



β -GLUCANAS DO COGUMELO

Agaricus subrufescens Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets):

Extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

Palavras chaves: *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus subrufescens*, β -glucana, polissacarídeo, vasculogênese

RESUMO

Agaricus subrufescens Peck (= *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets), popularmente conhecido no Brasil como Cogumelo Medicinal, é um fungo nativo e cultivado no país. Devido às suas propriedades medicinais, particularmente em relação ao conteúdo e estruturas de β -glucanas com atividade biológica, vêm ganhando importância em diversos países, principalmente para uso nutricional, i.e., cogumelos minimamente processados e encapsulados. Foram analisadas frutificações de *A. subrufescens* (UFSC 51) coletadas nos estágios de maturação com píleo fechado (F) e moderadamente aberto (A), para se avaliar o rendimento e as características estruturais dos polissacarídeos solúveis em água a 100 °C antes e após a purificação das β -glucanas usando-se cromatografia líquida, identificação por espectrometria (FTIR e RMN de ^{13}C e ^1H) e teor de proteínas. Identificou-se um polissacarídeo de estrutura (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucanas, com baixo teor de proteínas (em média 0,59 %) nos dois estágios de maturação, porém com aumento do rendimento das β -glucanas com a maturação passando de 41,9 mg.g $^{-1}$ (F) para 43,4 mg.g $^{-1}$ (A) do peso seco da amostra. As β -glucanas destas frutificações nos diferentes estágios foram avaliadas quanto à atividade biológica sobre o processo de vascularização inicial em embriões de galinha (*Gallus domesticus*). Foi constatado um efeito pró-vasculogênico, correspondendo em média a um aumento de 30,4 % no número de vasos em relação ao con-

trole e conseqüente aumento no crescimento dos embriões considerando-se as β -glucanas isoladas dos diferentes estágios de maturação e concentrações testadas. Estes resultados sugerem que as β -glucanas aumentaram a formação de vasos sanguíneos e que este efeito pode ser mediado pela atividade imunomoduladora, com potencial no tratamento de isquemias e cicatrizações. Como conseqüência, frutificações maduras de *A. subrufescens* que também contêm essas β -glucanas com atividade biológica deveriam ser utilizadas na elaboração de produtos nutricionais, propiciando assim uma otimização na utilização da biomassa do cogumelo.

1. INTRODUÇÃO

Nas décadas de 60 e 70, foram coletados no Brasil (Piedade, São Paulo) espécimes de cogumelo identificados com *Agaricus blazei* Murrill, posteriormente denominados *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann. O cultivo da espécie no Brasil iniciou-se na década de 90 devido às condições climáticas ideais, já que é uma espécie nativa do continente americano (IWADE & MIZUNO, 1997). Recentemente, Wasser *et al.* (2002) propuseram para a espécie nativa do Brasil uma nova denominação, *Agaricus brasiliensis*. Porém, estudos comparativos entre várias espécies realizados por Kerrigan (2005) indicaram que esta espécie é biológica e filogeneticamente identificada com *Agaricus subrufescens* Peck, classificada em 1893, também nativa na América do Norte. Taxonomicamente, esta espécie de fungo é clas-

Carla Maísa Camelin

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/Universidade Federal de Santa Catarina
carla.maisa@gmail.com

Margarida de Mendonça

PbD. em Fitopatologia/Microbiologia
University of Arizona/USA (1978)
Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brasil.
margarid1@terra.com.br

Paulo Fernando Dias

Dr. em Farmacologia/Universidade Federal de Santa Catarina (2005)
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina
paulus@mbox1.ufsc.br

Marcelo Maraschin

Dr. em Ciências (Bioquímica)/Universidade Federal do Paraná (1998)
Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina
m2@cca.ufsc.br



Figura 1. Frutificação de *Agaricus subrufescens* com píleo aberto e detalhe da estrutura química da (1→6)-(1→3)-β-glucana isolada deste fungo

sificada como Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Agaricomycetidae, tribo Agariceae, seção *Arvenses*, gênero *Agaricus*.

No presente trabalho a denominação *A. blazei* será utilizada quando se refere a trabalhos já publicados com essa denominação taxonômica. Por outro lado, em concordância com Kerrigan (2005), modificamos a denominação *A. brasiliensis* no título e no decorrer do texto para *A. subrufescens* (Figura 1), para a estirpe utilizada em nossa pesquisa que foi identificada por Neves (2000).

No cultivo de *A. subrufescens*, no Brasil, as frutificações (cogumelos) são coletadas principalmente no estágio imaturo, quando o cogumelo dispõe do píleo (chapéu) fechado, atendendo a padrões morfológicos pré-estabelecidos. No entanto, essas frutificações ainda não atingiram uma biomassa máxima, sendo, no entanto, nesse estágio que o cogumelo detém maior valor comercial para exportação. As frutificações com os píleos abertos são ...muitas vezes descartadas pelos produtores.

Espécimes de *A. blazei* foram levadas para o Japão, na década de 70, por pesquisadores interessados nas propriedades medicinais e no

cultivo do cogumelo. Desde então, diversos trabalhos científicos têm sido publicados relatando as propriedades anti-tumoral, anti-mutagênica, anti-viral, anti-trombótica, hipotensiva e antioxidante, atividades relacionadas a uma ampla gama de substâncias, tais como ésteres, ácidos linoleico e oleico, proteínas, enzimas, vitaminas e polissacarídeos (MIZUNO *et al.*, 1990a; EGUCHI *et al.*, 1999; DELMANTO *et al.*, 2001; MATSUI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004).

Algumas das atividades biológicas, principalmente a anti-tumoral, têm sido relacionadas às β-glucanas presentes na parede celular do fungo (KAWAGISHI *et al.*, 1990; MIZUNO *et al.*, 1990a; 1990b; OHNO *et al.*, 2001) sendo que diversas patentes foram concedidas para processos de maximização da produção e utilização desses polissacarídeos (OKUBO *et al.*, 1991; FUJIMIYA & EBINA, 2000).

As β-glucanas dos fungos são polissacarídeos com função estrutural na parede celular do micélio, das frutificações do fungo, ou ainda podem ser exo-polissacarídeos. As β-glucanas da parede celular estão ligadas à quitina (glucosaminaglicana) e proteínas (MOL *et al.*, 1990). Essas moléculas são estruturas altamente ordenadas, formadas principalmente por unidades de β-glucose (anéis do tipo β-glucopiranosídico), diferenciando-se da celulose das plantas, por exemplo, pelo tipo de ligação entre as unidades desses açúcares da cadeia principal e por possuírem ramificações, apresentando usualmente elevado peso molecular (PM) (CLEARY *et al.*, 1999; SHU *et al.*, 2003). Essas características conferem ações biológicas distintas a estas macromoléculas sendo a estrutura química, um fator fundamental para a atividade das β-glucanas sobre o sistema imunológico (BROWN & GORDON, 2001; BETA GLUCAN RESEARCH, 2003).

