

IVANELIZA SIMIONATO DE ASSIS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS  
DE *Pleurotus sajor-caju***

JOINVILLE  
2011

IVANELIZA SIMIONATO DE ASSIS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS  
DE *Pleurotus sajor-caju***

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: Sandra Aparecida Furlan  
Co-orientadora: Regina Maria Miranda Gern

JOINVILLE  
2011

## **Termo de Aprovação**

### **SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE *Pleurotus sajor-caju***

por

Ivaneliza Simionato de Assis

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração (Biotecnologia) e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville.  
Aprovada em 9 de Junho de 2011.

Profª Drª Sandra Aparecida Furlan  
Orientadora (UNIVILLE)

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger  
Coordenador do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

Banca examinadora:

Profª Drª Sandra Aparecida Furlan  
Orientadora (UNIVILLE)

Profª Drª Regina Maria Miranda Gern  
Co-orientadora (UNIVILLE)

Profª Drª Andréa Lima dos Santos Schneider  
Membro interno (UNIVILLE)

Prof Dr Agenor Furigo Júnior  
Membro externo – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Joinville, 9 de Junho de 2011

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a minha família, em especial para minha irmã Gizele Simionato de Assis pela compreensão, dedicação, amor e carinho demonstrados nos momentos em que me fiz ausente.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois se não fosse a vontade DELE em minha vida nada disso teria sido realizado e a todos que contribuíram para a elaboração desse trabalho, em especial à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Sandra Aparecida Furlan e a Prof. Regina Maria Miranda Gern, co-orientadora.*

*As companheiras de luta Prof<sup>a</sup> Márcia L. L. Silveira e a Prof. Mariane Chaves-Bonatti, aos acadêmicos de iniciação científica Carlos, Karina, Priscila, Bruna e Bárbara, e aos colaboradores dos laboratórios da UNIVILLE, em especial a Michele, Bia e Leslie.*

*Agradeço também a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho: o corpo docente do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, os colegas de classe, e as secretárias Débora e Maria Patrícia.*

*Agradeço à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE que, através da Área de Pesquisa, concedeu suporte técnico e financeiro para a realização deste trabalho, bem como a CAPES, pela bolsa de estudo concedida.*

*À Prof<sup>a</sup> Elisabeth Wisbeck, agradeço imensamente pelos conselhos, sugestões e contribuições fornecidas para enriquecer este trabalho.*

*Aos professores Andréa Lima dos Santos Schneider e Agenor Furigo Júnior por terem aceitado avaliar este trabalho e participar da Comissão Examinadora.*

*A meu namorado Betto (Gilberto) pelo companheirismo e incansável apoio durante todo o tempo da realização deste trabalho.*

*Aos meus pais Ivan de Assis e Elizabeth S. de Assis, pelo incentivo, a minha família pelo apoio, todo o meu amor.*

*Aos meus amigos do peito Adriana Zilly, Gustavo Chaves Brandão, Ana Manuela Ordonez, Alcina Fresta e Denise Lemke Carletto pelo carinho, amor e apoio durante todo o tempo para a realização deste trabalho.*

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## RESUMO

Espécies do gênero *Pleurotus*, dentre as quais *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *P. citrinopileatus*, vêm se destacando pelo seu valor nutricional e medicinal. Dentre as propriedades medicinais cita-se a capacidade de modular o sistema imunológico, de diminuir a pressão arterial e o colesterol sanguíneo, além da ação hipoglicêmica, antitrombótica, antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antinociceptiva e antimicrobiana. Estudos revelam que a ação medicinal dos cogumelos está relacionada com a presença de polissacarídeos, principalmente as  $\beta$ -D-glucanas, que podem ser extraídas do corpo de frutificação, micélio, esclerócio e do caldo de cultivo em meio submerso. Assim sendo, trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de identificar a melhor composição do meio de cultivo, bem como as melhores condições de cultivo para maximizar a produção de polissacarídeos fúngicos. Este trabalho teve como objetivos: estudar a influência da composição do meio de cultivo sobre o desenvolvimento de *Pleurotus sajor-caju* e a produção de polissacarídeos em frascos agitados; investigar a influência do pH, da presença de íons cálcio e da concentração inicial de glicose no cultivo de *P. sajor-caju* para produção de polissacarídeos em processo descontínuo, em biorreator de bancada e; validar, *in vivo* contra o S180, a atividade antitumoral dos polissacarídeos extracelulares (EPS) e intracelulares (IPS), obtidos a partir de três diferentes estratégias de separação e denominados PE1 (precipitado de EPS), PM1 e PM2 (extratos de IPS). O estudo da composição do meio de cultivo partiu do meio POL descrito na literatura para síntese de polissacarídeos e variou-se as concentrações iniciais de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona de soja, em frascos agitados, com base num planejamento fatorial  $2^3$ , resultando na definição do meio POL modificado. Para o estudo da influência do pH sobre a produção de polissacarídeos, realizou-se cultivos em pH livre, pH 3,0 e pH 4,0 com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, sem adição de carbonato de cálcio. Após definição do pH do meio de cultivo, realizou-se os cultivos para estudo da influência dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  na produção de polissacarídeos, onde utilizou-se o pH definido anteriormente e adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. E, por último, realizou-se o cultivo com as melhores condições definidas nos experimentos anteriores e  $60 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Para comprovação *in vivo* da eficácia do EPS (PE1) e dos IPS (PM1 e PM2) obtidos, foram conduzidos testes em camundongos inoculados com S180 e submetidos a tratamento pós-indução tumoral com quatro diferentes doses (3, 10, 30 e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) das substâncias teste. Os estudos relacionados à composição do meio de cultivo POL revelaram que, dentre as oito formulações propostas pelo planejamento experimental, a que proporcionou maior concentração de EPS ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) foi a proposta no experimento 7 ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amônio,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja). Quanto à influência do pH na produção de polissacarídeos, os experimentos realizados em pH 3,0 não proporcionaram consumo de glicose, crescimento micelial e produção de polissacarídeos. Os experimentos com pH 4,0 e pH livre apresentaram semelhanças nos resultados. Com isso, optou-se por utilizar o pH 4,0, pois em pH mais alto o carbonato de cálcio é dissolvido facilmente, permitindo melhor visualização do meio de cultivo. Os cultivos realizados com a adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de carbonato de cálcio mostraram que a produtividade global em EPS foi 114,5% maior em relação aos cultivos sem adição de carbonato de cálcio. Quanto à influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS, observou-se que a concentração de EPS foi 101,4% maior nos cultivos com  $60 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial, porém a produtividade global foi 42,2% superior nos cultivos com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial. Quanto aos testes *in vivo*, a substância que promoveu maiores reduções do crescimento do S180 foi o precipitado PE1, seguido do extrato PM2, independentemente da dose, e a substância PM1 na dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Palavras-chave: *Pleurotus sajor-caju*, meio de cultivo, pH, íons cálcio, glicose, atividade antitumoral, Sarcoma 180.

## ABSTRACT

Species of *Pleurotus* genus - *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* and *P. citrinopileatus* – have been pointed out due to their nutritional and medicinal value. Among the medicinal properties, the ability to modulate the immune system, lowering blood pressure and blood cholesterol levels have been focused, besides the hypoglycemic action, antithrombotic, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, antinociceptive and antimicrobial. Studies show that the medicinal properties of mushrooms are related to the polysaccharides presence, mainly the  $\beta$ -D-glucans that can be extracted from the fruiting body, mycelium, and sclerotia as well as from the culture broth in submerged culture. Thus, a number of studies have been conducted to identify the best culture medium composition, and the best cultivation conditions to maximize the production of fungal polysaccharides. This paper aimed: to study the influence of the culture medium composition on *Pleurotus sajor-caju* growth and polysaccharide production in shake flasks; to investigate the influence of pH, calcium ions and initial glucose concentration in *P. sajor-caju* cultivation for polysaccharide production in batch process; to validate *in vivo* against the S180, the antitumor activity of extracellular (EPS) and intracellular (IPS) polysaccharides, obtained through three different separation strategies. These polysaccharides were called PE1 (precipitate from EPS), PM1 and PM2 (extracts from IPS). The study of the culture medium composition was based on the POL medium, considered appropriate for polysaccharide synthesis in the literature. The initial concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , yeast extract and soy peptone were investigated in shake flasks using a factorial design  $2^3$ , resulting in the modified POL medium. To study the influence of pH on polysaccharide production, cultures were carried out in pH 3.0, pH 4.0 and without pH control. The initial glucose concentration was equal to  $20 \text{ g L}^{-1}$  and no calcium carbonate was added to the medium. Keeping initial glucose concentration at the same value and using the pH condition defined in the previous experiments, the influence of calcium ions on polysaccharide production was investigated by adding  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  in the culture medium. Finally, using the best results of the previous experiments, initial glucose concentration was increased to  $60 \text{ g L}^{-1}$ . To validate *in vivo* the effectiveness of the EPS (PE1) and IPS (PM1 and PM2) obtained, tests were conducted in mice, inoculated with S180 and treated (post-tumor induction) with four different doses (3, 10, 30 and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of the test substances. The studies related to the composition of the POL medium showed that among the eight formulations proposed by the experimental design, the one that provided the highest concentration of EPS ( $0.6 \text{ g L}^{-1}$ ) was that of experiment 7 ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$  ammonium sulfate,  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  yeast extract and  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  soy peptone). About the influence of pH on polysaccharide production, the experiments performed in pH 3,0 did not provide glucose consumption, mycelial growth or polysaccharide production. The experiments carried out with pH 4,0 and without pH control presented similar performance. Therefore, pH 4.0 was chosen for further experiments as in higher pH the calcium carbonate is dissolved easily, allowing better visualization of the cultivation medium. The cultivations conducted with  $1 \text{ g L}^{-1}$  calcium carbonate promoted overall productivity in EPS 114.5% higher than those without calcium. About the influence of initial glucose concentration on EPS production, it was observed that EPS concentration was 101.4% higher in the cultivation using  $60 \text{ g L}^{-1}$  initial glucose concentration. However the overall productivity was 42.2% higher in cultivations with  $20 \text{ g L}^{-1}$  initial glucose. Concerning the *in vivo* tests, the substance that promoted the highest inhibition of S180 growth was PE1, followed by PM2, independent on the dose, and finally by PM1 at  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Keywords: *Pleurotus sajor-caju*, means of cultivation, pH, ions, calcium, glucose, antitumor activity, Sarcoma 180.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Desenho esquemático das principais estruturas dos Basidiomicetos .....	5
FIGURA 2	Ciclo de vida dos Basidiomicetos .....	6
FIGURA 3	Imagens dos corpos frutíferos de (a) <i>Pleurotus sajor-caju</i> na natureza. (b) <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 019 em cultivo realizado nos laboratórios da Univille/SC .....	9
FIGURA 4	(a) Estrutura do polissacarídeo isolado do extrato aquoso de <i>P. sajor-caju</i> por Pramanik <i>et al.</i> (2005) (b) Estrutura do polissacarídeo isolado do corpo de frutificação de <i>P. sajor-caju</i> por Pramanik <i>et al.</i> (2007). (c) Estrutura do polissacarídeo isolado de <i>P. sajor-caju</i> por Roy <i>et al.</i> (2008) .....	13
FIGURA 5	(a) Esquema do delineamento experimental para estudo da composição e do pH do meio de cultivo b) Esquema do delineamento dos testes para obtenção de EPS e de IPS c) Esquema do delineamento dos testes antitumoral <i>in vivo</i> .....	30
FIGURA 6	Cultivo de <i>P. sajor-caju</i> em frascos Erlenmeyer .....	32
FIGURA 7	Imagem do pré-cultivo de <i>P. sajor-caju</i> .....	33
FIGURA 8	Esquema de um Biorreator de mistura completa .....	34
FIGURA 9	Efeito das interações das concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS .....	44
FIGURA 10	Efeito das interações das concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de biomassa micelial .....	46
FIGURA 11	Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos conduzidos em meio POL modificado com $20 \text{ g L}^{-1}$ de glicose inicial em pH 3,0 em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas .....	48
FIGURA 12	Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos conduzidos em meio POL modificado com $20 \text{ g L}^{-1}$ de glicose inicial em pH 4,0 em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.....	49
FIGURA 13	Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) e pH (linha intermitente, -◆-, -◇-) dos experimentos conduzidos em meio POL modificado com $20 \text{ g L}^{-1}$ de glicose inicial em pH livre (espontâneo) em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as	

	.....	49
FIGURA 14	Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos em pH 4,0, 20 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO <sub>3</sub> (1,0 g L <sup>-1</sup> ) em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas .....	53
FIGURA 15	Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos em pH 4,0, 60 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO <sub>3</sub> (1,0 g L <sup>-1</sup> ) em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas .....	55
FIGURA 16	(a) Massa média±erro padrão do tumor (g) do grupo controle (CP) e dos grupos testes; (b) Volume médio±erro padrão do tumor (cm <sup>3</sup> ) do grupo controle (CP) e dos grupos testes. Grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg <sup>-1</sup> de precipitado obtido pela adição de etanol ao caldo de cultivo de <i>P. sajor- caju</i> segundo a metodologia de Pokhrel & Ohga (2007) (PE1). * representa existência de diferença significativa em relação ao grupo controle .....	58
FIGURA 17	(a) Massa média±erro padrão do tumor (g) dos camundongos grupo controle (CP) e dos grupos testes; (b) Volume médio±erro padrão do tumor (cm <sup>3</sup> ) dos camundongos CP. Grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg <sup>-1</sup> de extrato obtido do micélio segundo a metodologia de Pokhrel & Ohga (2007) (PM1). * representa existência de diferença significativa em relação ao grupo controle; ** representa existência de diferença significativa em relação ao grupo tratado com 3, 10 e 30 mg kg <sup>-1</sup> .....	59
FIGURA 18	(a) Massa média±erro padrão do tumor (g) dos camundongos grupo controle (CP) e dos grupos testes; (b) Volume médio±erro padrão do tumor (cm <sup>3</sup> ) dos camundongos CP e dos grupos testes. Grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg <sup>-1</sup> de extrato obtido do micélio segundo metodologia de Jose <i>et al.</i> (2004) (PM2). * representa existência de diferença significativa em relação ao grupo controle .....	60
FIGURA 19	Taxa de inibição do crescimento (%) de S180 para os grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg <sup>-1</sup> de (a) precipitado obtido por adição de etanol ao caldo de cultivo (POKHREL & OHGA, 2007) (PE1), (b) extrato obtido do micélio segundo metodologia de Pokhrel & Ohga (2007) (PM1) e (c) extrato obtido do micélio segundo metodologia de Jose <i>et al.</i> (2004) (PM2) .....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Polissacarídeos isolados de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> .....	11
TABELA 2	Efeito inibitório (%) do crescimento de tumores por extratos aquosos a quente de algumas espécies de macrofungos .....	15
TABELA 3	Métodos utilizados para a obtenção de polissacarídeos de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> .....	20
TABELA 4	Macro e micronutrientes requeridos pelas células fúngicas .....	21
TABELA 5	Desenho do planejamento fatorial $2^3$ variando-se as concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona .....	32
TABELA 6	Composição do meio de cultivo POL modificado em termos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona, definido por meio do planejamento fatorial $2^3$ .....	32
TABELA 7	Concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS e biomassa, obtidas nos experimentos de estudo da composição do meio de cultivo, segundo planejamento fatorial $2^3$ .....	43
TABELA 8	Efeitos calculados com base no planejamento fatorial $2^3$ , com um nível mínimo de 95% de confiança, para a concentração de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ) .....	44
TABELA 9	Efeitos calculados com base no planejamento fatorial $2^3$ , com um nível mínimo de 95% de confiança, para a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ). .....	46
TABELA 10	Parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio POL modificado, pH 4,0 e pH livre, com $20 \text{ g L}^{-1}$ de glicose inicial em processo descontínuo .....	52
TABELA 11	Parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio POL modificado, pH 4,0 sem e com adição de $\text{CaCO}_3$ ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e $20 \text{ g L}^{-1}$ de glicose inicial em processo descontínuo.....	54
TABELA 12	Parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio POL modificado, pH 4,0 com $\text{CaCO}_3$ ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), $20 \text{ g L}^{-1}$ e $60 \text{ g L}^{-1}$ de glicose inicial em processo descontínuo .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp – 3-O-metil-galactopiranosose

ABS – Absorbância

CCB – Centro de Cultivo de Basidiomicetos

DLA – Linfoma ascítico de Dalton

EAC – Carcinoma de Ehrlich

EPS – Polissacarídeos extracelulares

Galp – Galactopiranosose

GlcP – Glicopiranosose

GOD – Glicose-oxidase

i.p. – Intraperitoneal

IPS – Polissacarídeos intracelulares

$K_{La}$  - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )

Manp – Manopiranosose

NK – Natural Killer

P – Concentração de polissacarídeos extracelulares ( $g L^{-1}$ ), no ponto em que a produtividade é máxima

$P_0$  – Concentração inicial de polissacarídeos extracelulares ( $g L^{-1}$ )

$P_f$  – Concentração final de polissacarídeos extracelulares ( $g L^{-1}$ ), aqui considerada a concentração máxima de polissacarídeos extracelulares

pH – Potencial hidrogeniônico

POD – Peroxidase

POL - Meio de cultivo para a produção de polissacarídeos extracelulares

$Q_P$  – Produtividade global em polissacarídeos extracelulares ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )

$Q_{Pmáx}$  – Produtividade máxima em polissacarídeos extracelulares ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )

$Q_X$  – Produtividade global em biomassa ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )

$Q_{Xmáx}$  – Produtividade máxima em biomassa ( $mg L^{-1} h^{-1}$ )

rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossômico

$S_0$  – Concentração inicial de glicose ( $g L^{-1}$ )

S180 – Sarcoma 180

$S_f$  – Concentração final de glicose ( $g L^{-1}$ ), aqui considerado no momento do seu esgotamento ou quando sua concentração torna-se estável

STR – Stirred Tank Reactor (Reator agitado mecanicamente)

$t$  – Tempo de cultivo, aqui considerado o momento no qual a concentração de polissacarídeos extracelulares atinge seu valor máximo (h)

TDA – Trigo Destrose Ágar

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

$t_p$  – Tempo de cultivo no qual a produtividade em polissacarídeos extracelulares é máxima (h)

$t_x$  – Tempo de cultivo no qual a produtividade em biomassa é máxima (h)

$v/v$  – Volume/volume

$vvm$  - Volume de ar por volume de meio por minuto

$X$  – Concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no ponto onde a produtividade em biomassa é máxima

$X_0$  – Concentração inicial de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )

$X_f$  – Concentração final de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), aqui considerada como sendo a concentração de biomassa no ponto em que a concentração de EPS é máxima

$Y_{P/S}$  – Fator de conversão global de substrato (glicose) em produto (EPS) ( $\text{g g}^{-1}$ )

$Y_{X/S}$  – Fator de conversão global de substrato (glicose) em biomassa ( $\text{g g}^{-1}$ )

$\Delta P$  – Variação entre as concentrações de EPS máxima nos tempos  $t_0$  e  $t$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\Delta P_m$  – Variação entre as concentrações de EPS nos tempos  $t_0$  e  $t_p$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\Delta X$  - Variação entre as concentrações de biomassa máxima nos tempos  $t_0$  e  $t$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\Delta X_m$  - Variação entre as concentrações de biomassa nos tempos  $t_0$  e  $t_x$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\mu_{P_{\text{máx}}}$  – Velocidade específica máxima de formação de polissacarídeos extracelulares ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_{X_{\text{máx}}}$  – Velocidade específica máxima de crescimento micelial ( $\text{h}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNTAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 REINO FUNGI .....	3
2.1.1 Filo Basidiomycota .....	5
2.1.2 O gênero <i>Pleurotus</i> .....	7
2.2 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS .....	10
2.2.1 Polissacarídeos de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> .....	11
2.3 PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DOS FUNGOS .....	13
2.3.1 Propriedades antitumorais de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> .....	15
2.4 SEPARAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS .....	18
2.4.1 Separação de polissacarídeos de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> .....	19
2.5 CULTIVO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE EPS .....	20
2.5.1 Composição do meio de cultivo .....	20
2.5.2 Condições de cultivo .....	25
2.6 O CÂNCER .....	26
2.6.1 Modelo de estudo animal .....	27
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>29</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	29
3.2 PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM MEIO LÍQUIDO .....	31
3.2.1 Micro-organismo e manutenção .....	31
3.2.2 Cultivo em frascos agitados: estudo da composição do meio de cultivo .....	31
3.2.3 Cultivo em biorreator .....	32
3.2.3.1 Preparo do pré-cultivo (inóculo) .....	33
3.2.3.2 Ensaios conduzidos em biorreator .....	33

3.3 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL <i>in vivo</i> .....	35
3.3.1 Obtenção dos polissacarídeos .....	35
3.3.1.1 Métodos de obtenção dos polissacarídeos intracelulares (IPS) .....	35
3.3.1.1.1. Métodos de extração segundo Pokhrel & Ohga (2007) .....	35
3.3.1.1.2 Método de extração segundo Jose <i>et al.</i> (2004) .....	36
3.3.1.2 Métodos de precipitação dos polissacarídeos extracelulares (EPS) .....	36
3.3.2 Teste antitumoral <i>in vivo</i> .....	36
3.3.2.1 Animais e manutenção .....	36
3.3.2.2 Células tumorais e manutenção .....	37
3.3.2.3 Indução tumoral .....	37
3.3.2.4 Delineamento experimental .....	37
3.4 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	38
3.4.1 Análise de concentração de biomassa .....	38
3.4.2 Análise da concentração de glicose .....	38
3.4.3 Extração e quantificação de EPS para obtenção de dados para análise cinética .....	39
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
3.5.1 Estudo da composição do meio de cultivo .....	40
3.5.2 Experimentos em biorreator .....	40
3.5.3 Avaliação do potencial antitumoral <i>in vivo</i> .....	40
3.6 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS .....	41
3.6.1 Fatores de conversão .....	41
3.6.2 Produtividades .....	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO .....	43
4.2 CULTIVOS EM BIORREATOR .....	48
4.2.1 Estudo da influência do pH no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> para síntese de EPS .....	48
4.2.2 Estudo da influência do carbonato de cálcio no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> para síntese de EPS .....	52
4.2.3 Estudo da influência da concentração inicial de glicose no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> para síntese de EPS .....	55
4.3 TESTE ANTITUMORAL <i>in vivo</i> .....	57

<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>64</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>92</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos são conhecidos popularmente como bolores, mofos, cogumelos comestíveis e alucinógenos. A maioria cresce em ambientes úmidos, com baixa luminosidade, utilizando nutrientes da matéria orgânica através de processos de absorção (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Dentre os fungos, os cogumelos destacam-se na área da saúde por diminuírem o nível de colesterol no sangue, apresentarem em sua composição substâncias anticancerígenas, minerais e vitaminas; por serem fontes de aminoácidos essenciais e não-essenciais, e apresentarem ainda a característica de nutrir e não engordar (PUTZKE & PUTZKE, 1998).

Fungos do gênero *Pleurotus* estão incluídos no filo Basidiomycota (CARLILE *et al.*, 2001; WEBSTER & WEBER, 2007) e são conhecidos como cogumelos “ostra”, hiratake, houbitake e shimeji-preto (CHANG & MILES, 2004). As propriedades medicinais de *Pleurotus* spp 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 antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana (ZHANG *et al.*, 1994; OOI & LIU, 2000).

Os polissacarídeos constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica, sendo a parede celular das hifas frequentemente formada por 75% de polissacarídeo (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995). Estes polissacarídeos podem ser extraídos e isolados da parede celular do corpo de frutificação (DONG *et al.*, 2002; ALQUINI *et al.*, 2004; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008), do micélio (SARANGI *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007), do esclerócio (ZHANG *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2009) e também do caldo de cultivo de células em processos submersos (PRAMANIK *et al.*, 2005). Quando os fungos são cultivados em meio líquido (cultivo submerso) podem produzir polissacarídeos que são excretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1998) e também aqueles que ficam aderidos à parede celular da biomassa micelial (FUKUDA *et al.*, 2009).

As glucanas são consideradas como os homopolissacarídeos mais frequentes na parede celular fúngica, sendo que as  $\beta$ -glucanas constituem a forma predominante, podendo estar livres ou associadas a proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos (WILLIAMS, 1997). As  $\beta$ -glucanas são substâncias que estimulam o sistema imune, modulando a imunidade humoral e celular, tendo, assim, um efeito benéfico no combate as infecções (bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias), além de apresentarem propriedades hipocolesterolêmica,

anticoagulante, anti-citotóxica, antimutagênica e anti-tumorigênica, tornando estas substâncias promissoras candidatas a promotores da saúde (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de identificar a melhor composição do meio de cultivo (WU *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2008; PAPINUTTI, 2010) e as melhores condições de cultivo (WISBECK, 2003; HWANG *et al.*, 2003; POKHREL & OHGA, 2007; GERN *et al.*, 2008) para a produção destes polissacarídeos por diversas espécies fúngicas.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a síntese de polissacarídeos por *Pleurotus sajor-caju* e avaliar o seu potencial antitumoral *in vivo*.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar a influência da composição do meio de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* na produção de polissacarídeos em frascos agitados;
- Investigar a influência do pH, da presença de íons cálcio e da concentração inicial de glicose no cultivo de *Pleurotus sajor-caju* para produção de polissacarídeos em processo descontínuo em biorreator de bancada;
- Validar, *in vivo* contra o Sarcoma 180 (S180), a atividade antitumoral dos polissacarídeos extracelulares (EPS) e intracelulares (IPS), obtidos a partir de três diferentes estratégias de separação.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 REINO FUNGI

Segundo Joly (2002) os fungos (Divisão Eumycophyta) são distribuídos em quatro classes: Archimycetes, Phycomycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes. Por muitas décadas os fungos foram classificados como plantas, mas estudos revelaram que os fungos apresentam quatro características que os diferem das plantas: são aclorofilados; a parede celular contém um carboidrato denominado quitina; embora geralmente filamentosos, não são verdadeiramente multicelulares, pois o citoplasma de uma célula se conecta com a célula adjacente através de poros e; os fungos são eucariontes heterotróficos (ALCANO, 2000). Incluem-se nesta divisão organismos saprófitas e parasitas (PUTZKE & PUTZKE, 1998).

Estima-se que existam mais de 1,5 milhões de espécies fúngicas no mundo, embora apenas 80.000 espécies tenham sido descritas (HAWKSWORTH, 2001; WEBSTER & WEBER, 2007). Carlile *et al.* (2001) sugerem que a cada ano 700 novas espécies são descobertas.

Conforme Esposito & Azevedo (2004) os fungos são conhecidos popularmente como bolores, mofos, cogumelos comestíveis e alucinógenos, sendo um grupo bastante heterogêneo, que tem representantes em todos os ambientes.

Com exceção das leveduras, os fungos consistem de massas de filamentos entrelaçados de células denominadas hifas. Cada célula de uma hifa possui um ou mais núcleos, bem como outras organelas. O conjunto de hifas é denominado micélio (ALCANO, 2000). Dependendo do grupo, as hifas podem apresentar separação entre as células (septadas) ou não (cenocíticas) (PUTZKE & PUTZKE, 1998).

