



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE QUÍMICA - BACHARELADO

KATARINA BOTELHO SARAIVA

**PROPRIEDADES DE POLISSACARÍDEOS BIOATIVOS DE COGUMELOS E DE
SUAS COMPOSIÇÕES COM *ALOE VERA*.**

FORTALEZA

2017

KATARINA BOTELHO SARAIVA

PROPRIEDADES DE POLISSACARÍDEOS BIOATIVOS DE COGUMELOS E DE SUAS
COMPOSIÇÕES COM *ALOE VERA*.

Monografia apresentada ao Curso de Química do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra de Aguiar Soares.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B762p Botelho Saraiva, Katarina.
Propriedades de polissacarídeos bioativos de cogumelos e de suas composições com Aloe vera /
Katarina Botelho Saraiva. – 2018.
59 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Sandra de Aguiar Soares.

1. Agaricus brasiliensis. 2. Lentinus edodes. 3. Aloe vera. 4. Polissacarídeos bioativos. 5.
Caracterização Química e Biológica. I. Título.

CDD 540

KATARINA BOTELHO SARAIVA

PROPRIEDADES DE POLISSACARÍDEOS BIOATIVOS DE COGUMELOS E DE SUAS
COMPOSIÇÕES COM *ALOE VERA*.

Monografia apresentada ao Curso de Química
do Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para obtenção
do título de Bacharel em Química.

Aprovada em: ___ / ___ / ___.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Arcelina Pacheco Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Thiago Magalhães Farias Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Arilda e Rogério.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que essa etapa acontecesse.

Aos meus pais e irmã pela compreensão, paciência, apoio e disponibilidade em ajudar sempre.

A minha orientadora Sandra, pela oportunidade concedida, pelo respeito, pela atenção, pela confiança e pela contribuição para meu crescimento profissional ao longo de toda a graduação.

À amiga Arcelina por ter contribuído no desenvolvimento do meu trabalho assim como por sua amizade e apoio em todos os momentos.

Ao amigo Thiago, por ter me ajudado no começo desse trabalho e ter confiado em mim desde o princípio.

Aos amigos Isabel, Kheslley e demais pela parceria durante as disciplinas.

À amiga Sarah, por todos os momentos de descontração, pois tal hora era ela que estava lá para estudar, rir e criar códigos.

Aos amigos que fizeram e fazem parte do grupo LABPIM: Thiago, Yohanna, Felipe, Arcelina, Carol, Aiêrta, Rafael, Sarah, David, Denise, Alessandro, Luana, Alan e demais pelas contribuições, sugestões e momentos de descontração.

Aos colegas Johnny e Wesley pela ajuda e disponibilidade na reologia e análises de FTIR.

Aos colegas Joaquim e Glawber pela colaboração com as análises biológicas.

Aos meus amigos Lara, Beatriz e Mario, por todo o apoio, paciência e disponibilidade nas horas que precisei.

Aos professores e membros da AGEAC de Fortaleza, pelo apoio e pelo auxílio no meu crescimento espiritual, que me conferiu equilíbrio e confiança.

À Universidade Federal do Ceará pela estrutura física necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

“A única coisa que importa é colocar em prática, com sinceridade e seriedade, aquilo em que se acredita.” (Dalai Lama)

RESUMO

Os diversos benefícios dos polissacarídeos bioativos extraídos de cogumelos têm sido amplamente estudados e comprovados. Os estudos mostram atividades antiviral, anti-inflamatória e antioxidante. Esta pesquisa avaliou as composições químicas e as propriedades biológicas dos polissacarídeos bioativos (glucanas) extraídos dos cogumelos *Lentinus edodes* e *Agaricus brasiliensis*, assim como as composições destes com polissacarídeos extraídos da *Aloe vera*. Os polissacarídeos foram extraídos em meio aquoso, com precipitação em etanol, e os materiais isolados foram avaliados quanto ao rendimento, comportamento reológico, composição química através de Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), citotoxicidade e atividade antioxidante. O comportamento reológico dos polissacarídeos isolados foi avaliado em Reômetro modelo AR 550 em sensor do tipo cone-placa. As soluções foram avaliadas em diferentes concentrações (1, 3, 5, 7 e 10%), a 25°C e em triplicata, mostrando um comportamento Newtoniano para os polissacarídeos extraídos do *Agaricus brasiliensis*, não se observando variação significativa na viscosidade com a mudança da concentração. Para os polissacarídeos extraídos do *Lentinus edodes*, observou-se um comportamento pseudoplástico. Os resultados obtidos da massa molar viscosimétrica estão de acordo com a massa molecular média ponderal (Mw) obtida na análise de cromatografia de permeação em gel, apresentando um maior resultado para os polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis*. Os dados dos diagramas de fase, certificados por meio do módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento (G') e pelo módulo de perda ou de viscosidade (G''), demonstram que a adição dos polissacarídeos diminui a faixa de temperatura em que o copolímero F127 se mantém na fase gel, sendo mais notório nos polissacarídeos do *Agaricus brasiliensis*. Os resultados obtidos do AFM indicam que os polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* possuem uma estrutura em forma de novelo, enquanto que os polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* apresentam uma estrutura ramificada. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de quelação do íon ferroso, obtendo um resultado significante.

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*; *Lentinus edodes*; *Aloe vera*; Polissacarídeos bioativos; Caracterização Química; Diagrama de Fases; Reologia e Atividades biológicas.

ABSTRACT

The various benefits of bioactive polysaccharides extracted from mushrooms have been extensively studied and verified. The studies show antiviral, anti-inflammatory and antioxidant activities. This research evaluated the chemical compositions and biological properties of the bioactive polysaccharides (glucans) extracted from the mushrooms *Lentinus edodes* and *Agaricus brasiliensis*, as well as their compositions with polysaccharides extracted from *Aloe vera*. The polysaccharides were extracted in aqueous medium, with precipitation in ethanol, and the isolated materials were evaluated for yield, rheological behavior, chemical composition through infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR), cytotoxicity and antioxidant activity. The rheological behavior of the isolated polysaccharides was evaluated in a Rheometer model AR 550 in cone-plate type sensor. The solutions were evaluated at different concentrations (1, 3, 5, 7 and 10%), at 25°C and in triplicate, showing a Newtonian behavior for the polysaccharides extracted from *Agaricus brasiliensis*, without significant change in viscosity with the change in concentration. For the polysaccharides extracted from *Lentinus edodes*, a pseudoplastic behavior was observed. The results obtained from the viscous molar mass agree with the average molecular mass (Mw) obtained in the analysis of the gel permeation chromatography, presenting a greater result for the polysaccharides isolated from *Agaricus brasiliensis*. The data of the phase diagrams, certified by the dynamic or storage shear modulus (G') and by the loss or viscosity modulus (G''), demonstrate that the addition of the polysaccharides decreases the temperature range at which the F127 copolymer remains in the gel. The results obtained from the AFM indicate that the polysaccharides isolated from *Agaricus brasiliensis* have a ball structure, whereas the polysaccharides isolated from *Lentinus edodes* have a branched structure. The antioxidant activity was evaluated by the ferrous ion chelate method, obtaining a significant result through the iron ion reduction method.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*; *Lentinus edodes*; *Aloe vera*; Bioactive polysaccharides; Chemical characterization; Phase Diagram; Rheology and Biological activities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação das estruturas de glucanas α (1→4) (a) e α (1→6) (b).....	17
Figura 2 – Representação das estruturas de glucanas β (1→3) (a) e β (1→6) (b).....	17
Figura 3 – <i>Agaricus brasiliensis</i>	18
Figura 4 – <i>Lentinus edodes</i>	19
Figura 5 – Estrutura geral dos Pluronic®.....	21
Figura 6 – Módulo complexo $ G^* $	23
Figura 7 – Fluxograma do procedimento de extração e isolamento dos polissacarídeos.....	27
Figura 8 – Espectro infravermelho dos polissacarídeos isolados do <i>Agaricus brasiliensis</i> em pastilha de KBr.....	34
Figura 9 – Espectro infravermelho dos polissacarídeos isolados do <i>Lentinus edodes</i> em pastilha de KBr.....	35
Figura 10 – Espectro infravermelho dos polissacarídeos isolados do <i>Aloe vera</i> em pastilha de KBr.....	35
Figura 11 – ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>Agaricus brasiliensis</i>	38
Figura 12 – ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>Lentinus edodes</i>	38
Figura 13 – ^{13}C – RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>Agaricus brasiliensis</i>	36
Figura 14 – ^{13}C – RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>Lentinus edodes</i>	37
Figura 15 – Viscosidade reduzida x concentração: (a) <i>Agaricus brasiliensis</i> e (b) <i>Lentinus edodes</i>	40
Figura 16 – Viscosidade absoluta x taxa de cisalhamento (40 a 800s ⁻¹) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆). (a) <i>Agaricus brasiliensis</i> (b) <i>Lentinus edodes</i>	42
Figura 17 – 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>Agaricus brasiliensis</i> (b) <i>Lentinus edodes</i>	43
Figura 18 – Cromatograma para as amostras de polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>Lentinus edodes</i> e <i>Agaricus brasiliensis</i>	45

- Figura 19 – Diagramas de fases do F127 e da sua mistura com polissacarídeos e/ou glicoproteínas: (a) Polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* – 1%; (b) Polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* – 2%; (c) Polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* – 1%; (d) Polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* – 2%.....49
- Figura 20 – Diagramas de fases do F127 e da sua mistura com polissacarídeos e/ou glicoproteínas de cogumelo e Aloe: (a) Polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* e *Aloe vera* – 1%; (b) Polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* e *Aloe vera* – 1%.....50
- Figura 21 – Reograma do módulo de armazenamento (G') pela tensão – região de linearidade.....51
- Figura 22 – Porcentagem de quelação do íon ferroso em comparação com o positivo EDTA para (a) *Agaricus brasiliensis* e (b) *Lentinus edodes*.....54
- Figura 23 – Avaliação da toxicidade do (a) *Agaricus brasiliensis* e (b) *Lentinus edodes* em neutrófilos humano através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH).....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atribuições das frequências das principais bandas dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas.....	35
Tabela 2 – Deslocamentos químicos característicos das glucanas β (1→6) e α (1→4) presentes nos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do <i>Agaricus brasiliensis</i>	36
Tabela 3 – Deslocamentos químicos característicos de glucana β (1→6) presentes nos polissacarídeos isolados do <i>Lentinus edodes</i>	37
Tabela 4 – Coeficiente de consistência (m) e índice de fluxo (n) para as soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados.....	42
Tabela 5 – 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>Agaricus brasiliensis</i> e <i>Lentinus edodes</i>	43
Tabela 6 – Temperaturas de gelificação para o F127 e para as misturas do F127 com polissacarídeos e/ou glicoproteínas.....	50
Tabela 7 – 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.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPG	Cromatografia de permeação em gel
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

