

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARLA MAÍSA CAMELINI**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO FUNGO *Agaricus subrufescens*  
POR PROCESSOS FERMENTATIVOS SÓLIDO E SUBMERSO  
PARA OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS BIOATIVOS**

**Florianópolis  
2010**



**CARLA MAÍSA CAMELINI**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO FUNGO *Agaricus subrufescens*  
POR PROCESSOS FERMENTATIVOS SÓLIDO E SUBMERSO  
PARA OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS BIOATIVOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadores**

Prof.<sup>a</sup> Dr. Margarida Matos de Mendonça  
Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Florianópolis  
2010

CAMELINI, Carla Maísa

Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos./ Carla Maísa Camelini  
Florianópolis, 2010. 215 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1- *Agaricus subrufescens*. 2- biotecnologia. 3- fermentação.  
4- filtração. 5- micélio. 6- polissacarídeos. 7- RAPD.  
8- resíduos.

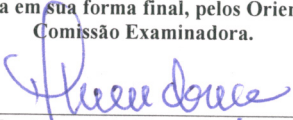
**“Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos.”**

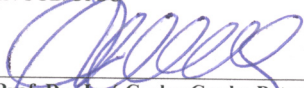
POR

**Carla Maisa Camelini**

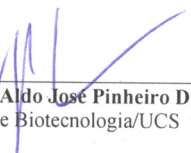
Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelos Orientadores e membros da Comissão Examinadora.

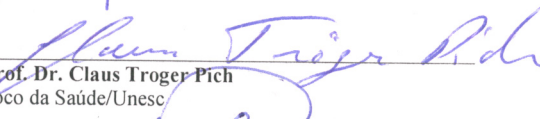
Orientadores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Margarida Matos de Mendonça  
MIP/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus  
Gabinete do Reitor/UFSC

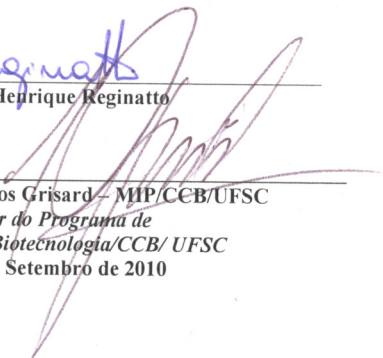
Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon  
Instituto de Biotecnologia/UCS

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Claus Troger Pich  
Bloco da Saúde/Unesc

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Márcio José Rossi  
MIP/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto  
CIF/CCS/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia/CCB/UFSC  
Florianópolis, Setembro de 2010



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João Carlos Camelini e Marlene Decanini Camelini, e ao meu irmão Carlos Eduardo Camelini pelo apoio e incentivo. Ao meu noivo Eduardo Marques pela compreensão e carinho. À mestre de Tai Chi Chuan Jacqueline e às minhas médicas Analyce Claudino e Ana Luisa Schumacher pela ajuda nos momentos mais difíceis da travessia. À Loreta L. V. Rodrigues pela direção do sagrado.

Reconhecimento também à amiga e orientanda Aline Gomes pela disposição para a realização dos experimentos, e por acreditar que poderiam dar certo. Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela cooperação, ensinamento e troca de experiências. Em especial, às amigas Francielle T. G. de Sousa Cardozo e Darlene Pena.

Grata em especial à prof.<sup>a</sup> Margarida Matos de Mendonça, aos professores Arthur Smania, Marcelo Maraschin, Márcio José Rossi, Mario Steindel, José Carlos Petrus, pela orientação, apoio e incentivo.

Agradecimentos também ao pessoal dos Laboratórios de Ectomicorrizas e Bioprocessos, prof.<sup>a</sup> Vetúria, prof. Admir, Everton, Pedro, Bianca, Luiz e Paulo. Ao Laboratório de Farmacognosia em especial a prof.<sup>a</sup> Cláudia Oliveira Simões. Reconhecimentos pela disposição e eficiência do pessoal do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCAR, principalmente ao prof. Giba.





Nada nunca é igual.  
Enquanto descanso, carrego pedra.  
(Ditado popular)



## RESUMO

*Agaricus subrufescens* (= *A. brasiliensis*) é um fungo comestível amplamente comercializado no Brasil e em outros países, devido as suas propriedades nutricionais e medicinais relacionadas principalmente aos polissacarídeos presentes em sua parede celular, tais como glucanas e glucomananas. Certos processos biotecnológicos têm sido utilizados para aumentar a escala produtiva do micélio e, conseqüentemente, aumentar a obtenção dos polissacarídeos. Previamente ao desenvolvimento desses processos de produção é importante estabelecer métodos de preservação do fungo *in vitro* e a recuperação do micélio após estocagem. Para a produção de biomassa foi utilizada a fermentação no estado sólido (FES) em grãos de trigo pré-tratados e a fermentação submersa (FSm) em hidrolisados de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo (FT) e resíduo de cervejaria (RC). Polissacarídeos extraídos da frutificação (controle), do micélio em FES e do micélio isolado da FSm foram separados de acordo com suas massas molares por meio de diferentes membranas. Essas frações de polissacarídeos foram testadas na ativação de macrófagos *in vitro*. Entre os métodos de preservação, melhores resultados foram obtidos quando o meio de cultura foi suplementado com carvão ativo, tanto para a preservação quanto para a recuperação de *A. subrufescens*, sem alterações significativas na morfologia e genética do fungo durante um período de até 12 meses de estocagem. Para a FES, 21 min de cozimento dos grãos de trigo seguido de 24 min de molho após o cozimento demonstrou ser mais adequado para a produção de polissacarídeos (glucomananas) pelo fungo, inclusive quando o substrato não foi suplementado com cálcio, ou com adição máxima de 0,25 %  $\text{CaCO}_3$  (pH 6,6). A quantidade inicial de inoculante para a melhor produção de glucomananas ( $6,89 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi aproximadamente 10,3 %, numa temperatura ótima de incubação de  $27,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . As maiores biomassas de *A. subrufescens* para a FSm em hidrolisados de RC e FT foram obtidas na concentração de HCl 0,45 % e 20 min de hidrólise, apresentando  $9,65 \text{ g.L}^{-1}$  e  $22,1 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Porém, melhores resultados de bioconversão foram obtidos em hidrolisados utilizando até 0,3 % de HCl e 30 min de hidrólise, com adição de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativo durante a hidrólise. Também foram obtidas altas taxas de biomassa de *A. subrufescens* no cultivo em hidrolisado com pH 5,3 e temperatura de incubação de  $30,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Na separação com membranas houve aumento da retenção dos polissacarídeos de todos os extratos à medida que o tamanho dos poros da membrana diminuiu. Os polissacarídeos

separados pelas membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF1) favoreceram a retenção de polissacarídeos de maior massa molar da frutificação ( $627 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e do micélio ( $310 \text{ g.mol}^{-1}$ ), obtido tanto em FES quanto em FSm. Todos os polissacarídeos extraídos e retidos pelas membranas ativaram macrófagos através da expressão do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Porém, somente os extratos brutos da frutificação e do micélio isolado da FSm, e seus polissacarídeos de maior massa molar retidos pela membrana MF ativaram macrófagos através da expressão de Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). Resultados importantes também foram obtidos para os polissacarídeos das frutificações de *A. subrufescens*, apresentando efeito antígeno tóxico e atividade antiherpética quando esses foram sulfatados. Baseado nesses resultados, pesquisas complementares estão sendo desenvolvidas para a obtenção de produtos biotecnológicos com finalidade nutricional e/ou farmacêutica.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus subrufescens*, biotecnologia, fermentação, filtração, glucana, micélio, polissacarídeos, RAPD, resíduo.

## ABSTRACT

*Agaricus subrufescens* (= *A. brasiliensis*) is an edible fungus widely commercialized in Brazil and other countries, mainly due to its nutritional and medicinal properties related principally to the polysaccharides present in the fungus cell wall, such as glucans and glucomannans. Biotechnological processes may in turn be used to scale up the production of mycelium and consequently the polysaccharides. Previous to the development of the production process it is important to establish techniques for the *in vitro* preservation and recovery of the mycelium after storage. Solid state fermentation (SSF) on pre-treated wheat grains and submerge fermentation (SmF) on hydrolyzed residues from the agro industries, such as wheat bran (FT) and brewery residues (RC) were used for biomass production. Polysaccharides extracted from fruiting bodies (control), mycelium on SSF and isolated mycelium from SmF were separated by molecular weight through different membranes. These polysaccharide fractions were tested on macrophage activity *in vitro*. Among the preservation techniques, better results were obtained when the media was supplemented with activated charcoal both for preservation and further recovery of *A. subrufescens*, without significant morphological and genetic changes within the 12 month storage period. For SSF, 21 min of wheat grain cooking followed by a 24 min resting time has shown to be the optimal condition for the production of polysaccharides (glucomannans) by the fungus, either with no supplement added, or when up to 0.25 % CaCO<sub>3</sub> (pH 6.6) has been added to the substrate. The initial inoculum amount for the best polysaccharide production levels (6.89 %) was around 10.3 % with an optimal temperature of 27.2 °C. The highest biomass of *A. subrufescens* for the SmF in hydrolyzed RC and FT using HCL 0.45% and 20 min hydrolysis was 9.65 g.L<sup>-1</sup> and 22.1 g.L<sup>-1</sup>, respectively. On the other hand, better results of bioconversion were obtained in hydrolyzed residues using up to 0.30 % HCl and 30 min hydrolysis, with the addition of 2 g.L<sup>-1</sup> of activated charcoal throughout the process. High biomass levels were also obtained when the cultivation was carried out at a pH of 5.3 and with incubation temperature of 30.2 °C. The results showed an increase in retention of all polysaccharide extracts as the membrane porosity decreased. Microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF1) membranes retained the highest polysaccharides from fruiting body (627 g.mol<sup>-1</sup>) and mycelium (310 g.mol<sup>-1</sup>) obtained on both SSF and SFm. All polysaccharide extracts and fractions separated by the membranes showed biological activity for TNF- $\alpha$  cytokines. On the

other hand, only extracts obtained from fruiting bodies and isolated mycelium of FSm, and its high molecular weight polysaccharides retained by the MF membrane activated the iNOS. Important results were also obtained for the polysaccharides extracted from the fruiting bodies, showing antigenotoxic and antiherpetic activities after sulphatation. Based on these findings, additional research is currently in progress to purpose biotechnological products that can be used in both the nutraceutical and/or pharmaceutical areas.

Key words: *Agaricus blazei*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus subrufescens*, biotechnology, fermentation, filtration, glucan, mycelium, polysaccharide, RAPD, residue.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>21</b>
1.1 OBJETIVOS.....	24
1.1.1 Objetivo geral.....	24
1.1.2 Objetivos específicos.....	24
1.2 Descrição biológica.....	24
1.2.2 Bioatividade, extração e separação de polissacarídeos estruturais.....	29
1.2.2.1 Histórico.....	29
1.2.2.2 Bioatividade e estrutura dos polissacarídeos.....	31
1.2.2.3 Extração e separação dos polissacarídeos.....	33
1.2.3 Produção de biomassa miceliana visando à obtenção de polissacarídeos.....	36
1.2.3.1 Preservação.....	36
1.2.3.2 Caracterização molecular.....	38
1.2.3.3 Produção de biomassa.....	39
1.2.3.4 Produção em biorreatores.....	45
1.2.3.5 Viabilidade econômica da produção.....	47
1.2.4 Planejamento estatístico de experimentos.....	48
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>53</b>
<b>2 PRESERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Agaricus subrufescens</i></b> .....	<b>55</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	55
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.2.1 Inóculo de cultivo.....	56
2.2.2 Métodos de preservação.....	56
2.2.3 Viabilidade do micélio.....	57
2.2.4 Velocidade de crescimento radial do micélio.....	58
2.2.5 Análise da estabilidade genética do fungo.....	58
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
2.3.1 Viabilidade de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	60
2.3.2 Velocidade de crescimento radial do micélio.....	62
2.3.3 Análise da estabilidade genética de <i>Agaricus subrufescens</i> por RAPD.....	65
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>69</b>
<b>3 CULTIVO DE <i>Agaricus subrufescens</i> EM SUSTRATO SÓLIDO</b> .....	<b>71</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	71
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73

3.2.1 Inóculo de cultivo .....	73
3.2.2 Delineamento experimental para o cultivo em estado sólido a base de grãos de trigo.....	74
3.2.3 Seleção de fatores ambientais determinantes que influenciam na obtenção dos polissacarídeos de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	74
3.2.4 Identificação da umidade ótima dos grãos para obtenção dos polissacarídeos de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	75
3.2.5 Identificação do pH ótimo para obtenção dos polissacarídeos de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	76
3.2.6 Aumento da escala de produção dos polissacarídeos de <i>Agaricus subrufescens</i> em grãos de trigo .....	76
3.2.7 Métodos analíticos .....	77
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
3.3.1 Análise dos polissacarídeos de <i>Agaricus subrufescens</i> produzidos em substrato sólido .....	78
3.3.2 Seleção de fatores ambientais determinantes que influenciam na produção de polissacarídeos.....	82
3.3.3 Umidade ótima dos grãos para obtenção de polissacarídeos .....	84
3.3.4 pH ótimo para obtenção de polissacarídeos .....	90
3.3.5 Temperatura de incubação ótima e quantidade de inóculo inicial para o aumento da escala de produção de polissacarídeos.....	98
3.3.6 Condições para o cultivo de <i>Agaricus subrufescens</i> no estado sólido a base de grãos de trigo para produção de polissacarídeos.....	101

## **CAPÍTULO IV ..... 103**

### **4 CULTIVO DE *Agaricus subrufescens* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS ..... 105**

4.1 INTRODUÇÃO .....	105
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	106
4.2.1 Inóculo de cultivo .....	106
4.2.2 Resíduos agroindustriais .....	107
4.2.3 Hidrólise dos resíduos.....	107
4.2.4 Suplementação com nutrientes.....	108
4.2.5 Verificação preliminar das concentrações de HCl para a hidrólise dos resíduos.....	108
4.2.6 Influência do tempo e concentração de HCl na hidrólise dos resíduos .....	108
4.2.7 Fatores limitantes do crescimento de <i>Agaricus subrufescens</i> nos hidrolisados .....	109



4.2.8 Otimização da hidrólise dos resíduos para o crescimento de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	110
4.2.9 Otimização do pH e temperatura de cultivo .....	110
4.2.10 Métodos analíticos.....	111
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	111
4.3.1 Quantidade de carbono e nitrogênio nos resíduos e seus hidrolisados .....	111
4.3.2 Verificação preliminar das concentrações de HCl para a hidrólise do resíduo da cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT) .....	112
4.3.3 Influência do tempo e concentração de HCl na hidrólise dos resíduos e produção de biomassa .....	115
4.3.4 Fatores limitantes no hidrolisado para o crescimento de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	118
4.3.5 Otimização da hidrólise dos resíduos .....	120
4.3.6 Quantidade de biomassa, carbono e bioconversão para os hidrolisados do resíduo RC .....	121
4.3.7 Quantidade de biomassa, carbono e bioconversão para os hidrolisados do resíduo FT .....	127
4.3.8 Temperatura ótima de incubação e pH ótimo do substrato para o cultivo de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	133
4.3.9 Elaboração de formulações em hidrolisados do resíduo da cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT).....	136
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>137</b>
<b>5 EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS.....</b>	<b>139</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	139
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	140
5.2.1 Material biológico .....	140
5.2.2 Extração dos polissacarídeos.....	141
5.2.3 Separação dos polissacarídeos através de membranas .....	142
5.2.4 Obtenção de $\beta$ -glucanas para uso como controle .....	143
5.2.5 Atividade biológica <i>in vitro</i> .....	143
5.2.6 Determinação da massa molar.....	144
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	144
5.3.1 Rendimento do polissacarídeo.....	144
5.3.2 Massa molar e atividade biológica <i>in vitro</i> .....	146
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>153</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>155</b>

<b>CAPÍTULO VII .....</b>	<b>159</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>161</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>163</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>189</b>
<b>APÊNDICE A – MATRIZ DO COEFICIENTE DE SIMILARIDADE DE DICE BASEADA NA ANÁLISE DE RAPD.....</b>	<b>191</b>
<b>APÊNDICE B – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO DE <i>Agaricus subrufescens</i> EM GRÃOS.....</b>	<b>193</b>
<b>APÊNDICE C - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO DE <i>Agaricus subrufescens</i> EM HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS .....</b>	<b>199</b>
<b>APÊNDICE D – RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....</b>	<b>207</b>
<b>ANEXO – PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>209</b>

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Fungos são microrganismos eucariotos que absorvem os nutrientes, reproduzem-se por esporos e dispõem de um corpo sob a forma de filamentos, as hifas, que no seu conjunto compõem o micélio. As hifas são tubulares e constituem as unidades estruturais que contém todas as organelas características das células eucarióticas. A parede celular do fungo, envoltório mais externo da célula, é constituída principalmente por quitina, glicoproteínas, glucanas e mananas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Alguns fungos produzem estruturas macroscópicas, também denominadas frutificações e que em determinados casos se denominam cogumelos. Esses fungos têm ciclo de vida com uma fase longa de micélio secundário e de crescimento vegetativo que desempenha a função fundamental de nutrição. Quando esta fase recebe estímulos do meio ambiente se formam as frutificações, durante a fase denominada reprodutiva, com formação de esporos nestas frutificações que subsequentemente iniciam novo ciclo de vida (CLARK; ANDERSON, 2004; FAZENDA et al., 2008).

Muitos desses fungos pertencem ao filo *Basidiomycota*, inclusive a espécie *Agaricus subrufescens* Peck (= *A. brasiliensis* Wasser, Didukh, de Amazonas & Stamets<sup>1</sup>), amplamente consumida e estudada devido as suas propriedades nutricionais e medicinais, relacionadas principalmente às  $\beta$ -glucanas presentes em sua parede celular, ou ainda, aos componentes extracelulares secretados pelo fungo no meio de cultivo (ITO et al., 1997; MIZUNO et al., 1990a; MIZUNO et al., 1999).

A esses polissacarídeos são atribuídas atividades biológicas imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica e antimicrobiana, sendo no conjunto denominadas modificadores da resposta biológica, pois interagem e modificam a resposta imunológica (biorregulação) do hospedeiro, controlam a homeostase, regulam o biorritmo, prevenindo várias doenças (DIJKGRAAF et al., 2002; ROSS et al., 1999; WASSER; WEIS, 1999).

Tais compostos apresentam estruturas ordenadas, formadas principalmente por unidades de  $\beta$ -D-glicose, com elevada massa molar. As diferenças no tipo de ligação entre as unidades dos açúcares da cadeia principal e nas suas ramificações lhes conferem características estruturais específicas e ações biológicas distintas, de acordo com a

---

<sup>1</sup> Apesar do nome *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann ser amplamente utilizado como sinônimo para *A. subrufescens*, o nome tem sido incorretamente empregado (Kerrigan, 2005).

espécie de origem (BROWN; GORDON, 2001; CLEARY; GRAHAM; HUSBAND, 1999; SHU; WEN; LIN, 2003).

As  $\beta$ -glucanas com função estrutural estão presentes em todo o ciclo de vida dos fungos, podendo variar sua estrutura em diferentes fases do desenvolvimento. A partir das frutificações de *A. subrufescens* foram identificadas as estruturas (1 $\rightarrow$ 6)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanas, ou seja, a cadeia principal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e ramificações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) conectadas (CAMELINI et al., 2005; MIZUNO et al., 1990a). A partir do micélio cultivado em substrato líquido, foram identificadas as glucomanas, com cadeia principal (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -mananas e ramificações (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanas (MIZUNO et al., 1999). No filtrado desse cultivo foi isolado o complexo manana-proteínas secretado pelo fungo (ITO et al., 1997). Ambos os polissacarídeos apresentaram atividade antitumoral (MIZUNO et al., 1990a; MIZUNO et al., 1999; ITO et al., 1997). Esses polissacarídeos bioativos podem ser obtidos a partir das frutificações em cultivo tradicional de fermentação sólida, não axênico (não estéril), ou a partir do micélio em crescimento vegetativo em condições axênicas.

O cultivo tradicional para a obtenção das frutificações é um sistema de produção que envolve etapas de pré-cultivo complexas tal como o processo de seletividade do substrato, a compostagem e a produção do inoculante. Na etapa de crescimento do fungo nesse substrato não axênico, processo denominado colonização, podem ocorrer contaminações. Além desse problema, o processo requer um longo período de tempo, desperdiçando-se o micélio que permeou o substrato e é descartado após a colheita das frutificações (EIRA, 2003; OEI, 1996). Sendo assim, é importante o desenvolvimento de processos que reduzam o tempo de produção da biomassa fúngica viabilizando de forma eficiente a recuperação dos polissacarídeos.

O aumento de escala, do laboratório à escala comercial, é um processo biotecnológico típico, sendo comum ao cultivo de microrganismos para produção de antibióticos, de enzimas, de hormônios, quando se produzem anticorpos e na cultura de células e tecidos vegetais (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). Quando se trata do cultivo de microrganismos é fundamental primeiramente se estabelecer o método ideal de preservação da cultura selecionada, a qual deve ter capacidade de produzir elevados rendimentos de biomassa ou do metabólito de interesse. A preservação do micélio garante sua utilização sem perda das características fisiológicas por modificação genética visto que reduz o número de réplicas que são produzidas quando se usam repetidamente técnicas de repicagem do micélio para o suprimento de

biomassa inoculante. Diversos métodos de preservação podem ser utilizados para diminuir esses riscos. Métodos simples, como a preservação em água ou óleo mineral, que podem reduzir a necessidade de um elevado número de manipulações da cultura, podem ser eficientes desde que monitoradas a viabilidade e as características genéticas do fungo ao longo do período de estocagem (CROAN; BURDSALL JR.; RENTMEESTER, 1999; RICHTER; BRUHN, 1989).

Uma vez preservado, o fungo selecionado pode ser utilizado para produção de biomassa em substrato axênico sólido ou líquido, denominados respectivamente de fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm). Esses processos têm aplicações industriais na produção de micélio de cogumelos comestíveis como alimento ou inoculante para o cultivo tradicional, obtenção de agentes flavorizantes, polissacarídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos (COUTO; SANROMÁN, 2006; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

A FES apresenta algumas vantagens em relação a FSm dentre elas a baixa demanda de água no processo e o suporte sólido para o crescimento dos microrganismos simulando um meio ambiente natural. Porém, nesse sistema é mais complexo quantificar e separar a biomassa fúngica e o polissacarídeo específico de sua parede celular, sendo mais viável para obtenção de matéria-prima para a área de alimentos, de forma integral (GADEN et al., 1992; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

Por outro lado, a FSm, uma área em desenvolvimento nas últimas décadas, possibilita um maior controle do processo, menor risco de contaminação, e a obtenção de micélio com maior pureza já que a biomassa é facilmente separada do meio de cultivo e os polissacarídeos isolados para a área farmacêutica (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; ROSSI et al., 2004).

A escolha do processo depende de diversos fatores entre os quais estão àqueles relacionados aos aspectos econômicos, a qualidade do produto final, e as regulamentações governamentais para o descarte do resíduo sólido ou líquido (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). A atividade biológica dos produtos obtidos nos diferentes processos também é um requisito importante para essa escolha, já que diferentes substratos podem modificar a estrutura química dos polissacarídeos do micélio, analisados quanto a sua estrutura de cadeia principal, grupo de cadeias laterais e grau dessas ramificações (HOLIDAY, 2003; SILVA et al., 2006; WASSER; WEIS, 1999).

Em função do exposto, a potencialidade dos polissacarídeos de *A. subrufescens*, para a produção de produtos nutracêuticos e sua extração

em escala comercial, dependem do desenvolvimento de pesquisas envolvendo diversas etapas, incluindo a preservação do fungo com manutenção de suas características genéticas, a maximização da produção da biomassa no cultivo e o estabelecimento de métodos de extração e separação dos polissacarídeos visando à viabilização dos estudos pré-clínicos e clínicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Estabelecer processos eficientes de produção, extração e separação de polissacarídeos do fungo *A. subrufescens*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Definir métodos de preservação do fungo *A. subrufescens* que permitam garantir a manutenção das características do fungo por períodos prolongados.
- 2) Estabelecer parâmetros de crescimento miceliano de *A. subrufescens*, laboratoriais e para a escala comercial, em substratos sólidos e líquidos visando à produção de polissacarídeos bioativos.
- 3) Extrair e separar os polissacarídeos obtidos nos diferentes sistemas de cultivo e analisar a sua massa molar e bioatividade.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Descrição biológica

Os fungos são microrganismos eucariotos heterotróficos que realizam nutrição absorptiva, ou seja, não fixam carbono. Os nutrientes devem passar através das hifas, que são filamentos tubulares. Essas unidades estruturais são compostas por membrana plasmática e parede celular (Figura 1.1), que contém todas as organelas características de células eucarióticas, e que constituem o soma (corpo) do fungo, com alongamento por crescimento apical formando-se o micélio. Estruturas



reprodutivas são diferenciadas das estruturas somáticas e exibem uma variedade de formas, com base nas quais é possível classificar muitos fungos. Muitas espécies de fungos possuem hifas interrompidas em alguns pontos por paredes transversais (septos) ao longo do comprimento da hifa, dividindo-a em compartimentos individuais ou “células” que contêm um, dois ou mais núcleos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

A membrana citoplasmática dos fungos apresenta estrutura e funções similares às das membranas das células de mamíferos, sendo constituída por dupla camada de fosfolipídios e um arranjo de proteínas embebidas na bicamada lipídica rica em grupamentos esterol, com proteínas de superfície fracamente ligadas à membrana e pequenas quantidades de carboidratos. A membrana plasmática dos fungos difere das membranas animais por apresentar o esterol não-polar ergosterol, ao invés de colesterol, ambos provenientes do lanosterol. Os esteróides apresentam papel importante na organização, dinâmica e função da membrana, conferem estrutura, barreira biofísica, modulação da fluidez e possivelmente controlam alguns eventos fisiológicos, como a regulação da síntese de quitina (ARORA; RAGHURAMAN, CHATTOPADHYAY, 2004; KINNUNEN, 2008; MIAO et al., 2002; MOL, 1989; SOOD; TRABULSI, 1999).

O ergosterol foi primeiramente identificado em *Claviceps purpurea* em 1889, sendo que a maioria dos fungos contém o ergosterol como principal esterol, com estrutura química ciclopentanoperidrofenantreno de 28 carbonos, pois apresenta o grupamento 24 $\beta$ -metil a mais em relação à estrutura do colesterol, ambos oriundos do lanosterol na biossíntese dos terpenóides (SOOD; KINNUNEN, 2008; WEETE, 1989).

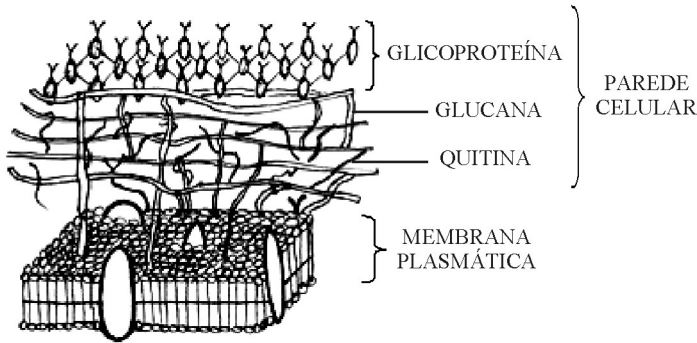


Figura 1.1 - Esquema da estrutura da membrana plasmática e parede celular de fungos baseado em Yamaguchi (2003).

A membrana plasmática é envolvida por uma parede celular semi-rígida responsável pela forma e integridade estrutural do organismo (MOL, 1989; TRABULSI, 1999). A parede celular do fungo é o envoltório mais externo da hifa e consiste de estruturas estratificadas compostas por várias camadas de microfibrilas de quitina (glucosaminaglicana), embebidas em uma matriz de polissacarídeos complexos, glicoproteínas, sais inorgânicos e pigmentos. Os principais polissacarídeos da matriz da parede celular consistem de glicanos não-celulósicos tais como glucanas (polímeros de glicose), mananas (polímeros de manose), e galactanos (polímeros de galactose). Pequenas quantidades de resíduos de fucose, ramanose, xilose e ácidos urônicos também podem estar presentes. As proporções dos componentes da parede celular variam bastante entre as diferentes espécies de fungos (SUTHERLAND, 2002; TRABULSI, 1999).

Os polissacarídeos constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica, a parede da hifa, por exemplo, contém mais de 75% desse tipo de molécula. Além de atuarem como elemento de suporte para as hifas, alguns polissacarídeos constituem uma capa extracelular ao redor do micélio (exopolissacarídeos), proporcionando um suporte para adesão das enzimas secretadas e participando na degradação da lignina. As glucanas também podem contribuir para manter o pH ótimo para as enzimas ligninolíticas, além de impedirem a desidratação das hifas e de regularem a concentração de glicose extracelular. Essas

moléculas ficam parcialmente dissolvidas no meio de cultivo quando o fungo cresce em meio líquido (SILVA et al., 2006).

As glucanas são formadas principalmente por unidades de  $\beta$ -D-glicose (anéis do tipo  $\beta$ -D-glicopiranosídico), sintetizadas no citoplasma, transportadas à membrana plasmática e subsequentemente integradas na parede celular em formação, apresentando diferentes ligações como (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ , (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ , (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ , (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$  ou (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ , com ramificações na cadeia principal, dependente da espécie do fungo. Essas glucanas estão ligadas à quitina formando um complexo, com ligações entre as terminações redutoras da glucana e os grupamentos de amino livres da glucosaminoglicana, e também podem estar ligadas a proteínas (MOL, 1989).