A parede celular dos fungos é composta predominantemente de polissacarídeos, pequena quantidade de proteínas e outros componentes, sendo que os principais polissacarídeos são estruturais, que fornecem rigidez à parede celular e aos componentes da matriz. Além de fornecer proteção contra lise osmótica, contra radiação ultravioleta (quando a melanina está presente) e enzimas líticas de outros organismos e, ainda, regulação da passagem de moléculas grandes através dos poros da parede, a parede celular desempenha papéis importantes no modo de crescimento da hifa e na interface entre o fungo e o ambiente. A parede celular ainda possui funções fisiológicas como sítios de ligação para enzimas e

componentes de superfície que medeiam interações entre os fungos e outros organismos (DEACON, 2006).

Os polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos incluem mananas, glucanas e quitina. A síntese de glucanas envolve glucanas sintetases associadas à membrana plasmática para a montagem das ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 dos ramos de glucanas da parede celular fúngica. A quitina é um importante componente estrutural da parede celular e está envolvida no processo de brotamento da levedura e na transição dimórfica de levedura para a forma filamentosa. As manoproteínas pré-montadas no complexo de Golgi são transportadas através de vesículas até a parede celular. Além destas, outras moléculas são transportadas até a parede para o crescimento da hifa, tais como: enzimas sintetizantes de parede, enzimas líticas de parede e enzimas ativadoras. Estas se fundem com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo, que juntamente com os substratos entregues a partir do citoplasma da célula promovem o crescimento da parede (WALKER & WHITE, 2005).

Os fungos crescem melhor na ausência de luz e em ambientes úmidos. A maioria é saprófita, assegurando seus nutrientes de matéria orgânica morta. Sua nutrição é realizada por exoenzimas hidrolíticas que digerem externamente os substratos e, posteriormente, células especializadas, denominadas de haustórios, absorvem os produtos solúveis. São quimiorganotróficos, isto é, utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, elétrons e energia. A maioria utiliza carboidratos (de preferência glicose ou maltose) e compostos nitrogenados para sintetizar suas próprias proteínas e aminoácidos (PRESCOTT *et al.*, 2002).

Quanto às necessidades nutricionais, a maioria requer carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, boro, manganês, cobre, molibdênio, ferro e zinco (PUTZKE & PUTZKE, 1998; WALKER & WHITE, 2005). São geralmente aeróbios, no entanto, algumas leveduras são anaeróbias facultativas e podem obter energia por fermentação, como na produção de álcool etílico a partir da glicose (PRESCOTT *et al.*, 2002).

Possuem reprodução assexuada ou sexuada. A reprodução assexuada pode ser realizada por divisão binária (fissão ou gemulação) e por produção de esporos assexuados (artrosporos, clamidiosporos, esporangiosporos, conidiosporos e blastosporos). A reprodução sexuada envolve a união de núcleos compatíveis e também a formação de esporos sexuados: zigosporos, ascosporos e basidiosporos (PRESCOTT *et al.*, 2002).

Desempenham papel ecológico preponderante, pois contribuem na degradação de substâncias orgânicas, acelerando o ciclo biogeoquímico dos elementos na natureza (GUERRERO & HOMRICH, 1999). Economicamente, tem implicações em várias áreas, como medicina humana e veterinária, farmácia, nutrição, fitopatologia, entre outras (PUTZKE

& PUTZKE, 1998). No entanto, os fungos são a principal causa de doenças em plantas, sendo que mais de 5.000 espécies atacam culturas economicamente importantes, assim como causam doenças em humanos e em outros animais (PRESCOTT *et al.*, 2002).

### 2.2.1 Filo Basidiomycota

Os basidiomicetos representam uma das maiores classes de fungos com cerca de 550 gêneros (RAJAN, 2001) e 30.000 espécies (DEACON, 2006; RAVEN *et al.*, 2007). Recebem este nome devido à estrutura de reprodução sexual, em que os basidiósporos são produzidos por cariogamia seguida de meiose (ALCAMO, 2000). Compreendem duas subclasses que são separadas pelo tipo de basídio formado. Na primeira subclasse (Holobasidiomycetidae), o basídio é inteiro (não septado), enquanto que na segunda subclasse (Phragmobasidiomycetidae), o basídio apresenta-se sempre septado, transversal ou longitudinalmente (JOLY, 2002). Hawksworth *et al.* (1995) diferentemente do autor anterior, descreve três classes: Basidiomycetes, Teliomycetes e Ustomycetes, classificação baseada principalmente na estruturação do septo hifálico.

A maioria apresenta frutificação macroscópica, constituída de hifas modificadas que formam pseudotecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (PUTZKE & PUTZKE, 1998), conforme demonstra a Figura 1.

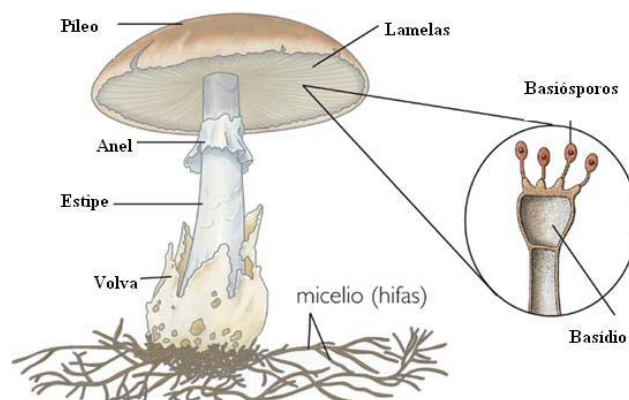


Figura 1 – Desenho esquemático das principais estruturas dos Basidiomicetos.  
Fonte: [www.kalipedia.com/ecologia/tema/basidiomiceto](http://www.kalipedia.com/ecologia/tema/basidiomiceto).

Segundo Raven *et al.* (2007) grande parte dos fungos denominados macroscópicos estão incluídos no Filo Basidiomycota, entre eles várias espécies de cogumelos comestíveis e venenosos, os gasteromicetos, as orelhas-de-pau, bem como grupos de fungos patogênicos

importantes, as ferrugens e os carvões. Os membros desse filo têm papel preponderante na decomposição de substratos vegetais.

Os basidiomicetos são fungos terrestres, saprófitas ou parasitas. O micélio é bem desenvolvido, ramificado e septado. Possuem três tipos de micélio: primário, secundário e terciário (SHARMA, 1989). Segundo Prescott *et al.* (2002) o desenvolvimento dos basidiomicetos típicos do solo, inicia com a germinação de um basidiósporo para a produção de micélio monocariótico, que cresce rapidamente e se espalha pelo solo. Quando este micélio primário encontra outro micélio monocariótico, se fundem para formar o micélio dicariótico, que é estimulado a desenvolver o basidiocarpo, que contém os basídios alinhados sobre as lamelas, local onde ocorre a cariogamia, isto é, os núcleos se fundem e formam um único núcleo diplóide, que imediatamente sofre meiose, formando quatro núcleos haplóides. Cada núcleo haplóide vai formar um basidiósporo (haplóide), sendo liberado na maturidade, caindo novamente no substrato e reiniciando o ciclo (Figura 2).

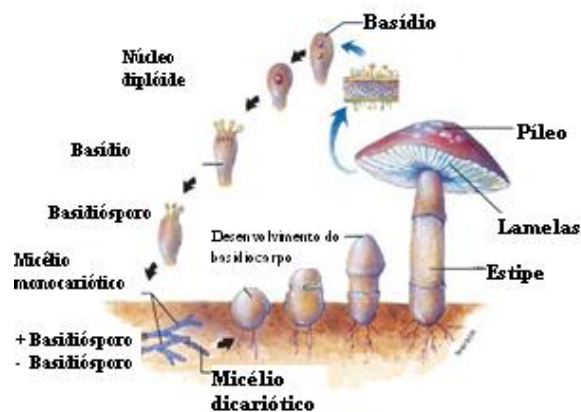


Figura 2 – Ciclo de vida dos Basidiomicetos.

Fonte: Prescott *et al.* (2002).

Webster & Weber (2007) destacam entre os cogumelos comestíveis cultivados comercialmente, *Agaricus bisporus* (champignon), *Pleurotus* spp (hiratake e shimeji) e *Lentinula edodes* (Shiitake). Estes autores também relatam a incidência natural de espécies venenosas e alucinógenas destacando *Amanita phalloides* e *Amanita muscaria*, respectivamente.

Dentre as qualidades como alimento, os cogumelos destacam-se por serem fontes de aminoácidos essenciais e alguns não-essenciais, conterem minerais (cálcio, potássio, iodo e fósforo), apresentarem vitaminas (riboflavina, tiamina, ácido ascórbico, niacina e algumas do

complexo B) e terem ainda a característica de nutrir e não engordar (PUTZKE & PUTZKE, 1998). Segundo Taveira & Novais (2007) os países Asiáticos, Europeus e Norte Americanos são os maiores produtores e consumidores de cogumelos em todo mundo.

Devido ao alto valor nutritivo e grande potencial medicinal dos cogumelos, várias pesquisas vêm sendo realizadas. Manzi *et al.* (2001) avaliaram o valor nutricional de cogumelos amplamente consumidos na Itália (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* e *Boletous* spp) e observaram a presença, em quantidades variáveis, de fibras dietéticas, quitina e  $\beta$ -glucanas. Relatam, ainda, que uma porção de 100 gramas de cogumelos garantiria de 9 a 40% de fibras alimentares recomendadas diariamente. Furlani & Godoy (2007) estudaram o valor nutricional dos cogumelos comestíveis no Brasil (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*), demonstrando que estas espécies constituem um alimento com excelente valor nutritivo devido a sua constituição química, apresentando alto teor de proteínas e fibras, além de conterem baixo teor de lipídeos.

Bonatti *et al.* (2004) avaliaram as características nutricionais de corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* utilizando como substrato palha de arroz e de bananeira e observaram que *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* apresentaram maior teor de fibras (9,60 % e 9,89%, respectivamente) quando cultivados em palha de arroz. Além disso, o teor de proteína do corpo de frutificação fresco de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, quando cultivados em palha de bananeira, foram 3,10 % e 2,01%, respectivamente. Conforme reportado pelos autores, estes valores são semelhantes ou até mesmo superiores aos encontrados em muitos vegetais.

Estudos recentes vêm sendo realizados com o objetivo de comprovar o potencial prebiótico dos cogumelos, já havendo estudos apontando duas espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus* e *P. eryngii*) com grande potencial prebiótico (AIDA *et al.*, 2009).

Segundo Fortes *et al.* (2006) muitos cogumelos apresentam polímeros de glicose que estimulam a atividade de células natural killer, neutrófilos, macrófagos e células T. Estes polímeros, em geral  $\beta$ -D-glucanas, são responsáveis pela atividade imunomoduladora dos cogumelos medicinais.

### 2.1.2 O gênero *Pleurotus*

Espécies do gênero *Pleurotus* são geralmente denominadas “cogumelos ostra”, devido ao formato do píleo ser semelhante a uma concha e por apresentar estipe excêntrico ou lateral. Sua coloração pode variar entre azul-escuro, cinza-escuro, branco, creme, marrom, amarelo e

rosa (CHANG & MILES, 2004). São de difícil identificação, pois possuem semelhanças morfológicas, grande variedade de espécie e ampla distribuição (GUZMAN, 2000). Segundo Kong (2004) cerca de 70 espécies foram descritas e frequentemente novas espécies vem sendo descobertas.

A espécie *Pleurotus ostreatus*, também conhecida como “Shimeji-preto”, é largamente estudada, mas outras espécies vêm se destacando pelo seu valor nutricional e medicinal, tais como *P. sajor-caju* (hiratake, houbitake), *P. citrinopileatus*, *P. flabellatus*, *P. sapidus*, entre outros (CHANG & MILES, 2004). Segundo Dias *et al.* (2003) o cogumelo *P. sajor-caju*, de origem asiática, destaca-se por apresentar sabor suave, ser rico em vitaminas e aminoácidos e possuir propriedades terapêuticas.

Segundo Carlile *et al.* (2001) a espécie *Pleurotus sajor-caju* (Figura 3) é classificada na seguinte posição taxonômica:

Reino: FUNGI

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Poliales

Gênero: *Pleurotus*

Espécie: *P. sajor-caju*

Já Webster & Weber (2007) inserem *P. sajor-caju* na seguinte classificação, com base na análise filogenética molecular do gene 18S rDNA:

Reino: FUNGI

Sub-reino: Eumycota

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Euagarics

Família: Pleurotaceae

Gênero: *Pleurotus*

Espécie: *P. sajor-caju*



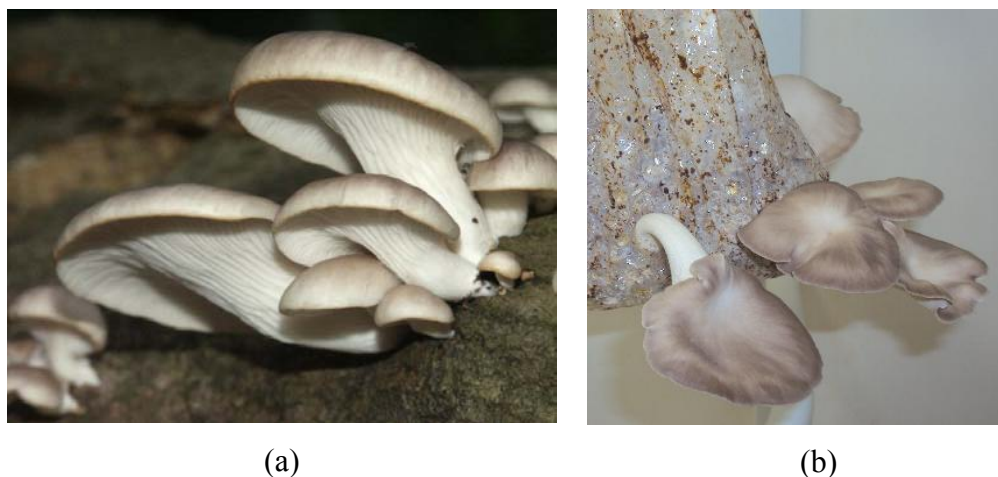


Figura 3 – Imagens dos corpos frutíferos de (a) *Pleurotus sajor-caju* na natureza (b) *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em cultivo realizado nos laboratórios da Univille/SC.

Fonte: (a) <http://www.pbase.com/chinham/image/59787166> (b) Primária.

Cogumelos do gênero *Pleurotus* são de fácil cultivo, crescendo em resíduos agroindustriais e agrofloretais como substrato, agregando valor a estes resíduos (BONATTI, 2002; DIAS *et al.*, 2003; BONATTI *et al.*, 2004; MODA *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2007; MOONMOON *et al.*, 2010).

Este gênero tem despertado grande interesse da comunidade científica devido às suas propriedades medicinais, como capacidade de modular o sistema imunológico (REFAIE *et al.*, 2009), de diminuir a pressão arterial (TAM *et al.*, 1986) e o colesterol sanguíneo, possuindo também ação hipoglicêmica, antitrombótica (WASSER, 2002), antitumoral (MIZUNO & ZHUANG, 1995; ZHANG *et al.*, 2004; WOLFF *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2010), antiinflamatória (JOSE *et al.*, 2004; SMIDERLE *et al.*, 2008), antioxidante (LEE *et al.*, 2007; JAYAKUMAR *et al.*, 2009), antinociceptiva (BAGGIO *et al.*, 2010) e antimicrobiana (WISBECK *et al.*, 2005; IWALOKUN *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2008).

Além dos estudos sobre as propriedades terapêuticas dos fungos do gênero *Pleurotus*, outros estudos vem sendo realizados com ênfase na área ambiental, buscando avaliar a capacidade de biorremediação (PURNOMO *et al.*, 2010), biodegradação (KAMIDA & DURRANT, 2005; MACHADO & MATHEUS, 2006; FURLAN *et al.*, 2008), biodescoloração (MUNARI *et al.*, 2008; SARNTHINA & KHAMMUANG, 2008), bioconversão (SHASHIREKHA *et al.*, 2002), entre outros.

Furlan *et al.* (2008) estudaram as possibilidades de aplicação de fungos do gênero *Pleurotus* na alimentação, saúde e meio ambiente. Estes estudos revelaram que este gênero

apresenta algumas possibilidades de aplicações, tais como: a produção de corpo de frutificação com alto teor de proteínas; a produção de polissacarídeos extracelulares de potencial antitumoral em cultivo submerso e utilização da biomassa micelial como inóculo para cultivo sólido; a degradação de poluentes como o 2,4-diclorofenol em meio líquido.

## 2.2 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

Os polissacarídeos constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica, sendo que a parede celular das hifas contém frequentemente mais de 75% de polissacarídeo. Além de atuar como elementos de apoio das hifas, alguns polissacarídeos extracelulares constituem uma bainha em torno do micélio (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

Segundo Sutherland (1998), os exopolissacarídeos são polissacarídeos extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias, ligados à superfície das células ou excretados para o meio extracelular. Fukuda *et al.* (2009) consideram os polissacarídeos da parede celular fúngica como endopolissacarídeos. Nelson & Cox (2002) relatam que os polissacarídeos podem ser estruturais, excretados ao meio como exopolissacarídeos (EPS) ou localizarem-se no citoplasma, exercendo a função de reserva energética.

Os polissacarídeos extracelulares microbianos possuem amplo campo de aplicações nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas, apresentando elevado valor econômico e constituindo um mercado promissor. A indústria de alimentos tem grande interesse nos biopolímeros de carboidratos devido as suas propriedades físico-químicas e reológicas, podendo estes ser empregados em sistemas alimentares como agentes estabilizantes, espessantes, emulsificantes e como biofilmes para revestimentos comestíveis (CUNHA *et al.*, 2008).

Colleoni-Sirghie *et al.* (2003) relatam que a aplicação terapêutica destes polissacarídeos parece depender da estrutura química e da conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais de cada polímero resultam em características peculiares para novas aplicações. Com isso, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de isolar, purificar e identificar a estrutura química destas moléculas e suas possíveis aplicações.

Williams (1997) considera as glucanas como sendo os homopolissacarídeos mais frequentes na parede celular fúngica. A maioria apresenta cadeia linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ), sendo que as  $\beta$ -glucanas constituem a forma predominante, podendo estar livres ou associadas a

proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos. Gutiérrez *et al.* (1995) relatam que as glucanas podem contribuir para manter o pH ótimo, além de impedirem a desidratação das hifas e de regularem a concentração de glicose extracelular. Essas moléculas ficam parcialmente dissolvidas no meio de cultivo quando o fungo cresce em meio líquido.

Segundo Mantovani *et al.* (2008), as  $\beta$ -glucanas são substâncias que estimulam o sistema imune, modulando a imunidade humoral e celular, exercendo assim um efeito benéfico no combate as infecções (bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias), além de apresentarem propriedades hipocolesterolêmica, anticoagulante, anti-citotóxica, antimutagênica e anti-tumorogênicas, tornando estas substâncias promissores candidatos a promotores da saúde.

De acordo com Wasser (2002) e Park *et al.* (2003),  $\beta$ -glucanas, homo- e hetero-glucanas unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow3)$ ,  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$  são supostamente responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde humana, como atividade imunomodulatória, antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena dos cogumelos comestíveis. Fortes *et al.* (2006) também relatam as  $\beta$ -glucanas como as substâncias responsáveis pela atividade imunomoduladora dos cogumelos comestíveis, estimulando a atividade de células natural Killer, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células T.

### 2.2.1 Polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus*

Devido as propriedades medicinais dos polissacarídeos de cogumelos do gênero *Pleurotus*, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de isolar, purificar e caracterizar as glucanas de cogumelos do gênero *Pleurotus*, conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 – Polissacarídeos isolados de fungos do gênero *Pleurotus*.

<b>Espécie</b>	<b>Polissacarídeo</b>	<b>Ligação glicosídica</b>	<b>Autor(es)</b>
<i>P. eryngii</i>	$\beta$ -D- Glcp*	(1 $\rightarrow$ 3)	Carbonero <i>et al.</i> (2006)
	$\alpha$ -D-Galp**	(1 $\rightarrow$ 6)	Carbonero <i>et al.</i> (2008)
<i>P. florida</i>	$\beta$ -D- Glcp	(1 $\rightarrow$ 6)	Das <i>et al.</i> (2010)
	$\alpha$ -D-Glcp, $\beta$ -D- Glcp	(1 $\rightarrow$ 3)	Santos-Neves <i>et al.</i> (2008)
	$\alpha$ -D-Glcp, $\beta$ -D- Glcp	(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)	Rout <i>et al.</i> (2005)
<i>P. ostreatoroseus</i>	$\beta$ -D- Glcp	(1 $\rightarrow$ 3)	Carbonero <i>et al.</i> (2006)
	$\alpha$ -D-Galp	(1 $\rightarrow$ 6)	Carbonero <i>et al.</i> (2008)

Continuação da Tabela 1.

	$\alpha$ -D-Manp***, $\alpha$ -D-Galp	(1→4), (1→6)	Rosado <i>et al.</i> (2002)
	3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp, $\alpha$ -D-Galp	(1→6)	Rosado <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ostreatus</i>	$\beta$ -D- Glcp	(1→3)	Yoshioka <i>et al.</i> (1985)
	3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp, $\alpha$ -D-Galp	(1→6)	Rosado <i>et al.</i> (2003)
	$\alpha$ -D-Galp, $\beta$ -D-glucose	(1→6), (1→2,6)	Sun; Liu (2009)
<i>P. sajor-caju</i>	D-glucose, D-galactose, D- manose	(1→4), (1→6), (1→2)	Pramanik <i>et al.</i> (2005)
	$\alpha$ -D-Glcp, $\beta$ -D- Glcp	(1→3), (1→6), (1→2)	Pramanik <i>et al.</i> (2007)
	D-glucose, D-galactose	(1→4), (1→6)	Roy <i>et al.</i> (2008)
<i>P. tuber-regium</i>	$\beta$ -D- Glcp	(1→3)	Chenghua <i>et al.</i> (2000)

\* Glicopiranose, \*\* Galactopiranose, \*\*\* Manopiranose.

Karacsnyoni & Kuniak (1994) isolaram de *P. ostreatus* um polissacarídeo extracelular, denominado pleurana. Este se apresentou constituído por cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -Glcp-(1→3), sendo parte destas substituídas em O-6 por ramificações de  $\beta$ -Glcp que se encontram a cada quatro unidades da cadeia principal. Yoshioka *et al.* (1985) já haviam identificado um polissacarídeo semelhante, porém este apresentou ramificações em O-6 por terminais não redutores de  $\beta$ -Glcp.

Santos-Neves *et al.* (2008) descreveram a caracterização química de um novo  $\beta$ -glucano solúvel em água, extraído do corpo de frutificação *P. florida*. As análises demonstraram se tratar de uma glucana ramificada, com cadeia principal constituída por unidades de  $\alpha$ -D-Glcp-(1→3), parcialmente substituídas em O-6 por unidades simples de  $\beta$ -D-Glcp e, em menor proporção, por cadeias laterais constituídas por unidades de  $\beta$ -D-Glcp com ligações do tipo (1→3).

Rosado *et al.* (2003) identificaram heteropolissacarídeos em *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* variedade *florida* e *P. ostreatus*, denominadas de heterogalactanas, nos quais a cadeia principal consistiu de unidades de  $\alpha$ -D-Galp e 3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp unidas por ligações (1→3), parcialmente substituídas em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-Manp.

Rout *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram outra heterogalactana de *P. ostreatus* variedade *florida*, porém esta apresentou cadeia principal formada de unidades alternadas de  $\alpha$ -D-Galp e  $\beta$ -D-Galp com ligações (1→6), com unidades de  $\alpha$ -D-Galp substituídas em O-2 e O-4 por  $\beta$ -D-Manp e  $\alpha$ -D-Glcp, respectivamente.

Pramanik *et al.* (2005) investigaram a estrutura de um polissacarídeo solúvel em água (Fr. II), isolado do extrato aquoso de *P. sajor-caju*, constituído de D-glucose, D-galactose e D-manose em proporção molar de 1:1:1, como mostra a figura 4a. Outra glucana solúvel em água foi isolada do corpo de frutificação de *P. sajor-caju* (Fr. I) por Pramanik *et al.*, (2007) (figura 4b). Roy *et al.* (2008) isolaram outro polissacarídeo do extrato aquoso do corpo de frutificação de *P. sajor-caju* cultivado no Japão. Um polissacarídeo solúvel em água, constituído de D-glucose e D-galactose (figura 4c) na proporção molar de 3:1 foi identificado.

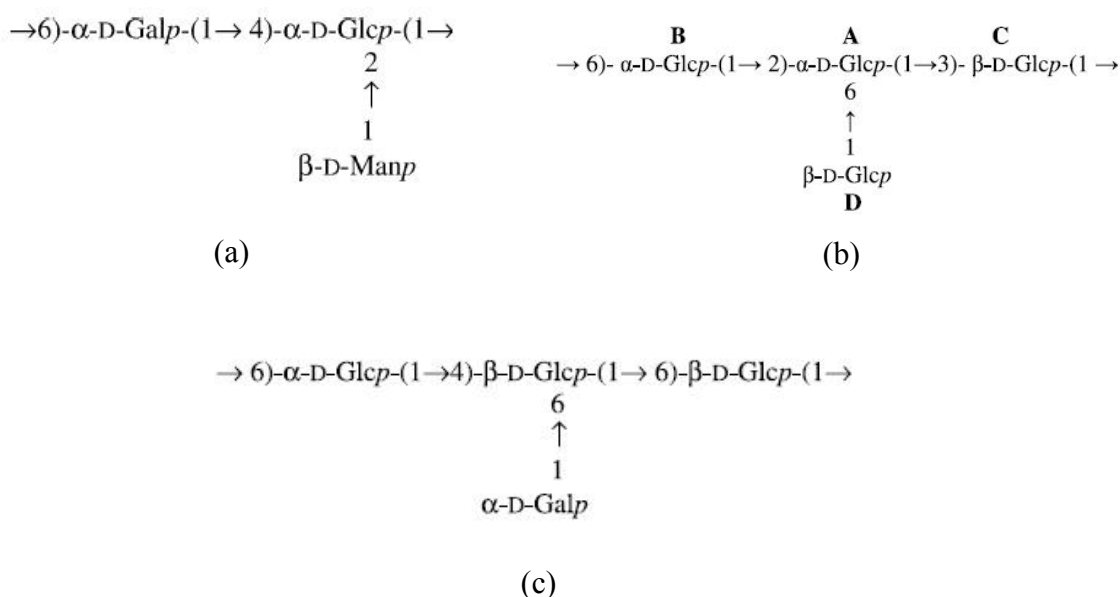


Figura 4 – (a) Estrutura do polissacarídeo isolado do extrato aquoso de *P. sajor-caju* por Pramanik *et al.* (2005) (b) Estrutura do polissacarídeo isolado do corpo de frutificação de *P. sajor-caju* por Pramanik *et al.* (2007). (c) Estrutura do polissacarídeo isolado de *P. sajor-caju* por Roy *et al.* (2008).

### 2.3 PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DOS FUNGOS

Fortes & Novaes (2006) relatam que os mecanismos de ação das substâncias bioativas presentes nos cogumelos não estão completamente esclarecidos na literatura, mas evidências científicas sugerem que essas substâncias são capazes de modular a carcinogênese nos estágios de iniciação, promoção e progressão, promovendo benefícios aos portadores de diversos tipos de câncer, principalmente através da estimulação do sistema imunológico, podendo ser utilizada como coadjuvante na terapia contra o câncer.