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.....	17
1.1 Cogumelos.....	17
1.1.1 <i>Agaricus brasiliensis</i>	18
1.1.2 <i>Lentinus edodes</i>	19
1.2 <i>Aloe vera</i>	19
1.3 Procedimentos de extração e propriedades relacionadas.....	20
1.4 Gelificação e termorresponsividade.....	21
1.5 Absorção de gordura.....	24
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Materiais.....	26
3.2 Metodologia e procedimentos.....	26
3.2.1 <i>Extração e isolamento dos polissacarídeos</i>	27
3.2.2 <i>Análise e Caracterização dos Polissacarídeos</i>	28
3.2.2.1 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	28
3.2.2.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear (¹³C-RMN e ¹H-RMN)</i>	28
3.2.3 <i>Propriedades dos Polissacarídeos em Solução</i>	28
3.2.3.1 <i>Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar</i>	28
3.2.3.2 <i>Estudo reológico</i>	29
3.2.3.3 <i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	29
3.2.4 <i>Propriedades termorresponsivas</i>	30
3.2.4.1 <i>Método de inversão de tubo</i>	30
3.2.4.2 <i>Estudo reológico</i>	30
3.2.5 <i>Ensaio para investigação da capacidade de absorção de gordura</i>	31
3.2.6 <i>Avaliação farmacológica</i>	31
3.2.6.1 <i>Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de quelação do íon ferroso</i>	31
3.2.6.2 <i>Teste de citotoxicidade: Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)</i>	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Rendimento dos polissacarídeos solúveis em água.....	33
4.2 Caracterização Estrutural dos Polissacarídeos.....	33
4.2.1 <i>Espectroscopia na região do Infravermelho</i>	33

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C e ^1H	36
4.3 Propriedades dos Polissacarídeos e/ou glicoproteínas em solução.....	40
4.3.1 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar.....	40
4.3.2 Estudo reológico.....	41
4.3.3 Cromatografia de permeação em gel.....	44
4.4 Propriedades termorresponsivas pelo método da inversão de tubo.....	45
4.4.1 Diagrama de fases.....	45
4.4.2 Reologia.....	47
4.4.3 Influência dos polissacarídeos no processo de gelificação.....	48
4.5 Capacidade de absorção de gordura.....	50
4.6 Análises Farmacológicas.....	50
4.6.1 Análise de atividade antioxidante pelo ensaio de quelação do íon ferroso.....	50
4.6.2 Análise de citotoxicidade sobre a atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH).....	50
5. CONCLUSÃO.....	51
6. REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cogumelos

As importâncias nutricional e medicinal dos cogumelos têm sido amplamente estudadas e comprovadas, sendo cultivados e utilizados como alimento em muitos países (Chang et al, 2001; Dong et al, 2002).

Pesquisas na busca do potencial farmacológico dos cogumelos tem aumentado, principalmente em países asiáticos, explorando suas propriedades medicinais, para que os mesmos possam ser utilizados em diversas atividades terapêuticas (Gonzaga, 2006).

As propriedades terapêuticas dos cogumelos estão relacionadas com a presença de substâncias que contêm polissacarídeos de ligações β -glicosídica, como as β -glucanas, que estimulariam o sistema imunológico (Mizuno, 1990; Guillamón et al, 2010), sendo apresentadas nas **Figuras 1 e 2** as estruturas das principais glucanas com propriedades terapêuticas (Surenjav, 2006).

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

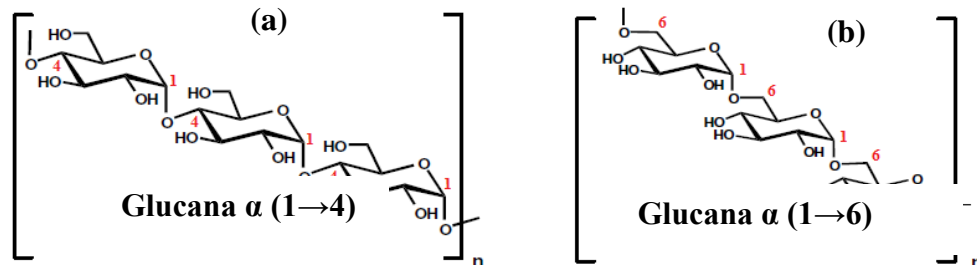
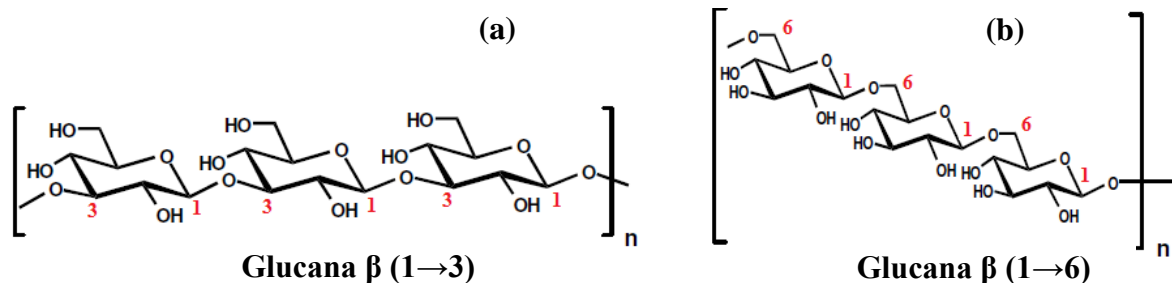


Figura 2 - Representação das estruturas de glucanas β (1 \rightarrow 3) (a) e β (1 \rightarrow 6) (b).



1.1.1 *Agaricus brasiliensis*

O *Agaricus brasiliensis*, um cogumelo nativo do Brasil, é uma espécie de fungo

pertencente a classe Basidiomycetes, mais conhecido como cogumelo do sol (**Figura 3**), cultivado em escala comercial em regiões próximas à costa atlântica, mas tendo sua produção expandida de São Paulo para outros lugares do país (Mendonça et al, 2005) e do mundo (Wasser, 2002).

Tem em sua composição nutricional a presença de proteínas (40 a 45%), carboidratos (38 a 45%), fibras (6 a 8%), cinzas (5 a 7%) e lipídios (3 a 4%), havendo variação desses valores em função do local e das condições de cultivo, assim como processamento e armazenagem (Mizuno, 2002).

Desde a década de 70, pesquisadores têm divulgado a atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos do *Agaricus brasiliensis* (Ohtsuka et al, 1973; Ohno et al, 2001; Wasser, 2002; Bellini et al, 2006), e, até hoje, outros estudos comprovam suas significativas potencialidades terapêuticas como: atividade anticancerígena (Ribeiro et al, 2006; Kaneno et al, 2004), antibacteriana (Bernardshaw et al, 2005), antiviral (Sorimachi et al, 2001; Faccin et al, 2006), antioxidante (Silva et al, 2009; Lo e Cheung, 2004), entre outras.

Segundo estudos, tais propriedades estão relacionadas à presença de glucanas de cadeia linear com configurações β (1→3) e β (1→6) (Yamanaka et al, 2012; Dong, 2002).

Em seu aspecto físico, o *Agaricus brasiliensis* apresenta a auréola com coloração marrom, lamelas de coloração creme e hifas com coloração branca (**Figura 3**).

Figura 3. *Agaricus brasiliensis*



Fonte: Menezes, 2014

1.1.2 *Lentinus edodes*

Lentinus edodes, conhecido como shiitake, é uma das espécies de cogumelo comestível mais cultivadas no mundo, tendo sua produção mundial e nacional cada vez maior, tendo como destaque a produção na China e regiões sul e sudeste do Brasil (Ishikawa et al, 2001).

Assim como o *Agaricus brasiliensis*, o *Lentinus edodes* também pertence a

classe Basidiomycetes, tendo alto valor nutritivo e recebendo atenção devido a efeitos positivos na saúde, como atividade antitumoral (Kitzberger et al, 2007), atividades antioxidante e antibacteriana (Shimada et al, 2003; Yang et al, 2002) e tratamento de câncer (Carbonero et al, 2008), sendo esses efeitos também relacionados a presença de glucanas com configurações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$ (Minato, 1999; Xu et al, 2012; Liu et al, 2012)

Os aspectos físicos do *Lentinus edodes* são semelhantes aos do *Agaricus brasiliensis*, porém com uma tonalidade de cor mais escura e uma auréola enrugada com pigmentos brancos (**Figura 4**).

Figura 4. *Lentinus edodes*



Fonte: Menezes, 2014

1.2 *Aloe vera*

Pertencente à família Aloeaceae, a *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) possui folhas verdes no formato de lanças pontiagudas formadas por uma casca fina, dura e espinhosa, tendo em seu interior uma mucilagem incolor e uma seiva amarelada. Há muito tempo, seu conteúdo tem sido amplamente utilizado devido ao conhecimento popular de suas inúmeras propriedades benéficas (Grindland e Reynolds, 1986), sendo bastante empregado em aplicações medicinais, nutricionais e cosmeceúticas (Bondreau e Beland, 2006; Pothuraju et al, 2016).

A seiva amarelada é composta principalmente por antraquinonas, que confere seu efeito laxante (Vogler e Ernst, 1999; Eshun e He, 2004). Sendo a parte interna mais estudada e utilizada, a mucilagem incolor é composta em sua maior parte por água (98,5% a 99,5%) e possui, em sua parte sólida, majoritariamente, polissacarídeos bioativos, em particular acemananas (Lee et al, 2001). Esse polissacarídeo é composto principalmente por unidades de manoses acetiladas unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Chow et al, 2005;

Femenia et al, 1999). Adicionalmente, estudos mostram a presença de outros polissacarídeos como galactanas e pectinas (Mandal e Das, 1980a, 1980b).

Estudos têm mostrado que os efeitos benéficos atribuídos a *Aloe vera* está relacionado às características químicas de seus polissacarídeos (Chokboribal et al, 2015; Chow et al, 2005). Apesar disso, o tipo de solo e o clima da região onde são cultivadas, o período de crescimento, entre outros fatores, pode modificar as propriedades funcionais e os efeitos benéficos da *Aloe vera* (Ray et al, 2015; Rodríguez-González et al, 2012). Tem sido mostrado que os polissacarídeos ricos em manoses não só armazenam energia (Femenia et al, 1999) como também possui um papel fundamental no comportamento reológico do gel (Campestrini et al, 2013).

Apresenta como benefícios o controle de crescimento de fungos (Castillo et al, 2010) e atividades anticancerígena, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, entre outras (Reynolds e Dweck, 1999). Estudos mostram que essas atividades biológicas são devido às ações sinérgicas dos compostos presentes (Hamman, 2008).

1.3 Procedimentos de extração e propriedades relacionadas

O objetivo da extração é separar determinada substância através de processos químicos e/ou físicos (Eggers, 2003) e a escolha do método de extração deve levar em conta o custo, o rendimento e o impacto ambiental, sendo a extração em meio aquoso com aquecimento até a ebulição uma das técnicas mais usadas, fornecendo produtos livres de solventes orgânicos, podendo ser utilizados diretamente em outros processos (Mazzutti, 2012) e favorecendo seu uso em testes farmacológicos (Gonzaga, 2006).

A viscosidade e o comportamento reológico de polissacarídeos isolados de cogumelos devem também ser levados em conta, sendo um fator importante na atuação dessas substâncias (Gonzaga, 2006). Sua viscosidade determina a via de administração que deve ser utilizada para se melhor absorvida no organismo (Ansel et al, 2000).

O mecanismo de ação imunomodulatória das β -glucanas podem 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).