As β-glucanas presentes nas fru-

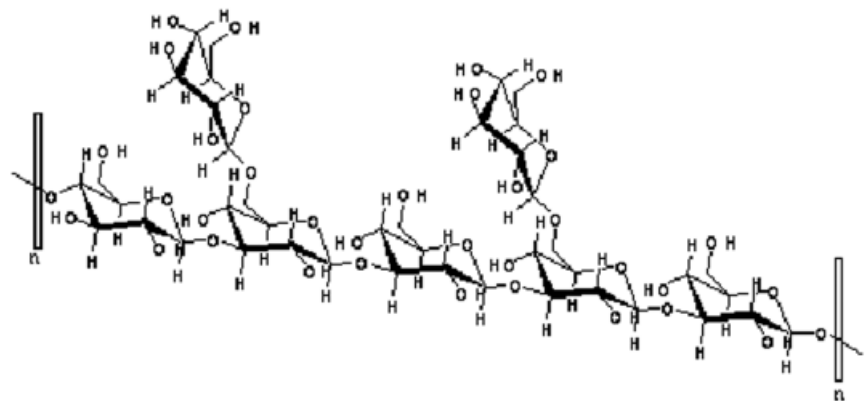


Figura 2. Detalhe da estrutura química da (1→3)-(1→6)-β-glucana de *Lentinula edodes* (shiitake), evidenciando a cadeia principal e as ramificações a cada 3 resíduos de β-D-glucose

tificações de *Lentinula edodes*, o shiitake, ou as secretadas por *Schizophyllum commune* exercem atividade anti-tumoral e são conhecidas como lentinan e schizophyllan, respectivamente. Tais polissacarídeos possuem estruturas semelhantes, com cadeia principal composta por unidades de β -glucopiranosose, contendo ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) e ramificações β -(1 \rightarrow 6) a cada três unidades de β -glucose da cadeia principal (Figura 2). Estes compostos constituem frações do extrato aquoso (100 °C), com peso molecular entre 500.000 e 1.000.000 Daltons e estrutura em tripla-hélice, formando gel em solução aquosa (MIZUNO, 1999; RAU, 2002).

Segundo Shigesue *et al.* (2000), uma fração das frutificações de *Gri-fola frondosa* denominada Fração-D, constitui-se de uma β -glucana com atividade anti-tumoral e pró-angiogênica, possuindo cadeia principal com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) e ramificações β -(1 \rightarrow 3), com 30 % de proteína e peso molecular de 1.000.000 Daltons.

Nas frutificações de *A. blazei* as principais substâncias anti-tumorais são o complexo (1 \rightarrow 6)- β -glucana-proteína na fração insolúvel em água e a estrutura (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucana na fração solúvel em água, com peso molecular de 2.000.000 Daltons (MIZUNO *et al.*, 1990a, 1990b). Porém, Ohno *et al.* (2001) e Dong *et al.* (2002) relataram que os componentes polissacarídicos das frações solúvel e insolúvel em água apresentaram a cadeia principal β -(1 \rightarrow 6) e ramificações β -(1 \rightarrow 3) conectadas.

Os cogumelos são consumidos, tradicionalmente no Japão e na China, como alimentos que beneficiam a saúde (alimentos funcionais ou nutraceuticos), sendo que, nas últimas décadas vêm sendo também consumidos como nutracêuticos (suplementos dietéticos) e medicamentos, sobretudo devido ao elevado teor de β -glucanas bioativas. O termo nutracêutico é utilizado para uma nova classe de subprodutos obtidos das frutificações ou do micélio, minimamente processados, podendo ser encapsulados para serem consumidos como suplementos dietéticos com propósito terapêutico (CHANG &

BUSWELL, 1996). Como medicamentos, as β -glucanas são utilizadas no Japão, desde a década de 80, no tratamento de pacientes com câncer e comercializados com nomes comerciais como, Krestin® (*Trametes versicolor*), Lentinan® (*L. edodes*) e Sonifilan® (*S. commune*) (MIZUNO, 1999).

Os nutracêuticos tiveram um consumo crescente nos últimos anos, com estimativas de terem movimentado mundialmente cerca de US\$ 47 bilhões em 2002. Em 1999, os nutracêuticos de cogumelos medicinais movimentaram cerca de 10 % deste valor (JONG, 2005).

Nos Estados Unidos, os nutracêuticos contendo β -glucanas são geralmente produtos reconhecidos como seguros (*GRAS, Generally Recognized as Safe*) pelo *Food and Drug Administration (FDA)*, e comercializados na forma de extratos, cápsulas ou tabletes (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; BOREK, 2003).

No Brasil, conforme o informe técnico nº 6, de 31 de janeiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cogumelos a exemplo de *A. blazei*, nas formas dessecadas inteiras ou fragmentadas e em conserva são considerados alimentos e estão dispensadas da obrigatoriedade de registro, enquadradas na Resolução nº 23/00.

Recentemente (11 de janeiro de 2005), a Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos funcionais e Novos Alimentos (CT-CAF) e a Gerência-Geral de Alimentos da ANVISA atualizaram a lista dos Alimentos e Substâncias Bioativas com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde e Novos Alimentos (Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002), e através de evidências científicas (artigos em português ou em língua estrangeira) incluíram as β -glucanas com a seguinte alegação: "A beta glucana (fibra alimentar) auxilia na redução da absorção do colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis". É possível comercializar os cogumelos em pó, cápsula, tablete ou comprimido, devendo conter na tabela de informação nutricional a

quantidade da β -glucanas, como fibra solúvel, abaixo das fibras alimentares. Em sua embalagem não poderá ser veiculada informação alusiva as suas propriedades que não sejam aquelas aprovadas pelo órgão competente da ANVISA.

Diante da possibilidade de surgimento de estudos científicos que comprovem outras atividades biológicas tal como a imunomodulatória, a anti-tumoral e a anti-viral das β -glucanas de *A. blazei*, a exemplo de vários fungos já pesquisados, que incluem desde a levedura de cerveja, *G. frondosa*, *L. edodes*, uma alternativa seria estender a legislação dos fitoterápicos (Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004) para os micoterápicos, sendo, da mesma forma necessário o desenvolvimento de estudos que relacionam o principal constituinte (β -glucanas) e as suas propriedades medicinais, para comprovação da sua eficácia e segurança para uso humano. Essa sugestão viabilizaria ainda o registro de extratos a base de *A. blazei*, comercializados em diversos países.

Em função do exposto, a potencialidade das β -glucanas de *A. blazei*, na fabricação de produtos nutracêuticos e farmacêuticos, depende do desenvolvimento de pesquisas envolvendo diversas etapas, incluindo a otimização do cultivo do fungo, a obtenção da matéria ativa, o estabelecimento de métodos de extração destes polissacarídeos em escala comercial e estudos pré-clínicos e clínicos.

O mecanismo de ação anti-tumoral, das β -glucanas difere daquele envolvido nos tratamentos quimioterápicos convencionais, já que atua ativando e reforçando as diversas funções imunológicas do hospedeiro, constituindo-se, portanto, em um tratamento do tipo imunoterápico, ativando as células NK (*Natural Killer*), os macrófagos, as células T e a liberação de citocinas/interleucinas assim como a produção de anticorpos (MIZUNO, 1999; JONG, 2002; BETA GLUCAN RESEARCH, 2003).