Estudos de Novaes *et al.* (2007) sobre os efeitos nutricionais e farmacêuticos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* indicaram melhora no prognóstico de pacientes com câncer. Nesse contexto, a espécie *Agaricus blazei* tem sido tradicionalmente

utilizada na prevenção de doenças como câncer, diabetes, hiperlipidemia, arterioesclerose e hepatite crônica.

Takaku *et al.* (2001) estudaram a atividade antitumoral de diferentes frações lipídicas extraídas do corpo de frutificação de *A. blazei*, substância determinada como sendo o ergosterol. Os extratos solúveis e insolúveis foram administrados em camundongos machos de 6 semanas (linhagem ICR) e fêmeas de 5 semanas (linhagem C57BL/6), via oral, na dose de 800 mg kg<sup>-1</sup> da massa corporal do animal, durante 20 dias. A administração da fração insolúvel do extrato com n-hexano, fração solúvel da extração com acetona e extrato clorofórmio/metanol, promoveram redução de 90,1%, 86,6% e 77,5%, respectivamente, sobre o Sarcoma 180 (S180).

Lee *et al.* (2003) também estudaram a inibição do crescimento do S180 inoculado em camundongos machos (linhagem ICR e “Athymic KSN nude) de 5 semanas, através da administração oral de extratos aquosos de *A. blazei* (linhagem H1), nas doses de 100 e 300 mg kg<sup>-1</sup> no período de 10, 17 e 24 dias de tratamento, e constataram a inibição do crescimento do S180 *in vivo*, propondo que este extrato contém substâncias bioativas com efeitos antitumorais e moduladores do sistema imunológico.

Fan *et al.* (2007), ao testarem a atividade antitumoral de extratos do caldo de cultivo de *A. brasiliensis*, em camundongos Swiss albinos fêmeas de 4 semanas, na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> do extrato, com administração intra-peritoneal, durante 10 dias consecutivos, obtiveram 72,19% de inibição do desenvolvimento do S180, sendo que 50% dos camundongos apresentaram redução total do tumor em relação ao grupo controle.

Nakamura *et al.* (2004) avaliaram a atividade antitumoral de frações extraídas do micélio de *Phellinus linteus* sobre o S180, em camundongos fêmeas livres de patógenos (SPF), de 4 semanas, com tratamento oral de 16 vezes em 33 dias, após a indução tumoral. Obtiveram de 40 a 81,6% de inibição do crescimento do S180. A fração que proporcionou maior inibição foi a FIII-1, que apresentou na sua estrutura química 39,3% de açúcar e 49,4% de proteínas, sendo que os monossacarídeos constituintes foram frutose, xilose, manose, glicose e galactose. Estes autores sugerem ainda que a principal glucana encontrada no complexo glucana-proteína foram cadeias simples de  $\alpha$ -1,3-glucana.

Huang *et al.* (2007) observaram que polissacarídeos solúveis em água, extraídos do micélio de *Poria cocos*, exibiram forte ação antitumoral, com 54,4% de inibição sobre o S180 implantado em camundongos machos BALB/c de 8 semanas (peso de 20 g), além de 81% de inibição de células leucêmicas HL-60 *in vitro*.

A tabela 2, obtida de Moradali *et al.* (2007), apresenta o efeito inibitório do crescimento de dois tipos de tumores (S180 e Ehrlich) por extratos aquosos de macrofungos em estudos clínicos e experimentais.

Tabela 2 – Efeito inibitório (%) do crescimento de tumores por extratos aquosos a quente de algumas espécies de macrofungos.

Espécies	S-180 (%)	Tumor de Ehrlich (%)
<i>Auricularia aucularia</i>	70-90	60-80
<i>A. delicate</i>	42-70	80
<i>A. mesentérica</i>	42-60	60
<i>Tremella sp.</i>	60-100	70-100
<i>Phlogiotis helvelloides</i>	100	100
<i>Tremellodon gelationsum</i>	90	90
<i>Cantharellus sp.</i>	60-100	60-90
<i>Craterellus sp.</i>	60-90	60-90
<i>Clavaria sp.</i>	60-90	60-100
<i>Ramaria formosa</i>	60-70	60-70
<i>Hydnum sp.</i>	70	90
<i>Polyporus occidentalis</i>	80	100
<i>P. umbellatus</i>	70	-
<i>Ganoderma applanatum</i>	64,9	-
<i>G. tropicum</i>	70	-
<i>G. tsugae</i>	77,8	-
<i>Armillariella mellea</i>	70	80
<i>Clitocybe fragrans</i>	70-80	70-80
<i>Flammulina velutipes</i>	81-100	80
<i>Lepista nuda</i>	90	100
<i>Mycena pura</i>	60	70
<i>Tricholoma gambosum</i>	70-90	70-90
<i>Buletus edulis</i>	100	90
<i>Agaricus bisporus</i>	90	100
<i>Coprinus atramentarius</i>	100	100
<i>Pholiota nameko</i>	100	100

( - ) Dados não apresentados pelo autor.

Fonte: Moradali *et al.* (2007).

### 2.3.1 Propriedades antitumorais de fungos do gênero *Pleurotus*

Mizuno & Zhuang (1995) extraíram polissacarídeos de corpos frutíferos frescos de *P. sajor-caju*, sendo que cinco extratos apresentaram atividade antitumoral contra o S180 em camundongos. Dos polissacarídeos encontrados com atividade antitumoral, os componentes xiloglucana e manogalactana, associados a proteínas, faziam parte da fração solúvel em água e a glucoxilana, associada ou não à proteína, da parte insolúvel.

Wang *et al.* (2000) extraíram lectinas de corpo de frutificação de *P. ostreatus*, que apresentaram atividade antitumoral *in vivo* sobre o S180 em camundongos machos ICR, na dose de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , com administração intraperitoneal por 20 dias consecutivos. A inibição do crescimento do S180 foi de 88,46%. Neste estudo também observou-se o aumento da sobrevida e do peso dos camundongos.

Sousa *et al.* (2004) avaliaram a atividade antitumoral de frações solúveis em água obtidas do corpo de frutificação de *P. ostreatoroseus* e obtiveram 41,96% de redução no crescimento do S180 em camundongos Swiss albinos machos (entre 45 e 60 dias), com duas doses de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  em intervalo de 7 dias, via intraperitoneal.

Zhang *et al.* (2004) extraíram polissacarídeos solúveis em água do esclerócio de *P. tuber-regium*, que exibiram ação antitumoral *in vivo* sobre células de S180 induzidas em camundongos machos BALB/c (8 semanas) e *in vitro* sobre células do tumor HI-29, por indução do processo de apoptose celular. A dose administrada via intraperitoneal, para a avaliação antitumoral sobre S180 foi de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  por 10 dias consecutivos. Dentre os polissacarídeos isolados, dois proporcionaram inibição de 65,4% e 55,3% sobre o crescimento de S180. Ainda, do esclerócio da mesma espécie fúngica, Zhang *et al.* (2006) isolaram um polissacarídeo, também solúvel em água e em seguida o modificaram pelo processo de carboximetilação. Esta nova molécula inibiu a proliferação de células do tumor de mama MCF-7 e induziu apoptose.

Três frações de proteoglicanas (frações I, II e III) isoladas da biomassa micelial de *P. ostreatus* por Sarangi *et al.* (2006) tiveram seus efeitos imunomodulatório e antitumoral comprovados. As frações I, II e III administradas via intraperitoneal, na dose de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , durante 6 dias consecutivos, após a indução tumoral intraperitoneal, em camundongos Swiss albinos (6 a 8 semanas), reduziram o número de células do S180 (tumor ascítico) em 48,43%, 76,94% e 63,7%, respectivamente, e aumentaram o número de células Natural Killer (NK) e macrófagos.

Lavi *et al.* (2006) examinaram a atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica de extratos do micélio de *P. ostreatus*, obtidos por meio de cultivo submerso, sobre células cancerosas do cólon (HT-29) *in vitro*. A fração extraída foi isolada e caracterizada quimicamente como uma glucana de baixo peso molecular. Os resultados revelaram que o glucano de baixo peso molecular demonstrou incidência direta sobre as células cancerosas HT-29 por intermédio da regulação da expressão de proteínas relacionadas a apoptose, indução de morte celular programada e inibição da proliferação.



Li *et al.* (2008) isolaram uma lectina do corpo de frutificação de *P. citrinopileatus* e avaliaram várias atividades biológicas, tais como: atividade antitumoral, inibição da transcriptase reversa (HIV-1) e atividade antifúngica. Obtiveram 80% de inibição do crescimento do S180 com a dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> de animal, administrado via intraperitoneal durante 20 dias. Observaram também que a lectina inibiu a transcriptase reversa HIV-1 e que não apresentou atividade antifúngica.

Wasonga *et al.* (2008) avaliaram a atividade anticarcinogênica de extratos de *P. pulmonarius* sobre o carcinoma hepatocelular em camundongos. Os polissacarídeos extraídos dos corpos de frutificação secos foram adicionados a ração na proporção de 1:4 (m/m). Os extratos adicionados a dieta adiaram a progressão da carcinogênese, sugerindo que estes extratos podem ser úteis como adjuvantes nas terapias convencionais do câncer.

Wolff (2007) estudou a capacidade antitumoral de substâncias bioativas de *P. ostreatus* oriundas dos corpos de frutificação e do caldo obtido do cultivo submerso sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e o S180, em camundongos albinos Swiss fêmeas (25 ± 5 g), com dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> (via intraperitoneal, gástrica e oral), por 6 dias consecutivos. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se o tratamento via intraperitoneal. Obteve-se a inibição de 76% e 72%, para TAE e S180, respectivamente, quando utilizou-se o extrato do caldo de cultivo de *P. ostreatus*.

Tao *et al.* (2009) extraíram duas frações de complexos proteína-polissacarídeos de esclerócio de *P. tuber-regium* que, em seguida, foram modificadas quimicamente por processos de carboximetilação e sulfatação. Os resultados mostraram que todos os complexos proteína-polissacarídeos, nativos e derivados, exibiram potente atividade antitumoral *in vitro* sobre S180, provavelmente devido a sua solubilidade em água, sendo que os derivados sulfatados S-TM1 e S-TM2 em alta dose, apresentaram atividade antitumoral de 51,2% e 43,2% respectivamente, valores ligeiramente superiores ao observado com o controle (5-Fluorouracil), que foi de 35%. Além disso, os derivados sulfatados S-TM1 e S-TM2 apresentaram taxa de inibição 37% e 18%, respectivamente, maiores para a proliferação de células de S180 do que os derivados carboximetilados C-TM1 e C-TM2.

Tong *et al.* (2009) extraíram um polissacarídeo solúvel em água, denominado de POPS-1, do corpo de frutificação de *P. ostreatus*, que apresentou ação altamente citotóxica para células do tumor de Hela *in vitro*, reduzindo em 60 % o número das células tumorais, quando as células foram tratadas com doses de 200 e 400 µg mL<sup>-1</sup> do polissacarídeo isolado.

Dalonso *et al.* (2010) pesquisaram a capacidade antineoplásica das frações FI, FII, FIII-I e FIII-II extraídas do corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. Seus

estudos revelaram que duas frações (FI e FII) reduziram em 85% o número de células do Tumor Ascítico de Ehrlich em camundongos Swiss albino fêmeas (25 a 45 g), tratados por via intraperitoneal, com dose de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , por 6 dias consecutivos. As frações FI e FII foram caracterizadas em termos de composição monossacarídica, tendo apresentado: 63,9% e 71,4% de glicose; 23,9% e 15,5% de galactose; 12,0% e 4,2% de manose para FI e FII, respectivamente, além de proteínas (11,3% e 4,2% para a FI e FII, respectivamente).

De Barba (2010) estudou o potencial antitumoral de extratos do caldo de cultivo de *P. djamor*, obtidos a partir da precipitação, utilizando etanol ou acetona como agente precipitante. O modelo tumoral utilizado foi o S180, com administração i.p. dos extratos obtidos, com período de tratamento de 10 dias consecutivos, após a indução tumoral, utilizando as doses de 3, 10, 30 e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . Melhores resultados (60%, 83%, 94% e 64% de redução tumoral para as doses de 3, 10, 30 e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente) foram obtidos com extrato etanólico. Segundo a autora, o uso de acetona no processo de precipitação não é indicado porque, apesar da substância ter proporcionado redução tumoral (entre 55 e 93%, dependendo da dosagem), ocasionou efeito nocivo sobre os animais saudáveis.

## 2.4 SEPARAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos fúngicos podem ser extraídos e isolados da parede celular do corpo de frutificação (DONG *et al.*, 2002; ALQUINI *et al.*, 2004; PRAMANIK *et al.*, 2005; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008), do micélio (SARINGI *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007), do esclerócio (ZHANG *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2009) e também do caldo de cultivo de células em processos submersos (ROSADO *et al.*, 2002; KOMURA *et al.*, 2010).

Segundo Barbosa *et al.* (2004) os polissacarídeos extracelulares (EPS) são recuperados do meio de cultivo por centrifugação, filtração, agentes precipitantes de EPS, diálise e liofilização.

O etanol é um dos agentes precipitantes mais utilizados (POKHREL & OHGA, 2007; RUBEL, 2006), embora se observe a utilização de outros agentes precipitantes, como acetona (MAZZIERO *et al.*, 1999; RUBEL, 2006) e metanol (JOSE *et al.*, 2004; LAKSHMI *et al.*, 2006).

Segundo Rubel (2006) para a extração de polissacarídeos do corpo de frutificação é necessário proceder a secagem e trituração do corpo de frutificação, remoção de lipídeos, extração com água, remoção de proteínas e impurezas, precipitação com metanol ou etanol, centrifugação e/ou filtração e, em seguida, purificação do sedimento. O mesmo autor ainda

relata que para a extração de polissacarídeos obtidos por cultivo submerso, primeiro separa-se o micélio do caldo de cultivo por centrifugação ou filtração. Para a obtenção do EPS, o caldo de cultivo é previamente reduzido a  $\frac{1}{4}$  de seu volume por evaporação a baixa pressão e, em seguida, o caldo de cultivo reduzido é adicionado de álcool etílico ou acetona (1:4), sendo o EPS precipitado e separado por centrifugação.

Para a obtenção do IPS (polissacarídeos intracelulares), o micélio é primeiramente tratado com etanol para remoção dos lipídeos, sendo, em seguida, adicionado de água, triturado e fervido por aproximadamente 2 h. A mistura micelial é filtrada e o sobrenadante é precipitado com álcool etílico ou acetona (1:4), sendo o IPS separado por centrifugação. Baixas temperaturas favorecem a precipitação dos polissacarídeos, de forma que após adição de éter ou acetona, é aconselhável deixá-los por 12 h à temperatura de refrigeração (4°- 8° C). Após a recuperação, o precipitado é tratado com solventes orgânicos (éter, acetona), por meio de sucessivas etapas de centrifugação, e seco em estufa a 50°C (RUBEL, 2006).

Pokhrel & Ohga (2007) propuseram uma metodologia para obtenção de polissacarídeos do caldo de cultivo e da biomassa micelial de *Lyophyllum decastes*. O caldo de cultivo é separado da biomassa micelial por centrifugação (10.000g por 20 minutos) e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm. Em seguida, o filtrado é adicionado de etanol 95%, agitado vigorosamente e mantido “overnight” a 4°C. O EPS precipitado é centrifugado (10.000 g por 20 minutos) e o sobrenadante descartado. Repete-se a adição de etanol e a centrifugação, sendo o precipitado liofilizado. O micélio é liofilizado logo após ser lavado com água destilada e, em seguida, ressuspenso em água destilada e aquecido a 80°C por 3-4 horas sob agitação de 100 rpm. Após, é filtrado em membrana de 0,45µm e concentrado a vácuo. Quatro volumes de etanol são adicionados sob agitação vigorosa e a mistura é mantida “overnight” a 4°C. O IPS precipitado é recolhido por centrifugação (10.000 g por 20 minutos), lavado com etanol, novamente centrifugado e o precipitado é liofilizado.

#### **2.4.1 Separação de polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus***

Diferentes metodologias têm sido empregadas por diversos autores para a obtenção de polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus*, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Métodos utilizados para a obtenção de polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus*.

Espécie	Material	Metodologia	Autor (es)
<i>P. eryngii</i> , <i>P. ostreatoroseus</i>	Corpo de frutificação	Material liofilizado, deslipidificado com solvente clorofórmio:metanol (2:1) a 60°C por 3 h (3x), adição de metanol:água (4:1) a 60°C por 3h (3x), fervura com água por 6 h (6 x), precipitação com etanol (3:1), diálise (48h), congelamento, dissolução em água e centrifugação.	CARBONERO <i>et al.</i> (2006)
<i>P. florida</i>	Corpo de frutificação	Material seco (45-50°C por 48 horas), extração com éter de petróleo em Soxhlet, deslipidificação com metanol.	JOSE <i>et al.</i> (2006)
<i>P. ostreatus</i>	Corpo de frutificação	Material seco, dois tipos de extração: com éter de petróleo (20-80°C) em Soxhlet (2 h) e extração com acetona 80% em Soxhlet (2 h), evaporação dos solventes.	IWALOKUN <i>et al.</i> (2007)
<i>P. sajor-caju</i>	Corpo de frutificação	Material triturado, fervura aquosa por 8 h, filtração, centrifugação (8000 rpm, 45 min, 4°C), precipitação com etanol (1:5) “overnight” a 4°C, centrifugação, precipitação com etanol (4x), liofilização, diálise (4 h), liofilização.	ROY <i>et al.</i> (2008)
<i>P. ostreatus</i>	Caldo de cultivo	Concentração com evaporação a baixa pressão, precipitação com etanol 95% (1:1) “overnight” a 4°C, centrifugação a 5000 rpm (30 min), precipitação com etanol 95% (1:1) “overnight” a 4°C, centrifugação, liofilização.	REFAIE <i>et al.</i> (2009)
<i>P. ostreatoroseus</i>	Caldo de cultivo	Extração aquosa em água fervente (100°C, 3 h), filtração (3x), congelamento-descongelamento, centrifugação, congelamento-descongelamento.	ROSADO <i>et al.</i> (2002)
<i>P. tuber-regium</i>	Esclerócio, micélio	Material seco, deslipidificado com éter (esclerócio) e acetona (micélio) por 4 horas, adição de solução salina, fervura (100°C, 3 h), ultrassom (2 h), centrifugação, diálise (2 dias) e liofilização.	ZANG <i>et al.</i> (2004)
<i>P. ostreatus</i>	Biomassa micelial	Maceração do micélio seco, centrifugação (8000 rpm, 15 min), sobrenadante submetido a precipitação com etanol (1:3, extrato:etanol) “overnight” a 4°C, centrifugação, dissolução em PBS, centrifugação e diálise.	SARANGI <i>et al.</i> (2006)

## 2.5 CULTIVO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE EPS

### 2.5.1 Composição do meio de cultivo

As necessidades nutricionais dos fungos, segundo Walker & White (2005) são relativamente simples. A maioria das espécies é capaz de sobreviver bem em condições aeróbias, desde que os macro e micronutrientes sejam fornecidos. A tabela 4 apresenta os nutrientes necessários e suas respectivas funções celulares.

Por serem quimiorganotróficos, necessitam de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os açúcares são amplamente utilizados para o crescimento dos fungos, podendo variar de monossacarídeos (glicose, galactose, frutose, manose) a polissacarídeos (celulose, hemicelulose, quitina, inulina etc). Não são fixadores do nitrogênio e, portanto, há necessidade de se fornecer compostos contendo nitrogênio, tanto na forma inorgânica como orgânica. Geralmente, o sulfato de amônio é utilizado como fonte de nitrogênio em meio de cultivo para fungos (WALKER & WHITE, 2005).

Tabela 4 – Macro e micronutrientes requeridos pelas células fúngicas.

<b>Elementos</b>	<b>Fontes</b>	<b>Função celular</b>
<b>Carbono</b>	Açúcares	Elemento estrutural da célula fúngica em combinação com oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. Fonte de energia.
<b>Hidrogênio</b>	Prótons de ambientes ácidos	Transmembrana - força motriz fundamental para a nutrição de fungos. Intracelular - pH ácido (em torno de 5-6) necessários para metabolismo de fungos.
<b>Oxigênio</b>	Ar, O <sub>2</sub>	Substrato para respiração e outras funções oxidativas. Essencial para síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol.
<b>Nitrogênio</b>	Sais NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , uréia, aminoácidos.	Estrutural e funcionalmente como nitrogênio orgânico de aminoácidos, proteínas e enzimas.
<b>Fósforo</b>	Fosfatos	Transdução de energia, formação de ácidos nucléicos e estrutura da membrana.
<b>Potássio</b>	Sais K <sup>+</sup>	Balanço iônico, cofator enzimático.
<b>Magnésio</b>	Sais Mg <sup>2+</sup>	Cofator enzimático, estrutura celular e organelas.
<b>Enxofre</b>	Sulfatos, metionina	Aminoácidos sulfurados e vitaminas.
<b>Cálcio</b>	Sais Ca <sup>2+</sup>	Possível segundo mensageiro nos sinais de transdução.
<b>Cobre</b>	Sais cúpricos	Pigmentos Redox.
<b>Ferro</b>	Fe <sup>3+</sup>	Proteína Heme, Citocromo.
<b>Manganês</b>	Sais Mn <sup>2+</sup>	Cofator enzimático.
<b>Zinco</b>	Sais Zn <sup>2+</sup>	Cofator enzimático.
<b>Níquel</b>	Sais Ni <sup>2+</sup>	Cofator da enzima urease.
<b>Molibdênio</b>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Metabolismo do nitrato, vitamina B <sub>12</sub> .

Fonte: Walker & White (2005).

Segundo Barbosa *et al.* (2004) a composição do meio e as condições de cultivo interferem diretamente na produção de polissacarídeos extracelulares (EPS). Na produção de EPS por fungos, deve ser considerada a linhagem escolhida como também o seu meio ambiente natural para adequar, em laboratório, o meio de cultivo em termos de características nutricionais. Segundo os autores, os parâmetros que interferem na produção dos polissacarídeos extracelulares por fungos são as fontes de carbono, as fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, a aeração, a agitação, os microelementos e os fatores de crescimento (as vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos etc).

Com base nesta evidência, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de determinar as melhores condições de cultivo, bem como definir as melhores fontes de carbono, nitrogênio e minerais e suas respectivas concentrações iniciais para a produção de EPS e biomassa micelial. A glicose e a sacarose são as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de EPS fúngicos, sendo que, as concentrações utilizadas destes açúcares variam bastante em função do microrganismo empregado, indicando a importância da adequação das concentrações iniciais do substrato para cada cepa estudada (CUNHA *et al.*, 2008).

Segundo Barbosa *et al.* (2004), níveis elevados de nitrogênio reprimem a síntese de EPS em fungos, sendo os sais de amônio e nitrato (inorgânicos) e o extrato de levedura (orgânico) os mais utilizados.

Cunha *et al.* (2008) avaliaram a influência da concentração inicial de glicose (20, 40 e 50 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultivo sobre a produção de EPS e biomassa fúngica. Seus estudos revelaram que a concentração inicial de glicose teve grande influência na concentração final e na produtividade do biopolímero. Concentrações iniciais mais altas de glicose contribuíram para maior produção do biopolímero, maior produtividade volumétrica e maiores taxas de assimilação do substrato. Verificaram também que, em condições de limitação da fonte de carbono no meio de cultivo, ocorreu o consumo do biopolímero. A produção final de EPS variou de 2,62 g L<sup>-1</sup> para 4,32 g L<sup>-1</sup> quando a concentração inicial de glicose variou de 20 g L<sup>-1</sup> para 50 g L<sup>-1</sup>.

Nos estudos de otimização da composição do meio de cultivo para a produção de EPS por *Agaricus brasiliensis* em cultivo submerso, realizados por Fan *et al.* (2007), a melhor fonte de carbono foi a sacarose e a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura. Estes estudos demonstraram que concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,6 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,3 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> são as mais apropriadas para a produção de EPS por *A. brasiliensis*.

Pokhrel & Ohga (2007) investigaram a influência de fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose, lactose, maltose, sorbitol e xilose) e fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, polipeptona, sulfato de amônio, fosfato de amônio, tartarato de amônio, cloreto de amônio e nitrato de amônio) sobre a produção de EPS e biomassa por *Lyophyllum decastes* em frascos agitados. Os resultados demonstraram que 3% de glicose proporcionou maiores concentrações de EPS ( $1,65 \text{ g L}^{-1}$ ) e biomassa ( $6,36 \text{ g L}^{-1}$ ) e a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura (1%), com concentração de  $1,76 \text{ g L}^{-1}$  de EPS e  $7,03 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa.

Papinutti (2010) estudou diferentes condições de cultivo para a produção de EPS por *Ganoderma lucidum*. Dentre as fontes de carbono testadas a celulose e a glicose foram as mais eficientes para a produção de EPS ( $0,55 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,49 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente). Posteriormente, foram testadas as concentrações de extrato de malte e glicose, sendo que a concentração máxima de EPS foi alcançada em 21 dias utilizando  $60 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de malte e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Nesta etapa, o autor relata a produção de duas frações de EPS, sendo uma solúvel em água e a outra insolúvel.

O cultivo submerso de *P. tuber-regium* foi investigado por Wu *et al.* (2003). Os autores observaram que, quando se utilizava a glicose e a frutose como fonte de carbono, o crescimento micelial apresentava uma fase de latência menor do que quando se utilizava o amido de milho. O extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio, sendo que a máxima eficiência de bioconversão encontrada foi de 40%.

Wu *et al.* (2004), continuando seus estudos, investigaram a influência da composição do meio de cultivo em relação a proporção de carbono e nitrogênio, sobre o crescimento micelial de *P. tuber-regium*. Observaram que as maiores concentrações de biomassa ( $0,8$  a  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) foram obtidas com as relações C:N de 18:1 e 36:1, respectivamente, sendo que as relações maiores entre C:N diminuíram em duas vezes a concentração de fibras dietéticas na biomassa e aumentaram a quantidade de glucanos.

Confortin *et al.* (2008) otimizaram o meio de cultivo de *P. sajor-caju* em frascos agitados, alterando as concentrações de sulfato de amônio, peptona de soja e extrato de levedura com o objetivo de aumentar a produção de biomassa. A utilização do meio de cultivo otimizado e  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, resultaram em  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa. Em biorreator de 5 L, sob agitação, utilizando  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose ou de sacarose, as concentrações de biomassa foram de  $8,18$  e  $5,94 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. No meio com glicose o maior rendimento foi de  $0,82 \text{ g g}^{-1}$  e produtividade em biomassa de  $0,085 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A maior concentração de EPS ( $1,58$

g de massa seca L<sup>-1</sup>) foi obtida quando utilizou-se a sacarose como fonte de carbono ao invés da glicose (1,18 g de massa seca L<sup>-1</sup>).