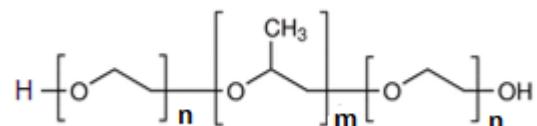
1.4 Gelificação e termorresponsividade

Copolímeros correspondem à um tipo de polímeros que apresentam duas ou mais unidades diferentes de monômeros, podendo ser divididos em quatro classes, dependendo da estruturação de seus monômeros (Yokoyama, 1992).

O uso de copolímeros na dissolução de fármacos tem sido estudado, principalmente devido à sua possível utilização como carreadores de fármacos, sendo eficientes no processo de solubilização e controle de liberação de fármacos, além de possuírem baixa toxicidade (Oliveira e Lima, 2006). Em especial, têm-se os copolímeros em bloco de caráter anfifílico, que formam micelas em solução aquosa (Letchforde Burt, 2007).

Copolímeros que possuem bloco hidrofílico de polioxietileno mostram-se favoráveis nanocarreadores de fármacos, como os poliéteres do tipo $E_nP_mE_n$ (**Figura 5**), sendo E a unidade monomérica óxido de etileno, e P a unidade de óxido de propileno, conhecidos como Pluronic® (Myers, 1992). Os Pluronic possuem termoresponsividade, que é o aumento da viscosidade à medida que há aumento da temperatura, até a formação de um gel imóvel. Apresentam, também, variação com relação à concentração: suas soluções começam a tornar-se mais viscosas com o aumento da concentração do copolímero, até atingir o estado de gel imóvel.

Figura 5. Estrutura geral dos Pluronic®.



Essa transição de sol para gel é devido a diminuição na solubilidade do copolímero em água com o aumento da temperatura, sendo reversível com a diminuição da temperatura ou, em algumas concentrações, acima de uma temperatura máxima, onde o estado de gel volta a ser sol. A menor concentração a partir da qual se verifica esse fenômeno é a concentração crítica de formação de gel (Menezes, 2014).

O método de inversão de tudo é um artifício utilizado para analisar o comportamento da formação de géis desses copolímeros em função da temperatura e da concentração. Soluções em diferentes concentrações do copolímero são analisadas numa faixa de temperatura que normalmente varia de 10°C a 90°C. Os dados são representados em um gráfico de concentração *versus* temperatura (diagrama de fases), onde se expressa a fase em que se encontra sol ou gel em determinada temperatura (Chaibunditet al.,2007).

No estudo dos géis, outro aspecto importante é o das propriedades reológicas. A medida da viscoelasticidade desses géis pode ser feita por métodos reológicos estáticos e dinâmicos. Entretanto, as propriedades podem ser medidas ao mesmo instante somente por meio de ensaios oscilatórios (Braseq, 2007), onde o material é submetido à variação de tensão ou deformação de acordo com o tempo e os resultados dependem da estrutura física e composição química do material. Com a resposta obtida, tem-se informação sobre seu aspecto estrutural a nível molecular ou pode-se prever seu comportamento macroscópico (Steffe, 1996).

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 complexo

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

Onde:

τ^o = tensão total

γ^o = deformação

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

Equação 2. Módulo complexo

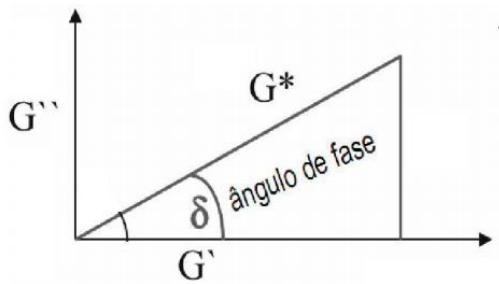
$$G^* = G' + G''$$

Onde:

G' = módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento

G'' = módulo de perda ou de viscosidade

Figura 6. Módulo complexo $|G^*|$.



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

1.5 Absorção de gordura

Intervindo na emulsificação das gorduras pelo aumento do tamanho das gotículas, as soluções viscosas de β -glucanas proporcionam uma inibição da digestão de gordura da dieta, operando como cardioprotetoras pela diminuição dos níveis de colesterol no sangue (Wood, 2007).

A β -glucana também possui efeito regulador sobre os níveis sanguíneos de glicose e insulina, tendo 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 apud Menezes, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Isolar e avaliar a composição química e atividade biológica dos polissacarídeos bioativos extraídos dos cogumelos *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes* e de suas composições com *Aloe barbadensis* Miller.

2.2 Objetivos específicos:

- Utilizar procedimento de extração e isolamento para obtenção dos polissacarídeos;
- Caracterizar os polissacarídeos bioativos extraídos através de FTIR, RMN e, em solução, através de medidas de viscosidade, reologia, cromatografia de permeação em gel e seu potencial na absorção de gordura;
- Avaliar suas propriedades termorresponsivas, mediante diagrama de fases, de géis produzidos da combinação do copolímero F127 e polissacarídeos e
- Analisar propriedades biológicas dos polissacarídeos como atividade antioxidante e citotoxicidade.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Os cogumelos *Agaricus brasiliensis blazei* e *Lentinus Edodes* foram obtidos de empresas especializadas em plantação de cogumelos em São Paulo (Blazei Murril® DEC Enterprise Comercial e Estação dos grãos respectivamente) e as folhas de *Aloe vera* obtidas do horto medicinal da Universidade Federal do Ceará. Os cogumelos foram cultivados em estufas climatizadas, reproduzindo as condições de cultivo *in natura*. As amostras foram enviadas sem raízes, desidratadas 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.

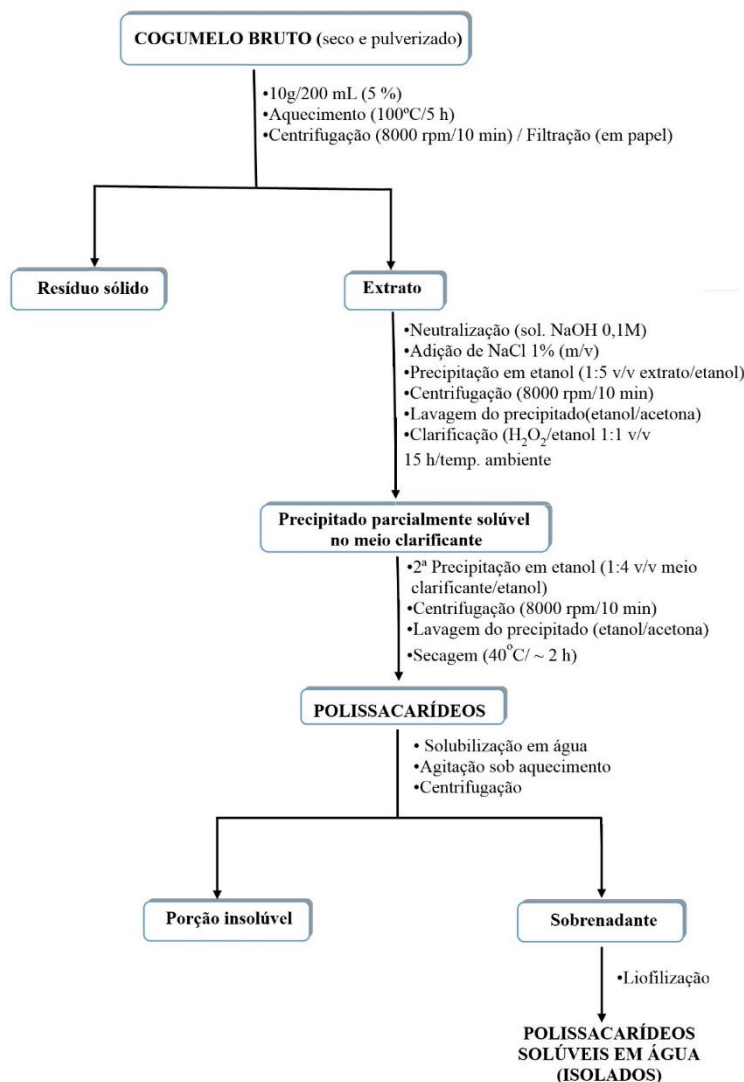
3.2 Metodologia e procedimentos

3.2.1 Extração e isolamento dos polissacarídeos

O mesmo procedimento de extração e isolamento foram aplicados para cada tipo de cogumelo, onde do cogumelo seco e pulverizado, preparou-se uma suspensão aquosa 5% (m/v) (10 g de cogumelo em 200 mL de água destilada), submetida a 100°C por 5 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada (8000 rpm/10 min) e filtrada em papel para remoção do resíduo, obtendo-se um extrato límpido de coloração alaranjada com pH por volta de 5,0 para o *Agaricus brasiliensis* e um extrato límpido de coloração amarelada com pH também próximo de 5,0 para o *Lentinus 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 favorecer a precipitação dos polissacarídeos na etapa seguinte. Em seguida, 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 com etanol e depois com acetona para retirada de eventuais traços de ácidos graxos. Devido a aparência escura do material isolado, tornou-se necessário uma clarificação, onde foi usado peróxido de hidrogênio 40%, na forma de uma mistura etanol/peróxido 1:1 (v/v) por aproximadamente 15 horas à temperatura ambiente, para evitar que a presença de pigmentação comprometesse alguma análise. Em razão da parcial solubilização do precipitado no meio clarificante, submeteu-se o material a uma segunda precipitação em etanol, na 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 horas. O precipitado final obtido foi quantificado. Após seco e pesado, o precipitado foi solubilizado em água destilada a 1% (m/v) e submetido à aquecimento de 40°C, sob agitação, por 48 horas, 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 7**.

Figura 7. Fluxograma do procedimento de extração e isolamento dos polissacarídeos.



Fonte: Menezes, 2014.

Para a extração dos polissacarídeos da *Aloe vera* fez-se uso de um procedimento mais simples onde a porção da mucilagem incolor foi extraída manualmente da casca e liofilizada por conter, majoritariamente, água em sua composição. Posteriormente, preparou-se uma suspensão aquosa, sendo submetida a 100°C por 5 horas. Após este período, a suspensão foi filtrada em papel para remoção do resíduo, concentrada em rotaevaporador e adicionada a

etanol na proporção 1:5 (v/v) (extrato/ etanol) sob agitação moderada para precipitação dos polissacarídeos. Foi retirado o etanol por rotaevaporação e os polissacarídeos foram solubilizados em água destilada para posterior liofilização. A porção foi, posteriormente, pesada.

3.2.2 Análise e Caracterização dos Polissacarídeos

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

As amostras foram analisadas em equipamento FT-IR 8300 da Shimadzu e preparadas em pastilhas de KBr sob pressão de 6 toneladas (prensagem), numa janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , na razão de 4 cm^{-1} .

3.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C - RMN e ^1H - RMN)

Para obtenção dos espectros de ^{13}C - RMN e ^1H - RMN, as amostras foram solubilizadas em D_2O , com frequência de 400 MHz, operando a 100 MHz para carbono e tempo de relaxação de 10s. Os espectros foram obtidos em equipamento Bruker modelo Avance DRX-500.

