



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THIAGO MAGALHÃES FARIAS MENEZES

Isolamento dos polissacarídeos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*: caracterização estrutural, estudo reológico e potencial para uso terapêutico.

Fortaleza

2014

THIAGO MAGALHÃES FARIAS MENEZES

Isolamento dos polissacarídeos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*: caracterização estrutural, estudo reológico e potencial para uso terapêutico.

Dissertação de Mestrado Submetida à comissão do Curso de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial do Título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra de Aguiar Soares.

Coorientador: Prof. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

FORTALEZA

2014

THIAGO MAGALHÃES FARIAS MENEZES

Isolamento dos polissacarídeos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*: caracterização estrutural, estudo reológico e potencial para uso terapêutico.

Dissertação de Mestrado Submetida à comissão do Curso de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial do Título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em: ___ / ___ / ___.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra de Aguiar Soares (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Tamara Gonçalves Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus por mais uma realização profissional. Por ter me dado força e coragem para superar este grande desafio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a sua infinita misericórdia, amor incondicional e por ter me dado a oportunidade de realizar este sonho.

A meus pais, esposa, irmãos e demais familiares pelo carinho e compreensão.

A minha orientadora Sandra e coorientadora Nágila, pela oportunidade, amizade, respeito, atenção e por serem um referencial na pesquisa e no ensino.

As professoras Pablyana e Judith por ter contribuído no desenvolvimento do meu trabalho.

A Juliana Gaspar e Francisco Rodrigo pelo incentivo em fazer a seleção para o mestrado.

Aos amigos André, Moacir, Bruno e Thiago pela parceria durante as disciplinas do mestrado.

Aos grandes amigos Roberto, Leônia, Solange, Lillian, Arcelina, Ethanielda e Katarina pelas contribuições durante estes dois anos de trabalho. Por serem exemplos de profissionais e amizade. Pelos momentos de conversas e sugestões que foram valiosos para desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos que fizeram parte do grupo LABPIM durante este período: Arcelina, Rafael, Carol, Roberto, Solange, Lillian, Katarina, Flávia, Igor, Débora, Régis, Aurélio, Denilton, Natália, Ethanielda e Luana.

Aos colegas do LABPOL, Natália e Vinícius pela ajuda na reologia.

A professora Luciana e sua aluna Angélica pelas análises de Microscopia de Força Atômica.

Aos professores Pierre, Trevisan e Pablyana que compuseram a banca do exame geral de conhecimentos e que foram de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da coordenação da pós-graduação, Célia e Orlando, pela colaboração e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Universidade Federal do Ceará pela estrutura física disponibilizada.

A Funcap e Capes pela bolsa concedida e pelos auxílios financeiros concedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Então Samuel tomou uma pedra, e a pôs entre Mizpá e Sem, e lhe chamou Ebenézer; e disse: Até aqui nos ajudou o Senhor. (I Samuel 7:12)

RESUMO

Estudos têm mostrado que polissacarídeos extraídos de cogumelos estimulam o sistema imunológico e apresentam atividades antiviral, anti-inflamatória e antinociceptiva. A presente pesquisa estuda os polissacarídeos (glucanas) extraídos dos cogumelos *Agaricus blazei* Murill e *Lentinus edodes* objetivando o isolamento, a caracterização química, as propriedades em soluções e sua atividade biológica diante do herpes. Neste trabalho, polissacarídeos constituintes do corpo frutífero dos cogumelos *A. blazei* e *L. edodes* foram isolados em meio aquoso. Os materiais isolados foram caracterizados através da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) e sugerem uma estrutura compatível com glucanas (proteoglucanas) apresentando-se predominante a configuração beta de reconhecida atividade biológica. A análise elementar mostrou um teor de nitrogênio maior para o material extraído do *A. blazei*, o que caracteriza um maior teor de proteínas se comparado aos polissacarídeos obtidos do *L. edodes*. O comportamento reológico dos polissacarídeos purificados foi avaliado em Reômetro TA Instruments modelo AR 550 em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de $0^{\circ}59'1''$ e taxas de cisalhamento de 40 a 800 s^{-1} . As medidas das soluções em concentrações variadas (1, 3, 5, 7 e 10%) foram realizadas em triplicata a 25°C e mostram que para os polissacarídeos extraídos do *A. blazei*, para cada concentração em particular, praticamente não se observa variação na viscosidade, indicando comportamento Newtoniano, porém parece haver uma tendência à elevação quando são aplicadas taxas de cisalhamento mais baixas. Os polissacarídeos do *L. edodes* mostraram comportamento pseudoplástico e uma menor concentração micelar crítica. A análise de cromatografia de permeação em gel revelou uma maior massa molecular média ponderal (Mw) para os polissacarídeos isolados do *A. blazei*, condizente com os resultados da massa molar viscosimétrica. Os dados do AFM revelaram uma estrutura na forma de novelo para a fita polissacarídica obtida do *A. blazei* e uma fita polissacarídica ramificada para o *L. edodes*, o que pode justificar uma menor viscosidade e uma menor concentração micelar crítica para a solução polissacarídica do *A. blazei*. Os diagramas de fases mostram que a presença do polissacarídeo diminui a faixa de temperatura em que o F127 permanece na fase gel, sendo tal efeito mais evidente nos polissacarídeos extraídos do *A. blazei*. Os dados dos diagramas foram comprovados por meio do módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento (G') e pelo módulo de perda ou de viscosidade (G'').

Palavras chaves: *Agaricus blazei* Murill; *Lentinus edodes*; Polissacarídeos; Caracterização Química; Propriedades em Solução; Diagrama de Fases e Reologia.

ABSTRACT

Studies have shown that polysaccharides extracted from mushrooms stimulate the system immune and exhibit antiviral, anti-inflammatory and antinociceptive activities. This research studies the polysaccharides (glucans) extracted from *A. blazei* Mushroom *L. edodes* and aiming isolation, chemical characterization, properties in solutions and its biological activity against herpes. In this work, the constituent polysaccharides fruiting body of the mushroom *Agaricus blazei* and *L. edodes* were isolated in the aqueous medium. The isolated materials were characterized by infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) and suggest a compatible glucans (proteoglucanas) structure presenting the predominant beta of recognized biological activity setting. The elemental analysis showed the highest level of nitrogen to the material extracted from *A. blazei*, which features a larger protein content with standing to polysaccharides obtained from *L. edodes*. O rheological behavior of the purified polysaccharides was evaluated in rheometer TA Instruments model AR 550 in the cone-plate type sensor 40 mm in diameter and angle 0°59 1" 'and shear rates 40-800 s⁻¹. The measurements of solutions in various concentrations (1, 3, 5, 7 and 10%) were carried out in triplicate at 25 ° C and to show that polysaccharides extracted from *A. blazei* for each particular concentration, almost no variation observed in viscosity, indicating Newtonian behavior, but there seems to be a tendency to increase when lower shear rates are applied. Polysaccharides *L. edodes* showed pseudoplastic behavior and a lower critical micelle concentration. The analysis of gel permeation chromatography revealed a higher weight average molecular weight (Mw) to the polysaccharides isolated from *A. blazei*, consistent with the results of viscosimetric molecular weight. The AFM data show a structure in the form of ball for polysaccharide obtained from *A. blazei* tape, which may explain the lower viscosity. The phase diagrams show that the presence of the polysaccharide lowers the temperature range in which the F127 remains in the gel phase, which is a more obvious effect on the polysaccharide extracted from *A. blazei*.

Keywords: *Agaricus blazei* Murill; *Lentinus edodes*; polysaccharides; Chemical Characterization; Phase Diagram and Rheology.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático das principais estruturas dos cogumelos.	18
Figura 2. Representação das estruturas de glucanas α (1→4) (a) e α (1→6) (b).	19
Figura 3. Representação das estruturas de glucanas β (1→3) (a) e β (1→6) (b).	19
Figura 4. <i>A. blazei</i>	20
Figura 5. <i>L. edodes</i>	21
Figura 6. . Diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela.	23
Figura 7. Estrutura geral dos Pluronic®.	24
Figura 8. Módulo complexo $ G^* $	26
Figura 9. Fluxograma do procedimento de extração e isolamento dos polissacarídeos.	31
Figura 10. Espectro infravermelho dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A. blazei</i> , em pastilha de KBr.	39
Figura 11. Espectro infravermelho dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>L. edodes</i> , em pastilha de KBr.	40
Figura 12. ^{13}C – RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A. blazei</i>	41
Figura 13. ^{13}C – RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>L. edodes</i>	41
Figura 14. ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A. blazei</i>	42
Figura 15. ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>L. edodes</i>	43
Figura 16. Viscosidade reduzida x concentração: (a) <i>A. blazei</i> e (b) <i>L. edodes</i>	45
Figura 17. Viscosidade absoluta x taxa de cisalhamento (40 a 800s ⁻¹) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆). (a) <i>A. blazei</i> e (b) <i>L. edodes</i>	46
Figura 18. Tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento: 40 a 800s ⁻¹ dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados a 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆). (a) <i>A. blazei</i> e (b) <i>L. edodes</i>	47
Figura 19. Cromatograma para as amostras de polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>L. edodes</i> e <i>A. blazei</i>	49
Figura 20. Tensão superficial em função do ln c para soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A. blazei</i> (a) e <i>L. edodes</i> (b).	50
Figura 21. Imagem de MFA no modo “tapping” do polissacarídeo do <i>A. blazei</i> em mica. Área: 500 x 500 nm.	52

Figura 22. Imagem de tapping MFA do polissarídeo do <i>A. blazei</i> em mica. Área:1.89 x 1.89 μm	53
Figura 23.Imagem em 3D da Figura 22.....	53
Figura 24. Imagem de AFM no modo “tapping” do polissacarídeo do <i>L.edodes</i> em mica. Área: 3.255 x 3.255 μm	54
Figura 25. Imagem em 3D da Figura 24.....	54
Figura 26. Diagramas de fases do F127 e da sua mistura com polissacarídeos e/ou glicoproteínas: (a) Polissacarídeos isolados do <i>A. blazei</i> – 1%; (b) Polissacarídeos isolados do <i>A. blazei</i> – 2%; (c) Polissacarídeos isolados do <i>L. edodes</i> – 1%; (d) Polissacarídeos isolados do <i>L.edodes</i> –2%.....	56
Figura 27. Reograma do módulo de armazenamento (G') pela tensão – região de linearidade.	57
Figura 28. Relação entre as propriedades viscoelásticas e a temperatura para o F127 em diferentes concentrações: (a) - F127 16% m/m; (b) - F127 18% m/m e (c) – F127 20% m/m.....	58
Figura 29. Relação entre as propriedades viscoelásticas e a temperatura para os géis formados pela combinação do F127 e os polissacarídeos e/ou glicoproteínas do <i>A.blazei</i> : (a) - F127 16% m/m + polissacarídeos 1% m/m; (b) - F127 18% m/m polissacarídeos 1% m/m e (c) – F127 20% m/m.....	59
Figura 30. Relação entre as propriedades viscoelásticas e a temperatura para os géis formados pela combinação do F127 e os polissacarídeos e/ou glicoproteínas do <i>L.edodes</i> : (a) - F127 16% m/m + polissacarídeos 1% m/m; (b) - F127 18% m/m + polissacarídeos 1% m/m e (c) – F127 20% m/m + polissacarídeos 1% m/m.....	60
Figura 31. Dependência da frequência com a força estrutural para as misturas de F127 18% m/m com 1% m/m dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A.blazei</i> : a) temperatura de 17°C; (b) temperatura de 25°C; (c) temperatura de 37°C.	61
Figura 32. Dependência da frequência com a força estrutural para as misturas de F127 18% m/m com 1% m/m dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>L.edodes</i> : a) temperatura de 17°C; (b) temperatura de 25°C; (c) temperatura de 37°C.	61
Figura 33. Espectro infravermelho dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas sulfatados do <i>A. blazei</i> , em pastilha de KBr.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Atribuições das frequências das principais bandas dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas.	40
Tabela 2. Deslocamentos químicos característicos das glucanas β (1 \rightarrow 6) e α (1 \rightarrow 4) presentes nos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A. blazei</i>	42
Tabela 3. Deslocamentos químicos característicos de glucana β (1 \rightarrow 6) presentes nos polissacarídeos isolados do <i>L. edodes</i>	42
Tabela 4. Análise elementar dos polissacarídeos isolados obtidos do <i>A. blazei</i> e <i>L. edodes</i>	44
Tabela 5. Coeficiente de consistência (m) e índice de fluxo (n) para as soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados.	48
Tabela 6. Massa molecular média ponderal (Mw), a massa molecular numérica (Mn) e o índice de polidispersidade (Mw/Mn) obtidos dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>A. blazei</i> e <i>L. edodes</i>	50
Tabela 7. Valores de concentração micelar crítica (cmc) e Fração molar na cmc	51
Tabela 8. Temperatura de transição de sol para gel para as misturas de F127 pelos métodos da inversão de tubos e reologia.	58
Tabela 9. Temperaturas de gelificação para o F127 e para as misturas do F127 com polissacarídeos e/ou glicoproteínas.	59
Tabela 10. Temperatura de transição de sol para gel para as misturas do F127 com polissacarídeos e/ou glicoproteínas pelos métodos da inversão de tubos e reologia.....	59

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1. Módulo de cisalhamento	26
Equação 2. Módulo complexo	26
Equação 3. Viscosidade intrínseca	33
Equação 4. Tensão de cisalhamento	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
AT	Antitrombia
CPG	Cromatografia de permeação em gel
CMC	Concentração Micelar Crítica
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
HCII	Cofator II da Heparina
MFA	Microscopia de Força Atômica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TT	Tempo de Trombina

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
G'	Módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento
G''	Módulo de perda ou de viscosidade
G^*	Módulo de cisalhamento complexo
m	Massa
m	Coefficiente de consistência
M_n	Massa molecular numérica
M_v	Massa molar viscosimétrica média
M_w	Massa molecular média ponderal
n	Índice de fluxo
η	Viscosidade intrínseca
pH	Potencial hidrogeniônico
η_{red}	Viscosidade reduzida
v	Volume
γ	Velocidade de cisalhamento
γ°	Deformação
σ	Tensão de cisalhamento
δ	Ângulo de fase
τ°	Tensão total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Reino Fungi.....	18
1.2 Cogumelos	18
1.3 <i>Agaricus blazei</i>	20
1.4 <i>Lentinus edodes</i>	20
1.5 Extração em Meio Aquoso e Propriedades dos Polissacarídeos em Solução	21
1.6 Geleificação e termorresponsividade	22
1.7 Polissacarídeos Sulfatados	26
1.8 Absorção de gordura	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral:	29
2.2. Objetivos específicos:	29
3. EXPERIMENTAL	30
3.1 Materiais	30
3.2 Metodologia e procedimentos.....	30
3.2.1 <i>Extração e isolamento dos polissacarídeos</i>	30
3.3. Análise e Caracterização dos Polissacarídeos	32
3.3.1 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	32
3.3.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear (¹³C - RMN, ¹³C -RMN-DEPT e ¹H- RMN)</i>	32
3.3.3 <i>Análise Elementar</i>	32
3.4 Propriedades dos Polissacarídeos em Solução.....	33
3.4.1 <i>Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar</i>	33
3.4.2 <i>Estudo Reológico</i>	33
3.4.3 <i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	34
3.4.4 <i>Avaliação da Conformação Estrutural por Microscopia de Força Atômica</i> . 34	
3.4.5 <i>Tensão superficial para Determinação da Concentração Micelar Crítica</i> ...	35
3.5 Propriedades termorresponsivas pelo método da inversão de tubo	35
3.5.1 <i>Método de inversão de tubo</i>	35
3.5.2 <i>Estudo Reológico</i>	36
3.6 Modificação química dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas por sulfatação	36
3.6.1 <i>Procedimento de Sulfatação</i>	36
3.6.2 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	37
3.6 Ensaio para investigação da capacidade de absorção de gordura	37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Extração e Isolamento dos Polissacarídeos	38
4.1.1 <i>Rendimento dos polissacarídeos solúveis em água</i>	38
4.1.2 <i>Rendimento da porção insolúvel</i>	38
4.2 Caracterização Estrutural dos Polissacarídeos	38
4.2.1 <i>Espectroscopia na região do Infravermelho</i>	38
4.2.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear ¹³C e ¹H</i>	40
4.2.3 <i>Análise Elementar</i>	44
4.3 Propriedades dos Polissacarídeos em Solução	44
4.3.1 <i>Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar</i>	44
4.3.2 <i>Estudo Reológico</i>	46
4.3.3 <i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	48
4.3.4 <i>Avaliação da Conformação Estrutural por Microscopia de Força Atômica</i>	52
4.4 Propriedades termorresponsivas pelo método da inversão de tubo	55
4.4.1 <i>Diagrama de Fases</i>	55
4.4.2 <i>Reologia</i>	56
4.4.3 – <i>Influência dos polissacarídeos no processo de gelificação</i>	58
4.4.4 – <i>Dependência da frequência com a força estrutural</i>	60
4.6 Capacidade de absorção de gordura	62
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Reino Fungi

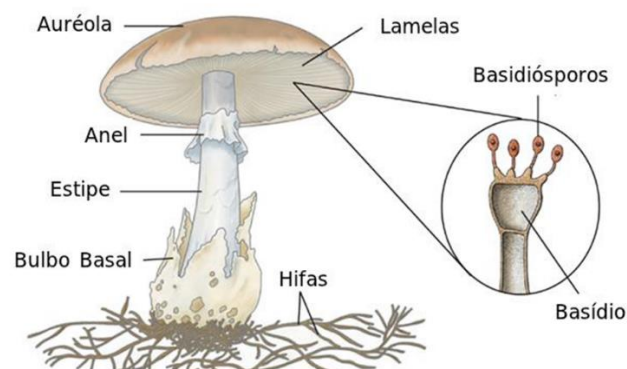
O reino Fungi apresenta uma grande variedade de representantes encontrados nos mais diversos ambientes (Sterflinger et al., 2012). São seres heterotróficos e eucarióticos, podendo apresentar-se sob a forma levuriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas (Esposito; Azevedo, 2004). Diferente dos vegetais, que apresentam amido como reserva energética, nos fungos tal papel é desempenhado pelo glicogênio. A parede celular dos fungos apresenta hexoses e hexoaminas como componentes principais, que formam mananas, ducanas e galactanas, já outras espécies têm parede rica em quitina (N-acetilglucosamina) e outros possuem complexos glicoprotéicos (Putzke; Putzke, 1998).

