

# Determinação da estrutura química de uma $\beta$ -glucana (1→3), (1→4) e (1→6) isolada do basidiomiceto *Pleurotus ostreatoroseus*.

Gracy Kelly Faria de Oliveira<sup>1</sup>, Elaine Rosechrer Carbonero<sup>2</sup>

Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão,  
CEP 75704-020 Catalão, GO, Brasil.

(<sup>1</sup>email: gkfaria@hotmail.com; <sup>2</sup>email: elainecarbonero@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pleurotus ostreatoroseus*,  $\beta$ -glucana, caracterização estrutural.

## 1 INTRODUÇÃO

Por séculos, a população de países como China e Japão, utiliza os cogumelos comestíveis para manter a saúde e aumentar a longevidade. As frações solúveis em água quente, na forma de decoctos e essências eram usadas como medicamentos pelos povos antigos.

Nas últimas décadas, os cogumelos têm sido consumidos em grandes quantidades pelo seu sabor e valor nutricional e principalmente por apresentarem valores medicinais. Recentemente, os polissacarídeos isolados de cogumelos surgiram como uma classe importante de substâncias biologicamente ativas. Estudos científicos indicam que os polissacarídeos presentes nestes organismos, constituem uma importante classe de substâncias bioativas, as quais atuam como modificadores de resposta biológica. Muitas propriedades medicinais e terapêuticas são atribuídas aos polissacarídeos dos basidiomicetos, tais como, atividade hipoglicemiante, antitrombótica, antibiótica, sendo a atividade antitumoral a mais evidente (WASSER; WEIS, 1999; ZHANG et. al., 2007).

Atualmente, o número total de espécies de cogumelos é estimado em 140.000, sendo que desse total somente 14.000 são conhecidas. Destas, 2.000 são comestíveis e apenas 700 são conhecidas pelas suas propriedades medicinais, provavelmente devido à carência de estudos que comprovam o potencial destes organismos (WASSER; WEIS, 1999). Dentre os basidiomicetos mundialmente conhecidos e comercializados encontram-se os fungos do gênero *Pleurotus*. Os “cogumelos Ostra”, como são conhecidos os *Pleurotus*, são boas fontes

de carboidratos, contendo alta quantidade de fibras, além de proteínas com quase todos os aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Em relação aos polissacarídeos de basidiomicetos, 651 espécies de 182 gêneros já foram estudadas (WASSER, 2002), sendo as glucanas e as heterogalactanas as estruturas comumente encontradas (WASSER; WEIS, 1999; ZHANG et. al., 2007).

As glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas, e apresentar diferentes configurações e massa molar. Além disso, podem ser solúveis ou insolúveis em água, dependendo da conformação, ligações químicas e massa molar (ZHANG et al., 2007). Porém, as mais comumente encontradas são as glucanas com cadeia principal de  $\beta$ -glucose com ligações 1 $\rightarrow$ 3, substituídas em O-6 por terminais não redutores de  $\beta$ -Glc<sub>p</sub>.

Com relação às heterogalactanas, a maioria é formada por uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6) contendo diferentes substituintes, principalmente fucose e/ou manose (WASSER, 2002; ZHANG et al., 2007).

Dentro deste contexto, os cogumelos representam uma fonte alternativa, pouco explorada, para isolamento de polissacarídeos, pois, além de apresentarem altos teores, estes organismos apresentam polímeros com uma ampla diversidade estrutural. Trabalhos preliminares evidenciam que há uma correlação entre a estrutura e os efeitos farmacológicos destes carboidratos, sendo assim, o conhecimento da estrutura química fina desses polissacarídeos se torna imprescindível quando se deseja aplicá-los para fins terapêuticos.

## **2 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem por objetivo geral a análise estrutural da  $\beta$ -glucana obtida, via extração alcalina, dos basidiocarpos do fungo *Pleurotus ostreatoroseus*.