3.2.3 Propriedades dos Polissacarídeos em Solução

3.2.3.1 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar

Solução aquosa dos polissacarídeos isolados a 5% (m/v) foi submetida a aquecimento ($\approx 50^\circ\text{C}$) sob agitação por 15 horas. 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

$$[\eta] = k \cdot M_v^a$$

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 *Agaricus brasiliensis* (Varum, Martnsen e Smidsrod, 1991 apud Menezes, 2014). Para o *Lentinus edodes* o fator “k” foi $2,94 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e o expoente $a = 1,58$ (Zhanget al., 2005 apud Menezes, 2014).

3.2.3.2 Estudo Reológico

O comportamento reológico dos polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes*, assim como suas composições com *Aloe vera*, foi avaliado no Reômetro da TA Instruments modelo AdvancedRheometer 550 (AR550) em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40mm e ângulo de $1^{\circ}0'47''$, à 25°C e taxa de cisalhamento de 40 a 800 s^{-1} . As medidas das soluções em concentrações variadas (1, 3, 5, 7 e 10% para os cogumelos) foram realizadas em triplicata.

3.2.3.3 Cromatografia de Permeação em Gel

O perfil cromatográfico dos polissacarídeos 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 NaNO_3 0,1 mol/L, fluxo de 1,0 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 10^3 a 10^5 g/mol.

3.2.4 Propriedades termorresponsivas

3.2.4.1 Método de inversão de tubo

Os géis foram preparados misturando-se diferentes concentrações de F127 (16 a 32% m/m) com polissacarídeos extraídos do *Agaricus brasiliensis*, *Lentinus Edodes* e *Aloe vera* (1% - sendo 0,5% de cogumelo e 0,5 de *Aloe vera*), 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 termostaticado. 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.

3.2.4.2 Estudo Reológico

Os géis foram preparados misturando-se diferentes concentrações de F127 (16, 18 e 20% m/m) com polissacarídeos (1% 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 foi avaliado no Reômetro da TA Instruments modelo Advanced Rheometer 550 (AR550) em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de $1^\circ 0' 47''$. O módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G''), foram determinados por testes oscilatórios em frequência de 1 Hz, tensão de 30 Pa (determinada por meio da região de linearidade) e uma faixa de temperatura de 15-50°C

3.2.5 Ensaio para investigação da capacidade de absorção de gordura

Uma amostra de 100 mg polissacarídeos extraídos do *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus 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.

3.2.6 Avaliação farmacológica

3.2.6.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de quelação do íon ferroso

O ensaio de quelação do íon ferroso foi realizado de acordo com o método descrito por Chew et al. (2008) com algumas modificações. Nesta ordem, misturou-se 1 mL da amostra de

cada cogumelo nas concentrações 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL com 1 mL de Ferrozina 0,25 mM (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico). Os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto e, após 10 minutos, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 562 nm. Todas as reações foram realizadas em triplicata. O mesmo método foi realizado com o controle positivo EDTA para posterior análise e comparação de resultados.

Os resultados foram expressos como habilidade de quelação do íon ferroso (%) e calculados através da seguinte fórmula:

Equação 5. Habilidade de quelação do íon ferroso:

$$(\%) = \frac{A_o - (A - A_b)}{A_o} \times 100$$

Onde: $A_o = A_{562nm}$ dos reagentes sem amostra

$A = A_{562nm}$ da mistura reacional (amostra + reagentes)

$A_b = A_{562nm}$ da amostra sem reagentes.

3.2.6.2 Teste de citotoxicidade: Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença de *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes* (1, 10, 25, 50, 100 µg/mL), Controle (DMSO 1% - veículo), HBSS (células não tratadas) e Triton X-100 (0,2% v/v – padrão citotóxico). A seguir, os tubos de reação foram centrifugados a 755g, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, que fica localizada no citoplasma da célula e é liberada quando as células são lesadas ou necrosadas (BERGMEYER e BERNT, 1963).

O ensaio é realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorbância devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubadas com o sobrenadante, por 3 minutos, a 37°C. Foi realizada a leitura da absorbância em 340nm nos tempos 1 e 3 minutos, a 37°C, em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

Equação 7. Atividade da enzima LDH:

$$A = \left[\frac{A_1 - A_2}{2} \right] \times 1746,03$$

Onde: A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1 = absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2 = absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1746,03 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 μ L

A citotoxicidade dos cogumelos foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos polissacarídeos solúveis em água

Seguindo os procedimentos de extração citados, após isolados da parte insolúvel, obteve-se um rendimento dos polissacarídeos de aproximadamente de 10% para o *Agaricus brasiliensis*, 6,5% para o *Lentinus edodes* e 17% para a *Aloe vera*.

Para o *Agaricus brasiliensis*, o rendimento encontrado se encontra equivalente ao de estudos com o cogumelocultivado no Ceará (9,5 %) (Gonzaga, 2006) nas mesmas condições de extração (100°C / 5 horas).

Alguns estudos indicam um baixo rendimento na extração aquosa do *Lentinus edodes* (0,12%) (Lu, 2006), mas outros mostram que, quando há uso de solução básica, há um aumento do rendimento para 5% (Wang et al., 2008), mostrando que o método usado está sendo eficaz.

O rendimento encontrado em estudos para a *Aloe vera* é de aproximadamente 23,4% (Campestrini, 2013), indicando uma perda de eficiência no processo, mas ainda sendo um método efetivo.

4.2 Caracterização Estrutural dos Polissacarídeos

4.2.1 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros dos polissacarídeos dos cogumelos (**Figuras 8 e 9**) apresentam frequências de absorção características de carboidratos referentes aos grupos OH (3000-3500 cm^{-1}), aos grupos CO ($\sim 1034 \text{ cm}^{-1}$), a ligação glicosídica C-O-C ($\sim 1150 \text{ cm}^{-1}$) e ao carbono anomérico C1H (1079 cm^{-1}) (Brondsted, Hovgaard e Simonsen, 1995). O indício da ligação C-H em configurações α e β foram identificadas em torno de 900 cm^{-1} (Seefeldt, 2009 apud Magalhães, 2014). A presença de proteína também foi identificada através das frequências em cerca de 1651 cm^{-1} (íons carboxilato e amida I) e 1423 cm^{-1} (íons carboxilato) (Grosev, Bozac e Puppels, 2001; Carey, 1992). Estiramento de NH absorve frequentemente em 3400 cm^{-1} (Silvestein, Bassler e Morrill, 1994), o qual, certamente, está sobreposto pela larga banda de OH. A natureza glicoproteica do material foi apresentada e confirmada. A **Tabela 1** mostra as atribuições das principais frequências características dos polissacarídeos isolados.

O espectro da *Aloe vera* (**Figura 10**) apresenta bandas características de carboidratos

relativas aos grupos OH (banda larga em 3439 cm^{-1}) e a ligação glicosídica C-O-C (1151 cm^{-1}). Um outro pico em 1035 cm^{-1} foi devido a presença de unidades de glucanas (Chang, Chen e Feng, 2011). Os picos entre $1245\text{-}1260$ mostram a presença de o-acetil éster. Estudos sugerem que a presença de grupo acetil é necessário para ação biológica, pois capacita a molécula a atravessar barreiras na célula (Reynolds e Dweck, 1999). A presença de proteína também foi identificada através das frequências em cerca de 1625 cm^{-1} (íons carboxilato e amida I) e 1424 cm^{-1} (íons carboxilato) (Grosev, Bozac e Puppels, 2001; Carey, 1992).

Figura 8. Espectro infravermelho dos polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* em pastilha de KBr.

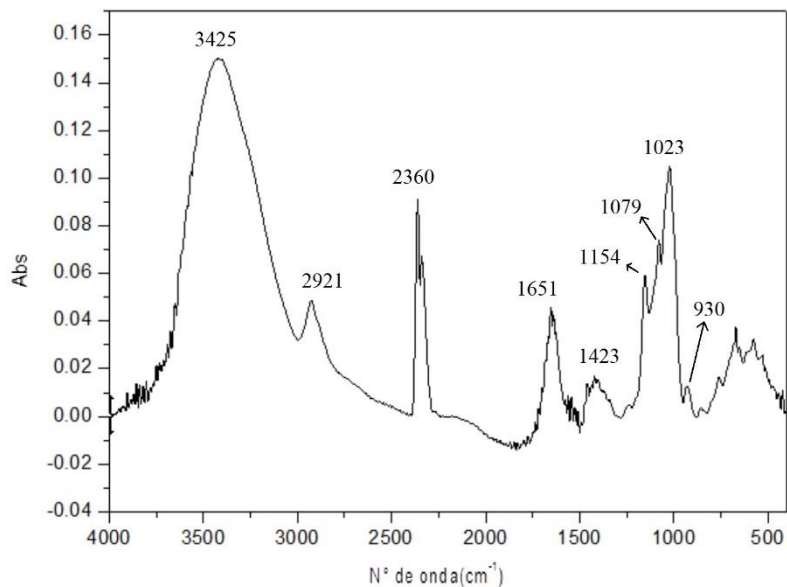


Figura 9. Espectro infravermelho dos polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* em pastilha de KBr.

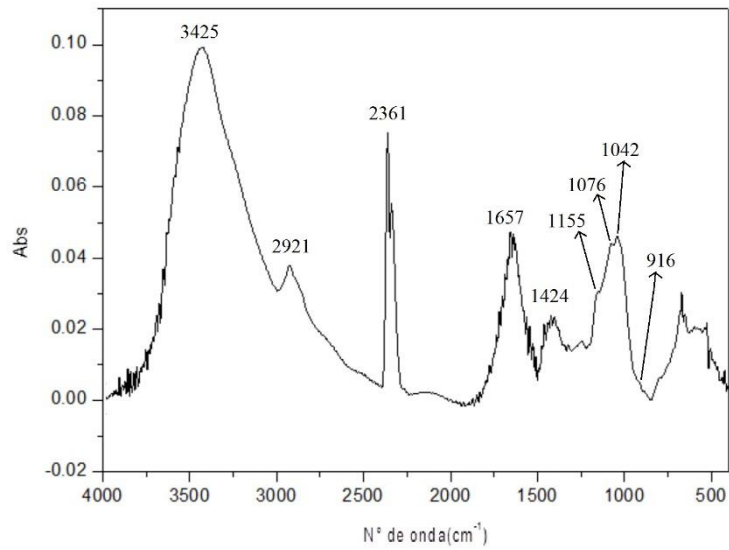


Figura 10. Espectro infravermelho dos polissacarídeos isolados do *Aloe vera* em pastilha de KBr.