Esse reino apresenta divisões, sendo que o filo Basidiomycota agrupa os seus representantes mais desenvolvidos.

1.2 Cogumelos

Os cogumelos são as formas mais conhecidas pertencentes ao filo Basidiomycota, apresentando, em sua maioria, uma frutificação macroscópica, constituída por hifas modificadas que formam pseudotecidos, os quais se diferenciam em auréola, anel, estipe, lamelas e bulbo basal, como representado na **Figura 1**. (Putzke; Putzke, 1998).

Figura 1. Desenho esquemático das principais estruturas dos cogumelos.



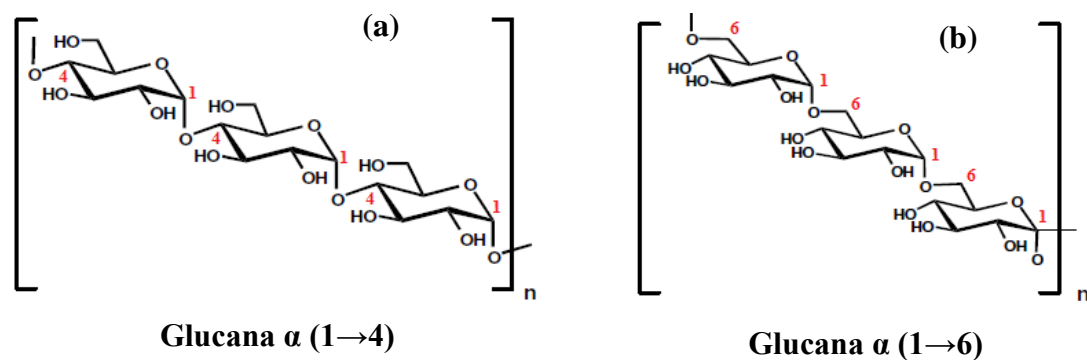
Fonte: Autor.

Considerando as espécies ainda não identificadas e o foto de seqüências moleculares entre esses fungos mostram que uma única “espécie” pode agrupar 20 espécies distintas, o número de espécies de cogumelos catalogadas ultrapassa os 21.000. (Kirk, 1998).

Cogumelos comestíveis são amplamente consumidos em muitos países como um alimento devido ao seu sabor atraente, aroma e caráter nutricional, já que possuem teores significativos de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais contéudos e um nível baixo de lipídeos. Além disso, os cogumelos comestíveis caracteristicamente contêm muitos compostos bioativos diferentes, tais como os compostos fenólicos e a eritadenine, esta com caráter hipocolesterêmica (Guillamón et al, 2010).

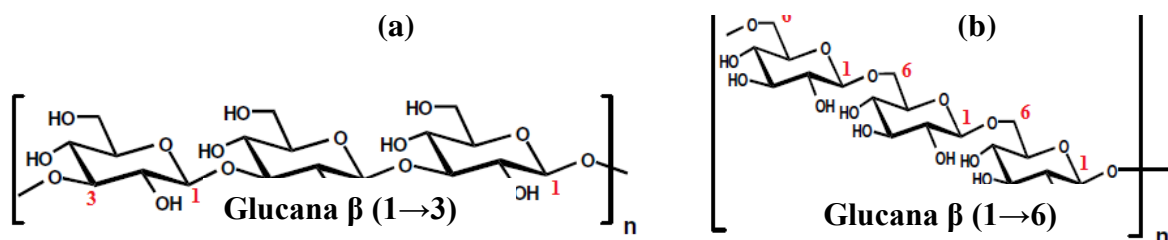
Muitas das ações farmacológicas dos cogumelos são atribuídas a substâncias constituídas de polissacarídeos de ligação β -glicosídica, como é o caso da β -glucana, que estimulam uma resposta do sistema imunológico (Guillamón et al, 2010). As estruturas das principais glucanas com propriedades terapêuticas (Surenjav, 2006) são representadas nas **Figuras 2 e 3**.

Figura 2. Representação das estruturas de glucanas α (1 \rightarrow 4) (a) e α (1 \rightarrow 6) (b).



Fonte: Autor.

Figura 3. Representação das estruturas de glucanas β (1 \rightarrow 3) (a) e β (1 \rightarrow 6) (b).



Fonte: Autor.

1.3 *Agaricus blazei*

A. blazei é um cogumelo brasileiro popularmente conhecido como cogumelo do sol, e é frequentemente consumido como alimento ou chá em diversas partes do mundo, com destaque para China e Japão (Kaneno et al., 2004), devido a seus efeitos medicinais. No Brasil, principalmente no estado de São Paulo, o cultivo comercial vem sendo realizado desde o início da década de 90, sendo realizado nas épocas de primavera e verão (Ferreira, 1998). Seu cultivo não pode ser feito pelo usando troncos de árvores, uma vez que não podem degradar componentes lignocelulósicos complexos, sendo mais adequada a técnica de produção intensiva chamada de axênico, onde o substrato é preparado à base de serragem, adicionado de farelos de cereais e calcários (Eira et al, 1997). Este cogumelo é utilizado no combate ao estresse físico e mental, na melhora do sistema imunológico, redução do colesterol, tratamento de problemas circulatórios e digestivos, além da atividade antitumoral (Bellini, 2006). Segundo estudos tais propriedades estão relacionadas à presença de glucanas de cadeia linear com configurações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$ (Yamanaka, 2012; Dong, 2002).

O *A. blazei* apresenta, quanto aos aspectos morfológicos, a auréola com coloração marrom, lamelas de coloração creme e hifas com coloração branca, como mostrado na **Figura 4**.

Figura 4. *A. blazei*



Fonte: Autor

1.4 *Lentinus edodes*

L. edodes, conhecido como shiitake, é a segunda mais importante espécie de cogumelo comestível cultivada no mundo, ficando atrás apenas do "champignon" de Paris (*Agaricus bisporus*). A produção mundial é crescente, sendo a China o principal país produtor. No Brasil, a produção de shiitake está se expandindo, principalmente nas regiões sul e sudeste (Ishikawa, Kasuya e Vanetti, 2001).

O *L.edodes* é um basidiomiceto cujo corpo de frutificação é muito utilizado na culinária asiática devido ao valor nutritivo significativo e seu consumo vem crescendo a nível mundial, incluindo o Brasil. Seu cultivo pode ser feito em troncos de árvores, como é o caso do abacateiro, mangueira, carvalho e eucalipto, ou utilizando o sistema axênico (Eira et al, 1997). Este cogumelo apresenta influência em várias propriedades fisiológicas como a imunoproteção (estimulando a maturação, diferenciação ou proliferação de células envolvidas nos mecanismos de defesa), prevenção e tratamento de doenças coronárias e cancerígenas (Carbonero, 2008). Segundo estudos tais propriedades estão relacionadas à presença de glucanas com configurações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$ (Xu, 2012; Liu, 2012).

O *L.edodes* apresenta aspectos morfológicos semelhantes ao *A. Blazei* porém com uma tonalidade de cor mais escura e uma auréola enrugada com pigmentos brancos, como representado na **Figura 5**.

Figura 5. *L. edodes*



Fonte: Autor

1.5 Extração em Meio Aquoso e Propriedades dos Polissacarídeos em Solução

Estudos com polissacarídeos e glicoproteínas, solúveis em água, extraídos de cogumelos, têm demonstrado possuir atividades farmacológicas (Surenjav e col., 2006; Yamanaka, 2012). A solubilização desses polissacarídeos em água é uma propriedade importante quando se trata de testes farmacológicos, uma vez que favorece a absorção e atuação dessas substâncias, além de permitir uma redução da tensão superficial,

característica favorável para a solubilização da substância em determinado solvente (Gonzaga, 2006).

Outro fator importante para os testes farmacológicos é o estudo da viscosidade, uma vez que pode interferir na qualidade da atuação das substâncias, ao considerar velocidade de absorção e consequente ação. No entanto, nenhuma consideração é feita acerca da relação da viscosidade desses polissacarídeos e a eficiência das suas atividades biológicas. (Gonzaga, 2006)

As glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas, e apresentar diferentes configurações e massa molar. β -glucanas com a mesma composição química podem apresentar conformação de hélice simples, tripla hélice ou em forma de espiral (Young et al, 1998). As hélices são compostas por uma, ou três cadeias de polissacarídeos que permanecem unidas por ligações de hidrogênio (Lipke, 1998), formando uma estrutura helicoidal, sendo as de hélices simples e as triplas hélices consideradas biologicamente ativas (Ko et al., 2004). Além disso, podem ser solúveis ou insolúveis em água, dependendo da conformação, ligações químicas e massa molar (Zhang et al., 2007).

O mecanismo de ação imunomodulatória das β -glucanas ainda não está totalmente esclarecido, mas parece estar relacionado à massa molar, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização (Ohno et al., 1996; Kubala et al., 2003). Além do arranjo estrutural e viscosidade (Wood, 2007).

1.6 Geleificação e termorresponsividade

Copolímeros correspondem a uma classe de polímeros que apresentam duas ou mais unidades monoméricas diferentes. De acordo com a disposição de seus monômeros, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, estatístico, e enxertado (Yokoyama, 1992). Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros A ligados covalentemente a uma sequência de monômeros B. Os copolímeros em bloco podem ser classificados em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos, como mostra a **Figura 6**:

Figura 6. . Diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela.



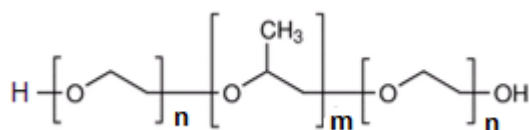
Fonte: Kumar, Ravikumar e Domb, 2001.

O copolímero em bloco mais simples é o tipo A_mB_n , onde o homopolímero A_m estão ligado ao homopolímero B_n recebendo o nome de copolímero dibloco (**Figura 6.a**). O segundo tipo de copolímero, chamado de tribloco (**Figura 6.b**), é constituído do homopolímero B_n com as terminações ligadas a homopolímeros A_m . No terceiro tipo, os segmentos A_m e B_n ligados são repetidos muitas vezes e é chamado de multibloco (**Figura 6.c**). O quarto tipo de copolímero em bloco é chamado de estrela (**Figura 6.d**), onde a unidade A_m com muitos braços funcionalizados copolimeriza em bloco com os blocos B_n e apresenta-se na forma de estrela. (Kumar, Ravikumar e Domb, 2001).

A utilização de copolímeros na dissolução de fármacos vem sendo estudada, devido, principalmente, à sua eficiência no processo de solubilização, baixa toxicidade e capacidade em controlar a liberação de fármaco no organismo (Oliveira e Lima, 2006), em especial, os copolímeros em bloco de caráter anfifílico, por formarem micelas em solução aquosa (Letchford e Burt, 2007), o que torna possível seu uso como carreadores de fármacos.

Nesse contexto, estudos de misturas binárias de copolímeros que possuem bloco hidrofílico de polioxietileno (Myers, 1992) mostram-se promissores como nanocarreadoras de fármacos. Um exemplo são poliéteres do tipo $E_nP_mE_n$ (**Figura 7**), onde E denota a unidade monomérica óxido de etileno e P a unidade de óxido de propileno, conhecidos como Pluronic®.

Figura 7. Estrutura geral dos Pluronicos®.



Fonte: Autor.

À medida que a concentração desses copolímeros aumenta, suas soluções começam a tornar-se mais viscosas até atingir um estado de gel imóvel. Wanka, Hoffman e Ulbricht (1990) propuseram que a geleificação acontece pelo empacotamento das micelas em mesofases cristalinas cúbicas, hexagonais ou lamelares, dependendo da forma das micelas. Os Pluronicos apresentam uma propriedade interessante, a termorresponsividade, que é a formação de gel imóvel com o aumento da temperatura.

Essa transição sol-gel é uma consequência de uma diminuição na solubilidade do copolímero em água com o aumento da temperatura, aonde o sistema vai se tornando viscoso até atingir o estado de gel imóvel. A menor concentração a partir da qual se verifica esse fenômeno é a concentração crítica de formação de gel. Essa transição é reversível quando se diminui a temperatura ou, em algumas concentrações, o estado de gel possui uma temperatura máxima, acima da qual ele volta a ser sol. Esse comportamento termorresponsivo tem sido estudado a fim de usar o copolímero como matriz para a administração subcutânea de fármacos, objetivando uma liberação controlada e prolongada.

Uma das técnicas utilizadas no estudo do comportamento de formação de gel desses copolímeros em função da temperatura e da concentração é o método de inversão de tubo (Chaibundit et al., 2007), onde soluções dos copolímeros em diferentes concentrações são analisadas quanto à formação de gel numa faixa de temperatura que normalmente varia de 10 a 90°C. Os dados do estudo são representados em um gráfico de concentração *versus* temperatura (diagrama de fases). Nesse diagrama as fases são: solução ou fluido (“sol” ou “mobile”) e gel duro ou imóvel (“gel”, “hard gel” ou “immobile”).

No estudo dos géis outro estudo importante é o das características reológicas, que são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação tópica (Martin, 1993).

Os géis, por apresentarem comportamento híbrido elástico e viscoso, são viscoelásticos, podendo ser avaliados por diferentes métodos reológicos, tais como: fluxo contínuo, tensão constante e oscilatória. Ou seja, a medida da viscoelasticidade pode ser feita por métodos estáticos e dinâmicos, porém somente por meio de ensaios oscilatórios, as propriedades podem ser medidas ao mesmo instante (Braseq, 2007).

No método dinâmico oscilatório, o material é submetido à variação de tensão ou deformação harmonicamente com o tempo e os resultados são influenciados pela estrutura física do material e composição química, ou seja, a resposta obtida pode ser usada para fornecer informação sobre o aspecto estrutural de um sistema a nível molecular ou prever o comportamento macroscópico, desde que o ensaio seja feito dentro do intervalo de viscoelasticidade linear (Steffe, 1996).

As análises oscilatórias permitem determinar a energia elástica armazenada e a energia perdida pelo fluxo viscoso. São determinados através do cálculo dos módulos elástico, viscoso, complexo e outros parâmetros, utilizados para estudo da viscoelasticidade de sistemas complexos (Dolz; Hernandez; Delegido, 2008).

No teste de deformação aplica-se uma tensão baixa e constante sobre a amostra por certo período de tempo. A resposta do material à tensão aplicada, quanto à distância e velocidade com que se moveu em função do tempo é a propriedade de deformação do material. Quando a deformação é pequena, ou é aplicada de forma muito lenta, os arranjos moleculares estão próximos ao equilíbrio. Assim, esta resposta mecânica é a uma reflexão dos processos dinâmicos a nível molecular que se modificam constantemente, os quais ocorrem mesmo quando o sistema está em equilíbrio. Este é o domínio da viscoelasticidade linear. (Braseq, 2007).

Ao ser medido o ângulo de fase (δ) entre tensão e deformação tem-se uma medida do grau do comportamento sólido ou líquido, quantificados através do módulo de cisalhamento dinâmico ou de estocagem G' e módulo de perda G'' (Freitas, 2003), onde um menor δ representa uma maior resposta elástica.

O módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total a deformação do sistema, é definido como (**Equação 1**)

Equação 1. Módulo de cisalhamento

$$G^* = \frac{\tau^0}{\gamma^0}$$

Onde:

τ^0 = tensão total

γ^0 = deformação

O G^* também pode ser subdividido em dois componentes (**Equação 2**):

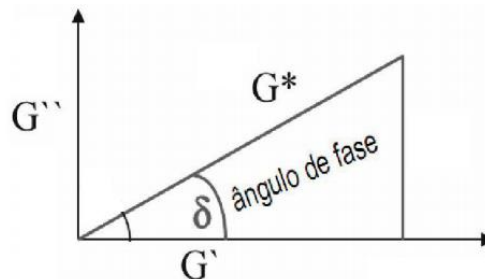
Equação 2. Módulo complexo

$$G^* = G' + G''$$

G' = módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento

G'' = módulo de perda ou de viscosidade

Figura 8. Módulo complexo $|G^*|$.



Fonte: autor

Um alto módulo de cisalhamento complexo G^* representará maior rigidez.

A varredura de tensão ou deformação, a uma frequência constante, é utilizada para determinar o limite da viscoelasticidade linear pela identificação do valor crítico deste parâmetro de varredura. Na região viscoelástica linear, não é observado dependência da deformação e da tensão em relação à frequência (Lapasin; Pricil, 1995). Um material mais estável apresenta uma região viscoelástica linear mais ampla.

1.7 Polissacarídeos Sulfatados

Atualmente, há um grande interesse na busca de substâncias que apresentem ação anticoagulante, ou seja, que possam ser uma alternativa a heparina. Tal atividade

biológica deve-se, em grande parte, aos grupos sulfatos existentes na heparina, uma vez que estes potencializam a ação de inibidores das proteases plasmáticas, tais como AT (antitrombina) e HCII (cofator II da heparina), ou inibi-las diretamente (Pomin, 2009). Porém, a atividade anticoagulante destes compostos depende da massa molar e da composição química, especialmente dos conteúdos de sulfato e fucose (Nishino; Aizu; Nagumo, 1991).

O potencial anticoagulante despertou interesse na busca de novos polissacarídeos naturalmente sulfatados e de estratégias para sulfatar polissacarídeos neutros. Polissacarídeos sulfatados são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados como componentes de matriz extracelular, na superfície de células de vertebrados ou são sintetizados por organismos marinhos (Alban; Schauerte; Franz, 2001). Dentre os polissacarídeos naturalmente sulfatados, destacam-se os polímeros isolados de algas marinhas, como carragenanas e fucoidanas.

Alguns polissacarídeos de líquens foram isolados e sulfatados. Stuelp (1997) avaliou a atividade anticoagulante de uma α - e uma β -glucana isolada de *Ramalina celastri*. A α -glucana apresentou uma atividade máxima para os testes de aPTT (tempo de tromboplastina parcialmente ativada) e TT (tempo de trombina) nas doses de 13 e 18 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, respectivamente. Em outro estudo com polissacarídeos de líquens, uma galactoglucomanana isolada de *Cladonia ibitipocae*, após sulfatação química, apresentou 42,2 % de sulfato e inibiu totalmente a formação de trombo *in vivo*, após administração intravenosa de uma solução à 2 mg/kg do animal (Martinichen-Herrero et al., 2005b). No mesmo modelo animal de trombose, uma β -glucana com ligações (1 \rightarrow 6) isolada de *Parmotrema mantiqueirense*, contendo 76,8% de sulfato após modificação química, também inibiu a formação do trombo (Martinichen-Herrero et al., 2005a). Apesar de polissacarídeos de líquens apresentarem uma boa atividade anticoagulante, seu uso é limitado, já que estes organismos não são encontrados em grande quantidade na natureza.

Além das atividades anticoagulantes, polissacarídeos sulfatados também podem apresentar atividades anti-arterioesclerótica, antiproliferativa, antiangiogênica, antiviral, anti-inflamatória e antimetástática (Yoshida et al., 1995; Alban; Schauerte; Franz, 2002).

1.8 Absorção de gordura

A princípio, a água é o veículo de escolha para as preparações medicamentosas, uma vez que é a substância de maior abundância no corpo humano e sem risco de toxicidade (Gonzaga, 2006).

Soluções viscosas de β -glucanas promovem inibição da digestão e absorção de gordura da dieta por influenciar na emulsificação das gorduras através do aumento do tamanho das gotículas, atuando como cardioprotetoras pela diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo (Wood, 2007).

Além dos seus efeitos hipocolesterolêmicos, a β -glucana também possui efeito regulador sobre os níveis sanguíneos de glicose e insulina. A β -glucana tem ação na redução da glicose sanguínea pós-prandial, pela diminuição do fluxo de glicose através do aumento da viscosidade e capacidade de ligação com água que confere ao conteúdo gastrointestinal, interferindo na digestão enzimática e absorção dos nutrientes na mucosa intestinal (Bae et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Isolar e caracterizar os polissacarídeos e/ou glicoproteínas dos cogumelos *A. blazei* e *L. edodes*, quanto as suas características estruturais, propriedades em solução e formação de géis, na tentativa de contribuir para o conhecimento destes materiais e propor alternativas para ampliar sua área de aplicação.

2.2. Objetivos específicos:

- Utilizar procedimento de extração e isolamento para obtenção dos polissacarídeos e/ou glicoprotéicos nas suas configurações específicas;
- Caracterizar os polissacarídeos e/ou complexos glicoprotéicos;
- Estudar as propriedades dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas em solução através de medidas de viscosidade, reologia, cromatografia de permeação em gel, microscopia de força atômica e concentração micelar crítica, e, bem como seu potencial na absorção de gordura.
- Avaliar suas propriedades termorresponsivas, por meio do diagrama de fases, de géis desenvolvidos a partir da combinação do copolímero F127 e polissacarídeos e/ou glicoprotéicos.
- Modificar quimicamente os polissacarídeos e/ou glicoproteínas por sulfatação.
- Avaliar o potencial dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas em absorver gordura.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Os cogumelos *A. blazei* e *L. Edodes* foram fornecidos por Nilo Martins Guimarães (Suzano, São Paulo) e pela Profa. Rosa Elisa Linhares (Universidade Estadual de Londrina – Pr), respectivamente. Os cogumelos foram cultivados em estufas climatizadas, reproduzindo as condições de cultivo *in natura*. As amostras foram enviadas sem raízes, desidratadas, cortadas em fatias e embaladas em sacos plásticos a vácuo. Para os experimentos, os cogumelos foram secos, na estufa, e pulverizados utilizando-se liquidificador industrial.

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

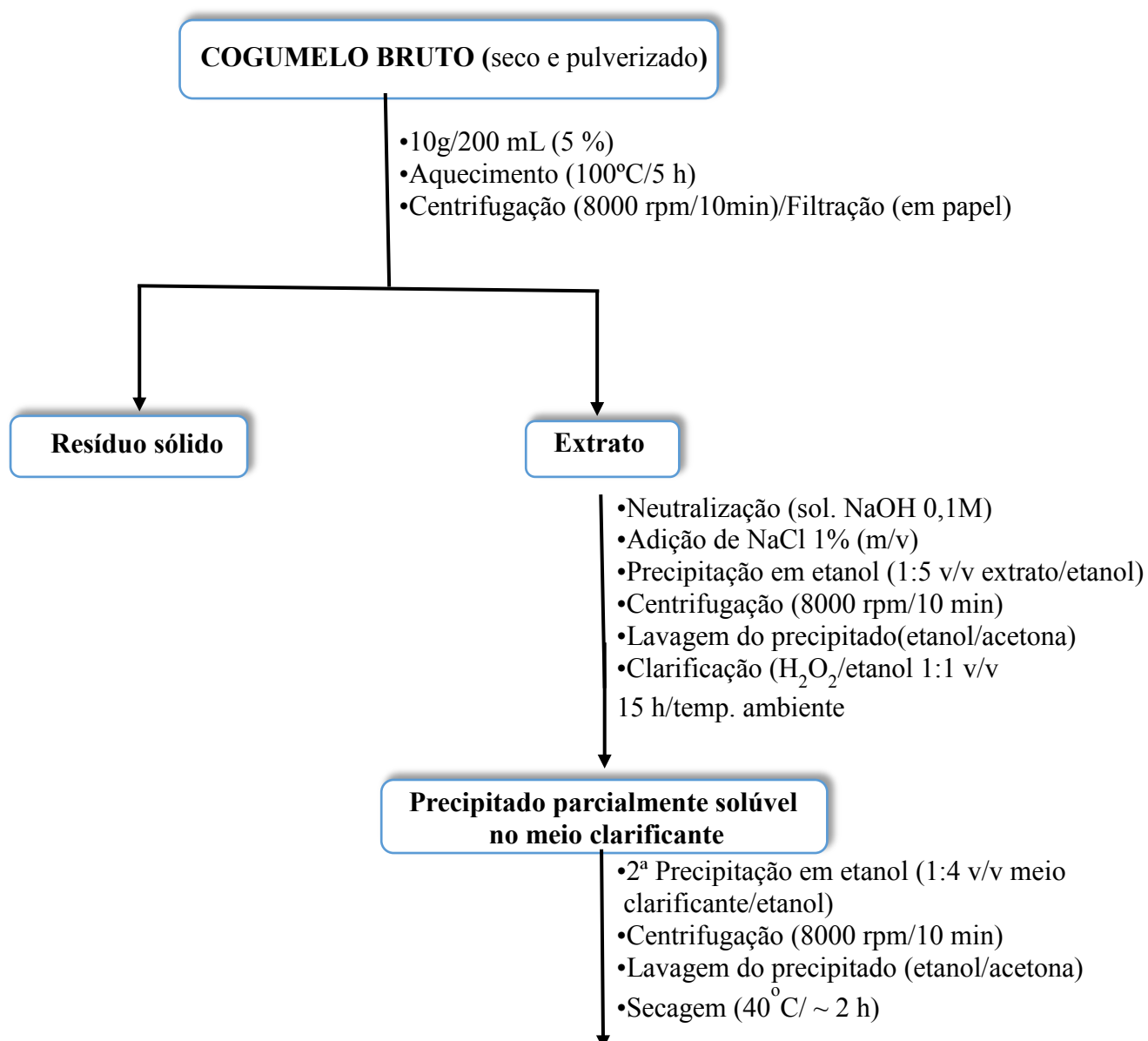
3.2 Metodologia e procedimentos

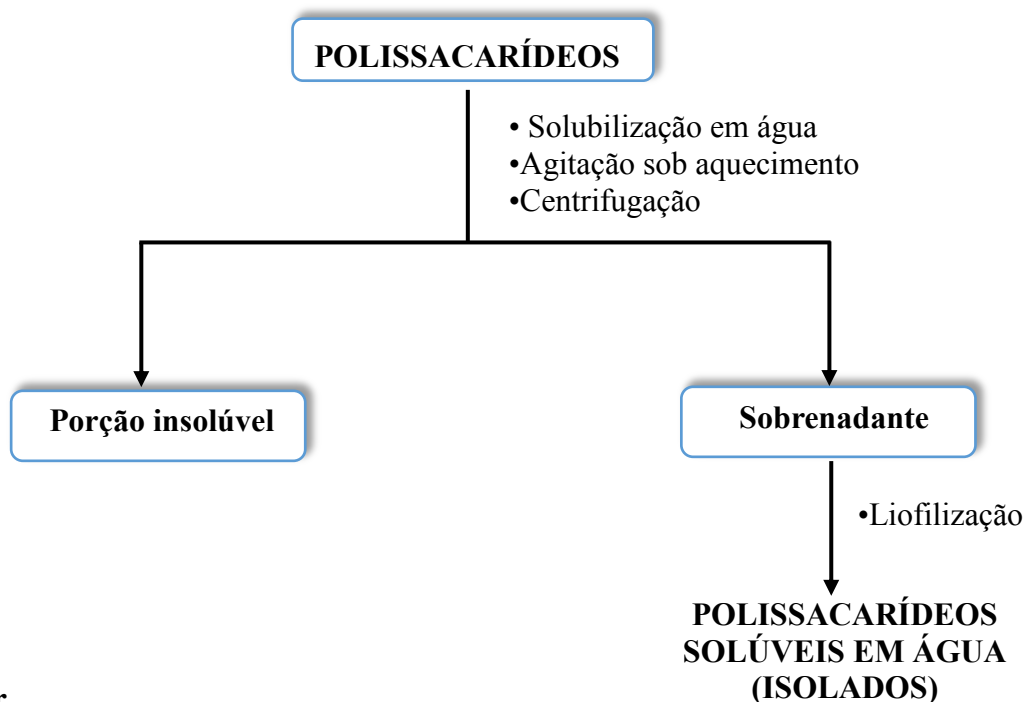
3.2.1 Extração e isolamento dos polissacarídeos

O mesmo procedimento de extração e isolamento foram aplicados para os cogumelos isoladamente, onde partindo-se do cogumelo seco e pulverizado, preparou-se uma suspensão aquosa 5% (m/v) (10 g de cogumelo em 200 mL de água destilada), que foi submetida a 100°C por 5 h. Após este período, a suspensão foi centrifugada (8000 rpm/10 min) e em seguida filtrada em papel para remoção do resíduo, obtendo-se um extrato límpido de coloração alaranjada (pH ~5,0) para o *A. blazei* e um extrato límpido de coloração amarelada (pH ~5,0) para o *L. edodes*. O extrato foi neutralizado com solução diluída de NaOH (0,1 M). Nesta etapa adicionou-se 1% (m/v) de NaCl (sendo, “m” a massa do sal e “v” o volume de extrato) para facilitar a precipitação dos polissacarídeos e/ou do complexo glicoproteico na etapa seguinte. Posteriormente, o extrato foi adicionado ao etanol na proporção 1:5 (v/v) (extrato/ etanol) e sob agitação moderada. Por centrifugação (8000 rpm/durante 10 min), o precipitado foi retirado do meio etanólico e lavado em seguida com etanol e posteriormente com acetona para remoção de eventuais traços de ácidos graxos. Desde que o material isolado apresentou uma coloração escura, tornou-se necessário uma clarificação utilizando-se peróxido de hidrogênio 40%, na forma de uma mistura etanol/peróxido 1:1 v/v, por aproximadamente 15 h à temperatura ambiente, para evitar que a presença de pigmentação comprometa algumas análises. Em virtude da parcial solubilização do

precipitado no meio clarificante, submeteu-se o material a uma segunda precipitação em etanol, usando-se a proporção de 1:4 v/v (meio clarificante /etanol), para recuperação máxima do precipitado. Por centrifugação (8000 rpm/10 min), o precipitado foi separado e em seguida lavado com etanol e acetona, nesta ordem, sendo seco em banho de areia a 40°C por aproximadamente 2 h. O precipitado final obtido foi quantificado. Após seco e pesado, o precipitado foi colocado em um recipiente com água destilada a 1% m/v e submetido a aquecimento de 40°C, sob agitação por 48 h, sendo em seguida centrifugado por 15 min a 8000 rpm, para remoção da parte insolúvel, a qual foi seca a 40°C e pesada. A porção solúvel foi liofilizada e posteriormente pesada. O fluxograma das etapas é mostrado na **Figura 9**.

Figura 9. Fluxograma do procedimento de extração e isolamento dos polissacarídeos.





Fonte: Autor.

3.3. Análise e Caracterização dos Polissacarídeos e ou Glicoproteínas

3.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e analisadas em equipamento FT-IR 8300 da Shimadzu.

3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C - RMN, ^{13}C -RMN-DEPT e ^1H - RMN)

Para obtenção dos espectros de ^{13}C - RMN, ^{13}C -RMN-DEPT e ^1H - RMN as amostras foram solubilizadas em D₂O. Os espectros foram obtidos em equipamento Bruker modelo Avance DRX-500.

3.3.3 Análise Elementar

A pesquisa dos elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, nos polissacarídeos e ou glicoproteínas isolados foi realizada em um microanalisador CHNS/O, modelo 1110 (Carlo Erba), equipado com detector de condutividade térmica.

A amostra foi submetida à combustão a 1000°C, em atmosfera de oxigênio, usando hélio como gás de arraste e uma coluna cromatográfica empacotada com sílica. Os teores de nitrogênio foram utilizados para determinação de proteínas, multiplicando-se esses valores pelo fator 4,38, o qual é estabelecido para algumas espécies fúngicas (Manzi et al., 1999; Chang et al, 2001).

3.4 Propriedades dos Polissacarídeos em Solução

3.4.1 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar

Solução aquosa dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados a 5% (m/v) foi submetida a aquecimento ($\approx 50^\circ\text{C}$) sob agitação por 15 h. As medidas de viscosidade foram realizadas em viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde, a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A viscosidade intrínseca $[\eta]$, em mL/g, foi determinada a partir do gráfico da viscosidade reduzida *versus* concentração, extrapolando a reta para concentração zero. A massa molar viscosimétrica média (M_v) foi calculada usando-se a equação de Mark-Houwink (**Equação 3**):

Equação 3. Viscosidade intrínseca

$$[\eta] = k \cdot \bar{M}_v^a$$

Onde, k e a são constantes dependentes da natureza do soluto e do solvente. Os fatores $k = 6,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e o expoente $a = 0,75$ foram usados para os cálculos envolvendo os polissacarídeos isolados do *A. blazei* (Varum, Martnsen e Smidsrod, 1991). Para o e *L. edodes* os fatores k e o expoente a foram respectivamente $2,94 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e o expoente $a = 1,58$ (Zhang et al., 2005).