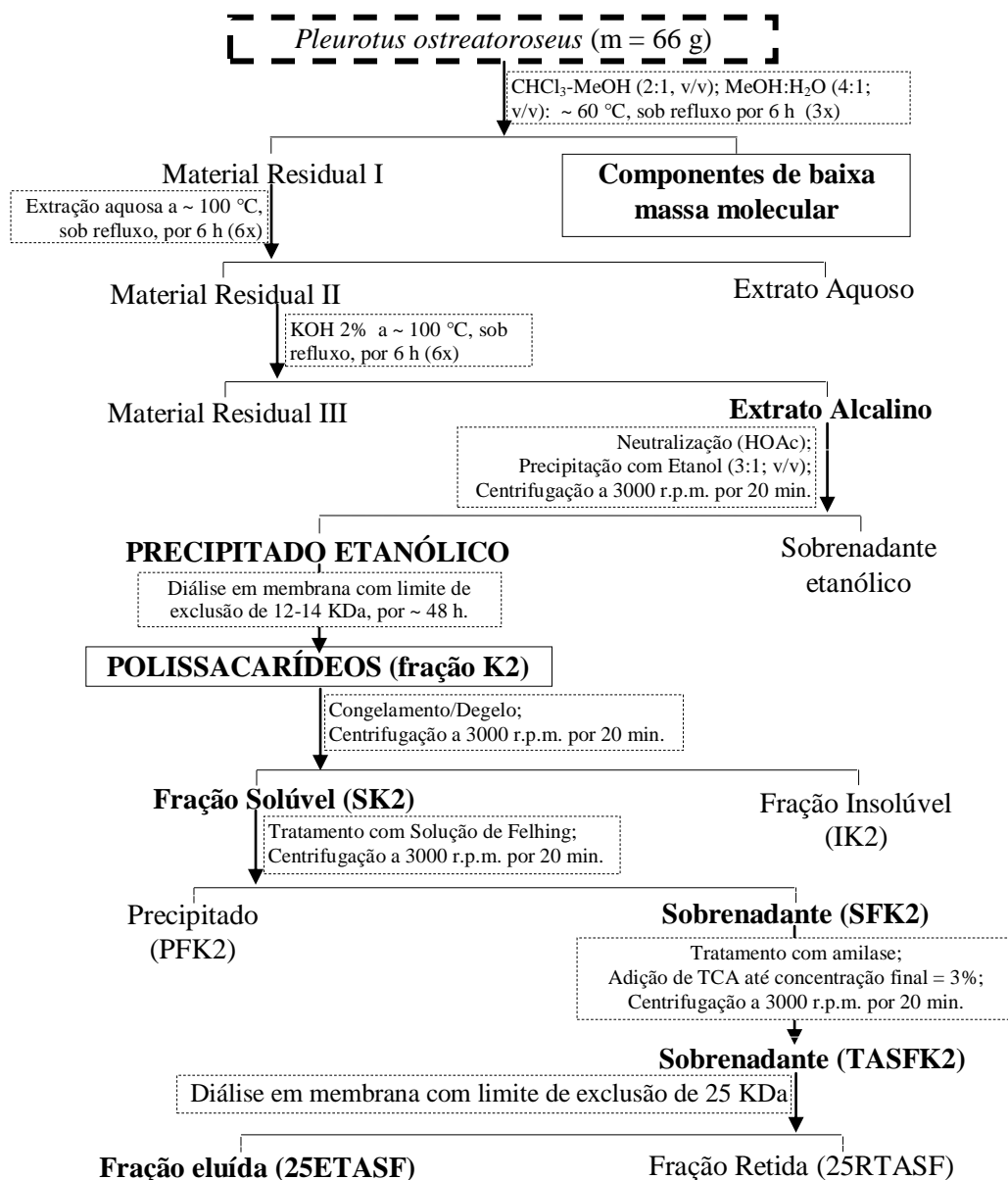
## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Material Biológico**

O basidioma de *Pleurotus ostreatoroseus* foi fornecido pela empresa Makoto Yamashita (Miriam Harumi Yamashita), localizada em São José dos Pinhais, PR.

### 3.2 Obtenção dos Polissacarídeos

Os basidiomas (= corpo de frutificação ou basidiocarpos) foram previamente deslipidificados, sucessivamente, com  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (2:1, v/v) e  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (4:1, v/v), sob refluxo, durante 6 horas na temperatura de  $\sim 60^\circ\text{C}$  (3 x). Após deslipidificação, os basidiocarpos foram submetidos a sucessivas extrações aquosas e alcalinas (KOH 2%), ambas a  $\sim 100^\circ\text{C}$  sob refluxo, por 6 horas (6 x), com a finalidade de obter os polissacarídeos. O extrato alcalino obtido foi neutralizado com ácido acético (HOAc), concentrado sob pressão reduzida até pequeno volume e precipitado com etanol (3:1, v/v). O precipitado etanólico obtido (fração K2) foi dialisado contra água corrente por 48 horas e liofilizado (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de extração e purificação da  $\beta$ -glucana obtida dos basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus*, por extrações alcalinas.