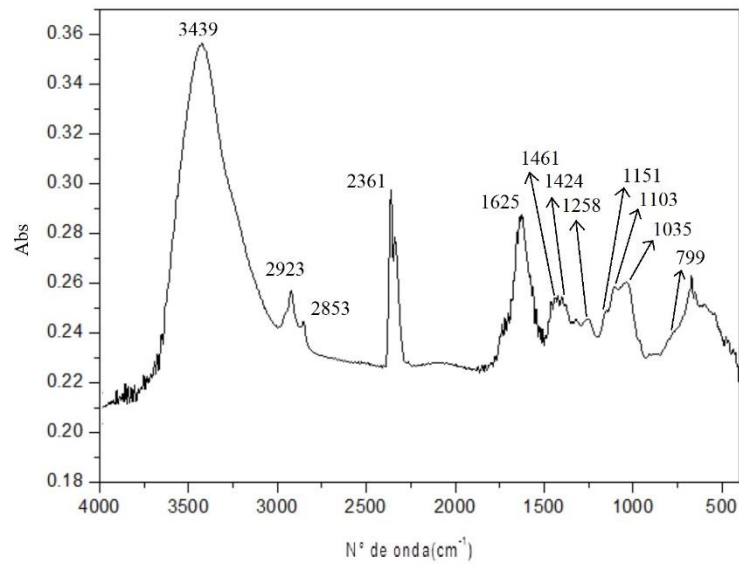


Tabela 1. Atribuições das frequências das principais bandas dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3396	v (O-H) e (N-H)
2930	v(C – H)
1653	v (COO-), Amida I (vC=O)
1562	Amida II (vCN e vNH)
1411	v(COO-)
1242	Proteína não ordenada Amida III (vCN e vNH)
1150	v(C–O–C) éter da ligação glicosídica
1079	v(C1-H) carbono anomérico
1034	v(C-O) álcool primário
887	B-glucana
871	α-glucanas

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear ¹³C e ¹H

Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes* foram analisados por ¹³C - RMN e ¹H- RMN, mostrados nas **figuras 11 a 14**.

Figura 11. ¹H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis*.

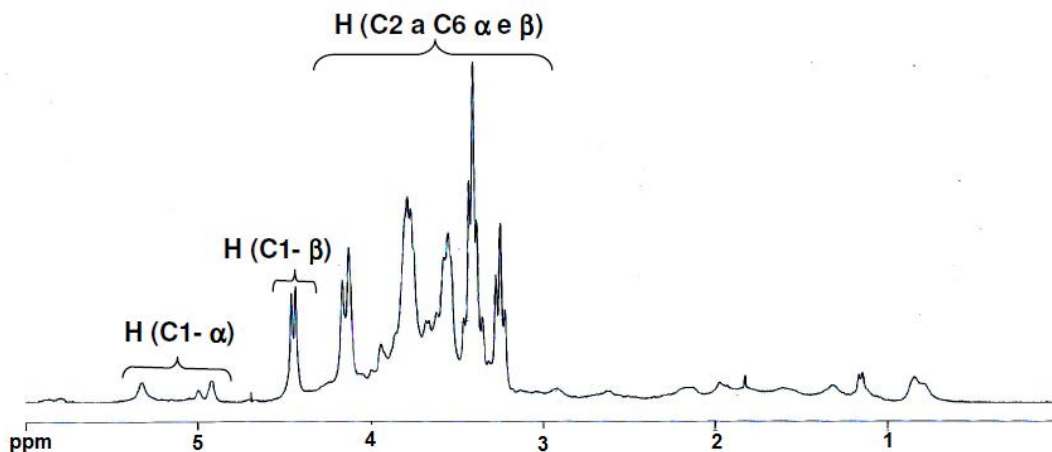
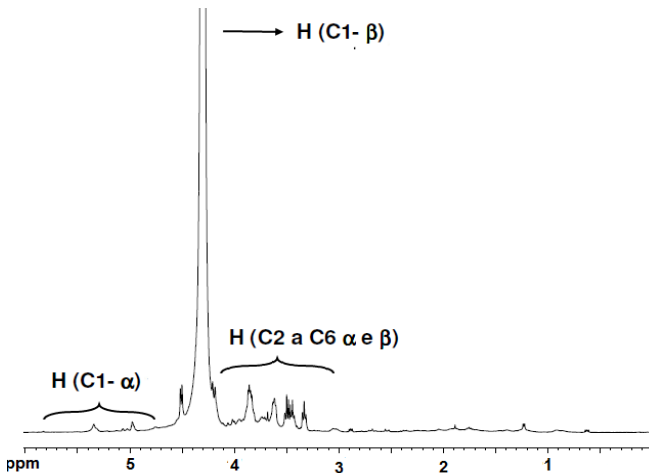


Figura 12. ^1H - RMN dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Lentinus edodes*.



Os espectros de RMN ^1H foi bem representativo de prótons de grupos glicosídicos de carboidratos. Os deslocamentos na faixa de 3,3 a 4,0ppm 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 4,2 a 5,5ppm. Foram detectados os dubletos em 4,1 e 4,2ppm, característicos de configuração $\beta(1\rightarrow6)$ (Mizuno e col., 1990), e na região de 4,9 a 5,5ppm foram registrados os picos representativos de uma configuração α (Mizuno e col., 1990). A configuração $\alpha(1\rightarrow6)$ está representada pelo deslocamento em 5,3ppm. Observa-se que no espectro de ^1H do *Lentinus edodes* a região característica de α é bem inferior que a de β , confirmando predominância de configuração β por parte dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas obtido do *Lentinus 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 glicoproteico. Segundo Kawagishi e col.,1988, 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.

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

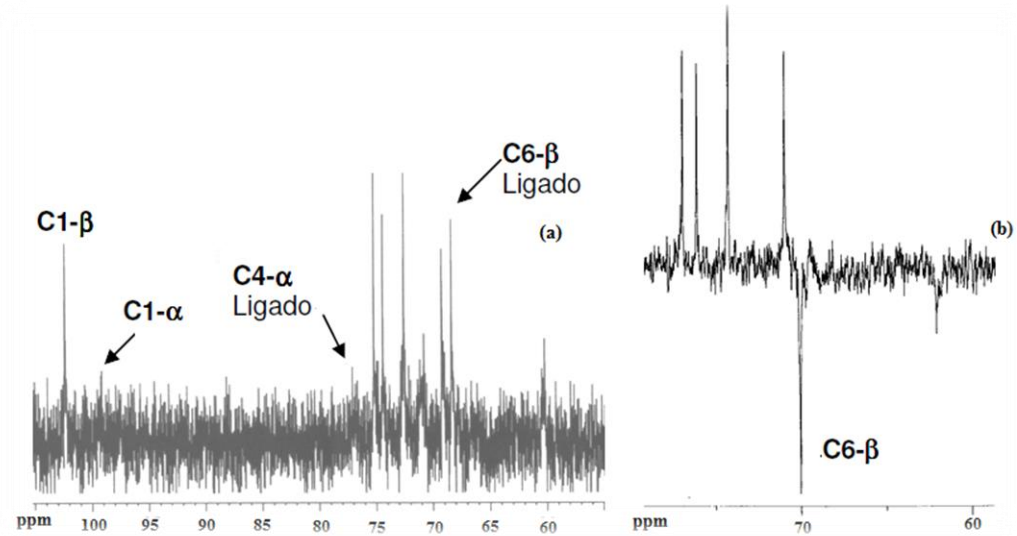
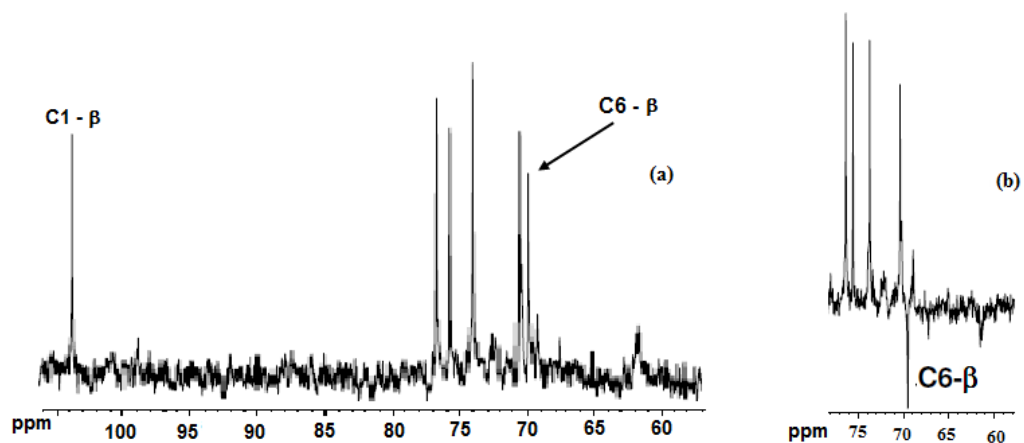


Figura 14. ^{13}C – RMN (a) e ^{13}C -RMN-DEPT (b) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Lentinus edodes*.



Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas presentes foram identificados nos espectros de RMN predominantemente como glucanas de configuração $\beta(1\rightarrow6)$. Índícios de glucanas de configuração $\alpha(1\rightarrow4)$ foram observadas de maneira mais representativa apenas nos espectros do *Agaricus brasiliensis*. Os deslocamentos químicos característicos para os carbonos C1 a C6 do anel glicosídico são apresentados nas **Tabelas 2 e 3**. Para o *Agaricus brasiliensis* observou-se um 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 *Lentinus edodes*, glucanas de configuração $\alpha(1\rightarrow4)$ não foram detectadas e

portanto, neste método de extração e isolamento, as glucanas $\beta(1\rightarrow6)$ prevaleceram.

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

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 *Lentinus 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

4.3 Propriedades dos Polissacarídeos e/ou glicoproteínas em solução

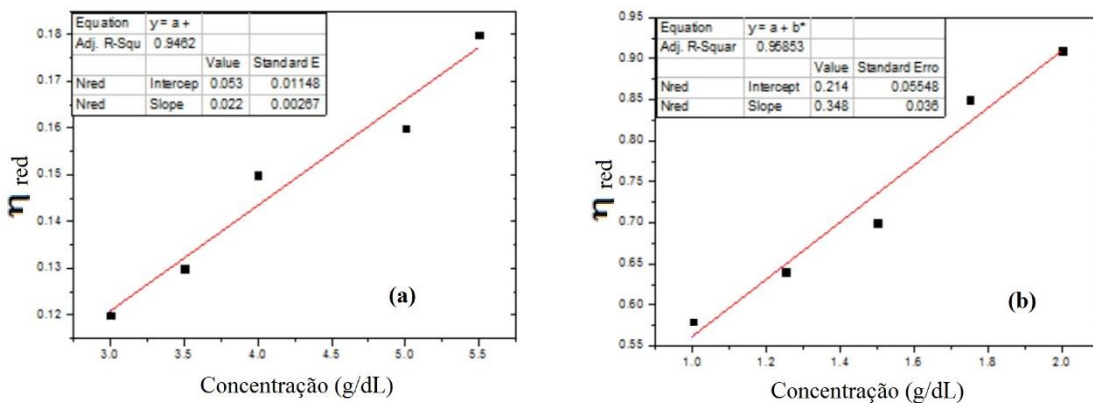
4.3.1 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar

A solução aquosa dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis* apresentou viscosidade intrínseca $[\eta]$ de 5,3 mL/g e massa molar viscosimétrica média de $1,58 \times 10^5$ g/mol, cujo valor se assemelha do mostrado na literatura de $1,6 \times 10^5$ g/mol (Gonzaga, 2002). Para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Lentinus edodes*, a viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi de 20,6 mL/g e a massa molar viscosimétrica média $8,2 \times 10^4$ g/mol, valor igual ao encontrado na literatura (Zhang et al, 2002).