3.4.2 Estudo Reológico

O comportamento reológico dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* e *L. edodes* foi avaliado no Reômetro da TA Instruments modelo Advanced Rheometer 550 (AR 550) em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de $0^\circ 59' 1''$, à 25°C e uma taxa de cisalhamento de 40 a 800 s^{-1} . As medidas das soluções em concentrações variadas (1, 3, 5, 7 e 10%) foram realizadas em triplicata.

Alguns parâmetros de fluxo envolvidos nas medidas foram avaliados através da equação da lei da potência dos fluidos, usando o modelo *Power-law* representado pela **equação 4** (Marcotte, 2001).

Equação 4. Tensão de cisalhamento

$$\sigma = m\gamma^n$$

onde σ é a tensão de cisalhamento, γ é a velocidade de cisalhamento, m é o coeficiente de consistência e n o índice de fluxo.

3.4.3 Cromatografia de Permeação em Gel

O perfil cromatográfico dos polissacarídeos e/ou glicoprotéínas foi determinado em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10 a 25°C. A análise foi realizada com uma coluna PolySep-GFC-P linear 7,8 x 300 mm, fase móvel de NaNO₃ 0,1 mol/L, fluxo de 0,5 mL/min e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. A curva de calibração foi construída utilizando-se de padrões de pululana com massas molares em intervalo de 10³ a 10⁵ g/mol.

3.4.4 Avaliação da Conformação Estrutural por Microscopia de Força Atômica

As imagens de MFA foram obtidas por meio do microscópio Nanoscope IIIa (Veeco, CA), no modo de varredura intermitente (tapping mode), no qual a ponta de prova do equipamento varre a superfície da amostra com “batidas” intermitentes produzidas numa frequência próxima à de ressonância do cantilever, evitando assim, danos na superfície de amostras frágeis. A sonda utilizada é feita de silício e possui constante de mola de aproximadamente 46 N/m (modelo TESP - Bruker). As imagens foram obtidas com resolução de 512 x 512 linhas, e velocidade de varredura de 1 Hz.

A preparação das amostras teve início com a dissolução dos polissacarídeos e/ou glicoprotéínas isolados do *A. blazei* e *L. edodes* em água Milli-Q, concentração de 1%, sob agitação magnética, durante 12 horas. Após dissolução, as amostras foram centrifugadas (8000 rpm/10 min) para remoção de possíveis partículas suspensas. Em seguida, foram depositadas em um substrato de mica (aproximadamente 2 µl) e deixadas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. A

superfície da mica foi previamente clivada com ajuda de uma fita adesiva e posteriormente inserida em soluções levemente ácidas, seguida por copiosa lavagem em água destilada. Finalmente as amostras são levadas para análise no MFA em temperatura ambiente.

3.4.5 Tensão superficial para Determinação da Concentração Micelar Crítica

Soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* e *L. edodes*, em concentrações variadas (1,5 a 1×10^{-7} % m/v), foram submetidas a medidas de tensão superficial através do método de du Nouy. As soluções analisadas foram preparadas usando-se água Mili-Q e filtradas para realização das medidas, que foram feitas a temperatura de 25°C em um tensiômetro TD 2 LAUDA devidamente calibrado conforme o manual de operação do aparelho. O procedimento consiste na aplicação da força necessária para remover um anel de platina previamente mergulhado na solução em estudo. A força é aplicada através do braço do tensiômetro, que suspende lentamente o anel até desprendê-lo da superfície do líquido. O valor da tensão superficial no momento do deslocamento do anel é lido diretamente na balança, em $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

3.5 Propriedades termorresponsivas

3.5.1 Método de inversão de tubo

Os géis foram preparados misturando-se diferentes concentrações de F127 (15 a 32% m/m) com polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *A. blazei* e *L. Edodes* (1 a 2% m/m), acrescentando água Milli-Q até a massa de 0,5 g em tubos pequenos (diâmetro interno de 10 mm). Após mistura, os géis foram agitados (vortex) e deixados em repouso, sob refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$), por 10 dias até atingir o equilíbrio.

Foi observada a possível modificação de fase dos sistemas, enquanto lentamente aquecidos (10 – 90°C, a uma velocidade de aquecimento de $\pm 1^\circ \text{min}^{-1}$) num banho de água termostatizado. A reprodutibilidade foi $\pm 2^\circ\text{C}$ para as temperaturas de transição fluido/gel e $\pm 2^\circ\text{C}$ para as temperaturas de transição gel/fluido. Essa relação entre temperatura e modificação de fase permite a construção do diagrama de fases, observando assim as propriedades termorresponsivas dos géis.

Para verificar a influencia dos polissacarídeos e/ou glicoprotéínas no processo de gelificação foi feito o diagrama de fases do F127 nas concentrações de 15 a 32% m/m.

3.5.2 Estudo Reológico

Os géis foram preparados misturando-se diferentes concentrações de F127 (16, 18 e 20% m/m) com polissacarídeos e/ou glicoprotéínas extraídos do *A.blazei* e *L. Edodes* (1% a m/m), acrescentando água Milli-Q até a massa de 2,0 g (quantidade suficiente para análise em triplicata) em frascos pequenos (diâmetro interno de 20 mm). Após mistura, os géis foram agitados (vortex) e deixados em repouso, sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), por 10 dias até atingir o equilíbrio.

O comportamento reológico dos géis foram avaliados no Reômetro da TA Instruments modelo Advanced Rheometer 550 (AR 550) em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de $0^{\circ}59'1''$. O módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G''), foram determinados por testes oscilatórios em frequência de 1Hz, tensão de 30Pa (determinada por meio da região de linearidade) e uma faixa de temperatura de 15-50°C (máxima variação permitida pelo aparelho).

3.6 Modificação química dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas por sulfatação

3.6.1 Procedimento de Sulfatação

O procedimento experimental adotado foi adaptado da metodologia proposta por (O'Neill, A.N,1955) e (Singh, V; Srivastava, A; Tiwari, A, 2009) no qual 300 mg dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *A.blazei* foram adicionadas em uma mistura de piridina e N,N-dimetilformamida (50 : 10 v/v), com agitação magnética a 25 °C por 12 horas. Após esse procedimento, a mistura foi condicionada, em sistema fechado, à temperatura de 4°C e ácido clorossulfônico (4mL) foi adicionado lentamente à mistura com agitação, em banho de gelo. Com o término da adição do ácido, a mistura reacional ficou em repouso a 4°C por 24 h, e em seguida neutralizada

com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. O produto obtido foi dialisado (membrana de corte 12.000 g/mol) por 120 horas e posteriormente liofilizado.

3.6.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e analisadas em equipamento FT-IR 8300 da Shimadzu.

3.6 Ensaio para investigação da capacidade de absorção de gordura

Uma amostra de 100 mg polissacarídeos e/ou glicoprotéínas extraídos do *A. blazei* e *L. Edodes* foi dispersa em um tubo de ensaio contendo 2,0 g de óleo de soja. A mistura foi mantida em contato, à temperatura de 25°C, durante 1 hora com agitação por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação por 20 min a 8000 rpm, o sobrenadante descartado e o resíduo pesado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e Isolamento dos Polissacarídeos e/ou Glicoproteínas

4.1.1 Rendimento dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas solúveis em água

Através dos procedimentos de extração e isolamento realizados obteve-se um rendimento médio de 11% para o *A. blazei* e de 7% para o *L. edodes*. Após procedimento de separação da porção insolúvel em água, os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* e *L. edodes*, apresentaram rendimentos de 10% e 6. Rendimento muito semelhante (10,5%) foi obtido para polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *A. blazei* cultivado no Ceará, utilizando-se das mesmas condições de extração trabalhadas (100°C/5 h), e em torno de 9,5% para polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados (Gonzaga, 2006).

4.1.2 Rendimento da porção insolúvel

A porção insolúvel em água, obtida a partir dos precipitados isolados dos dois cogumelos, mostrou rendimento percentual de aproximadamente 12% para a amostra do *A. blazei*, enquanto um percentual médio de 10% foi obtido para o material isolado do *L. edodes*.

4.2 Caracterização Estrutural dos Polissacarídeos e/ou Glicoproteínas

4.2.1 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados, **Figuras 10 e 11**, revelaram frequências de absorção características de carboidratos referentes aos grupos OH (3000-3500 cm^{-1}), aos grupos CO (1034 cm^{-1}), a ligação glicosídica C-O-C (1150 cm^{-1}) e ao carbono anomérico C1H (1079 cm^{-1}) (Brondsted, Hovgaard e Simonsen, 1995). A indicação da ligação C-H em configuração β foi confirmada pela presença da frequência de deformação em torno de 887 cm^{-1} (Seefeldt, 2009), já a de configuração α na região em torno de 871 cm^{-1} (Seefeldt, 2009). A presença de proteína também foi

identificada através das frequências em 1653 cm^{-1} (íons carboxilato e amida I), 1411 cm^{-1} (íons carboxilato) e 1562 cm^{-1} (amida II) (Grosev, Bozac e Puppels, 2001; Carey, 1992; Payne e Veis, 1988). Estiramento de NH absorve frequentemente em 3400 cm^{-1} (Silvestein, Bassler e Morrill, 1994), o qual, certamente, está sobreposto à larga banda de OH. As análises revelaram natureza glicoproteica no material isolado. A **Tabela 1** mostra as atribuições das principais frequências características dos polissacarídeos isolados.

Figura 10. Espectro infravermelho dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei*, em pastilha de KBr.

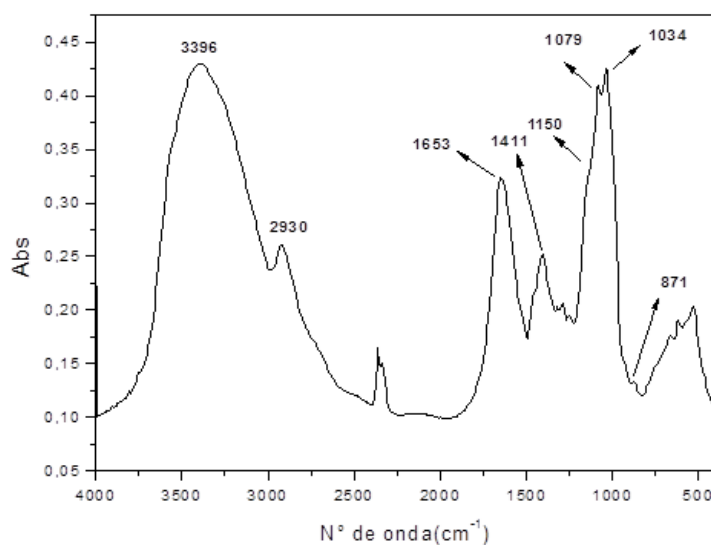


Figura 11. Espectro infravermelho dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L. edodes*, em pastilha de KBr.

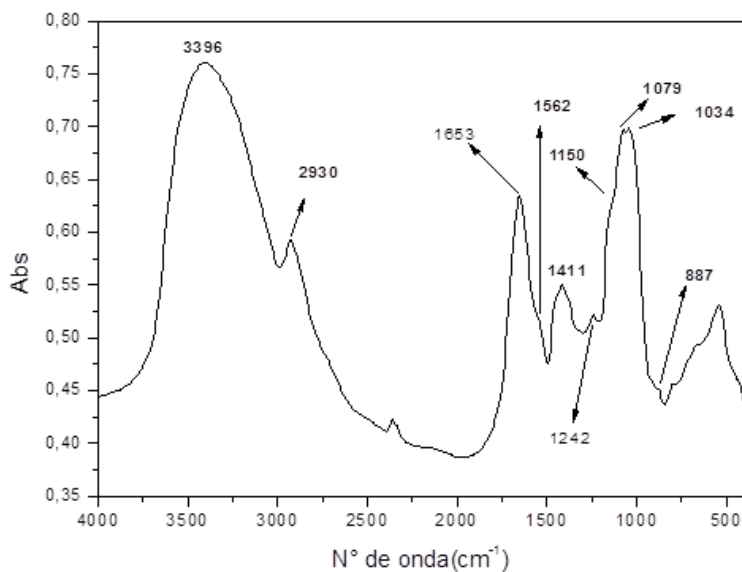


Tabela 1. Atribuições das frequências das principais bandas dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3396	ν (O-H) e (N-H)
2930	ν (C - H)
1653	ν_{as} (COO-), Amida I (ν C=O)
1562	Amida II (ν CN e δ NH)
1411	ν_s (COO-)
1242	Proteína não ordenada
	Amida III (ν CN e δ NH)
1150	ν (C-O-C) éter da ligação glicosídica
1079	ν (C1-H) carbono anomérico
1034	ν (C-O) álcool primário
887	β -glucana
871	α -glucanas

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear ¹³C e ¹H

Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* e *L. edodes* foram analisados por ^{13}C - RMN, ^{13}C -RMN-DEPT e ^1H - RMN.

Figura 12. ^{13}C - RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei*.

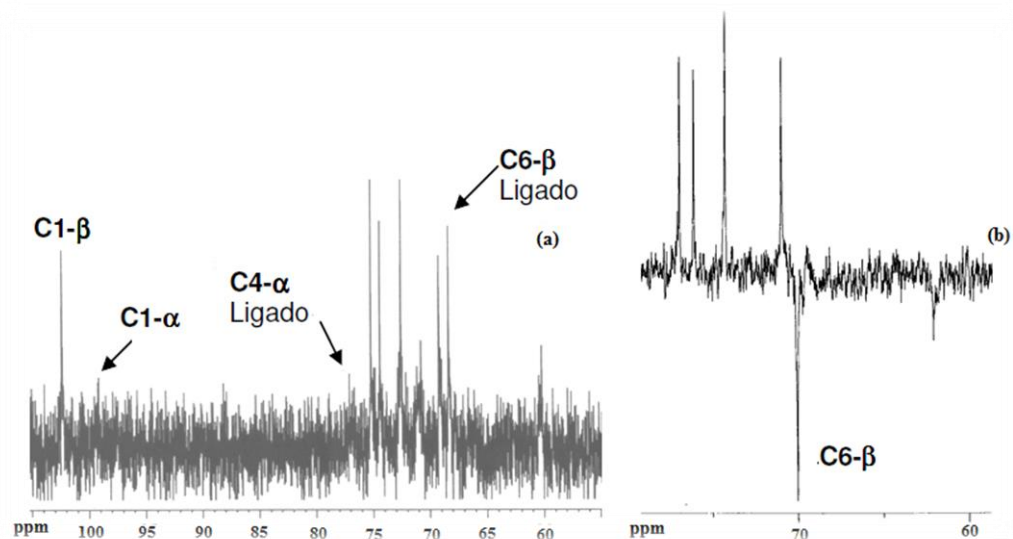
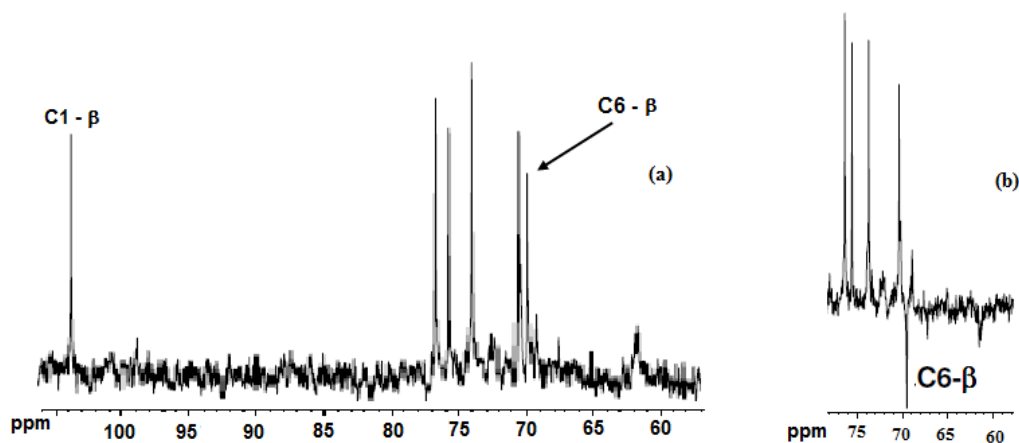


Figura 13. ^{13}C - RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L. edodes*.



Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas presentes foram identificados nos espectros de RMN predominantemente como glucanas de configuração $\beta(1\rightarrow6)$. Glucanas de configuração $\alpha(1\rightarrow4)$, foram identificadas de maneira mais representativa apenas nos espectros do *A. blazei*. Os deslocamentos químicos característicos para os carbonos C1 a C6 do anel glicosídico são apresentados nas **Tabelas 2 e 3**. Para o *A. blazei* observou-se um pronunciado pico representativo de carbono anomérico em configuração $\beta(1\rightarrow6)$ evidenciando uma maior concentração desta glucana em relação à de configuração α . Em relação ao *L. edodes*, glucanas de configuração $\alpha(1\rightarrow4)$ não

foram claramente identificadas e, portanto neste método de extração e isolamento as glucanas $\beta(1\rightarrow6)$ foram predominantes.