As β -glucanas são reconhecidas pelo sistema imune inato dos vertebrados através de receptores de superfície celular, designado primária-

mente para o controle de patógenos fúngicos (ADEREM & ULEVITCH, 2000). As β -glucanas reconhecem e se ligam aos receptores de diversas células humanas, principalmente leucócitos, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e NK, como também a receptores de células não-imunes como as endoteliais e os fibroblastos (BROWN & GORDON, 2003). Recentemente, foram identificados três receptores celulares de β -glucanas: CR3, dectin-1 e lactosilceramida (ZIMMERMAN *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 1999; BROWN & GORDON, 2001; 2003).

Os CR3 são receptores celulares responsáveis por diversas atividades *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas (TNF- α , IFN- α , IFN- γ e IL-6) em células NK, principalmente na presença de patógenos (ROSS *et al.*, 1999). Os receptores do tipo dectin-1, de monócitos e macrófagos, possuem um ligante para po-

lissacarídeos exógenos e outro ligante co-estimulatório para células T. Alguns estudos demonstraram que esses receptores celulares e também o lactosilceramida de linfócitos reconhecem β -glucanas, principalmente com estrutura do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) (ZIMMERMAN *et al.*, 1998; BROWN & GORDON, 2001).

Na tabela 1 são apresentadas as estruturas químicas de diversas glucanas de *A. blazei*, principalmente β -glucanas, resultados de estudos pré-clínicos realizados *in vivo* e *in vitro* e respectivos mecanismos de ação. Em alguns destes trabalhos foi relatado que as β -glucanas apresentaram citotoxicidade específica sobre células tumorais, contudo, não apresentaram toxicidade para células normais (FUJIMIYA *et al.*, 1998; SHIMIZU *et al.*, 2002). Estudos clínicos conduzidos no Japão e na China, entre 1992 e 2003, demonstraram que pacientes com tumores malignos, sob tratamen-

to com quimioterápico ou radioterápicos, apresentaram diminuição de todos os efeitos colaterais quando usaram simultaneamente *A. blazei*, promovendo-se a hematopoiese e imunoestimulação, em comparação ao grupo de pacientes que utilizaram somente o tratamento quimioterápico (JING *et al.*, 1994; RONG *et al.*, 1995; AHN *et al.*, 2004).

(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -Glucanas extraídas em água, a 100 °C, das frutificações de *A. blazei* apresentaram 96,77 % de ação inibitória do crescimento de tumores sólidos, Sarcoma 180 em ratos, além de um aumento significativo na proliferação de linfócitos T e B *in vitro* (MIZUNO *et al.*, 1990a; DONG *et al.*, 2002). β -Glucana com estrutura química semelhante, encontrada no fungo *G. frondosa* (Fração-D), também com atividade anti-tumoral, estimulou a atividade de macrófagos, aumentou a concentração de fatores de crescimento vascular

Tabela 1.

Principais glucanas encontradas nas frutificações de *A. blazei*, as respectivas atividades e mecanismos de ação

Glucanas	Atividades		Mecanismo de Ação	Autores
	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>		
(1 \rightarrow 6)- β -glucana-proteína		Anti-tumor Sarcoma 180		Kawagishi <i>et al.</i> (1990); Mizuno <i>et al.</i> (1990b)
(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucana		Anti-tumor Sarcoma 180		Mizuno <i>et al.</i> (1990a)
(1 \rightarrow 6)- β -glucana-proteína		Anti-tumor Meth A	\uparrow linfócitos T _{aux.} \downarrow linfócitos T _{supres.}	Itoh <i>et al.</i> (1994)
(1 \rightarrow 4)- α -glucana (1 \rightarrow 6)- β -glucana-proteína		Anti-metastase Meth A (intra tumoral)	Imunoestimulação com citotoxicidade seletiva	Ebina <i>et al.</i> (1998)
(1 \rightarrow 4)- α -glucana (1 \rightarrow 6)- β -glucana-proteína	Tumoricida em células de tumor Meth A	Anti-tumor e anti-metástase Meth A	Citotoxicidade seletiva, \uparrow NK e apoptose	Fujimiya <i>et al.</i> (1998)
(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucana e (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucana-proteínas		Anti-tumor Sarcoma 180	Imunoestimulação	Ohno <i>et al.</i> (2001)
(1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucana	Proliferação de linfócitos T e B			Dong <i>et al.</i> (2002)

endotelial (VEGF) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) no plasma e induziu angiogênese *in vivo* (ratos da linhagem C3H/HeJ). A β -glucana também aumentou a capacidade de proliferação e a quimiotaxia (capacidade de migração) das células vasculares endoteliais humanas, *in vitro* (MATSUI *et al.*, 2001).

Para o ergosterol, obtido da fração lipídica do cogumelo *A. blazei*, foi descrito atividade anti-angiogênica resultando na redução do crescimento (volume) de tumores em camundongos portando o tumor Sarcoma-180. A administração oral ou intra-peritoneal dessa fração não causou efeitos adversos, como a redução do tamanho dos animais (TAKAKU *et al.*, 2001).

Durante o desenvolvimento embrionário a angiogênese está relacionada à remodelagem da vascularização primária com a formação de novos capilares, importante no desenvolvimento dos órgãos e sistemas. No adulto, o processo de angiogênese ocorre nos ciclos de reprodução (proliferação do endométrio), na gravidez (desenvolvimento placentário), no crescimento dos cabelos, inflamação e na cicatrização. O desenvolvimento dos vasos sanguíneos é estritamente regulado por um equilíbrio dinâmico entre a ativação e a inibição do processo de formação de vasos. Este é mediado por fatores (sinais) pró-angiogênicos - tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) - e anti-angiogênicos, como a angiostatina (KERBEL & FOLKMAN, 2002).

A angiogênese e a vasculogênese, i.e. vascularização primordial a partir da diferenciação de células progenitoras endoteliais, estão intimamente relacionadas na fase embrionária, principalmente devido à atuação comum dos fatores de crescimento angiogênicos como o VEGF e o FGF,

considerados importantes na estimulação dos mecanismos de proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais. Outras citocinas, como os fatores estimuladores de colônia de macrófagos e células T (GM-CSF), também estimulam a divisão e a diferenciação de progenitoras endoteliais (CARMELIET, 2003; RAFII & LYDEN, 2003).

Recentemente, a vasculogênese tem sido descrita em processos similares também em adultos. Assim, células progenitoras endoteliais em adultos normalmente residem em diversos tecidos, entre os quais a medula óssea, mas podem ser mobilizadas para a circulação por meio de sinais como fatores de crescimento angiogênicos, ou hormônios, a partir de danos em vasos sanguíneos. Essas células são, então, incorporadas nos locais de atividade angiogênica, onde se diferenciam em células endoteliais, que formarão novos vasos durante a regeneração de tecidos, bem como, em alguns tipos de tumores. (FOLKMAN, 1971; RAFII & LYDEN, 2003).