Estudos indicam altos valores de viscosidades para soluções de glucanas isoladas de cogumelos (Zhang et al, 2005). A elevada massa molar e a conformação em tripla hélice rígida foram as características usadas para justificar os altos valores de viscosidade desses polissacarídeos e/ou glicoproteínas, sugerindo que o comportamento viscosimétrico pode estar relacionado com a porção proteica. As baixas viscosidades apresentadas nesse estudo podem ser fundamentadas na presença de vários íons presentes, e da proteína conjugada, que provavelmente causam mudanças conformacionais favoráveis à promoção do enovelamento

da estrutura e/ou compactação.

Figura 15. Viscosidade reduzida x concentração: (a) *Agaricus brasiliensis* e (b) *Lentinus edodes*.



4.3.2 Estudo Reológico

As viscosidades das soluções aquosas dos polissacarídeos dos cogumelos 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 16**). Entretanto, para cada concentração em particular, no caso das soluções de polissacarídeos e/ou glicoproteínas extraídos do *Agaricus brasiliensis*, praticamente não se observa variação na viscosidade, indicando um comportamento Newtoniano (**Figura 16. a**). O comportamento Newtoniano é característica favorável para fármacos injetáveis, já que está diretamente relacionado com fluídos de baixas viscosidades. As soluções referentes ao *Lentinus edodes* (**Figura 16. b**) apresentam comportamento típico de polissacarídeos e/ou glicoproteínas, diminuindo a viscosidade com o aumento da taxa de deformação, até se tornar constante. Para cada concentração em particular se observou que a viscosidade absoluta era maior quanto menor a taxa de cisalhamento, indicando um comportamento pseudoplástico, interessantes para formulações cosméticas uma vez que se tornam 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 *Lentinus edodes* apresentam conformação em tripla-hélice (Xu, 2012) justificando, em parte, suas altas viscosidades. Já pesquisas com glucanas do *Agaricus brasiliensis* sugerem configuração em novelo aleatório, contribuindo para baixas viscosidades (Gonzaga, 2002).

O gráfico de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, para o polissacarídeo e/ou glicoproteínas do *Agaricus brasiliensis* (Figura 17. 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 *Lentinus edodes* (Figura 17. b), mostra um comportamento não-newtoniano, tal como demonstrado pela não linearidade entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento.

Figura 16. Viscosidade absoluta x taxa de cisalhamento (40 a 800s⁻¹) dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆). (a) *Agaricus brasiliensis* (b) *Lentinus edodes*.

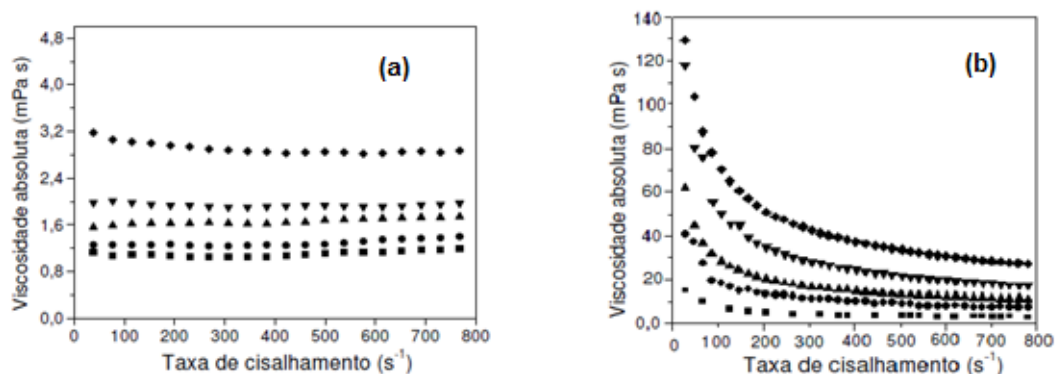
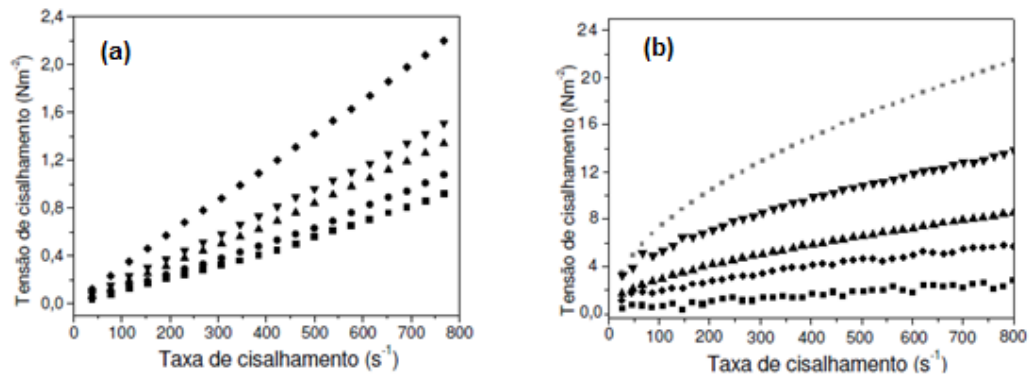


Figura 17. Tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento: 40 a 800s⁻¹ dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados a 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▼) e 10% (◆). (a) *Agaricus brasiliensis* (b) *Lentinus edodes*.



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.

Os valores de n para as condições aplicadas são apresentados na **Tabela 4**, os quais foram próximos de 1,0 para soluções do *Agaricus brasiliensis*, como esperado para comportamento Newtoniano. Para as soluções do *Lentinus edodes*, os valores de n ficaram no intervalo de 0,47 a 0,69, considerados como líquidos não-Newtonianos (Dongowski et al., 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 4**) foram 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).

Tabela 4. 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>Agaricus brasiliensis</i>		<i>Lentinus 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

4.3.3 Cromatografia de Permeação em Gel

A análise de cromatografia de permeação em gel (CPG) foi utilizada para analisar a massa molar dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *Agaricus brasiliensis* e do *Lentinus edodes*. O cromatograma obtido (**Figura 18**) mostra uma maior massa molecular média ponderal (Mw) para os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis*, condizente com os resultados da massa molar viscosimétrica. A **Tabela 5** 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 *Agaricus brasiliensis* ($3,35 \times 10^6$ g/mol) é equivalente ao verificado na literatura de $2,32 \times 10^6$ g/mol (Gonzaga, 2006). Para polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *Lentinus edodes*, o valor de Mw foi de $9,54 \times 10^4$ g/mol, bem próximo dos valores da literatura 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 18. Cromatograma para as amostras de polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Lentinus edodes* e *Agaricus brasiliensis*.

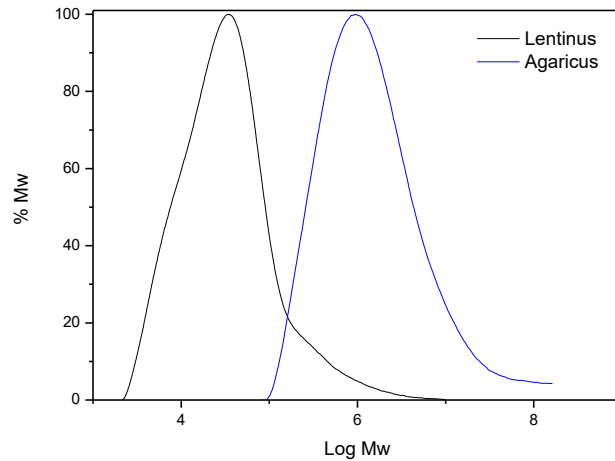


Tabela 5. Massa molecular média ponderal (M_w), a massa molecular numérica (M_n) e o índice de polidispersidade (M_w/M_n) obtidos dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes*.

	Polissacarídeos isolados do <i>Agaricus brasiliensis</i>	Polissacarídeos isolados do <i>Lentinus 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

4.4 Propriedades termorresponsivas pelo método da inversão de tubo

4.4.1 Diagrama de Fases

O diagrama de fases foi uma técnica utilizada para determinar a intervenção dos polissacarídeos do *Agaricus brasiliensis* e do *Lentinus edodes* no processo de gelificação do F127, com o objetivo de fazer uso da mistura no desenvolvimento de géis para tratamento dermatológico.

Da mesma forma, foram adicionados polissacarídeos da *Aloe vera* para verificar a influência no gel quando se encontram apenas polissacarídeos de cogumelos e quando misturados com *Aloe vera*, para verificar se há um possível melhoramento no comportamento, já que a babosa é um produto mais disponível à população.

Na faixa de temperatura estudada (10-90 °C), a solução de F127 puro começa a formar gel na concentração de 15%, tendo 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 favorece um aumento da faixa de temperatura na qual o sistema comporta-se como gel, até atingir um estado de gel imóvel.

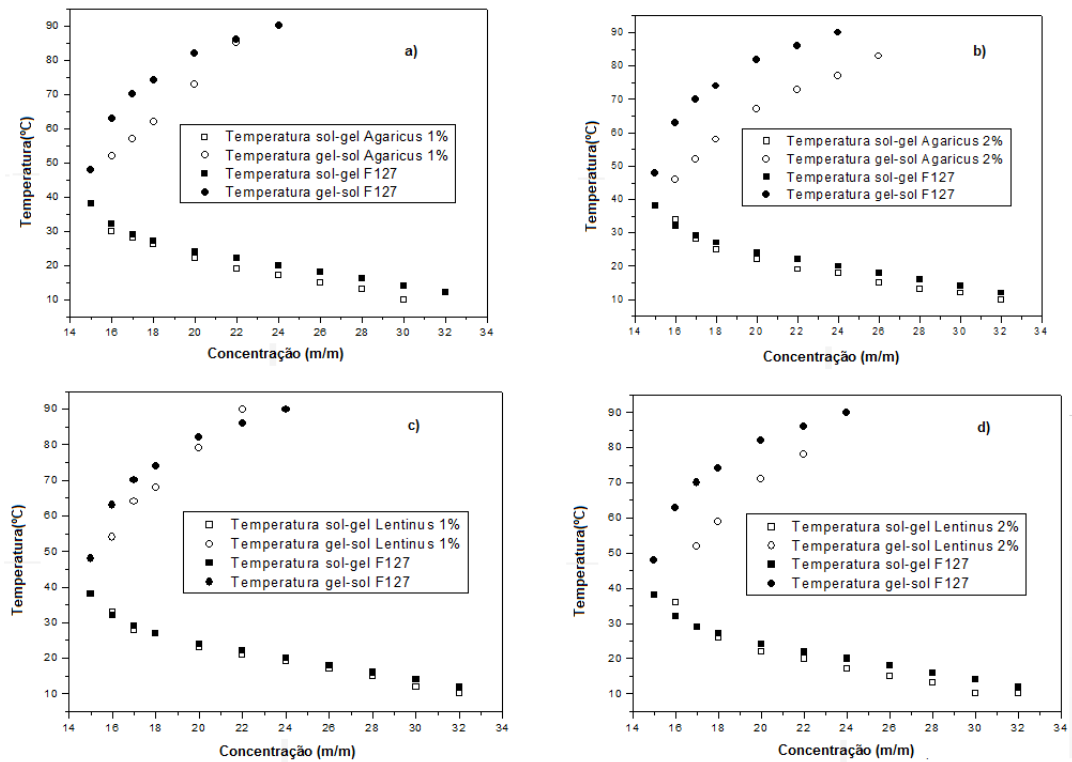
A transição sol-gel é uma consequência de uma diminuição da solubilidade do copolímero em água com o aumento da temperatura, aonde o sistema vai aumentando sua viscosidade. Entre os fatores responsáveis pelo efeito da termorresponsividade está a diminuição das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água. (Lilian, 2012 apud Magalhães 2014).