### **3.3 Purificação dos Polissacarídeos**

A purificação dos polissacarídeos, obtidos por extração alcalina, foi realizada, sucessivamente, através de processos por congelamento e descongelamento, precipitação com solução de Fehling, tratamento com  $\alpha$ -amilase e diálise em membrana com limite de exclusão de 25 KDa (Figura 1).

#### **3.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo**

Os polissacarídeos obtidos através das extrações alcalinas (fração K2) foram submetidos, primeiramente, ao processo de purificação por congelamento e degelo. A mistura polissacarídica foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetida ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (3000 r.p.m., 20 min, 25°C). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante aquoso (fração SK2) não apresentasse material insolúvel (fração IK2) em água fria (Figura 1).

#### **3.3.2 Purificação por precipitação com solução de Fehling**

A fração solúvel em água fria (fração SK2) originada a partir do processo de congelamento e degelo foi submetida ao tratamento com solução de Fehling (JONES, STOODLEY, 1965). Esta solução consiste da combinação de duas soluções (A e B). A solução A é composta por KOH e tartarato de sódio e potássio (125 g + 173 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml, respectivamente), enquanto que a solução B consiste de CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O (55,7 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml).

À fração SK2, que foi dissolvida em volume de água suficiente para solubilizá-la, adicionou-se igual volume da solução de Fehling: A+B (1:1), sendo o material mantido sob agitação por 12 horas. Decorrido o tempo, o complexo cúprico insolúvel (PFK2) e o sobrenadante (SFK2) foram separados por centrifugação (3000 r.p.m., 20 min, 25°C), neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente (~ 48 horas). Após a diálise, ambos foram tratados com resina catiônica com o objetivo de remover o cobre, e novamente dialisados. Em seguida, os materiais foram concentrados sob pressão reduzida, congelados e liofilizados (Figura 1).

### 3.3.3 Purificação por degradação enzimática

Em decorrência da presença de glicogênio na fração SFK2, a mesma foi submetida à degradação enzimática utilizando  $\alpha$ -amilase, a qual foi acompanhada utilizando lugol ( $I_2 + KI$ ). Após esse tratamento a enzima foi removida por precipitação com ácido tricloroacético (TCA), sendo o sobrenadante (fração TASFK2) submetido à diálise em membrana de 12-14 kDa por ~48 h (Figura 1).

### 3.3.4 Purificação dos polissacarídeos por diálise em membranas

A fração TASFK2 foi submetida à diálise em membrana (Spectra/Por<sup>®</sup>) com limite de exclusão de 25 kDa (CARBONERO, 2005). A diálise, contra água destilada, foi realizada através de um processo fechado, sendo o material a ser dialisado mantido sob agitação magnética. O processo foi repetido diversas vezes, até que a fração eluída (= água de diálise) não apresentasse coloração (Figura 1).

## 3.4 Análise Estrutural dos Polissacarídeos

### 3.4.1 Composição monossacarídica

As frações obtidas (1-2 mg) foram hidrolisadas com 0,5 ml de TFA 1 M (ácido trifluoroacético), “*overnight*” (12-15 h), ou TFA 2 M durante 8 horas, seguida por evaporação até *secura*. Os materiais hidrolisados foram, então, reduzidos com  $NaBH_4$  (pH 9,0-10,0) e acetilados com uma mistura de anidrido acético ( $Ac_2O$ ) e piridina (1:1, v/v; 1 ml) em temperatura ambiente por 12 horas (WOLFROM, THOMPSON, 1963 a,b). Os acetatos de alditol foram extraídos com  $CHCl_3$  (1 ml), e a piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por complexação com sulfato de cobre 5%. Após a completa remoção da piridina, o  $CHCl_3$  foi evaporado e os derivados acetilados foram analisados por Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa.

### 3.4.2 Metilação dos polissacarídeos e hidrólise por ácido fórmico

A fração homogênea, 25ETASF, foi metilada pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Para a metilação, uma alíquota desta fração (10 mg) foi solubilizada em 1 ml de dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ). Após a solubilização, foi adicionado 1 ml de iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) e, aproximadamente, 1 mg de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), sendo a mistura reacional submetida a agitação vigorosa por 30 min. Após um período de repouso (~12 horas), a amostra foi neutralizada com  $\text{HOAc}$ , dialisada exaustivamente contra água corrente e liofilizada, sendo o processo novamente repetido no material liofilizado. Terminado o segundo ciclo de metilação, foi realizada a extração dos produtos per-*O*-metilados com  $\text{CHCl}_3$ , que, após evaporação do  $\text{CHCl}_3$ , foram submetidos à hidrólise ácida total.