A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica que está sujeita a mudança e modificações em diferentes fases na vida de um fungo. Para rápida expansão das frutificações, sob pressão de turgor, adquire certo grau de plasticidade devido ao crescimento em extensão da parede celular, diferente das hifas do micélio. As diferenças foram encontradas no complexo glucana-glucosaminoglicana que dispõe de menor número de ligações nas frutificações e de uma reorientação da parede, aumentando a flexibilidade, permitindo alongação axial, e inserção de novos polímeros até um máximo de expansão (MOL; VERMEULEM; WESSELS, 1990). Para tanto, entre outras mudanças químicas e enzimáticas, existe um aumento na proporção de ramificações do tipo (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanas na cadeia principal (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanas, no caso de *Agaricus bisporus* (MOL; WESSELS, 1990). A reestruturação dos polissacarídeos é requerida durante o crescimento das frutificações, micélio, esporulação, e envolve glucanases e gluconosiltransferase localizadas na superfície celular (DIJKGRAAF; HUIJUAN; BUSSEY, 2002).

As frutificações ou cogumelos são estruturas macroscópicas de algumas espécies de fungos. Esses fungos têm no seu ciclo de vida uma fase dicariótica, longa, de micélio secundário ou crescimento vegetativo que desempenha função de nutrição. Quando essa fase recebe estímulos do meio ambiente são formados os cogumelos, denominada fase reprodutiva, com formação e liberação de esporos, ou seja, células haplóides que iniciam novo ciclo de vida (CLARK; ANDERSON, 2004; FAZENDA et al., 2008)

O ciclo de vida pode ser visualizado na Figura 1.2. Na fase dicariótica o fungo possui em cada célula, ou compartimento de hifa, dois núcleos haplóides, provenientes de estruturas diferentes, que ao

serem compatíveis fundem seus citoplasmas, dividindo-se sincronicamente, determinando a fase  $n+n$ . Essa fase se inicia com a plasmogamia e termina com a cariogamia, abrangendo a fase de micélio secundário e de frutificações. A fase seguinte é diplóide, na qual o fungo possui núcleos com número  $2n$  de cromossomos, iniciando com a cariogamia e terminando com a meiose, em continuidade ao ciclo na fase haplóide com células de núcleos com número  $n$  de cromossomos, formando esporos e micélio primário até a plasmogamia (CLARK; ANDERSON, 2004; FAZENDA et al., 2008; GUERRERO; SILVEIRA, 1996).

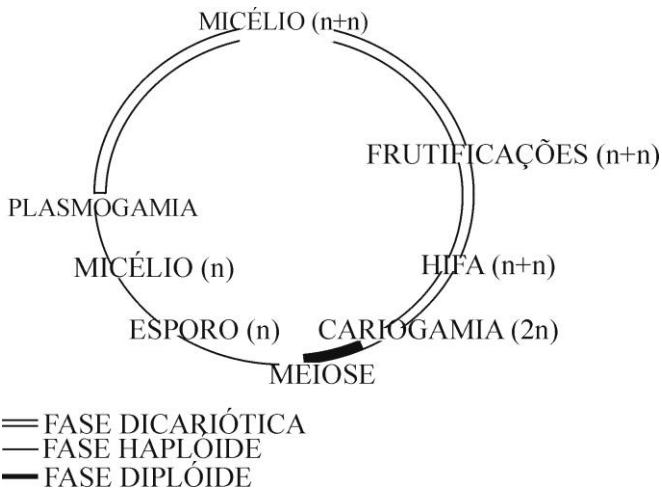


Figura 1.2 – Ciclo de vida dos fungos pertencentes ao filo *Basidiomycota*.

Muitos desses fungos pertencem ao filo *Basidiomycota*, com micélio filamentosos originando as frutificações, nas quais são produzidos os esporos de origem sexual, denominados basidiósporos, externamente nos basídios, ou seja, na estrutura celular onde ocorre a cariogamia e a meiose.

A espécie *Agaricus subrufescens* Peck (= *A. brasiliensis* Wasser, Didukh, de Amazonas & Stamets) é pertencente a esse filo, ao subfilo Agaricomycota, à classe Agaricomycetes, à subclasse Agaricomycetidae, à ordem Agaricales, à seção Arvenses, e ao gênero *Agaricus* (KERRIGAN, 2005).

Nas décadas de 60 e 70, foram coletados no Brasil em Piedade, em São Paulo, espécimes de cogumelos identificados como *Agaricus*

*blazei* Murrill, posteriormente denominados *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann. O cultivo da espécie no país iniciou-se na década de 90 devido às condições climáticas ideais, já que o fungo é nativo do continente americano (IWADE; MIZUNO, 1997). Recentemente, Wasser et al. (2002) propuseram uma nova denominação, *Agaricus brasiliensis* para a espécie brasileira. Porém, estudos comparativos entre várias espécies de *Agaricus* realizados por Kerrigan (2005) indicaram que *A. brasiliensis* é biológica e filogeneticamente relacionada à *Agaricus subrufescens* Peck, classificada em 1893 e também nativa na América do Norte. Apesar do nome *A. blazei* Murrill ser amplamente utilizado como sinônimo para *A. subrufescens*, o nome tem sido incorretamente empregado.

No presente trabalho serão considerados os artigos já publicados com essa denominação taxonômica, *A. blazei*. Porém, atendendo ao critério de prioridade e respeitando o Código Internacional de Botânica, passamos a utilizar a denominação *A. subrufescens*.

## **1.2.2 Bioatividade, extração e separação de polissacarídeos estruturais**

### **1.2.2.1 Histórico**

Os cogumelos vêm sendo consumidos pela humanidade há milhares de anos devido ao seu valor nutricional, pois contêm minerais, vitaminas, proteínas, polissacarídeos e baixo teor de gordura (BREENE, 1990; CHANG, 1996; MANZI et al., 1996; MATTILA; SUONPAA; PIIRONEN, 2000). Além disso, esses fungos são apreciados por serem uma iguaria sofisticada, incrementando o sabor na elaboração de diversos alimentos (MISAKI; KAKUTA, 1995; MISAKI; KISHIDA, 1995), pela sua riqueza em glutamina, um realçador de sabor recentemente descoberto no Japão e denominado “umami” (HALLOCK, 2007).

Os cogumelos são consumidos tradicionalmente no Japão e na China como nutracêuticos (alimentos funcionais que beneficiam a saúde), principalmente devido ao elevado teor de  $\beta$ -glucanas bioativas, sendo que, nas últimas décadas, vêm sendo consumidos também como nutricêuticos e medicamentos. O termo nutricêutico é utilizado para denominar uma nova classe de subprodutos minimamente processados, podendo ser encapsulados para o consumo como suplementos dietéticos, com propósito terapêutico. Nutricêuticos de fungos podem ser obtidos

dos cogumelos ou do micélio (CHANG; BUSWELL, 1996; LAKHANPAL; RANA, 2005). Como medicamentos, as  $\beta$ -glucanas são utilizadas no Japão, desde a década de 80, no tratamento de pacientes com câncer, e comercializadas com nomes comerciais como Krestin<sup>®</sup> (*Trametes versicolor*), Lentinan<sup>®</sup> (*Lentinula edodes*) e Sonifilan<sup>®</sup> (*Schizophyllum commune*) (MIZUNO, 1999).

Nos países ocidentais houve um recente aumento no consumo desses fungos com finalidade terapêutica. Na Europa, as espécies mais utilizadas são *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus* e *Laricifomes officinalis* (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006). Nos Estados Unidos da América houve uma abertura de mercado para novas fontes naturais de compostos promotores de saúde, e as espécies *Ganoderma lucidum* e *Grifola frondosa*, conhecidos como Reishi e Maitake, respectivamente, são amplamente consumidos como nutracêuticos (CHANG, 1996; CHANG; BUSWELL, 2003; LAKHANPAL; RANA, 2005; MAYELL, 2001).

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 % desse valor (ZEISEL, 1999).

Nos Estados Unidos, os nutracêuticos contendo  $\beta$ -glucanas são geralmente produtos reconhecidos como seguros (*GRAS; Generally Recognized as Safe*) pelo *Food and Drug Administration (FDA)*, e são comercializados na forma de extratos, cápsulas ou tabletes (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; BOREK, 2003). Desde 1994, esses produtos são regulamentados por meio das boas-práticas de fabricação dos suplementos alimentares, sem necessitar das precauções de segurança aplicadas aos medicamentos em geral (INSTITUTE OF MEDICINE U.S., 2005)

Em 2005, a Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) 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 por meio de evidências científicas, publicadas em artigos, incluíram as  $\beta$ -glucanas nas substâncias bioativas com a seguinte alegação: “A beta-glucona (fibra alimentar) auxilia na redução da absorção do colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis.” (BRASIL, 2002).

Portanto, é possível legalizar e comercializar os cogumelos que contêm  $\beta$ -glucanas, na forma de pó, cápsula, tablete ou comprimido, devendo conter na tabela de informação nutricional a quantidade da  $\beta$ -glucanas, como fibra solúvel, abaixo das fibras alimentares. Em sua embalagem não poderá ser veiculada informação alusiva a propriedades, que não sejam aquelas aprovadas pelo órgão competente da ANVISA.

#### 1.2.2.2 Bioatividade e estrutura dos polissacarídeos

Muitos cogumelos de uso tradicional na Ásia estão sendo estudados por pesquisadores interessados em averiguar e comprovar a eficácia e segurança de muitas atividades biológicas atribuídas a eles, tais como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, imunoestimulante, antitumoral, e nos casos de diabetes e hipertensão (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006).

Espécimes de *A. subrufescens* foram levados 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 a propriedade antitumoral, antimutagênica, antiviral, antitrombótica, hipotensiva, anti-inflamatória, cicatrizante e antioxidante do cogumelo. Essas atividades estão relacionadas a uma ampla gama de substâncias, tais como ésteres, ácidos linoléico e oléico, proteínas, enzimas e polissacarídeos (MIZUNO et al., 1990a; EGUCHI et al., 1999; DELMANTO et al., 2001; MATSUI et al., 2003; CHEN; SHAO; SU., 2004; HUANG et al., 2004; SOUSA et al., 2007; KOMURA et al., 2010; SUI et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Algumas das atividades biológicas, principalmente a imunoestimulante e a antitumoral, têm sido relacionadas às  $\beta$ -glucanas presentes na parede celular de *A. subrufescens* (KAWAGISHI et al., 1990; MIZUNO et al., 1990a; 1990b; OHNO et al., 2001), sendo que diversas patentes foram concedidas para processos de produção e utilização desses polissacarídeos (OKUBO; KAZUKUNI; OHKUBO, 1991; FUJIMIYA; EBINA, 2000). A indústria farmacêutica, incluindo a que produz medicamentos e cosméticos, tem utilizado as  $\beta$ -glucanas oriundas de *A. subrufescens* (ITO; SUMIYA, 2000; UCHIYAMA; HARAMAKI, 2002). Diversas marcas registradas e patentes relacionam as propriedades de *A. subrufescens* no uso dermatológico com atividades antialérgica, cicatrizante, protetora de danos causados à pele pela poluição e radiação, e também no clareamento de manchas e sinais

(HYDE; BAHKALI; MOSLEM, 2010; KOZUKA et al.; 2005; UCHIYAMA; HARAMAKI, 2002).

Existem ainda no mercado nacional e internacional, cremes, géis, loções facial e corporal, sabonetes, xampus e condicionadores (Cogumelo do Sol<sup>®</sup>, Agaricalis<sup>®</sup>), usados como cosmecêuticos. Esse termo é utilizado para uma nova linha de produtos de uso dermatológico com propriedades medicinais, podendo conferir atividade farmacológica, corretiva, regeneradora, nutritiva e estética (CASTILLO, 2005; HYDE; BAHKALI; MOSLEM, 2010; KLIGMAN, 2002).

Nos polissacarídeos de *A. subrufescens* foram identificadas as estruturas (1→6)-(1→3)- $\beta$ -glucanas nas frutificações, ou seja, a cadeia principal  $\beta$ -(1→6) e ramificações  $\beta$ -(1→3) conectadas (DONG et al., 2002, MIZUNO et al., 1990a, OHNO et al., 2001), com massa molar de 1700 g.mol<sup>-1</sup> (DONG et al., 2002) ou 2000 g.mol<sup>-1</sup> (MIZUNO et al., 1990a). No micélio cultivado em substrato líquido, foram identificadas as glucomananas com cadeia principal (1→2)- $\beta$ -mananas e ramificações (1→3)- $\beta$ -glucanas (MIZUNO et al., 1999). A massa molar dessa glucomanana foi determinada por diversos autores, com os seguintes valores: 380 g.mol<sup>-1</sup> (FUJIMIYA et al., 1998), 274 g.mol<sup>-1</sup> (LIN; YANG, 2006) e 170 g.mol<sup>-1</sup> (DONG et al., 2002). Uma fração desse polissacarídeo foi purificada apresentando um conteúdo menor que 5% de proteínas (ITO et al., 1997). Essa fração compõe 2,1 % do total da fração solúvel em água e foi denominado ATOM (antitumor organic substance Mie). No filtrado desse cultivo foi isolado o complexo manana-proteínas secretado pelo fungo. Ambos os polissacarídeos apresentaram atividade antitumoral (ITO et al., 1997; MIZUNO et al., 1999; WASSER; WEIS, 1999).

As frutificações de *A. subrufescens* UFSC 51, contém  $\beta$ -glucanas, como aquelas descritas acima, com baixo teor de proteínas e rendimento médio de  $42 \pm 1$  mg de  $\beta$ -glucana por grama de frutificação desidratada, com pequena variação entre os estágios de maturação (CAMELINI et al., 2005). Tais polissacarídeos foram testados no processo de vascularização em embriões de galinha demonstrando atividade promotora de formação de vasos (CAMELINI et al., 2006). Esse processo pode estar relacionado à atividade imunomodulatória e antitumoral das  $\beta$ -glucanas, como foi relatado por Matsui, Kodama e Nanba (2001) para as  $\beta$ -glucanas de *Grifola frondosa* denominada de Fração D, que possui estrutura semelhante àquelas de *A. subrufescens*.

No caso desse isolado UFSC 51, também já foi realizado cultivo em substrato líquido em biorreator, e constatada a viabilidade do micélio



para a utilização como inoculante (ROSSI et al., 2004), porém não foram averiguadas as estruturas químicas, o rendimento e a bioatividade dos polissacarídeos presentes no micélio e no meio líquido do cultivo.

As  $\beta$ -glucanas reconhecem e se ligam aos receptores de diversas células humanas, principalmente leucócitos, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e células NK, como também em receptores de células não-imunes como as endoteliais e os fibroblastos (BROWN; GORDON, 2003). Os principais receptores já identificados para  $\beta$ -glucanas são CR3, dectin-1 e lactosilceramida (BROWN; GORDON, 2001; 2003; ROSS et al., 1999; ZIMMERMAN et al., 1998).

De acordo com Ross et al. (1999), os receptores celulares de  $\beta$ -glucanas, i.e. CR3, são responsáveis por diversas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-6 em células NK, moduladoras da formação de vasos sanguíneos (BAMIAS; DIMOPOULOS, 2003).

Já foi demonstrado que polissacarídeos de elevada massa molar de *A. subrufescens* cultivado em substrato líquido podem ativar macrófagos e estimular a liberação da citocina TNF- $\alpha$  (SHU; WEN; LIN, 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; KODAMA; NANBA, 2001; ONO et al., 1999).

### 1.2.2.3 Extração e separação dos polissacarídeos

A obtenção das  $\beta$ -glucanas pelo método de Mizuno et al. (1990a) assegura elevado rendimento, porém requer um longo período de extração a 100° C e purificação por cromatografia líquida. Métodos como a extração em autoclave a 121° C, utilizando centrifugação e dialização para isolamento das  $\beta$ -glucanas (OHNO et al., 2001), podem reduzir o tempo de extração e facilitar a pesquisa da concentração dos polissacarídeos em várias amostras.

Uma forma de melhorar a separação/fracionamento e concentrar os polissacarídeos é por meio dos processos de separação com membranas como discutido a seguir. Esse processo apresenta diversas aplicações na separação e purificação de produtos biotecnológicos, com segurança e baixo custo (VAN REIS; ZYDNEY, 2007). São utilizados

na purificação de vacinas, extratos e soluções químicas, concentração de vírus e bactérias, remoção de pirogênios de soro fisiológico, remoção de células de caldos fermentados, esterilização a frio de mostos, tratamento de água e de efluentes (HILGER; SIGG; BARBIERI, 1999; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

Membranas são barreiras utilizadas na filtração, que separam duas fases permitindo a passagem seletiva das substâncias de acordo com seu tamanho, formato e características físico-químicas. As membranas possuem várias configurações e são selecionadas de acordo com as necessidades específicas de cada aplicação. As membranas são produzidas a partir de duas classes distintas de materiais: os polímeros, na sua grande maioria materiais orgânicos, e os inorgânicos, como metais e cerâmicas. Membranas de natureza orgânica são mais baratas do que as membranas inorgânicas, no entanto essas últimas apresentam uma maior vida útil e permitem limpezas mais eficientes, apesar de terem um custo mais elevado. São diversos os polímeros utilizados para produção de membranas tais como polietersulfona, polisulfona, polipropileno, politetrafluoretileno (PTFE), fluoreto de polivinilideno (PVDF), polivinilpirrolidona, ésteres de celulose e celulose regenerada (MOON; KIM; KIM, 2006; NANDI; UPPALURI; PURKAIT, 2008; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

Uma forma de operar um sistema de separação com membranas, muito utilizado industrialmente, é o tangencial (cross-flow). O sistema permite maior tempo de operação minimizando a necessidade de paradas para limpeza, conferindo ao sistema de filtração maior produtividade e confiabilidade. Esse modo de operação consiste em uma corrente de alimentação da fase líquida passando sob pressão através de uma membrana colocada em paralelo com a corrente fluida. Uma porção da alimentação passa através da membrana com a pressão aplicada, desde que seus componentes sejam menores que os poros da membrana. Essa porção que atravessa a membrana é chamada de permeado. A corrente que não passa pela membrana arrasta da sua superfície os materiais que não permearam. Essa corrente é chamada de concentrado ou retentado (VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

A capacidade de separação dos solutos depende fundamentalmente da seletividade e da permeabilidade da membrana, que são funções da distribuição e do tamanho médio dos poros e da espessura da camada de separação. Um estreitamento no perfil da distribuição de tamanhos dos poros prejudica a permeabilidade, porém aumenta a seletividade. Os principais processos de separação com membranas na biotecnologia são os de microfiltração, ultrafiltração,

nanofiltração, osmose inversa com e sem diafiltração, eletrodialise, permeação de gases e vapores (CHARCOSSET, 2006; VAN REIS; ZYDNEY, 2001; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

A microfiltração é o processo de separação com membranas mais próximo da filtração clássica. Utiliza membranas porosas com tamanho de poros na faixa entre 50 e 10.000 nm, sendo, portanto, processos indicados para a retenção de materiais em suspensão como células intactas e fragmentadas, e bactérias. Como as membranas de microfiltração são relativamente abertas, as pressões transmembranas empregadas como força motriz para o transporte, são baixas, frequentemente não ultrapassando 3 bar (CHARCOSSET, 2006; VAN REIS; ZYDNEY, 2001).

As membranas para ultrafiltração possuem diâmetro dos poros entre 1 e 20 nm e são utilizadas quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo proteínas e outras macromoléculas (CHARCOSSET, 2006; VAN REIS; ZYDNEY, 2001; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

Já em membranas empregadas na nanofiltração apresentam diâmetro dos poros compreendidos entre 0,5 e 2 nm, e são utilizadas para separar solventes, aminoácidos e antibióticos. A osmose inversa é usada quando se deseja reter solutos de baixa massa molar tais como, os sais inorgânicos, ou pequenas moléculas orgânicas como a glicose, e também é utilizada para obter água ultrapura para injeções (CHARCOSSET, 2006; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

Em trabalho realizado por Hashim e Gupta (1997), duas membranas de acetato de celulose de poros 0,2 e 0,45  $\mu\text{m}$  foram testadas para a microfiltração de solução contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram avaliados parâmetros importantes na operação como velocidade tangencial, concentração de levedura e volume acumulado do permeado. A velocidade tangencial foi o fator mais importante sobre a taxa de permeado, seguido da concentração de levedura com o tempo de operação do sistema. Também foi analisado o *fouling*, ou "sujamento" da membrana, que se traduz na deposição de partículas de levedura e outras substâncias ou partículas presentes no meio a ser filtrado. Geralmente, a vazão de alimentação da fase contendo a levedura deve ser bem maior que a vazão de filtração para reduzir o *fouling* da membrana.

$\beta$ -Glucanas secretadas (exopolissacarídeo) para o meio líquido pelo fungo *Schizophyllum commune*, conhecida como Schizophyllan, vem sendo purificadas e concentradas por microfiltração tangencial. Esse polissacarídeo fica retido na membrana de porosidade 0,1  $\mu\text{m}$ ,

permeando compostos de menor massa molar como proteínas, glicose e sais. A purificação é feita por diafiltração, ou seja, entrada de solvente (água) para manter o volume de retentado constante e lixiviar os compostos que devem permear a membrana. Após essa etapa, o polissacarídeo é concentrado e liofilizado (RAU, 2002).

### **1.2.3 Produção de biomassa miceliana visando à obtenção de polissacarídeos**

#### **1.2.3.1 Preservação**

Processos biotecnológicos visando à produção comercial, que utilizam microrganismos para obtenção de biomassa ou metabólitos primários e secundários necessitam garantir o armazenamento de culturas por longos períodos de tempo. O processo de propagação vegetativa pode ocasionar contaminações, perda de viabilidade, mutações, alterações nas características fisiológicas e variabilidade genética. Diversos métodos de preservação podem ser utilizados para diminuir esses riscos (CHANG; ELANDER, 1986).

Para obtenção de uma espécie de cogumelo para os processos biotecnológicos é necessário, primariamente, isolar o fungo a partir de um fragmento da parte interna do cogumelo fresco, próximo à área do chapéu, que contém células dicariontes  $n+n$ , porém longe da superfície exterior e da região das lamelas que contém os esporos  $n$ . Esse fragmento é transferido para um meio de cultura sólido iniciando a fase de micélio secundário quando incubado a temperatura ideal para cada espécie, podendo variar de 20 a 30 °C (OEI, 1996).

Após o isolamento do fungo são necessários métodos de preservação que podem ser de curto prazo, como a repicagem continuada; de médio prazo, como preservação em óleo mineral, ou em água, sob refrigeração (4 a 8 °C); ou de longa duração, como a liofilização, o congelamento a -80 °C e a criopreservação em nitrogênio líquido (CHANG; ELANDER, 1986).

A preservação em óleo mineral e água são métodos utilizados para evitar o ressecamento de culturas de fungos preservadas sob refrigeração, diminuindo a atividade metabólica. Discos de meio de cultura colonizados por fungos micorrízicos foram armazenados em tubos contendo água esterilizada e estocados em diferentes temperaturas por um período de 3 a 48 meses, apresentando diferentes tempos de viabilidade dependendo da espécie (RICHTER; BRUHN, 1989;

SMITH; McKAY; MOLINA, 1994).

Resíduos do metabolismo secundário de fungos como álcoois, ácidos alifáticos e compostos fenólicos podem comprometer sua viabilidade (DUARTE FILHO et al., 2008). O carvão ativo é frequentemente utilizado para remover compostos tóxicos de meios de cultura obtidos por hidrólise de resíduos agroindustriais para obtenção de biomassa fúngica (CHANDEL et al., 2007; MUSSATTO; ROBERTO, 2001). Dessa forma, o carvão ativo pode também ser uma alternativa viável para detoxificação dos meios de cultura usados na preservação de fungos, como tem sido utilizado pelos Laboratórios de Bioprocessos e Micorrizas da UFSC.

A liofilização, o congelamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a criopreservação são métodos de preservação de longa duração. A liofilização é um método que requer a remoção da água por sublimação em condições assépticas, que garante longa viabilidade e estabilidade elevada quando se considera diversas espécies fúngicas, principalmente quando os fungos formam esporos *in vitro* (TAN; STALPERS, 1984).

A criopreservação, estocagem em nitrogênio líquido em temperatura de  $-96\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tem sido utilizada para preservar fungos que não esporulam como os basidiomicetos, sem afetar, por outro lado, o crescimento e a produção de enzimas lignolíticas. O congelamento de oito espécies do gênero *Inonotus* e seis espécies de *Pholiota* apresentaram viabilidade quando testados após curto período de preservação usando-se esse método (STOYCHEV et al., 1998).

A repicagem, ou seja, a transferência de micélio vegetativo *in vitro*, de meio para meio de forma contínua, aumenta a ocorrência de contaminações e com frequência leva à perda do vigor do isolado, muitas vezes implicando em perda de características morfológicas ou fisiológicas importantes e a seleção de células atípicas (mutantes). Os métodos de preservação de médio prazo que se baseiam em princípios que envolvem a redução da atividade metabólica são mais acessíveis, de menor custo envolvendo menor risco de contaminações da cultura inicial. Por outro lado, quando se considera a preservação por longos períodos os processos são caros e tecnicamente complexos particularmente porque envolvem equipamentos sofisticados e especiais. Porém, os métodos a médio e longo prazo evitam problemas que apenas se resolvem por meio de nova seleção e isolamento, processo que frequentemente pode ser moroso e dispendioso. As características do crescimento miceliano, sua viabilidade e propriedades morfológicas, assim como as características genéticas do fungo são requisitos importantes que devem ser avaliados quando se tem como objetivo a

seleção de um método de preservação (CHANG; ELANDER, 1986).

### 1.2.3.2 Caracterização molecular

Ao longo do período de preservação é importante ainda a identificação de possíveis variações genéticas intraespecíficas. Nesse contexto, diversas técnicas moleculares permitem a detecção dessas variações. Técnicas baseadas em “Reação em Cadeia da Polimerase” (*PCR; Polymerase Chain Reaction*) constituem uma ferramenta básica para inúmeras metodologias de análise do DNA, consistindo fundamentalmente na amplificação de determinados segmentos de DNA. O processo é iniciado com a desnaturação da molécula de DNA de dupla hélice por aplicação de temperatura elevada. Após a redução da temperatura, dois oligonucleotídeos de cadeia simples, complementares às regiões flanqueadoras do segmento que se selecionou para amplificação e que funcionam como iniciadores (*primers*), ligam-se a essas regiões, dando-se início à síntese do DNA por ação de uma DNA polimerase termostável. Ciclos de desnaturação, de ligação e de extensão (alongamento) dos iniciadores pela ação da DNA polimerase, são repetidos várias vezes resultando na amplificação do segmento alvo de DNA (GASSER, 2006).

Os marcadores moleculares do tipo polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (*RAPD; Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma das utilizações mais diretas da PCR. A técnica utiliza um oligonucleotídeo com sequência arbitrária e temperatura de anelamento entre 30 e 40 °C, ou seja, com baixa estringência, para que a ligação do iniciador à fita molde de DNA ocorra em vários pontos ao longo da fita, contrariamente ao PCR específico. Isso permite a amplificação simultânea de um grande número de fragmentos de DNA aleatoriamente distribuídos no genoma. O produto de amplificação é sujeito a eletroforese para separação dos fragmentos e após coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata, sendo visualizado sob luz ultravioleta. Perfis de fragmentos diferentes indicam sequências diferentes nas moléculas originais de DNA, indicando polimorfismo e podem ser utilizados como marcadores em estudos de genética de população e filogenia (GASSER, 2006; OBORNÍK; KLÍ; ĎIŇKA, 2000; STEINDEL et al., 1993). Em diversos trabalhos de aplicação da técnica de RAPD foi obtido discriminação ao nível da espécie, mas pequenas diferenças nos perfis de diferentes isolados da mesma espécie, como também danos no DNA e mutações de uma determinada espécie,

indicam que é possível discriminar em nível intraespecífico (ATIENZAR et al., 2002; NEVES et al., 2005).

Lee et al. (2000) avaliaram por RAPD as similaridades genéticas entre diferentes isolados da espécie de fungo *Pleurotus ostreatus* após mutações induzidas por radiação gama. Também foram avaliadas as diferentes densidades do micélio, formação da frutificação, crescimento radial da colônia, e potencial enzimático. Todos os isolados apresentaram características morfológicas semelhantes ao controle, porém a diversidade genética variou de 64,4 % a 93,3 % em relação ao controle, ou seja, o isolado apresentou variações após radiação em relação aquele inicial.

### 1.2.3.3 Produção de biomassa

O cultivo de fungos com a finalidade de obtenção de componentes bioativos vem sendo desenvolvido desde a década de 70, e há um número elevado de compostos de interesse extraídos das frutificações, do micélio, e também presentes no resíduo do cultivo em substrato líquido (HOLIDAY, 2003; WASSER; WEIS, 1999).

Por outro lado, o cultivo tradicional para a obtenção das frutificações de *A. subrufescens* é um sistema complexo de produção, envolvendo etapas de pré-cultivo como a compostagem do substrato e a produção do inoculante. Na etapa de crescimento do fungo nesse substrato que não é axênico, ocorrem riscos de contaminações, além de requerer um longo período de cultivo (120 dias) e se desperdiçar o micélio no substrato que é descartado após a colheita das frutificações (BRUM, 2005; CHEN, 2003; OEI, 1996). Sendo assim, é importante o desenvolvimento de processos que reduzam e viabilizem o tempo de produção do fungo para a obtenção das  $\beta$ -glucanas.

Os processos biotecnológicos para aumento da escala produtiva (*scale-up*) são utilizados para cultivo de microrganismos, algas, cultura de células e de tecidos vegetais. Para a produção de biomassa de fungos pode ser utilizado o cultivo em substrato axênico sólido ou líquido, denominados respectivamente de fermentação no estado sólido (FES; *Solid State Fermentation*) e fermentação submersa (FSM; *Submerge Fermentation*). Esses processos têm aplicações industriais na produção de inoculante para o cultivo tradicional, ou na área de alimentos e farmacêutica para obtenção de agentes flavorizantes, polissacarídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). O termo fermentação, diferentemente de sua

definição bioquímica, é utilizado na área de engenharia em processos tanto aeróbio como anaeróbios (SCHMIDELL et al., 2001).