Tabela 2. Deslocamentos químicos característicos das glucanas $\beta(1\rightarrow6)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes nos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei*.

Configurações	Deslocamento Químico					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\beta(1\rightarrow6)$	102,7	72,7	75,3	69,6	74,6	67,9
$\alpha(1\rightarrow4)$	99,5	71,4	75,1	78,5	70,0	59,0

Tabela 3. Deslocamentos químicos característicos de glucana $\beta(1\rightarrow6)$ presentes nos polissacarídeos isolados do *L. edodes*.

Configurações	Deslocamento Químico					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\beta(1\rightarrow6)$	103,5	73.73	76.38	70.39	75.58	69.53

Figura 14. ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei*.

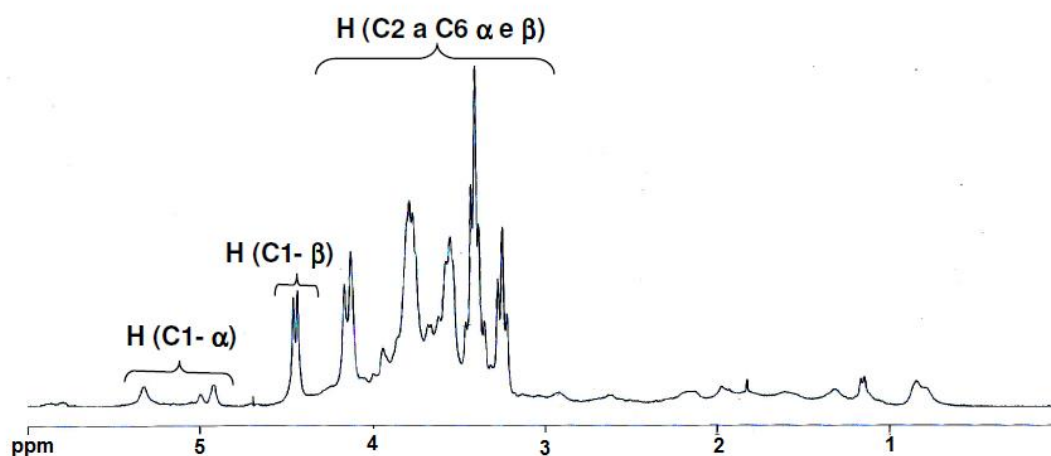
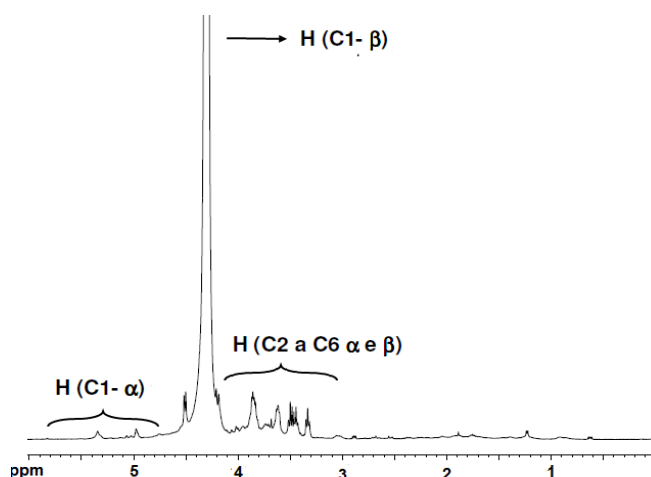


Figura 15. ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L. edodes*.



Os espectros de RMN ^1H apresentaram as mesmas características representativas de prótons de grupos glicosídicos de carboidratos. Os deslocamentos na faixa de 3,20 a 4,20 ppm foram atribuídos aos prótons dos carbonos (C2 a C6) do anel glicosídico (Saito e col., 1994). Os deslocamentos químicos na região dos hidrogênios anoméricos estão presentes na faixa de 4,44 a 5,50 ppm. Foi detectado o H (C1- α) H (C2 a C6 α e β) H (C1- β) dubleto registrado a 4,13 e 4,17 ppm, que é característico de configuração $\beta(1\rightarrow6)$ (Mizuno e col., 1990), e na região de 4,90 a 5,40 ppm foram registrados os picos representativos de uma configuração α (Mizuno e col., 1990). A configuração $\alpha(1\rightarrow4)$ está representada pelo deslocamento em 5,30 ppm. Observa-se que no espectro de ^1H do *L. edodes* a região característica de α é bem inferior a de β , confirmando predominância de configuração β por parte dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas obtido do *L. edodes*.

Sabe-se que os registros de hidrogênio dos grupamentos N-CH₃ e N-H normalmente são observados em torno de 2,78 ppm e na faixa de 0,5 a 3,0 ppm, respectivamente (Silvestein, Bassler e Morrill, 1994). Analisando-se esses dados, pode-se considerar que os picos registrados no intervalo de 0,8 a 3,0 ppm podem ser atribuídos aos referidos prótons, caracterizando assim a presença de proteínas, o que contribui para a indicação de um conjugado glicoprotéico. Segundo Kawagishi e col., 1990, a baixa intensidade ou ausência de picos de deslocamentos relativos à resíduos de aminoácidos de proteínas nos espectros, deve-se ao fato da razão molar dos resíduos das glucanas ser consideravelmente maior que a dos resíduos de cada aminoácido.

4.2.3 Análise Elementar

Os resultados da análise elementar nos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados para o *A. blazei* e *L. edodes* são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Análise elementar dos polissacarídeos isolados obtidos do *A. blazei* e *L. edodes*.

Amostras	(% Elementos pesquisados – <i>A. blazei</i> / <i>L.edodes</i>)			
	Nitrogênio	Carbono	Hidrogênio	Enxofre
Polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados	2,55/1,75	32,99/34,24	5,37/6,27	0,32/0,31

A partir do percentual de nitrogênio foram calculados os teores de proteínas nas amostras utilizando o fator 4,38, obtendo-se 11,17% para o *A. blazei* e 7,7% para o *L. edodes*.

4.3 Propriedades dos Polissacarídeos e/ou glicoproteínas em Solução

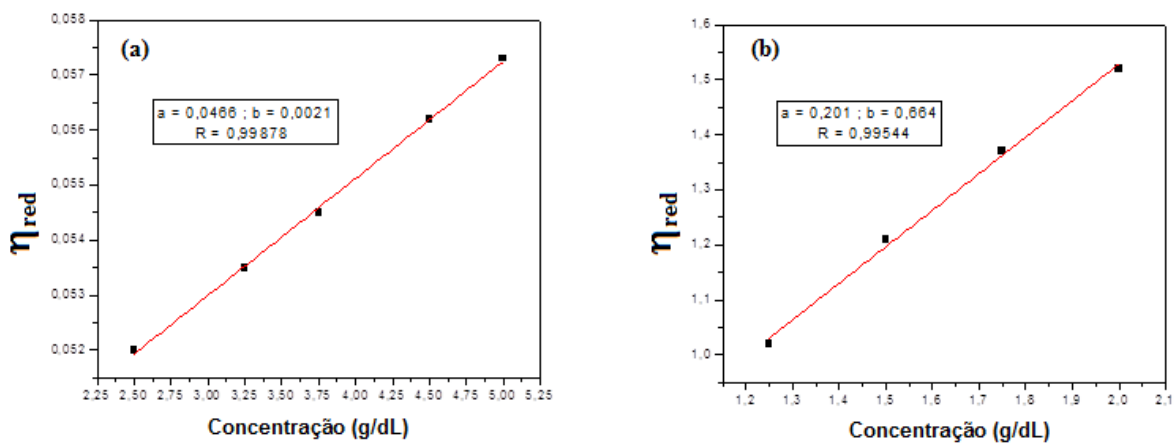
4.3.1 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar

A solução aquosa dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* apresentou viscosidade intrínseca $[\eta]$ de 4,66 mL/g e massa molar viscosimétrica média de $1,32 \times 10^5$ g/mol, cujo valor não é muito diferente daquele verificado na literatura $1,6 \times 10^5$ g/mol (Gonzaga, 2002). Já para polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L. edodes* a viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi de 20,1 mL/g e a massa molar viscosimétrica média $9,1 \times 10^4$ g/mol, valor próximo ao encontrado na literatura na faixa de $7,24 \times 10^4$ a $4,21 \times 10^5$ g/mol (Zhang et al, 2002).

Citações na literatura (Zhang et al, 2005) apresentam altos valores de viscosidades para soluções de glucanas isoladas de cogumelos. Em estudos com frações isoladas do Lentinan, um medicamento antitumoral constituído de β -glucanas isoladas do cogumelo *L. edodes*, livre de proteína, foram observados valores de viscosidades $[\eta]$

de 903,3 mL/g (Xu et al, 2008). Estudos (Surenjav e col, 2006) utilizando frações isoladas do *L. edodes* com teor proteico variando de 4,6 a 15,2 %, foram obtidas viscosidades intrínsecas com valores de 1050 a 1250 mL/g. A elevada massa molar e a conformação em tripla hélice rígida foram as características apresentadas para justificar os altos valores de viscosidade desses polissacarídeos e/ou glicoproteínas. Esses dados sugerem que o comportamento viscosimétrico pode ser dependente da porção protéica. Os baixos valores de viscosidade para as soluções dos materiais em estudo podem ser justificados considerando a presença de vários íons, geralmente presentes, e da proteína conjugada, os quais, provavelmente, causam modificações conformacionais favoráveis à promoção do enovelamento da estrutura e/ou compactação.

Figura 16. Viscosidade reduzida x concentração: (a) *A. blazei* e (b) *L. edodes*.



4.3.2 Estudo Reológico

As viscosidades das soluções aquosas dos polissacarídeos foram estudadas considerando-se experimentos de fluxo contínuo com variação da taxa de cisalhamento. Os gráficos de viscosidade absoluta versus taxa de cisalhamento, no intervalo de 40 a 800 s⁻¹ para soluções de concentração 1, 3, 5, 7 e 10% (m/v) apresentaram valores de viscosidade absoluta crescentes, com o aumento da concentração do polissacarídeo (**Figura 17**). Entretanto, para cada concentração em particular, no caso das soluções de polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *A. blazei*, praticamente não se observa variação na viscosidade, indicando comportamento Newtoniano (**Figura 17.a**). O comportamento Newtoniano é característica favorável para fármacos injetáveis, pois está diretamente relacionado com fluídos de baixas viscosidades. As soluções referentes ao *L. edodes* (**Figura 17.b**) apresentam comportamento típico de polissacarídeos e/ou glicoproteínas, diminuindo a viscosidade rapidamente com o aumento da taxa de deformação, até atingir um platô. Para cada concentração em particular se observa que viscosidade absoluta mostrou-se mais elevada quanto menor a taxa de cisalhamento, tal variação caracteriza um comportamento pseudoplástico. Matérias que apresentam comportamento pseudoplástico são interessantes para formulações cosméticas uma vez que tornam-se menos viscosos no momento da aplicação facilitando o uso da formulação.

As propriedades reológicas das β -glucanas podem mudar dependendo das suas características moleculares (como peso molecular e estrutura), do tempo de armazenamento, do tempo de espera que antecede as análises e dos tratamentos térmicos realizados anteriormente. Outra razão para as diferenças neste comportamento pode estar baseada nas diferenças estruturais das glucanas. Estudos sugerem que as glucanas obtidas do *L. edodes* apresentam conformação em tripla-hélice (Xu, 2012) justificando, em parte, suas altas viscosidades. Já pesquisas com glucanas do *A. blazei* sugerem configuração em novelo aleatório, contribuindo para baixas viscosidades (Gonzaga, 2002).

Figura 17. Viscosidade absoluta x taxa de cisalhamento (40 a 800s⁻¹) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆). (a) *A. blazei* e (b) *L. edodes* .

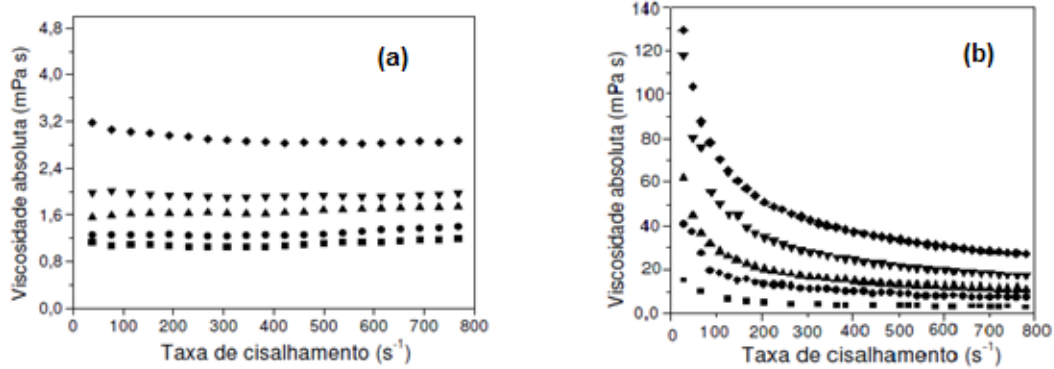
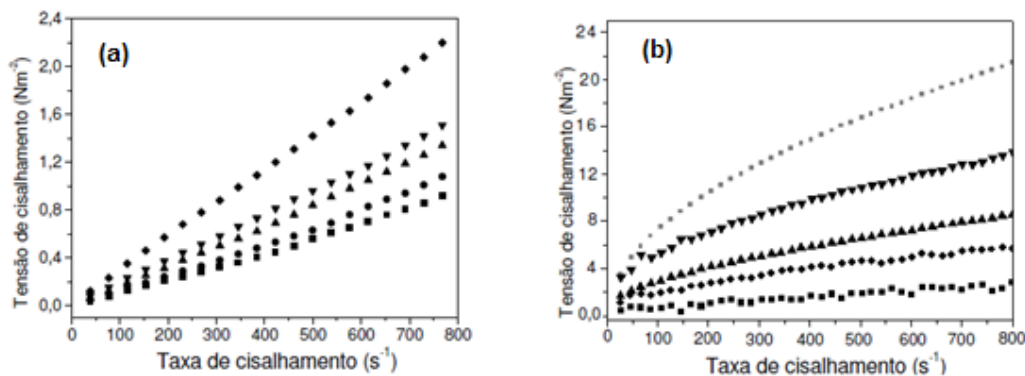


Figura 18. Tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento: 40 a 800s⁻¹ dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados a 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆).(a) *A. blazei* e (b) *L. edodes*.



O gráfico de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, para o polissacarídeo e/ou glicoproteínas do *A. blazei* (**Figura 18.a**), mostra um comportamento linear crescente com o aumento da tensão aplicada para todas as concentrações estudadas, característico de fluxo Newtoniano. Já o gráfico de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, para o polissacarídeo do *L. edodes* (**Figura 18.b**), mostra um comportamento não-newtoniano, tal como demonstrado pela não linearidade entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento.

Com a finalidade de se avaliar o comportamento de fluxo das soluções foram calculados os parâmetros m e n que correspondem, respectivamente, ao coeficiente de consistência e índice de fluxo.

Tabela 5. Coeficiente de consistência (m) e índice de fluxo (n) para as soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados.

Soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados (%)	<i>A. blazei</i>		<i>L. edodes</i>	
	m (mPa s)	n	m (mPa s)	n
1	0,09	1,04	24,61	0,69
3	0,11	1,04	159,20	0,54
5	0,16	1,01	246,70	0,53
7	0,22	0,98	590,00	0,47
10	0,25	1,00	646,30	0,52

Os valores de n para as condições aplicadas são apresentados na **Tabela 5**, os quais foram próximos de 1,0, para soluções do *A. blazei*, como esperado para comportamento Newtoniano. Já para as soluções do *L. edodes* os valores de n ficaram no intervalo de 0,47 a 0,69 sendo consideradas como líquidos não-Newtonianos (Dongowski et al., 2005). Soluções de β - glucanas de cereais, comumente utilizadas na alimentação, exibem de modo geral um comportamento pseudoplástico mesmo em soluções de baixas concentrações (Burkus e Temelli, 2005). A pseudoplasticidade dessas glucanas é prontamente estabelecida para soluções de alta viscosidade, apresentando altos coeficientes de consistência e baixos índices de fluxo ($\ll 1$), próprios de fluídos não-Newtonianos.

Os valores dos coeficientes de consistência (m) (**Tabela 5**) se revelaram crescentes com o aumento da concentração nas condições de cisalhamento trabalhadas. Comportamento semelhante foi obtido para soluções das gomas xantana e carragenana e para soluções de amido e pectina (Marcotte et al., 2001).