A hidrólise total do polissacarídeo metilado foi realizada com 1 ml de solução de ácido fórmico 45% a  $100^\circ\text{C}$  por 18 horas (STORTZ et al., 1997).

Após o período necessário para hidrólise, o ácido foi evaporado e o material residual foi reduzido com borohidreto de sódio deuterado ( $\text{NaB}^2\text{H}_4$ ), e acetilado como citado anteriormente (item 4.3.1). Os derivados metilados foram analisados na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados por GC-MS e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa.

### 3.4.3 Oxidação com periodato de sódio

Uma alíquota da fração 25ETASF (40 mg) foi solubilizada em água (10 ml) e em seguida acrescentou-se periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) até atingir uma concentração final de 0,05 M. O material foi mantido sob agitação por 72 horas, em ausência de luz. Decorrido o tempo de reação, o material foi neutralizado com ácido acético e dialisado, contra água corrente, por aproximadamente 24 h. Em seguida, este foi reduzido com  $\text{NaBH}_4$  (pH 9,0-10,0) por 24 horas (GOLDSTEIN et al., 2005), sendo o produto resultante, após diálise, submetido à hidrólise ácida parcial (TFA, pH 2,0 por 30 minutos a  $100^\circ\text{C}$ ) (GORIN, HORITSU, SPENCER, 1965). O material resistente a oxidação (fração DS-25ETASF; 11,2 mg) foi analisado por ressonância magnética nuclear (RMN- $^{13}\text{C}$ ).

### **3.4.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)**

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3800, acoplado a espectrômetro de massa Saturn 2000R (GC-MS) utilizando coluna DB-225. Durante a injeção da amostra a temperatura foi de 50°C sendo então programada para aumentar 40°C. min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura constante de 220°C (para análise de alditol acetato) ou 215°C (para análise de alditol acetato parcialmente metilado). Hélio foi usado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min<sup>-1</sup>.

### **3.4.5 Determinação da homogeneidade e massa molar ( $M_w$ )**

A análise de homogeneidade e a determinação da massa molar das amostras foram realizadas em HPSEC-MALLS (Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz), que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz (modelo 64 DAWN DSP, Wyatt Technologies Corporation, EUA).

### **3.4.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>13</sup>C e HMQC) foram obtidos em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400 MHz.

As análises foram realizadas a 70°C, com as amostras de polissacarídeos (~ 40 mg), solubilizadas em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>), dependendo da sua solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D<sub>2</sub>O foram expressos em ppm ( $\delta$ ) relativos aos sinais de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H da acetona em  $\delta$  30,20 e 2,22, respectivamente, e aos sinais do Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> em  $\delta$  39,70 (<sup>13</sup>C) e 2,40 (<sup>1</sup>H), para as amostras solúveis no mesmo.

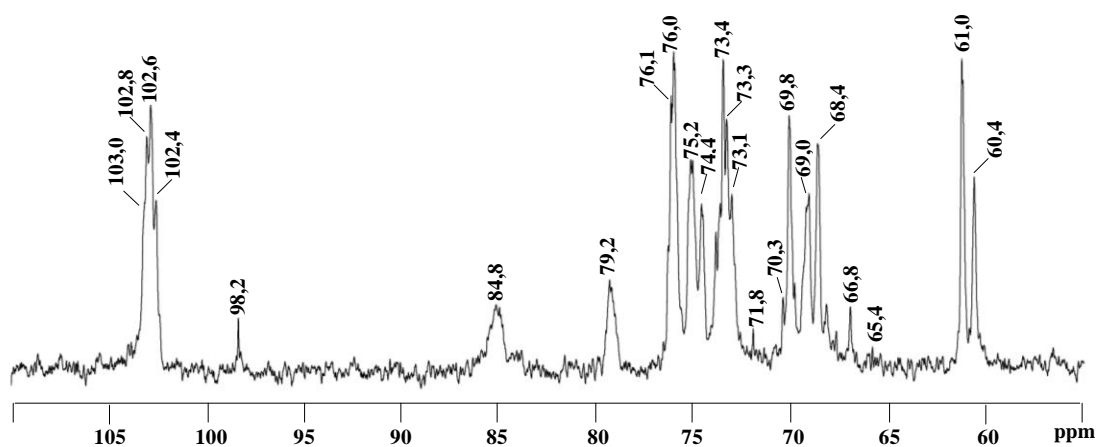
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a finalidade de obter os polissacarídeos do cogumelo comestível *P. ostreatoroseus*, os basidiocarpos, previamente deslipidificados, foram submetidos a seqüenciais extrações aquosas e alcalinas (Figura 1).