A FES ocorre naturalmente no meio ambiente em locais com baixa atividade de água sendo responsável pela reciclagem contínua de compostos orgânicos na natureza. Desde a antiguidade o processo de FES tem sido utilizado para a produção de alimentos fermentados pelos povos nativos que fabricam o queijo na Europa, *Koji*, molho de soja, *Miso* e *Tempeh* na Ásia, e fermentado de sorgo na África (GADEN et al., 1992).

Os microrganismos que estão envolvidos na FES sintetizam enzimas que degradam substâncias poliméricas tornando-as menores e de mais fácil digestão, além de propiciarem a agregação de enzimas, sabor e textura aos alimentos. Um exemplo é o *Koji*, um produto resultante da fermentação do arroz cozido pelo fungo *Aspergillus oryzae* que produz amilases e proteases nesse processo. O *Koji* misturado com sal é utilizado subsequentemente para inocular soja cozida para um segundo processo de fermentação na produção do *miso*, juntamente com leveduras *Saccharomyces rouxii* e *Candida versatilis*, e bactérias ácido láctica *Pediococcus pentosaceus* e *P. halophilus*, que produzem textura e aromas (GADEN et al., 1992).

A FES apresenta algumas vantagens em relação a FSm devido à baixa necessidade de água no processo e de energia para o aquecimento do suporte sólido utilizado, simulando as condições que ocorrem na natureza, além da possibilidade de fermentação de substratos insolúveis em água e do potencial para uso de culturas mistas para maior eficiência na utilização do substrato (GADEN et al., 1992; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). Porém, nesse sistema é mais difícil quantificar e separar a biomassa fúngica e o polissacarídeo específico de sua parede celular, sendo mais viável para obtenção de matéria-prima para a área de alimentos, pois não é necessária a separação dos produtos obtidos na fermentação para a formulação de nutracêuticos (HOLIDAY, 2003; WASSER; WEIS, 1999).

No entanto, a FSm é um processo que passou por importantes melhoramentos nas últimas décadas e que possibilita um maior controle do processo num menor período de tempo (5 a 7 dias), na eficiência na transferência de O<sub>2</sub>, remoção do CO<sub>2</sub> e em menor risco de contaminação. Isso confere vantagem ao processo na obtenção do micélio com maior pureza já que a biomassa é facilmente separada do meio de cultivo e as β-glucanas podem finalmente ser isoladas e utilizadas com finalidade farmacêutica. Adicionalmente, é possível recuperar os polissacarídeos secretados pelo fungo no meio de cultura



durante o seu desenvolvimento, aumentando seu rendimento (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; ITO et al., 1997; KUMAR et al., 2004; ROSSI et al., 2004; SHU; WEN; LIN, 2003;).

A escolha do processo depende de uma diversidade de fatores tal como os ecológicos, das características do microrganismo, a qualidade do produto final, as condições econômicas para implantar o processo e as regulamentações governamentais para o descarte do resíduo sólido ou líquido (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

Características ecológicas dos microrganismos selecionados devem ser consideradas na seleção do processo. Por exemplo, para a FES os microrganismos devem ter tolerância à baixa atividade de água, um elevado potencial para excretar enzimas hidrolíticas, e uma morfologia específica. Os fungos filamentosos possuem essas características morfológicas dispendo de elevada capacidade de colonização e permeiam o substrato sólido com facilidade, porém esses fungos são aeróbicos e produzem calor proporcional ao consumo de oxigênio, sendo difícil, portanto, nesses substratos, a remoção do calor, além da limitada difusão do oxigênio nas partículas do substrato (RAHARDJO, 2005).

A atividade biológica dos produtos obtidos nos diferentes processos é um requisito importante para essa escolha, já que diferentes substratos podem modificar a estrutura química dos polissacarídeos do micélio, analisados quanto a sua estrutura de cadeia principal, grupo de cadeias laterais e grau de ramificações (HOLIDAY, 2003; SILVA et al., 2006; WASSER; WEIS, 1999).

A pureza dos polissacarídeos é um fator importante para se obter a atividade biológica desejada, sem os efeitos dos outros constituintes do fungo, e até mesmo do substrato. A FSm possibilita a obtenção da biomassa mais facilmente separável para a extração dos polissacarídeos. Por exemplo, quando a levedura *Saccharomyces* é consumida integralmente na alimentação pode ocasionar problemas como alergias e inflamações ocasionadas por substâncias da parede celular que tornam os polissacarídeos insolúveis. Dessa forma, é necessária a solubilização das  $\beta$ -glucanas e purificação para a obtenção da atividade no sistema imunológico com segurança (HANTER; GAULT; BERNER, 2002; WILLIAMS et al., 1991).

A partir do cultivo de *L. edodes*, cultivado em grãos e induzido à frutificação, foi obtido um produto nutracêutico, na forma de pó, contendo polissacarídeos bioativos do micélio e das frutificações, denominados LEM e Lentinan<sup>®</sup>, respectivamente, e também outras

substâncias bioativas como as enzimas e o ergosterol (HOLIDAY, 2003; WASSER; WEIS, 1999).

Foi demonstrado por Mol e Wessels (1990) que as  $\beta$ -glucanas da parede celular de *A. bisporus*, na fase de micélio cultivado em substrato sólido compostado e nas frutificações, foram similares em termos de estrutura química (1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana, com pouca variação quantitativa. No caso de *A. subrufescens* foram encontradas diferenças estruturais nos polissacarídeos da frutificação e do micélio obtido em meio líquido (MIZUNO et al. 1990a; MIZUNO et al.; 1999), porém não identificamos pesquisas comparando as estruturas químicas e a bioatividade dos polissacarídeos do micélio produzido em substrato sólido. A partir do cultivo do fungo em grãos, podem ser elaborados nutracêuticos contendo a mistura dos grãos colonizados pelo micélio pulverizados e encapsulados. Grãos, como a aveia, o centeio e o trigo, podem ser utilizados no cultivo, já que também possuem  $\beta$ -glucanas benéficas (DEMIRBAS, 2005; HOLTEKJØLEN et al., 2006; JOHANSSON et al., 2004; LEUCCI et al., 2008). Entretanto, as  $\beta$ -glucanas fúngicas devido a suas ramificações têm atividade imunológica mais significativa do que aquelas oriundas das plantas (BROWN; GORDON, 2001).

Em substratos sólidos é difícil separar a biomassa fúngica do substrato, e uma forma de avaliar a produção de biomassa é por meio de métodos indiretos que avaliam constituintes específicos do fungo, como o ergosterol, glucosamina, proteína, conteúdo de DNA, como também evolução de CO<sub>2</sub>, estabelecendo medidas de conversão entre a biomassa e esse indicador (OOIJKAAS; TRAMPER; BUITELAAR, 1998; SINGHANIA et al., 2009).

Na FSm de microrganismos os principais fatores que afetam o processo são a disponibilidade de carbono, tais como açúcares e outros carboidratos, fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, íons inorgânicos como fosfato, magnésio, ferro, cobre, manganês e zinco que são necessários para o crescimento. Além desses, fatores físicos como temperatura, pH e o oxigênio em quantidade suficiente para o desenvolvimento da biomassa (CRUEGER; CRUEGER, 1990).

Para a obtenção de biomassa miceliana e exopolissacarídeos em cultivo submerso de *A. subrufescens*, Hamedi, Vahid e Ghanati (2007) experimentaram oito diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Os açúcares e carboidratos utilizados foram galactose, lactose, frutose, amido, sacarose, maltose, glicose e xilose. Os compostos nitrogenados inorgânicos e orgânicos utilizados foram oxalato de amônia, nitrato de

potássio, sulfato de amônia, cloreto de amônia, uréia, extrato de levedura, polipeptona e peptona. Dentre esses nutrientes, o amido, seguido da xilose e os nitrogênios orgânicos foram as suplementações que produziram a maior biomassa. O rendimento da produção do exopolissacarídeo também foi superior para esses nutrientes, exceto para a xilose. Segundo Lin e Yang (2006), o nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi a fonte inorgânica de nitrogênio para o cultivo de *A. subrufescens* que maior biomassa propiciou, também sendo necessária a suplementação com  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para aumentar o rendimento do micélio.

Hamedi, Vahid e Ghanati (2007) também avaliaram pH inicial do substrato, temperatura de incubação, concentração do amido e do extrato de levedura e estimaram que o rendimento máximo de biomassa de  $9,08 \text{ g.L}^{-1}$  pode ser obtido com  $5,64$ ,  $24,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $11,55 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,63 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Para a produção máxima de exopolissacarídeo ( $1,27 \text{ g.L}^{-1}$ ) os valores estimados foram  $6,87$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, para os mesmos fatores.

Em outro cultivo submerso de *A. subrufescens* em frascos foram utilizados glicose, extrato de levedura e peptona. O valor previsto para o rendimento máximo da produção de biomassa foi de  $10,86 \text{ g.L}^{-1}$  utilizando concentrações de glicose, extrato de levedura e peptona de  $26,30 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $6,84 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6,62 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Quando esse meio foi utilizado em um biorreator de tanque agitado de 30 L, para aumento de escala, o rendimento da biomassa subiu para  $13,91 \pm 0,68 \text{ g.L}^{-1}$ , após 7 dias de fermentação (LIU; WANG, 2007). A bioconversão da glicose em biomassa fúngica aumentou de 41,3 % no cultivo em frascos para 52,9 % em biorreator.

O meio utilizado para o cultivo de microrganismos deve conter de forma equilibrada todos os elementos e nutrientes para a síntese das substâncias celulares e para a produção de metabólitos. Os meios de cultura quimicamente definidos são utilizados em pesquisas de laboratório, porém em escala industrial, por razões econômicas, são utilizados substratos complexos de composição variável, subprodutos de outras indústrias. Esses substratos devem ser adaptados para o cultivo por meio de processos de extração, suplementação e balanceamento da composição do meio visando aumentar o rendimento da produção do microrganismo selecionado, utilizando experimentos de triagem previamente ao cultivo em biorreatores (CRUEGER; CRUEGER, 1990). No cultivo de microrganismos para produção de seus metabólitos podem ser utilizados hidrolisados de resíduos agroindustriais tais como palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2004b), bagaço de cana

(PANDEY et al., 2000), resíduo de cervejaria (MUSSATO; ROBERTO, 2006) e farelo de trigo (DOBREV et al., 2007), na intenção de aproveitar e minimizar a disposição desses resíduos em aterros, contribuindo para a preservação do meio ambiente.

O resíduo de cervejaria ou resíduo de cevada é um subproduto gerado no processo de fermentação, insolúvel em água e que representa 85 % do total de resíduos do processo, ou seja, aproximadamente 20 Kg.hL<sup>-1</sup> de cerveja produzida (VALVERDE, 1994). Considerando essa estimativa calcula-se uma disponibilidade de 53.480 ton. por ano desse subproduto no Brasil, sendo que o Sul do país contribui consideravelmente para esse montante devido às inúmeras indústrias de cerveja e *chopp* que produzem aproximadamente 17 milhões hL por ano (SINDICERV, 2008).

A estimativa de produção de trigo no Brasil para a safra 2008/2009 chegou a 5,8 milhões de toneladas, sendo o Sul o maior produtor nacional com cerca de 2 milhões ha de área plantada, com produção de 3 milhões de toneladas de grãos no estado do Paraná, e 2 milhões de toneladas no Rio Grande do Sul (CONAB, 2008). Com o processamento do trigo para obtenção da farinha é gerado o farelo de trigo, um subproduto que compõe 15 a 20 % do peso do grão. O farelo de trigo faz parte da camada mais externa do grão, ou seja, pericarpo, testa e aleuroma, e contém 38 % de glucoronoarabinosilanas, 16 % de celulose, 6,6 % de lignina, 25 % de proteínas e ainda pequenas quantidades de (1→3)-(1→4)-β-glucanas e arabinosilanas (DOBREV et al., 2007).

O resíduo da cervejaria, assim como o farelo de trigo, é uma fonte rica de carbono, pois a sua composição contém em média 17 % de celulose, 28 % de polissacarídeos não-celulósicos, principalmente arabinosilanas, e 28 % de lignina (MUSSATO; ROBERTO, 2006). Mussato e Roberto (2005) utilizaram o hidrolisado desse resíduo com sucesso para o cultivo de *Candida guilliermondii* e produção de xilitol.

Para hidrolisar esses resíduos podem ser utilizadas soluções neutra, alcalina ou ácida. A utilização de ácidos minerais diluídos em água, na proporção de 2 a 5 % de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gera a ionização da água, diminuindo assim o pH. Essa solução aquosa ionizada constitui um meio da hidrólise ocorrer mais facilmente com os resíduos lignocelulósicos. Também o aquecimento da solução conduz a uma maior agitação molecular acelerando as reações, sendo utilizadas temperaturas entre 120 a 200 °C (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

A hidrólise ácida de resíduos pode liberar xilose, arabinose e glicose, mas também compostos tóxicos para os microrganismos como o hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético e composto fenólicos, resultantes da degradação de hexoses, pentoses, grupos acetil da hemicelulose e lignina, respectivamente (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Para contornar os problemas de toxicidade dos hidrolisados, vários procedimentos têm sido utilizados, incluindo a precipitação de impurezas com a variação de pH, adsorção em carvão ativo, resinas de troca iônica, entre outros (CHANDEL et al., 2007; MUSSATTO; ROBERTO, 2004a; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Dentre esses procedimentos, destaca-se o uso de carvão ativo, que vem sendo amplamente utilizado em processos de detoxificação para produção de xilitol (MUSSATTO; ROBERTO, 2004b, 2005).

Para evitar a corrosão ácida dos equipamentos de hidrólise e liberação de metais tais como ferro, níquel, cromo e cobre no hidrolisado devem ser utilizados utensílios de vidro ou aço inoxidável. Esses metais também são adsorvidos pelo carvão ativo (MUSSATTO; ROBERTO, 2004a, 2004b).

#### 1.2.3.4 Produção em biorreatores

Os cultivos em biorreatores são utilizados nos processos biotecnológicos para o aumento da escala produtiva de microrganismos, algas, antibióticos, enzimas, hormônios, anticorpos, cultura de células e tecidos vegetais (CAMACHO et al., 2001; MARTIN; WENDT; HEBERER, 2004; MARTIN; VERMETTE, 2005; ZHANG; CHISTI; MOO-YOUNG, 1995).

Vários tipos de biorreatores têm sido utilizados para a FES, sendo a maioria baseada na agitação ou aeração do sistema. Os biorreatores, classificados em função dessas características, são denominados de bandejas, tambor rotatório e tambor agitado, ambos com aeração não-forçada; ou ainda os biorreatores de leito fixo, leito fluidizado, leito agitado e tambor de balanço, baseados na aeração forçada (SINGHANIA et al., 2009). Uma limitação do sistema de FES é a dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo fúngico, devido essencialmente a baixa condutividade térmica do estado sólido. No entanto, a passagem de ar forçado entre as partículas do substrato é importante para a remoção desse calor e controle da temperatura de incubação (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Para a FSm existem diferentes tipos de biorreatores, sendo os fermentadores aerados os mais utilizados na indústria (CRUEGER; CRUEGER, 1990). Cerca de 90 % são de tanque agitado tradicional, o restante é representado pelos biorreatores pneumáticos, sem agitação mecânica como *airlift* e colunas de bolhas (CHISTI, 1989). Os biorreatores de tanque agitado apresentam diversas desvantagens para o cultivo de microrganismos, principalmente devido ao alto grau de agitação requerido para a transferência de massa e oxigênio, causando danos às células pelo alto cisalhamento das pás do agitador (NIENOW, 1998).

O biorreator *airlift* evita esse problema, já que o sistema de circulação do fluido no biorreator é gerado pela diferença de densidade do líquido dividido em duas zonas distintas, onde somente uma recebe a injeção de ar. A parte que contém a mistura gás-líquido em fluxo ascendente é denominada de *riser*, e a outra que contém o líquido em fluxo descendente é o *downcomer*. O controle dessa circulação é dependente da diferença de gás *holdup* que se refere à fração de gás na dispersão gás-líquido, pelo aumento ou diminuição da subida das bolhas (CHISTI, 1989; CHISTI; WENGE; MOO-YOUNG, 1995).

A circulação do fluido no biorreator *airlift* afeta a turbulência, a transferência de massa gás-líquido e de calor, e também as forças de cisalhamento que os microrganismos estão expostos, e às quais possuem limites de tolerância (CHISTI; MOO-YOUNG, 1988). As pequenas bolhas de ar no biorreator aumentam a área superficial de transferência de oxigênio e o tubo de corrente de ar uniformiza as forças de cisalhamento por todo biorreator, fatores que incrementam a produção de biomassa (KUNAMNENI et al., 2007).

O oxigênio é o menos solúvel de todos os nutrientes num cultivo aeróbio, e sua concentração em meios de cultivo, em equilíbrio com a pressão atmosférica, é inferior a  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . O consumo do oxigênio em cultivos de microrganismos unicelulares encontra-se na faixa entre  $0,18$  a  $2,70 \text{ mg.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , e sua concentração crítica no meio de cultivo varia entre  $0,26$  e  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  (CRUEGER; CRUEGER, 1990).

Por outro lado, a formação de *pellets* pode ser uma forma de evitar as variações na densidade dos meios durante o cultivo já que muitos microrganismos secretam exopolissacarídeos que aumentam a viscosidade, e complicando a transferência de oxigênio para o meio de cultivo (PROSSER; TOUGH, 1991; ROSSI; SOUZA; OLIVEIRA, 2002).

A morfologia de crescimento é afetada pelo grau de cisalhamento e pode determinar se um fungo crescerá na forma de micélio livre ou na

forma de *pellets*, como também remover fragmentos de hifas das superfícies dos *pellets* e, também, provocar sua ruptura. Porém, o crescimento na forma de *pellets* pode limitar a transferência de oxigênio para o interior dos aglomerados de micélio (ROSSI; SOUZA; OLIVEIRA, 2002).

Os biorreatores *airlift* são os mais recomendados para cultivo de fungos filamentosos, como é o caso de *A. subrufescens*, por não causarem danos às hifas. Rossi et al. (2004) cultivaram esse fungo em um biorreator *airlift* desenvolvido no Depto. de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, e obtiveram micélio na forma de *pellets* esféricos com tamanhos menores do que 2 mm.

#### 1.2.3.5 Viabilidade econômica da produção

A estimativa dos custos para se produzir um produto biotecnológico é um requisito importante na análise da viabilidade do processo, envolvendo os custos da operação direta (produção), custos fixos e despesas gerais da indústria. A matéria-prima diretamente consumida no processo representa entre 30 a 80 % do custo de produção, os suprimentos representam cerca de 15 % do custo, ou seja, materiais que não são diretamente utilizados na produção, mas que são necessários para a operação do processo. Os custos com os salários e supervisão variam entre 10 a 40 %. Outros custos estão relacionados à produção de vapor para a esterilização, eletricidade, água e tratamento do resíduo (KALK; LANGLYKKE, 1986)

Custos fixos e despesas gerais da indústria são investimentos relacionados à depreciação do imóvel, impostos, seguros, aluguéis e salários. Todos os fundos requeridos para construções e obtenção de equipamentos são investimentos de capital fixo, e dependente do processo realizado, pois podem ser necessários fermentadores, centrífugas, homogenizadores, ultrafiltros, entre outros equipamentos (KALK; LANGLYKKE, 1986)

O preço do produto vai depender diretamente do custo da matéria-prima principal, que representam até 80 % do preço final do produto. Dessa forma é possível calcular e comparar diferentes processos de fermentação sólido ou líquido, em relação ao seu rendimento de biomassa fúngica (CASTILHO et al., 2000).

### 1.2.4 Planejamento estatístico de experimentos

O planejamento experimental é uma técnica que vem sendo utilizada em grande escala para melhoramento de processos e produtos, minimizando custos e tempo, e visando maximizar rendimento e produtividade (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

É comum na pesquisa e principalmente na indústria, aparecerem problemas em que é preciso investigar simultaneamente várias propriedades, ou fatores. Por meio do planejamento de experimentos, baseado em princípios estatísticos, é possível determinar quais desses fatores exercem maior influência no desempenho de um processo. As variáveis que influenciam no sistema são denominadas de *fatores*, o resultado analisado é chamado de *resposta*, e a função que descreve essa influência é chamada de *superfície de resposta* (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Na pesquisa geralmente é utilizado o planejamento com um único fator que fixa um fator com variação do outro até ser encontrada a melhor resposta, porém muitas vezes existe interação entre esses fatores independentes e o planejamento fatorial permite medir os efeitos (ou influências) de um ou mais fatores sobre a resposta de um processo, sujeita a todas as combinações entre eles (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996; CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Um planejamento fatorial completo requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis de fatores envolvidos. Os níveis de um fator são os diferentes modos de presença de um fator no estudo considerado. Cada combinação desses níveis de fatores é um ensaio experimental.

O delineamento fatorial completo  $2^K$  ocorre quando existem K fatores, todos em dois níveis. São do tipo inteiramente casualizados, sempre que cada um dos tratamentos de  $2^K$  for atribuído aleatoriamente às unidades experimentais, sem a formação de blocos. Delineamentos desse tipo são muito utilizados em condições de laboratório onde as fontes externas de variação são mais controladas. No caso de considerar quatro fatores,  $2^4 = 16$  significa que 16 experimentos devem ser realizados. Esse procedimento fornece o menor número de corridas com os quais os K fatores podem ser estudados em um planejamento fatorial completo (CALADO; MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Muitas vezes é necessário mais de um delineamento experimental para atingir a resposta desejada. Quando o número de fatores for



superior a quatro, é interessante uma estratégia sequencial de experimentos. Também pode ser conveniente iniciar o estudo com um fatorial fracionário, analisar os efeitos mais importantes sobre a resposta desejada e seguir, sequencialmente, com outros planejamentos (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Esse tipo de experimento permite estudar um número elevado de fatores com poucos ensaios, com um dado limite. Para certo número de ensaios, existe um número máximo de fatores que pode ser investigado, e quando esse limite é alcançado, o planejamento é denominado de *saturado* (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

A inclusão de experimentos no ponto central em um planejamento fatorial de dois níveis sem repetições pode fornecer informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos valores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo, podendo ser usado para construir uma estimativa do erro. Porém, é ideal repetirem-se os ensaios nos pontos fatoriais e realizar alguns ensaios no ponto central, ou seja, nos valores intermediários estipulados no espaço experimental, uma vez que eles não afetam as estimativas usuais dos efeitos e possibilitam estimar todos os parâmetros do modelo quadrático, chamado de modelo de superfície de resposta de segunda ordem (CALADO; MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Um delineamento composto central rotacional (DCCR), ou fatorial em estrela, é uma ampliação do experimento já existente acrescentando um planejamento idêntico, porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida, isto é, novos pontos são adicionados à uma distância  $\pm \alpha = (2^k)^{1/4}$  do ponto central, conhecido como pontos axiais, tornando o planejamento ortogonal. Esse planejamento deve ser utilizado quando se quiser verificar a curvatura de um plano, ou seja, verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996; CALADO; MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

No DCCR pode ser observada a relação funcional entre os fatores para a resposta desejada para o modelo quadrático. O modelo pode ser obtido de duas formas, com uma equação que corresponde ao modelo completo, onde todos os fatores e suas interações são considerados, independentes do valor de  $p$ , ou seja, são considerados os fatores que possuem ou não significância, e outra equação que considera apenas os fatores e as interações que apresentam significância ( $p < 0,05$ ). Os fatores marcados com L, correspondentes ao termo linear, e os marcados com Q correspondente ao termo quadrático. A diferença entre o modelo

completo e o modelo simplificado baseia-se na precisão dos valores preditos, ou seja, quando utilizamos o modelo completo o valor estimado possui maior proximidade ao valor observado. Já o modelo simplificado fornece um valor com maior desvio do valor observado, porém compreendido no intervalo de confiança de 95 % (CALADO; MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O modelo polinomial pode ser validado pela análise de variância para a resposta desejada, observando o  $F_{\text{calculado}}$  que deve ser maior que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$ , indicando que a regressão é significativa. Assim, se  $F_{\text{calc}}$  apresentar valor superior a quatro vezes o  $F_{\text{tab}}$ , o modelo é bom para predição. Caso o valor de  $F_{\text{calc}}$  não seja maior que o valor de  $F_{\text{tab}}$ , a falta de ajuste do modelo quadrático é significativa. Porém, caso esse valor seja menor do que o  $F_{\text{calc}}$  do modelo linear significa que o modelo quadrático explica melhor os resultados do que o modelo linear. Deve também ser observada a porcentagem de variação explicada, máxima variação explicável e o coeficiente múltiplo de determinação ( $R^2$ ) de ambos os modelos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Fan et al. (2007) delinearão experimentos fatoriais para verificar os efeitos nutricionais e físico-químicos na produção de exopolissacarídeos de *A. subrufescens*. Inicialmente, selecionaram as melhores fontes de carbono (sacarose e maltose) e nitrogênio (extrato de levedura). Após essa seleção, foi realizado um experimento fracionário analisando diferentes concentrações de glicose (10 e 30 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3 e 6 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,6 e 1,4 g.L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub> (0,3 e 0,7 g.L<sup>-1</sup>). Não houve diferença na produção de exopolissacarídeos de nenhum dos diferentes fatores testados, sendo utilizados os menores valores para o cultivo em biorreator. Foi delineado um DCCR e um modelo de superfície de resposta para os valores de temperatura de 25,5; 27; 30; 33 e 34,4 °C e pHs 4,58; 5; 6; 7 e 7,41. Verificou-se que os fatores influenciaram negativamente na produção de exopolissacarídeo, isto é, quanto maiores foram os valores de temperatura e pH, menores foram os rendimentos na produção.

Para a produção de polissacarídeos e ergosterol de *A. subrufescens* foi realizada uma otimização de fatores físico-químicos em biorreator agitado utilizando-se o delineamento saturado Plackett–Burman para a seleção daqueles fatores importantes na produção de biomassa e de ergosterol. Foram avaliados a temperatura, o pH inicial, a tensão de oxigênio dissolvido, a razão de aeração e a pressão no tanque. O método de gradiente ascendente foi utilizado para identificar a região do ponto ótimo para os fatores importantes, ou seja, aqueles que influíram significativamente no experimento anterior: temperatura de

incubação, velocidade de agitação e pH inicial, encontrando-se valores de 20 °C, 300 rpm e 5,0 respectivamente. O delineamento Box-Behnken conduziu ao maior rendimento de polissacarídeo e ergosterol com a velocidade de agitação de 310 rpm, pH 4,9 e temperatura de 20 °C, valores 57 % e 43 % maiores, respectivamente, comparados ao rendimento do experimento não-otimizado (GAO; GU, 2007).



**CAPÍTULO II**  
**PRESERVAÇÃO *IN VITRO* DE**  
*Agaricus subrufescens*



## 2 PRESERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Agaricus subrufescens*

### 2.1 INTRODUÇÃO

Fungos importantes biotecnologicamente são rotineiramente mantidos em coleções de culturas para a preservação do germoplasma viável, para a conservação de suas funções ecológicas e genéticas, e de suas substâncias biologicamente ativas. A preservação desses isolados é necessária para diversas aplicações na área de pesquisa e industrial (CAMEOTRA, 2007).

Óleo mineral e água destilada são utilizados para preservação por períodos relativamente curtos, dependendo da espécie (CROAN; BURDSALL JR.; RENTMEESTER, 1999; RICHTER; BRUHN, 1989). Liofilização e criopreservação em nitrogênio líquido, que interrompem o crescimento e comprometem alguns processos metabólicos, representam técnicas de preservação de longo prazo (CROAN; BURDSALL JR.; RENTMEESTER, 1999). O desafio de manter as culturas de *A. subrufescens* em laboratório resulta da diminuição da viabilidade da cultura e frequentes mudanças nos hábitos de crescimento, principalmente depois de muitas transferências. Apesar de diversos autores publicarem técnicas para a preservação *in vitro* de micélio fúngico (ANTHEUNISSE, 1973; CRESPO; ABARCA; CABAÑES, 2000; CROAN; BURDSALL JR.; RENTMEESTER, 1999), não foi encontrada nenhuma publicação referente à preservação de *A. subrufescens* em curto ou longo prazos.

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que podem permanecer no meio de cultura, como é o caso da agaritina produzida por *Agaricus* spp. O micélio é uma fase do ciclo de vida do fungo responsável pela síntese desse metabólito (ANDERSSON; GRY, 2004). Agaritina tem atividade mutagênica (KONDO et al., 2006) e pode ser prejudicial a espécie. Carvão ativo é muito utilizado para a remoção de compostos tóxicos dos hidrolisados de resíduos lignocelulolíticos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004a), e tem sido utilizado na cultura de tecidos de plantas para melhorar o crescimento celular *in vitro* (TENG, 1997). Portanto, o carvão ativo pode fornecer condições adequadas quando integrado ao meio de cultura para a preservação e recuperação de fungos.

Durante um determinado período de preservação é importante acompanhar a viabilidade e as características morfológicas do micélio em meio de cultura sólido (CLARK; ANDERSON, 2004; MARÍN et al., 2008). Também é crucial avaliar a estabilidade genética do micélio

preservado. Técnicas de PCR e protocolos de análise de DNA, como os marcadores de RAPD tem sido importantes na avaliação da variabilidade intraespecífica de microrganismos (ATIENZAR et al., 2002; NEVES et al., 2005), e para a detecção de danos e mutações no DNA (LEE et al., 2000).

Para assegurar a manutenção das características do fungo *A. subrufescens* e prover inoculantes para os experimentos a serem realizados neste trabalho foi definido inicialmente uma série de experimentos de preservação do fungo durante um período de 12 meses, com o monitoramento periódico da sua viabilidade, velocidade de crescimento radial e características genéticas.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Inóculo de cultivo

O fungo da espécie *A. subrufescens* utilizado neste experimento está depositado na coleção de fungos do Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob código UFSC 51. Um exemplar da espécie está depositado no herbarium FLOR, sob código FLOR 11.797.

O fungo foi inoculado em placas de petri com meio de cultura sólido batata dextrose ágar (BDA, Sigma), pH 6,0, e incubado durante 12 dias a 26 °C. Essa cultura foi utilizada nos diferentes experimentos de preservação.