Em razão do tropismo das β -glucanas sobre o sistema vascular, efetuou-se neste trabalho, um bioensaio de vasculogênese utilizando-se β -glucanas isoladas de *A. subrufescens* (píleo fechado e aberto) sobre a ve-

sícula (saco) vitelínica de embriões de galinha (espécie *Gallus domesticus*), na idade de 2 a 4 dias de incubação, avaliadas *in ovo*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Agaricus subrufescens utilizado neste experimento foi depositado na coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob código UFSC 51. Amostras das frutificações, em diferentes estágios de maturação, foram coletadas no cultivo comercial em propriedade localizada no município de Biguaçu (SC), em dezembro de 2003. Esses estágios incluíram: frutificações com píleo fechado (F) e píleo moderadamente aberto (A), i.e., com esporos imaturos, conforme Figura 3.

As frutificações foram coletadas por torção leve, cuidadosa e rente ao substrato. Após coleta foram colocadas em sacos de papel pardo sob refrigeração (8 °C), durante 30 min, para retirar o calor de campo e diminuição dos processos enzimáticos, sendo transportadas ao laboratório em bolsa térmica. As frutificações foram lavadas e escovadas para re-

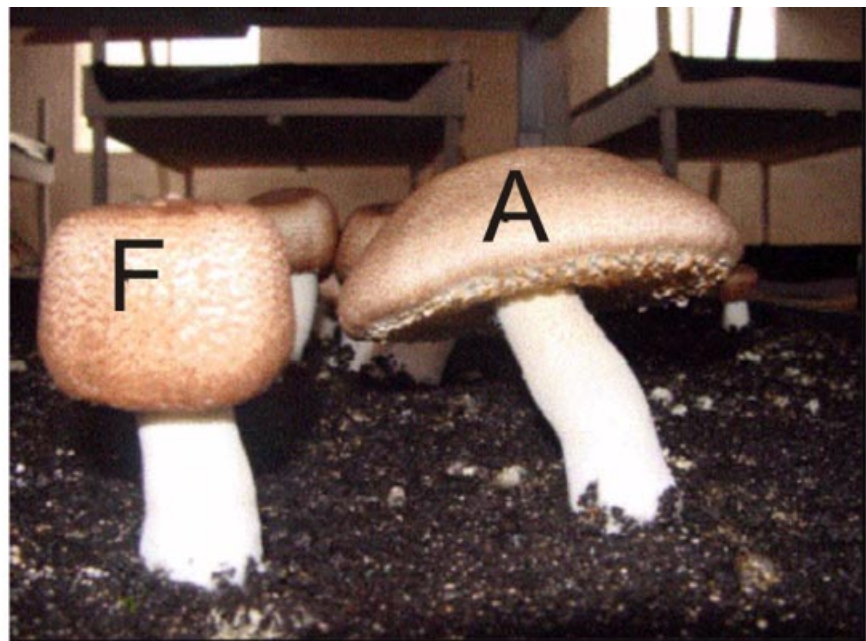


Figura 3. Frutificações de *Agaricus subrufescens* nos estágios de maturação com píleo fechado (F) e moderadamente aberto (A)

moção de sujidades e da coloração marrom do píleo, tal como é requerido pelos padrões do consumidor. Em seguida, foram seccionadas longitudinalmente em duas partes e desidratadas em estufa, com ventilação forçada, e aumento gradual de temperatura, iniciando-se a 41 °C até finalizar a 60 °C (18 h de secagem). As amostras foram embaladas em sacos plásticos, seladas e armazenadas em câmara fria.

O protocolo para extração e isolamento das β -glucanas das frutificações de *A. subrufescens* foi definido por Mizuno *et al.* (1990a). Para tanto, foram pesados aproximadamente 20 g de frutificações desidratadas de *A. subrufescens*, trituradas e lavadas com solução de etanol 85 % (v/v) aquecido a 80 °C durante 3 h. Esta etapa foi repetida 3 vezes. A fração polissacarídica foi obtida da fase sólida, com 350 mL de água destilada, aquecida a 100 °C, por 3 h, em extrator de refluxo, e filtrada. A essa fração líquida foram adicionados 4 volumes de etanol 96 °GL para precipitação dos polissacarídeos. Esta etapa foi repetida 3 vezes. O volume foi reduzido por evaporação rotativa e dialisado contra água destilada-deionizada. Subseqüentemente, a amostra foi liofilizada. Seguindo a purificação das β -glucanas, foi pesado 1,0 g da amostra liofilizada, dissolvida em água destilada, e eluída em coluna de troca iônica (35 cm altura x 1 cm \varnothing) contendo DEAE – celulose (35 mL, Sigma), utilizando-se primeiramente H₂O destilada (105 mL) como fase móvel, e descartando esta fração neutra. Na continuidade, utilizouse um gradiente de eluição de 0,25; 0,5; 0,75 M de NaCl (105 mL de cada fração). Essas frações foram dialisadas e concentradas para, então, ser fracionada em sistema cromatográfico, (35 cm altura x 1 cm \varnothing) utilizando 35 mL da fase estacionária Toyopearl HW-65F (Tosoh), desprezando o volume morto, e coletando os primeiros 35 mL para se obter a fração do polissacarídeo com maior peso molecular. A separação de β -glucanas/ α -glucanas da fração ácida foi efetuada através de cromatografia de afinidade, com fase estacionária de

10 mL de Concanavalina A-Sepharose 4B (10 cm altura x 1 cm \varnothing , Fluka Biochemika). A fração β -glucana foi coletada utilizando-se água destilada como fase móvel (40 mL). Os eluatos das frações de β -glucanas oriundas das frutificações F e A foram liofilizados e pesados para a determinação do rendimento, calculado em relação ao peso da amostra inicial (frutificações desidratadas), considerando o teor de umidade de cada amostra baseado no método gravimétrico a 105 °C.

Pelo método de Bradford (1976), foram dosadas as proteínas totais nas frações de β -glucanas, utilizando o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 e espectrofotometria UV-visível (λ_{595}, η_m). Foram utilizados a média de três avaliações da absorbância, e os valores foram plotados na curva de calibração de albumina de soro bovino (Sigma) em concentrações 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 μ g/0,1 mL.

A análise estrutural das frações de β -glucanas foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR), em pastilhas de KBr e espectrômetro ABD Bomem Inc. (FTLA 2000). Adicionalmente, análises de ressonância magnética nuclear de ¹³C (¹³C-RMN) foram efetuadas em espectrômetro Bruker (DRX-400) operando em 9,4 T, temperatura de 298 °K e TSPAD₄ como padrão interno e sequência de pulso zgpg30. Para tal, aproximadamente 120 mg de biomassa seca/amostra, foram diluídos em 600 μ l de D₂O e transferidos para um tubo de 5 mm de diâmetro interno.

