ. Press. p. 277-278., 1984.

ZHANG, J., WANG, G., LI, H., ZHUANG, C., MIZUNO, T., ITO, H., SUZUKI, C., OKAMOTO, H., LI, J. Antitumor Polysaccharides from a Chinese Mushroom, "Yuhuangmo", the Fruiting Body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, n.58, v.7, p. 1195-1201, 1994.

ZHANG, L., ZHANG, M., ZHOU, Q., CHEN, J., ZENG, F. Solution properties of antitumor sulfated derivative of  $\alpha$ -(1-3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 64, n. 10, p. 2172-2178, 2000.

ZHANG, M., CHEUNG, P.C.K., ZHANG, L., CHIU, C.M., OOI, V.E.C. Carboxymethylated  $\beta$ -glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 319-325, 2004 (a).

ZHANG, M., CUI, S.W., CHEUNG, P.C.K., WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, v.18, n.1, p.4-19, 2007.

ZHANG, M., ZHANG, L., CHEUNG, P.C.K., OOI, V.E.C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 123-128, 2004 (b).

ZHANG, M., ZHU, L., CUI, S., WANG, Q., ZHOU, T., SHEN, H. Fractionation, partial characterization and bioactivity os water-soluble polysaccarides and polysaccaride-protein complexes from *Pleurotus geesteranus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, p. 5-12, 2011(a).

ZHANG, Y., LI, S., WANG, X., ZHANG, L., CHEUNG. P.C.K. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 196-206, 2011(b).

## 8 ANEXOS

### ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ  
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE



Joinville, 16 de julho de 2009

OFÍCIO N.º 202/2009 - PRPPG/ CEP

Para Profa. Sandra Aparecida Furlan  
Projeto de Pesquisa – MSMA  
UNIVILLE

ASSUNTO: Parecer Processo nº 008/09 - COEA

O Projeto de **“SÍNTESE E EXTRAÇÃO DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE PLEUROTUS OSTREATUS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REDUÇÃO TUMORAL”**, de sua responsabilidade, foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, após ter sido analisado e verificado que atende plenamente aos parâmetros descritos na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Lembramos que, ao finalizar a pesquisa, deverá ser encaminhado ao CEP/UNIVILLE o relatório final.

Atenciosamente,

  
Mariluci Neis Carelli

Presidente *Pró-Tempore* do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

*Recibido 17/07/09  
E.K.*

Unidade São Francisco do Sul  
Rodovia Duque de Caxias Km 8 Poste 128 - Iperoba  
CEP. 89.240-000 - São Francisco do Sul/SC  
Telefone: (47) 3442-2577

Campus Joinville  
Campus Universitário, s/n - Bom Retiro  
CEP. 89201-974 - Joinville/SC  
Fone: (47) 3461-9000 - Fax: (47) 3473-0131  
[www.univille.br](http://www.univille.br)

Campus São Bento do Sul  
R. Norberto Eduardo Weisermann, 230 - Colonial  
Caixa Postal 41 - CEP. 89290-000 - São Bento do Sul/SC  
Telefone: (47) 3631-9100

# ANEXO B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ  
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE



## PARECER CONSUBSTÂNCIADO

### 1) DADOS GERAIS

Nº do Processo: 008/2009  
Nº do Protocolo nº: 01/0409  
Data de entrada no Comitê: 22/04/2009  
Instituição: UNIVILLE  
Comitê: ( ) Humanas ( X ) Animais  
Área Temática Especial: ( X ) Não ( ) Sim. Qual?

### 2) TÍTULO

Síntese e extração de frações polissacarídicas de *Pleurotus ostreatus* e avaliação da capacidade de redução tumoral.

### 3) RESPONSÁVEL

Profa. Sandra Aparecida Furlan.

### 4) PARTICIPANTES

Profa. Sandra Aparecida Furlan.  
Jean Mary Facchini.

### 5) ANÁLISE

Em resposta ao Ofício nº 168/2009 – PRPPG/CEP, a autora do projeto respondeu ao esclarecimento solicitado, no que se refere à seguinte pendência apontada:

a) Informar o título oficial no formulário "Formulário de Apresentação de Proposta de Projeto – Comitê de Ética em Pesquisa com Animal Univille – COEA".

### 6) PARECER

( ) Não aprovado;  
(X) Aprovado;  
( ) Com Pendências.

A partir da análise, constata-se que atende plenamente a lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, para realização de pesquisas com animais, assim recomenda-se sua aprovação para a execução.

Joinville, 16 de julho de 2009.

Mariluci Neis Carelli

Presidente *Pro-Tempore* do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

Unidade São Francisco do Sul  
Rodevia Duque de Caxias Km 8 Poste 128 - Iperoba  
CEP. 89.240-000 - São Francisco do Sul/SC  
Telefone: (47) 3442-2577

Campus Joinville  
Campus Universitário, s/n - Bom Retiro  
CEP. 89201-974 - Joinville/SC  
Fone: (47) 3461-9000 - Fax: (47) 3473-0131  
[www.univille.br](http://www.univille.br)

Campus São Bento do Sul  
R. Norberto Eduardo Welhermarin, 230 - Colonial  
Caixa Postal 41 - CEP. 89250-000 - São Bento do Sul/SC  
Telefone: (47) 3631-9100