Gern *et al.* (2008) avaliaram a influência de duas concentrações de glicose (20 e 40 g L<sup>-1</sup>) e três fontes de nitrogênio (extrato de levedura, água de maceração de milho e sulfato de amônio) sobre a produção de biomassa e de polissacarídeos extracelulares por *P. ostreatus* em frascos agitados. Observaram que os melhores resultados, em termos de produtividade máxima em biomassa (1,16 g L<sup>-1</sup> dia) e produtividade global em polissacarídeos (17,12 mg L<sup>-1</sup> dia), foram obtidos quando utilizou-se 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 40 g L<sup>-1</sup> de glicose. Em termos de concentração máxima de biomassa, o melhor resultado (29,64 g L<sup>-1</sup>) foi obtido quando 20 g L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 40 g L<sup>-1</sup> de glicose foram utilizados.

Papaspyridi *et al.* (2010) buscaram otimizar a produção de biomassa com objetivo de aumentar a síntese de glucanas e fibras dietéticas em cultivo submerso por *P. ostreatus*. Inicialmente 95 fontes de carbono foram investigadas quanto à assimilação de carbono e atividade mitocondrial utilizando-se a análise Biolog FF em microplacas. Dentre as 95 fontes de carbono investigadas, oito delas foram testadas em frascos agitados (frutose, glicose, xilose, manose, maltose, sucrose, trealose e rafinose). O efeito de diferentes fontes de nitrogênio (asparagina, triptofano, glicina, peptona, água de maceração de milho, extrato de malte, extrato de levedura, caseína hidrolisada e grão de soja) também foi estudado. Após triagem, o meio de cultivo otimizado foi testado em biorreator de 20L utilizando-se 57 g L<sup>-1</sup> de xilose e 37 g L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho. Os autores obtiveram um alto rendimento em biomassa seca (39,2 g L<sup>-1</sup>) e os rendimentos em glucanas e em fibras dietéticas sobre a biomassa micelial seca foram de 140 ± 4 e 625 ± 9 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Borges (2009) avaliou a influência da concentração inicial de glicose (40 g L<sup>-1</sup> e 50 g L<sup>-1</sup>) e do pH (3,0 e 4,0), por meio de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, sobre a síntese de EPS por *P. djamor*. Os resultados revelaram que o aumento da concentração de glicose levou a um aumento no tempo de consumo do substrato, o qual refletiu negativamente nos valores de produtividade, porém, a análise de Pareto revelou que não houve influência significativa desse parâmetro sobre a concentração de EPS.

Estas exigências nutricionais de fungos são importantes não só para o sucesso de cultivos experimentais em laboratório, mas também para a otimização de processos industriais de produção (WALKER & WHITE, 2005).



### 2.5.2 Condições de cultivo

Além da composição do meio de cultivo, a aeração, a agitação e o pH são parâmetros que interferem diretamente na produção de EPS (BARBOSA *et al.*, 2004). Cunha *et al.* (2008) consideram que a viscosidade das soluções de EPS fúngicos variam de acordo com pH, temperatura, concentração do EPS, massa molar, solubilidade, além das características morfológicas dos fungos produtores.

Devido aos vários fatores de interferência na produção de EPS por microrganismos, diversos trabalhos vêm sendo realizados com o propósito de determinar a melhor condição para a produção de EPS fúngicos. Hwang *et al.* (2003) estudaram a influência de diferentes temperaturas e valores de pH sobre o cultivo de *Phellinus linteus* e verificaram que a temperatura de 30°C proporcionou os melhores valores para a produção de biomassa e EPS, sendo a maior concentração de EPS obtida (3,3 g L<sup>-1</sup>) quando se utilizou o valor de pH 4,0.

Xiao *et al.* (2006) avaliaram a influência do pH sobre a produção de biomassa e EPS por *Cordyceps jiangxiensis*. Os resultados mostraram que o pH 7,0 proporcionou maior concentração de biomassa (10,56 g L<sup>-1</sup>) e o pH 6,0 proporcionou a maior concentração de EPS (4,6 g L<sup>-1</sup>).

Pokhrel & Ohga (2007), além de estudarem as fontes de carbono e nitrogênio para obter maior produção de EPS e biomassa micelial por *Lyophyllum decastes*, estudaram também a influência do pH inicial em cultivos submersos sobre o crescimento e a produção de EPS. Testaram valores de pH inicial de 5 até 9 e observaram que pH entre 7 e 8 foram os que proporcionaram melhor produção de EPS (1,73 g L<sup>-1</sup>) e de biomassa (7,19 g L<sup>-1</sup>).

Fan *et al.* (2007) buscaram a otimização física do meio de cultivo com o objetivo de aumentar a produção de EPS por *A. brasiliensis* LPB3 em cultivo submerso. Os estudos revelaram que a temperatura de 30°C e pH de 6,1 foram as melhores condições para a maior produção de EPS. A produção máxima de EPS (382 mg L<sup>-1</sup>) foi obtida na condição estática, com agitação manual duas vezes por dia, durante uma semana de cultivo, com aumento de 78,62% em relação aos valores obtidos antes da otimização. No biorreator com aeração e agitação, a máxima concentração de EPS produzido foi de 321,2 mg L<sup>-1</sup>.

Wisbeck (2003) estudou a influência do pH e do K<sub>L</sub>a sobre a produção de biomassa e EPS por *Pleurotus ostreatus* e observou que, quando utilizou o pH 4,0 e K<sub>L</sub>a de 15 h<sup>-1</sup>, obteve concentração maior para biomassa (12,86 g L<sup>-1</sup>) e EPS (1,33 g L<sup>-1</sup>).

Utilizando a mesma espécie fúngica Gern *et al.* (2008), além de estudarem a composição do meio de cultivo para a produção de EPS, avaliaram também a condição de

$K_{La}$ . Os melhores resultados em termos de produção de biomassa (aumentar valor) e polissacarídeos (aumentar valor) foram alcançados quando o menor valor de  $K_{La}$  inicial ( $10,2 \text{ h}^{-1}$ ) foi utilizado.

O trabalho de Borges (2009), que investigou a influência do pH e da concentração de substrato sobre a produção de EPS por *P. djamor* mostrou que o pH 3,0 proporcionou um aumento de 110% na concentração de polissacarídeos extracelulares em relação ao pH 4,0. Os resultados obtidos revelaram que a concentração inicial de glicose de  $40 \text{ g L}^{-1}$  e pH 3,0 maximizaram os fatores de conversão de substrato em EPS ( $0,072 \text{ g g}^{-1}$ ) e em biomassa ( $0,244 \text{ g g}^{-1}$ ), assim como as produtividades máximas em EPS ( $11,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e em biomassa ( $32,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

## 2.6 O CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (BRASIL, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo 236.240 novos casos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (BRASIL, 2009).

Os agentes usualmente utilizados no tratamento do câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas, porém eles acarretam maior dano às células malignas do que às dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares (ALMEIDA, 2004). Segundo o autor existem quatro modalidades terapêuticas principais para o câncer (cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia biológica), sendo que a cirurgia é a mais definitiva, quando o tumor é localizado em condições anatômicas favoráveis. Em pequenos tumores sólidos, por exemplo, a cirurgia costuma ser definitiva e curativa, não causando efeitos colaterais indevidos.

A radioterapia tem como fundamento a destruição de células através da radiação ionizante, podendo ser usada para alívio do paciente de modo a melhorar a qualidade de vida,

diminuir o tamanho dos tumores, diminuir ou estancar hemorragias, ou atuar sobre outros sintomas, como a dor (ALMEIDA, 2004).

A quimioterapia consiste na administração de drogas químicas, que atuam interferindo diretamente no ciclo celular, bloqueando uma seqüência metabólica e com isso impedindo a divisão ou amadurecimento celular, levando a célula conseqüentemente à morte. A duração do tratamento depende basicamente de seu objetivo e da tolerância do paciente (FAUCI *et al.*, 1998).

A terapia biológica consiste na aplicação de agentes hospedeiros com origem no tumor, que são concebidos para criar uma resposta imune capaz de retardar ou eliminar o crescimento tumoral, empregando substâncias como interferon, interleucina-2, interleucina-4, fatores de crescimento hematopoiéticos (filgrastima), fator de necrose tumoral e vacinas bacterianas vivas BCG (RIEGER, 2000; BENJAMIN *et al.*, 2002).

No entanto, os tratamentos usuais do câncer são invasivos ao organismo e as tentativas de descoberta de medicamentos menos agressivos ainda estão em fase experimental (ALMEIDA, 2004). Os novos medicamentos, antes de chegarem ao mercado, passam por um longo caminho de testes começando, geralmente, pelo modelo animal (BRASIL, 2000)

### **2.6.1 Modelo de estudo tumoral**

Estudos pré-clínicos do câncer dividem-se em duas grandes categorias: os que utilizam transplante de células tumorais e aqueles em que os tumores surgem ou são induzidos no hospedeiro. A escolha do modelo animal depende da questão científica a ser investigada. Interações celulares e respostas imunes exigem animais imunocompetentes e sistemas singênicos, enquanto que o estudo de desenvolvimento do câncer ou quimioprevenção podem ser realizados utilizando modelos transgênicos ou de tumores induzidos quimicamente (WORKMAN *et al.*, 2010).

Segundo Workman *et al.* (2010) para os experimentos que envolvem transplante de células tumorais para camundongos ou ratos, sendo os transplantes mais comuns estabelecidos por via subcutânea, destacam-se como vantagens: a forma simples de avaliação de rotina de agentes anticancerígenos; ser de administração simples, exigindo anestesia somente no momento do transplantes (inoculação); e permitir um acompanhamento contínuo. Dentre as desvantagens são relatadas o raro desenvolvimento de metástases, a pouca vascularização do tumor com aparecimento de necrose central.

Conforme Zuckerberg (1973) o Sarcoma 180 – S180 (tumor de Crocker) foi descoberto pelo Dr. W. H. Woglom no Laboratório Crocker nos Estados Unidos em 1914. Foi isolado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo Swiss macho (*Mus musculus*) e sua manutenção é realizada por transplantes sucessivos.

Inicialmente o S180 foi considerado como um carcinoma (ZUCKERBERG, 1973) mas, posteriormente, verificou-se que se tratava de um sarcoma, pois as células tumorais não expressavam a laminina e, portanto, não tinham origem epitelial e sim conjuntiva (ASSEF *et al.*, 2002).

Segundo Oliveira-Júnior (2008) as células tumorais de S180 podem ser mantidas por meio de cultura celular (*in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (*in vivo*). Podem ser implantadas de duas formas, com células inoculadas na cavidade intraperitoneal (tumor ascítico) ou inoculadas subcutaneamente formando assim tumores sólidos. Zuckerberg (1973) relata que este tumor cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, com taxa de regressão natural de 8 a 10%. O desenvolvimento de ulcerações pode ocorrer a partir do 28º dia após a inoculação subcutânea, sendo o tempo de sobrevida de 28 a 30 dias.

Diversos autores tem utilizado S180 inoculado em camundongos (ZHANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005; SARANGI *et al.*, 2006; WASONGA *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2010) para avaliar a eficácia de polissacarídeos fúngicos sobre a regressão tumoral.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A figura 5a apresenta o esquema do delineamento experimental, referente ao estudo da composição do meio e condições de cultivo, utilizadas neste trabalho. Com o objetivo de maximizar a produção de EPS, partiu-se do meio POL, descrito na literatura (CAVAZZONI & ADAMI, 1992) para síntese de polissacarídeos. As concentrações de três componentes deste meio foram alteradas e avaliadas, em frascos agitados, com base num planejamento fatorial, resultando na definição do meio POL modificado. Este meio foi testado em biorreator de bancada em três diferentes condições de pH. Uma vez definido o valor de pH que proporcionava melhor produção de EPS, avaliou-se a influência de carbonato de cálcio sobre a síntese de EPS. Ainda buscando maximizar a síntese do produto desejado, avaliou-se o efeito de uma concentração de substrato três vezes superior àquela estudada até então, definindo-se, assim, a composição do meio de cultivo a ser utilizado para síntese de EPS por *P. sajor caju*.

O caldo de cultivo e a biomassa micelial obtidos do cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* foram separados por filtração para obtenção do EPS do caldo de cultivo e do IPS da biomassa micelial. Para a obtenção do IPS utilizou-se a metodologia descrita por Pokhrel & Ohga (2007) e José *et al.* (2004), sendo as substâncias resultantes denominadas de PM1 e PM2, respectivamente. Para obtenção do EPS utilizou-se a metodologia proposta por Pokhrel & Ohga (2007), sendo a substância denominada de PE1. A figura 5b apresenta o esquema do delineamento experimental dos testes para obtenção de EPS e IPS.

A fim de comprovar *in vivo* a eficácia do EPS e do IPS obtidos, foram conduzidos testes em camundongos inoculados com S180 e submetidos a tratamento pós-indução tumoral com quatro diferentes doses das substâncias teste. A figura 5c demonstra o esquema do delineamento experimental dos testes *in vivo*.

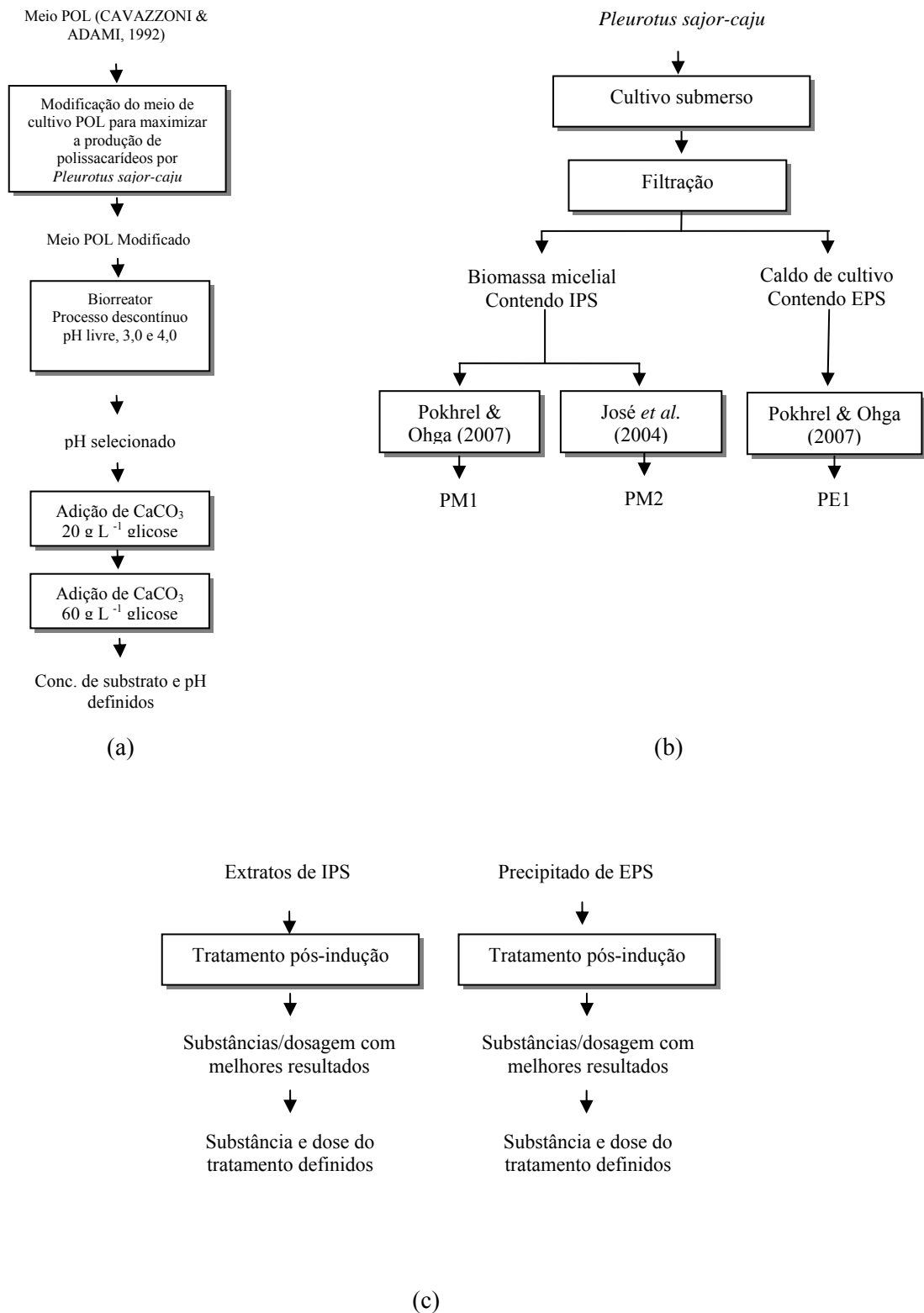


Figura 5 – a) Esquema do delineamento experimental para estudo da composição e do pH do meio de cultivo b) Esquema do delineamento dos testes para obtenção de EPS e de IPS c) Esquema do delineamento dos testes antitumoral *in vivo*.

## 3.2 PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM MEIO LÍQUIDO

### 3.2.1 Microrganismo e manutenção

O fungo utilizado para a produção das substâncias bioativas foi a espécie *Pleurotus sajor-caju* CCB 019, cedida pelo Centro de Cultivo de Basidiomicetos da Universidade de São Paulo. A linhagem foi cultivada em meio sólido TDA (Trigo Dextrose Ágar) (FURLAN *et al.*, 1997) e mantida sob refrigeração (4°C) e os repiques realizados a cada três meses.

### 3.2.2 Cultivo em fracos agitados: estudo da composição do meio de cultivo

Experimentos realizados anteriormente para o cultivo de *P. sajor-caju* em processo descontínuo, utilizando o meio POL proposto por Cavazzoni & Adami (1992), mostrou-se inviável, pois não foi possível conduzir o cultivo até o final, devido à formação de “pellets” miceliais grandes, não permitindo homogeneização do meio de cultivo. Devido a este fator, houve a necessidade de reformular o meio de cultivo POL original, alterando as concentrações iniciais das fontes de nitrogênio e estudando a influência destas fontes sobre a produção de EPS e biomassa micelial por *P. sajor-caju*.

Os experimentos visando ao estudo da composição do meio de cultivo foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de meio POL modificado de acordo com um planejamento fatorial  $2^3$  (Tabelas 5 e 6). Os meios foram inoculados com dois discos de ágar de 15mm de diâmetro contendo micélio fúngico. A composição base do meio POL foi: 2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH inicial de 6,5-7,0. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 120 min<sup>-1</sup>, a 30°C por 7 dias em incubadora CERTOMAT U (Figura 6). Os experimentos foram realizados em triplicata.

O meio POL original apresenta também na sua composição o carbonato de cálcio (1 g L<sup>-1</sup>), mas para os experimentos de estudo da composição do meio de cultivo, optou-se por não adicioná-lo, pois, devido ao pH inicial estar próximo a neutralidade, não possibilita a dissolução do carbonato de cálcio, deixando o meio de cultivo turvo, o que não permite a visualização de possíveis contaminações.

Tabela 5 – Desenho do planejamento fatorial  $2^3$  variando-se as concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona. Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada fator como inferior e superior, respectivamente.

Variáveis	Nível	
	+	-
Sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (g L <sup>-1</sup> )	5	2,5
Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	2	1
Peptona de soja (g L <sup>-1</sup> )	1	0,5

Tabela 6 – Composição do meio de cultivo POL modificado em termos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e peptona, definido por meio do planejamento fatorial  $2^3$ .

Experimentos	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	Peptona de soja (g L <sup>-1</sup> )
1*	5	2	1
2	5	2	0,5
3	5	1	1
4	5	1	0,5
5	2,5	2	1
6	2,5	2	0,5
7	2,5	1	1
8	2,5	1	0,5

\* Concentrações iniciais das fontes de nitrogênio do Meio POL proposto por Cavazzoni & Adami (1992).

Estes experimentos foram comparados com base no efeito da concentração de cada variável testada sobre a concentração de EPS e de biomassa resultante.



Figura 6 – Cultivo de *P. sajor-caju* em frascos Erlenmeyer.

### 3.2.3 Cultivo em biorreator

Os cultivos em biorreator foram realizados para a análise da influência do pH, do íons cálcio e da concentração da glicose inicial sobre a produção de EPS e biomassa micelial por *P. sajor-caju* em regime descontínuo. Os valores de pH e concentração de glicose inicial, a serem analisados foram determinados a partir de experimentos realizados pelo grupo de pesquisa (WISBECK, 2003; BORGES, 2009).



### 3.2.3.1 Preparo do pré-cultivo (inóculo)

O inóculo foi preparado em frascos de Duran de dois litros com duas saídas laterais, sendo uma superior (entrada de ar) e outra inferior (saída do meio). Os frascos contendo meio POL (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 L de água destilada) com 20 g  $\text{L}^{-1}$  de glicose e pH inicial de 6,5-7,0 (CAVAZZONI & ADAMI, 1992), foram inoculados com micélio de 7 dias, contido em uma placa de Petri (WISBECK, 2003), e incubados sob agitação de  $110 \text{ min}^{-1}$ , a  $30^\circ\text{C}$  em incubadora CERTOMAT U, por 6 dias (Figura 7).

Esta cultura foi utilizada para inocular o biorreator utilizando-se uma fração de inóculo de 10% (v/v).



Figura 7 - Imagem do pré-cultivo de *P. sajor-caju*.

### 3.2.3.2 Ensaio conduzidos em biorreator

Os experimentos foram realizados em regime descontínuo, em biorreator de mistura completa, modelo MD B. BRAUN, com dorna de vidro de capacidade útil de 5L e volume de trabalho de 4L. A Figura 8 apresenta o esquema de um biorreator de mistura completa.

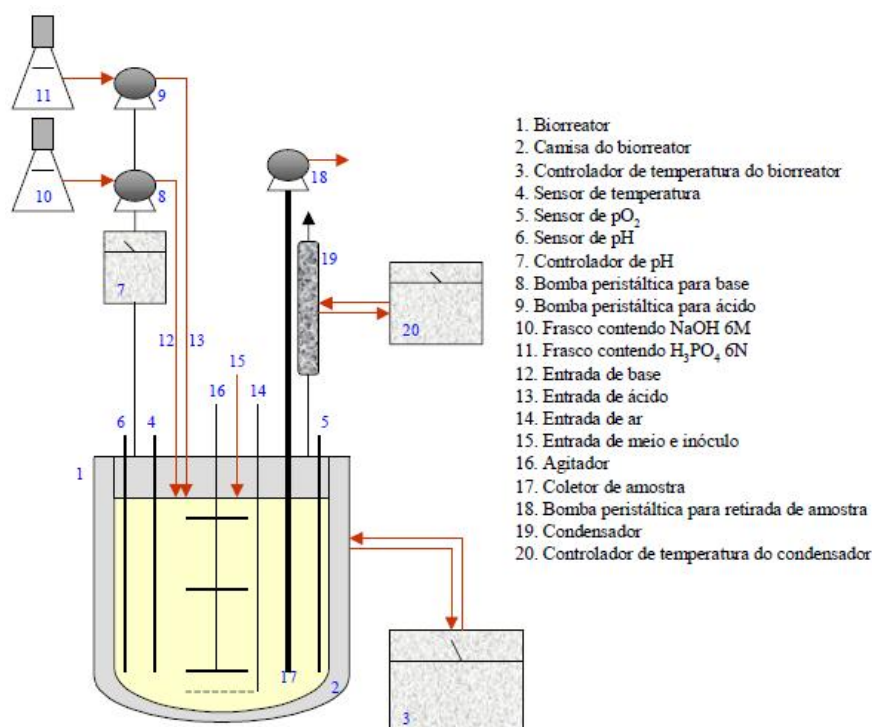


Figura 8 – Esquema de um biorreator de mistura completa.

Fonte: WISBECK, 2003.

Para a continuação dos experimentos utilizou-se o meio de cultivo POL modificado que proporcionou maior concentração de polissacarídeos extracelulares (EPS) dentre os meios descritos no planejamento fatorial no item 3.2.2.

A temperatura foi controlada em 30°C por meio de sensor de temperatura presente no biorreator. O controle do pH foi mantido pela adição automática de soluções de NaOH 6M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6N, tendo acoplado ao biorreator um sensor de pH HAMILTON modelo EASYFERM PLUS K8 325. O K<sub>L</sub>a inicial foi de 15h<sup>-1</sup> resultando em vazão de ar de 0,3 vvm e frequência de agitação de 350min<sup>-1</sup>. O sistema possui duas turbinas de 63 mm de diâmetro, com seis pás planas, estando a primeira turbina situada imediatamente acima do anel dispersor de ar e a segunda turbina a 8,75cm da primeira.

Inicialmente utilizou-se o cultivo em pH livre (evolução espontânea) com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose, sem adição de carbonato de cálcio. Posteriormente, realizou-se o cultivo com pH 3,0 e outro com pH 4,0 com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e sem carbonato de cálcio. Após definição do pH do meio de cultivo, realizou-se os cultivos com a adição de 1 g L<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose. E, por último, realizou-se o cultivo com o melhor valor de pH, com 1 g L<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio e 60 g L<sup>-1</sup> de glicose. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

No decorrer dos cultivos, foram retiradas amostras periodicamente para a análise de concentração celular, concentração de glicose e de EPS, como descrito no item 3.5. O volume de amostra foi correspondente a 20 mL. Os cultivos foram encerrados a partir do momento em que a concentração de polissacarídeos extracelulares atingiu seu valor máximo.

No cultivo descontínuo em biorreator foi avaliada a cinética do crescimento microbiano, de consumo de substrato e de síntese de polissacarídeos extracelulares (EPS). Verificou-se as condições que propiciaram produção máxima de EPS e de biomassa, bem como determinou-se os fatores de conversão de substrato em produto e em biomassa e as produtividades globais. Os métodos analíticos para o acompanhamento da cinética do processo, tais como a determinação das concentrações de polissacarídeos extracelulares (EPS), consumo de glicose e produção de biomassa foram descritos no item 3.5.

### 3.3 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *in vivo*

#### 3.3.1 Obtenção dos polissacarídeos

O caldo de cultivo e a biomassa obtidos dos cultivos com pH 4,0 (com e sem adição de carbonato de cálcio), foram separados por filtração em papel Whatmann n° 1. Os polissacarídeos provenientes da biomassa micelial foram denominados de polissacarídeos intracelulares (IPS) e aqueles provenientes do caldo de cultivo de polissacarídeos extracelulares (EPS). Estas substâncias foram utilizadas para o tratamento em *in vivo*.

##### 3.3.1.1 Métodos de obtenção dos polissacarídeos intracelulares (IPS)

Com o objetivo de identificar a melhor metodologia para a obtenção dos polissacarídeos intracelulares com maior atividade antitumoral, três diferentes métodos descritos na literatura foram testados.

###### 3.3.1.1.1 Método de extração segundo Pokhrel & Ohga (2007)

A biomassa micelial foi liofilizada (Liofilizador Terroni Fauvel LT 1000/8) e, em seguida, adicionou-se 500 mL de água destilada, sendo esta mistura aquecida a 80 °C por 4 horas sob agitação. Após aquecimento a solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm. O

filtrado foi concentrado a vácuo em rotavapor (Fisatom) e adicionado de etanol PA na proporção 1:4 (filtrado: etanol, v:v), agitado vigorosamente e mantido “overnight” a 4°C. Após, o precipitado formado (IPS) foi separado por centrifugação (5500 rpm por 20 minutos), em centrífuga da marca SIGMA 3K12, lavado com etanol PA e centrifugado novamente sob a mesma condição. O precipitado obtido foi liofilizado e mantido em frasco vedado, em temperatura ambiente até sua utilização. Esta substância foi chamada de PM1.