Para realização dos experimentos de vasculogênese, foram calculadas as concentrações de β -glucanas de *A. subrufescens*, tendo como referências à dose de 100 mg de β -glucana/Kg.dia⁻¹, descrita para a obtenção da atividade anti-tumoral (MIZUNO *et al.* 1990a). Além disto, a dose de 10 mg de β -glucana.dia⁻¹, para o consumo de um homem com 75 Kg de peso, foi considerada para a obtenção do aumento da atividade de macrófagos (HUNTER; GAULT & BERNER, 2002). Considerando o peso médio de 42 mg do embrião de *G. domesticus* na idade de 4 dias, as concentrações

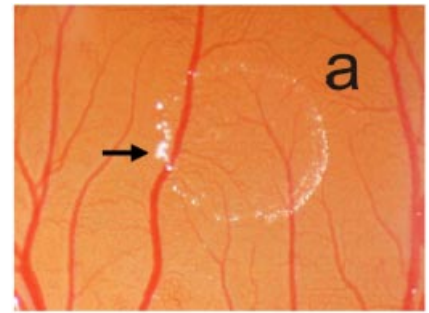


Figura 4. Suporte (disco) de metilcelulose (seta) implantado na vesícula vitelínica dos embriões de galinha, usado no tratamento e na quantificação dos vasos sanguíneos (a)

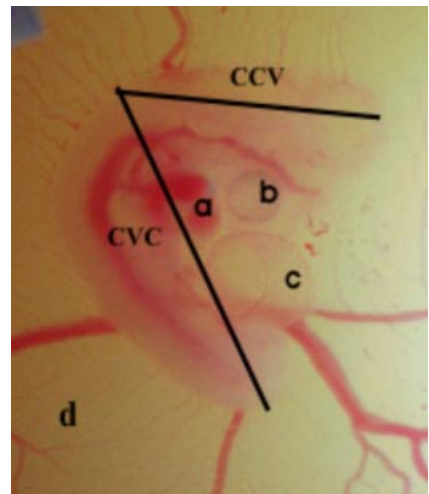


Figura 5. Indicação (linhas em preto) dos eixos cefálico-cervical (CCV) e cervical-caudal (CVC) utilizados para a determinação das medidas de comprimento total dos embriões de galinha, com 4 dias de incubação (a- coração; b- olho; c- alantóide; d- vesícula vitelínica)

para os tratamentos tiveram como referência uma concentração de 6 μ g, utilizando-se, então, nos experimentos, as doses de 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g e 20 μ g/embrião (n=6) de β -glucanas isoladas das frutificações F e A.

Os ovos de galinha da espécie *G.*

Tabela 2.

Rendimento e teor de proteínas de β -glucanas extraídas de *A. subrufescens* nos estágios de maturação com píleo fechado (F) e moderadamente aberto (A)

Estágios de Maturação	Rendimento de β -glucanas (mg.g ⁻¹) ^a	Proteína(mg.g ⁻¹) ^b
F	41,9	5,8
A	43,4	6,0

^amg de glucana/g de frutificação (peso seco)

^bmg de proteína/g de β -glucana.

domesticus (linhagem Ross) fertilizados, de tamanho médio padrão, foram obtidos junto à empresa Macedo Koerich S.A. (Distrito Industrial de São José, Santa Catarina, Brasil). Esses ovos foram coletados logo após a postura e incubados sobre suporte plástico, em estufa, à temperatura de 37,5 °C, 30 % de umidade relativa do ar e ventilação mecânica. Após um período inicial de incubação de 2 dias, os ovos foram retirados da incubadora para abertura de um orifício (janela) na casca, de aproximadamente 10 mm de diâmetro. Para aplicação dos tratamentos, as β -glucanas foram adsorvidas (volume = 5 μ l) em suportes de metilcelulose (VIS 440 CP, Aldrich) na concentração final de 0,45 %. Na polimerização desses suportes (discos), a secagem da solução foi efetuada ao ar (fluxo laminar) em uma bandeja de metal revestida de Teflon™. Os tratamentos consistiram de uma única dose (disco) por ovo. Os discos foram preparados previamente ao início dos experimentos e mantidos a -18 °C, na ausência de luz e depositados sobre as ilhotas sanguíneas da vesícula vitelínica dos embriões de 2 dias de idade. Discos de metilcelulose contendo somente água ultra-filtrada (pH 7,2) foram utilizados como controle.

Concluída a aplicação do tratamento, as janelas, na casca, foram fechadas com fita adesiva opaca e

os ovos retornaram à incubadora até o final do período total de 4 dias. Ao término desse período, as vesículas foram analisadas ao microscópio estereoscópio (35 x).

A avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a vasculogênese embrionária foi realizada com base na quantificação dos vasos vitelínicos que interceptavam o limite do disco e na biometria (medidas de comprimento embrionário em relação aos eixos cefálico-cervical-caudal).

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média e comparados através da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey.

Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos em protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de rendimento do protocolo de extração e purificação das β -glucanas de *A. subrufescens* nos estágios de maturação com píleo fechado (F) e moderadamente aberto (A) são apresentados na tabela 2.

O rendimento da β -glucana de *A. subrufescens* aumentou com a maturação das frutificações passando de 41,9 mg.g⁻¹ (F) para 43,4 mg.g⁻¹ (A). Os resultados foram superiores aos valores encontrados em estudos prévios de Eira (2003), cujos resultados

atingiram em média, 5 mg.g⁻¹ de peso seco de amostra, após pré-tratamento enzimático (β -glucosidase), ou compatíveis aos rendimentos obtidos pelo método enzimático indireto de α -glucosidase de 39,03 a 67,98 mg.g⁻¹ de β -glucanas, resultados estes dependentes das estirpes analisadas. De forma similar, os valores de rendimento das β -glucanas de *A. subrufescens* foram superiores aqueles encontrados para a Fração-D (30 mg.g⁻¹), extraída das frutificações de *G. frondosa* (SHIGESUE *et al.*, 2000). É importante ressaltar que as frutificações de *A. subrufescens* com píleo aberto moderadamente apresentaram maior rendimento de β -glucanas, assim como ocorreu com amostras de *L. edodes* e *G. frondosa* no mesmo estágio, as quais produziram acentuada estimulação de macrófagos (MINATO *et al.*, 2001).

As β -glucanas das frutificações nos estágios de maturação F e A apresentaram uma reduzida quantidade de proteínas totais (Tabela 2). Estes resultados evidenciam que os polissacarídeos das frações purificadas possuem baixo teor de proteína (em média 0,59 %), enquanto a fração obtida por Mizuno *et al.* (1990a) apresentou um conteúdo maior de proteínas (6,3 %). Tal resultado sugere que o protocolo, de extração e isolamento utilizado permitiu a obtenção de frações de elevada pureza, i.e., maior proporção de β -glucanas comparativamente a outros compostos, um fato de interesse, uma vez que a atividade biológica está relacionada diretamente com este polissacarídeo.