4.3.3 Cromatografia de Permeação em Gel

A análise de cromatografia de permeação em gel - CPG foi utilizada para avaliar a massa molar dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *A. blazei* e do *L. edodes*. O cromatograma obtido (**Figura 19**) mostra uma maior a massa molecular média ponderal (Mw) para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei*, condizente com

os resultados da massa molar viscosimétrica. A **Tabela 6** mostra os dados obtidos para a massa molecular média ponderal (Mw), a massa molecular numérica (Mn) e o índice de polidispersidade (Mw/Mn). O valor de Mw obtido para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* ($3,35 \times 10^6$ g/mol) não é muito diferente daquele verificado na literatura $2,32 \times 10^6$ g/mol (Gonzaga, 2006). Já para polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *L. edodes* o valor de Mw foi de $9,54 \times 10^4$ g/mol, bem próximo dos valores da literatura, na faixa de $7,24 \times 10^4$ a $4,21 \times 10^5$ g/mol (Zhang et al., 2002). Os altos índices de polidispersidade para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas caracterizam heterogeneidade, sugerindo uma necessidade de fracionamento.

Figura 19. Cromatograma para as amostras de polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L. edodes* e *A. blazei*.

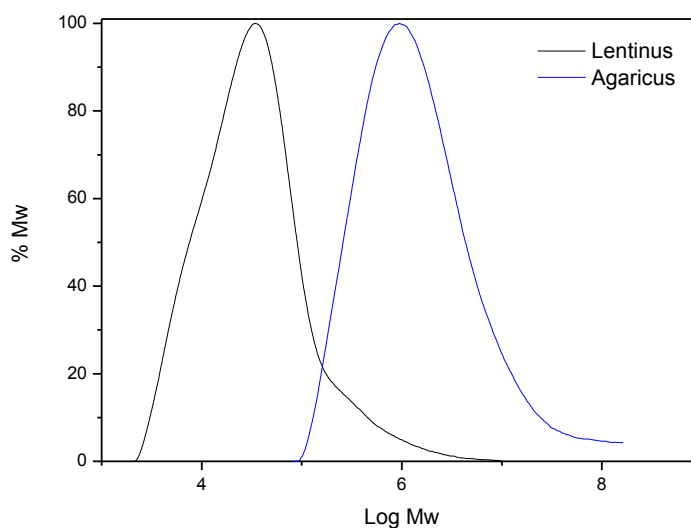


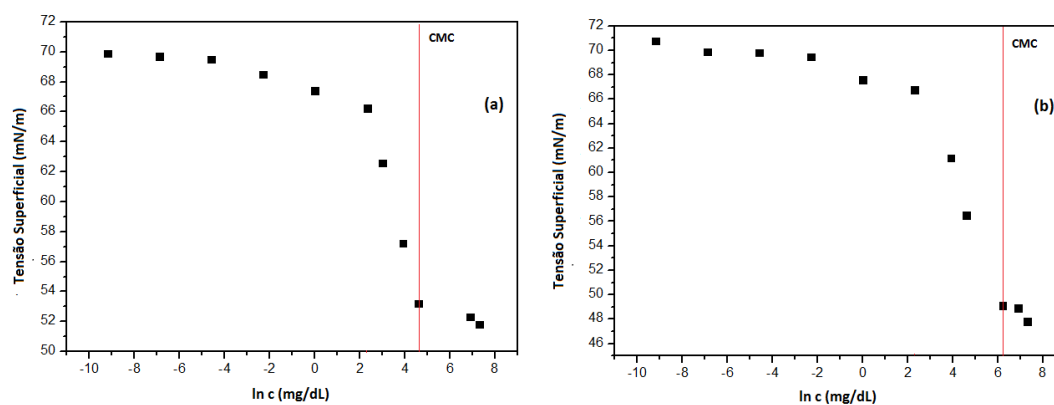
Tabela 6. Massa molecular média ponderal (M_w), a massa molecular numérica (M_n) e o índice de polidispersidade (M_w/M_n) obtidos dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* e *L. edodes*.

	Polissacarídeos isolados do <i>A.</i> <i>blazei</i>	Polissacarídeos isolados do <i>L.</i> <i>edodes</i>
M_w	$3,35 \times 10^6$	$9,54 \times 10^4$
M_n	$6,64 \times 10^5$	$2,04 \times 10^4$
M_w/M_n	5,05	4,66

4.3.4 Concentração Micelar Crítica

Os gráficos da tensão superficial em função de \ln da concentração das soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas, realizados a 25°C, são apresentados na **Figura 20 (a) e (b)**, para o *A. blazei* e *L. edodes* respectivamente.

Figura 20. Tensão superficial em função do $\ln c$ para soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* (a) e *L. edodes* (b).



Através das medidas da tensão superficial foi possível obter os valores da concentração micelar crítica (cmc) e da fração molar na cmc (X_{cmc}), que são apresentadas na tabela 07.

Tabela 7. Valores de concentração micelar crítica (cmc) e Fração molar na cmc

	Solução do <i>A. blazei</i>	Solução do <i>L. edodes</i>
cmc (mol.L ⁻¹)	2,9 x 10 ⁻⁷	5,2 x 10 ⁻⁵
X _{cmc}	5,2 x 10 ⁻⁹	9,4 x 10 ⁻⁷
Tensão Superficial das moléculas (mN.m ⁻¹)	52,12	49,08

Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas demonstraram reduzir a tensão superficial da água que se apresenta em torno de 72 mNm⁻¹ a 25°C. A baixa concentração de formação micelar (< 1,0%) é característica favorável à aplicação comercial de surfactantes (França, 2002).

Os valores encontrados para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas obtidos do *L.edodes* foram menores se comparados aos do *A.blazei*. A diferença na conformação estrutural, estrutura mais ramificada para *L.edodes*, pode contribuir para que uma menor quantidade de moléculas ocupe a superfície para o arranjo micelar.

A cmc mostrou-se baixa quando comparada a valores apresentados em outros trabalhos (Correia e col., 1995; Maiti e Chatterji, 2000; França, 2002). O fato de se tratar de uma glicoproteína pode justificar tal comportamento, já que as proteínas contribuem para o espessamento da camada aquosa interfacial. Então, para moléculas grandes, espera-se que uma concentração menor das mesmas seja necessária no início da micelização (Dickinson et al, 2003).

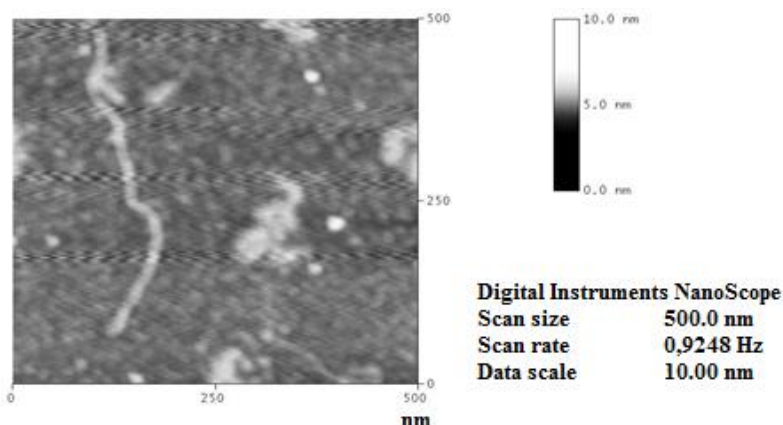
Porém os valores obtidos para soluções de polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *A.blazei* (**Tabela 07**) foram menores se comparados aos presentes na literatura: cmc (6,66 x 10⁻⁶ M) e X_{cmc} (1,2 x 10⁻⁷) para polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *A.blazei* (Gonzaga, 2006). Tal diferença pode estar relacionada à estrutura das unidades monoméricas, massa molar e conformação estrutural.

4.3.4 Avaliação da Conformação Estrutural por Microscopia de Força Atômica

Os melhores resultados de imagem foram obtidos para mica modificada a partir de soluções diluídas (0,1% m/v). Nessas condições foi possível observar as características da fita molecular do polissacarídeo.

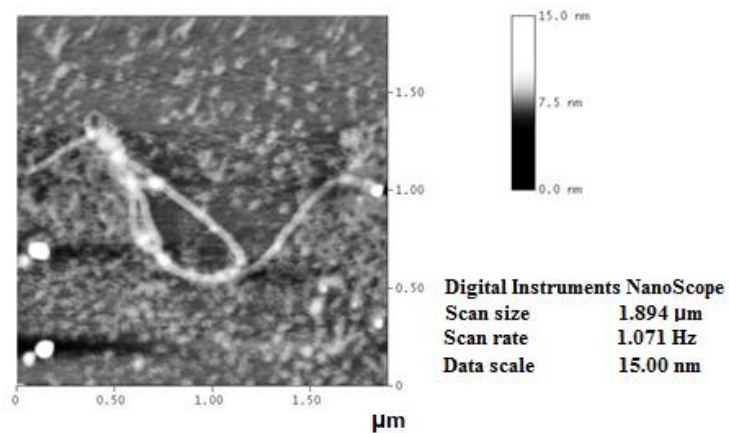
Na imagem da **Figura 21** são observadas moléculas de polissacarídeo isolados do *A.blazei* em diferentes conformações. Na imagem verifica-se uma molécula completamente desenovelada, com características lineares, onde o comprimento é de aproximadamente 500 nm com diâmetro em torno de 28,3 nm. Na mesma imagem é ainda possível observar outras moléculas parcialmente enoveladas onde a ponta da fita molecular avança para fora do “novelo” molecular.

Figura 21. Imagem de MFA no modo “tapping” do polissacarídeo do *A.blazei* em mica. Área: 500 x 500 nm.



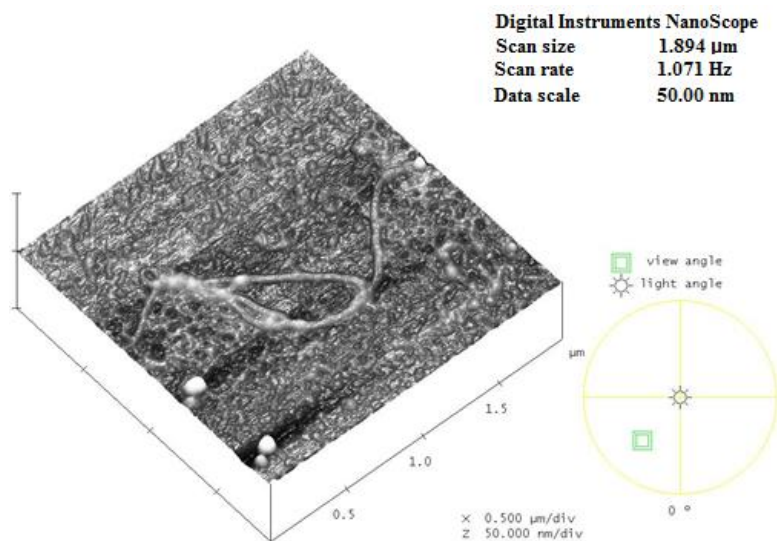
Na imagem da **Figura 22** observa-se uma molécula onde a fita polimérica foi revelada enquanto parte do enovelamento se manteve fazendo com que a imagem da molécula apareça como um laço.

Figura 22. Imagem de tapping MFA do polissarídeo do *A. blazei* em mica.
Área: 1.89 x 1.89 μm .



A mesma imagem pode ser observada no modo 3D (**Figura 23**) ilustrando a forma tridimensional do polissacarídeo.

Figura 23. Imagem em 3D da Figura 22.



Nas imagens das **Figuras 24 e 25**, que representam uma molécula do polissacarídeo isolados do *L.edodes*, verifica-se um aspecto morfológico ramificado (**Região 02**). Também pode ser observado uma região onde as laterais das fitas se conectam (**Região 01**), que pode representar as ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias unidas. A melhor resolução das imagens, se comparado ao do *A. blazei* deve-se ao fato das imagens terem sido feitas em períodos diferentes da pesquisa, onde ocorreu a mudança do microscópio.

Figura 24. Imagem de AFM no modo “tapping” do polissacarídeo do *L.edodes* em mica. Área: 3.255 x 3.255 μm .

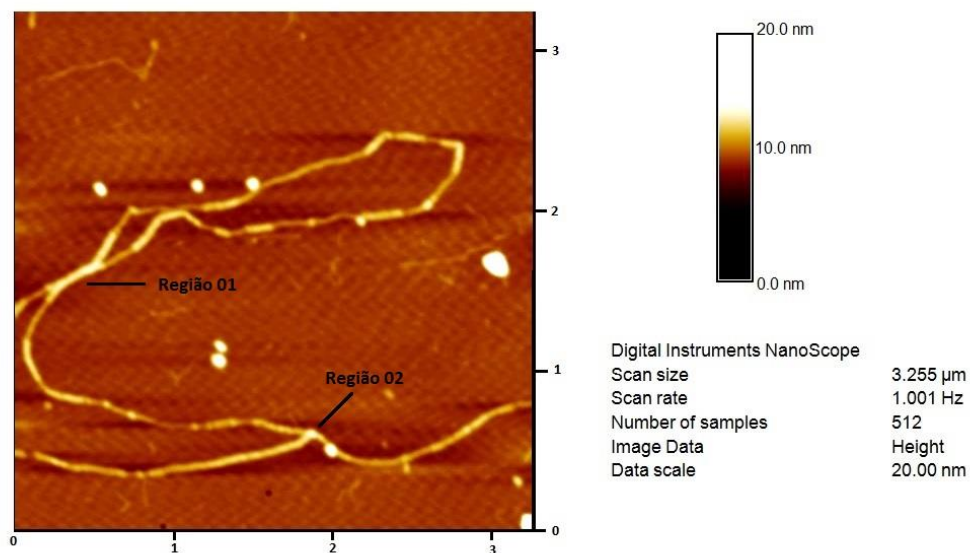
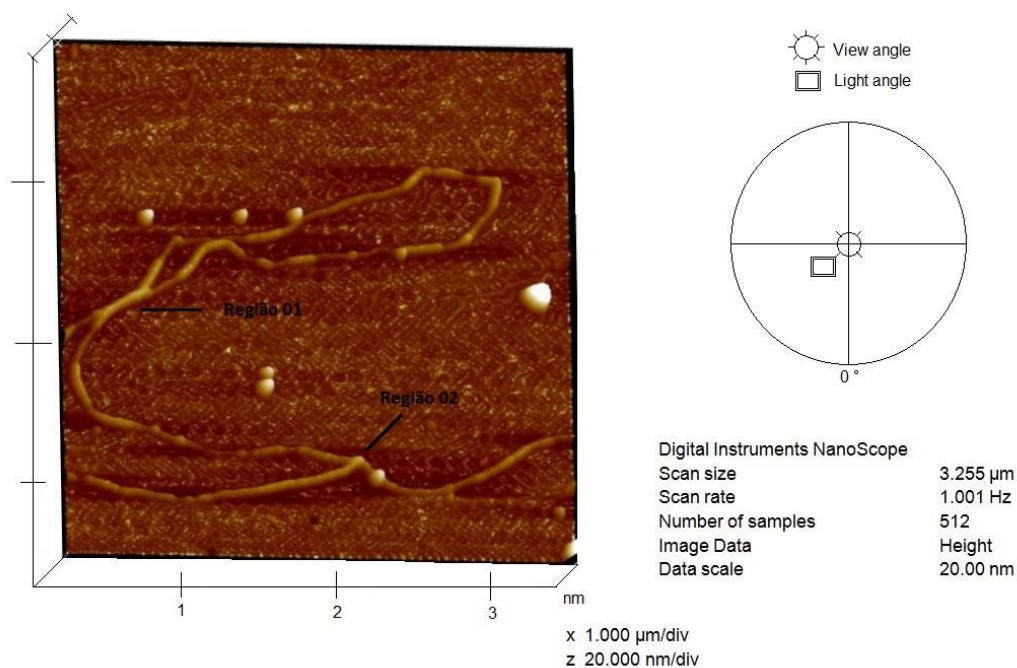


Figura 25. Imagem em 3D da Figura 24.



As imagens de MFA revelam variabilidade estrutural dos polissacarídeos. As estruturas mais ramificadas, obtida a partir do *L.edodes*, e as mais enoveladas, obtida do

A.blazei, podem estar relacionadas às mudanças de comportamento observadas na viscosidade e cmc.

Algumas estruturas de glucanas com atividades biológicas têm sido descritas como moléculas lineares e/ou ramificadas, com suas cadeias principais compostas de glicose unidas por ligações de conformações α ou β , possuindo, quando ramificadas, cadeias ligadas em diferentes pontos (Wasser, 2002).

4.4 Propriedades termorresponsivas pelo método da inversão de tubo

4.4.1 Diagrama de Fases

A análise do diagrama de fases foi utilizada para avaliar a interferência dos polissacarídeos do *A. blazei* e do *L. edodes* no processo de gelificação do F127, objetivando uma combinação do copolímero com os polissacarídeos para ser utilizada no desenvolvimento de géis dermatológico com propriedades antivirais e anti-inflamatórias.