A presença do polissacarídeo dos cogumelos diminui a temperatura na qual o sistema passa de sol para gel e diminui a temperatura na qual o sistema volta a ser sol. Tal efeito pode estar relacionado ao caráter hidrofílico dos polissacarídeos, possibilitando 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 (**Figura 19**). O que se observa é que a solubilidade do fármaco em água interfere ou afeta o perfil de solubilidade do copolímero.

Com as soluções com *Aloe vera*, o comportamento se assemelhou ao do F127 puro, tendo maiores valores de temperatura na passagem de sol para gel e maiores valores de temperatura na passagem de gel para sol (**Figura 20**).

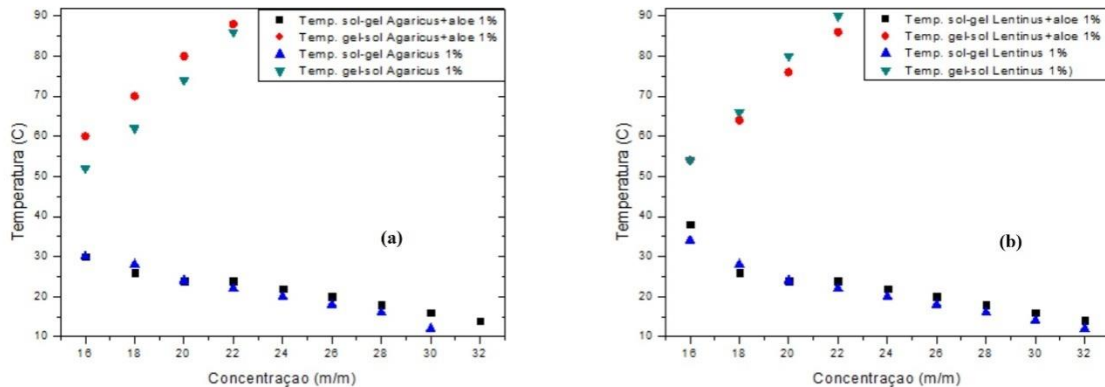
A formação de géis, com teores de F127 entre 16-20%, apresenta uma temperatura de transição na faixa entre a temperatura ambiente e a temperatura corpórea (25-37°C), além de não serem tão rígidos, tornando-se misturas interessantes para o uso cosmeceútico.

Figura 19. Diagramas de fases do F127 e da sua mistura com polissacarídeos e/ou glicoproteínas: (a) Polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* – 1%; (b) Polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* – 2%; (c) Polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* – 1%; (d) Polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* – 2%.



Fonte: Menezes, 2014.

Figura 20. Diagramas de fases do F127 e da sua mistura com polissacarídeos e/ou glicoproteínas de cogumelo e Aloe: (a) Polissacarídeos isolados do *Agaricus brasiliensis* e *Aloe vera* – 1%; (b) Polissacarídeos isolados do *Lentinus edodes* e *Aloe vera* – 1%.

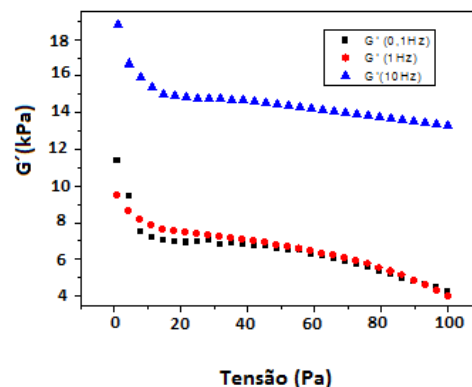


Fonte: autor

4.4.2 Reologia

A determinação do comportamento reológico dos géis teve início com a determinação da região de linearidade para o F127 a 18% m/m (**Figura 21**) 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.

Figura21. Reograma do módulo de armazenamento (G') pela tensão – região de linearidade.



4.4.3 – Ação dos polissacarídeos no processo de gelificação

A análise dos reogramas foi utilizada para avaliar a ação dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas do *Agaricus brasiliensis* e do *Lentinus edodes* no processo de gelificação do F127. Na **tabela 6**, tem-se a combinação do F127 (16-20%) com polissacarídeos (1% m/m) isolados do *Agaricus brasiliensis* e do *Lentinus edodes*, onde se comprova as observações feitas pelo diagrama de fases. A presença dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas dos cogumelos reduz a temperatura na qual o sistema passa de sol para gel, ou seja, potencializa o processo de pectização. 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 *Lentinus edodes*. Tal resultado pode estar relacionado à maior viscosidade das soluções do *Lentinus 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 *Agaricus blazei*, o que torna necessário a repetição do experimento.

Na **tabela 7**, tem-se a combinação do F127 (16-20%) com polissacarídeos (1% m/m) isolados do *Agaricus brasiliensis* e do *Lentinus edodes* e os resultados obtidos do diagrama de fases quando inserida os polissacarídeos da *Aloe vera*. Com o *Agaricus brasiliensis*, há um aumento da temperatura de gelificação com as maiores concentrações de F127 (18 e 20%), enquanto permanece igual com F127 a 16%. Com o *Lentinus edodes*, há um aumento da temperatura de gelificação com a maior concentração de F127 (20%), uma preservação da temperatura com F127 a 18%, e uma diminuição da temperatura com F127 a 16%, o que torna necessário a repetição do experimento.

Comparando os dados da reologia com os dados da inversão de tubos, 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 6. 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>Agaricus brasiliensis</i>)	Temperatura de gelificação com polissacarídeos (<i>Lentinusedodes</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 7. 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>Agaricus brasiliensis</i>)	
	Sem <i>Aloe vera</i>	Com <i>Aloe vera</i>
F127 – 16% m/m	30°C	30°C
F127 – 18% m/m	25°C	26°C
F127 – 20% m/m	23°C	24°C

F127	Temperatura de gelificação com polissacarídeos (<i>Lentinus edodes</i>)	
	Sem <i>Aloe vera</i>	Com <i>Aloe vera</i>
F127 – 16% m/m	33°C	32°C
F127 – 18% m/m	26°C	26°C
F127 – 20% m/m	23°C	24°C

4. 5 Capacidade de absorção de gordura

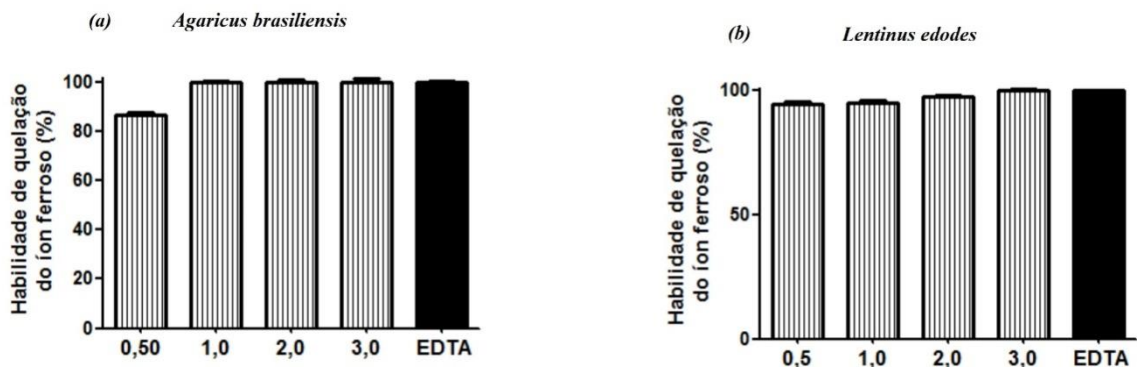
Estudos preliminares mostram uma boa capacidade de absorção de gordura por parte dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas. No caso do *Agaricus brasiliensis*, 100 mg do polissacarídeo foi capaz de absorver 335 mg de gordura de um total de 2g. Para as mesmas condições, 100mg do polissacarídeo isolado do *Lentinus 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)

4.6 Análises farmacológicas

4.6.1 Análise de atividade antioxidante pelo ensaio de quelação do íon ferroso

Foram obtidos resultados significativos de atividade antioxidante por esse método de análise, como mostrado na **figura 22** para *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes*, tendo uma média de 96,5% para ambos os cogumelos, que deve ser relacionado aos compostos fenólicos presentes (Carneiro, 2013), além da provável presença de substâncias polares nas extrações, desde que há estudos que indicam a variação de atividade antioxidante dependendo do solvente utilizado na extração (Kitzberger, 2007; da Silva, 2011)

Figura 22. Porcentagem de quelação do íon ferroso em comparação com o positivo EDTA para (a) *Agaricus brasiliensis* e (b) *Lentinus edodes*.

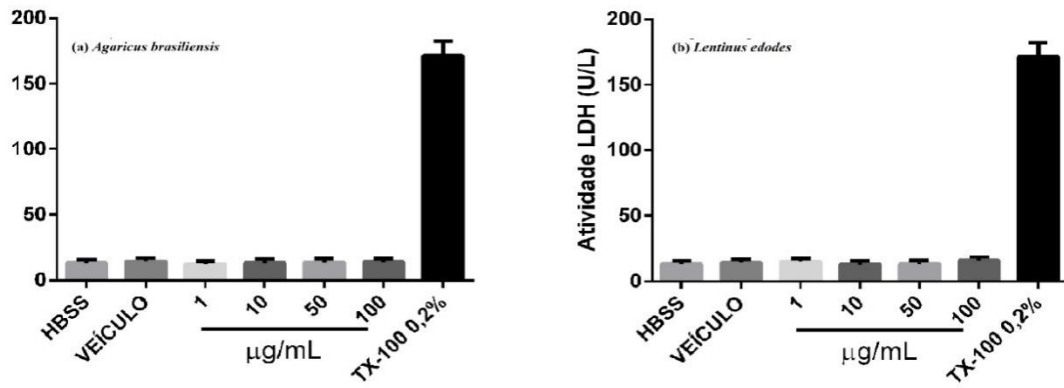


Fonte: autor

4.6.2 Análise de citotoxicidade sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A **Figura 23** mostra o efeito do *Agaricus brasiliensis* e do *Lentinus edodes* sobre a viabilidade de neutrófilos mensurada através da atividade da enzima LDH. Pode ser observado que a adição do veículo à suspensão de células (grupo controle – DMSO 1%) não alterou significativamente a atividade da enzima LDH em relação ao grupo HBSS (células não tratadas). O tratamento das células com Triton X-100 (padrão citotóxico) aumentou significativamente a atividade LDH. A adição de *Agaricus brasiliensis* e de *Lentinus edodes* (1, 10, 50, 100 µg/mL) não promoveu o aumento significativo da atividade LDH em relação ao grupo controle, comprovando a baixa toxicidade desses cogumelos.

Figura 23. Avaliação da toxicidade do (a) *Agaricus brasiliensis* e (b) *Lentinus edodes* em neutrófilos humano através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Fonte: o autor

Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5 CONCLUSÃO

O estudo dos polissacarídeos isolados dos cogumelos *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes* demonstraram possuir características estruturais similares, havendo predominância de glucanas em configuração $\beta(1\rightarrow6)$ e presença da proteína, possivelmente conjugada ao polissacarídeo.