A partir dos extratos aquosos foram isolados e caracterizados, em estudos anteriores, uma  $\beta$ -glucana contendo ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) (CARBONERO et al., 2006) e dois polímeros parcialmente metilados:  $\alpha$ -galactana linear (CARBONERO et al., 2008) e manogalactana (ROSADO et al., 2003).

Conforme descrito anteriormente, o objetivo deste trabalho foi a determinação estrutural da glucana presente no extrato alcalino (fração K2). Para isto, a fração K2 passou por diversos processos de fracionamento com a finalidade de purificá-la. Primeiramente, a mesma foi solubilizada em água e submetida ao congelamento e degelo, com a intenção de separar a fração solúvel em água fria (fração SK2; 3,2 g). A seguir, a fração SK2 foi tratada com solução de Fehling, resultando na formação de um sobrenadante (SFK2; 2,5 g) e um precipitado de Fehling (fração PFSK2; 0,4 g).

A fração sobrenadante de Fehling (SFSK2) apresentou, principalmente, glucose (89%) como monossacarídeo, sugerindo a presença de glucanas, além de baixos percentuais de manose (Man; 4,5%) e galactose (Gal; 6,5%) (analisados como acetatos de alditóis em GC-MS). O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  desta fração (Figura 2) apresentou, principalmente, sinais característicos de uma  $\beta$ -glucana, e, em menor intensidade, sinais correspondentes a heterogalactana presente no extrato aquoso-(ROSADO et al., 2003).

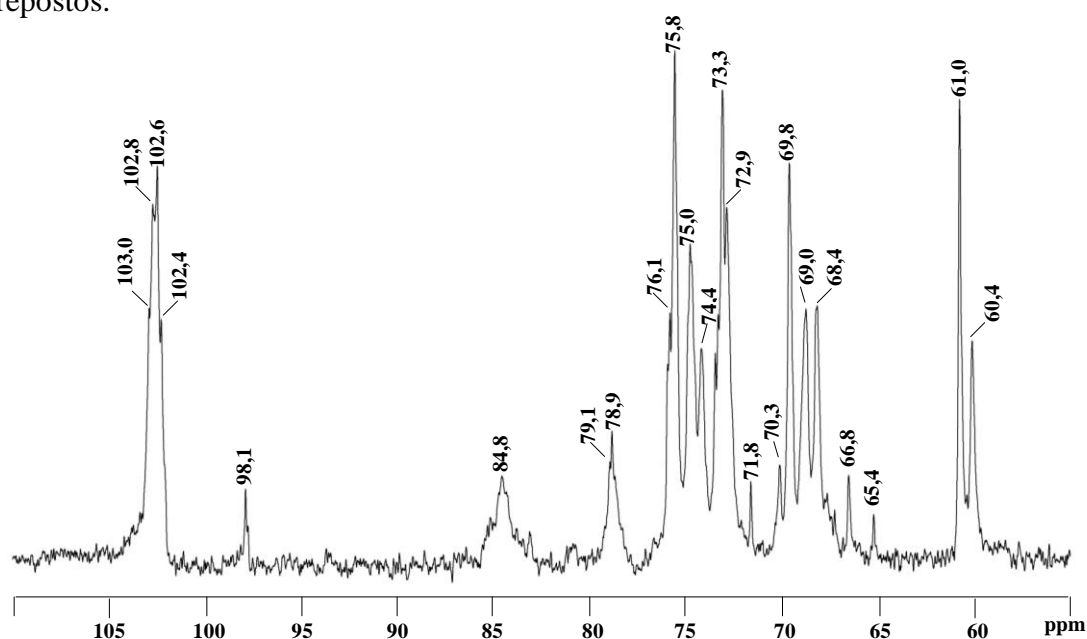


**Figura 2.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração SFK2 obtida dos basidiomas de *P. ostreatoroseus*, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $70^\circ\text{C}$ .