#### 3.3.1.1.2 Método de extração segundo Jose *et al.* (2004)

A biomassa micelial foi liofilizada e o material lipídico foi extraído em Soxhlet por processo de extração com éter de petróleo por 8-10 horas. O material isento de lipídeo foi adicionado de metanol PA e, após a evaporação do metanol, liofilizado e mantido em frasco vedado, em temperatura ambiente, até a sua utilização. Esta substância foi chamada de PM2. Segundo os autores esta técnica de extração permite a retirada do material lipídico.

#### 3.3.1.2 Métodos de precipitação dos polissacarídeos extracelulares (EPS)

Para a precipitação dos polissacarídeos extracelulares utilizou-se a metodologia proposta por Pokhrel & Ohga (2007), que consistiu em adicionar ao caldo de cultivo, isento de biomassa, etanol PA na proporção 1:4 (caldo de cultivo:etanol, v:v) e mantido “overnight” a 4°C. Após, o precipitado formado (EPS) foi separado por centrifugação, liofilizado e mantido em frasco vedado, em temperatura ambiente, até sua utilização. Esta substância foi chamada de PE1.

### 3.3.2 Teste antitumoral *in vivo*

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE (Anexo 1).

#### 3.3.2.1 Animais e manutenção

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), obtidos do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, com massa de  $30 \pm 5$  g, mantidos no laboratório de Tratamento Crônico da UNIVILLE durante todo o período de

desenvolvimento do experimento, com ração e água a vontade e fotoperíodo de 12h (VERÇOSA-JUNIOR *et al.*, 2006), a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

### 3.3.2.2 Células tumorais e manutenção

A linhagem de Sarcoma 180 foi obtida por doação da UNIVALI e mantida por transplantes seriados através de aplicações intraperitoneais semanais de suspensão tumoral em camundongos (PAGNO *et al.*, 2006).

### 3.3.2.3 Indução tumoral

A indução tumoral foi realizada via subcutânea, no dorso de cada camundongo dos grupos teste e controle positivo, na concentração de  $5 \times 10^6$  cel/animal (PAGNO *et al.*, 2006).

### 3.3.2.4 Delineamento experimental

Para cada substância (PM1, PM2 e PE1), testada em quatro doses, foram utilizados 50 animais ( $n=5$ ), sendo que 20 animais formaram os quatro grupos teste (com indução tumoral e tratamento), cinco animais formaram o grupo controle positivo (com indução tumoral e sem tratamento), 20 animais formaram os quatro grupos controle substância (sem indução tumoral e com tratamento) e cinco animais foram utilizados para o grupo controle negativo (sem indução tumoral e sem tratamento).

O tratamento pós-indução foi realizado por meio da administração das substâncias obtidas de *Pleurotus sajor-caju* CCB 019, separadamente, nos camundongos dos quatro grupos teste e dos quatro grupos controle substância. Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p) durante 10 dias, iniciando-se 24 horas após a indução do tumor, nas doses diárias de 3, 10, 30 e 100 mg  $\text{kg}^{-1}$  de massa do animal (LEE *et al.*, 2003, ZHANG *et al.*, 2004, HUANG *et al.*, 2007). Os camundongos dos grupos controle positivo e negativo receberam uma dose diária de 10mg  $\text{kg}^{-1}$  de solução PBS 0,01M, via intraperitoneal por 10 dias.

A avaliação do desenvolvimento tumoral foi realizada após 21 dias, a contar da indução tumoral (ZHANG *et al.*, 1994; MIZUNO *et al.*, 1999; AJITH *et al.*, 2003) por determinação da massa (g) do tumor (MISAKI *et al.*, 1984), do volume tumoral (AJITH & JANARDHANAN, 2003), da taxa de inibição (MIZUNO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004) e mortalidade (MIZUNO *et al.*, 1999). A taxa de inibição foi obtida através da relação: [(1-

T)/C]\*100, onde T é a massa do tumor do grupo teste e C é a massa do tumor do grupo controle positivo.

### 3.4 METODOLOGIA ANALÍTICA

As metodologias de determinação das concentrações de biomassa, glicose e EPS foram as mesmas tanto nos cultivos conduzidos em frascos agitados quanto nos cultivos em biorreator.

#### 3.4.1 Análise de concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada pelo método gravimétrico. Toda a biomassa contida nos frascos Erlenmeyer foi filtrada a vácuo em papel Whatman nº1. A massa obtida após a secagem por 48 h a 60°C em cadinho previamente seco e pesado, foi relacionada ao volume de meio constante dos frascos e o resultado apresentado em g L<sup>-1</sup>.

#### 3.4.2 Análise da concentração de glicose

A concentração de glicose no meio de cultivo foi determinada pelo método enzimático Glicose-Enzimática (CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos). Neste método, a glicose é oxidada pela enzima glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada (glicose + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → ácido glucônico + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em presença de peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio produz copulação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF), dando lugar à formação de um cromógeno vermelho cereja (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-AF + fenol → 4-(p-benzoquinona-monoimino) fenazona + 4H<sub>2</sub>O), cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução em análise (TRINDER, 1969).

As amostras coletadas foram diluídas em água deionizada de modo a se obter uma solução de glicose com concentração entre 0,1 e 1,0 g L<sup>-1</sup>. Em cubetas previamente calibradas acrescentou-se:

- ao branco: 1mL do reativo GOD-POD e 10μL de água deionizada;
- às amostras: 1 mL do reativo GOD-POD e 10 μL da amostra devidamente diluída ou não.

Em seguida a mistura foi incubada em estufa a 37°C por 20 minutos. As medições de absorvância foram realizadas a 505nm em espectrofotômetro (modelo SP 2000 UV, BEL Photonics). Em paralelo, preparou-se quatro soluções padrão, contendo 0,1, 0,5, 0,8 e 1 g L<sup>-1</sup> de glicose, que sofreram o mesmo tratamento. Com base nas leituras obtidas com os padrões, foi definida uma equação, por regressão linear, através da qual foram calculadas as concentrações de glicose nas amostras.

### **3.4.3 Extração e quantificação de EPS para obtenção de dados para análise cinética**

Para acompanhamento da cinética do processo, a determinação das concentrações de polissacarídeos extracelulares (EPS) exigiu os seguintes procedimentos: as amostras de 20mL do caldo de cultivo foram tratadas com adição de acetona, resfriadas a 8°C, na proporção acetona:amostra 3:1 (v:v) (MAZIERO, 1996). A quantificação de polissacarídeos extracelulares foi realizada segundo Cavazzoni & Adami (1992). Após 24h sob refrigeração (4°C), para a precipitação dos polissacarídeos extracelulares, as amostras foram centrifugadas a 4500xg por 5 minutos, lavadas duas vezes com solução de acetona:etanol:água destilada, na proporção 3:1:1 (v:v:v). A concentração de polissacarídeos foi medida indiretamente por meio da determinação da concentração de açúcares totais, pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

O método fenol-sulfúrico baseia-se no fato de que os ácidos fortes (ácido sulfúrico) desidratam os glicídios, dando origem a aldeídos cíclicos (furfural ou derivados) que podem combinar-se com diversos fenóis formando compostos corados, cuja coloração é diretamente proporcional à concentração de açúcares solúveis no meio reativo (REMIÃO *et al.*, 2003). O procedimento completo é descrito a seguir:

- em um tubo de ensaio adiciona-se 0,5 mL da amostra a ser analisada devidamente diluída, 0,5 mL de uma solução de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e deixa-se reagir por 20 min em temperatura entre 25 e 30°C e mede-se a absorvância em espectrofotômetro, a 490 nm;
- para o preparo da curva padrão, substitui-se a amostra por 0,5 mL de soluções padrão de glicose com concentrações variando de 0,001 a 0,1 g L<sup>-1</sup>; o equipamento é calibrado (ABS490=0) com uma solução na qual a amostra é substituída por água deionizada.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, constrói-se uma curva de calibração cuja equação calculada por regressão linear permite calcular a concentração de açúcares totais nas amostras.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### 3.5.1 Estudo da composição do meio de cultivo

As replicatas provenientes dos experimentos realizados em frascos agitados foram avaliadas através do teste estatístico para rejeição de valores desviantes denominado de Teste Q de Dixon, com nível de confiança de 95% ( $r_{10}$ ), de acordo com Rorabacher (1991). A existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados obtidos nos experimentos foi determinada pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,5 %, utilizando-se o programa Microsoft EXCEL. O planejamento experimental foi avaliado no programa STATISTICA®7.0, utilizando a análise de Pareto (BARROS NETO *et al.*, 1996) que permite identificar e quantificar o efeito de cada um dos fatores e de suas interações nos experimentos realizados.

#### 3.5.2 Experimentos em biorreator

Os experimentos foram realizados em duplicata e as curvas cinéticas foram traçadas utilizando-se os pontos de ambas as repetições. Os valores utilizados para cálculo dos parâmetros cinéticos foram retirados diretamente das curvas. A existência ou não de diferenças significativas entre as repetições foi determinada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

#### 3.5.3 Avaliação do potencial antitumoral *in vivo*

Com exceção dos dados relacionados à cinética da variação da massa corporal dos animais com o tempo, todos os demais dados obtidos foram analisados por meio do teste estatístico para rejeição de valores desviantes, denominado Teste 'Q' de Dixon ( $r_{10}$ ), com nível de confiança de 95% (RORABACHER, 1991).



Para a análise estatística, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de valores médios, através do Teste F com o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.6 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

#### 3.6.1 Fatores de conversão global

Os fatores de conversão globais de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e em polissacarídeos extracelulares ( $Y_{P/S}$ ) foram definidos pelas expressões 1 e 2.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (1)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (2)$$

Onde:

$X_f$  representa a concentração final de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), aqui entendida como sendo a concentração de biomassa no ponto em que a concentração de EPS atinge seu valor máximo,

$X_0$  é a concentração inicial de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ),

$P_f$  representa a concentração final de polissacarídeos extracelulares ( $\text{g L}^{-1}$ ), aqui considerada a concentração máxima de EPS,

$P_0$  é a concentração inicial de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ),

$S_f$  representa a concentração final de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), aqui considerada como sendo a concentração de glicose no ponto em que a concentração de EPS atinge seu valor máximo,

$S_0$  é a concentração de glicose no tempo zero ( $\text{g L}^{-1}$ ).

#### 3.6.2 Produtividades

A produtividade máxima em biomassa ( $Q_{Xmáx}$ ) e a produtividade máxima em polissacarídeos extracelulares ( $Q_{Pmáx}$ ) foram definidas pelas expressões 3 e 4.

$$Q_{Xmáx} = \frac{X - X_0}{t_x} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3)$$

$$Q_{P\text{máx}} = \frac{P - P_0}{t_P} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (4)$$

Onde:

X representa a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no ponto em que a produtividade em biomassa é máxima (este ponto é obtido ao se traçar uma reta que parte do valor de  $X_0$  e tangencia a curva  $X = f(t)$  no seu ponto de inflexão),

$X_0$  é a concentração no tempo zero ( $\text{g L}^{-1}$ ),

$t_X$  é o tempo de cultivo onde a produtividade em biomassa é máxima (h).

P representa a concentração de polissacarídeos extracelulares ( $\text{g L}^{-1}$ ), no ponto em que a produtividade é máxima (este ponto é obtido ao se traçar uma reta que parte do valor de  $P_0$  e tangencia a curva  $P = f(t)$  no seu ponto de inflexão),

$P_0$  é a concentração inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ),

$t_P$  é o tempo de cultivo onde a produtividade em polissacarídeos extracelulares é máxima (h).

A produtividade global em biomassa ( $Q_X$ ) e em polissacarídeos extracelulares ( $Q_P$ ) são representadas pelas expressões 5 e 6.

$$Q_X = \frac{X_t - X_0}{t} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (5)$$

$$Q_P = \frac{P_t - P_0}{t} \quad [\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (6)$$

Onde:

t representa o tempo de cultivo, aqui considerado como o tempo em que a concentração de EPS atinge seu valor máximo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Nestes experimentos, as concentrações de três fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja) do meio POL, proposto por Cavazzoni & Adami (1992), foram alteradas segundo o planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 5), com o objetivo de aumentar a concentração de polissacarídeos extracelulares (EPS) sintetizados por *Pleurotus sajor-caju*. Os resultados, em termos de concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS e de biomassa, são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS e biomassa, obtidas nos experimentos de estudo da composição do meio de cultivo, segundo planejamento fatorial  $2^3$ .

Experimentos	EPS ( $\text{g L}^{-1}$ )	Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	0,39	7,90
2	0,32	7,96
3	0,34	4,36
4	0,28	3,45
5	0,32	6,77
6	0,31	8,42
7	0,60	3,95
8	0,49	3,62

A tabela 8 apresenta os efeitos calculados, com base no planejamento fatorial  $2^3$ , para a concentração de EPS, em que um efeito negativo expressa que o valor da concentração de EPS aumenta na direção do nível inferior daquela variável e um efeito positivo expressa que o valor da concentração de EPS aumenta na direção do nível superior daquela variável.

A figura 9 apresenta o efeito das interações entre as concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS.

Tabela 8 – Efeitos calculados, com base no planejamento fatorial  $2^3$ , com um nível mínimo de 95% de confiança, para a concentração de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ).

Variáveis	Efeito $\pm$ erro padrão
(1) Sulfato de amônio ( $\text{g L}^{-1}$ )	-0,097125* $\pm$ 0,017169
(2) Extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	-0,095375* $\pm$ 0,017169
(3) Peptona de soja ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,064875* $\pm$ 0,017169
Interação entre (1) e (2)	0,140125* $\pm$ 0,017169
Interação entre (1) e (3)	0,004375 $\pm$ 0,017169
Interação entre (2) e (3)	-0,020875 $\pm$ 0,017169
Interação entre (1), (2) e (3)	0,029125 $\pm$ 0,017169

\* Efeito estatisticamente significativo

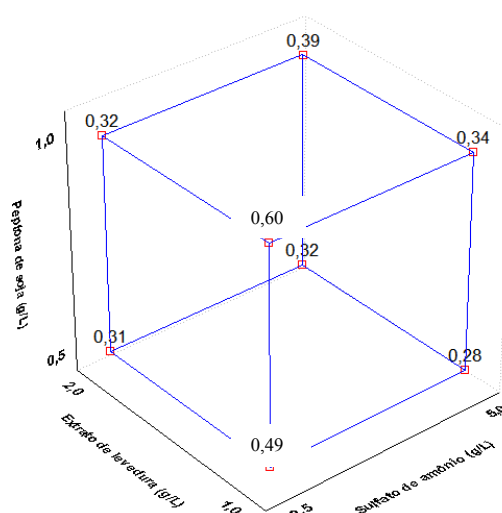


Figura 9 – Efeito das interações entre as concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de EPS.

Ao analisar a tabela 8 e a figura 9, observa-se que o sulfato de amônio e o extrato de levedura apresentaram efeito negativo estatisticamente significativo sobre a concentração de EPS, ou seja, a concentração de EPS aumenta na direção do nível inferior destas variáveis (sulfato de amônio =  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  extrato de levedura =  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Peptona de soja apresentou efeito positivo estatisticamente significativo sobre a concentração de EPS, ou seja, a concentração de EPS aumenta na direção do nível superior desta variável (peptona de soja =  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Com relação à interação significativa entre sulfato de amônio e extrato de levedura, observa-se que quando as concentrações desses componentes estão no nível inferior, tem-se

aumento da concentração de EPS, no entanto este aumento é mais acentuado quando peptona de soja está no nível superior. Desta análise verifica-se que para obter-se maior concentração de EPS ( $0,60 \text{ g L}^{-1}$ ), levando-se em consideração as interações significativas, deve-se utilizar no cultivo as concentrações de sulfato de amônio e extrato de levedura no nível inferior ( $2,5$  e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e peptona de soja no nível superior ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos nestes experimentos estão de acordo com os descritos por Barbosa *et al.* (2004). Estes autores descrevem que níveis elevados de nitrogênio reprimem a síntese de EPS fúngicos, sendo os sais de amônio e o extrato de levedura os mais utilizados em meio de cultivo de espécies fúngicas.

Rosado *et al.* (2003), em seus estudos para a produção de EPS por *P. ostreatoroseus* e *P. ostreatus "florida"*, também observaram que menores concentrações de sulfato de amônio no meio de cultivo aumentaram a produção de EPS ( $5,8 \text{ g L}^{-1}$ ) pela espécie *P. ostreatoroseus*, como observado neste trabalho para *P. sajor-caju*.

Confortin *et al.* (2008) avaliaram a modificação das concentrações de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja no meio de cultivo, visando à produção de biomassa e EPS por *P. sajor-caju*. Estes autores obtiveram  $8,18 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa e  $1,18 \text{ g L}^{-1}$  de EPS quando o meio de cultivo continha  $1,57 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amônio,  $1,86 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $2,4 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja. De acordo com planejamento fatorial realizado por estes autores, menores concentrações de sulfato de amônio e extrato de levedura, bem como maiores concentrações de peptona de soja no meio de cultivo, proporcionaram aumento da produção de EPS. Os valores de concentração obtidos pelos autores são cerca de 100% superiores aos observados no experimento 7 deste trabalho ( $3,95 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa e  $0,6 \text{ g L}^{-1}$  de EPS). Contudo, cabe destacar que os autores, além das três fontes de nitrogênio citadas e da glicose, utilizaram um meio de cultivo mais rico em nutrientes e micronutrientes ( $20 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $14 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $3,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $3 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $3,0 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $15,6 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $14 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $20 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{CoCl}_2$ ) que o meio de cultivo POL, além da adição de óleo de soja ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ). Este meio de cultivo enriquecido com minerais pode ter contribuído para a maior produção de EPS e biomassa por *P. sajor-caju*.

A tabela 9 apresenta os efeitos calculados, com base no planejamento fatorial  $2^3$ , para a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ). A figura 10 apresenta o efeito das interações entre as concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de biomassa micelial.

Tabela 9 – Efeitos calculados com base no planejamento fatorial  $2^3$ , com um nível mínimo de 95% de confiança, para a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ).

Variáveis	Efeito $\pm$ erro padrão
(1) Sulfato de amônio ( $\text{g L}^{-1}$ )	$0,227637 \pm 0,170871$
(2) Extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	$3,917256^* \pm 0,170871$
(3) Peptona de soja ( $\text{g L}^{-1}$ )	$-0,117079 \pm 0,170871$
Interação entre (1) e (2)	$0,111520 \pm 0,170871$
Interação entre (1) e (3)	$0,542204^* \pm 0,170871$
Interação entre (2) e (3)	$-0,735986^* \pm 0,170871$
Interação entre (1), (2) e (3)	$0,250861 \pm 0,170871$

\* Efeito estatisticamente significativo

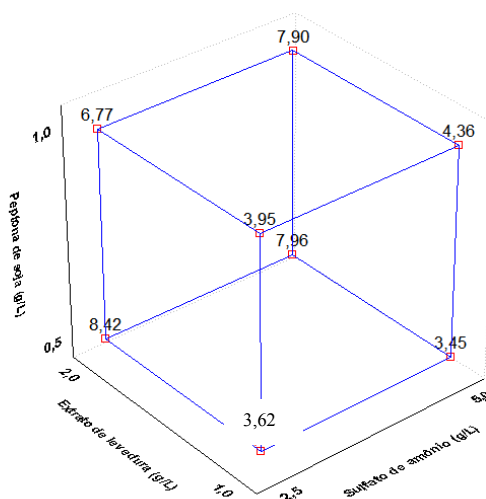


Figura 10 – Efeito das interações das concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja sobre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de biomassa micelial.

Ao analisar a tabela 9, observa-se que extrato de levedura apresentou efeito positivo estatisticamente significativo sobre a concentração de biomassa, ou seja, a concentração de biomassa aumenta na direção do nível superior desta variável (extrato de levedura =  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ). As variáveis sulfato de amônio e peptona de soja, separadamente, não apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a produção de biomassa. Levando-se em consideração, a interação significativa entre sulfato de amônio e peptona de soja, observa-se que quando a concentração de peptona de soja está no nível inferior, tem-se aumento da concentração de biomassa, no entanto este aumento é mais acentuado quando sulfato de amônio está no nível inferior. Fazendo esta mesma análise para a interação extrato de levedura e peptona de soja, que também é significativa, observa-se que quando a concentração

de extrato de levedura está no nível superior tem-se um aumento na concentração de biomassa, no entanto este aumento é mais acentuado quando peptona está no nível inferior. Desta análise verifica-se que para obter-se maior concentração de biomassa ( $8,42 \text{ g L}^{-1}$ ), levando-se em consideração as interações significativas, deve utilizar no cultivo as concentrações de sulfato de amônio e peptona de soja no nível inferior ( $2,5$  e  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e extrato de levedura no nível superior ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ).

Observa-se que as condições que maximizaram a concentração de EPS, ou seja,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amônio,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  peptona de soja (meio de cultivo 7, Tabela 6), proporcionaram uma concentração de biomassa igual a  $3,95 \text{ g L}^{-1}$ . Esta concentração equivale a apenas 47% da concentração ( $8,42 \text{ g L}^{-1}$ ) obtida com extrato de levedura no nível superior e as demais variáveis no nível inferior do planejamento (meio 6 da Tabela 6). No entanto, deve-se considerar que concentrações menores de biomassa não afetam a homogeneidade do meio e não dificultam a transferência de oxigênio e acesso a nutrientes, porém, deve-se destacar que a biomassa micelial também contém polissacarídeos (polissacarídeos intracelulares – IPS) aderidos à parede celular das hifas. Desse modo, a escolha da composição do meio de cultivo depende do tipo de polissacarídeo que se deseja obter. Se o foco principal do estudo for a obtenção de EPS, como é o objetivo deste trabalho, deve-se optar pelo meio 7 da tabela 6 e, se for de IPS, deve-se optar, em princípio, pelo meio 6 da mesma tabela e depois investigar a concentração de IPS na biomassa micelial.

A influência do extrato de levedura sobre a produção de biomassa foi estudada por Gern *et al.* (2008). Os melhores resultados foram obtidos quando estes autores utilizaram  $5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura ao invés de  $2 \text{ g L}^{-1}$  no meio de cultivo de *P. ostreatus*, em frascos agitados. Os autores obtiveram concentração máxima em biomassa igual a  $11,15 \text{ g L}^{-1}$  e produtividade máxima em biomassa igual a  $1,16 \text{ g L}^{-1}$  dia.

Outros autores também estudaram a influência do extrato de levedura sobre a produção de biomassa por espécies de Basidiomicetos. Lee *et al.* (2004) relatam que concentrações maiores ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) de extrato de levedura em meio de cultivo submerso de *Grifola frondosa*, proporcionam maior produção de biomassa, aproximadamente  $4,5 \text{ g L}^{-1}$ , em relação as outras fontes de nitrogênio testadas. Nos estudos de Pokhrel & Ohga (2007) a melhor fonte de nitrogênio para a produção de biomassa por *Lyophyllum decastes* foi o extrato de levedura, obtendo-se aproximadamente  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa.

Quando se compara os resultados obtidos no experimento 1 da tabela 6, que utilizou o meio de cultivo proposto por Cavazzoni & Adami (1992), com os resultados obtidos no experimento 7 da mesma tabela, observa-se que, após modificações do meio, houve um

aumento de 54% na concentração de EPS produzidos por *P. sajor-caju*. Além disso, obteve-se uma melhor homogeneização do meio de cultivo, devido aos “pellets” miceliais serem menores, sendo, portanto, o meio de cultivo 7 considerado o ideal, dentre as composições testadas, para a continuidade dos experimentos em biorreator, visando, principalmente à obtenção de EPS.

## 4.2 CULTIVOS EM BIOREATOR

### 4.2.1 Estudo da influência do pH no cultivo de *P. sajor-caju* para síntese de EPS

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as curvas cinéticas referentes aos cultivos submersos de *P. sajor-caju* em meio de cultivo POL modificado (meio 7 da Tabela 6) contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial, em pH 3,0, pH 4,0 e pH livre, respectivamente.

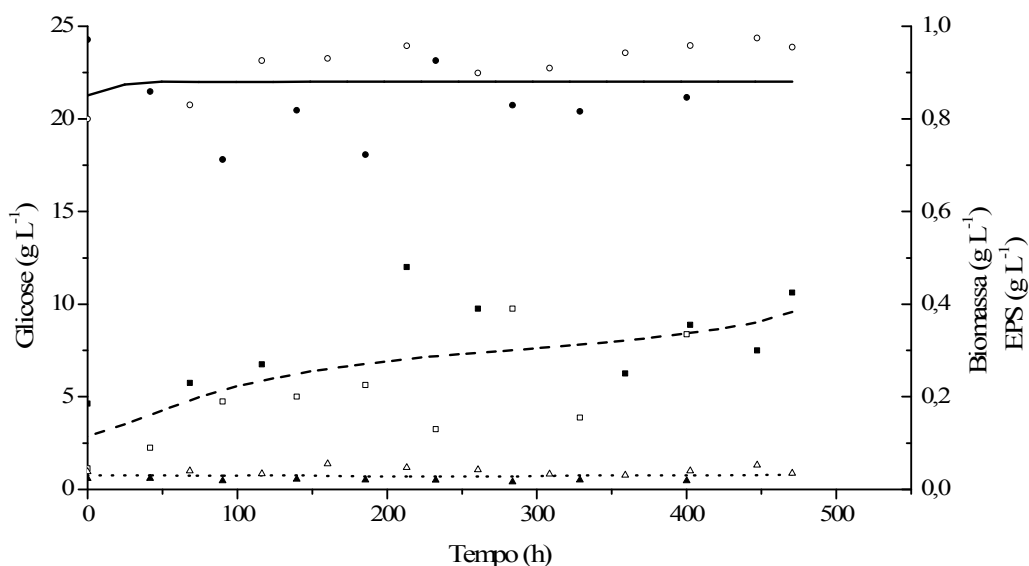


Figura 11 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada - ■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos conduzidos em meio POL modificado com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial em pH 3,0 em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.