Os espectros de FTIR das frações de polissacarídeos extraídos e purificados das frutificações nos estágios F e A apresentaram absorções nas regiões de frequências características de grupos funcionais comumente encontradas em polissacarídeos, inclusive para as β -glucanas. Os espectros de FTIR também indicaram a ausência de ácidos urônicos e reduzida quantidade de proteína (PERLIN & CASU, 1982), o que foi posteriormente

Tabela 3. Valores médios e erro padrão da média (EPM) do número de vasos sanguíneos no limite do disco e do comprimento total dos embriões de galinha, tratados com concentrações de 1 a 20 µg/disco de β-glucanas extraídas das frutificações de *A. subrufescens*, nos estágios de maturação com píleo fechado (F) e moderadamente aberto (A), e do grupo controle (água ultrafiltrada)

Tratamentos (Estágio-µg β-glucana/disco)	Número de Vasos (Média ± EPM)	Comprimento Total (mm)
Controle	102 ± 4,03	11,9 ± 0,48
F 1	129 ± 4,10*	14,5 ± 0,46
F 5	135 ± 5,38*	12,8 ± 0,30
F 10	133 ± 0,79*	13,4 ± 0,19
F 15	124 ± 1,90*	14,0 ± 0,21
F 20	129 ± 1,51*	13,9 ± 0,13
A 1	135 ± 3,81*	14,5 ± 0,28
A 5	127 ± 0,84*	14,5 ± 0,42
A 10	130 ± 2,34*	14,0 ± 0,37
A 15	129 ± 3,20*	15,1 ± 0,27
A 20	129 ± 3,92*	15,5 ± 0,30

* Diferenças significativas ao nível de P < 0,05 em relação ao controle

confirmado (tabela 2). Os espectros de RMN de ¹³C obtidos das frações de polissacarídeos de *A. subrufescens* para cada estágio de maturação foram comparados com outros espectros que constam da literatura, evidenciando-se que as frutificações, nos dois estágios em estudo, possuem a

estrutura (1→6)-(1→3)-β-glucana, que já foi identificada por outros pesquisadores, com elevada atividade anti-tumoral (MIZUNO *et al.*, 1990a). Dong *et al.* (2002) propõem para essa fração uma estrutura de cadeia principal caracterizada por ligações do tipo β-(1→6) e duas uni-

dades glucosilas (1→3)-β- ligada a cada três unidades de glucose dessa cadeia principal.

A avaliação dos efeitos das frações de β-glucanas das frutificações de *A. subrufescens*, extraídas nos estágios de maturação F e A, sobre a vasculogênese embrionária foi realizada com base na quantificação dos vasos sanguíneos vitelínicos, que interceptam o limite do suporte (disco) de metilcelulose (figura 4). Adicionalmente foram desenvolvidos estudos de biometria, tendo sido considerada a medida de comprimento total obtida pela soma dos valores de comprimento dos segmentos cefálico-cervical e cervical-caudal de embriões com 4 dias de incubação (figura 5; tabela 3).

A análise estatística do número de vasos formados no limite do disco (Figura 6) mostrou uma diferença significativa (p<0,05) em todos os grupos tratados com β-glucanas das frutificações de *A. subrufescens*, nos estágios F e A, em relação ao grupo controle (veículo), o qual apresentou, em média, 102 vasos capilares (Tabela 3). Nos embriões tratados com β-glucanas, porém, não houve diferença significativa entre os grupos tratados nos diferentes estágios de maturação. Além

Figura 6. Número de vasos sanguíneos no limite do disco implantado na vesícula vitelínica de embriões de galinha (2 – 4 dias de incubação) com os tratamentos contendo β-glucanas extraídas das frutificações de *A. subrufescens* nos estágios de maturação com píleo fechado (F - em branco) e moderadamente abertos (A - em preto) nas dosagens de 1, 5, 10, 15 e 20 µg/disco, e o controle (em cinza) contendo somente água ultrafiltrada. Cada barra vertical representa a média ± E.P.M. de 6 embriões e os asteriscos denotam o nível de significância, sendo *P < 0,001 em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)

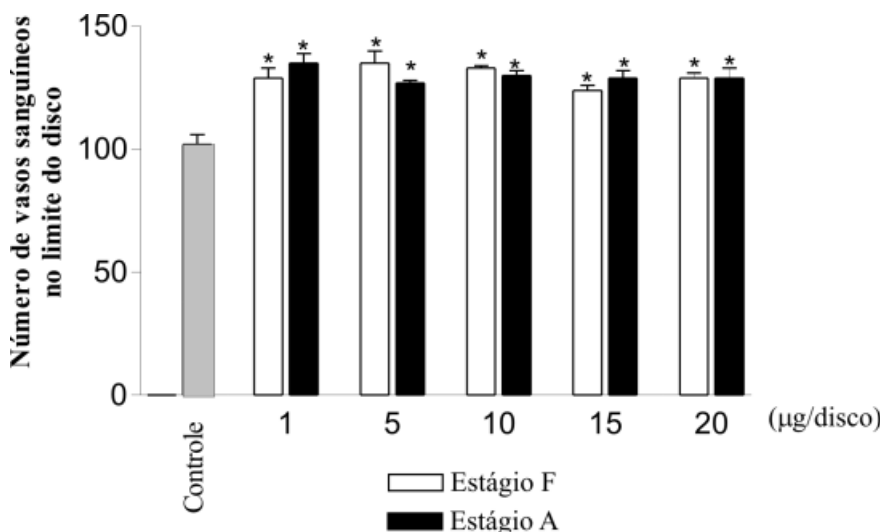
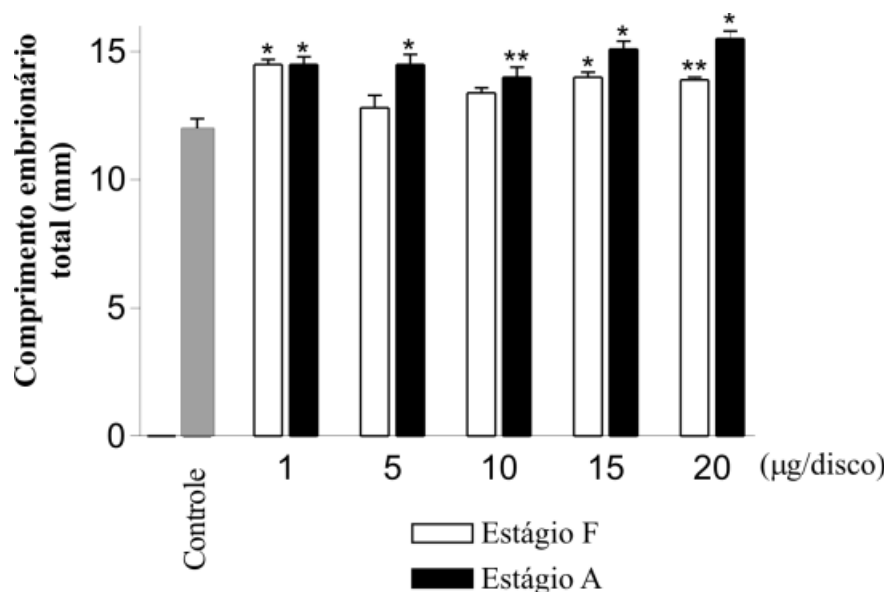


Figura 7. Comprimento total (mm) dos embriões de galinha (2 – 4 dias de incubação) para os tratamentos (discos de metilcelulose) contendo β -glucanas extraídas e purificadas das frutificações de *A. subrufescens* nos estágios de maturação com píleo fechado (F - em branco) e moderadamente aberto (A - em preto) nas dosagens de 1, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g}/\text{disco}$, e o controle (em cinza) contendo somente água ultrafiltrada. Cada barra vertical representa a média \pm E.P.M. de 6 embriões e os asteriscos denotam o nível de significância, sendo $**P < 0,01$ e $*P < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey)



disto, entre os grupos de embriões tratados com β -glucanas de um mesmo estágio (F ou A), não foram detectadas diferenças significativas em relação às concentrações utilizadas nos tratamentos.