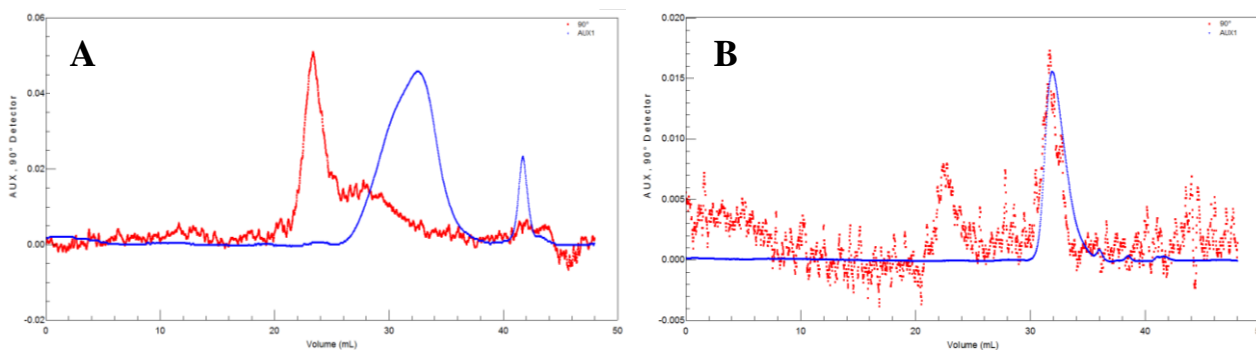
Além dos baixos teores da heterogalactana, esta fração apresentou uma coloração castanho-avermelhada quando tratada com o reativo lugol, sugerindo a presença de glicogênio. Desta forma, com o intuito de remover o glicogênio presente na fração SFSK2, uma alíquota (1,6 g) desta foi tratada com  $\alpha$ -amilase até apresentar reação negativa (coloração castanho-claro) com lugol, resultando na fração TASFK2 (1,14 g).

O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração TASFK2 (Figura 3) mostrou-se similar a fração de origem, contendo, principalmente, os sinais correspondentes a  $\beta$ -glucana e àqueles referentes a heterogalactana, no entanto, pode ser observado uma melhor definição de alguns sinais devido, provavelmente, a remoção dos sinais de glicogênio os quais apresentavam-se sobrepostos.



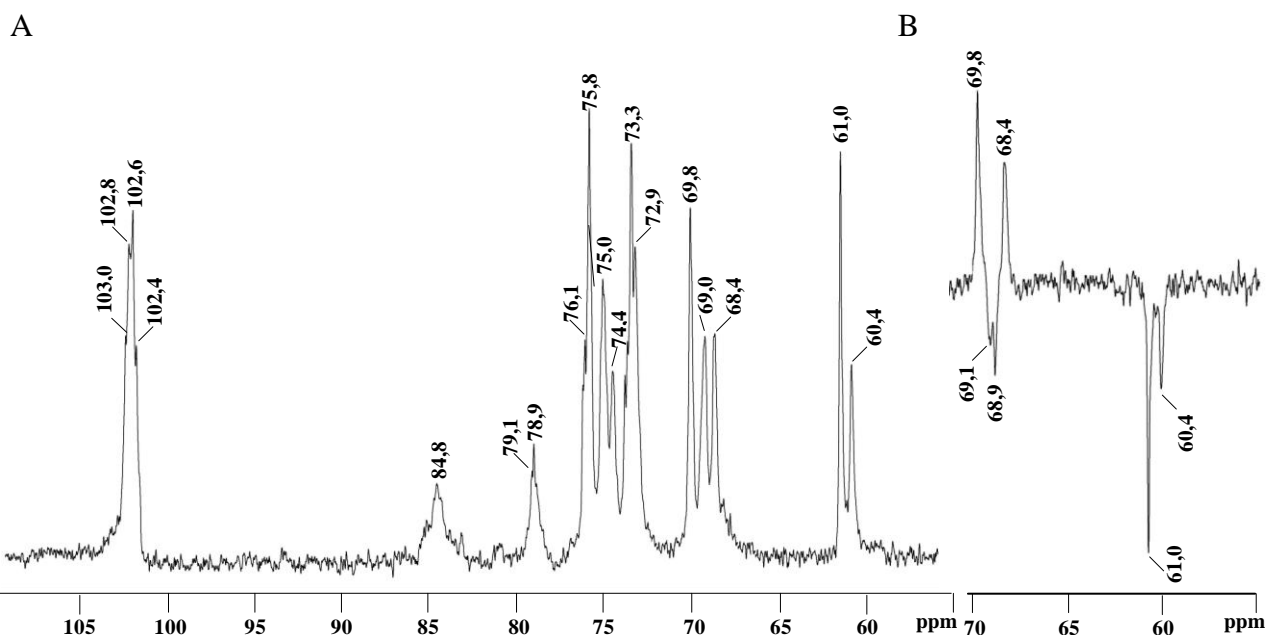
**Figura 3.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração TASFK2 obtida dos basidiomas de *P. ostreatoroseus*, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $70^\circ\text{C}$ .