Os polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis* apresentaram maior massa molar em relação aos obtidos do *Lentinus edodes*. Porém as soluções dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do cogumelo *Agaricus brasiliensis* apresentaram baixa viscosidade, mesmo em concentrações elevadas, e comportamento Newtoniano. As soluções do *Lentinus edodes* apresentaram uma maior viscosidade e comportamento não-Newtoniano. O enovelamento da estrutura dos polissacarídeos e/ou glicoproteínas isolados do *Agaricus brasiliensis* e o aspecto mais ramificado para as cadeias do *L. edodes* pode justificar tal comportamento.

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 permaneça na fase sol enquanto presente na embalagem, o que facilita sua saída, e se altere para a 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. Com a presença da *Aloe vera*, obteve-se géis com comportamento similar ao dos géis de F127 puro, demonstrando eficiência na diminuição do uso de co-polímeros na gelificação, além de adicionar propriedades terapêuticas.

Os materiais analisados se manifestaram como bons antioxidantes e, dessa forma, podem ser usados como tal, propondo que esse método de extração e o solvente utilizado são adequados em termos de atividade antioxidante. A baixa toxicidade parece ser mais uma característica dos cogumelos *Agaricus brasiliensis* e *Lentinus edodes*, sugerindo que esses materiais são potenciais candidatos ao uso em composição cosmecêutica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen Jr., L. V. Farmacotécnica, Formas Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Drogas, (tradução da 6ª edição americana), Editora Premier, São Paulo, 2000.

Bellini, M.;Angeli, J.;Matuo, R.;Terezan, A.; Ribeiro, L.; Mantovani, M. *Toxicology in Vitro*, 2006, 20, 355–360.

BergmeyerH.; BERNT E. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor.Methods of Enzymatic Analysis. London: Academic Press; 1963. pp. 574–579.

Bernardshaw, S.; Johnson, E.; Hetland, G. An Extract of the Mushroom *Agaricus blazei* Murril Administered Orally Protects Against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.62, n. 4, p. 393-398, 2005.

Boudreau, M. D.; Beland, F. A. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *J. Environ. Sci. Health C: Environ. Carcinog. Ecotoxicol.* 2006, Rev. 24, 103-154.

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.

Camprestini, L. H.; Silveira, J. L. M.; Duarte, M. E. R.; Koop, H. S.;Nosedá, M. D. NMR and rheological study of *Aloe barbadensis* partially acetylated glucomannan. *CarbohydratePolymers*, 94, 2013, 511-519.

Carbonero, E.; Gracher, A.; Komura, D.; Marcon, R.; Freitas, C.; Baggio, C.; Santos, A.; Torri, G.; Gorin, P.;Iacomini, M. *FoodChemistry*, 2008, 111, 531 – 537.

Carey, P. R. *Biochemical Application of Raman and Resonance Raman Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1992.

Carneiro, A. A. J.; Ferreira, I. C. F. R.; Dueñas, M.; Barros, L.; da Silva, R.; Gomes, E.; Santos-Buelga, C. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*, 138, 2013, 2168-2173.

Castillo, S.; Navarro, D.; Zapata, P. J.; Guillén, F.; Valero, D.; Serrano, M.; Martínez-romero, D. Antifungal efficacy of aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biol. Technol.* 2010, 57, 183-188.

Chang, X. L.; Chen, B. Y.; Feng, Y. M. Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of *Aloe vera* Miller. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 2011, 197-203.

Chang, H. L.; Chao, G. R.; Chen, C. C.; Mau, J. L. *Food Chemistry*, 2001, 74, 203-207.

Chew, Y. L.; Lim, Y. Y.; Omar, M.; Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1067-1072

Chokboribal, J.; Tachaboonyakiat, W.; Sangvanich, P.; Ruangpornvisuti, V.; Jettanacheawchankit, S.; Thunyakitpisal, P. Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan: an extracted polysaccharide from *Aloe vera*. *Carbohydrate Polymer*, 2015, 133, 556-566.

Chow, J. T.; Williamson, D. A.; Yates, K. M.; Goux, W. J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharides of *Aloe vera* L. *Carbohydr. Res.*, 2005, 340, 1131-1142.

Da Silva, A. C.; Jorge, N. Mushrooms: Bioactive Compounds and Antioxidant Properties. *UNOPAR CientCiêncBiol Saúde*, 2011; 13(Esp):375-84.

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.

Eshun, K.; He, Q. Aloe vera: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, 44, 91-96.

Faccin, L. C.; Benati, F.; Rincão, V. P.; Montovani, M. S.; Soares, S. A.; Gonzaga, M. L. C.; Nozawa, C.; Linhares, R. E. C. *Applied Microbiology Journals*, 2006.

Femenia, A.; Sánchez, E. S.; Simal, S.; Rosselló, C. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydr. Polym.*, 1999, 39, 109-117.

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.

Grindland, D.; Reynolds, T. The *aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J. Ethnopharmacol*, 1986, 16, 117-151.

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.

Hamman, J. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules*, 2008, 13, 1599-1616.

Ishikawa, N.Z.; Kasuya, M.C.M.; Vanetti, M.C.D. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2001, 32,

206-210.

Kaneno, R. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42, 909-916.

Kawagishi, H.;Kanao, T.; Inagaki, R.; Mizuno, T. *Carbohydrate Polymers*, 1990, 12,393-403.

Kitzberger, C. S. G.; Jr., Pedrosa, R. C.; Ferreira, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 2007, 80, 631-738.

Kawagishi, H.; Nomura, A.;Yumen, T.; Mizuno, T.; Hagiwara, T.; Nakamura, T. *Carbohydrate Research*, 1988, 150-154.

Kubala, L.; Ruzickova, J.; Nickova, K.; Sandula, J.; Ciz, M.; Lojek, A. *Carbohydrate Research*, 2003, 338, 2835-2840.

Lapasin, R.; Pricil, S. *Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications*. Glasgow, London: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall. 1ª Edição, p. 620, 1995.

Lee, J. K.; Lee, M. K.; Yun, Y. P.; Kim, Y.; Kim, J. S.; Kim, Y. S.; Kim, K.; Han, S. S.; Lee, C. K. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* 2001, 1, 1275-1284.

Letchford, K.;Burt, H. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 65, 259.

Lo, K. M.; Cheung, P. C. K. *Food Chemistry*, 2005, 89, 533-539.

Liu, Q.; Xu, X.; Zhang, L. ; Yu. *European Polymer Journal*, 2012, 48, 1329 – 1338.

Lu, C. Y. Method for separation and purification of lentinan for drug use. Chinese Patent, 2006, 2006 – 10031910.

Mandal, G.; Das, A. Structure of the D-galactan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research*, 1980a, 86, 247-257.

Mandal, G.; Das, A. Structure of the glucomannan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research*, 1980b, 87, 249-256.

Marcotte, M.; Hoshahili, A. R. T.; Ramaswamy, H. S. *Food Research International*, 2001, 34, 695-703.

Mendonça, M. M.; Kasuya, M. C. M.; Cadorin, A.; Vieira, A. J. *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brasil. In: *MushWorld. (Org.). Shiitakicultivation*. Seoul: Mushworld, 2005, p. 246-257.

Menezes, T. M. F. Isolamento dos polissacarídeos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*: caracterização estrutural, estudo reológico e potencial para uso terapêutico. Dissertação do curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, 2014.

Minato, K.; Mizuno, M.; Terai, H.; Tsuchida, H. Autolysis of lentinan, an antitumor polysaccharide, during storage of *Lentinus edodes*, shiitake mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 1530-1532.

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.

Mizuno, T. Medicinal Properties and Clinical Effects of Culinary-Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murril (Agaricomycetidae) (Review). *International Journal of Medicinal Mushroom*, v. 4, 299-312, 2002.

Ohtsuka, S.; Ueno, S.; Yoshikumi, C.; Hirose, F.; Ohmura, Y.; Wada, T.; Fuji, T.; Takahashi, E. UK Patent 1331513, 1973.

Ohno, N.; Furukawa, M.; Miura, N. N.; Adachi, Y.; Motoi, M.; Yadomae, T. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 24, 820-828.

Oliveira, R. B.; Lima, E. M. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2006, 3, 29.

Pothuraju, R.; Sharma, R. K.; Onteru, S. R.; Singh, S.; Hussain, S. A. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aloe vera* extract preparations: a review. *Phytother. Res.* 2016, 30, 200-207.

Ray, A.; Ghosh, S.; Ray, A.; Aswatha, S. M. An analysis of the influence of growth periods on potential functional and biochemical properties and thermal analysis of freeze-dried *Aloe vera* L. gel. *Ind. Crops Prod.*, 2015, 76, 298-305.

Reynolds, T.; Dweck, A. C. *Aloe vera* leaf gel: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 68(1-3), 3-37.

Ribeiro, L. R.; Mantovani, M. S.; Ribeiro, D. A.; Salvadori, D.M. F. *Human & Experimental Toxicology*, 2006, 25, 267-272.

Rodríguez-González, V. M.; Femenia, A.; Minjares-Fuentes, R.; González-Laredo, R. F. Functional properties of pasteurized samples of *Aloe barbadensis* Miller: optimization using response surface methodology. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2012, 47, 225-232.

Saito, S.; Sasaki, S.; Furumoto, T.; Sumita, S.; Hinomoto, T. *Carbohydrate Research*, 1994, 258, 59-75.

Shimada, Y.; Morita, T.; Sugiyama, K. Dietary eritadenine and ethanolamine depresses fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanolamine in rats. *Journal of Nutrition*, 2003, 3, 758-765.

Silvestein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Guanabara Koogan, 1994.

Silva, A. C. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. *Ciência e agrotecnologia*, v.33, n. 4, p. 1103-1108, 2009.

Silva, H. S. R. C.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I. *Quím. Nova* [online]. 2006, 29, 4, pp.

776-785

Sorimachi, K. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages active with *Agaricus blazei* Murril fractions in vitro. *Cell Structure and Function*, v. 26, n. 2, p. 103-108, 2001.

Steffe, J. F. *Rheological methods in food process engineering*. 2.e d. Michigan: Freeman, 1996.

Surenjav, M.; Zhang, L.; Xu, X.; Zhang, X.; Zeng, F. *Carbohydrate Polymer*, 2006, 63,97-104.

Vogler, B. K.; Ernst, E. *Aloe vera: A systematic review of its clinical effectiveness*. *The British Journal of General Practice*, 1999, 49, 823-828.

Wang, X.; Xu, X.; Zhang, L. Thermally induced conformation transition of triple-helical lentinan in NaCl aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112, 10343-10351.

Wasser, S. P. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60, 258-274.

Wood, P. J. *Journal of Cereal Science*, 2007, 46, 230-238.

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.

Yang, J-H.; Lin, H-C.; Mau, J-L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 2002, 77, 229-235.

Yokoyama, M. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1992, 9, 213.

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

Zhang, P.; Zhang, L.; Cheng, S. Solution properties of an α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Lentinus edodes* and its sulfated derivatives. *Carbohydrate Research*, 2002, 337, 155-160.