Na faixa de temperatura estudada (10-90 °C), o F127 começa formar gel na concentração de 15%, com uma temperatura crítica de 38 °C, temperatura a partir da qual, sob aquecimento, o fluido torna-se gel, voltando a ser fluido na temperatura de 48°C. O diagrama mostra que uma maior concentração de F127 proporciona um aumento da faixa de temperatura na qual o sistema comporta-se como gel, até atingir um estado de gel imóvel.

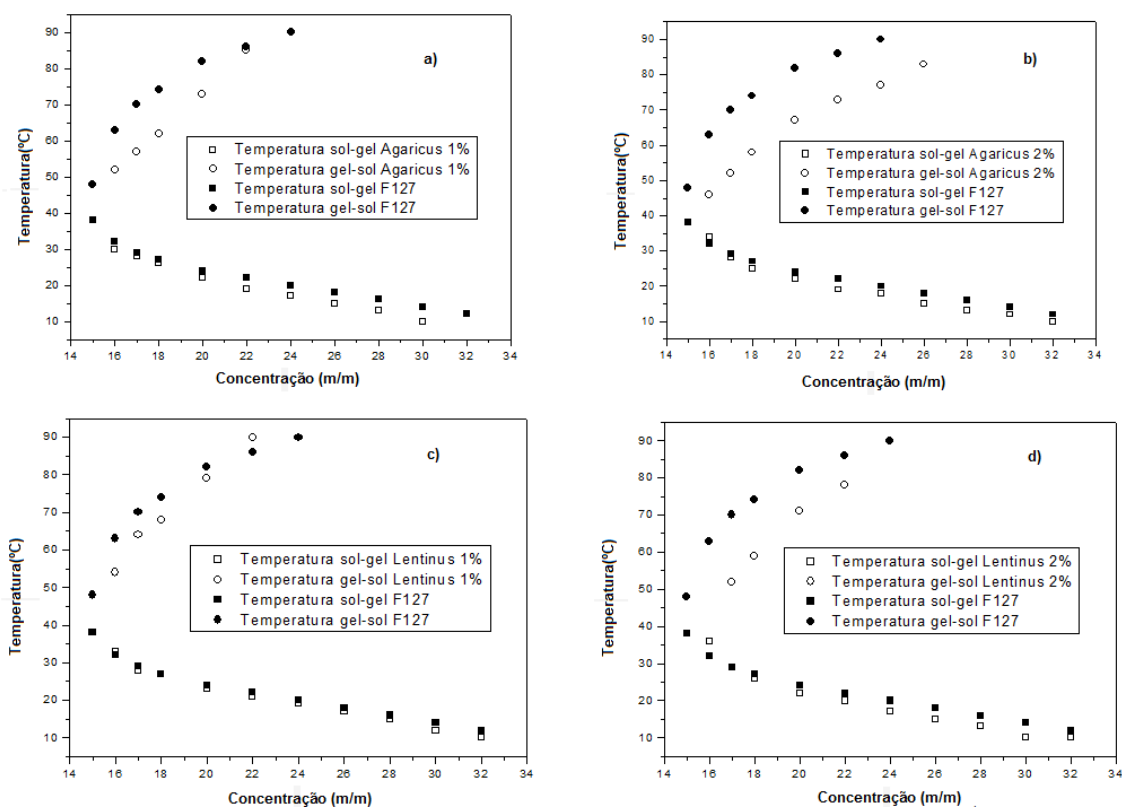
A transição sol-gel é uma consequência de uma diminuição da solubilidade do copolímero em água com o aumento da temperatura, aonde o sistema vai aumentando sua viscosidade. Entre os fatores responsáveis pelo efeito da termorresponsividade está a diminuição das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água. (Lilian.2012).

A presença do polissacarídeo diminui a faixa de temperatura em que o sistema permanece na fase gel (**Figura 26**), ou seja, diminuindo a temperatura na qual o sistema passa de sol para gel e reduzindo significativamente a temperatura na qual o sistema volta a ser sol. Tal efeito pode estar relacionado ao caráter hidrofílico dos polissacarídeos, permitindo a formação de ligações de hidrogênio com a água, levando a uma diminuição das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água. Essa diminuição da solubilidade é mais significativa quando se aumenta a concentração dos

polissacarídeos e/ou glicoproteínas (**Figuras 26.b e 26.d**), logo, o que se observa é que o a solubilidade do fármaco em água interfere ou afeta o perfil de solubilidade do copolímero.

A formação de géis, com teores de F127 entre 16-20%, apresenta uma temperatura de transição na faixa entre a temperatura ambiente e a temperatura corpórea (25-37°C), além de não serem tão rígidos, tornando-se misturas interessantes para a administração de medicamentos.

Figura 26. Diagramas de fases do F127 e da sua mistura com polissacarídeos e/ou glicoproteínas: (a) Polissacarídeos isolados do *A. blazei* – 1%; (b) Polissacarídeos isolados do *A. blazei* – 2%; (c) Polissacarídeos isolados do *L. edodes* – 1%; (d) Polissacarídeos isolados do *L. edodes* – 2%.



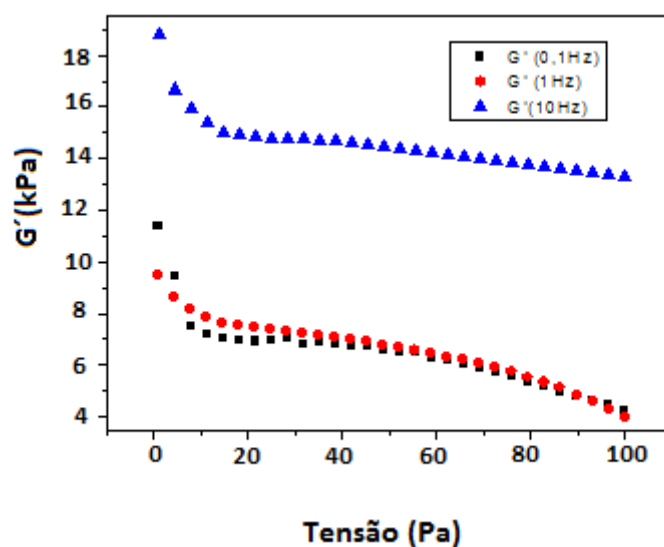
4.4.2 Reologia

4.4.2.1 – Determinação da região de linearidade

A determinação do comportamento reológico dos géis teve início com a determinação da região de linearidade para o F127 (18% m/m), **Figura 27**, para que pudesse ser estabelecida a tensão ideal de trabalho. A varredura de tensão ou

deformação, a uma frequência constante, é utilizada para determinar o limite da viscoelasticidade linear pela identificação do valor crítico deste parâmetro de varredura. Na região viscoelástica linear, não é observado dependência da deformação e da tensão em relação à frequência (Lapasin; Pricil, 1995). Sendo assim, todos os testes oscilatórios foram executados em um valor de tensão de 30Pa, o qual estava dentro da região viscoelástica linear.

Figura 27. Reograma do módulo de armazenamento (G') pela tensão – região de linearidade.



4.4.2.2 – Determinação da temperatura de mudança de fase sol-gel

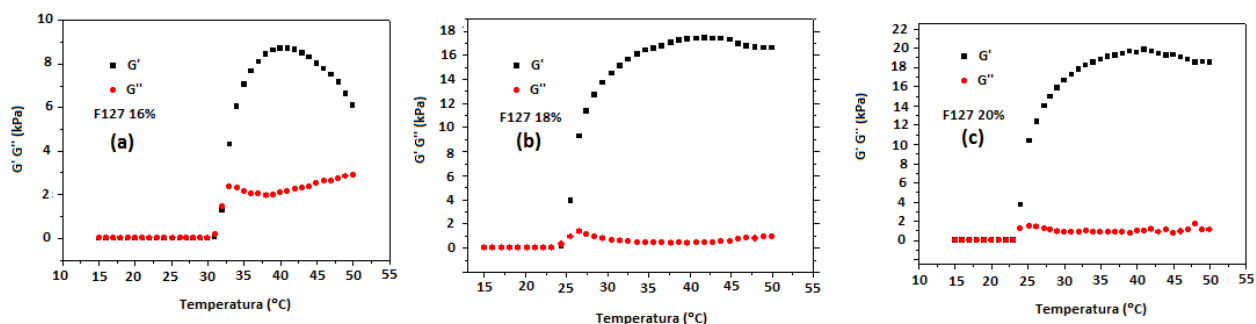
Objetivando o possível uso dos géis para finalidades terapêuticas os mesmos foram preparados nas concentrações de 16, 18 e 20% m/m de F127 e realizado um estudo relacionando as propriedades viscoelásticas com a temperatura para determinação da temperatura de mudança do estado de sol para o de gel.

Com base nos reogramas obtidos (**Figura 28**) foi verificada para cada uma das misturas à temperatura na qual ocorre a transição de sol para gel, ou seja, a temperatura na qual o G' passa a ser superior ao G'' , passando a predominar o caráter sólido. Os resultados obtidos foram iguais os do método da inversão de tubos (**Figura 26**) como mostra a **tabela 08**. Observa-se que o aumento da concentração de F127 reduz a temperatura de início da gelificação.

Tabela 8. Temperatura de transição de sol para gel para as misturas de F127 pelos métodos da inversão de tubos e reologia.

Gel	Temperatura sol-gel pela inversão dos tubos	Temperatura sol-gel pela reologia
F127 - 16% (m/m)	33°C	33°C
F127 - 18% (m/m)	26°C	26°C
F127 - 20% (m/m)	24°C	24°C

Figura 28. Relação entre as propriedades viscoelásticas e a temperatura para o F127 em diferentes concentrações: (a) - F127 16% m/m; (b) - F127 18% m/m e (c) - F127 20% m/m.



4.4.2.3 – Influência dos polissacarídeos no processo de gelificação

A análise dos reogramas foi utilizada para avaliar a interferência dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *A. blazei* e do *L. edodes* no processo de gelificação do F127. Nas **Figuras 29 e 30** temos a combinação do F127 (16-20%) com polissacarídeos (1% m/m) isolados do *A. blazei* e *L. edodes*, onde se comprova as observações feitas pelo diagrama de fases, **Figura 26**, que a presença dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas reduz a temperatura na qual o sistema passa de sol para gel, ou seja, potencializa o processo de pectização. A **Tabela 09** representa a redução de temperatura observada entre os géis. Para a mais baixa concentração do F127 (16% m/m) e para a mais alta concentração do F127 (20% m/m) os efeitos provocados nas propriedades viscoelásticas são mais significativos para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L. edodes*. Tal resultado pode estar relacionado à maior viscosidade das soluções do *L. edodes* e ao aspecto morfológico ramificado das cadeias. Para a concentração intermediária de F127 (18% m/m) o

resultado foi o oposto, sendo os efeitos mais significativos para os polissacarídeos isolados do *A.blazei*, o que torna necessário a repetição do experimento. Comparando os dados da reologia com os da inversão de fases, **Tabela 10**, é observada uma diferença nas temperaturas. Tal diferença é decorrente da maior precisão dos experimentos reológicos, já que pode ser visualizado o início da gelificação, ou seja, quando o gel é classificado como mole.

Tabela 9. Temperaturas de gelificação para o F127 e para as misturas do F127 com polissacarídeos e/ou glicoproteínas.

F127	Temperatura de gelificação sem polissacarídeo	Temperatura de gelificação com polissacarídeos (<i>A.blazei</i>)	Temperatura de gelificação com polissacarídeos (<i>L.edodes</i>)
F127 – 16% m/m	33°C	32°C	28°C
F127 – 18% m/m	26°C	23°C	25°C
F127 – 20% m/m	24°C	22°C	21°C

Tabela 10. Temperatura de transição de sol para gel para as misturas do F127 com polissacarídeos e/ou glicoproteínas pelos métodos da inversão de tubos e reologia.

F127	Temperatura de gelificação com polissacarídeos (<i>A.blazei</i>)		Temperatura de gelificação com polissacarídeos (<i>L.edodes</i>)	
	Inversão dos tubos	Reologia	Inversão dos tubos	Reologia
	F127 – 16% m/m	30°C	32°C	33°C
F127 – 18% m/m	25°C	23°C	26°C	25°C
F127 – 20% m/m	23°C	22°C	23°C	21°C

Figura 29. Relação entre as propriedades viscoelásticas e a temperatura para os géis formados pela combinação do F127 e os polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *A.blazei*: (a) - F127 16% m/m + polissacarídeos 1% m/m; (b) - F127 18% m/m polissacarídeos 1% m/m e (c) – F127 20% m/m + polissacarídeos 1% m/m.

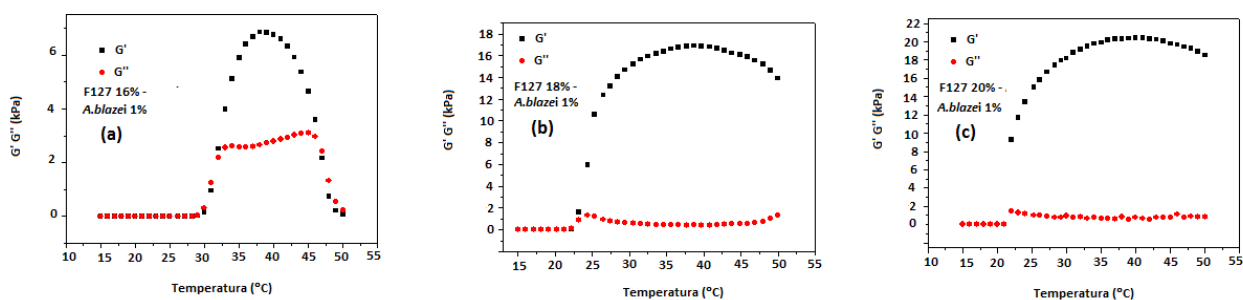
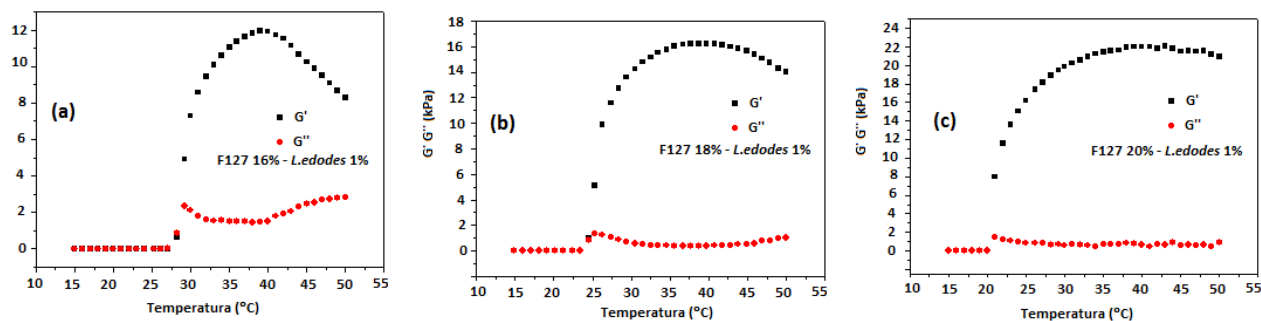


Figura 30. Relação entre as propriedades viscoelásticas e a temperatura para os géis formados pela combinação do F127 e os polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *L.edodes*: (a) - F127 16% m/m + polissacarídeos 1% m/m; (b) - F127 18% m/m + polissacarídeos 1% m/m e (c) – F127 20% m/m + polissacarídeos 1% m/m



4.4.2.3 – Dependência da frequência com a força estrutural

A estabilidade dos géis foi verificada por meio da relação entre as propriedades viscoelásticas e frequência, **Figuras 31 e 32**. À temperatura de 17°C, **Figuras 31a e 32a**, foram observados que os módulos de perda (G'') do F127 18% m/m e da mistura do mesmo com os polissacarídeos e/ou glicoproteínas foram maiores que os módulos de armazenamento (G'), o que caracteriza uma fraca estrutura interna, ou seja, uma baixa estabilidade. Quando os géis foram analisados a 25°C, **Figuras 31b e 32b**, podem ser observados que no F127 18% m/m o módulo elástico G' é praticamente igual ao módulo viscoso G'' , ou seja, uma estrutura fraca, porém na mistura com o polissacarídeo o G' foi maior que o G'' , caracterizando que o polissacarídeo aumentou o poder de gelificação. Já na temperatura corporal (37°C), **Figuras 31c e 32c**, os géis apresentaram uma alta estabilidade (G' maior que G''), pois ambos módulos são aproximadamente paralelos ao eixo das abscissas em toda faixa de frequência medida (Morris, 1995). Em todos os casos a presença do polissacarídeo permitiu um aumento dos módulos elásticos, aumentando assim a estabilidade dos géis, sendo os efeitos mais representativos nos géis de *A.blazei*.

Figura 31. Dependência da frequência com a força estrutural para as misturas de F127 18% m/m com 1% m/m dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A.blazei*: a) temperatura de 17°C; (b) temperatura de 25°C; (c) temperatura de 37°C.