### 2.2.2 Métodos de preservação

Os métodos de preservação utilizados foram os seguintes: (A) tubos de ensaios contendo meio de cultura BDA com adição de carvão ativo, (B) BDA com adição de óleo mineral após a colonização fúngica, ou (C) discos da cultura em água Mili Q, e armazenados sob refrigeração a 8 °C. Os experimentos foram acompanhados durante 12 meses, com coletas mensais, sendo necessárias 12 amostras destrutivas em duplicatas, totalizando 24 amostras de cada método de preservação.

Para a preservação em carvão ativo foram utilizados tubos inclinados contendo 10 mL de meio de cultura BDA com adição de 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativo (Sigma Chemical Co., EUA), esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 min. Esses tubos foram inoculados com



discos de 8 mm da cultura-mãe e incubados a 26 °C durante 7 dias. Após o crescimento armazenaram-se os tubos de cultivo a 8 °C.

Para preservação em óleo mineral foram inoculados discos de 8 mm da cultura-mãe em tubos inclinados contendo 10 mL de meio de cultura BDA esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 min., e incubados a 26 °C durante 7 dias. Após o crescimento do fungo nos tubos, foram adicionados 5 mL de óleo mineral (Multilab, Brasil) esterilizado e armazenados a 8 °C.

Para a preservação em água foram cortados discos de 8 mm após a colonização e colocados 4 em cada tubo contendo 15 mL de água Mili Q, também esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 min. Os tubos foram armazenados a 8 °C.

Outro método de preservação utilizado foi a liofilização. Após o crescimento do fungo em balões volumétricos de 25 mL contendo 10 mL de meio líquido Melin-Norkrans Modificado (MNM) (MARX, 1969), sob incubação a 26 °C durante 7 dias, foram adicionados 0,5 mL de trealose (10 %) e 0,5 mL de lactose (10 %). O fungo foi congelado a -20 °C e liofilizado, com filtro de algodão na boca do balão, até total secagem (CHANG; ELANDER, 1986; CROAN; BURDSALL JR.; RENTMEESTER, 1999).

### 2.2.3 Viabilidade do micélio

Para averiguar a viabilidade do micélio de *A. subrufescens* nos diferentes métodos de preservação foram retiradas amostras mensais durante um período de 12 meses. De cada amostra foram retiradas, com bisturi esterilizado, quatro frações da cultura fúngica ou quatro discos, no caso da preservação em água, e colocados para crescimento a 26 °C em placas de petri contendo meio de cultura BDA, observando-se a viabilidade do fungo após o crescimento do micélio ao final de 2 a 5 dias. As amostras foram coletadas completamente casualizadas, em duplicatas, e analisadas pela média das porcentagens de amostras viáveis em 12 meses. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Diferença Mínima Significativa (DMS) para o nível de significância  $\alpha < 0,1$ .

Para recuperação do fungo liofilizado também foi testada a adição de 10 mL de meio líquido MNM diretamente no balão contendo o liofilizado, e incubado durante 12 dias a 26 °C.

## 2.2.4 Velocidade de crescimento radial do micélio

Discos ou frações viáveis de amostras iniciais do fungo (antes do armazenamento), no 4º, 8º e 12º meses foram transferidos após o crescimento inicial para placas de petri contendo meio de cultura BDA, e/ou BDA com adição de carvão ativo ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ), e incubados a  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ . O crescimento radial do fungo foi mensurado a cada dois dias, durante 16 dias, utilizando paquímetro. As análises foram realizadas em triplicata.

No 12º mês de preservação, na primeira repicagem após o crescimento das amostras foi avaliado o crescimento radial do fungo, a partir de discos de 8 mm, em placas de petri contendo meio de cultura BDA com adição de carvão ativo. As análises foram realizadas em triplicata.

## 2.2.5 Análise da estabilidade genética do fungo

O micélio foi coletado de amostras iniciais de cultura fúngica (antes do armazenamento), e após 4, 8 ou 12 meses de armazenamento nos diferentes métodos de preservação. Foram inoculados em placas de petri contendo meios de cultura BDA e BDA com adição de carvão ativo. O micélio aéreo foi retirado superficialmente, com um bisturi esterilizado, e armazenado em tubos de 1,5 mL a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O DNA de todas as amostras foi extraído e isolado segundo método utilizado por Lee e Taylor (1990). Inicialmente, a amostra foi submetida a cinco repetições de congelamento em nitrogênio líquido e subsequente aquecimento. Após adicionar 50  $\mu\text{L}$  de tampão lise (Tris-HCl 50 mM (pH 7,2), EDTA 50 mM, 3% de SDS, e 1 % de 2-mercaptoetanol) a mesma foi macerada com pistilo. Ao lisado foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de proteinase-K ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), 450  $\mu\text{L}$  de tampão lise e homogeneizado. As amostras foram submetidas à temperatura de  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período de 12 horas.

Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de uma mistura fenol: clorofórmio saturado foi adicionada ao produto digerido e homogeneizado cuidadosamente, seguido de centrifugação a 11000 g durante 15 min. a temperatura ambiente. Outra alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da fase aquosa foi transferida para novo tubo e 15  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (NaOAc) 3M e 216  $\mu\text{L}$  de isopropanol foi adicionado para precipitar o DNA. Após precipitação, a amostra foi centrifugada a 11000 g durante 15 min. em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foi

adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol (70 %) gelado e novamente centrifugado, descartando-se o sobrenadante.

Após secagem, o DNA precipitado foi ressuspenso em 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e tratado com 1  $\mu\text{L}$  de RNase (20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a 37 °C durante 1 h. A qualidade e concentração do DNA foram analisados em gel de agarose 1 % e espectrofotometria, respectivamente. A concentração das amostras foi ajustada para 2  $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e as mesmas foram estocadas a -20 °C.

Para a análise de marcadores moleculares do tipo RAPD foram utilizados iniciadores de sequências aleatórias (*primers*) apresentados na Tabela 2.1. Os oligonucleotídeos foram modelados segundo Lee et al. (2000) e Neves et al. (2005), e produzidos pela INVITROGEN (Brasil).

Tabela 2.1 – Iniciadores utilizados para a amplificação de DNA de *Agaricus subrufescens* por RAPDs.

Iniciador	Sequência de bases
AB1	5'-ACGGATCCTG-3'
AB2	5'-GGGAATTCGG-3'
AB3	5'-CCAAGCTTCC-3'
AB4	5'-GGCTGCAGAA-3'
AB5	5'-GGCACTGAGG-3'
AB6	5'-GAGCCCTCCA-3'
AB7	5'-CTGAGACGGA-3'
AB8	5'-TCGGACGTGA-3'
AB9	5'-AGACGTCCAC-3'
AB10	5'-GGAAGTCGCC-3'

O DNA extraído foi submetido à reação de RAPD que ocorreu na presença de 1  $\mu\text{L}$  de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,8 U da enzima Taq DNA polimerase (Labtrade, São Paulo), 1 pmol do primer, 0,2 mM de dNTP's (Invitrogen), e 2 ng de DNA para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf<sup>®</sup>, EUA), inicialmente com temperaturas de desnaturação de 94 °C durante 5 min, seguida de dois ciclos de nova desnaturação a 94 °C durante 30 s, ligação a 30 °C durante 2 min e extensão a 72 °C durante 1 min. Ao término desses ciclos as amostras foram submetidas a 33 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, ligação a 40 °C durante 2 min. e extensão a 72 °C durante 1 min.

Como controle positivo foi utilizado DNA de frutificação de *A. subrufescens*. A água utilizada na reação foi o controle negativo. O

padrão de peso molecular dos fragmentos de DNA utilizado foi o 100 pb ladder (100-1000 pb, Fermentas).

Os produtos amplificados de DNA foram ressuspensos utilizando 3 µL das amostras em igual volume de tampão 2x (0,08 % de azul de bromofenol, 0,08 % de xileno cianol e 10 % de ficol) e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (6 %) em sistema de minigel (BIO-RAD) a 100 V durante 75 min. Em seguida, os géis foram fixados em etanol 10 % e ácido acético 0,5 % durante 20 min sob agitação branda, corados com nitrato de prata 0,2 % durante 10 min sob agitação, lavados durante 2 min em água Mili Q e revelados com NaOH 0,75 M e formaldeído 0,1 M durante 10 min sob agitação. A visualização das amostras foi realizada com o auxílio de um transiluminador MacroVue UV 20<sup>®</sup> (Hoefer Pharmacia Biotech, EUA) e os resultados foram fotodigitalizados.

As análises das amostras por RAPD foram realizadas em série para reduzir problemas de repetibilidade da técnica. Para a análise dos dados, a cada fragmento de DNA amplificado com uma mobilidade eletroforética diferente foi designada um número de posição e uma marca de 1 ou 0 baseado na presença ou ausência de fragmentos. As amostras foram analisadas pelo percentual de fragmentos compartilhados a cada duas amostras para cálculo dos coeficientes de similaridade Dice. O coeficiente de similaridade  $S = 2a / 2a + b + c$  onde, a = número de fragmentos compartilhados entre as amostras 1 e 2, b = número de fragmentos exclusivos da amostra 1 e c = número dos fragmentos exclusivos da amostra 2. Esses dados foram colocados em uma matriz de similaridade e analisados pelo método *Unweighted Pair Group Method Analysis* (UPGMA) utilizando o programa FREETREE, com consequente elaboração do dendograma pelo programa TREEVIEW versão 1.6.6. A linha de fenon representa a média das similaridades entre os pares e indica o ponto de referência para divisão dos organismos em grupos separados.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Viabilidade de *Agaricus subrufescens*

A Tabela 2.2 apresenta a média dos discos viáveis (%) referentes aos diferentes tratamentos ao longo de 12 meses para a preservação em BDA com carvão ativo (A), BDA com óleo mineral (B) e até o 10<sup>o</sup> mês para o tratamento de discos em água (C), analisados a cada dois meses.

Tabela 2.2 - Média do número dos discos viáveis (%) submetidos aos diferentes métodos de preservação de *Agaricus subrufescens* em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A), BDA com óleo mineral (B) e água (C).

Método de Preservação	Média do número de discos viáveis (%)					
	Mês 2	Mês 4	Mês 6	Mês 8	Mês 10	Mês 12
A	75,00	75,00	68,75	75,00	93,75	75,00
B	87,50	87,50	75,00	62,50	62,50	50,00
C	93,75	100,00	100,00	75,00	50,00	0

Os métodos de preservação A e B permitiram que as frações se mantivessem viáveis por períodos mais longos, ou seja, até 12 meses, sendo que a viabilidade no início e no final do período estudado se manteve em 75 % para o método de preservação A, enquanto o método B conduziu a redução de viabilidade de 87,5 para 50 %. O método C se diferenciou do restante por apresentar viabilidade elevada até o sexto mês, após o qual se observou uma redução até 50 % no mês 10, e finalmente perda total de viabilidade no 12º mês.

O tratamento A, com carvão ativo, demonstrou ser a melhor opção para a preservação do fungo por um período de até 12 meses. Já o tratamento B, a base de óleo mineral não é recomendável devido à dificuldade de manuseio pela presença de grande quantidade de óleo mineral, fato que também dificulta o crescimento miceliano após transferência.

O carvão ativo é uma alternativa de preservação eficiente sendo que a presença do adsorvente pode estar associada a um processo de detoxificação dos metabólitos secundários que o fungo produz no substrato mesmo quando em condições de hipobiose. Isso se manifesta devido as baixas velocidades de crescimento do fungo exposto às baixas temperaturas (8 °C) de estocagem. Vale salientar que de *A. subrufescens* cultivada no Brasil é incapaz de sobreviver em temperaturas abaixo de 4 °C (WASSER et al., 2002). Compostos tóxicos podem comprometer a viabilidade dos microrganismos. Dessa forma, o carvão ativo é adicionado ao meio com finalidade de remoção desses compostos dos meios de cultura obtidos por hidrólise de resíduos agroindustriais (CHANDEL et al., 2007; MUSSATTO; ROBERTO, 2001). O carvão ativo pode ser, portanto, uma alternativa importante também na produção de meios de cultura para a preservação de alguns fungos, como analisado por Duarte Filho et al. (2008) para os fungos micorrízicos.

A preservação dos discos em água foi utilizada por Richter e

Bruhn (1989), que reportaram um período de armazenamento de até 48 meses a 5 °C, para algumas espécies de fungos micorrízicos, e um período de até 9 meses para outras espécies. Smith, McKay e Molina (1994) também averiguaram viabilidade para 95 % dos 169 fungos testados depois de 20 meses de armazenamento, sendo a temperatura de armazenamento mais eficiente dependente da espécie.

Segundo Croan, Burdsall Jr. e Rentmeester (1999), a liofilização utilizando-se trealose 10% e lactose 10% pode ser aplicada para preservar diversos fungos. No entanto, *A. subrufescens* não sobreviveu quando foi submetido a essa técnica.

### 2.3.2 Velocidade de crescimento radial do micélio

A Figura 2.1 apresenta a média das velocidades de crescimento no 4º, 8º e 12º mês para os métodos de preservação A e B, e 4º e 8º mês para o tratamento C. A velocidade de crescimento radial do micélio de *A. subrufescens* diminuiu em função do tempo de armazenamento (período de 12 meses).

A velocidade de crescimento radial do fungo antes de ser preservado (tempo 0), apresentou uma média de 4,7 e 5,5 mm.d<sup>-1</sup>, em meio BDA e BDA com adição de carvão ativo, respectivamente. As Figuras 2.1A e 2.1B são similares, pois apresentam curvas polinomiais descendentes de crescimento radial até o 12º mês para o tratamento A e B, com velocidades de crescimento de 2,6 e 2,2 mm.d<sup>-1</sup>, respectivamente, em meio com carvão ativo. Para o tratamento C, apresentado na Figura 2.1C, houve uma diminuição brusca da velocidade de crescimento já no 8º mês de armazenamento.

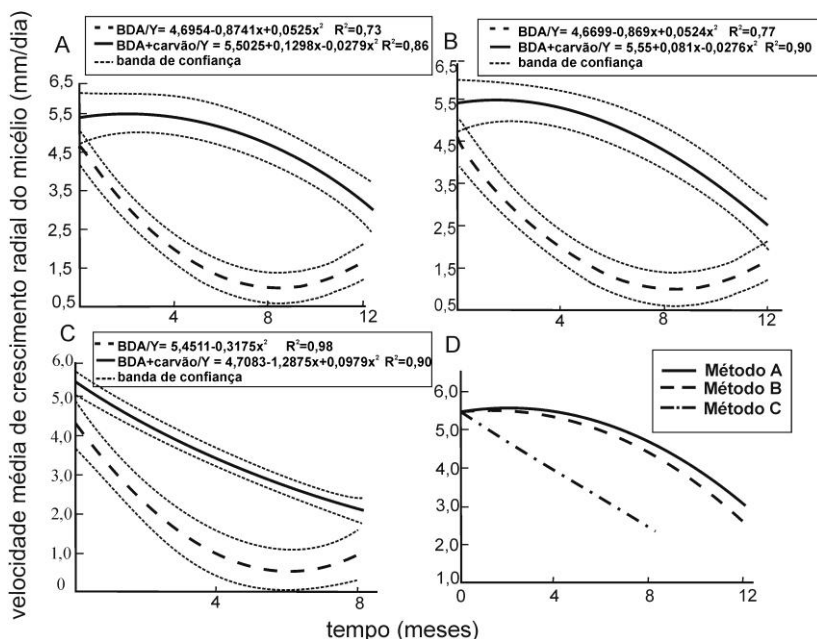


Figura 2.1 – Velocidades médias de crescimento radial do fungo *Agaricus subrufescens* no 0, 4º, 8º e 12º meses para o método de preservação em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A), BDA com óleo mineral (B) e discos em água (C); comparativamente na recuperação em meio BDA ou BDA com carvão ativo. Tempo 0 refere-se à média das velocidades de crescimento do fungo antes do armazenamento. O gráfico D apresenta a média das velocidades para os três métodos em meio BDA com carvão ativo.

Mesmo que a velocidade de crescimento tenha uma diminuição ao longo dos meses, o meio BDA com adição de carvão ativo foi a forma de recuperação mais eficiente para todos os métodos de preservação. Devido a esse fato, a Figura 2.1D compara os diferentes métodos, considerando as bandas de confiança para as respectivas equações da reta. Não houve diferença significativa entre os tratamentos A e B, porém esses tratamentos foram significativamente diferentes dos valores do tratamento C. Entretanto, quando se consideram os dois tratamentos A e B, pode-se evidenciar uma tendência para um melhor desempenho do tratamento A que também contém carvão ativo para a preservação.

A conservação em baixa temperatura aumentou o período de

latência para o crescimento fúngico, ou seja, a fase lag, tendo sido verificado um maior tempo para o início do crescimento ao redor do disco, possivelmente devido à maior dificuldade do fungo se adaptar as novas condições ambientais ou relacionadas ainda à toxicidade da agaritina produzida pelo fungo no meio de cultivo (KONDO et al., 2006; MARÍN et al., 2008). Para esse experimento, essa fase foi desconsiderada ao aguardar-se o crescimento inicial do fungo no disco para posterior transferência para a placa a ser analisada a velocidade de crescimento radial. Mesmo desconsiderando essa fase, a velocidade foi menor conforme o aumento do tempo de preservação, e dependente do meio de cultura utilizado.

O fungo recuperado e inoculado em meio de cultura BDA apresentou sectorização, porém, quando inoculado em meio BDA com carvão ativo, o fungo apresentou suas características morfológicas padrão, com formação de colônia radial equidistante (Figura 2.2). Outras características descritas por Wasser et al. (2002) também foram constatadas, como a coloração branca da colônia, amarronzada no centro com possibilidade de exsudato amarelo, micélio denso, algodinoso, zoneado e aéreo.

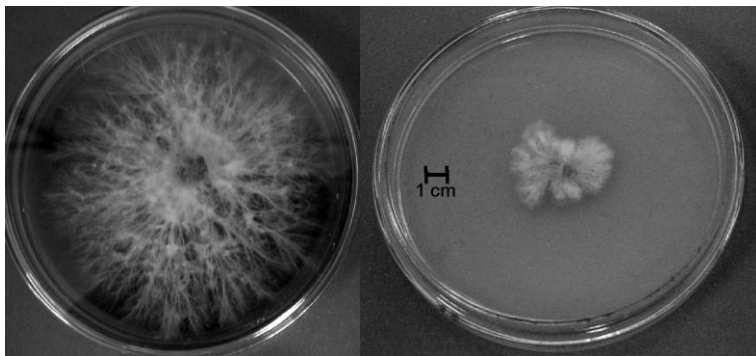


Figura 2.2 - Crescimento do *Agaricus subrufescens* em meio de cultura BDA (direita) e BDA com adição de carvão ativo (esquerda) no 14º dia de cultivo.

Por outro lado, Mantovani, Linde e Colauto (2007) quando avaliaram o crescimento miceliano de *A. subrufescens* cultivado em placas utilizando diferentes fontes de nitrogênio, comparando com o controle positivo em meio de cultura contendo extrato de malte, não encontraram degenerações visíveis da colônia.



### 2.3.3 Análise da estabilidade genética de *Agaricus subrufescens* por RAPD

A reação de amplificação utilizando os diferentes iniciadores, de AB1 a AB10 (Tabela 2.1), geraram de 8 a 12 fragmentos de DNA em cada gel, com tamanhos variados entre 100 a 1000 pb, somando um total de 98 fragmentos. O perfil eletroforético no gel, apresentado na Figura 2.3, para o iniciador AB1 de DNA total de *A. subrufescens* no 8° mês de preservação, representa a baixa variabilidade encontrada entre os diferentes métodos de preservação.

Os fragmentos de DNA amplificados por RAPD e analisados para a presença (1) e ausência (0) dos mesmos possibilitaram a separação de dois grupos: frutificação (FR) e micélio, incluindo o tempo 0 (antes da preservação) e demais tempos (4°, 8° e 12° meses) nos diferentes métodos de preservação e recuperação, denominados A1, A2, B1, B2, C1 e C2 (Figura 2.3). Porém, foi observada pouca variabilidade genética entre FR e o micélio no tempo (0), com percentual de similaridade genética de 91,2 %, para o mês 4, similaridade de 87,4 % no 8° mês, e 92,6 % no 12° mês, observados nas Tabelas 1A, 2A e 3A (APÊNDICE A), respectivamente. Todos os métodos de preservação do micélio agruparam-se com o micélio no tempo 0 (antes da preservação), com similaridade genética superior a 95 % no 4° mês, 93 % no 8° mês e 96 % no 12° mês.

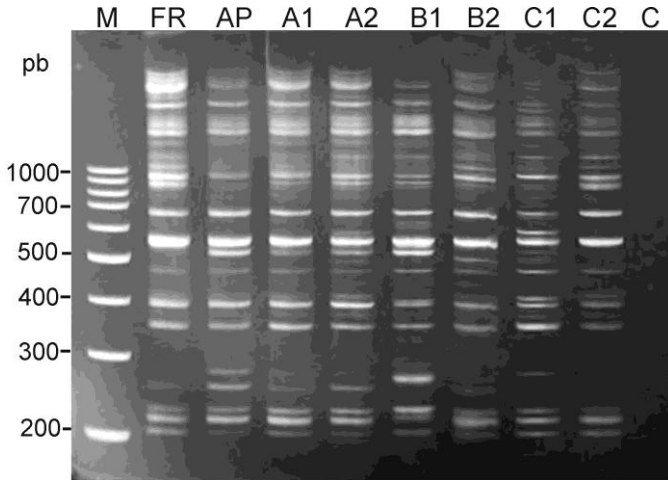


Figura 2.3 – Perfis de RAPD-PCR de DNA total de *Agaricus subrufescens* utilizando o iniciador AB1 para as amostras de micélio armazenadas a 8 °C durante 8 meses nos métodos de preservação em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A1 e A2), BDA com óleo mineral (B1 e B2), ou discos em água (C1 e C2); em diferentes meios de recuperação: BDA (1) ou BDA com adição de carvão ativo (2). AP- micélio antes da preservação, FR- frutificação, C- controle (água utilizada na reação). M- padrão de peso molecular 100 pb ladder.

Na Figura 2.4A, para o 4° mês de preservação, foi possível observar subgrupos para os tratamentos que se agruparam em pares A1 e A2, B1 e B2, e C1 e C2 e distinguiram em nível de métodos de preservação, pois apresentaram o mesmo perfil entre si, com alta similaridade do perfil observado para o micélio. As Figuras 2.4B e 2.4C apresentam similaridade genética de 100 % para as técnicas de preservação B2, A1 e A2, divergindo de B1, com similaridade de 99 % e 98 % para o 8° e 12° mês, respectivamente. Inicialmente, os valores de similaridade genética são menores entre os grupos (A1 e A2) e (B1 e B2), quando comparados com o dendograma da Figura 2.4B, uma vez que esses valores de similaridade aumentam, com aumento da homogeneidade. Para o patrimônio genético natural esse aumento da homogeneidade é evolutivamente desvantajoso, pois há uma diminuição da diversidade. Por outro lado, isso é favorável para o cultivo de *A. subrufescens* visando a obtenção dos polissacarídeos, pois não houve variação do mesmo isolado (UFSC 51) após recuperação em longo prazo.

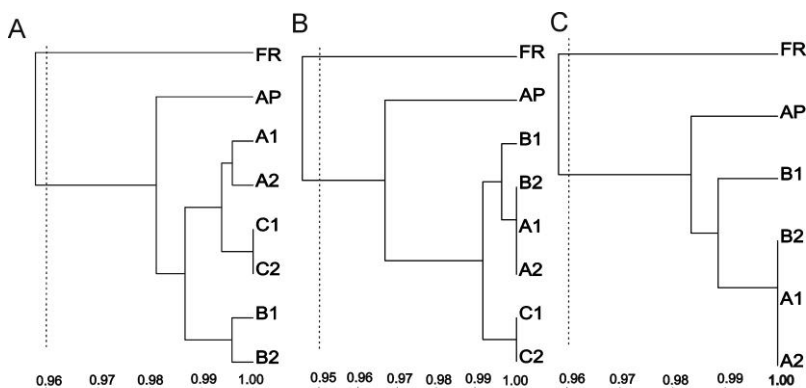


Figura 2.4 - Dendrogramas obtidos a partir dos perfis eletroforéticos utilizando os iniciadores AB1 a AB10 para amplificação do DNA total de *Agaricus subrufescens* oriundos do micélio armazenados a 8 °C durante 4 (A), 8 (B) e 12 (C) meses nos métodos de preservação em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A1 e A2), BDA com óleo mineral (B1 e B2), ou discos em água (C1 e C2); em diferentes meios de recuperação: BDA (1) ou BDA com adição de carvão ativo (2). Tempo 0- amostra do micélio antes da preservação, FR-frutificação. Cálculo de similaridade realizado utilizando o coeficiente de Dice pelo método de UPGMA. A linha vertical representa a linha de fenon.

Essas técnicas simples e pouco onerosas garantem a manutenção da sobrevivência de *A. subrufescens* por períodos específicos, evitando a obtenção de novos isolados do microrganismo a partir de frutificações e, sobretudo evitam sucessivas repicagens, técnica com potencial de contaminações, que também pode induzir a degenerescência e a distinção genética dos isolados (NEVES et al., 2005).

As mutações podem ser induzidas por radiações (LEE et al., 2000), genotoxinas (DELMANTO et al., 2001), preservação (CLARK; ANDERSON, 2004) e senescência do fungo (MAHESHWARI; NAVARAJ, 2008). Para *L. edodes* foram constatadas mutações que conduziram às variações morfológicas, na fase dicariótica, resultando em crescimento lento do micélio, hifas irregulares e hifas aéreas esparsas (SHIMOMURA; HASEBE, 2006). A recuperação de *A. subrufescens* em meio de cultura BDA sem adição de carvão ativo alterou morfológicamente a colônia, porém não foram detectadas modificações em nível de genoma utilizando a técnica de RAPD. Por outro lado, a diferença genética encontrada entre FR e o micélio pode estar relacionada com a diferenciação da fase reprodutiva e a vegetativa, de micélio. Ambos são dicarióticos e podem ter sido selecionados pelo

meio de cultivo, pois dois genomas existem em núcleos separados, os quais são fisicamente pariados e divididos de maneira coordenada pela extensão da hifa. Isso permite uma coadaptação entre os núcleos e suas possíveis mutações, respondendo até com um aumento na razão de crescimento do micélio (CLARK; ANDERSON, 2004).

Neves et al. (2005) avaliaram diferentes isolados de *A. subrufescens* por RAPD utilizando 10 iniciadores dos quais 5 de seqüências iguais as utilizadas nesse trabalho. Foram constatadas diferenças genéticas com máxima distância de 11,5 % entre um isolado de baixa produtividade de frutificações e os demais, inclusive o UFSC 51. Essas análises foram realizadas em condições diferentes de reação de PCR, e a eletroforese foi realizada em gel de agarose com coloração de brometo de etídeo, enquanto nesse trabalho se utilizou gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata, possibilitando uma maior sensibilidade de visualização dos polimorfismos, tornando o RAPD mais discriminativo. Essa técnica é mais utilizada para a discriminação em nível de espécie e foi importante também para a variabilidade intraespecífica, pois forneceu resultados reprodutíveis adequados para o estudo de polimorfismos de DNA.

A adição de carvão ativo para preservação e recuperação de *A. subrufescens* é um método fácil, rápido, e sem muito custo, que não interferiu significativamente nas características morfológicas e genéticas, durante um período de até 12 meses de estocagem. Além disso, esse método pode ser repetido após esse período, prolongando a viabilidade por muitos anos.

**CAPÍTULO III**  
**CULTIVO DE *Agaricus subrufescens***  
**EM SUBSTRATO SÓLIDO**



### 3 CULTIVO DE *Agaricus subrufescens* EM SUSTRATO SÓLIDO

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O interesse por diferentes produtos obtidos por processos biotecnológicos, usando-se microrganismos, tem aumentado nos últimos anos. Entre os produtos de relevante significância estão as enzimas (COUTO; SANROMÁN, 2005), os medicamentos obtidos de fontes naturais (BAÑOS et al., 2009) e os produtos nutricêuticos (GHORAI et al., 2009, MOORE; CHIU, 2001). Esses produtos podem ser obtidos pela sua extração, principalmente na indústria, utilização integral dos microrganismos ou recuperação de sua biomassa.

Para a produção de biomassa fúngica, geralmente são aplicados os processos: fermentação no estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm). A FES tem sido escolhida para a obtenção de muitos produtos de interesse, como enzimas e metabólitos secundários (BAÑOS et al., 2009; SAQIB et al., 2010). Esse processo promove condições de crescimento ótimo para vários fungos, como também estabilidade de algumas substâncias produzidas (COUTO; SANROMÁN, 2006; SINGHANIA et al., 2009). Além disso, o processo de FES é mais viável economicamente, principalmente quando se utiliza substrato bruto (CASTILHO et al., 2000).

Para a produção de cogumelos comestíveis e medicinais, utilizados como nutricêuticos, são utilizados resíduos lignocelulolíticos como serragem, palhas e farelos, que podem ser primariamente submetidos ao processo de compostagem. Ambos os estágios estão baseados na FES. Esse método de cultivo demanda um longo período para a obtenção dos cogumelos, aumentando consideravelmente os custos da produção (SCRASE, 1995; STAMETS, 2000), e ainda é dependente da qualidade do inóculo fúngico.

O sistema da FES também é utilizado para a produção do inóculo fúngico em grãos de cereais esterilizados, para a produção de várias espécies de cogumelos (EIRA, 2003; SCRASE, 1995; SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002). O inóculo pode ser produzido em diferentes grãos de cereais como arroz, trigo e centeio (OEI, 1996). A reidratação do grão é essencial para a produção da biomassa, sendo que diversos métodos de reidratação podem ser escolhidos em função do tipo de grão e da quantidade de umidade final adequada. O grão deve ter aproximadamente 42 a 45 % de umidade final, dependendo do tipo do grão. Elevada umidade pode provocar a quebra da integridade da parede celular do grão, alterando a capacidade metabólica do fungo e

umentando os riscos de contaminação (OEI, 1996). Para alguns fungos, a suplementação com gesso ( $\text{CaSO}_4$ ) e calcita ( $\text{CaCO}_3$ ), geralmente na razão de 1:4, é sugerida com positivos efeitos na estrutura do substrato e na estabilidade do pH (OEI, 1996; SCRASE, 1995).