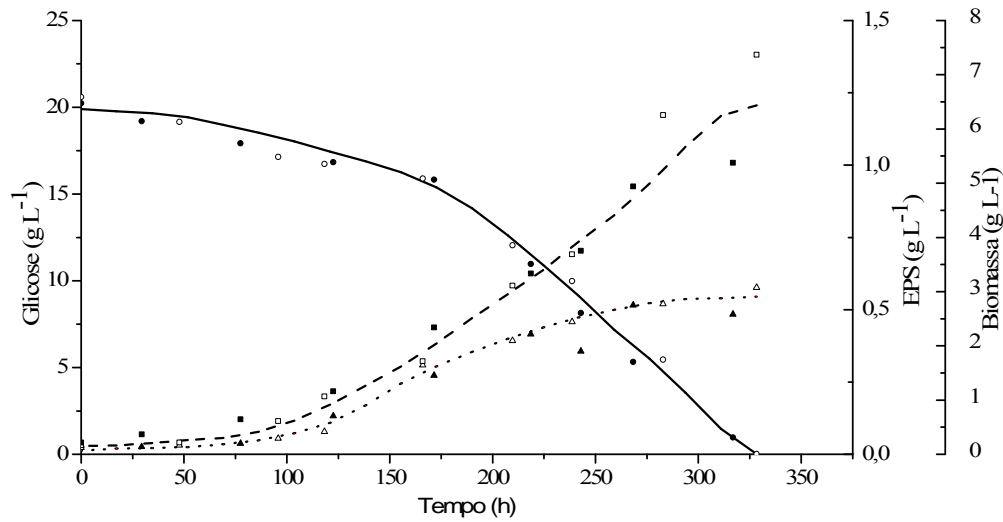


Figura 12 – Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos conduzidos em meio POL modificado com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial em pH 4,0 em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

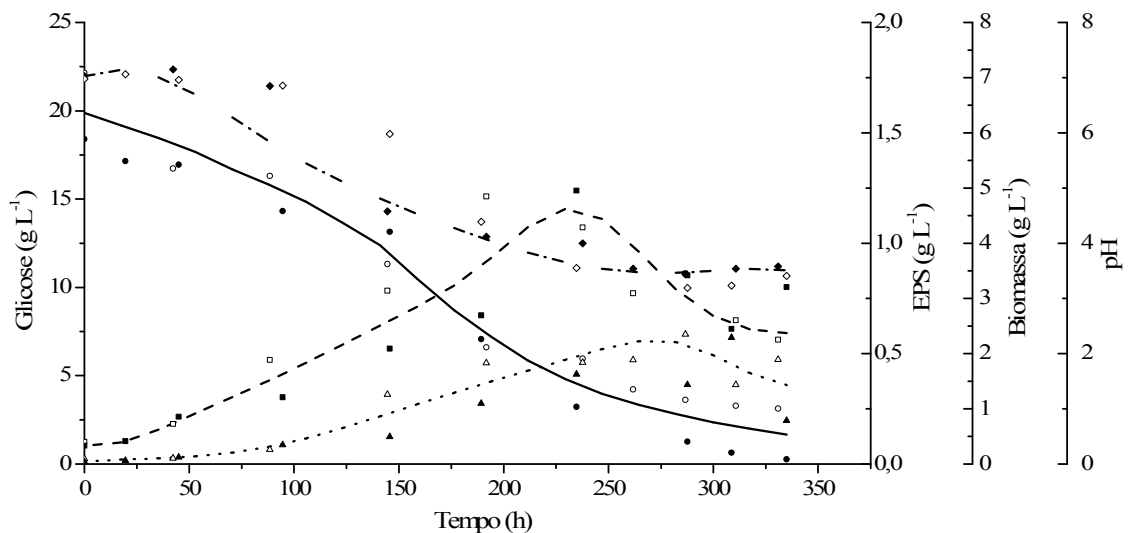


Figura 13 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) e pH (linha intermitente, -◆-, -◇-) dos experimentos conduzidos em meio POL modificado com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial em pH livre (espontâneo) em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

Ao analisar a Figura 11 observa-se que, mantendo-se o valor de pH em 3,0, não houve consumo de glicose e produção de EPS em 470 horas de cultivo, momento em que o cultivo

foi interrompido. Consequentemente, a concentração de biomassa foi baixa, variando de 0,1 a 0,4 g L<sup>-1</sup>.

Analisando-se os perfis cinéticos apresentados na Figura 12, observa-se que no tempo de 328 horas de cultivo toda a glicose foi consumida. Em 293,7 horas (t) de cultivo a concentração de EPS atingiu seu valor máximo e tornou-se estável, sendo as variações das concentrações de EPS ( $\Delta P$ ) e de biomassa ( $\Delta X$ ) nesse ponto de 0,53 g L<sup>-1</sup> e 5,52 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. O tempo onde a produtividade em EPS é máxima ( $t_p$ ) foi de 238,7 horas, sendo o valor da variação da concentração de EPS ( $\Delta_{Pm}$ ) nesse ponto igual a 0,45 g L<sup>-1</sup>. O tempo onde a produtividade em biomassa é máxima ( $t_x$ ) foi de 311,0 horas, sendo o valor da variação da concentração de biomassa ( $\Delta_{Xm}$ ) nesse ponto igual a 6,09 g L<sup>-1</sup>.

De acordo com os perfis cinéticos apresentados na Figura 13, observa-se que no tempo de 340 horas, momento em que o cultivo foi interrompido, a concentração de glicose residual era de aproximadamente 1,6 g L<sup>-1</sup>. O valor do pH inicial foi de 7,0, diminuindo no decorrer do cultivo e estabilizando-se no tempo de 230 horas, em torno de 3,5. Em 264,4 horas de cultivo (t) observou-se a máxima variação na concentração de EPS ( $\Delta P$ ) igual a 0,55 g L<sup>-1</sup>, sendo a variação da concentração de biomassa ( $\Delta X$ ) nesse momento de 3,52 g L<sup>-1</sup>. Os tempos onde as produtividades em EPS ( $t_p$ ) e em biomassa ( $t_x$ ) são máximas, foram de 246,8 h e 211,5 h, respectivamente, sendo os valores de variação da concentração de EPS ( $\Delta_{Pm}$ ) e biomassa ( $\Delta_{Xm}$ ) nesses pontos iguais a 0,51 g L<sup>-1</sup> e 3,96 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Observa-se ainda na Figura 13 que houve um pico na produção de biomassa (4,62 g L<sup>-1</sup>) em torno de 230 horas, com subsequente queda. Essa diminuição da concentração de biomassa ocorreu logo após a estabilização do pH em 3,5. Este comportamento também é observado na produção de EPS, onde se tem um pico (0,55 g L<sup>-1</sup>) no tempo de 264,8 horas, diminuindo a 0,36 g L<sup>-1</sup>, no tempo final do processo, sugerindo que o pH mais baixo, neste caso 3,5 pode estar influenciando negativamente a produção de biomassa e EPS. Essa hipótese é corroborada pelos resultados apresentados na Figura 11.

Fazendo-se a análise dos dados segundo Le Duy Zarjic e analisando-se a cinética do processo de acordo com a classificação de Gaden, observou-se que no cultivo com pH controlado em 4,0, a síntese de EPS é associada ao crescimento ( $\mu_P = 0,164 \mu$ ), enquanto que no cultivo em pH livre a síntese foi parcialmente associada ao crescimento. Neste caso, a produção de EPS foi dissociada do crescimento no início do processo, até 105 h, e associada a partir desse ponto ( $\mu_P = 0,124 \mu$ ). Os gráficos encontram-se apresentados no apêndice 4.

Barbosa *et al.* (2004) relatam que um dos fatores que interferem diretamente na produção de EPS fúngicos é o pH do meio de cultivo. Estudos da influência do pH em cultivo submerso são de grande importância, pois segundo Xiao *et al.* (2006), o pH afeta a morfologia e a estrutura celular, além de alterar a função da membrana celular fúngica. Os mesmos autores ao estudarem a influência do pH sobre a produção de biomassa e EPS por *Cordyceps jiangxiensis*, observaram que o pH 7,0 proporcionou maior concentração de biomassa (10,56 g L<sup>-1</sup>) e o pH 6,0 proporcionou a maior concentração de EPS (4,6 g L<sup>-1</sup>).

Huang & Liu (2008) em seus estudos de otimização do cultivo submerso por *Grifola umbellata*, relatam que o pH 5,0 foi o que proporcionou a maior concentração de EPS (0,571 g L<sup>-1</sup>) e o pH 6,0 a maior concentração de biomassa (6,23 g L<sup>-1</sup>). Hwang *et al.* (2003) observaram que o pH 4,0 foi o ideal para a produção de EPS e pH 5,0 para biomassa, por *Phellinus linteus*, sendo que a maior concentração de EPS obtida foi de 3,3 g L<sup>-1</sup> e a maior concentração de biomassa foi de aproximadamente 2,7 g L<sup>-1</sup>. Já o valor de pH encontrado por Fan *et al.* (2007), nos cultivos de *Agaricus brasiliensis* em biorreator, para maximização da concentração de EPS (0,32g L<sup>-1</sup>) foi pH igual a 6,1.

Wisbeck (2003), quando avaliou a influência do pH inicial do meio de cultivo, utilizando o meio POL (CAVAZZONI & ADAMI, 1992) com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose, sobre a produção de EPS e biomassa por *Pleurotus ostreatus*, obteve concentrações maiores de EPS (1,33 g L<sup>-1</sup>) e biomassa (12,86 g L<sup>-1</sup>) quando utilizou o pH 4,0. Já Borges (2009), utilizando o mesmo meio de cultivo, obteve maior concentração de EPS (2,1 g L<sup>-1</sup>) e biomassa (7,11 g L<sup>-1</sup>) por *P. djamor* quando utilizou o pH 3,0 e 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial. Por outro lado, Paspapyridi *et al.* (2010) em seus estudos de otimização de meio de cultivo para produção de EPS e biomassa por *P. ostreatus*, obtiveram melhores resultados utilizando o pH 6,0. Comparando os valores obtidos neste trabalho com os encontrados pelos autores, pode-se dizer que dentro do mesmo gênero, neste caso, o gênero *Pleurotus*, diferentes condições de cultivo são exigidas, sendo específicas a cada espécie fúngica.

A Tabela 10 resume os parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em pH 4,0 e pH livre. Ao analisar os dados observa-se grande similaridade entre os valores de variação de concentração ( $\Delta P$ ), fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) e produtividades global ( $Q_P$ ) e máxima ( $Q_{Pm\acute{a}x}$ ) obtidos em ambos os cultivos. De acordo com o Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, nenhum dos parâmetros cinéticos acima descritos apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Apêndice 1).

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio POL modificado, pH 4,0 e pH livre, com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial em processo descontínuo.

Dados cinéticos	pH Livre	pH 4,0
	Glicose 20 g L <sup>-1</sup>	Glicose 20 g L <sup>-1</sup>
$\Delta P$ (g L <sup>-1</sup> )	0,55	0,53
$\Delta X$ (g L <sup>-1</sup> )	3,52	5,52
$\Delta P_m$ (g L <sup>-1</sup> )	0,51	0,45
$\Delta X_m$ (g L <sup>-1</sup> )	3,96	6,09
$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,03	0,03
$Y_{X/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,21	0,34
$Q_P$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2,06	1,79
$Q_X$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	13,31	18,78
$Q_{Pm\acute{a}x}$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2,07	1,87
$Q_{Xm\acute{a}x}$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	18,72	19,57
$t$ (h)	264,4	293,7
$t_P$ (h)	246,8	238,7
$t_X$ (h)	211,5	311,0

Considerando estas semelhanças optou-se pelo uso do pH controlado (4,0) ao invés do pH livre para a continuidade dos experimentos, pois é sabido que cultivos em pH mais ácidos ficam menos suscetíveis a contaminações por outros microrganismos, visando futuramente cultivos em escala industrial. Além disso, considerou-se ainda para esta tomada de decisão que a etapa seguinte deste trabalho é a avaliação do uso do CaCO<sub>3</sub> no meio e, sabe-se que em valores de pH mais ácidos o carbonato de cálcio dissolve-se mais facilmente, facilitando a observação de contaminação do cultivo, o que seria bastante difícil em pH livre.

#### 4.2.2 Estudo da influência do carbonato de cálcio no cultivo de *P. sajor-caju* para síntese de EPS

A Figura 14 apresenta as curvas cinéticas referentes ao cultivo submerso de *P. sajor-caju*, em pH 4,0 com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO<sub>3</sub>.

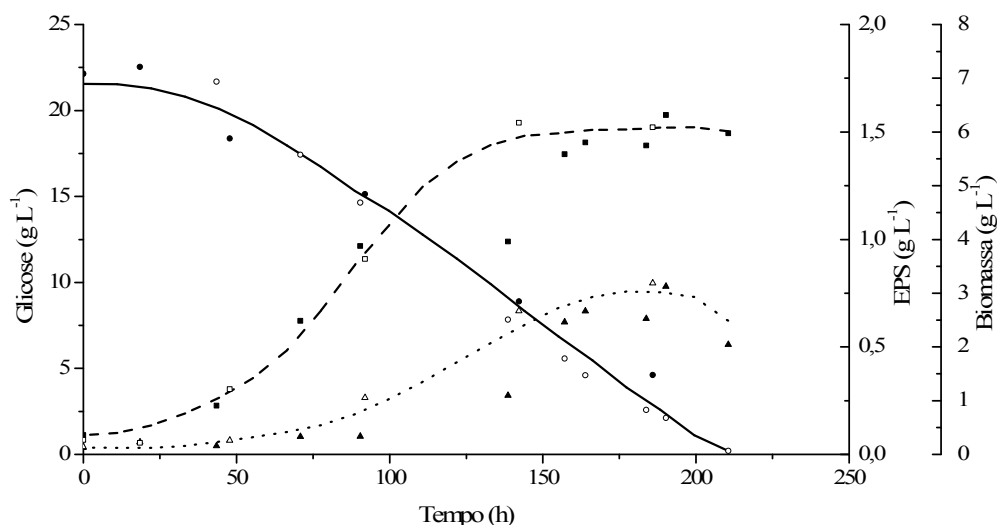


Figura 14 – Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos em pH 4,0, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>) em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

De acordo com os perfis cinéticos apresentados na Figura 14, observa-se que o tempo necessário para o consumo da glicose foi de 210 horas de cultivo, contra 328 h em cultivo sem CaCO<sub>3</sub> (Figura 12). Em 188,7 horas (t) de cultivo a concentração de EPS atingiu seu valor máximo e tornou-se estável, sendo as variações das concentrações de EPS ( $\Delta P$ ) e de biomassa ( $\Delta X$ ) nesse ponto de 0,72 g L<sup>-1</sup> e 5,73 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. A produtividade máxima em EPS foi alcançada no tempo de 166,2 horas (t<sub>p</sub>), sendo o valor da variação da concentração de EPS ( $\Delta P_m$ ) nesse ponto igual a 0,70 g L<sup>-1</sup>. A produtividade máxima em biomassa foi alcançada no tempo de 121,9 horas (t<sub>x</sub>), sendo o valor da variação da concentração da biomassa ( $\Delta X_m$ ) nesse ponto igual a 5,09 g L<sup>-1</sup>. Observa-se que após 188,4 horas ocorreu um declínio na concentração de EPS, chegando a 0,6 g L<sup>-1</sup> no tempo de 210 horas. Provavelmente esta queda na concentração de EPS ocorreu devido à estabilização da concentração de biomassa, pois os polissacarídeos podem estar aderidos à biomassa, dificultando a entrada da glicose dissolvida no meio para dentro da célula, o que pode estar levando o fungo a excretar  $\beta$ -glucanase para degradar o polissacarídeo e obter glicose, conforme sugerido por Papagianni (2004). Contudo, observa-se também que neste momento a glicose disponível é muito baixa, sugerindo ainda que o fungo possa estar degradando o EPS para obter glicose.

A Tabela 11 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio POL modificado em pH 4,0, sem e com adição de CaCO<sub>3</sub> (1 g L<sup>-1</sup>). Observa-se que a

variação da concentração máxima em EPS ( $\Delta P$ ) foi 35,8% superior ao utilizar o carbonato de cálcio no meio de cultivo. O mesmo pode se observar ao analisar as produtividades total ( $Q_P$ ) e máxima ( $Q_{Pmax}$ ) em EPS que foram, respectivamente, 114,5% e 125,7% maiores nos cultivos com adição de  $CaCO_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). O valor de produtividade máxima em biomassa ( $Q_{Xmax}$ ) foi 113,3% superior ao encontrado em cultivo sem carbonato de cálcio. Os demais parâmetros relacionados à biomassa, bem como os fatores de conversão de substrato em EPS e em biomassa não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os cultivos sem e com carbonato de cálcio, de acordo com o teste de Tukey, com nível de significância de 5% (Apêndice 2).

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio POL modificado, pH 4,0 sem e com adição de  $CaCO_3$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial em processo descontínuo.

Dados cinéticos	pH 4,0	pH 4,0
	sem $CaCO_3$	com $CaCO_3$
$\Delta P$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,53	0,72
$\Delta X$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	5,52	5,73
$\Delta P_m$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,45	0,70
$\Delta X_m$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	6,09	5,09
$Y_{P/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	0,03	0,04
$Y_{X/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	0,34	0,32
$Q_P$ ( $\text{mg.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	1,79	3,84
$Q_X$ ( $\text{mg.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	18,78	30,39
$Q_{Pmax}$ ( $\text{mg.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	1,87	4,22
$Q_{Xmax}$ ( $\text{mg.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	19,57	41,74
$t$ (h)	293,7	188,4
$t_P$ (h)	238,7	166,2
$t_X$ (h)	311,0	121,9

Segundo Xiao *et al.* (2006) a adição de uma fonte de cálcio no meio de cultivo é importante, pois os íons cálcio tem ação sobre o crescimento fúngico, isto é, mudam a permeabilidade da membrana celular através do gradiente interno de  $Ca^{+2}$  e da atividade de algumas enzimas fúngicas envolvidas na expansão da parede celular. Além disso, podem inibir a síntese de biopolímeros através do gradiente interno de  $Ca^{+2}$ , afetando o conteúdo de açúcar e proteínas, resultando em um aumento da produção de EPS e inibição do acúmulo de polissacarídeos intracelulares (IPS), ou seja, estimula a excreção dos polissacarídeos para fora da célula fúngica.

### 4.2.3 Estudo da influência da concentração inicial de glicose no cultivo de *P. sajor-caju* para síntese de EPS

A Figura 15 apresenta as curvas cinéticas referentes ao cultivo submerso de *P. sajor-caju*, em pH 4,0 com 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO<sub>3</sub>.

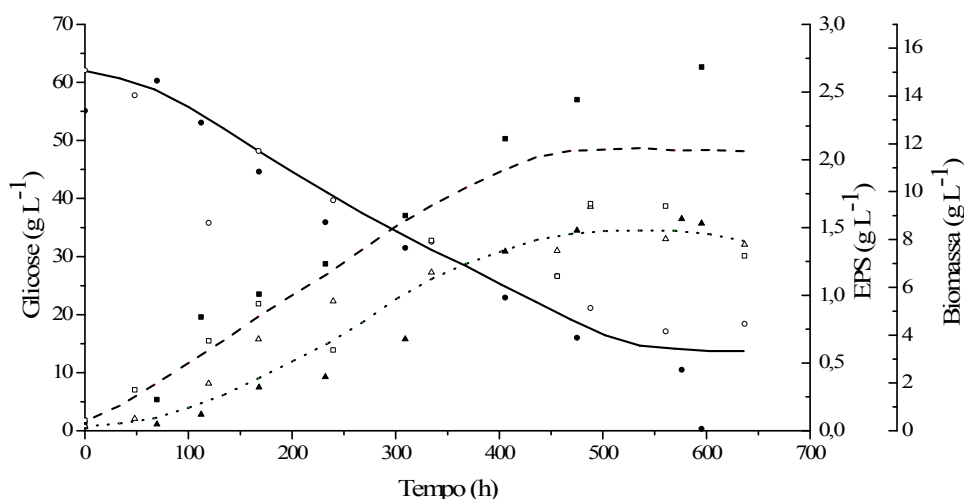


Figura 15 - Concentrações de glicose (linha contínua, -●-, -○-), biomassa (linha tracejada -■-, -□-) e EPS (linha pontilhada, -▲-, -△-) dos experimentos em pH 4,0, 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>) em função do tempo (h). Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

Ao analisar os perfis cinéticos apresentados na Figura 15, observa-se que no tempo de 636 horas de cultivo, momento em que o cultivo foi interrompido, a concentração da glicose residual ainda era de aproximadamente 11,4 g L<sup>-1</sup>, enquanto que no cultivo com pH 4,0, com adição de carbonato de cálcio e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial (Figura 14), no final de 210 horas toda a glicose já havia sido consumida. Comparando-se as velocidades médias de consumo de substrato entre estes experimentos observa-se que esta foi superior no experimento com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (104 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) em relação ao teste com 60 g L<sup>-1</sup> de glicose (75 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Em 535,6 horas (t) de cultivo a concentração de EPS atingiu seu valor máximo e tornou-se estável, sendo as variações das concentrações de EPS ( $\Delta P$ ) e de biomassa ( $\Delta X$ ) nesse ponto de 1,45 g L<sup>-1</sup> e 11,43 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os tempos onde as produtividades em EPS ( $t_p$ ) e em biomassa ( $t_x$ ) são máximas, foram de 334,7 e 301,3 horas, respectivamente, sendo os valores das variações das concentrações de EPS ( $\Delta P_m$ ) e biomassa ( $\Delta X_m$ ) nesses pontos iguais a 1,11 g L<sup>-1</sup> e 8,53 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os dados cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio POL modificado, pH 4,0 com CaCO<sub>3</sub> e 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial encontram-se resumidos na Tabela 12,

comparados aos dados obtidos no experimento com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose. Observa-se que a variação da concentração máxima em EPS ( $\Delta P$ ) nos cultivos com 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial, foi 101,4% superior, ao cultivo com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial. Contudo, a produtividade total em EPS ( $Q_P$ ) foi 42,2% inferior àquela obtida no cultivo com 20 g L<sup>-1</sup>. Os demais parâmetros cinéticos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A análise dos dados desses cultivos de acordo com Le Duy Zarjic e Gaden mostrou que a síntese de EPS é parcialmente associada ao crescimento tanto no cultivo conduzido com 20 g L<sup>-1</sup> quanto com 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial. No primeiro caso, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose, a produção foi dissociada do crescimento até 140 h de cultivo e associada a partir desse momento ( $\mu_P = 0,846 \mu$ ). Já, com 60 g L<sup>-1</sup> de glicose, a fase dissociada foi até 270 h, e a fase associada teve início a partir desse ponto até o final do cultivo ( $\mu_P = 0,195 \mu$ ). Pode-se observar que, apesar de ambos os cultivos favorecerem o crescimento em detrimento da produção, o cultivo com 60 g L<sup>-1</sup> foi ainda menos favorável à síntese de EPS. Os gráficos encontram-se no apêndice 5.

Tabela 12 – Dados cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio POL modificado, pH 4,0 com CaCO<sub>3</sub> (1 g L<sup>-1</sup>), 20 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial em processo descontínuo.

Dados cinéticos	pH 4,0	
	CaCO <sub>3</sub>	
	20 g L <sup>-1</sup> glicose	60 g L <sup>-1</sup> glicose
$\Delta P$ (g L <sup>-1</sup> )	0,72	1,45
$\Delta X$ (g L <sup>-1</sup> )	5,73	11,43
$\Delta P_m$ (g L <sup>-1</sup> )	0,70	1,11
$\Delta X_m$ (g L <sup>-1</sup> )	5,09	8,53
$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,04	0,03
$Y_{X/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,32	0,25
$Q_P$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	3,84	2,70
$Q_X$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	30,39	21,33
$Q_{P_{\max}}$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	4,22	3,30
$Q_{X_{\max}}$ (mg.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	41,74	28,31
t (h)	188,4	535,6
t <sub>P</sub> (h)	166,2	334,7
t <sub>X</sub> (h)	121,9	301,3

Libardi-Jr *et al.* (2007), ao avaliarem a influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS por *P. sajor-caju*, em experimentos realizados em frascos agitados,



obtiveram as maiores concentrações de EPS e biomassa (1,16 e 18,37 g L<sup>-1</sup>) utilizando concentração inicial de glicose de 60 g L<sup>-1</sup> ao invés de 20 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> ou 80 g L<sup>-1</sup>.

Cunha *et al.* (2008), ao investigarem a influência da concentração de glicose no meio de cultivo sobre a produção de EPS fúngico, observaram que concentrações maiores de glicose inicial contribuíram para a maior produção de EPS, sendo que a produção variou de 2,62 g L<sup>-1</sup> para 4,32 g L<sup>-1</sup> quando a concentração inicial de glicose variou de 20 g L<sup>-1</sup> para 50 g L<sup>-1</sup>.

Gern *et al.* (2008) obtiveram maior produtividade global em polissacarídeos intracelulares (17,12 mg L<sup>-1</sup> dia) por *P. ostreatus*, quando utilizaram 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial ao invés de 20 g L<sup>-1</sup>. Borges (2009) ao avaliar a influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS por *P. djamor*, obteve maior concentração de EPS (2,52 g L<sup>-1</sup>) quando utilizou 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial ao invés de 40 g L<sup>-1</sup>, porém as produtividades global e máxima em EPS (9,33 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 11,2 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente) foram maiores quando utilizou-se 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial. Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes ao encontrados por Borges (2009), visto que concentrações maiores de glicose inicial proporcionam maiores concentrações de EPS, porém as produtividades global e máxima em EPS foram menores. Para a produção em grande escala deve-se considerar as produtividades e diminuir riscos de contaminação. Sabe-se que cultivos longos apresentam maiores riscos de contaminação, tornando-se inviáveis industrialmente. Com base nestes fatores, optou-se por utilizar 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial no meio de cultivo para produção de EPS por *P. sajour-caju* ao invés de 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial.

Contudo, comparando-se os resultados obtidos neste trabalho, realizado com a espécie *P. sajour-caju*, com aqueles realizados por Wisbeck *et al.* (2005), para a espécie *P. ostreatus*, e com aqueles realizados por Borges (2009), para a espécie *P. djamor*, observa-se menores valores de concentração e produtividades para a espécie *P. sajour-caju*. Entretanto, polissacarídeos obtidos desta espécie parecem apresentar maior atividade antitumoral, pois em experimentos realizados por Dalonso *et al.* (2010), polissacarídeos extraídos de corpos de frutificação de *P. sajour-caju* apresentaram maior taxa de redução (85%) no número de células neoplásicas (de tumor ascítico de Ehrlich), inoculadas em camundongos, que polissacarídeos extraídos de corpos de frutificação de *P. ostreatus* (72%) investigados por Wolff *et al.* (2008). Este fato justifica a busca pela maximização da produção de EPS por *P. sajour-caju* e a validação *in vivo* de sua atividade.

### 4.3 TESTE ANTITUMORAL *in vivo*

Na figura 16 são apresentados a massa média (a) e o volume médio (b) tumoral dos camundongos do grupo controle positivo (CP) e dos camundongos pertencentes aos grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de precipitado polissacarídico (PE1), obtido com a adição de etanol ao caldo de cultivo de *P. sajor-caju*, segundo metodologia proposta por Pokhrel & Ohga (2007).

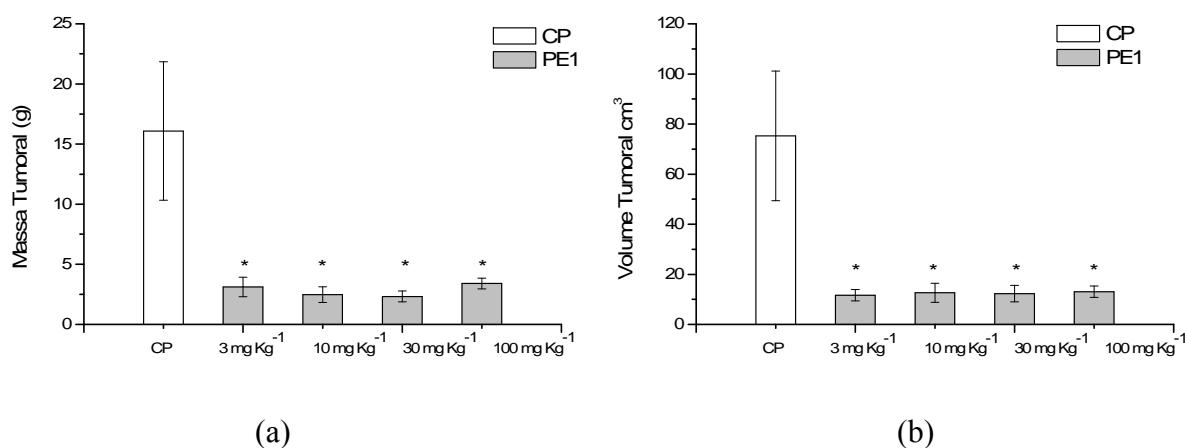


Figura 16 – (a) Massa média±erro padrão do tumor (g) do grupo controle (CP) e dos grupos testes; (b) Volume médio±erro padrão do tumor (cm<sup>3</sup>) do grupo controle (CP) e dos grupos testes. Grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de precipitado obtido pela adição de etanol ao caldo de cultivo de *P. sajor-caju* segundo a metodologia de Pokhrel & Ohga (2007) (PE1). \* representa existência de diferença significativa em relação ao grupo controle.