As vesículas vitelínicas expostas aos tratamentos com β -glucanas das frutificações de *A. subrufescens*, nos estágios F e A, apresentaram um número de vasos sanguíneos significativamente superiores àquele observado no controle (Tabela 3; Figura 6), evidenciando um efeito pró-vasculogênico. Essa resposta, contudo, não foi dose-dependente, mas homogênea para todos os tratamentos em estudo, i.e., estágios de maturação e doses. Mesmo na concentração de 20 μg β -glucana/disco, superior ao dobro da con-

centração padrão (6 $\mu\text{g}/\text{disco}$), foi observado um efeito pró-vasculogênico, sem qualquer evidência de dano aos embriões.

A dosagem de 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ para o estágio F resultou no maior número de vasos formados ($133 \pm 0,79$ vasos), correspondendo a um aumento de 30,4 % no número de vasos em relação ao controle ($102 \pm 4,03$ vasos).

Observou-se que as medidas do comprimento total dos embriões tratados com as β -glucanas foram superiores àquelas dos embriões controle ($11,9 \pm 0,48$ mm; Tabela 3; Figura 7). Foi possível estabelecer uma relação entre o crescimento dos embriões e a formação dos vasos nas amostras expostas às β -glucanas de *A. subrufescens*, exceto

nas doses de 5 e 10 μg de β -glucanas do grupo tratado com a fração do estágio F (Figura 7).

O presente estudo detectou o efeito pró-vasculogênico do tratamento com β -glucanas extraídas de cogumelos *A. subrufescens*, em dois estágios de maturação das frutificações. A atividade pró-vasculogênica indica uma ação promotora da formação de vasos primordiais, i.e., vasos originados a partir da diferenciação de células precursoras endoteliais (CARMELIET, 2003). Desta forma, a ação potencializa o efeito hematopoético de estimulação e aumento de células nucleadas totais, de células tronco pluripotentes (CFU-s), de células formadoras de colônias de macrófagos e de macrófagos-granulócitos (M-CFC e GM-CFC) (PATCHEN & MACVITTIE, 1983). Além disso, de acordo com Ross *et al.* (1999) os receptores celulares de β -glucanas, i.e. CR3, são responsáveis por diversas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas como TNF- α , IFN- α , IFN- γ , e IL-6 em células NK.

Mesmo que a vasculogênese seja considerada um processo, cuja ocorrência em organismos adultos normais é menos frequente intensa do que a angiogênese, o processo vem sendo relacionado principalmente a condições fisiopatológicas em indivíduos adultos, como aqueles resultantes da formação de tumores e doenças cardiovasculares (FOLKMAN, 1971; RAFII & LYDEN, 2003).

Face aos resultados já publicados sobre a atividade das β -glucanas, é provável que o efeito pró-vasculogênico de *A. subrufescens* esteja relacionado à atividade imunomodulatória e/ou anti-tumoral (FUJIMIYA *et al.*, 1998; MIZUNO *et al.*, 1990a; DONG *et al.*, 2002). É ainda possível que o efeito esteja relacionado com a atividade hematopoética, uma vez que esta já foi descrita em casos de pacientes de câncer, imuno-deprimidos, que utilizaram como tratamento complementar os extratos obtidos de *A. blazei* (JING *et al.*, 1994; RONG

et al., 1995). Essa atividade poderia ser comparada à atividade pró-angiogênica e anti-tumoral da Fração-D de *G. frondosa*, que segundo Matsui et al. (2001), inclui β -glucana com estrutura química semelhante àquela de *A. subrufescens*.

Já foi demonstrado que polisacarídeos de elevado peso molecular de *A. blazei* obtidos por meio de fermentação líquida podem ativar macrófagos e estimular a liberação da citocina TNF- α (SHU et al., 2003). Além disso, os macrófagos ativados também produzem citocina IL-8, fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos - tipo básico (bFGF), sinais pró-angiogênicos conhecidos, capazes de influenciar vários estágios da vascularização (MATSUI et al., 2001; ONO et al., 1999).

Os macrófagos, quando ativados, são capazes de modular eventos na matriz extracelular, correlacionando diretamente a infiltração dessas células com a densidade de microvasos na região de tumores, como o melanoma. No entanto, no estágio inicial da formação de tumores, os macrófagos possuem a capacidade de mediar a citotoxicidade específica sobre tumores e/ou estimular diretamente a atividade anti-tumoral de linfócitos (ONO et al., 1999).

Produtos nutracêuticos vêm se destacando como alternativa terapêutica, com potencial tanto anti-como pró-angiogênico. No que se refere a *A. blazei*, Takaku et al., (2001) concluíram que o ergosterol, presente nas frutificações, promoveu ação anti-angiogênica. No presente trabalho, verificou-se que as β -glucanas das frutificações, em diferentes estágios de maturação, apresentaram ação pro-vasculogênica. Desta forma o consumo do cogumelo na íntegra ou em pó tem potencial para modular a formação de vasos sanguíneos. Transposta para uma estratégia de produção, a utilização conjunta de cogumelos em ambos os estágios de maturação supriria o mercado consumidor com estruturas de re-

levante atividade biológica, e permitiria ao produtor um uso eficiente e rentável da biomassa fúngica, hoje de menor valor no mercado.

Considerando que a Fração-D de *G. frondosa*, já aprovada (FDA) e comercializada nos EUA como nutracêutico, especificamente devido à sua composição em β -glucanas, apresenta estrutura química e bioatividade semelhante àquelas de *A. subrufescens*, os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir como um importante subsídio para a legalização no Brasil de produtos nutracêuticos de *A. subrufescens*. Gostaríamos de lembrar que uma forma viável de registro destes produtos no país seria a sua inclusão na legislação dos produtos fitoterápicos, porém como micoterápicos. Obviamente não estamos desconsiderando outras propriedades já reconhecidas inerentes ao cogumelo na sua forma nutracêutica, ou seja, como alimento funcional.

Em conclusão, os resultados desta investigação evidenciaram que as frutificações de *A. subrufescens* coletadas com péleo fechado e moderadamente aberto incluíram a importante estrutura (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -glucana, responsável pela atividade biológica no processo de vasculogênese. Essas frutificações em diferentes estágios de maturação têm potencial para utilização como matéria prima na produção de nutracêuticos visando o tratamento de isquemias e processos de cicatrização.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor. À Associação de Produtores de Cogumelos de Santa Catarina (APROC). À empresa Macedo Koeirich S.A., ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos (Gilberto Antonio Ferreira e Leila Tavares) e ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (Cezar Zucco e Rafael Dias).