Grãos de trigo integral são importante fonte de amido solúvel e outros polissacarídeos como arabinoxilanas, glucanas, celulose e arabinogalactanas-peptídeos, além de proteínas (glúten entre outras) e lipídeos (VAN der BORGHT et al., 2005). Os grãos de trigo oferecem nutrientes essenciais, como carbono e nitrogênio, para o desenvolvimento dos fungos nesse substrato. O amido solúvel já foi selecionado como uma adequada fonte de carbono para a produção de biomassa e exopolissacarídeos de *A. subrufescens* em FSm (HAMEDÍ; VAHÍD; GHANATI, 2007).

A inoculação do substrato é geralmente feita pela transferência do micélio (em ágar) diretamente sobre os grãos. A cultura é incubada em temperatura adequada para cada espécie. Depois do crescimento do micélio e colonização dos grãos (aproximadamente 14 dias), esse inóculo em grãos pode ser utilizado para colonizar novos grãos esterilizados, para aumento da escala de produção (OEI, 1996; SCRASE, 1995, STAMETS, 2000).

Ainda que essa seja a principal aplicação do inóculo fúngico, alternativamente, essa biomassa poderia ser processada e consumida como nutricêutico, na elaboração de suplemento alimentar (COUTO; SANROMÁN, 2006; MOORE; CHIU, 2001). A bioconversão do grão em biomassa fúngica é importante para incrementar a qualidade nutricional do grão, que é obtida pelo conteúdo protéico contendo todos os aminoácidos essenciais, polissacarídeos como glucanas e quitina, vitaminas, entre outros (MOORE; CHIU, 2001).

A obtenção da biomassa de *A. subrufescens* pode ser realizada por FES com essa finalidade nutricêutica, pois esse fungo possui um importante polissacarídeo na composição de sua parede celular. Mizuno et al. (1999) relacionaram a estrutura desse polissacarídeo com a atividade antitumoral, identificando-as com glucomanas, de cadeia principal  $(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-mananas}$  e ramificações  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-glucanas}$ . Esse fungo tem se adaptado ao crescimento em substrato líquido, e diversos autores propuseram a otimização da FSm para a produção de biomassa miceliana e exopolissacarídeos (FAN et al, 2007; HAMEDÍ; VAHÍD; GHANATI, 2007; LIN; YANG, 2006). Apesar da otimização experimental já ter sido utilizada para o cultivo de fungos em FES e para obtenção de produtos importantes biotecnologicamente (PRAKASH; PADMAJA; KIRAN, 2008), e que inclusive a maioria do inóculo



comercializado de *A. subrufescens* seja obtido por FES (MENDONÇA et al., 2005; STAMETS, 2000), não foram encontrados estudos relacionando a produção de polissacarídeos de *A. subrufescens* cultivado em FES.

Alguns métodos de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR) têm sido propostos para a quantificação de polissacarídeos. Nie, Xie e Wang (2005) utilizaram a glicoproteína purificada de chá-verde como padrão para comparação quantitativa em amostras de chás coletados de diferentes espécies, variedades e localizações geográficas. Vendrell-Pascuas et al. (2000) desenvolveram um método de determinação quantitativa da inulina em produtos cárneos contendo esse tipo de aditivo como emulsificante. O método consiste na extração aquosa da inulina, seguido de hidrólise com inulinase e detecção da frutose liberada por índice de refração. Portanto, a proposta foi utilizar a CLAE-IR para a análise quantitativa dos polissacarídeos de maior massa molar presentes no extrato aquoso de *A. subrufescens* cultivado em substrato sólido a base de grãos de trigo.

O objetivo deste trabalho foi a seleção e a otimização dos fatores importantes para a produção dos polissacarídeos de *A. subrufescens* em FES. As condições de cozimento do grão de trigo e descanso após o cozimento, a suplementação com cálcio, a quantidade de inóculo inicial e a temperatura de incubação foram os fatores otimizados para a produção dos polissacarídeos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Inóculo de cultivo

O fungo da espécie *A. subrufescens* utilizado neste experimento está depositado na coleção de fungos do Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob código UFSC 51. Um exemplar da espécie está depositado no herbarium FLOR, sob código FLOR 11.797.

O fungo utilizado no cultivo dos experimentos em substrato sólido foi preservado sob refrigeração a 8 °C em tubos com meio de cultura inclinado batata dextrose ágar (BDA, Sigma) com carvão ativo (2 g.L<sup>-1</sup>).

Uma fração do fungo foi inoculada em placas de petri contendo meio de cultura da mesma composição, pH 6,0, e incubado durante 12-

15 dias a 26 °C até colonização de 75 % do meio de cultura.

Para inoculação dos experimentos foram cortados discos de 8 mm do meio colonizado e transferidos para outra placa com meio de cultura da mesma composição para avaliação da viabilidade, observando o início do crescimento do fungo. Posteriormente, cada frasco, contendo 100 g de substrato, foi inoculado com quatro discos viáveis.

### **3.2.2 Delineamento experimental para o cultivo em estado sólido a base de grãos de trigo**

Os delineamentos experimentais foram realizados usando-se substrato a base de grãos de trigo para o crescimento do fungo, com condições de preparo e de incubação conforme segue abaixo, exceto quando houve variação destes fatores segundo cada experimento. Os fatores fixos para a preparação dos grãos de trigo consideraram o tempo de cozimento e o tempo de molho dos grãos, ambos por 20 min. O volume de água para cozimento foi de 1:2,5 (p/V). Após o cozimento e molho dos grãos em recipiente metálico, esses foram drenados em peneira e espalhados sobre tela de plástico para esfriar. Foram pesados 100 g de grãos e colocados em frascos de vidro de 200 mL com tampas perfuradas (dois furos de 5 mm Ø) e protegidas com “tecido não-tecido” (TNT). Os substratos foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 30 min., e após o resfriamento foram inoculados com os discos de micélio e incubados a 26 °C, durante 14 dias, com agitação a cada quatro dias. Após a colonização, as amostras foram desidratadas a 60 °C durante 12 h, até peso constante, trituradas e armazenadas a 8 °C.

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa STATISTICA 6.0.

### **3.2.3 Seleção de fatores ambientais determinantes que influenciam na obtenção dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens***

Para se avaliar quais os fatores influem sobre o cultivo de *A. subrufescens* em substrato sólido a base de grãos de trigo, foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionário saturado  $2^{7-4}$  (8 experimentos), mais 8 experimentos espelho, com 2 repetições para averiguar como resposta o teor de umidade e outras 2 repetições para a concentração de polissacarídeo. Também foi avaliada a biomassa visualmente por meio de sua intensidade no crescimento. Os fatores

avaliados e os respectivos níveis de variação (-1 e +1) são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Definição dos fatores independentes do planejamento experimental fatorial fracionário saturado e espelho  $2^{7-4}$  e seus respectivos níveis de variação para o estudo da influência na produção do polissacarídeo de *Agaricus subrufescens*.

Fatores	Níveis de variação dos fatores	
	-1	+1
A) Volume de água de cozimento (p/V)	1:1,5	1:2,5
B) Quantidade de carbonato de cálcio (%)	0	0,5
C) Tempo de cozimento (min)	10	20
D) Tempo de molho após cozimento (min)	0	20
E) Tempo de descanso após cozimento (h)	2	4
F) Tempo de Autoclavagem (min)	30	60
G) Inóculo inicial (discos)	2	4

### 3.2.4 Identificação da umidade ótima dos grãos para obtenção dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens*

O tempo de cozimento e o tempo de molho após o cozimento dos grãos de trigo foram fatores selecionados para estudo por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Os experimentos foram realizados em duplicatas para análise da concentração de polissacarídeos. Foi realizada mais uma repetição destrutiva para averiguar o teor de umidade, sem necessitar inoculação. Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação ( $-\alpha$ , -1, 0, +1 e  $+\alpha$ ) estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Fatores independentes do planejamento composto central rotacional e os respectivos níveis de variação para o estudo da influência na produção do polissacarídeo de *Agaricus subrufescens*.

Fatores	Níveis de variação dos fatores				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A) Tempo de cozimento (min)	6	10	20	30	34
B) Tempo de molho após o cozimento (min)	6	10	20	30	34

### 3.2.5 Identificação do pH ótimo para obtenção dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens*

As porcentagens de gesso ( $\text{CaSO}_4$ ) e calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) adicionadas aos grãos de trigo, após o cozimento, foram fatores estudados por um delineamento experimental fatorial completo  $2^2$  com pontos centrais para as respostas pH e concentração dos polissacarídeos. Os experimentos foram realizados em duplicata. O pH foi avaliado antes do crescimento fúngico, segundo Tedesco et al. (1995). Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação (-1, 0, +1) estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Definição dos fatores independentes do delineamento experimental fatorial completo com pontos centrais e seus respectivos níveis para o estudo de suas influências na produção do polissacarídeo de *Agaricus subrufescens*.

Fatores	Níveis de variação dos fatores		
	-1	0	+1
A) Gesso (p/p, %)	0	1,5	3
B) Calcita (p/p, %)	0	0,5	1

### 3.2.6 Aumento da escala de produção dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens* em grãos de trigo

A quantidade de inoculante inicial e a temperatura de incubação foram fatores selecionados e estudados por um DCCR para a resposta concentração de polissacarídeos. Os experimentos foram realizados em duplicata. Inicialmente, o fungo foi cultivado em frascos contendo 100 g de grãos, e depois de colonizados, uma porcentagem determinada pelo experimento foi transferida para frascos de 500 mL contendo 250 g de grãos, visando o aumento da escala de cultivo. Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação ( $-\alpha$ , -1, 0, +1 e  $+\alpha$ ) estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Fatores independentes do planejamento composto central rotacional e os respectivos níveis de variação para o estudo de suas influências na produção do polissacarídeo de *Agaricus subrufescens*.

Fatores	Níveis de variação dos fatores				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A) Inoculante inicial (%)	4,4	6	10	14	15,6
B) Temperatura de incubação (°C)	21,8	23	26	29	30,2

### 3.2.7 Métodos analíticos

Para avaliar o teor de umidade do substrato de cultivo foram retiradas amostras de 10 g em dois pontos diferentes do frasco e desidratadas a 60 °C, até peso constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença de massa úmida em relação à seca.

Para avaliar o pH foram utilizadas amostras úmidas de 10 g, adicionado 50 mL de água destilada e agitadas por 30 min. As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 1100 g e o sobrenadante coletado para a verificação do pH.

Para a quantificação do polissacarídeo foi utilizado o método de extração padronizado a partir do conhecimento do polissacarídeo de maior massa molar no micélio de *A. subrufescens* (310 g.mol<sup>-1</sup>). Em 10 g de amostra seca e triturada foram adicionados 100 mL de água destilada. As amostras foram submetidas à autoclavagem durante 45 min, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado. A enzima  $\alpha$ -amilase AMG 200L (Novozyme, Brasil), na concentração de 1 % (V:V), foi adicionada para purificação da amostra, a qual foi levada a banho-maria a 55 °C durante 30 min, em pH 4,5. Posteriormente, a amostra foi resfriada e centrifugada durante 10 min a 11000 g, coletando-se o sobrenadante. Essa etapa foi repetida três vezes para hidrolisar os compostos amiláceos que interferiam na determinação quantitativa do polissacarídeo fúngico.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:3 (V:V) e a concentração (mg.mL<sup>-1</sup>) dos polissacarídeos foi determinada por CLAE-IR utilizando alíquotas de 20  $\mu$ L. O cromatógrafo Perkin Elmer series 200 foi equipado com coluna de gel permeação TSK Gel 5000 PW (7,8  $\times$  300 mm  $\varnothing$ , Tosoh Corporation, Japão) e pré-coluna (5 x 75 mm  $\varnothing$ , Tosoh Corporation, Japão). As amostras foram eluídas com fase móvel de solução de NaOCH<sub>3</sub> 0,003 M (HENGXIANG et al., 2008), com velocidade de fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, monitorado com detector de Índice de Refração Perkin Elmer series 200a, e detector de UV a 280 nm.

O polissacarídeo utilizado como padrão foi obtido do micélio em grão colonizado durante 45 dias, e hidrólise enzimática do amido como descrito para as amostras. O padrão foi separado por membrana de microfiltração 0,22  $\mu$ m, dialisado em água destilada durante três dias e liofilizado. Para testar a pureza do padrão foram utilizadas as enzimas proteinase K (Sigma, EUA) e tripsina (Sigma, EUA), nas respectivas soluções tampão e pH.

Para a elaboração da curva analítica foram utilizadas concentrações de 0,187 a 3,00 mg.mL<sup>-1</sup> de padrão purificado,

considerando a média da área de três repetições. Para validação do método cromatográfico foram analisadas a linearidade, a precisão e a exatidão (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001) para o polissacarídeo padrão.

O polissacarídeo padrão foi analisado quanto a sua massa molar por CLAE-IR, conforme a metodologia apresentada na Seção 5.2.6 do Capítulo 5. Para a análise da estrutura por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono<sup>13</sup> foram utilizados 60 mg do polissacarídeo liofilizado em 200 µL de água deuterada (D<sub>2</sub>O). A análise foi realizada em um equipamento marca VARIAN, modelo UNIt-Plus, 9.4 Tesla (100,582 MHz para frequência do <sup>13</sup>C), em uma sonda de 10 mm de diâmetro. A análise foi realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, UFSCAR.

Também foi realizada análise química elementar por microscopia eletrônica de varredura com sistema de espectrometria por dispersão de energia de raio-X (MEV-EDS), utilizando o equipamento JEOL JSM-6390L no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, UFSC. O polissacarídeo foi preparado para a análise pelo recobrimento com uma camada fina de ouro.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Análise dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens* produzidos em substrato sólido

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C do polissacarídeo padrão de *A. subrufescens* (Figura 3.1) foi comparado com outro espectro anteriormente publicado (MIZUNO et al., 1999). O espectro apresentou quatro principais sinais de carbonos anoméricos: C-1 em 105,1 ppm e 101,9 ppm, atribuídos as configurações anoméricas β, correspondentes a β-manopiranosil da cadeia principal e β-glicosil dos resíduos, respectivamente. Os sinais em 98,1 e 94,3 ppm sugerem seus correspondentes C-1 dos grupos finais redutores. Os sinais para os carbonos do monômero com ligação β-(1→2)- foram C2 (78,2), C3 (73,7), C4 (71,8), C5 (77,9) e C6 (62,9). Os sinais para β-(1→3)- podem ser relacionados com C2 (75,0), C3 (86,6), C4 (71,9), C5 (76,3) e C6 (62,9). Esse resultado sugere a estrutura de glucomananas com cadeia principal β-(1→2)-mananas e ramificações β-(1→3)-glucanas. Essa estrutura encontrada para o polissacarídeo extraído da biomassa de *A.*

*subrufescens* cultivado em FES foi similar ao polissacarídeo obtido da biomassa cultivada em meio líquido (MIZUNO et al., 1999).

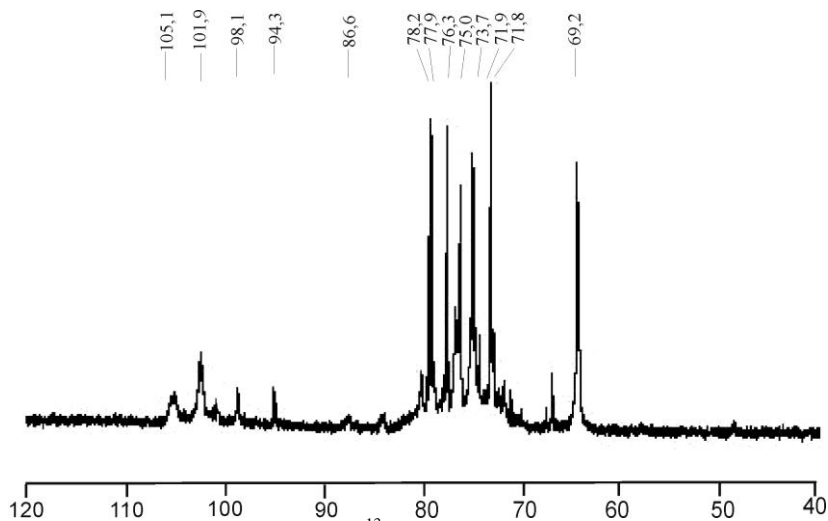


Figura 3.1 - Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo padrão de *Agaricus subrufescens* obtido no cultivo em FES.

A análise química elementar por MEV-EDX para o polissacarídeo padrão observado na imagem da Figura 3.2A, apresentou os constituintes: carbono (C-65,96 %), oxigênio (O-31,55 %), fósforo (P-0,29 %) e cálcio (Ca-2,20 %), nas respectivas porcentagens dos átomos. A proporção desses constituintes pode ser visualizada no espectro de dispersão de energia de raios-X (Figura 3.2B). Essa técnica instrumental revelou cristais amorfos do polissacarídeo liofilizado, indicando também elevada pureza pela presença de maiores proporções de carbono e oxigênio. Porém, a técnica não detecta elementos químicos com número atômico menor do que 11, como o nitrogênio e o hidrogênio (SOARES; SARON, 2010).

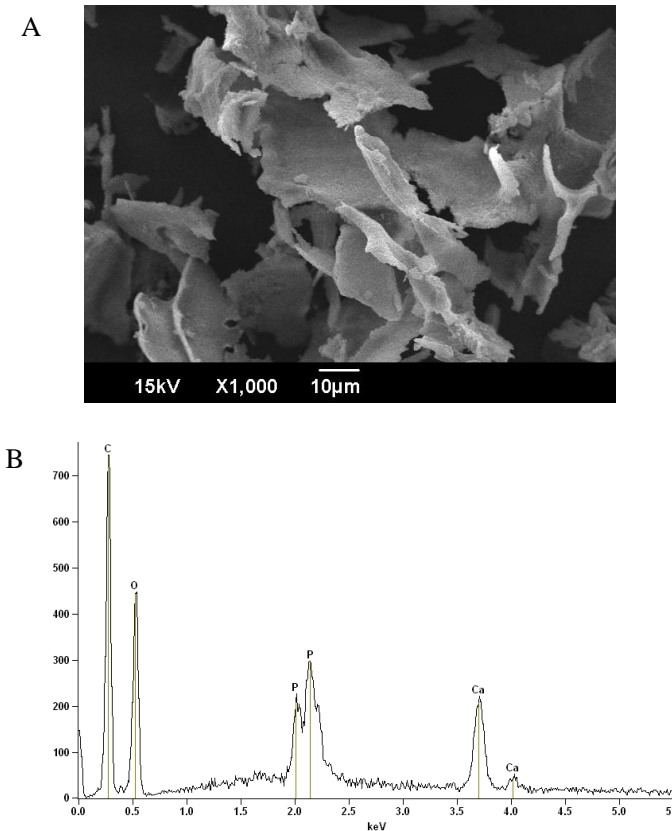


Figura 3.2 – Imagem das glucomananas por MEV com voltagem de aceleração de 15 kV e magnificação 1000x (A) e espectro de dispersão de energia de raios-X mostrando os picos de radiação dos elementos (B) conforme a incidência de energia (keV).

A cromatografia de gel permeação com detector de IR dos extratos obtidos do micélio apresentou um polissacarídeo de massa molar de  $310 \text{ g.mol}^{-1}$ , com volume de eluição de aproximadamente 8,5 mL. Adicionalmente, foram detectadas as frações de massa molar de  $25 \text{ g.mol}^{-1}$  (10,6 mL) e  $6 \text{ g.mol}^{-1}$  (11,8 mL), removidas pela  $\alpha$ -amilase, sugerindo a presença de amido no extrato. Essas frações foram hidrolisadas, pois a maior delas interferia na quantificação do



polissacarídeo de maior massa molar presente nas amostras. Os resíduos dos hidrolisados foram detectados com volume de eluição de 12,4 mL e uma fração de massa molar  $21 \text{ g.mol}^{-1}$  ( $10,7 \text{ mL}$ ) pôde ser visualizada após a hidrólise. O polissacarídeo utilizado como padrão apresentou um único pico simétrico ( $310 \text{ g.mol}^{-1}$ ), sugerindo que o polímero é homogêneo, como pode ser observado na Figura 3.3. Quando foram utilizadas as enzimas para hidrólise protéica, como a proteinase K e a tripsina, esse pico não diminuiu significativamente sua área, confirmando a presença de um polissacarídeo com baixo teor de proteína (MIZUNO et al., 1999), também visualizada com o detector de UV a 280 nm. Esse detector também foi utilizado para verificar se os resultados tinham correlação com aqueles obtidos com o IR, sem obter sucesso.

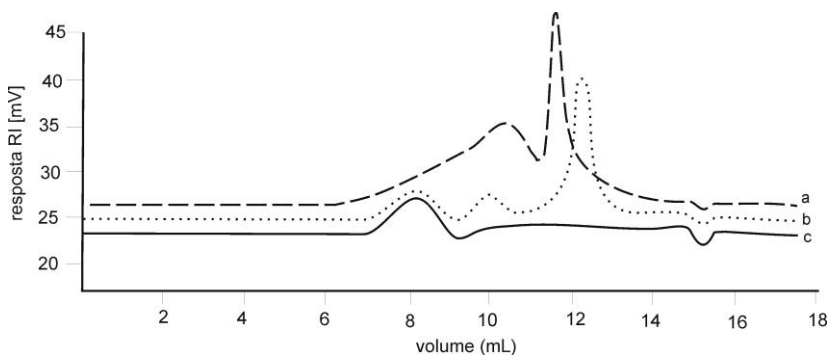


Figura 3.3 - Cromatogramas de CLAE-IR do extrato bruto antes da purificação do polissacarídeo de *Agaricus subrufescens* (a), polissacarídeos de amostras tratadas com  $\alpha$ -amilase (b) e polissacarídeo purificado de massa molar  $310 \text{ g.mol}^{-1}$  (c). Velocidade de fluxo de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ .

A análise da cromatografia de gel permeação permitiu que o polissacarídeo e seus produtos de degradação fossem determinados simultaneamente. A curva analítica da média das áreas relacionadas às concentrações entre  $0,187$  e  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi linear com equação de regressão  $y = 39096x + 1895,8$  e  $R^2 = 0,9997$  (Figura 1B, APÊNDICE B). A precisão para os valores de área intra e inter-dia, apresentou máximo coeficiente de variação de 1,64 % (intra) e 5,17 % (inter), para as três concentrações do polissacarídeo padrão (Tabela 1B, APÊNDICE B).

A exatidão variou entre 87,00 e 113,07 %, com média de recuperação de 100 % e desvio padrão de 8,16 % (Tabela 2B, APÊNDICE B). A análise das três amostras individuais resultou em um

coeficiente de variação máximo de 1,65 % (Tabela 3B, APÊNDICE B). O método desenvolvido para a quantificação dos polissacarídeos é simples, repetível e possibilita a comparação das amostras de *A. subrufescens*.

A recuperação da biomassa do substrato sólido é um problema para os estudos de cinética de crescimento em FES (SINGHANIA et al., 2009). Muitos métodos indiretos vêm sendo utilizados com esse propósito, como a determinação da glucosamina, ergosterol e proteína (OOIJKAAS; TRAMPER; BUITELAAR, 1998). Todas essas técnicas, no entanto, estão sujeitas a limitações. O objetivo neste trabalho foi enriquecer o substrato sólido com o polissacarídeo fúngico bioativo. Porém, esse método de quantificação do polissacarídeo poderia ser padronizado para estimar a biomassa fúngica em substratos sólidos.

### **3.3.2 Seleção de fatores ambientais determinantes que influenciam na produção de polissacarídeos**

Os resultados dos planejamentos experimentais para a seleção de fatores que condicionam o cultivo de *A. subrufescens* em grãos de trigo, para a produção de glucomananas, são mostrados nas Tabelas 3.5 e 3.6. Os resultados da mensuração visual da biomassa foram utilizados para ajustar o método de análise da concentração do polissacarídeo, sendo que esse é parte integral da parede celular do fungo. As umidades dos grãos de trigo, dependente do método de preparo, também estão apresentadas nas Tabelas 3.5 e 3.6.

Foi utilizado um planejamento experimental fracionário  $2^{7-4}$ , que corresponde a 1:16 do planejamento completo  $2^7$ , apresentando  $2^3$  observações independentes que são as respostas dos 8 experimentos, com todas as possíveis interações entre os fatores.

Tabela 3.5 – Resultados do planejamento experimental fatorial fracionário saturado  $2^{7-4}$  para umidade e glucomanas, considerando os fatores volume de água de cozimento (A), quantidade de carbonato de cálcio (B), tempo de cozimento (C), tempo de molho após o cozimento (D), tempo de descanso após cozimento (E), tempo de autoclavagem (F) e inóculo inicial (G).

Experi Mento	Fatores							Respostas		
	A	B	C	D	E	F	G	Umidade (%)	Glucomana (mg.mL <sup>-1</sup> )	Biomassa (intensidade)*
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	38,6	3,95	++
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	35,9	3,00	+
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	35,2	3,60	+
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	39,8	4,15	++
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	43,8	6,70	+++
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	33,2	3,77	+
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	37,4	4,51	++
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	43,0	7,51	+++

\*graus de produção de biomassa – avaliação visual: (+++) alta colonização, (++) média colonização, (+) baixa colonização

Para a resposta da concentração de glucomanas foi realizado o cálculo dos contrastes aplicando os sinais do fator desejado à coluna de respostas e dividindo por quatro, apresentados na Tabela 4B (APÊNDICE B). Para isolar os efeitos dos fatores e suas interações foi realizado o experimento espelho do primeiro planejamento para discernir os efeitos associados a esses fatores (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Resultados do planejamento experimental fatorial fracionário saturado espelho  $2^{7-4}$  para a umidade e glucomanas, considerando os fatores volume de água de cozimento (A), quantidade de carbonato de cálcio (B), tempo de cozimento (C), tempo de molho após o cozimento (D), tempo de descanso após cozimento (E), tempo de autoclavagem (F) e inóculo inicial (G).

Experimento Espelho	Fatores							Respostas		
	A	B	C	D	E	F	G	Umidade (%)	Glucomana (mg.mL <sup>-1</sup> )	Biomassa* (intensidade)
1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	38,1	5,91	++
2	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	42,1	6,25	+++
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	43,1	6,91	+++
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	38,3	4,56	++
5	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	33,8	3,39	+
6	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	38,3	4,17	++
7	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	40,7	5,46	++
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	32,5	3,76	+

\*graus de produção de biomassa – avaliação visual: (+++) alta colonização, (++) média colonização, (+) baixa colonização

Pelos resultados do primeiro experimento (Tabela 3.5) e cálculo dos contrastes, pode-se observar que os fatores A, B, C, D e G foram significativos para aumentar a concentração de glucomananas. Entretanto, essa interpretação não é única sendo necessário isolar os efeitos e suas interações, por meio dos resultados do experimento espelho (Tabela 3.6), cálculo dos contrastes e análise dos dois planejamentos conjuntamente também apresentados na Tabela 4B (APÊNDICE B).

Observamos que os fatores B, C, D, G e as interações entre eles, realmente foram significativos, discernindo os efeitos principais dos efeitos de 2<sup>a</sup> ordem. Ou seja, a quantidade de carbonato de cálcio, o tempo de cozimento e de molho após o cozimento, como também a quantidade de inóculo inicial foram importantes para a concentração de glucomanana e para o delineamento dos experimentos subsequentes.

Porém, não foi possível realizar os cálculos para o teor de umidade devido ao fator G, referente ao inóculo inicial, não ter sido incluído para a análise, incorrendo num erro experimental. No entanto, podemos observar nas Tabelas 3.5 e 3.6 que as maiores concentrações de glucomananas ocorreram com os teores de umidade dos grãos entre 42,1 e 43,8 %.

### **3.3.3 Umidade ótima dos grãos para obtenção de polissacarídeos**

O tempo de cozimento e o tempo de molho dos grãos de trigo após o cozimento estudados por um DCCR para os resultados de teor de umidade nos grãos de trigo e concentração de glucomanana na biomassa são apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Resultados do planejamento composto central rotacional e os respectivos níveis de variação do tempo de cozimento e tempo de molho após o cozimento para o estudo de suas influências no teor de umidade dos grãos e concentração de glucomananas de *Agaricus subrufescens*.

Experimento	Cozimento (min)	Molho (min)	Umidade (%)	Glucomanana (mg.mL <sup>-1</sup> )
1	10	10	38,2	5,07
2	30	10	45,9	5,19
3	10	30	44,3	5,36
4	30	30	50,0	5,12
5	6	20	38,5	4,82
6	34	20	52,8	4,94
7	20	6	38,9	4,52
8	20	34	44,5	6,65
9	20	20	45,6	6,12
10	20	20	45,4	6,45
11	20	20	45,5	6,39
12	10	10	38,0	4,91
13	30	10	45,7	5,26
14	10	30	44,2	5,52
15	30	30	50,0	4,92
16	6	20	38,5	4,64
17	34	20	50,2	5,16
18	20	6	38,9	4,48
19	20	34	44,5	6,28
20	20	20	45,5	6,27
21	20	20	45,4	6,43
22	20	20	45,5	6,30

Para o teor de umidade dos grãos podemos observar no gráfico de pareto (Figura 3.4A) que os fatores tempo de cozimento (L), molho após o cozimento (L), a interação entre eles e o tempo de molho (Q) são significativos. O modelo é representativo, pois o  $R^2$  é igual a 0,95. Os tempos de cozimento (L) e de molho (L) influem positivamente sobre o teor de umidade, porém o tempo de molho (Q) influi negativamente sobre essa resposta.