A fração resultante do tratamento com amilase por apresentar um perfil heterogêneo quando analisado em HPSEC-MALLS (Figura 4A), foi submetida a diálise em membrana com limite de exclusão de 25 KDa (Figura 1), a qual forneceu a fração eluída 25ETASF (196 mg), que finalmente apresentou-se homogênea, com uma massa molar de  $26,9 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Figura 4B).



**Figura 4.** Perfis de eluição das frações TASFK2 (A) e 25ETASF (B), por HPSEC-MALLS.

Como pode ser observado, este procedimento foi eficiente para a obtenção da glucana purificada (fração 25ESFK2), pois o conteúdo de glucose, após o tratamento, aumentou para 98%, além da remoção dos sinais referentes a manogalactana no espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 5A).



**Figura 5.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (A), e em detalhe, região de  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OH}$  do espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (B) da fração 25ESFK2, em D<sub>2</sub>O a 70°C.

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 5A) apresentou sinais de C-1 em  $\delta$  103,0 correspondentes aos terminais não redutores de  $\beta$ -Glc<sub>p</sub>, enquanto àqueles em  $\delta$  102,8, 102,4 e 102,6 são referentes às unidades de  $\beta$ -Glc<sub>p</sub> 3-*O*-, 4-*O*-, e 3,6-di-*O*- substituídas, respectivamente. A configuração  $\beta$  é dada através dos sinais de C-1 de alta frequência e de H-1 de baixa frequência, referentes aos terminais não redutores ( $\delta$  103,0/4,63) e às unidades 3-*O*- ( $\delta$  102,8/4,85), 4-*O*- ( $\delta$  102,4/4,66) e 3,6-di-*O*-substituídas ( $\delta$  102,6/4,87), respectivamente. Os sinais em  $\delta$  84,8; 79,1 e 78,9; e 69,1 e 68,9 referem-se, respectivamente,

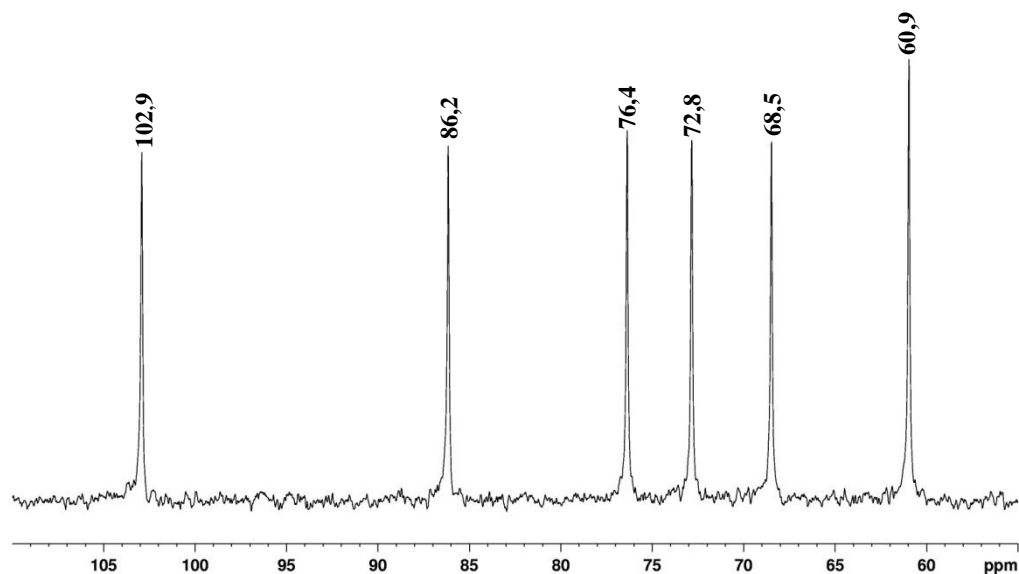
ao C-3, C-4 e C-6 substituídos das unidades de  $\beta$ -Glc<sub>p</sub>, sendo o último confirmado pela inversão no espectro de DEPT (Figura 5B). Estes dados estão de acordo com a análise de metilação, a qual sugere a presença de uma estrutura ramificada contendo ligações glicosídicas do tipo (1→3), (1→4) e (1→6) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise por metilação da fração 25ETASF obtida de *P. ostreatoroseus*.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados <sup>(a)</sup>	25TASF (mol%)	Tipo de Ligação <sup>(b)</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	22,7	Glc <sub>p</sub> -(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	24,8	3→)-Glc <sub>p</sub> -(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	28,5	4→)-Glc <sub>p</sub> -(1→
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	24,0	3,6→)-Glc <sub>p</sub> -(1→