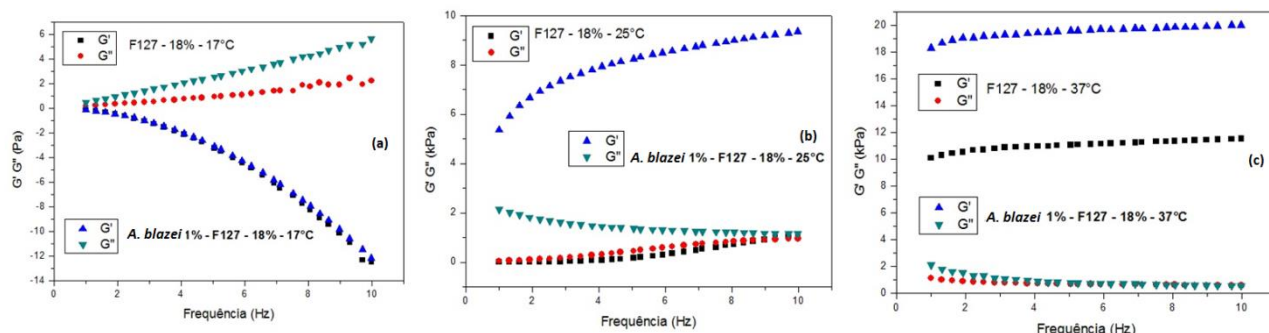
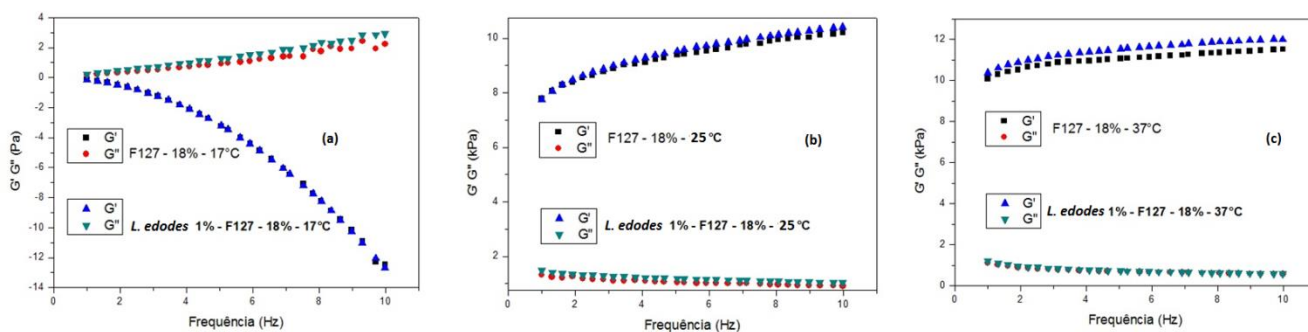


Figura 32. Dependência da frequência com a força estrutural para as misturas de F127 18% m/m com 1% m/m dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *L.edodes*: a) temperatura de 17°C; (b) temperatura de 25°C; (c) temperatura de 37°C.

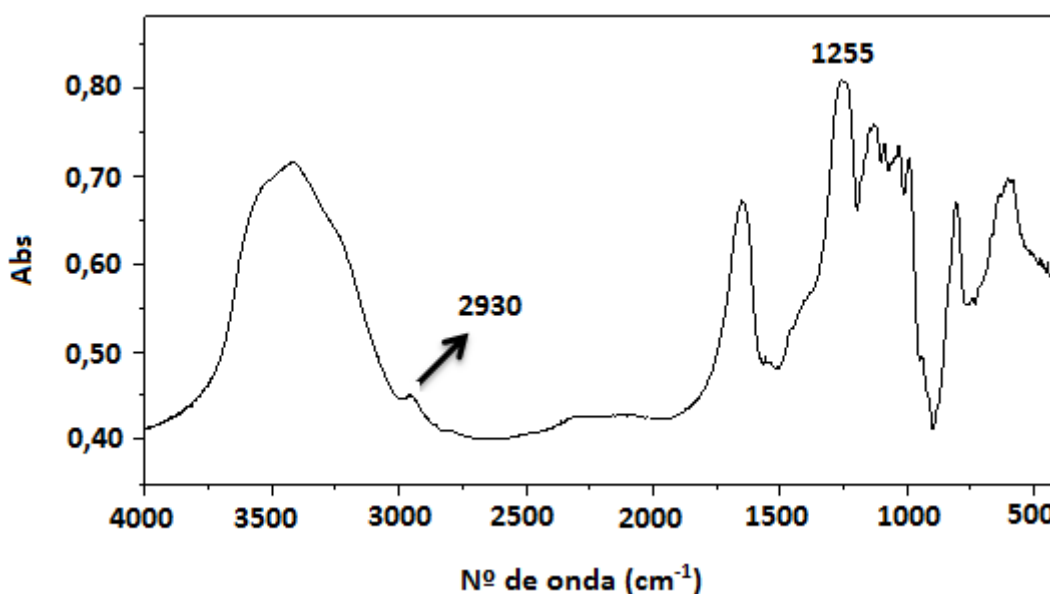


4.5 Modificação química dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas por sulfatação analisada por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR).

Na **figura 33**, o espectro de FT-IR do polissacarídeo sulfatado, revelou frequências de absorção referentes aos grupos OH ($3000-3500\text{ cm}^{-1}$) e uma diminuição da intensidade da banda de 2930, se comparado ao polissacarídeo não sulfatado, **Figura 10**, o que caracteriza o aumento do grau de substituição por sulfatação do polímero. Porém a região que caracteriza a impressão digital do processo de sulfatação é a de 1255 cm^{-1} , que se encontra bem intensificada em relação ao polissacarídeo não sulfatado características em torno de 3451 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} referentes aos estiramentos

vibracionais de hidroxilas e C-H, respectivamente. Devido o aumento do grau de substituição por sulfatação do polímero, a intensidade da banda de 2923 cm^{-1} se apresenta diminuída. Na figura 11 mostra a região da impressão digital do polissacarídeo, onde a intensidade da banda de 1255 cm^{-1} , referente ao estiramento assimétrico do grupo S=O (Peyman et.al, 2011), caracterizando que o método escolhido para sulfatação foi bem sucedido.

Figura 33. Espectro infravermelho dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas sulfatados do *A. blazei*, em pastilha de KBr.



4. 6 Capacidade de absorção de gordura

Estudos preliminares mostram uma boa capacidade de absorção de gordura por parte dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas. No caso do *A.blazei*, 100 mg do polissacarídeo foi capaz de absorver 335 mg de gordura, de um total de 2g. Para as mesmas condições, 100mg do polissacarídeo isolado do *L.edodes* absorveu 338mg de gordura. Esta interação pode estar entre a carga positiva presente na glicoproteína e a carga negativa presente nos ácidos graxos (Silva, et. al, 2006)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos polissacarídeos isolados dos cogumelos *A. blazei* e *L. edodes* demonstraram similaridade quanto as características estruturais analisadas, havendo predominância de glucanas em configuração $\beta(1\rightarrow6)$ e presença da proteína, possivelmente conjugada ao polissacarídeo.

Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* apresentaram maior massa molar em relação aos obtidos do *L. edodes*. Porém as soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do cogumelo *A. blazei* apresentaram baixa viscosidade, mesmo em concentrações elevadas, e comportamento Newtoniano. Já as soluções do *L. edodes* apresentaram uma maior viscosidade e comportamento não-Newtoniano. O enovelamento da estrutura dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *A. blazei* e o aspecto mais ramificado para as cadeias do *L. edodes* pode justificar tal comportamento. Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas demonstraram reduzir a tensão superficial da água e os valores encontrados para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas obtidos do *L. edodes* foram menores se comparados aos do *A. blazei*.

A combinação do copolímero F127 aos polissacarídeos e/ou glicoproteínas mostrou-se interessante para o desenvolvimento de géis dermatológicos, principalmente os que apresentam teores de F127 em 18%, já que a temperatura de transição encontra-se na faixa entre a temperatura ambiente e a temperatura corpórea (25-37 °C), o que permite que o sistema fique na fase sol enquanto presente na embalagem, o que facilita sua saída, e fique na fase gel à temperatura corporal, permitindo a permanência do fármaco em contato com a pele, além de apresentar uma certa estabilidade e não ser tão rígido.

O método de sulfatação utilizado demonstrou ser eficaz para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas em estudo o que permite a continuação da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alban, S.; Franz, G., *Biomacromolecules*, 2001, 2, 354-361.
- Alban, S.; Schauerte, A.; Franz, G., *Carbohydrate Polymers*, 2002, 47, 267-276.
- Bellini, M., Angeli, J., Matuo, R., Terezan, A., Ribeiro, L., Mantovani, M., *Toxicology in Vitro*, 2006, 20, 355–360.
- Braseq, Brasileira de Equipamentos Ltda. Boletim Técnico Informativo Braseq. Jarinu (SP), 2007.10 p.
- Brondsted, H., Hovgaard, L., Simonsen, L., *STP Pharma Sciences*, 1995, 5, 65-69.
- Burkus, Z., Temelli, F., *Carbohydrate Polymers*, 2005, 59, 459-465.
- Carbonero, E.; Gracher, A.; Komura, D.; Marcon, R.; Freitas, C.; Baggio, C.; Santos, A.; Torri, G.; Gorin, P. & Iacomini, M. , *Food Chemistry* , 2008, 111, 531 – 537.
- Carey, P. R., *Biochemical Application of Raman and Resonance Raman Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1992.
- Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Costa, F. M. L. L., Yeates, S. G. e Booth, *Langmuir*, 2007, 23, 9229.
- Chang, H. L., Chao, G. R., Chen. C. C., Mau. J. L, *Food Chemistry*, 2001, 74, 203-207.
- Dickinson,E.; *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 25-39.
- Dolz.; Hernandez,M. J.; Delegido, J. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, 421-427.
- Dongowski, G., Drzikova, B., Senge, B., Blochwitz, R., Gebhardt, E., Habel, A., *Food Chemistry*, 2005, 93, 279-291.
- Dong, Q.; Yao, J.; tong Yang, X. & nian Fang, J., *Carbohydrate Research*, **2002**, 337, 1417 – 1421.
- Eira, A. F.; Montini, R. M. C, *Manual de cultivo do shiitake (Lentinus edodes)*. FEPAF, FCA/UNESP, Botucatu, 38 p, 1997.
- Esposito, E.; Azevedo, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educ, 2004.
- Ferreira, J. E. *Produção de cogumelos*. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 1998. 135 p.

- Freitas, R. A. *Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos*. Dissertação do curso de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2003.
- Gonzaga, M. L. C., *Isolamento e Caracterização de Polissacarídeos e Constituintes Presentes no Agaricus blazei* Murill. Dissertação do curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, 2002.
- Gonzaga, M. L. C., *Agaricus blazei* Murill: Isolamento, Caracterização Estrutural e Atividades Biológicas dos Polissacarídeos e/ou Glicoconjugados Presentes. Dissertação do curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- Gordon, M. H.; *Food antioxidants*., 1990, 1-18.
- Grosev, V. M., Bozac, R., Puppels, G. J., *Spectrochimica Acta* (part a), 2001, 57, 2815-2829.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M., Villares, A., Martínez, J., *Fitoterapia*, 2010, 81, 715-723.
- Ishikawa, N.Z.; Kasuya, M.C.M.; Vanetti, M.C.D.. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2001,32, 206-210,.
- Kaneno, R. et al.. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42, 909-916,]
- Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., *Carbohydrate Polymers*, 1990, 12, 393-403.
- Kirk P., Cannon P., David, J., Stalpers J., *Dictionary of the Fungi*, CABI Publishing, 2008.
- Ko, Y.-T.; Lin, Y.-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 11, 3313-3318.
- Kohl, S.; Pickering, L. K. & Diluzio, N. R., *Journal of Immunological Methods*, 1979, 29, 361 - 368
- Kubala, L.; Ruzickova, J.; Nickova, K.; Sandula, J.; Ciz, M.; Lojek, A., *Carbohydrate Research*, 2003, 338, 2835-2840.
- Kumar, N., Ravikumar, M. N. J., Domb, A. J. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 23, 2001.
- Martin, A. *Physical Pharmacy*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 153-476.
- Lapasin, R.; Privil, S. *Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications*. Glasgow, London: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall. 1ª Edição, p. 620, 1995.

- Letchford, K., Burt, H., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 65, 259.
- Lipke, P. N.; Ovalle, R., *Journal of Bacteriology*, 1998, 15, 3735-3740.
- Liu, Q.; Xu, X.; Zhang, L. & Yu, *European Polymer Journal*, 2012, 48, 1329 – 1338.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L., *Food Chemistry*, 1999, 65, 477-482.
- Marcotte, M., Hoshahili, A. R. T., Ramaswamy, H. S., *Food Research International*, 2001, 34, 695-703.
- Martinichen-Herrero, J. C.; Carbonero, E. R.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005a, 60, 97-102.
- Martinichen-Herrero, J. C.; Carbonero, E. R.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, *Carbohydrate Polymers*, 2005b, 35 (1-2), 7 – 13.
v., p. 97-102, 2005b.
- Myers, D., *Surfactant Science and Technology*, 1992, 2.ed. New York: VCH Publishers.
- Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54, 2897-2905.
- Moresi, M., Lo Presti, S., Mancini, M., *Journal of Food Engineering*, 2001, 50, 235-245.
- Morris, E. R.; Polysaccharide Rheology and In-Mouth Perception. In: Stephen, A. M. Food Polysaccharides and their Applications. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 517-546.
- Nishino. T.; Aizu, Y.; Nagumo, T.. *Thrombosis Ressearch.*, 1991, 64,723-731.
- Ohno, N.; Uchiyama, M.; Tsuzuki, A.; Tokunara, K.; Miura, N. N.; Adachi, Y.; Aizawa, M. W.; Tamura, H.; Tanaka, S.; Yadomae, T., *Carbohydrate Research*, 316,161-172, 1999.
- Oliveira, R. B., Lima, E. M.. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2006, 3, 29.
- Payne, K. J., Veis, A., *Biopolymers*, 1988, 27, 1749-1760.
- Pomin, V. H. *Biopolymers*, 2009, 91(8), 601-609, 2009
- Putzke, J.; Putzke, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos*. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 1998.
- Saito, S., Sazaki, S., Furumoto, T., Sumita, S., Hinomoto, T., *Carbohydrate Research*, 1994, 258, 59-75.

- Schaeffer, D. J., Krylov, V. S., *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2000, 45, 208-227.
- Silvestein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Guanabara Koogan, 1994.
- Silva, H. S. R. C.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I. *Quím. Nova* [online]. 2006, 29, 4, pp. 776-785
- Soares, A. A. et al., *Food Chemistry*, 2009, 112, 775-781.
- Sterflinger, K., Tesei, D., Zakharova, K., *Fungal Ecology*, 2012, 5, 453-462.
- Steffe, J. F. , Rao, M. A., *Viscoelastic Properties of Foods*, 1992, 207-231.
- Steffe, J. F. *Rheological methods in food process engineering*. 2.e d. Michigan: Freeman, 1996.
- Stuelp, P. M. *Atividade de α - e β -D-glucanas extraídas do líquemn Ramalina celastri modificadas quimicamente*. Dissertação do curso de Pós-graduação em Ciências - Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 1997.
- Surenjav, M., Zhang, L., Xu, X., Zhang, X., Zeng, F., *Carbohydrate Polymer*, 2006, 63, 97-104.
- Thetsrimuang, C.; Khammuang, S.; Chiablaem, K.; Srisomsap, C. & Sarnthima, R., *Food Chemistry* , 2011, 128, 634 – 639.
- Wanka, G., Hoffman, H., Ulbricht, W. *Colloid and PolymScience*, 1990, 268, 101.
- Wasser, S. P., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60, 258-274.
- Wood, P. J., *Journal of Cereal Science*, 2007, 46, 230-238.
- Xu, X., Xu, J., Zhang, Y., Zhang, L., *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, 735-741.
- Xu, X., Chen, P., Zhang, L., Ashida, H., *Carbohydrate Polymers* , 2012, 1855-1862.
- Yamanaka, D., Tada, R., Adachi, Y., Ishibashi, K., Motoi, M., Iwakura, Y., Ohno, N., *International Immunopharmacology* , 2012, 14, 311–319.
- Yokoyama, M. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1992, 9, 213.
- Yoshida, T.; Yasuda, Y.; Mimura, T.; Kaneko, Y.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Uryu, T., *Carbohydrate Research*, 1995, 276, 425-436.
- Young, S.-H. & Jacobs, R. R., *Carbohydrate Research*, 1998, 310, 91 – 99.
- Zhang, P., Zhang, L., Cheng, S., *Carbohydrate Research*, 2002, 337, 155-160.

Zhang, L., Li, X., Xu, X., Zeng, F., *Carbohydrate Research*, 2005, 340, 1515-1521.

Zhang, M.; Cui, S. W.; Cheung, P. C. K.; Wang, Q., *Food Science and Technology*, 2007, 18, 4-19.