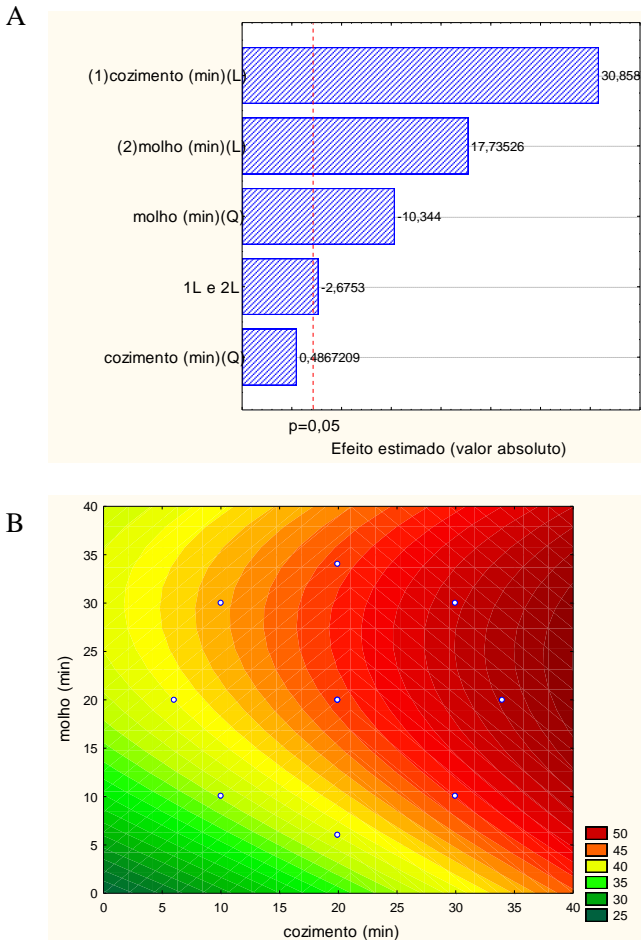


Figura 3.4 – Gráfico de pareto (A) para os fatores significativos  $p < 0,05$  para a resposta teor de umidade dos grãos e curva de contorno (B) correspondente a superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático em função do tempo de cozimento e tempo de molho dos grãos de trigo.

A relação funcional entre os fatores para a resposta do teor de umidade obtidos no delineamento composto central rotacional pode ser observada na Tabela 5B (APÊNDICE B) para o modelo quadrático. Todos os fatores, exceto o tempo de cozimento (Q), apresentaram coeficientes significativos para  $p < 0,05$ . As Equações (3.1 e 3.2) representam o modelo completo e simplificado, respectivamente.

$$y = 24,80 + 0,46 * X_1 + 0,97 * X_2 + 0,0007 * X_1^2 - 0,016 * X_2^2 - 0,0048 * X_1 * X_2 \quad (3.1)$$

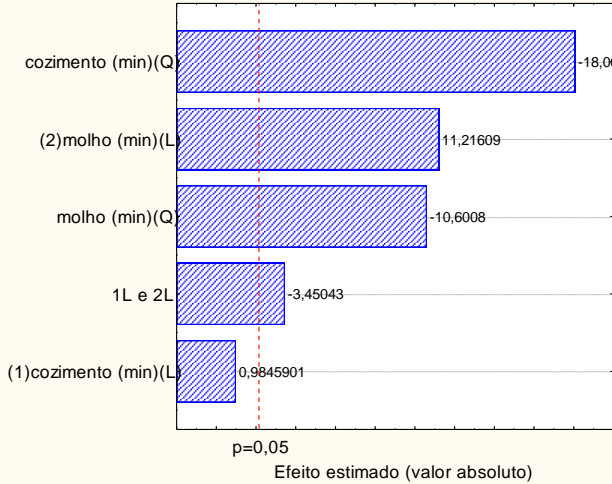
$$y = 24,80 + 0,46 * X_1 + 0,97 * X_2 - 0,016 * X_2^2 - 0,0048 * X_1 * X_2 \quad (3.2)$$

A curva de contorno representa o modelo na Figura 3.4B. Essa figura é bastante elucidativa e podemos observar que quanto maior o tempo de cozimento, maior o teor de umidade dos grãos. Já o molho após o cozimento é importante para a umidade, porém, permite uma variabilidade maior do tempo do molho entre 15 e 30 min para se obter maiores teores de umidade.

O modelo quadrático, validado por meio da ANOVA, pode ser observado na Tabela 6B, do APÊNDICE B. O modelo quadrático explicou melhor os resultados do que o modelo linear (dados não apresentados). A porcentagem de variação explicada passou de 86,73 % no modelo linear para 95,50 % no modelo quadrático, com índices de 99,10 % de máxima variação explicável.

Para a concentração de glucomananas, pode ser observado no gráfico de pareto (Figura 3.5A), que o tempo de cozimento (Q), o molho após o cozimento (L) e (Q) e a interação entre esses fatores são significativos. O tempo de molho (L) influi positivamente sobre o teor de glucomananas, porém os tempos de cozimento (Q) e de molho (Q) influem negativamente sobre essa resposta.

A



B

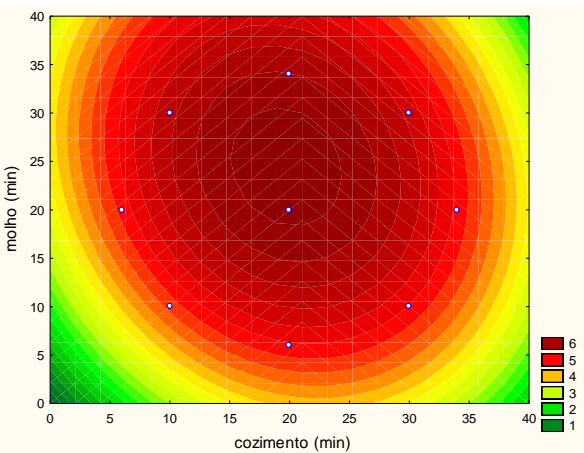


Figura 3.5 – Gráfico de Pareto (A) para os fatores significativos  $p < 0,05$  para a resposta glucomanas e curva de contorno (B) correspondente a superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático em função do tempo de cozimento e tempo de molho dos grãos de trigo.

Os coeficientes de regressão de todos os fatores (Q) e (L), exceto a média, são significativos para  $p < 0,05$  (Tabela 7B, APÊNDICE B). A curva de contorno resultante da equação do modelo quadrático indica que o ponto ótimo para a produção de glucomanas está no cultivo em grãos preparados com o período próximo de 20 min de cozimento e 25 min de molho após o cozimento (Figura 3.5B).



A equação no item (3.3) representa o modelo completo e o item (3.4) o modelo simplificado.

$$y = 0,20 + 0,33 * X_1 + 0,24 * X_2 - 0,007 * X_1^2 - 0,004 * X_2^2 - 0,0016 * X_1 * X_2 \quad (3.3)$$

$$y = 0,33 * X_1 + 0,24 * X_2 - 0,007 * X_1^2 - 0,004 * X_2^2 - 0,0016 * X_1 * X_2 \quad (3.4)$$

A análise de variância para a resposta concentração de glucomananas, observada na Tabela 8B (APÊNDICE B), indica que a regressão é significativa. A porcentagem de variação explicada passou de 25,85 % no modelo linear para 84,14 % no modelo quadrático, com índices de 98,10 % de máxima variação explicável.

A quantidade de água na FES deve ser suficiente para o crescimento do fungo e permitir a difusão de solutos, gás e nutrientes (GERVAIS; MOLIN, 2003). Os resultados de tempo de cozimento e molho após o cozimento tiveram efeito positivo sobre a umidade do grão de trigo, com teor máximo de 52,8%, obtido com 34 min de cozimento seguido de um período de 20 min de molho.

Maiores teores de umidade aumentaram a produção de glucomananas, no entanto a maior produção do polissacarídeo não foi obtida com o maior teor de umidade. Os grãos com umidade superior a 50 % tiveram sua parede celular rompida, ou seja, a integridade do grão foi prejudicada diminuindo a produção das glucomananas. Também com o rompimento dos grãos o amido é liberado e pode aumentar os riscos de contaminações microbiológicas (OEI, 1996). Por outro lado, um teor de umidade maior significa que a massa seca do substrato dentro dos frascos é menor, e também que há menos espaços de ar dentro das partículas de substrato. Ohga (1990) demonstrou que espaços de ar saturados com altos teores de umidade podem diminuir a troca de gases do interior dos frascos para a superfície.

Alternativamente, as superfícies de respostas da umidade e produção das glucomananas foram sobrepostas, considerando a umidade entre 40,5 e 46,5 %. O valor previsto de máxima produção do polissacarídeo (6,65 mg.mL<sup>-1</sup>) pode ser observado utilizando o período de 21 min de cozimento e 24 min de molho dos grãos de trigo (Figura 3.6).

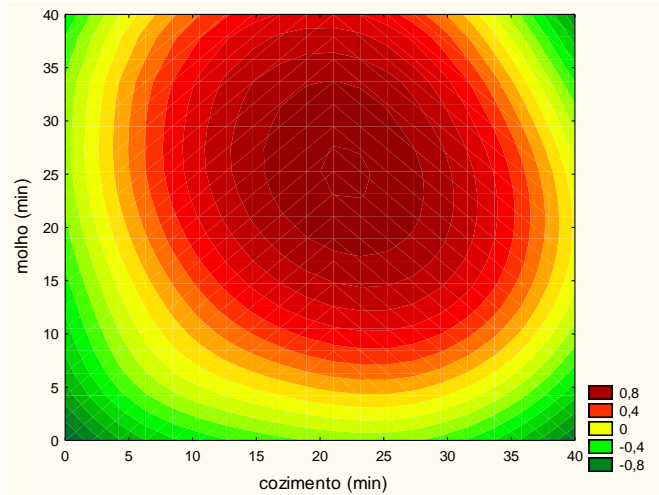


Figura 3.6 – Sobreposição das superfícies de resposta para as respostas do teor de umidade e concentração de glucomananas, considerando a umidade entre 40,5 e 46,5 %.

### 3.3.4 pH ótimo para obtenção de polissacarídeos

A porcentagem de gesso e calcita adicionada aos grãos de trigo, após o cozimento, foram estudados por um delineamento com pontos centrais para as respostas pH e concentração das glucomananas. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Resultados do planejamento experimental com pontos centrais e seus respectivos níveis para o estudo de suas influências no pH e concentração de glucomananas.

<b>Experimento</b>	<b>Gesso (p/p, %)</b>	<b>Calcita (p/p, %)</b>	<b>pH</b>	<b>Glucomanana (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
1	0,0	0,0	6,41	6,27
2	3,0	0,0	5,82	5,47
3	0,0	1,0	7,30	5,31
4	3,0	1,0	6,80	5,16
5	1,5	0,5	6,50	5,75
6	1,5	0,5	6,52	5,68
7	1,5	0,5	6,54	5,83
8	0,0	0,0	6,40	6,11
9	3,0	0,0	5,80	5,60
10	0,0	1,0	7,30	5,26
11	3,0	1,0	6,80	5,11
12	1,5	0,5	6,50	5,60
13	1,5	0,5	6,52	5,72
14	1,5	0,5	6,54	5,50

Os efeitos estimados dos fatores calcita e gesso são significativos sobre a resposta pH, e o gráfico de pareto da Figura 3.7A representa claramente esses fatores para  $p < 0,05$ . A calcita influenciou positivamente e o gesso negativamente sobre o pH, ou seja, o pH aumentou quanto maior a quantidade de calcita e diminuiu conforme maior foi a quantidade de gesso (Figura 3.7B).

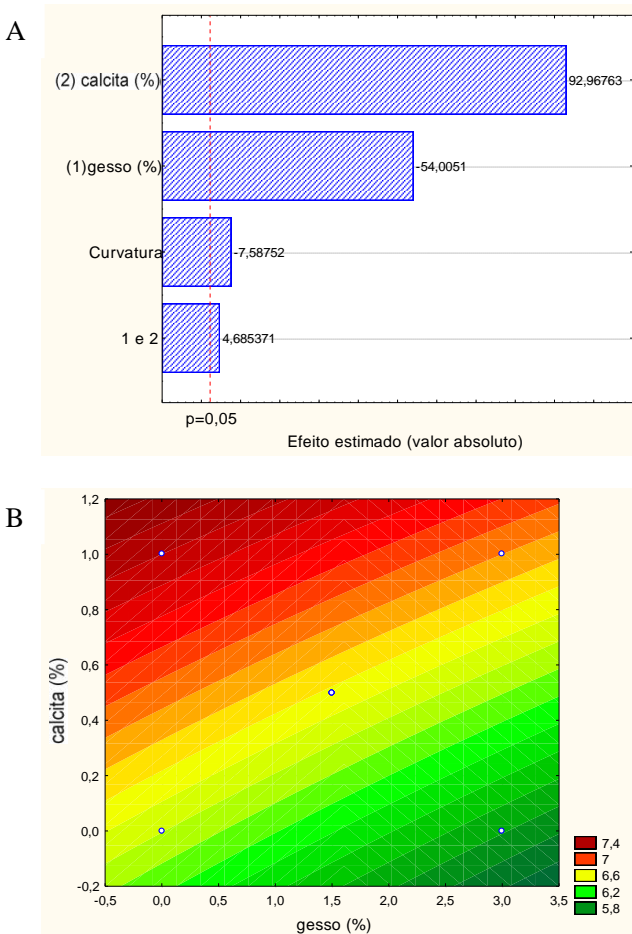


Figura 3.7 – Gráfico de pareto (A) para os fatores significativos  $p < 0,05$  para a resposta pH e curvas de contorno (B) correspondente a superfície de resposta gerada pelo modelo estatístico em função do gesso e calcita adicionados aos grãos de trigo.

A adição de pontos centrais no experimento fatorial com dois níveis é capaz de produzir uma interação entre os fatores e representar alguma torção que possa haver no plano. Dependendo da curvatura desse plano é possível propor um modelo quadrático. Como podemos observar na ANOVA (Tabela 9B, APÊNDICE B) que a curvatura é significativa, e poderíamos propor um experimento DCCR para a resposta pH. Porém, a média calculada dos quatros experimentos nos

pontos do planejamento fatorial (6,58) subtraído da média dos pontos centrais (6,52) é muito pequena, indicando que os pontos centrais estão próximos do plano passando através dos pontos do planejamento fatorial, não havendo curvatura quadrática. O termo de interação também não foi importante, conforme mostra a Figura 3.6B, uma vez que as linhas das curvas de nível estão paralelas. A equação no item (3.5) representa o modelo linear para o pH.

$$y = 6,40 - 0,20 * X_1 + 0,90 * X_2 + 0,033 * X_1 * X_2 \quad (3.5)$$

Pela ANOVA podemos dizer que o modelo linear explica 99,42 % da variância, conforme valor de  $R^2$ . O gráfico da probabilidade normal, Figura 3.8A, permite afirmar que os resíduos obedecem à distribuição normal, e os valores previstos *versus* os valores observados confirmam que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que os pontos caem próximos à linha reta (Figura 3.8B).

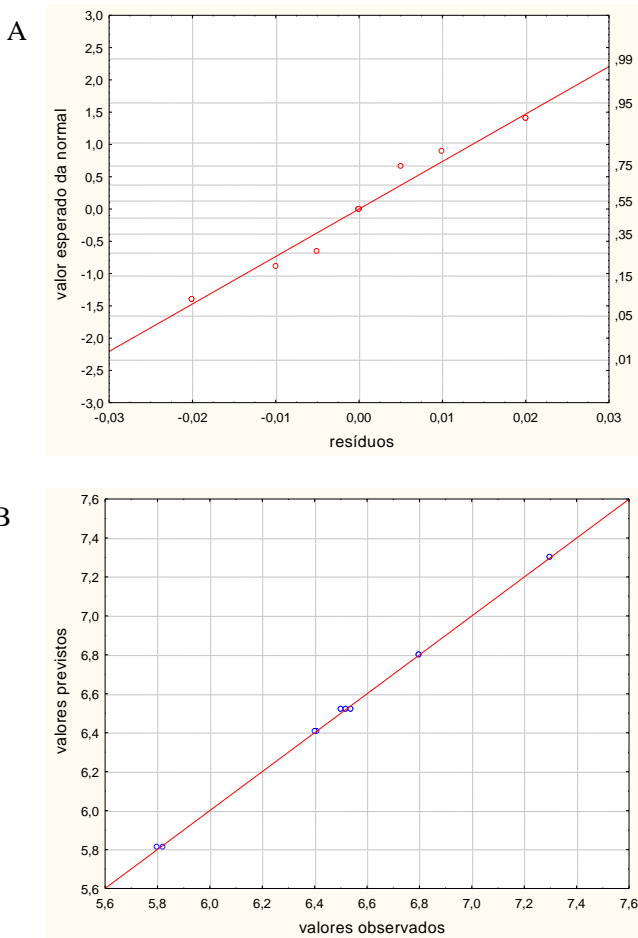


Figura 3.8 - Gráfico da probabilidade normal (A) e dos valores previstos versus os valores observados (B) para o pH.

Analisando a concentração de glucomananas, podemos observar no gráfico de pareto (Figura 3.9A) que os efeitos dos fatores gesso e calcita são significativos para  $p < 0,05$ . Os dois fatores influem negativamente sobre o processo. Porém, a interação entre os fatores, e a curvatura quadrática não influem sobre a concentração do polissacarídeo. As curvas de nível paralelas confirmam que a curvatura não é importante, conforme pode ser observado na Figura 3.9B.

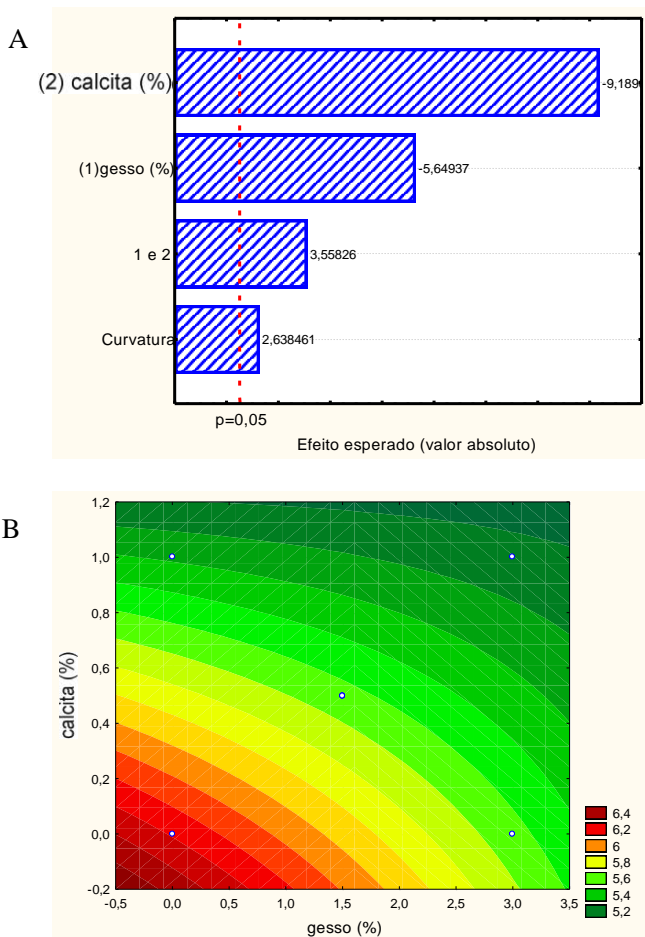


Figura 3.9 – Gráfico de Pareto (A) para os fatores significativos  $p < 0,05$  para a resposta concentração de glucanas e curvas de contorno (B) correspondente a superfície de resposta gerada pelo modelo linear em função do gesso e calcita adicionados aos grãos de trigo.

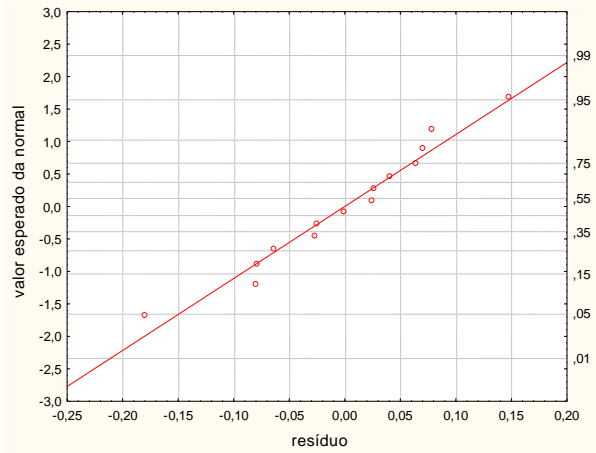
A Equação (3.6) representa o modelo linear para a concentração de glucomanas.

$$y = 6,19 - 0,22 * X_1 - 0,90 * X_2 + 0,168 * X_1 * X_2 \quad (3.6)$$

O modelo linear explica 88,99 % da variância, conforme valor de  $R^2$  apresentado na Tabela 10B da ANOVA (APÊNDICE B). O gráfico

da probabilidade normal, Figura 3.10A, permite afirmar que os resíduos obedecem à distribuição normal, e os valores previstos *versus* os valores observados confirmam que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que os pontos caem próximos à linha reta (Figura 3.10B).

A



B

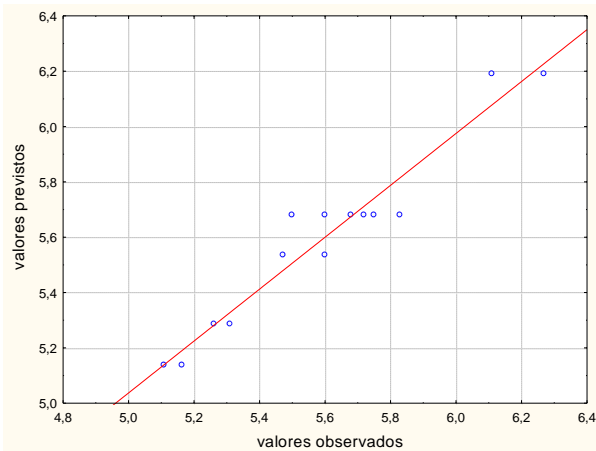


Figura 3.10 - Gráfico da probabilidade normal (A) e dos valores previstos versus os valores observados (B) para a concentração de glucomanas.

Esse método identifica em que região o ponto ótimo se encontra, e seria necessário um segundo experimento em direção a um modelo de segunda ordem para a produção de glucomanas. Devido a tendência



de a região estar em baixos níveis de concentração de gesso e cal, com indicação de não utilização desses corretores de pH para a obtenção de um cultivo com maiores concentrações de glucomananas, não foi realizado a otimização desses fatores.

A adição de sulfato de cálcio e carbonato de cálcio, diretamente sobre a superfície dos grãos, é uma prática comum na produção de inoculante em substratos sólidos (OEI, 1996; SCRASE, 1995). O cálcio também é utilizado para suplementar os substratos para cultivo de cogumelos (ROYSE; SANCHEZ-VAZQUEZ, 2003). Esses autores relataram que o  $\text{CaCO}_3$  regula o pH, mas que o  $\text{CaSO}_4$  não influenciaria sobre o pH dos substratos. Entretanto, os resultados obtidos demonstram que ambas fontes de cálcio controlam o pH, como também influem na produção de glucomananas. O  $\text{CaSO}_4$  diminui o pH, enquanto o  $\text{CaCO}_3$  alcaliniza o substrato. No entanto, ambas as fontes de cálcio diminuem a produção de glucomananas.

Grãos de trigo, sem adição das fontes de cálcio, apresentaram pH inicial de 6,4, valor próximo dos grãos suplementados com 1,5%  $\text{CaSO}_4$  e 0,5%  $\text{CaCO}_3$  (pH 6,5). Melhores resultados de produção de glucomananas foram obtidos sem nenhuma suplementação, ou com adição de até 0,25% de  $\text{CaCO}_3$  ao substrato. Esse resultado foi encontrado quando as superfícies de respostas do pH e das glucomananas foram sobrepostas com valor máximo de pH 6,6 (Figura 3.11).

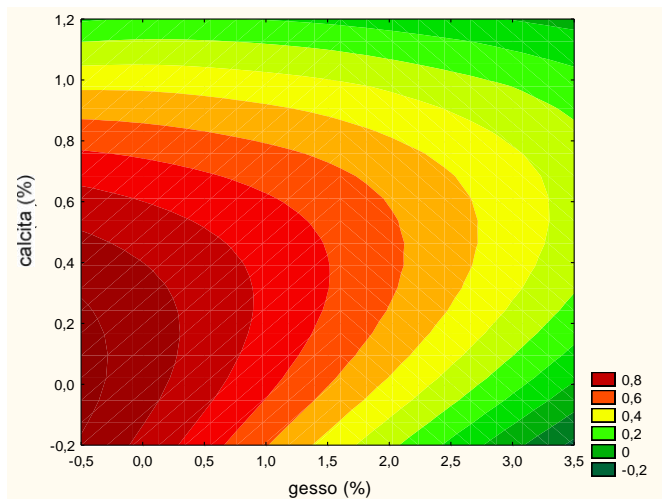


Figura 3.11 – Sobreposição das superfícies de resposta para o pH e concentração de glucomananas, considerando o pH entre 5,8 e 6,6.

A adição de  $\text{CaCO}_3$  em baixas concentrações é importante para manter a estrutura física do substrato (OEI, 1996), e também para a regulação do crescimento apical do micélio e formação das ramificações das hifas, promovida pelos íons cálcio (GADD, 1995).

### 3.3.5 Temperatura de incubação ótima e quantidade de inóculo inicial para o aumento da escala de produção de polissacarídeos

Para apurar a concentração de glucomananas foram avaliadas a temperatura de incubação e a quantidade de inóculo inicial (grãos previamente colonizados por *A. subrufescens*), visando o aumento da escala de cultivo por meio de um DCCR. Podemos observar na Tabela 3.9 os resultados dessa concentração nos diferentes níveis dos fatores.

Tabela 3.9 - Resultados do planejamento composto central rotacional e os respectivos níveis de variação para o estudo de suas influências na concentração de glucomananas de *Agaricus subrufescens*.

Experimento	Temperatura (°C)	Inóculo (%)	Glucomananas (mg.mL <sup>-1</sup> )
1	23,0	6,0	5,44
2	29,0	6,0	6,14
3	23,0	14,0	5,74
4	29,0	14,0	6,38
5	21,8	10,0	5,14
6	30,2	10,0	6,26
7	26,0	4,4	5,59
8	26,0	15,6	6,00
9	26,0	10,0	6,62
10	26,0	10,0	6,80
11	26,0	10,0	6,87
12	23,0	6,0	5,22
13	29,0	6,0	6,00
14	23,0	14,0	5,64
15	29,0	14,0	6,03
16	21,8	10,0	5,66
17	30,2	10,0	6,77
18	26,0	4,4	5,69
19	26,0	15,6	5,89
20	26,0	10,0	6,70
21	26,0	10,0	6,67
22	26,0	10,0	7,26

Os efeitos da temperatura de incubação (Q) e quantidade de inóculo inicial (Q) e (L), a interação entre eles e a média são significativos ( $p < 0,05$ ) para a produção das glucomananas. Os efeitos (Q) influem negativamente e os (L) influem positivamente sobre a concentração do polissacarídeo. Resultados são observados no gráfico de pareto da Figura 3.12A.

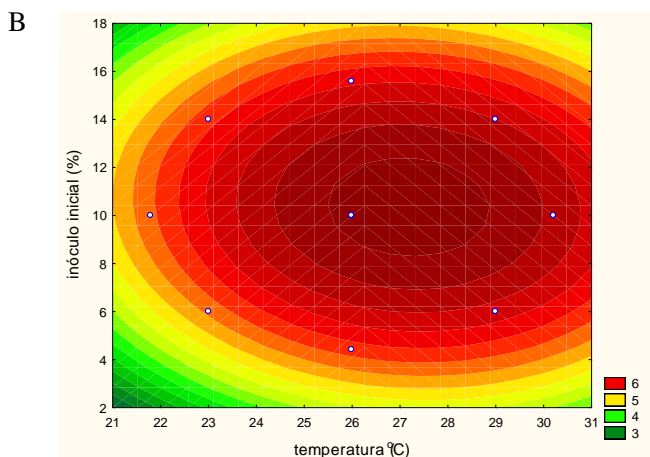
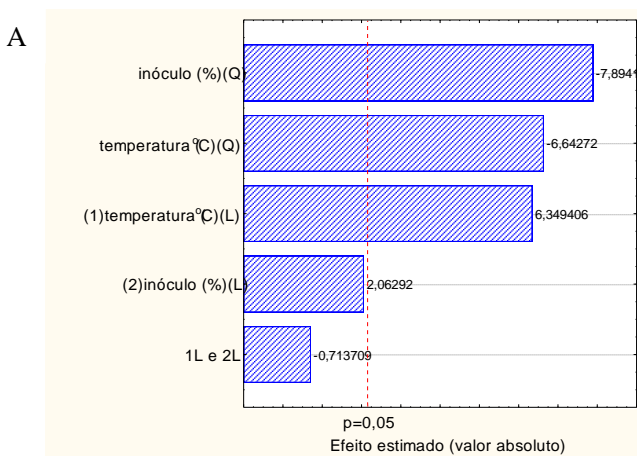


Figura 3.12 – Gráfico de pareto (A) para os fatores significativos  $p < 0,05$  para a resposta concentração de glucomananas e curvas de contorno (B) correspondente a superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático em função da quantidade de inóculo inicial e temperatura de incubação.

A correlação entre os fatores pode ser observada na curva de contorno gerada pelo modelo quadrático para a concentração de glucomananas (Figura 3.12B). Melhores resultados foram obtidos próximos dos pontos experimentais centrais. As Equações (3.7 e 3.8) representam o modelo completo e o simplificado, respectivamente.

$$y = -34,65 + 2,75 * X_1 + 0,81 * X_2 - 0,049 * X_1^2 - 0,003 * X_2^2 - 0,0047 * X_1 * X_2 \quad (3.7)$$

$$y = -34,65 + 2,75 * X_1 + 0,81 * X_2 - 0,049 * X_1^2 - 0,003 * X_2^2 \quad (3.8)$$

A validação desse modelo quadrático pela ANOVA pode ser observada na Tabela 5B (APÊNDICE B). A regressão é significativa, a falta de ajuste do modelo quadrático é significativa, porém o modelo quadrático explica melhor os resultados do que o modelo linear (dados não apresentados). A porcentagem de variação explicada é 91,72 % no modelo quadrático, com índices de 92,13 % de máxima variação explicável, com o  $R^2=0,91$ .