Ao analisar as figuras 16 (a) e (b) observa-se que houve diferença significativa tanto para valores de massa média quanto para volume médio dos animais do grupo controle positivo (CP) quando comparado aos grupos testes para todas as doses (3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup>), porém não houve diferença significativa entre os grupos testes nas diferentes doses de tratamento.

Na figura 17 são apresentados a massa média e o volume médio do tumor dos camundongos do grupo controle positivo (CP) e dos camundongos dos grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> do extrato polissacarídico (PM1) obtido a partir do micélio de *P. sajor-caju*, segundo a metodologia proposta por Pokhrel & Ohga (2007).

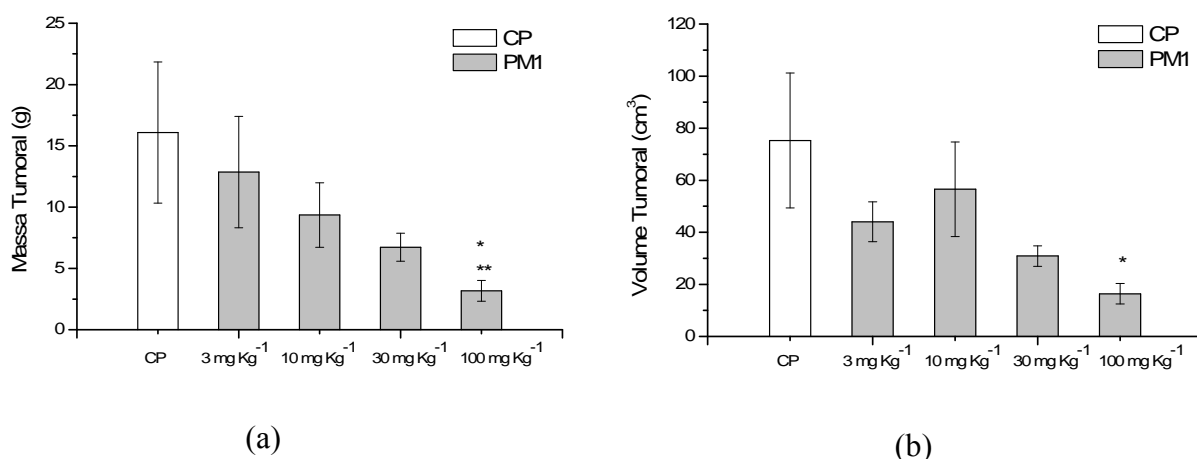


Figura 17 – (a) Massa média $\pm$ erro padrão do tumor (g) dos camundongos grupo controle (CP) e dos grupos testes; (b) Volume médio $\pm$ erro padrão do tumor (cm<sup>3</sup>) dos camundongos CP. Grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de extrato obtido do micélio segundo a metodologia de Pokhrel & Ohga (2007) (PM1). \* representa existência de diferença significativa em relação ao grupo controle; \*\* representa existência de diferença significativa em relação aos grupos tratados com 3, 10 e 30 mg kg<sup>-1</sup>.

Observa-se que não há diferença significativa nos valores de massa média do grupo controle quando comparado aos grupos tratados com as doses de 3, 10 e 30 mg kg<sup>-1</sup> do extrato PM1 (figura 17a), como também não há diferença significativa entre os grupos tratados com estas doses. Porém, há diferença significativa quando compara-se a massa média do tumor do grupo tratado com a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> em relação ao grupo controle positivo, assim como, em relação aos grupos tratados com as doses de 3, 10 e 30 mg kg<sup>-1</sup> de extrato PM1.

Da mesma forma, analisando-se a figura 17 (b), observa-se que não existe diferença significativa para o volume médio do tumor dos grupos testes tratados com as doses de 3, 10 e 30 mg Kg<sup>-1</sup> quando comparados com o controle positivo, mas existe diferença significativa entre a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> do extrato PM1 e o grupo controle positivo. Porém, não foi identificada diferença significativa no volume médio do tumor quando comparados os grupos testes nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> entre si.

A figura 18 apresenta a massa média e o volume médio tumoral dos camundongos do grupo CP e dos camundongos dos grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100mg kg<sup>-1</sup> de extrato polissacarídico obtido do micélio de *P. sajor-caju*, segundo a metodologia proposta por Jose *et al.* (2004), denominado de PM2.

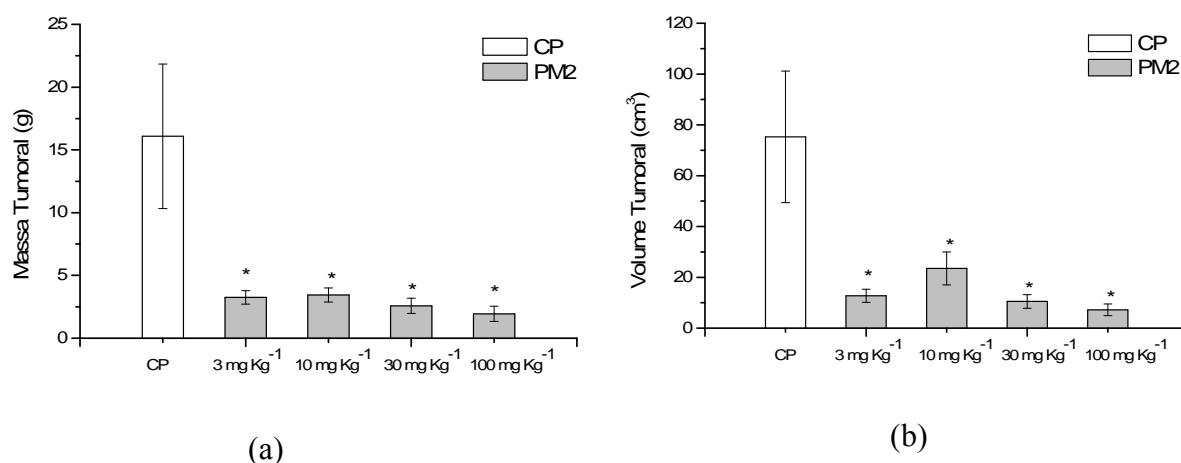
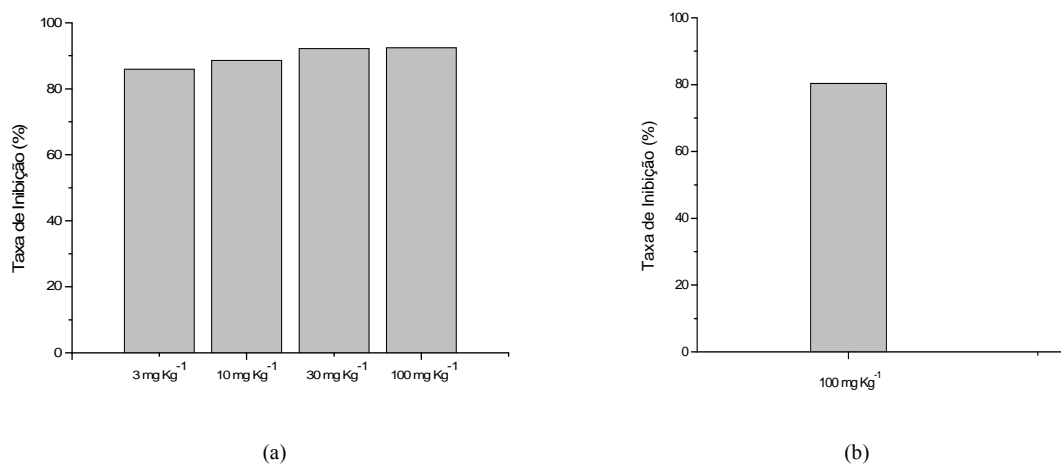


Figura 18 – (a) Massa média±erro padrão do tumor (g) dos camundongos grupo controle (CP) e dos grupos testes; (b) Volume médio±erro padrão do tumor (cm<sup>3</sup>) dos camundongos CP e dos grupos testes. Grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de extrato obtido do micélio segundo metodologia de Jose *et al.* (2004) (PM2). \* representa existência de diferença significativa em relação ao grupo controle.

Observa-se na figura 18 (a) que os valores da massa média tumoral dos grupos testes nas quatro doses avaliadas apresentam diferença significativa em relação ao grupo controle, mas não apresentam diferença significativa quando comparadas entre si. Este mesmo comportamento é observado na Figura 18 (b) para o volume tumoral.

Na figura 19 são apresentadas as taxas de inibição tumoral obtidas utilizando-se os extratos PE1, PM1 e PM2. Cabe destacar que na plotagem desta figura são apresentados apenas os casos em que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das massas tumorais obtidas nos grupos teste e controle positivo.



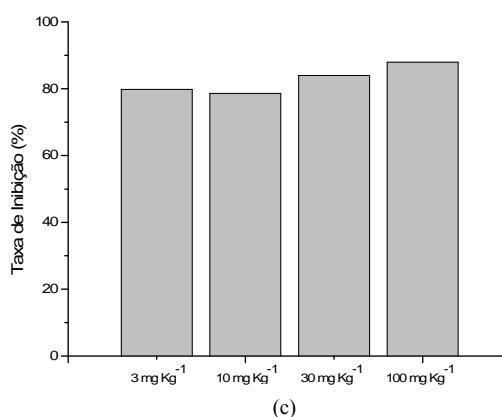


Figura 19 – Taxa de inibição do crescimento (%) de S180 para os grupos testes tratados com doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de (a) precipitado obtido por adição de etanol ao caldo de cultivo (POKHREL & OHGA, 2007) (PE1), (b) extrato obtido do micélio segundo metodologia de Pokhrel & Ohga (2007) (PM1) e (c) extrato obtido do micélio segundo metodologia de Jose *et al.* (2004) (PM2).

Analisando a figura 19 observa-se que todas as doses testadas para o precipitado polissacarídico PE1 e para o extrato PM2 apresentaram taxas de inibição da ordem de 86% e 82%, respectivamente, em relação ao controle positivo. No caso do extrato polissacarídico PM1, apenas a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> apresentou redução tumoral (80%), já que para as demais doses não observou-se diferença estatisticamente significativa no peso tumoral em relação ao controle.

Moradali *et al.* (2007), em estudos sobre o efeito inibitório do crescimento de tumores por extratos aquosos de várias espécies de macrofungos, obtiveram redução do crescimento tumoral do S180 variando de 42 a 100%. Fortes & Novaes (2006) sugerem que substâncias extraídas dos fungos são capazes de modular a carcinogênese, principalmente estimulando o sistema imunológico. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os encontrados na literatura, mostrando redução do crescimento tumoral superior a 79%.

Fan *et al.* (2007) obtiveram redução de 72,2% do crescimento tumoral do S180, quando realizaram o tratamento com extratos do caldo de cultivo de *Agaricus brasiliensis*, resultado inferior aos obtidos neste trabalho. Sarangi *et al.* (2006) relatam que três frações de proteoglicanas extraídas do micélio de *P. ostreatus* promoveram a redução do crescimento do S180 de 48%, 76,94% e 63,7% (Fração I, II e III), quando utilizaram a dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> dos extratos. Quando compara-se os resultados apresentados por Sarangi *et al.* (2006) com os obtidos neste trabalho, tanto com PE1 quanto com PM2, independentemente da dose, observa-se que estes últimos promoveram maior redução do crescimento do S180. Dalonso *et al.* (2010), utilizando frações extraídas do corpo de frutificação da mesma espécie fúngica

deste trabalho (*P. sajor-caju* CCB 019), obtiveram redução de 85% do número de células do Tumor Ascítico de Ehrlich, com o tratamento i.p., por 6 dias consecutivos na dose de 10 mg Kg<sup>-1</sup>.

Wolff (2007) obteve 72% de redução do crescimento do S180 quando realizou o tratamento i.p., por 6 dias consecutivos, na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> de extratos obtidos do caldo de cultivo de *P. ostreatus*. Comparando-se os resultados encontrados por Wolff (2007) com os apresentados neste trabalho, observa-se que houve neste último maior redução do crescimento do S180.

De Barba (2010), utilizando extratos etanólicos (POKHREL & OHGA, 2007) obtidos do caldo de cultivo de *P. djamor*, obteve redução do crescimento do S180 de 60%, 83%, 94% e 64% para as doses de 3, 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, com tratamento i.p. por 10 dias consecutivos. Comparando os resultados da autora com os obtidos neste trabalho com PE1, que utilizou a mesma metodologia, pode-se afirmar que é possível atingir os mesmos níveis de redução tumoral (cerca de 90%) com uma dose menor (3%), quando se utilizada precipitado de *P. sajor-caju* ao invés de *P. djamor*.

Segundo Wasser (2002) é difícil correlacionar a estrutura e a atividade antitumoral de polissacarídeos complexos, pois a atividade da molécula pode estar relacionada a diversos fatores, tais como: a solubilidade dos polissacarídeos em água, o tamanho das moléculas, a proporção de ligações e também à forma destas moléculas.

A caracterização química dos compostos bioativos obtidos não foi objeto do presente trabalho, no entanto, de acordo com a literatura reportada a seguir, sugere-se a presença de polissacarídeos e proteínas em sua composição.

Através do método de Pokhel & Ohga (2007), onde se utilizou o micélio de *P. sajor-caju*, obteve-se um extrato (PM1) que, de acordo com Fukuda *et al.* (2009), provavelmente seja composto de polissacarídeos, proteínas e lipídios.

Mizuno & Zhuang (1995) ao analisarem a atividade antitumoral de extratos de corpos de frutificação de *P. sajor-caju*, observaram que os extratos obtidos apresentaram em sua composição, polissacarídeos associados a proteínas, sendo o mesmo relatado por Dalonso *et al.* (2010), ao caracterizarem a composição dos extratos obtidos dos corpos de frutificação da mesma espécie fúngica.

Os extratos de *P. florida*, obtidos por Jose *et al.* (2004) através da metodologia também utilizada neste trabalho, apresentaram de 60 a 64% de inibição sobre inflamações induzidas em camundongos Balb/c e 95% de inibição de agregação plaquetária humana. A análise fitoquímica preliminar revelou que o extrato metanólico do corpo de frutificação de *P.*

*florida* é composto de polissacarídeos aderidos a proteínas e traços de terpenos e flavonóides. Utilizando a mesma metodologia de extração a partir de micélio de *P. sajor-caju*, o presente trabalho obteve 88% de inibição do desenvolvimento de S180.

A composição das três frações dos extratos etanólicos da biomassa de *P. ostreatus* obtidos por Sarangi *et al.* (2006) demonstraram a presença de proteoglicanas, sendo que nos testes antitumorais a redução dos tumores foram superiores a 48%. Refaie *et al.* (2009) também realizaram a caracterização do precipitado etanólico obtido a partir do caldo de cultivo de *P. ostreatus* e constataram que o precipitado é composto por aproximadamente 93% de carboidratos (galactose, glucose, manose, xilose e arabinose) e 2,5% de proteínas.

Ao analisar os resultados encontrados na literatura referentes à inibição tumoral promovida por extratos ou precipitados fúngicos e os obtidos neste trabalho, observa-se que as substâncias obtidas tanto do caldo de cultivo quanto do micélio de *P. sajor-caju*, têm potencial antitumoral, independentemente do método utilizado para a obtenção dos polissacarídeos.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, a substância que promoveu maiores reduções do crescimento do S180 foi o precipitado PE1, seguido do extrato PM2, independentemente da dose e, finalmente, do extrato PM1 na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos relacionados à composição do meio de cultivo POL revelaram que, dentre as oito formulações propostas pelo planejamento experimental, a que proporcionou maior concentração de EPS ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) foi a proposta no experimento 7 ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amônio,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de peptona de soja). Observou-se também que com a utilização deste meio de cultivo os “pellets” miceliais eram menores e, com isso, foi possível garantir melhor homogeneização do meio de cultivo.

Em relação ao estudo da influência do pH sobre a produção de EPS, observou-se que os valores do fator de conversão de substrato em EPS, assim como das concentrações e produtividades global e máxima, encontrados em pH 4,0 e pH livre, foram muito similares. Em função disso, optou-se pelo uso do pH 4,0 para a continuidade dos experimentos, pois em valores de pH dessa ordem o carbonato de cálcio dissolve-se mais facilmente, deixando o meio de cultivo translúcido, permitindo sua melhor visualização e, conseqüentemente, facilitando a identificação de contaminações e do próprio crescimento micelial. Nos cultivos em pH 3,0 não ocorreu consumo de glicose, produção de biomassa e EPS. Cabe ainda destacar que a análise cinética mostrou que no cultivo em pH controlado em 4,0, a síntese de EPS foi associada ao crescimento, enquanto que em pH livre a produção foi parcialmente associada ao crescimento.

Os cultivos realizados para avaliar a influência dos íons cálcio sobre a produção de EPS mostraram que as produtividades total ( $Q_p$ ) e máxima ( $Q_{p_{max}}$ ) em EPS foram, respectivamente, 114,5% e 125,7% maiores nos cultivos com adição de  $\text{CaCO}_3$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Desta forma, optou-se pela utilização da adição de carbonato de cálcio no meio de cultivo para a continuidade dos experimentos, objetivando, principalmente, a produção de polissacarídeos extracelulares.

Os resultados do estudo da influência da concentração inicial de glicose sobre a produção de EPS demonstraram que a variação da concentração máxima ( $\Delta_{p_m}$ ) em EPS nos cultivos com  $60 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial, foi 101,4% superior àquela observada no cultivo com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial. Contudo, a produtividade total em EPS ( $Q_p$ ) foi 42,2% inferior àquela obtida no cultivo com  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Portanto, como cultivos longos apresentam maiores riscos de contaminação, dificultando o manejo em escala industrial, optou-se por utilizar  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial no meio de cultivo para produção de EPS por *P. sajor-caju* ao invés de



60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial. A análise cinética demonstrou que em ambas as condições, a síntese de EPS foi parcialmente associada ao crescimento.

Com relação aos testes antitumorais, tanto as substâncias obtidas do caldo de cultivo quanto do micélio de *P. sajor-caju*, apresentaram potencial antitumoral. A substância que promoveu maiores reduções do crescimento do S180 foi o precipitado PE1, seguido do extrato PM2, independentemente da dose e, finalmente, do extrato PM1 na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>.

## PERSPECTIVAS

Para trabalhos futuros sugere-se que sejam: isolados e caracterizados os polissacarídeos obtidos do caldo de cultivo e do micélio de *P. sajor-caju*; avaliada a atividade antitumoral em outros modelos tumorais, para comprovar o efeito antitumoral em outros tipos de células neoplásicas; realizados testes de sobrevivência dos animais e também avaliada a citotoxicidade dos extratos *in vitro*; estudada a atividade antitumoral das substâncias em nível molecular, com a finalidade de compreender sua atuação sobre as células neoplásicas.

## REFERÊNCIAS

- AIDA, F. M. N. A.; SHUHAIMI, M.; YAZID, M.; MAARUF, A. G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, n. 2, p. 567-575, 2009.
- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. J. **Ethnopharm.**, n. 84, p. 157-162, 2003.
- ALCAMO, I. E. **Fundamentals of microbiology**. 6. ed. Jones and Bartlett Publishers, 2000.
- ALMEIDA, J.R.C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, 2004. 358 p.
- ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 47-52, 2004.
- ASSEF, M. L. M. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an a-d-glucan from the lichen Ramalina celastri. **Brazilian Journal of Morphological Science**, [S.l.]. v.19. n. 2, p. 49-54, 2002.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; SMIDERLE, F. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive effects of (1/3),(1/6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.
- BENJAMINI, E.; COICO R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- BONATTI, M; Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. **Revista saúde e meio ambiente**, v.4, n.1, p.31-35, 2002.
- 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, n. 3, p. 425-428, 2004.
- BORGES, G. **Produção de polissacarídeos extracelulares de potencial antitumoral por *Pleurotus djamor* Univelle 001 em processo descontínuo**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2009.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde (1996). Resolução 196/96. In: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa. Normas para pesquisa em seres humanos. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 19 Maio 2009.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 252-257, 2006.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ROSA, M. C. C.; TORRI, G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual partially 3-O-methylated  $\alpha$ -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 252–257, 2008.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. The fungi. 2 ed., 2001, p. 588.

CASTRO, A. L. A.; PAIVA, P. C. A.; BANYS, V. L.; DIAS, E. S.; SANTOS, J. Avaliação da produção de *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer utilizando resíduo do beneficiamento têxtil do algodão como substrato. **Ciênc. Agrotec.**, v. 31, n. 5, p. 1286-1290, 2007.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. **Italian Journal of Food Science**, v. 1, p. 9-15, 1992.

CHANG, SHU-TING; MILES, PHILIP G. **Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2. ed.: Ed. CRC, 2004. p. 431.

CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G.; YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A  $\beta$ -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 629–633, 2000.

COLLEONI-SIRGHIE, M.; FULTON, D. B.; WHITE, P. J. Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- $\beta$ -D-glucans from high- $\beta$ -glucan and tradicional oat lines. **Carbohydr. Polym**, v. 54, n. 2, p. 237-249, 2003.

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. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 1149–1155, 2008.

CUNHA, M. A. A.; PAWLAK, M. P.; FABBRIS, E. Z.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Produção de exopolissacarídeo pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*. **MMPL**, VI Semana de Tecnologia em Alimentos (UTFPR), v. 02, n. 20, 2008.

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. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 160, n. 8, p. 2265-2274, 2010.

DAS, D.; MONDAL, S.; ROY, S. K.; MAITI, D.; BHUNIA, B.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. A (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucan from a somatic hybrid of *Pleurotus florida* and

*Volvariella volvacea*: isolation, characterization, and study of immunoenhancing properties. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 974–978, 2010.

DEACON, J. W. **Fungal Biology**. 4. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006.

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) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do Cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. Agrotec.**, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

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

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

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educa, 2004.

FAUCI, A.S.; KASPER, D.L; BRAUNWALD, E.; ANTHONY, S. **Harison Medicina Interna**. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1998.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of 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.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 420-424, 2006.

FORTES, R. C.; TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G. The immunomodulator role of  $\beta$ -D-Glucans as co-adjuvant for cancer therapy. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 21, n.2, p. 163-168, 2006.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

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, Londrina**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

FUNLAN, S. A.; GERN, R. M. M.; WISBECK, B.; BONATTI, M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, H. H. Possibilities of *Pleurotus* applications in food, health and environmental technologies. In: KOUTINAS, A.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Current topics on Bioprocesses in Food Industry**. Nova Delhi: Asiatech, 2008. p. 482-495.

FURLAN, S. A. ; VIRMOND, L. J. ; MIERS, D. ; 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.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potencial antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 9, p. 76–82, 2008.

GUERRERO, R. T.; HOMRICH, M. H. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul**. 2. ed.: Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999. p. 124.

GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, M. J.; ALMENDROS, G.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; MARTÍNEZ, A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **The Science of the Total Environment**, v. 167, p. 315-328, 1995.

GUZMAN, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr) Pl Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. **Internacional Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 2, p. 29-37, 2000.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: 1,5 million species estimate revised. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HUANG, Q., JIN, Y., ZHANG, L., CHEUNG, P. C. K., KENNEDY, J. F. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 3, p. 324-333, 2007.

HUANG, H.; LIU, Y. Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Grifola umbellata*. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v.39, n. 4, p.307-311, 2008.

HWANG, H.; KIM, S.; CHOI, J.; YUN, J. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 3, p. 309-319, 2003.

IWALOKUN, B. A.; USEN, U. A.; OTUNBA, A. A.; OLUKOYA, D. K. Comparative phytochemical evolution, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 15, p. 1732-1739, 2007.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 228-234, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 13 ed., 2002. p. 777.

JOSE, N.; AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 43-46, 2004.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KARÁCSONYI, S., KUNIAK, L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble  $\beta$ -D-glucan. *Carbohydrate Polymers*, n. 24, p. 107-111, 1994.

KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; CARNONERO, E. R.; ALQUINI, G.; ROSA, M. C. C.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. The origin of mannans found in submerged culture of basidiomycetes. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1052-1056, 2010.

KONG, WON-SIK. Descriptions of commercially important *Pleurotus* species. In: **Mushroom Growers Handbook 1. Oyster Mushroom Cultivation**. Seoul: MushWord, 2004. p. 54-61.

LAKSHMI, B.; AJITH, T. A.; JOSE, N.; JANARDHANAN, K. K. Antimutagenic activity of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo[*a*]pyrene. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, n. 2, p. 297-303, 2006.

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.

LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYOA, H. B.; CHOEB, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n. 5, p.369-376, 2004.

LEE, YUN-LYUL; KIM, HEUI-JIN; LEE, MI-SOOK; HAN, JIN-SOO; HONG, EUK-KI; KWON, MYUNG-SANG; LEE, MIN-JAE. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 Strain) inhibited tumor growth in a Sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v. 52, n. 5, p. 371-375, 2003.

LEE, Y. L.; HUANG, G. W.; LIANG, Z. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 823-833, 2007.

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.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic Complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473, 2006.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R. B-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 658, p. 154-161, 2008.

MANZI, P.; AGUZZI, A. PIZZOFERRATO, L. Nutricional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, v. 73, p. 321-325, 2001.

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, p. 77-84, 1999.

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. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1996.

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. **Carbohydrate Research**, v. 129, p. 209-227, 1984.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Antitumor polysaccharide from the micelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Mill. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, n.4, p. 707-714, 1999.

MIZUNO, T., ZHUANG, C. Houbitake, *Pleurotus sajor-caju*: antitumor activity and utilization. **Food Review International**, New York, v. 11, n. 1, p. 185-187, 1995.

MODA, E. M.; HORII, J.; SPOTO, M. H. F. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. **Sci. Agric.**, v. 62, n. 2, p. 127-132, 2005.

MOONMOON, M.; UDDIN, N. AHMED, S. SHELLY, N. J.; KHAN, A. Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangaldesh. **Saudi journal of Biological Sciences**, article in press, doi:10.1016/j.sjbs.2010.12.008, 2010.

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.

MUNARI, F. M.; GAIO, T. A.; CALLONI, R.; DILLON, A. J. P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 1383-1392, 2008.

NAKAMURA, T.; MATSUGO, S.; UZUKA, Y.; MATSUO, S.; KAWAGOSJO, H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phelinus linteus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 68, n. 4, p. 868-872, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NOVAES, M. R. C. G.; NOVAES, L. C. G.; TAVEIRA, V. C. Natural products from *Agaricales* medicinal mushrooms: biology, nutritional properties, and pharmacological effects on cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 4, p. 411-420, 2007.