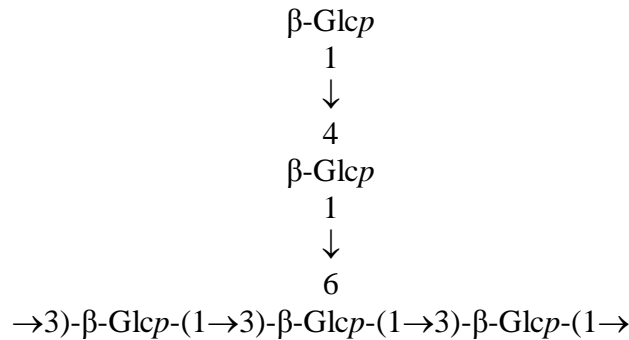
<sup>a</sup> Analisado em GC-MS (coluna DB 225) após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub>) e acetilação. <sup>b</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Em decorrência da presença de um polímero ramificado contendo diferentes tipos de ligação glicosídica, torna-se necessário a determinação estrutural da cadeia principal dessa molécula. Para isso, uma alíquota da fração 25ETASF (40 mg) foi submetida a degradação controlada de Smith. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C do produto resistente a esta degradação (fração DS-25ETASF; 11,2 mg) (Figura 6) apresentou apenas seis sinais  $\delta$  102,9; 72,8; 86,2; 68,5; 76,4 e 60,9 correspondentes aos carbonos 1 a 6, respectivamente, das unidades de  $\beta$ -Glc<sub>p</sub> (1→3)-ligadas. Todos os sinais foram assinalados por comparação com os encontrados na literatura para polissacarídeos similares (CARBONERO et al., 2006; AMARAL et al., 2008).



**Figura 6.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C do material resistente a degradação controlada de Smith (fração DS-25ETASF), em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> a 70°C.

Os resultados obtidos sugerem a presença de uma  $\beta$ -glucana, ramificada, contendo uma cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -Glc $p$  (1 $\rightarrow$ 3) ligadas, as quais apresentam-se parcialmente substituídas em O-6, principalmente, por cadeias laterais de  $\beta$ -Glc $p$  4-O-substituídas (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema da estrutura da  $\beta$ -glucana obtida de *Pleurotus ostreatoroseus*, via extração alcalina.

$\beta$ -Glucanas contendo o mesmo tipo de cadeia têm sido encontradas em diversos basidiomicetos, porém, estas se apresentam substituídas em O-6, principalmente, por terminais não redutores de  $\beta$ -Glc $p$ , em média, 1 a cada 3 ou 4 unidades da cadeia principal. Por outro lado, glucana similar a descrita neste trabalho tem sido previamente caracterizada apenas no fungo *Ganoderma resinaceum* (AMARAL et al., 2008).

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus* foi isolado uma não usual  $\beta$ -D-glucana contendo ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6), a qual será submetida a ensaios biológicos com a finalidade de avaliar se este polímero é responsável por parte das propriedades medicinais atribuídas a este fungo.

## 6. REFERÊNCIAS

AMARAL, A. E.; CARBONERO, E. R.; SIMÃO, R. C. G.; KADOWAKI, M. K.; SASSAKI, G. L.; OSAKU, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An unusual water-soluble  $\beta$ -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 473-478, 2008.

CARBONERO, E. R. Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes fotobiontes. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 120p, 2005.

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

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

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 361-369, 2005.

GORIN, P. A. J.; HORITSU, K.; SPENCER, J. F. T. An exocellular mannan alternately linked 1,3- $\beta$  and 1,4-  $\beta$  from *Rhodotorula glutinis*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 43, p. 950-954, 1965.

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

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.

ROSADO, F. R.; CARBONERO, E. R.; CLAUDINO, R. F.; TISCHER, C. A.; KEMMELMEIER, C.; IACOMINI, M. The presence of partially 3-*O*-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* "florida" Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Microbiology Letters**, v. 221, p. 119- 124, 2003.

STORTZ, C. A.; CASES, M. R.; CEREZO, A. S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 61-65, 1997.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P.; WEIS, A. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 65-96, 1999.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

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