É possível verificar que uma maior concentração de glucomananas foi obtida para a temperatura de incubação de 26 °C e 10 % de inóculo inicial, ou seja, com adição de 25 g de grãos colonizados pelo fungo em frascos de 250 g de grãos. A superfície de resposta, Figura 3.12B, permite visualizar que o rendimento é mais sensível a mudanças na temperatura do que na quantidade de inóculo inicial. A otimização da produção de glucomananas seria com 10,3 % de inóculo inicial e temperatura de 27,2 °C. Nessa condição, o valor previsto foi 6,89 mg. mL<sup>-1</sup> de glucomananas, a máxima produção observada. Essa temperatura foi próxima da encontrada por Lin e Yang (2006) para um máximo rendimento de biomassa de *A. subrufescens* em FSm. Para esses autores, a quantidade do inóculo inicial também foi importante, afetando a fisiologia e crescimento do fungo. No entanto, essa temperatura é inferior a encontrada para o cultivo submerso (30,2 °C).

Os experimentos foram realizados em grãos de trigo com teor de umidade próximo do ideal (45,5 %) para a produção do polissacarídeo. O conteúdo adequado de umidade é importante devido à transferência de massa da água entre o tecido do fungo e o substrato, e sua relação com outros parâmetros como temperatura e aeração (GERVAIS; MOLIN, 2003). A condição estática adotada nos experimentos, sem aeração forçada, é um ponto crítico para a definição da quantidade de inóculo inicial, que deve permitir uma rápida colonização dos grãos, e propiciar quantidade suficiente de oxigênio (metabolismo aeróbico), além de

prevenir a saturação com CO<sub>2</sub>.

A respiração do fungo também produz água, com o fenômeno de evaporação endotérmica que gera a dissipação do calor (GERVAIS; MOLIN, 2003). Uma grande limitação do sistema de FES é a dificuldade de remoção desse calor, devido essencialmente a baixa condutividade térmica do estado sólido. No entanto, a passagem de ar forçado entre as partículas do substrato é utilizada para o controle de temperatura (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003). Temperaturas de incubação de *A. subrufescens* na FES em condições estáticas devem ser inferiores daquelas encontradas para a FSM, como mostrado no próximo capítulo. A quantidade de grãos utilizada inicialmente (100 g) e para o aumento da escala de produção (250 g) é baixa e a temperatura pode ser mais facilmente controlada, permitindo a determinação precisa da temperatura ótima de incubação.

### **3.3.6 Condições para o cultivo de *Agaricus subrufescens* no estado sólido a base de grãos de trigo para produção de polissacarídeos**

Polissacarídeos de *A. subrufescens* em FES podem ser consumidos como parte integral da biomassa, para a elaboração de alimentos funcionais. O polissacarídeo encontrado nesse processo foi identificado como glucomanana. A recuperação e purificação do polissacarídeo na FES, no entanto, são mais dispendiosas, e a utilização dessa biomassa na área de alimentos propõe uma redução nos custos (COUTO; SANROMÁN, 2006), aliado ao incremento dos grãos com esse polissacarídeo bioativo (MIZUNO et al., 1999).

Grãos de trigo integral são importante fonte de amido solúvel e outros polissacarídeos, além de proteínas e lipídeos (VAN der BORGHT et al., 2005), fornecendo nutrientes essenciais para o desenvolvimento de *A. subrufescens* nesse substrato. Para a realização da FES devem ser selecionados grãos de qualidade, orgânico e isento de fungos que produzem micotoxinas como *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (ROIGÉ et al., 2009).

Para a elaboração da FES para a produção de glucomanana é importante o tempo de cozimento e molho após o cozimento dos grãos de trigo, e conseqüentemente o teor de umidade, assim como o pH desse substrato. Também entre os fatores importantes estão a temperatura de incubação e quantidade inicial de inoculante. O tempo de cozimento de 21 min seguido de 24 min de molho após o cozimento dos grãos de trigo (umidade de 46,5 %) demonstrou ser ótimo para a produção das

glucomananas pelo fungo. A adição de  $\text{CaSO}_4$  (até 3 %) e  $\text{CaCO}_3$  (até 1 %) teve uma importante influência no pH do substrato. Porém, melhores resultados foram obtidos para a concentração de glucomanana quando o substrato não foi suplementado com cálcio, ou com adição máxima de 0,25 %  $\text{CaCO}_3$  (pH 6,6). A quantidade inicial de inoculante necessária para a melhor produção de glucomananas ( $6,89 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi aproximadamente 10,3 %, enquanto a temperatura ótima de incubação foi  $27,2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**CAPÍTULO IV**  
**CULTIVO DE *Agaricus subrufescens***  
**EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**  
**UTILIZANDO HIDROLISADOS DE**  
**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**





## 4 CULTIVO DE *Agaricus subrufescens* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

### 4.1 INTRODUÇÃO

A fermentação submersa (FSm) é uma área que tem se desenvolvido nas últimas décadas, possibilitando um maior controle do processo, menor risco de contaminação, e obtenção de micélio com maior pureza, já que a biomassa é facilmente separada do meio de cultivo e os polissacarídeos isolados. Além disso, é possível recuperar os polissacarídeos secretados pelo fungo no meio de cultura durante o seu desenvolvimento, aumentando o rendimento do processo.

Na FSm de microrganismos, os principais fatores que afetam o processo são a disponibilidade de carbono, tais como açúcares e outros carboidratos, fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, íons inorgânicos como fosfato, magnésio, ferro, cobre, manganês e zinco que são necessários para o crescimento; fatores físicos como temperatura, pH e o oxigênio em quantidade suficiente para o desenvolvimento da biomassa, favorecendo a obtenção do polissacarídeo da parede celular (CRUEGER; CRUEGER, 1990; GAO; GU, 2007).

Os meios de cultura quimicamente definidos são utilizados em pesquisas de laboratório, porém em escala industrial, por razões econômicas, são utilizados substratos complexos de composição variável, subprodutos de outras indústrias. Esses substratos devem ser adaptados para o cultivo por meio de processos de extração, suplementação e balanceamento da composição do meio visando aumentar o rendimento da produção do microrganismo selecionado, utilizando experimentos de triagem previamente ao cultivo em biorreatores (CRUEGER; CRUEGER, 1990).

Castilho et al. (2000) calcularam que o custo do meio de cultura na FSm foi cinco vezes maior em relação ao substrato sólido na FES para a produção da enzima lipase obtido no cultivo de *Penicillium restrictum*. A fim de diminuir os custos com o substrato líquido no cultivo de microrganismos para produção de seus metabólitos podem ser utilizados hidrolisados de resíduos agroindustriais tais como palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2004b), bagaço de cana (PANDEY et al., 2000), resíduo da cervejaria (MUSSATO; ROBERTO, 2006) e farelo de trigo (DOBREV et al., 2007). O aproveitamento desses resíduos minimiza a sua disposição em aterros, contribuindo para a preservação do meio ambiente.

O resíduo da cervejaria é um subproduto gerado no processo de fermentação, insolúvel em água e que representa 85 % do total de resíduos do processo, ou seja, aproximadamente 20 Kg.hL<sup>-1</sup> de cerveja produzida (VALVERDE, 1994). Esse resíduo é uma fonte rica de carbono, pois a sua composição contém em média 17 % de celulose, 28 % de polissacarídeos não-celulósicos, principalmente arabinoxilanas, e 28 % de lignina (MUSSATO; ROBERTO, 2006).

Por outro lado, com o processamento do trigo para obtenção da farinha é gerado o farelo de trigo, um subproduto que compõe 15-20 % do peso do grão. O farelo de trigo contém 38 % de glucoronoarabinoxilanas, 16 % de celulose, 6,6 % de lignina, 25 % de proteínas e ainda pequena quantidade de (1→3)-(1→4)-β-glucanas e arabinoxilanas (DOBREV et al., 2007).

A hidrólise do resíduo de cervejaria, assim como do farelo de trigo, pode liberar xilose, arabinose e glicose, mas também compostos tóxicos para os microrganismos como o hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético e compostos fenólicos, resultantes da degradação de hexoses, pentoses, grupos acetil da hemicelulose e lignina, respectivamente (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Para contornar os problemas de toxicidade dos hidrolisados, vários procedimentos têm sido utilizados, incluindo a precipitação de impurezas com a variação de pH, adsorção em carvão ativo, resinas de troca iônica, entre outros (CHANDEL et al., 2007; MUSSATO; ROBERTO, 2004a; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Dentre esses procedimentos, destaca-se o uso de carvão ativo, que vem sendo amplamente utilizado em processos de detoxificação para produção de xilitol (MUSSATO; ROBERTO, 2001, 2004b).

*Agaricus subrufescens* foi cultivado em substrato líquido obtido pela hidrólise dos resíduos agroindustriais como o farelo de trigo (FT) e o resíduo da cervejaria (RC). A concentração do ácido HCl, o tempo de hidrólise dos resíduos e a suplementação do meio líquido foram os fatores analisados em relação ao seu conteúdo de carbono, produção da biomassa, e a bioconversão dos substratos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Inóculo de cultivo

O fungo da espécie *A. subrufescens* utilizado neste experimento

está depositado na coleção de fungos do Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob código UFSC 51. Um exemplar da espécie está depositado no herbarium FLOR, sob código FLOR 11.797.

Para a inoculação do substrato líquido, o inóculo proveniente de meio de cultura sólido (BDA) em placas de petri colonizado por *A. subrufescens* foi fragmentado em 50 mL de solução de NaCl (8 g.L<sup>-1</sup>) com adição de carvão ativo (2 g.L<sup>-1</sup>). A fragmentação foi realizada em liquidificador, previamente esterilizado, a 3600 rpm durante 20 segundos. Frascos contendo 20 mL de substrato foram inoculados com 5 mL da suspensão miceliana.

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa STATISTICA 6.0.

#### **4.2.2 Resíduos agroindustriais**

Para preparação de meios de cultura líquidos foram utilizados farelo de trigo (FT), adquirido no mercado local, e resíduo da cervejaria (RC), doado pela Opabier Choperia<sup>1</sup>. Os resíduos foram desidratados a 60 °C, até peso constante, e armazenados a 8 °C.

#### **4.2.3 Hidrólise dos resíduos**

Foram utilizados 7 g dos resíduos e colocados em tubos de vidro Pirex (25 cm x 20 mm Ø), com adição de 70 mL de solução de HCl com concentrações definidas nos experimentos a seguir. A hidrólise foi realizada em bloco de digestão a 100 °C durante 30 min.

Após o resfriamento, o material foi centrifugado a 1100 g durante 10 min. O hidrolisado foi coletado, e distribuído em frações de 20 mL em erlenmeyers de 250 mL, com adição de 2 mL de solução de nutrientes e carvão ativo (2 g.L<sup>-1</sup>). O pH foi corrigido para 6 com NaOH 1 M. Os frascos foram tampados com três camadas de papel alumínio e papel kraft, e esterilizados em autoclave a 121° C durante 20 min. O restante do hidrolisado foi armazenado a -20 °C para análise da concentração de carbono.

---

<sup>1</sup>Endereço Opabier: rua Dona Francisca, n° 11.560, Distrito de Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina.

Após o resfriamento, os frascos foram inoculados com 5 mL de suspensão de *A. subrufescens* e incubados a 26 °C durante 10 dias.

#### **4.2.4 Suplementação com nutrientes**

Considerando que a esterilização por autoclavagem a 121 °C evapora aproximadamente 8 % do líquido nos frascos, foi preparada uma solução de nutrientes, sendo adicionados 2 mL dessa em 20 mL de hidrolisado. A concentração final dos nutrientes ( $\text{g.L}^{-1}$ ) na solução foi 1 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 de extrato de levedura, 0,1 de  $\text{MgSO}_4$ , 0,32 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 0,25 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Essas duas últimas correspondem a concentrações equimolares que tamponam o meio (ROSSI, 2006).

#### **4.2.5 Verificação preliminar das concentrações de HCl para a hidrólise dos resíduos**

Um planejamento experimental com um único fator foi utilizado para comparar três diferentes concentrações de HCl (0,25, 0,5 e 1,0 %, além do 0%) na hidrólise dos resíduos RC e FT, utilizando o hidrolisado para o cultivo de *A. subrufescens*, com ou sem adição de carvão ativo (2 g/L). As respostas analisadas foram concentração de carbono ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtida no cultivo de 10 dias.

Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média, comparados pela ANOVA e análise dos desvios, utilizando-se o teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos para o teste.

#### **4.2.6 Influência do tempo e concentração de HCl na hidrólise dos resíduos**

A concentração de HCl, o tempo de hidrólise, e o tipo de resíduo (RC e FT) foram fatores estudados por meio de um planejamento experimental fatorial completo  $2^3$ , tendo como resultados as concentrações de carbono ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtidas no cultivo. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas, sendo uma duplicata analisada com sete dias de cultivo e outra com 14 dias

(amostras destrutivas). Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação (-1 e +1) estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Fatores independentes do planejamento experimental fatorial completo  $2^3$  e seus respectivos níveis para o estudo do crescimento de *Agaricus subrufescens* nos hidrolisados do resíduo da cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT).

Fatores	Níveis de variação dos fatores	
	-1	+1
A) Concentração de HCl (%)	0,1	0,2
B) Tempo de hidrólise (min)	15	30
C) Resíduo	RC	FT

#### 4.2.7 Fatores limitantes do crescimento de *Agaricus subrufescens* nos hidrolisados

A fonte de nitrogênio e as toxinas nos hidrolisados são fatores limitantes para o crescimento de *A. subrufescens* em relação às diferentes concentrações de carbono. A concentração de HCl para a hidrólise dos resíduos RC e FT, a concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e carvão ativo na composição do meio líquido foram fatores estudados por meio de um planejamento experimental fatorial incompleto  $2^{4-1}$  para a resposta concentração de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtida no cultivo. Os experimentos foram realizados em triplicatas, analisados com 12 dias de cultivo. Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação (-1 e +1) estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Fatores independentes do planejamento experimental fatorial incompleto  $2^{4-1}$  e seus respectivos níveis para o estudo do crescimento do fungo *Agaricus subrufescens* nos hidrolisados do resíduo da cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT).

Fatores	Níveis de variação dos fatores	
	-1	+1
A) Resíduo	RC	FT
B) Concentração de HCl (%)	0,25	0,5
C) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	1	2
D) Carvão ativo ( $\text{g.L}^{-1}$ )	2	4

### 4.2.8 Otimização da hidrólise dos resíduos para o crescimento de *Agaricus subrufescens*

Um DCCR foi realizado para o resíduo RC e para FT, independentemente. A concentração de HCl e o tempo de hidrólise foram os fatores selecionados e estudados para as respostas concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de carbono e biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtida no cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e analisados com 10 dias de cultivo. Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  e  $+\alpha$ ) estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Definição dos fatores independentes do delineamento composto central rotacional e seus respectivos níveis para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Agaricus subrufescens* em hidrolisado do resíduo de cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT).

Fatores	Níveis de variação dos fatores				
	$-\alpha$	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$
A) Concentração de HCl (%)	0,09	0,15	0,30	0,45	0,51
B) Tempo de hidrólise (min)	16	20	30	40	44

### 4.2.9 Otimização do pH e temperatura de cultivo

Um DCCR foi realizado para o cultivo de *A. subrufescens* em hidrolisado de RC, utilizando solução de HCl 0,3 % e tempo de hidrólise de 30 min. O pH e a temperatura de incubação foram estudados para a resposta biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtida no cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e analisados com 10 dias de cultivo. Os fatores avaliados e os respectivos níveis de variação ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  e  $+\alpha$ ) estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Fatores independentes do delineamento composto central rotacional e seus respectivos níveis para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Agaricus subrufescens* em hidrolisado do resíduo de cervejaria.

Fatores	Níveis de variação dos fatores				
	$-\alpha$	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$
A) pH	5,3	5,5	6	6,5	6,7
B) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	21,8	23	26	29	30,2

#### 4.2.10 Métodos analíticos

As amostras foram analisadas quanto à concentração de carbono (C) e nitrogênio (N), pela digestão ácida das amostras segundo Tedesco et al. (1995). Amostras sólidas dos resíduos FT e RC, com 100 e 200 mg foram utilizadas, respectivamente, para as análises de C e N. No entanto, para os hidrolisados desses resíduos, foram utilizados 1 mL para ambas as análises. As análises foram realizadas em duplicatas para as amostras, e em triplicatas para o controle.

Após determinado período de cultivo de *A. subrufescens* nos hidrolisados, a biomassa foi separada por centrifugação a 1100 g, durante 5 min, e filtrada sob vácuo usando papel filtro previamente tarado. Essa biomassa foi desidratada a 55 °C até massa constante.

A bioconversão foi calculada pela quantidade de biomassa seca em relação à concentração de carbono inicial nos hidrolisados.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Quantidade de carbono e nitrogênio nos resíduos e seus hidrolisados

Os resíduos RC e FT, caracterizados quanto às concentrações de carbono e nitrogênio, apresentaram valores elevados de C, indicando serem fontes ricas em açúcares, principalmente na forma de polissacarídeos, como observado na Tabela 4.5. Esses resíduos apresentaram baixo conteúdo de N indicando não serem fontes eficientes de proteínas e aminoácidos.

Quando tais resíduos foram submetidos à hidrólise em água ou solução de HCl 0,5 % durante 30 min, com extração parcial de tais compostos, as concentrações de C foram muito superiores ao N, indicando que os íons  $H^+$  solvatados interagem principalmente com os grupamentos dos polissacarídeos.

Como os valores de N foram muito baixos nos hidrolisados foram adotadas as análises de C nos experimentos desenvolvidos a seguir e a suplementação com uma fonte de N.

Tabela 4.5 - Quantidade de carbono (C) e nitrogênio (N) nos resíduos de cervejaria (RC) e farelo de trigo (FT) e seus hidrolisados

Amostras	C (%)	N (%)	C:N
RC	48,6	5,0	9,5:1
FT	38,5	3,9	9,8:1
RC água	0,22	0,0014	157:1
FT água	0,24	0,0012	200:1
RC HCl 0,5 %	0,48	0,0002	2400:1
FT HCl 0,5 %	0,53	0,0002	2650:1

Segundo Mandalari et al. (2005) os resíduos RC e FT são ricos em polissacarídeos celulósicos e não-celulósicos (hemiceluloses), e também fitonutrientes como o ácido ferrúlico. Quando esses resíduos foram hidrolisados em água a 80 °C liberaram compostos de glicose, e em meio alcalino (KOH) liberaram principalmente o polissacarídeo não-celulósico arabinoxilana, composto por monômeros de pentoses tipo xiloses e arabinoses.

Além desses polissacarídeos o FT contém amido (~ 26 %),  $\alpha$ -glucanas que podem ser hidrolisadas e liberar monômeros de glicose (DOBREV et al., 2007; TESTER; KARKALAS, 2002). As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos da celulose, mas também podem pertencer ao grupo das hemiceluloses com ligações do tipo (1→3)- $\beta$ - e (1→4)- $\beta$ - (KLEMM; SHAMAUDER; HEINZE, 2002), o que explica o conteúdo de glicoses na hidrólise em água a 80 °C. Na hidrólise ácida de RC foi relatada maior quantidade de xilose, seguido por arabinose, e pouca glicose (MUSSATO; ROBERTO, 2005).

#### 4.3.2 Verificação preliminar das concentrações de HCl para a hidrólise do resíduo da cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT)

Com o aumento da concentração de HCl na solução, aumentou a quantidade de C no hidrolisado, porém na concentração de HCl 1% não houve um crescimento do fungo proporcional ao aumento de C (Figura 4.1). Os polissacarídeos do resíduo ao serem hidrolisados podem ser degradados em substâncias tóxicas como ácidos fracos, furanos (furfural, hidroximetilfurfural) e compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a), e o processo de detoxificação por carvão ativo não foi eficiente ou suficiente para o cultivo desse fungo.

Porém, para o cultivo de *Candida shehatae* e produção de etanol, o tratamento com carvão ativo foi o segundo melhor tratamento para



detoxificação de compostos tóxicos do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando HCl 2,5 %. Esse tratamento reduziu 38,7 % de furanos e 57,5 % de compostos fenólicos totais (CHANDEL et al., 2007).

O carvão ativo, adicionado no momento da hidrólise, é uma alternativa para aumentar a adsorção dos compostos tóxicos, pois o pH ácido favorece a adsorção dos compostos fenólicos e a temperatura de 100 °C aumenta a razão de difusão das moléculas em solução para o carvão adsorvente, causando melhor interação entre esses (MUSSATO; ROBERTO, 2004a). Esse processo é interessante porque possibilita o cultivo com o hidrolisado em biorreator, pois o carvão sob agitação aumenta a espuma podendo carrear a biomassa para a linha de saída de ar, além de diminuir a visibilidade da biomassa.

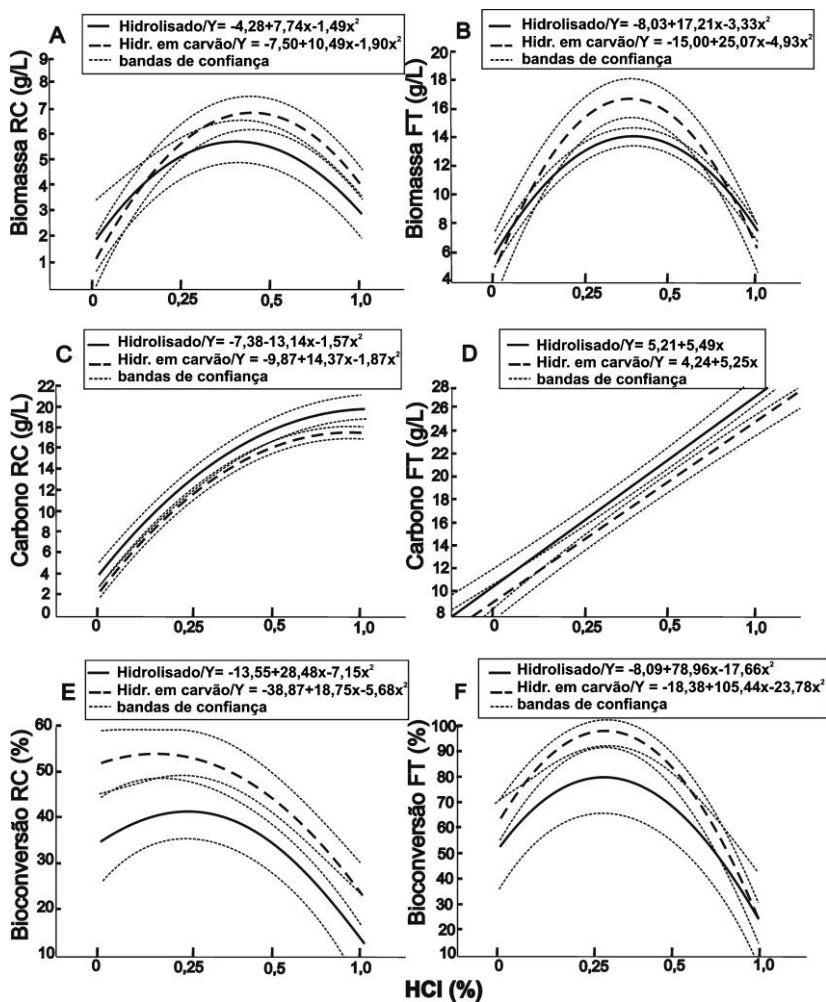


Figura 4.1 – Gráficos das médias da biomassa obtida no cultivo do fungo *Agaricus subrufescens* para os hidrolisados dos resíduos RC (A) e FT (B), concentração de carbono nos hidrolisados RC (C) e FT (D), e bioconversão do carbono em biomassa no 12<sup>o</sup> dia de cultivo para os hidrolisados RC (E) e FT (F) para as concentrações de HCl de 0, 0,25, 0,5 e 1% na hidrólise sem ou com carvão ativo comparativamente. As equações da reta foram calculadas em quadruplicatas, com bandas de confiança para  $p < 0,05$ .

### 4.3.3 Influência do tempo e concentração de HCl na hidrólise dos resíduos e produção de biomassa

Os resultados para a biomassa no 7º e no 14º dia de cultivo e concentração de carbono nos hidrolisados para as diferentes concentrações de HCl e tempos de hidrólise dos resíduos RC e FT estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Resultados do planejamento experimental fatorial completo 2<sup>3</sup> para o estudo da influência da concentração de HCl e tempo de hidrólise dos resíduos RC (1) e FT (2) no crescimento do fungo *Agaricus subrufescens*.

Experimento	Replicata	Tempo	HCl (%)	Resíduo	Biomassa 7d (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa 14d (g.L <sup>-1</sup> )	Carbono (g.L <sup>-1</sup> )
1	1	15	0,1	1	1,17	5,74	8,38
2	1	30	0,1	1	2,30	8,67	11,02
3	1	15	0,2	1	2,69	5,34	11,18
4	1	30	0,2	1	4,89	8,67	14,83
6	1	15	0,1	2	3,04	11,84	13,35
7	1	30	0,1	2	6,70	10,85	17,24
7	1	15	0,2	2	3,50	14,63	18,48
8	1	30	0,2	2	7,30	17,51	20,19
9	2	15	0,1	1	1,01	6,17	8,07
10	2	30	0,1	1	2,41	9,30	11,18
11	2	15	0,2	1	3,03	6,17	11,49
12	2	30	0,2	1	4,50	9,30	15,06
14	2	15	0,1	2	4,96	11,19	13,20
15	2	30	0,1	2	10,45	11,32	17,55
15	2	15	0,2	2	5,53	15,15	18,18
16	2	30	0,2	2	5,27	17,59	20,04

Para a resposta biomassa no 7º dia de cultivo podem ser observados na Tabela 1C (APÊNDICE C), para o cálculo dos efeitos, que a média, o fator tempo e resíduo são significativos, e o modelo é representativo. O cálculo dos efeitos para a resposta biomassa no 14º dia de cultivo pode ser observado na Tabela 2C (APÊNDICE C). A média, o fator tempo, concentração de HCl, resíduo e todas as interações são significativas, e modelo também é representativo.

O gráfico das médias pode ser visualizado na Figura 4.2, observando que o rendimento da biomassa aumenta com o aumento do tempo de hidrólise para os dois resíduos RC e FT (Figura 4.2A e 4.2B, respectivamente). Maiores rendimentos podem ser observados quando utilizados a concentração de HCl 0,2% e o tempo de hidrólise de 30 min para o resíduo FT.

A Tabela 3C (APÊNDICE C) apresenta o cálculo dos efeitos para a resposta concentração de carbono no hidrolisado, utilizado no cultivo. Podemos observar que a média, os fatores tempo de hidrólise, concentração de HCl, o tipo do resíduo e a interação desses fatores, exceto entre 1 e 3, ou seja, tempo de hidrólise e resíduo, são significativas.

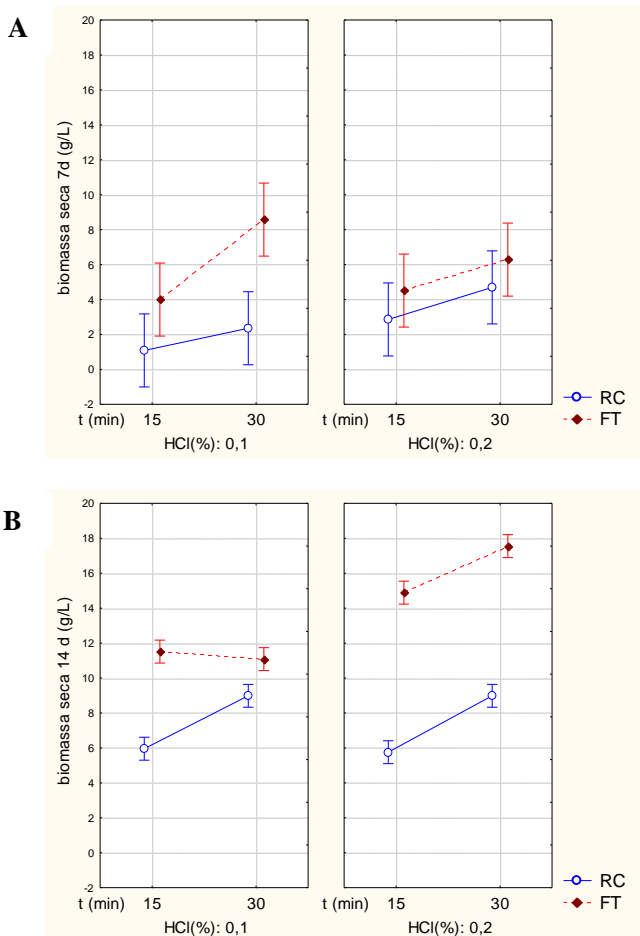


Figura 4.2 – Gráfico das médias da biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no 7º (A) e 14º (B) dias de cultivo de *Agaricus subrufescens*, considerando diferentes concentrações de HCl e tempos (t) de hidrólise dos resíduos FT e RC.

A Figura 4.3 apresenta as curvas de contorno para a concentração de carbono no resíduo RC e resíduo FT em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise. Os dois resíduos apresentaram aumento de carbono no hidrolisado conforme aumento na concentração do ácido de 0,1 para 0,2 %, e aumento do tempo de hidrólise de 15 para 30 min.

Esses resultados demonstraram que pequenas diferenças na concentração do ácido são suficientes para se obter um aumento da biomassa desde o início do cultivo. O tempo de hidrólise também é importante para a quantidade de C no hidrolisado. Esse experimento foi importante para se conhecer e obter informações sobre o processo e elaboração dos delineamentos experimentais subseqüentes.