OLIVEIRA-JUNIOR, R. J. **Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2008.



OLIVEIRA, M. A.; DONEGA, M. A.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Produção do inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonaris* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, p. 84-87, 2007.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. **Current Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 715-729, 2000.

PAGNO, T.; BLIND, L.Z.; BIAVATTI, M.W. AND KREUGER, M.R.O. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, online ahead of print, 2006.

PAPASPYRIDIS, L. M.; KATAPODIS, P.; GONOU-ZAGOU, Z.; KAPSANAKI-GOTSI, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 131–138, 2010.

PAPAGIANI, P. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PAPINUTTI, L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1941-1946, 2010.

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. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

POKHREL, C. P.; OHGA, S. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 641-646, 2007.

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

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 629–636, 2005.

PRESCOTT, LANSING M.; HARLEY, JOHN P.; KLEIN, DONALD A. **Microbiology**. 5. ed. McGraw Hill, 2002.

PURNOMO, A. S.; MORI, T.; KAMEI, I.; NISHII, T.; KONDO, R. Application of mushroom waste medium from *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 5, p. 397-402, 2010.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

RAJAN, S. SUNDARA. **Introduction to fungi**. New Delhi: Anmol Publications PVT. LTD, 2001. 299 p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2007.

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 International**, v. 21, n. 2, p. 67-75, 2009.

REMIÃO, J. O.R.; SIQUEIRA, A.J.S.; AZEVEDO, A.M.P. **Bioquímica. Guia de aulas práticas**. EDIPUCRS: Porto Alegre, 2003. 214 p.

RIEGER, P. T. Bioterápia. In: OTTO, Shirley E. **Enfermagem em Quimioterapia**. 3.ed., Loures: Lusociência. 631-676, 2000.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's Q parameter and related subrange 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  $\alpha$ -D-galactan and  $\alpha$ -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.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ISLAM, S. S. The structure of a polysaccharide from fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 995-1002, 2006.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ISLAM, S. S. Chemical analysis of a new (1→3), (1→6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2533-2539, 2005.

ROY, S. K.; MAITI, D.; MONDAL, S.; DAS, D.; ISLAM, S. S. Structural analysis of a polysaccharide isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*, cultivar Black Japan. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 1108-1113, 2008.

RUBEL, R. **Produção de Compostos Bioativos de *Ganoderma lucidum* por Fermentação em estado sólido: Avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos - Área de concentração: Saúde Humana e Animal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ALQUINI, G.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A novel branched  $\alpha\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 309-314, 2008.

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.

SARNTHINA, R.; KHAMMUANG, S. Evaluation of dyes decolourisation by the crude enzyme from *Pleurotus sajor-caju* grown on sorghum seed media. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 62-67, 2008.

SHARMA, O. P. **Textbook of fungi**. New Delhi: Ed. Tata McGraw-Hill, 1989. p. 365.

SHASHIREKHA, M. N.; RAJARATHNAM, S. ; BANO, Z. Enhancement of bioconversion efficiency and chemistry of the mushroom, *Pleurotus sajor-caju* (Berk and Br.) Sacc. reduced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 27-31, 2002.

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

SOUSA, M. R. Q.; NASCIMENTO, S. C.; CORREIA, M. J. Evaluation of antitumoral activity of a fraction of water-soluble components of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 165-168, 2004.

SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 983–986, 2009.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Limerick, v. 16, p. 41-46, 1998.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* murill and Its mechanism of action. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

TAM, S. C.; YIP, K. P.; CHANG, F.; CHANG, S. T. Hypotensive and renal effects of extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Life Sciences**, v. 38, p. 1155-1161, 1986.

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

TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. Consumo de cogumelos na nutrição humana: uma revisão da literatura. **Com. Ciências Saúde**, v. 18, n. 4, p. 315-322, 2007.

TRINDER, R. **Annual Clinical Biochemistry**. In: CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo. Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E, 1969.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L. JIANG, R.; SUN, D. T. 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.

VERÇOSA JUNIOR, D. *et al.* Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n.1, p. 150-154, feb., 2006.

WALKER, GRAEME M.; WHITE, NIA A. Introduction to fungal physiology. *In*: KAVANAGH, KEVIN. **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2005. p. 1-34.

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

WASSER S.P. Medicinal mushrooms as source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 60, p. 258–274, 2002.

WASONGA, C. G. O.; OKOTH, S. A.; MUKURIA, J. C.; OMWANDHO, C. O. A. Mushroom polysaccharide extracts delay progression of carcinogenesis in mice. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 7, p. 147-152, 2008.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. 3. ed. Nova York: Cambridge University Press, 2007.

WILLIAMS, D. L. Overview of (1→3)-β-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 de exopolissacarídeos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISBECK, E. ; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. **Revista Saúde e Ambiente (UNIVILLE)**, v. 6, p. 19-22, 2005.

WOLFF, E.R.S. **Estudo in vivo da atividade antitumoral de substâncias bioativas sintetizadas por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 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*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 151, p. 402-412, 2008.

WORKMAN, P.; ABOAGYE, E. O.; BALKWILL, F.; BALMAIN, A. BRUDER, G.; CHAPLIN, D. J.; DOUBLE, J. A.; EVERITT, J.; FARNINGHAM, D. A. H.; GLENNIE, M. J.; KELLAND, L. R.; ROBINSON, V.; STRATFORD, I. J.; TOZER, G. M.; WATSON, S.; WEDGE, S. R.; ECCLES, S. A.; NAVARATNAM, V.; RYDER, S. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 1555 – 1577, 2010.

WU, J. Z.; CHEUNG, C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer—Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. **Food Chemistry**, v. 81, p. 389-393, 2003.

WU, J. Z.; CHEUNG, C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio

of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry**, v. 85, p. 101-105, 2004.

XIAO, J.; DAI-XIONG CHEN, D.; WAN, W.; HU, X.; QI, Y.; LIANG, Z. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. **Process Biochemistry**, v.41, p.1887-1893, 2006.

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

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*. **Bios. Biotech. Biochem.**, v. 58, n.7, 1195-1201, 1994.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; CHIU, L. C. M.; WONG, E. Y. L.; OOI, V. E. C. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated  $\beta$ -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.455-462, 2006.

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.

ZUCKERBERG, C. Ultraestructura of Sarcoma 180. **Cancer Res.**, v. 33, p. 2278-2282, 1973.

**ANEXOS**

**OFÍCIO N.º 032/2008 – PRPPG/CEP**

**Parecer Processo nº 002/08 – COEA**

**Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE.**

**APÊNDICES**



## APÊNDICE 1

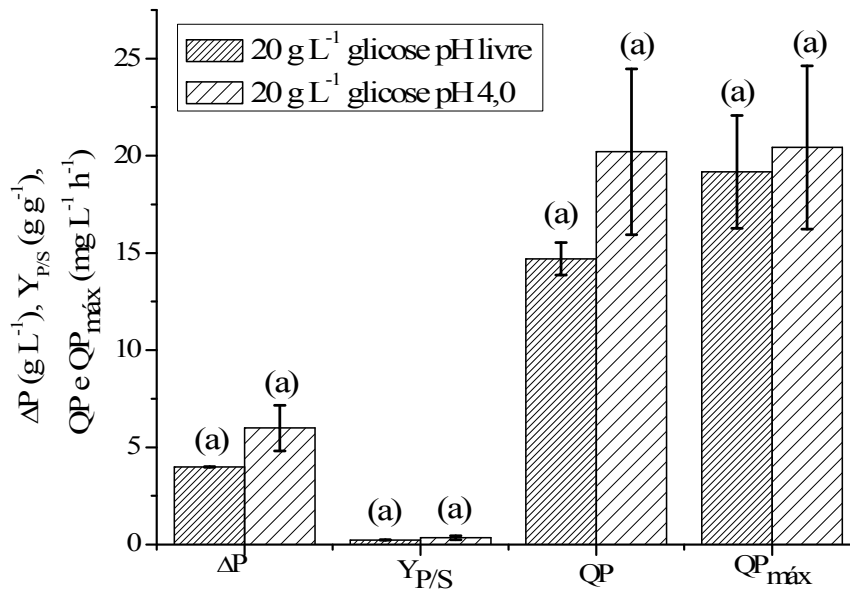


Figura 1 – Valores de  $\square P$  (g L<sup>-1</sup>),  $Y_{P/S}$  (g g<sup>-1</sup>),  $Q_P$  (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e  $Q_{Pmax}$  (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) nos cultivos com 20g L<sup>-1</sup> de glicose em pH livre e pH 4,0. As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores de  $\square P$ ,  $Y_{P/S}$ ,  $Q_P$  e  $Q_{Pmax}$  significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

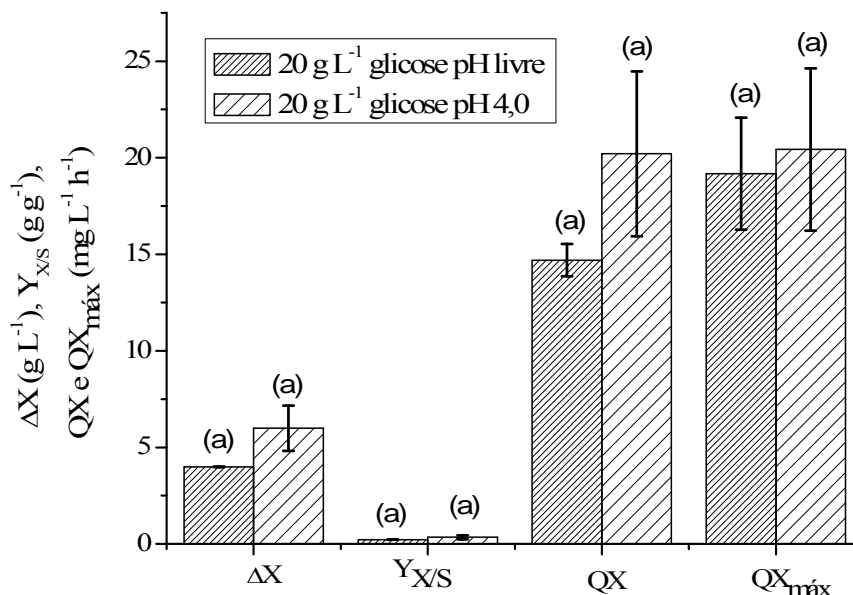


Figura 2 – Valores de  $\square X$  (g L<sup>-1</sup>),  $Y_{X/S}$  (g g<sup>-1</sup>),  $Q_X$  (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e  $Q_{Xmax}$  (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) nos cultivos com 20g L<sup>-1</sup> de glicose em pH livre e pH 4,0. As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores de  $\square X$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $Q_X$  e  $Q_{Xmax}$  significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## APÊNDICE 2

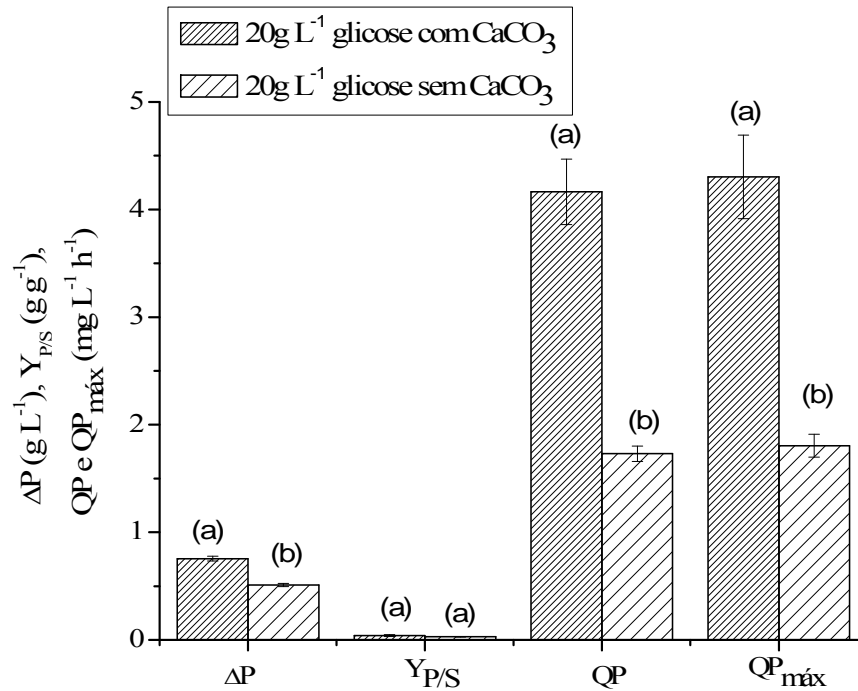


Figura 3 – Valores de  $\Delta P$  ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $Y_{P/S}$  ( $\text{g g}^{-1}$ ),  $Q_P$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) e  $Q_{P_{\text{max}}}$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) nos cultivos com  $20 \text{g L}^{-1}$  de glicose com e sem  $\text{CaCO}_3$ . As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores de  $\Delta P$ ,  $Y_{P/S}$ ,  $Q_P$  e  $Q_{P_{\text{max}}}$  significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

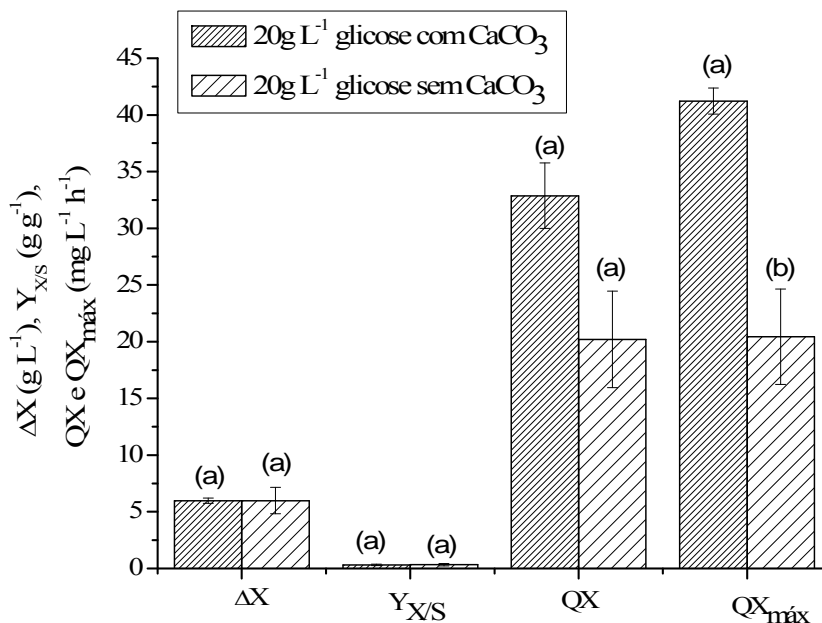


Figura 4 – Valores de  $\Delta X$  ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $Y_{X/S}$  ( $\text{g g}^{-1}$ ),  $Q_X$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) e  $Q_{X_{\text{max}}}$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) nos cultivos com  $20 \text{g L}^{-1}$  de glicose com e sem  $\text{CaCO}_3$ . As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores de  $\Delta X$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $Q_X$  e  $Q_{X_{\text{max}}}$  significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## APÊNDICE 3

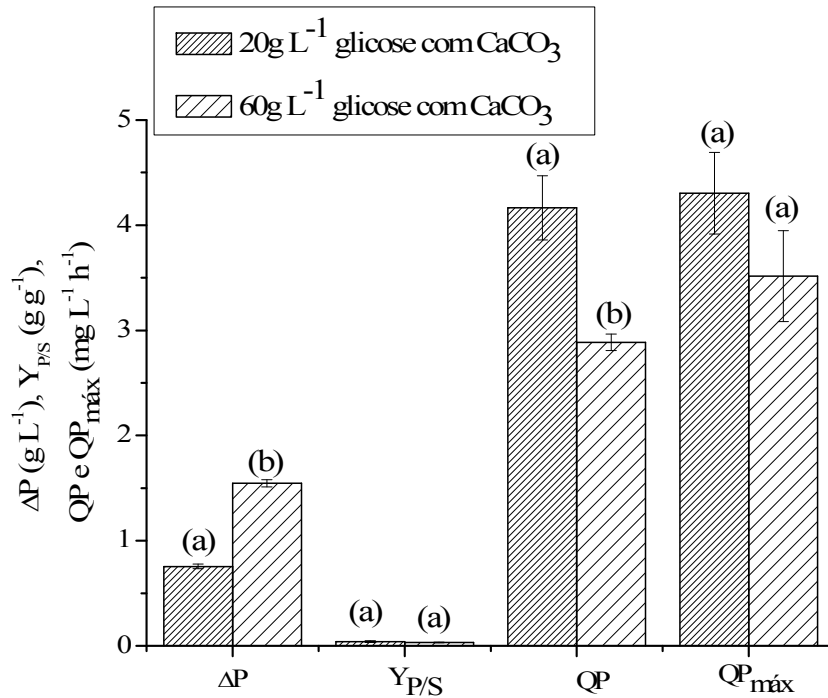


Figura 3 – Valores de  $\square P$  ( $g L^{-1}$ ),  $Y_{P/S}$  ( $g g^{-1}$ ),  $Q_P$  ( $mg L^{-1} h^{-1}$ ) e  $Q_{Pmax}$  ( $mg L^{-1} h^{-1}$ ) nos cultivos com  $20g L^{-1}$  e  $60 g L^{-1}$  de glicose inicial com  $CaCO_3$ . As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores de  $\square P$ ,  $Y_{P/S}$ ,  $Q_P$  e  $Q_{Pmax}$  significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

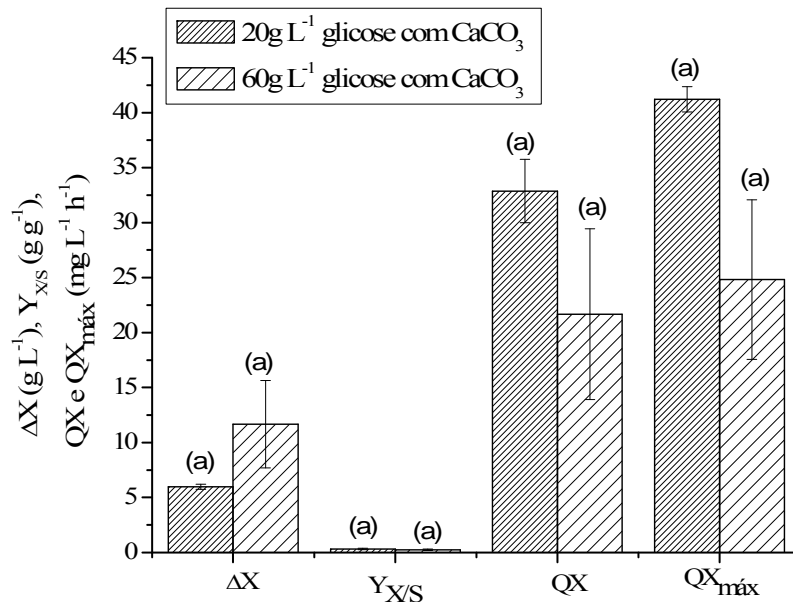


Figura 4 – Valores de  $\square X$  ( $g L^{-1}$ ),  $Y_{X/S}$  ( $g g^{-1}$ ),  $Q_X$  ( $mg L^{-1} h^{-1}$ ) e  $Q_{Xmax}$  ( $mg L^{-1} h^{-1}$ ) nos cultivos com  $20g L^{-1}$  e  $60 g L^{-1}$  de glicose inicial com  $CaCO_3$ . As barras indicam a média  $\pm$  desvio-padrão. Letras superiores diferentes entre as colunas dos valores de  $\square X$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $Q_X$  e  $Q_{Xmax}$  significam médias com diferença significativa pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## APÊNDICE 4

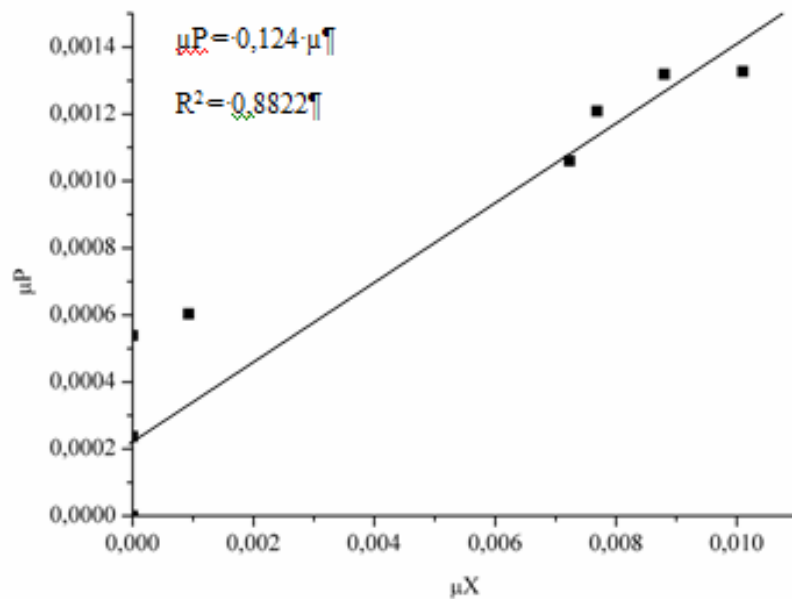


Figura 5 – Cinética de Gaden - Curva de velocidade específica de formação de EPS ( $\mu_P$ ) em relação à velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ) dos experimentos realizados em pH livre (espontâneo), 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial sem adição de CaCO<sub>3</sub>, calculados pelo método Le Duy Zarjic.

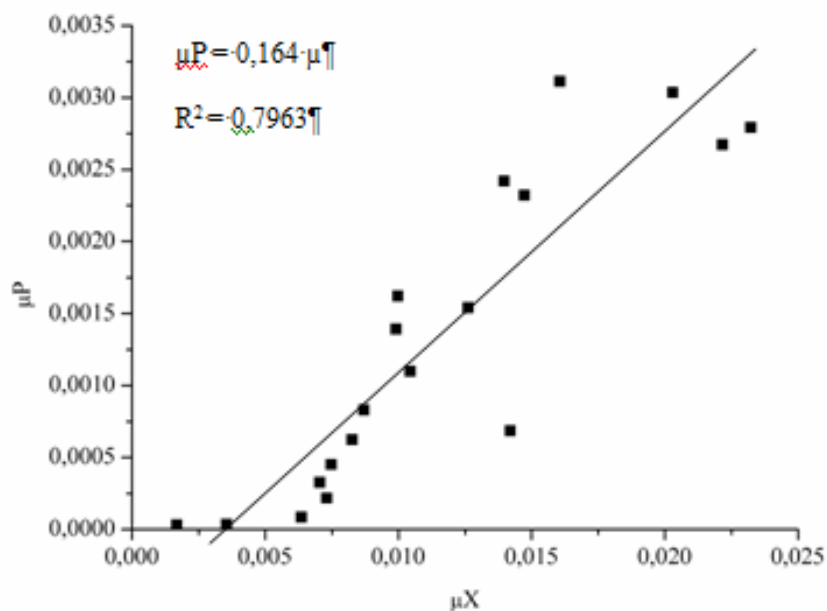


Figura 6 - Cinética de Gaden - Curva de velocidade específica de formação de EPS ( $\mu_P$ ) em relação à velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ) dos experimentos realizados em pH 4,0, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial sem adição de CaCO<sub>3</sub>, calculados pelo método Le Duy Zarjic.

## APÊNDICE 5

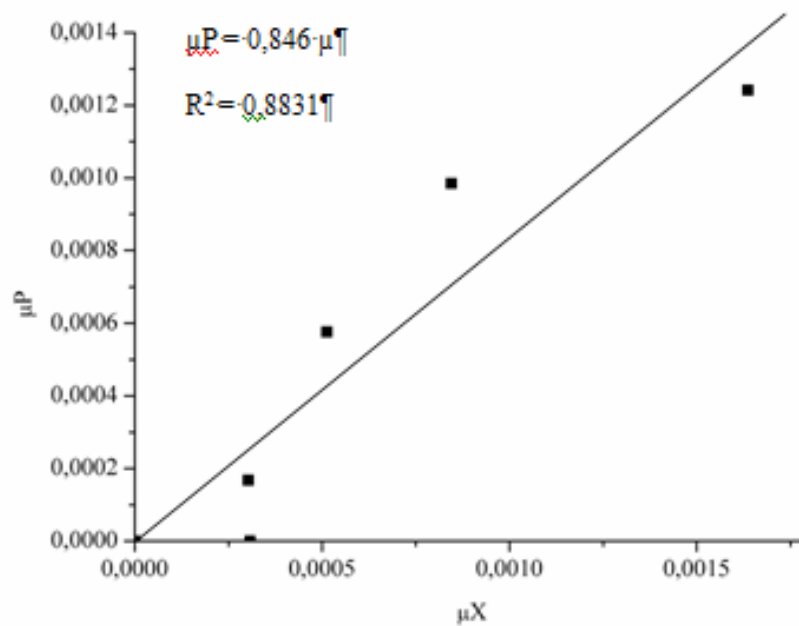


Figura 7 - Cinética de Gaden - Curva de velocidade específica de formação de EPS ( $\mu_P$ ) em relação à velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ) dos experimentos realizados em pH 4,0, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO<sub>3</sub> (1 g L<sup>-1</sup>), calculados pelo método Le Duy Zarjic.

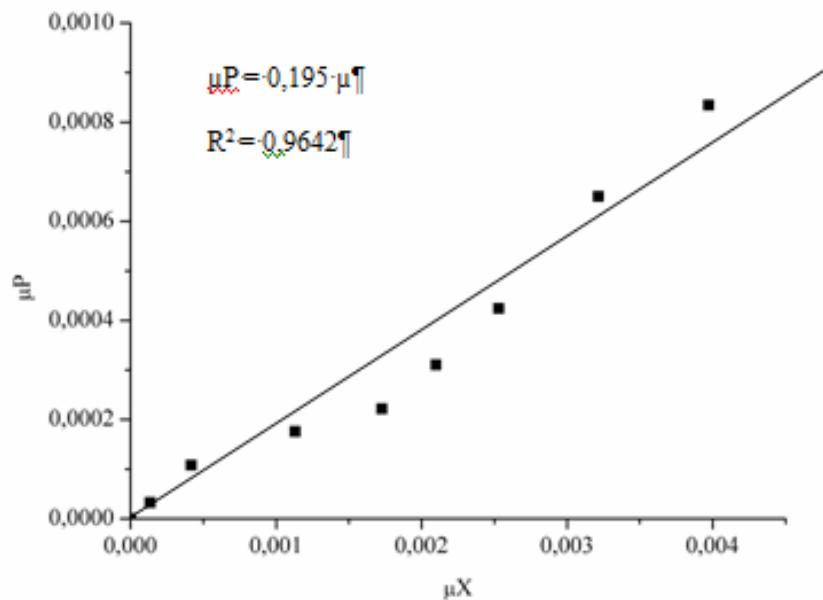


Figura 8 - Cinética de Gaden - Curva de velocidade específica de formação de EPS ( $\mu_P$ ) em relação à velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ) dos experimentos realizados em pH 4,0, 60 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial com adição de CaCO<sub>3</sub> (1 g L<sup>-1</sup>), calculados pelo método Le Duy Zarjic.