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787
- AHN, W. S.; KIM, D. J.; CHAE, G. T.; LEE, J. M.; BAE, S. M.; SIN, J. I.; KIM, Y. W.; NAMKOONG, S. E.; LEE, I. P. (2004) Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Muril Kyowa, in a gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. *International Journal of Gynecology Cancer* 14: 589-594
- BETA GLUCAN RESEARCH. Review year 2003: Beta glucan Research Papers, Patents and Patent Application. Disponível em: <http://www.betaglucan.org> Acesso em: 23 de ago. de 2003
- BOREK, C. (2003) Beta-glucan boosts immunity. *Nutrition Science News*. Disponível em: <http://www.newhope.com/nutritionsciencenews> Acesso em: 17 de dezembro de 2004
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- BRASIL. Informe técnico nº 6, de 31 de janeiro de 2003. Procedimentos sobre cogumelos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/31012003_2.htm Acesso em: 03 de julho de 2003
- BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Alimentos e Substâncias Bioativas com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde e Novos Alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm Acesso em: 01 de julho de 2003
- BRASIL. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medica-

- mentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php> Acesso em: 18 de abril de 2004
- BROWN, G. D.; GORDON, S. (2001) A new receptor for β -glucans. *Nature* 413: 36-37
- BROWN, G. D.; GORDON, S. (2003) Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19: 311-315
- CARMELIET, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9: 653-660
- CHANG, S. T., BUSWELL, J. A. (1996) Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 473-476
- CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. (2004) Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus code protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. *International Immunopharmacology* 4: 403-409
- CLEARY, J. A.; GRAHAM, G. E.; HUSBAND, A. J. (1999) The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. *Immunology and Cell Biology* 77: 395-403
- DELMANTO, R.; LIMA, P.; SUGUI, M.; EIRA, A.; SALVADORI, D.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. (2001) Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research* 496: 15-21
- DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.; FANG, J. (2002) Structural characterization of water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research* 337: 1417-1421
- EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. (1998) Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grated tumor system in mice. *Biotherapy* 11: 259-265
- EGUCHI, F.; WATANABE, Y.; ZHANG, J.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMOTO, H.; FUKUHARA, T.; HIGAKI, M. (1999) Inhibitory effects of hot water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Traditional Medicines* 16: 201-207
- EIRA, A. F. da. (2003) Cultivo do cogumelo medicinal: *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser *et al.*). Viçosa: Aprenda Fácil. 398 p.
- FOLKMAN, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285: 1182-1186
- FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; NAKASHIMA, H.; MATUMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; EBINA, T.; KATAKURA, R. (1998) Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunology Immunotherapy* 46: 147-159
- FUJIMIYA, Y.; EBINA, T. (2000) Surimoto Forestry Co., Ltd., Japan. Antitumor active substances. U.S. Patent 6,093,694.
- HUANG, S. J.; HUANG, L. C.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. (2004) Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. <http://www.mushworld.com> Acesso em: 26 de março de 2004
- HUNTER, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. (2002) Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology* 35 (4): 267-271
- ITOH, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. (1994) Inhibitory action of a (1-6)- β -D-glucan-protein complex (FII-2b) isolated of *Agaricus blazei* Murrill ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism. *Japanese Journal Pharmacology* 66: 265-271
- IWADE, I.; MIZUNO, T. (1997) Cultivation of Kawariharatake (*Agaricus blazei* Murill). *Food Review International* 13 (3): 383-390
- JING, W.; MIN, M. X.; ZHENG, C. R.; ZHI, W. J.; ITO, H.; SHIMURA, K. (1994) Observation on treatment effect of *Agaricus blazei* Murill against alimentary tract tumor. <http://www.atlasworldusa.com> Acesso em: 09 de setembro de 2003
- JONG, C. S. (2005) The market potential for medicinal <http://www.mushworld.com> Acesso em: 05 de fevereiro de 2005
- JONG, C. S. (2002) Fungal cell wall glycans In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH 6: 159-178
- KAWAGISHI, T.; KANDO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. (1990) Formolysis of a potent antitumor (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers* 12: 393-403
- KERBEL, R.; FOLKMAN, J. (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2: 727-739
- KERRIGAN, R. W. (2005) *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom. and its synonyms. *Mycologia* 97: 12-24
- MATSUI, K.; KODAMA, N.; NANBA, H. (2001) Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis. *Cancer Letters* 172: 193-198
- MATSUI, T. O.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. (2003) Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to

- alcoholic beverages. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 26: 133-144
- MINATO, K.; MIZUNO, M.; KAWAKAMI, S.; TATSUOKA, S.; DEMPO, Y.; TOKIMATO, K.; TSUCHIDA, H. (2001) Changes in immunomodulating activities and content of antitumor polysaccharides during growth of two mushrooms, *Lentinus edodes* (Berk..) Sing and *Grifola frondosa* (Dicks;Fr) S.F. Gray. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3: 1-7
- MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. (1990a) Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural Biogical Chemistry* 54 (11): 2889-2896
- MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAOKA, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. (1990b) Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural Biogical Chemistry* 54 (11): 2897-2905
- MIZUNO, T. (1999) The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 9-29
- MOL, P.C.; VERMEULEM, C. A.; WESSELS, J. G. (1990) Diffuse extension of hyphae in stipes of *Agaricus bisporus* may be based on unique wall structure. *Mycological Research* 94: 480-488
- NEVES, M. A. (2000) Caracterização ecológica, fisiológica e genética de *Agaricus blazei* Murrill através de estirpes provenientes de diferentes empresas de produção de cogumelos. Florianópolis, 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina
- OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N.N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. (2001) Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 24 (7): 820-828
- ONO, M.; TORISU, H.; FUKUSHI, J.; NISHIE, A.; KUWANO, M. (1999) Biological implications of macrophage infiltration human tumor angiogenesis. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 43: 69-71
- OKUBO, J.; KAZUKUNI, K.; OHKUBO, S. (1991) Method of cultivating *Agaricus blazei* mushroom. U.S. Patent 5,048,227
- PERLIN, A. S.; CASU, B. (1982) Spectroscopic methods In: ASPINALL, G. O. The polysaccharides. New York: Academic Press Inc. 1: 133-186
- PATCHEN, M. L.; MacVITTIE, T. J. (1983) Dose-dependent responses of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of the immunomodulating agent glucan. *Immunopharmacology* 5: 303-313
- RAFII, S.; LYDEN, D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine* 9 (6): 702-712
- RAU, U. (2002) Schizophyllan In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH 6: 61-69
- RONG, W. L.; RONG F. Q.; LIANG, M. H.; ZHI, W. J.; ITO, H.; SHIMURA, K. (1995) Observation on the treatment effect of *Agaricus blazei* Murill to the liver function of chronic hepatitis. www.atlasworldusa.com Acesso em: 09 de setembro de 2003
- ROSS, G. D.; VÌ TVIÈKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VÌ TVIÈKOVÁ, J. (1999) Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer (Review). *Immunopharmacology* 42: 61-74
- SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. (2003) Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7. *Biotechnology Letters* 25: 2061-2064
- SHIGESUE, K.; KODAMA, N.; NAMBA, H. (2000) Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice. *Japanese Journal of Pharmacology* 84: 293-300
- TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. (2001) Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutritional* 131: 1409-1413
- WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. (2002) Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 297-90
- ZIMMERMAN, J. W.; LINDERMUTH, J.; FISH, P. A.; PALACE, G. P.; STEVENSON, T. T.; DEMONG, D. E. (1998) A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β -(1 \rightarrow 3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 22014-22020
- ZEISEL, S. H. (1999) Regulation of "nutraceuticals". *Science* 285: 1853-1855