A quantidade de C é dependente principalmente do resíduo utilizado, fato que pode ser observado na Figura 4.3, onde a quantidade de C para a maior concentração de HCl (0,2 %) e maior tempo de hidrólise (30 min) difere entre os resíduos. Foi obtida uma média de  $14,9 \text{ g.L}^{-1}$  de C para o hidrolisado de RC e  $20,1 \text{ g.L}^{-1}$  para FT.

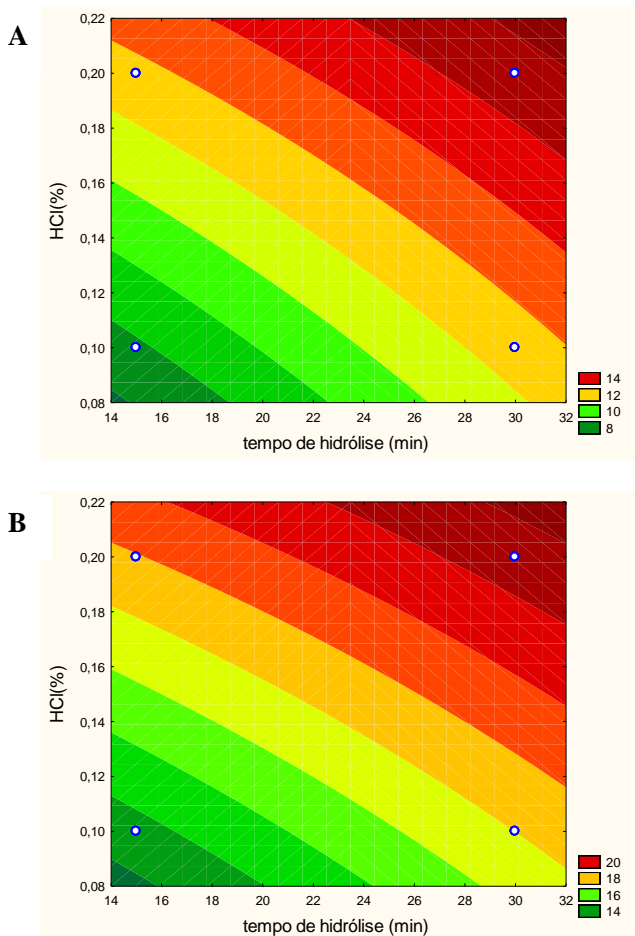


Figura 4.3 – Curvas de contorno para a resposta da concentração de carbono (g.L<sup>-1</sup>) no resíduo RC (A) e FT (B) em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise.

#### 4.3.4 Fatores limitantes no hidrolisado para o crescimento de *Agaricus subrufescens*

Os resultados do estudo preliminar de fatores limitantes para o cultivo de *A. subrufescens* em relação à concentração de C estão apresentados na Tabela 4.7. Os fatores concentração de HCl (1) e tipo de resíduo (3) e a interação entre eles são significativos, porém os fatores

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  (2) e carvão (4) na concentrações estudadas não influem significativamente no cultivo. A interação de segunda ordem entre os fatores 1 e 4 foram significativos possivelmente devido a influência do fator 1 (Figura 4.4).

Tabela 4.7 – Resultados planejamento experimental fatorial incompleto  $2^{4-1}$  e seus respectivos níveis para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Agaricus subrufescens* no hidrolisado dos resíduos RC (1) e FT (2)

Experi mento	Repli cata	HCl (%)	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Resíduo	Carvão ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )
1	1	0,25	1	1	2	8,55
2	1	0,50	1	1	4	13,41
3	1	0,25	2	1	4	8,55
4	1	0,50	2	1	2	9,47
5	1	0,25	1	2	4	14,32
6	1	0,50	1	2	2	19,73
7	1	0,25	2	2	2	15,34
8	1	0,50	2	2	4	21,61
9	2	0,25	1	1	2	8,24
10	2	0,50	1	1	4	13,21
11	2	0,25	2	1	4	9,00
12	2	0,50	2	1	2	9,79
13	2	0,25	1	2	4	15,75
14	2	0,50	1	2	2	18,38
15	2	0,25	2	2	2	16,56
16	2	0,50	2	2	4	22,43
17	3	0,25	1	1	2	11,46
18	3	0,50	1	1	4	13,07
19	3	0,25	2	1	4	8,54
20	3	0,50	2	1	2	9,99
21	3	0,25	1	2	4	15,78
22	3	0,50	1	2	2	20,77
23	3	0,25	2	2	2	16,04
24	3	0,50	2	2	4	18,72

Como esse planejamento não é completo, os valores dos efeitos dos fatores encontrados são ditos contrastes. A relação geradora desse planejamento fatorial incompleto é  $4=123$ , com resolução IV, ou seja,  $I=1234$ . Nenhum efeito principal é confundido ou superposto com outros efeitos principais ou com qualquer outro efeito de segunda ordem, porém interações de segunda ordem são confundidas entre si (CALADO; MONTGOMERY, 2003). É possível diferenciar os efeitos

dessa interação, que são chamados de pares associados ou alises, como pode ser observado na Tabela 4C (APÊNDICE C).

No entanto, num planejamento fatorial fracionário é importante analisar esses efeitos por meio do contraste relativo aos fatores mostrados na Tabela 5C (APÊNDICE C). Os efeitos dos fatores (2) e (4) e da interação entre eles e o fator (1) não foram significativos, dentro da faixa estudada, pois o valor zero está contido no seu respectivo intervalo de confiança. Nesse caso nenhum efeito principal foi confundido, mas a interação entre os fatores é menos importante, já que são confundidos entre si.

O gráfico de Pareto, Figura 4.4, apresentou claramente os fatores que são significativos para  $p < 0,05$ . Esses resultados evidenciaram que as diferentes concentrações de HCl que influem no cultivo e no aumento da biomassa não necessitaram de maiores concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou carvão ativo, sendo suficientes e considerados para os experimentos subsequentes os menores valores de 1 e 2  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

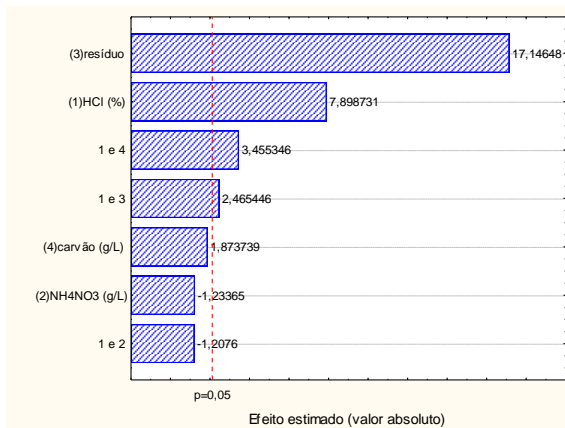


Figura 4.4 - Gráfico de Pareto para os fatores significativos  $p < 0,05$  para a resposta biomassa de *Agaricus subrufescens*.

### 4.3.5 Otimização da hidrólise dos resíduos

Os experimentos foram realizados separadamente para cada resíduo RC e FT, porém os resultados estão apresentados na mesma Tabela 4.8.



Tabela 4.8- Resultados do delineamento composto central rotacional e seus respectivos níveis para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Agaricus subrufescens* em hidrolisado do resíduo RC (1) e FT (2).

Ex Peri men to	Re pli ca ta	HCl (%)	Tem po hi dró lise (min)	Bio massa RC (g.L <sup>-1</sup> )	Bio massa FT (g.L <sup>-1</sup> )	Carbo no RC (g.L <sup>-1</sup> )	Carbo no FT (g.L <sup>-1</sup> )	Bio com ver são RC (%)	Bio com ver são FT (%)
1	1	0,15	20	6,15	14,73	6,40	15,38	96,0	95,8
2	1	0,15	40	4,91	17,00	8,73	19,25	56,3	88,3
3	1	0,45	20	9,98	22,08	15,54	24,65	64,2	89,6
4	1	0,45	40	6,95	22,73	18,17	26,22	38,3	86,7
5	1	0,09	30	4,70	9,60	5,01	13,68	93,8	70,2
6	1	0,51	30	7,12	21,19	14,92	27,92	47,7	75,9
7	1	0,30	16	9,02	18,97	11,36	19,10	79,4	99,3
8	1	0,30	44	7,77	19,52	13,53	21,88	57,4	89,2
9	1	0,30	30	7,67	20,84	12,91	22,66	59,4	92,0
10	1	0,30	30	8,10	20,51	12,60	22,21	64,3	92,4
11	1	0,30	30	7,68	20,49	12,75	22,66	60,2	90,4
12	2	0,15	20	6,40	12,40	6,99	16,00	91,6	77,5
13	2	0,15	40	5,46	16,27	8,57	19,10	63,7	85,2
14	2	0,45	20	9,33	22,01	15,85	24,52	58,9	89,8
15	2	0,45	40	5,78	21,18	19,25	26,06	30,0	81,3
16	2	0,09	30	4,65	9,40	5,10	13,22	91,2	71,2
17	2	0,51	30	7,40	22,47	15,85	28,23	46,7	79,6
18	2	0,30	16	9,04	17,06	11,51	20,18	78,5	84,5
19	2	0,30	44	7,73	18,63	13,83	22,35	55,9	83,4
20	2	0,30	30	7,95	20,84	13,22	23,28	60,2	89,5
21	2	0,30	30	8,16	20,69	12,75	23,74	64,0	87,1
22	2	0,30	30	8,04	21,19	13,37	24,67	60,1	85,9

#### 4.3.6 Quantidade de biomassa, carbono e bioconversão para os hidrolisados do resíduo RC

Para a resposta biomassa obtida no cultivo de *A. subrufescens* no hidrolisado do resíduo RC, pode ser observado na Tabela 6C (APÊNDICE C), do cálculo dos efeitos, que a média, o fator concentração de HCl (L) e (Q), e o fator tempo de hidrólise (L) são significativos, e o modelo é representativo.

A concentração de HCl influi positivamente sobre o cultivo de *A. subrufescens*, aumentando a biomassa, porém o tempo de hidrólise influi negativamente sobre a obtenção da biomassa, ou seja, conforme aumentou o tempo de hidrólise diminuiu a biomassa. O gráfico de pareto, Figura 4.5A, apresenta claramente os fatores que são significativos para  $p < 0,05$ .

Analisando os resultados de biomassa e a relação funcional entre os fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo RC, podemos observar na Tabela 7C (APÊNDICE C), para o modelo quadrático, que os fatores concentração de HCl (Q) e (L), apresentam coeficientes significativos para  $p < 0,05$ . A Equação (4.1) corresponde ao modelo completo e, segundo modelo, a Equação (4.2) considera apenas os fatores e as interações que apresentam significância ( $p < 0,05$ ).

$$y = 2,02 + 46,11 * X_1 - 0,06 * X_2 - 47,11 * X_1^2 + 0,001 * X_2^2 - 0,36 * X_1 * X_2 \quad (4.1)$$

$$y = 46,11 * X_1 - 47,11 * X_1^2 - 0,36 * X_1 * X_2 \quad (4.2)$$

A ANOVA realizada para o modelo quadrático considerando a biomassa pode ser observada na Tabela 8C (APÊNDICE C). Observando essa tabela notamos que a regressão é significativa, ou seja, o modelo quadrático explica melhor os resultados do que o modelo linear (dados não apresentados).

Analisando os cultivos que relacionam os fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo RC, podemos verificar que uma maior biomassa ( $9,65 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi obtida para a concentração de HCl 0,45 % e 20 min de hidrólise. A Figura 4.5B apresenta a curva de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise para a resposta biomassa. Podemos verificar que um maior rendimento de biomassa seria obtida para a mesma concentração de HCl, ou seja, 0,45 %, mas com menor nível de tempo de hidrólise, ou seja, 16 min.

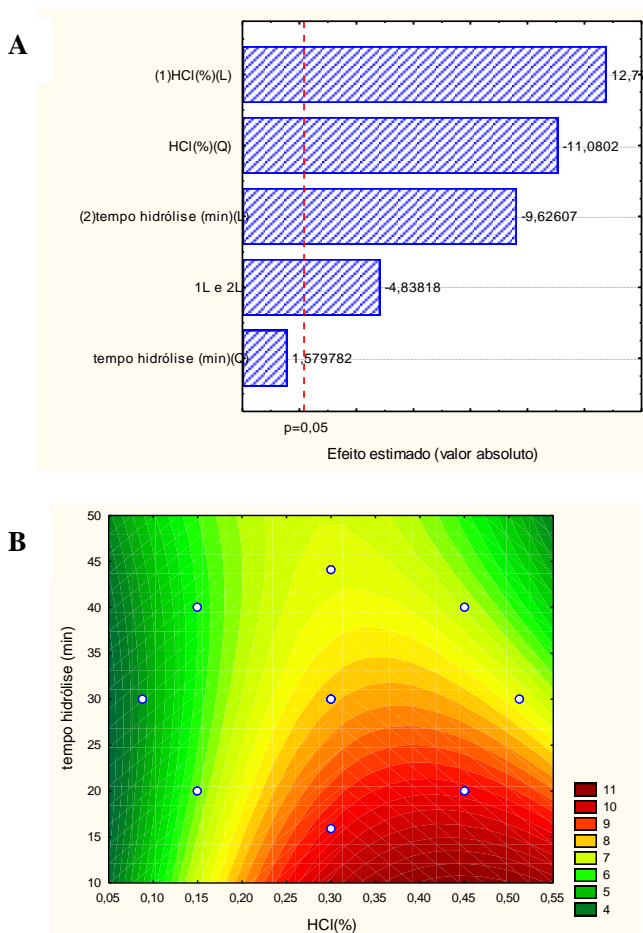


Figura 4.5 – Gráfico de Pareto (A) e curva de contorno (B) para a resposta biomassa em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise para RC.

Para a resposta carbono no hidrolisado do resíduo RC, pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 4.6A) que a média, os fatores concentração de HCl (L) e (Q), e o fator tempo de hidrólise (L) são significativos. A concentração de HCl e tempo de hidrólise influem positivamente sobre o processo, aumentando o carbono nos hidrolisados. Analisando a relação funcional entre os fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo RC podemos observar na Tabela 9C (APÊNDICE C), que os fatores concentração de HCl (Q) e (L), apresentam coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) para o

modelo quadrático. As equações dos modelos completo (4.3) e simplificado (4.4) são apresentadas abaixo:

$$y = -0,63 + 51,89 * X_1 + 0,003 * X_2 - 48,62 * X_1^2 + 0,001 * X_2^2 - 0,18 * X_1 * X_2 \quad (4.3)$$

$$y = 51,89 * X_1 - 48,62 * X_1^2 \quad (4.4)$$

A análise de variância para a resposta carbono pode ser observada na Tabela 10C (APÊNDICE C). Observamos que a regressão e a falta de ajuste são significativas, com uma tendência ao modelo linear. Porém, o modelo quadrático ainda explica melhor os resultados, com porcentagem de variação explicada passando de 91,46 % no modelo linear para 96,36 % no modelo quadrático, com índices de 99,46 % de máxima variação explicável, e seu  $R^2=0,96$ .

A concentração de carbono nos hidrolisados do resíduo RC pode ser observada na curva de contorno (Figura 4.6B) em função da concentração de HCl e do tempo de hidrólise. A concentração aumenta conforme os maiores níveis das concentrações de HCl e do tempo de hidrólise, influenciando positivamente sobre o processo e atingindo o valor de  $18,7 \text{ g.L}^{-1}$  com HCl 0,45 % e 40 min de hidrólise.

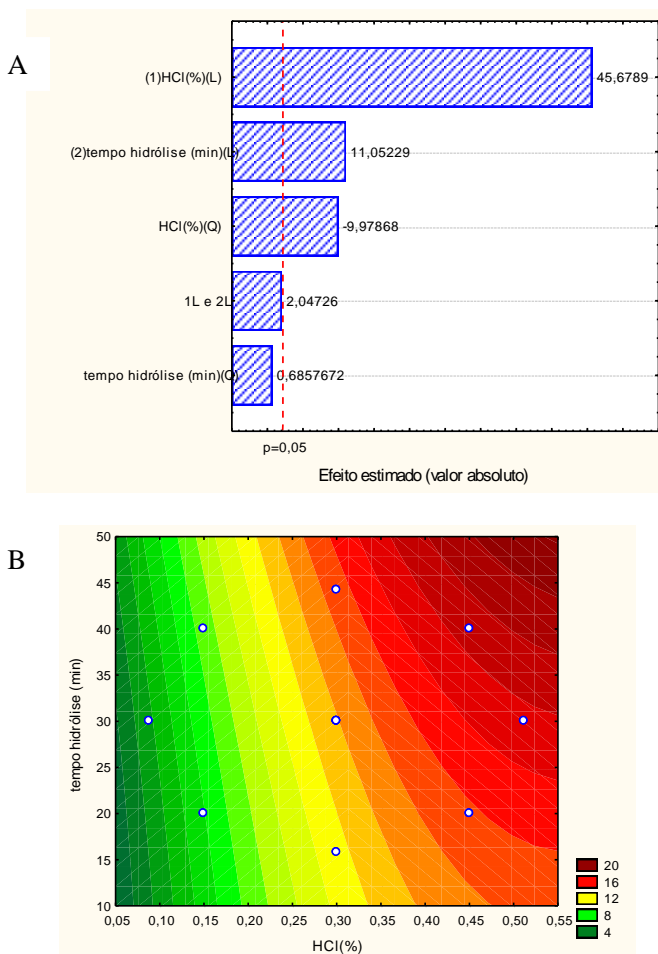
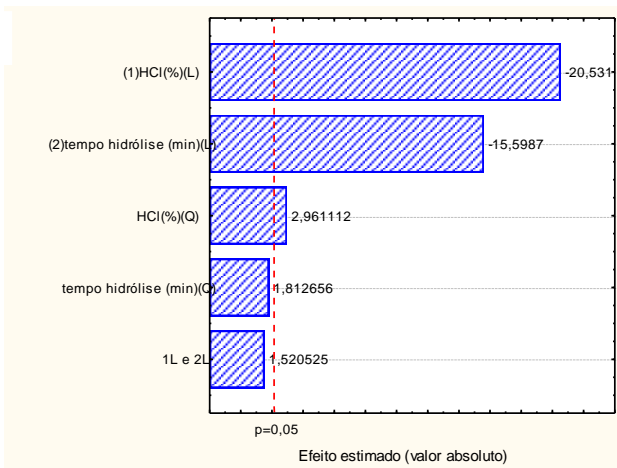


Figura 4.6 – Gráfico de Pareto (A) e curva de contorno (B) para a resposta carbono em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise para RC.

Para a bioconversão da fonte de carbono do resíduo RC em biomassa de *A. subrufescens* pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 4.7A) que a média, o fator concentração de HCl (L) e (Q), e o fator tempo de hidrólise (L) são significativos ( $p < 0,05$ ).

Podemos observar que a concentração de HCl (L) e o tempo de hidrólise (L) influem negativamente sobre a bioconversão, enquanto a concentração de HCl (Q) influi positivamente, conforme observado na curva de contorno da Figura 4.7B.

A



B

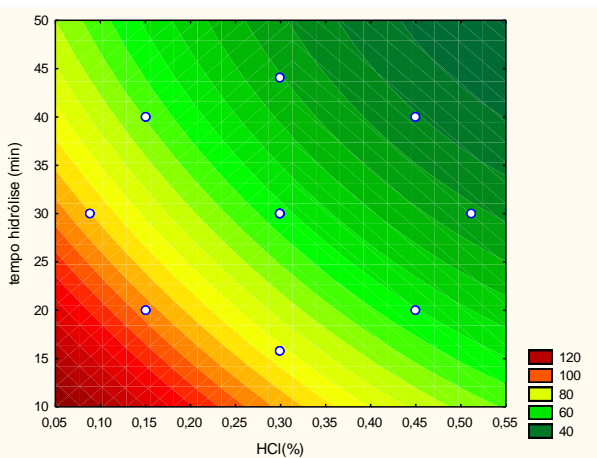


Figura 4.7 – Gráfico de Pareto (A) e curva de contorno (B) para a resposta bioconversão de carbono em biomassa em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise para RC.

Analisando a relação funcional entre os fatores na Tabela 11C (APÊNDICE C), considerando a bioconversão, podemos observar que os fatores concentração de HCl (Q) e (L), e o fator tempo de extração (L) possuem coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) para o modelo quadrático. As equações que representam os modelos completo (4.5) e simplificado (4.6) são apresentados abaixo:

$$y = 161 - 20360 * X_1 - 2,44 * X_2 + 11645 * X_1^2 + 0,02 * X_2^2 + 1,06 * X_1 * X_2 \quad (4.5)$$

$$y = 161 - 20360 * X_1 - 2,44 * X_2 + 11645 * X_1^2 \quad (4.6)$$

A análise de variância para a resposta bioconversão pode ser observada na tabela 12C (APÊNDICE C). A regressão é significativa, e o modelo quadrático explica melhor os resultados com índices de 90,36 % de máxima variação explicável, e seu  $R^2=0,92$ .

A concentração de HCl e tempo de hidrólise influem negativamente sobre a bioconversão, ou seja, quanto maiores os valores desses fatores menor a bioconversão de carbono do hidrolisado RC em biomassa fúngica, atingindo valores próximos de 93,8 % para a concentração de HCl 0,15 % (-1) e 20 min (-1) de hidrólise (Figura 4.7B).

Esses resultados de bioconversão parecem discrepantes quando comparados com dados obtidos por Liu e Wang (2007) para bioconversão da glicose em biomassa fúngica. Esses autores encontraram 41,3 % de bioconversão no cultivo em frascos. Porém, deve-se considerar que as moléculas de glicose possuem 40 % de carbono, e os resultados obtidos referem-se à quantidade total e direta de carbono nos hidrolisados.

### 4.3.7 Quantidade de biomassa, carbono e bioconversão para os hidrolisados do resíduo FT

A presente análise estatística também foi realizada para o hidrolisado do resíduo FT. A resposta da biomassa obtida no cultivo de *A. subrufescens* nos diferentes hidrolisados pode ser observada no gráfico de pareto (Figura 4.8A), no qual vemos que a média, os fatores concentração de HCl (L) e (Q), os fatores tempo de hidrólise (L) e (Q) e a interação entre eles são estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

O fator linear para concentração de HCl influi positivamente e o tempo de hidrólise influi negativamente sobre o cultivo de *A. subrufescens*. Isto significa que quanto maior a concentração de HCl e menor o tempo de hidrólise, maior a quantidade de biomassa obtida no cultivo.

A concentração de HCl influi positivamente sobre o cultivo de *A. subrufescens*, aumentando a biomassa, porém o tempo de hidrólise influi

negativamente sobre a obtenção da biomassa, ou seja, conforme aumenta o tempo de hidrólise diminui a biomassa (Figura 4.8B).

Podemos observar a relação funcional entre esses fatores na Tabela 13C (APÊNDICE C), para o modelo quadrático. Todos os fatores, ou seja, concentração de HCl (Q) e (L), tempo de hidrólise (Q) e (L), e a interação entre esses apresentam coeficientes significativos para  $p < 0,05$ . A equação completa e a simplificada são iguais para o modelo quadrático apresentada abaixo (4.7), pois todos os fatores e as interações apresentam significância.

$$y = -8,92 + 100,1 \cdot X_1 + 0,66 \cdot X_2 - 97,14 \cdot X_1^2 - 0,007 \cdot X_2^2 - 0,52 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (4.7)$$

A Tabela 14C (APÊNDICE C) apresenta a análise de variância para validação do modelo quadrático para a biomassa no cultivo. A regressão é significativa e o modelo quadrático explica melhor os resultados, com índices de 93,90 % de máxima variação explicável, e seu  $R^2=0,94$ .

O melhor rendimento de biomassa foi 22,1 g.L<sup>-1</sup> também para a concentração de HCl 0,45 % e 20 min de hidrólise do resíduo FT. A Figura 4.8B apresenta a superfície de resposta para a resposta biomassa em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise. Podemos verificar que uma maior biomassa seria obtida para um menor nível de tempo de hidrólise, ou seja, de 16 min (- $\alpha$ ).



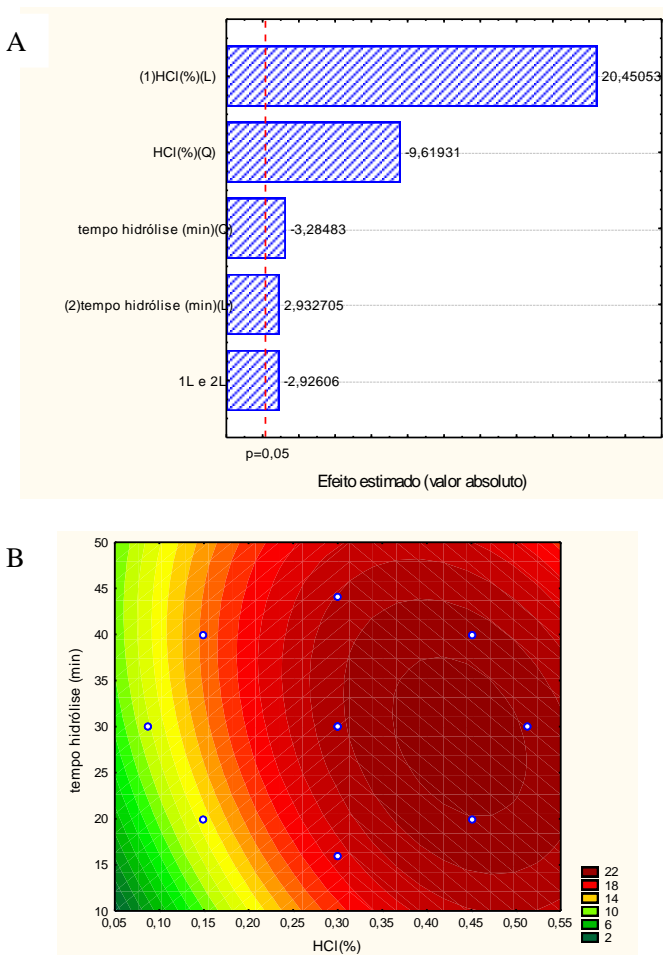


Figura 4.8 – Gráfico de pareto (A) e curva de contorno (B) para a biomassa em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo FT.

Para a resposta carbono no hidrolisado do resíduo FT podem ser observados no gráfico de pareto (Figura 4.9A) que a média, os fatores concentração de HCl (L) e (Q), e os fatores tempo de hidrólise (L) e (Q) são significativos. A concentração de HCl (L) e tempo de hidrólise (L) influem positivamente sobre o processo, aumentando o carbono nos hidrolisados.

Para os resultados da concentração de carbono nos hidrolisados obtidos do delineamento composto central rotacional e a relação

funcional entre os fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo FT podemos observar na Tabela 15C (APÊNDICE C), para o modelo quadrático, que todos os fatores para (Q) e (L), e a interação entre eles apresentam coeficientes significativos para  $p < 0,05$ . A equação que representa os modelos completo e simplificado é apresentada abaixo (4.8).

$$y = -5,48 + 68,77 * X_1 + 0,81 * X_2 - 47,79 * X_1^2 - 0,01 * X_2^2 - 0,32 * X_1 * X_2 \quad (4.8)$$

Pela análise de variância para a resposta carbono (Tabela 16C, APÊNDICE C) podemos observar que a regressão foi significativa. A porcentagem de variação explicada foi 96,71 % no modelo quadrático, com índices de 98,69 % de máxima variação explicável, e seu  $R^2=0,96$ . O modelo quadrático explica melhor os resultados obtidos.

Na superfície de resposta (Figura 4.9B) verifica-se que a concentração de carbono de FT aumenta conforme os maiores níveis de concentrações de HCl e tempo de hidrólise, influenciando positivamente sobre o processo, assim como nos resultados obtidos em RC. Entretanto, foram obtidos maiores quantidades de carbono para esse resíduo, de aproximadamente  $28,1 \text{ g.L}^{-1}$  com HCL 0,51 % e 30 min de hidrólise.

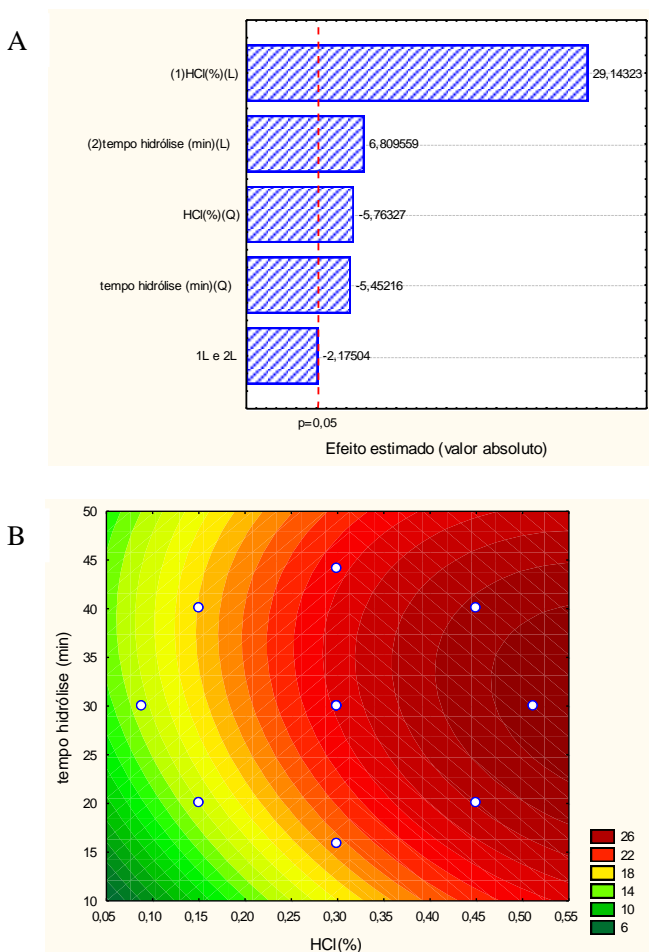
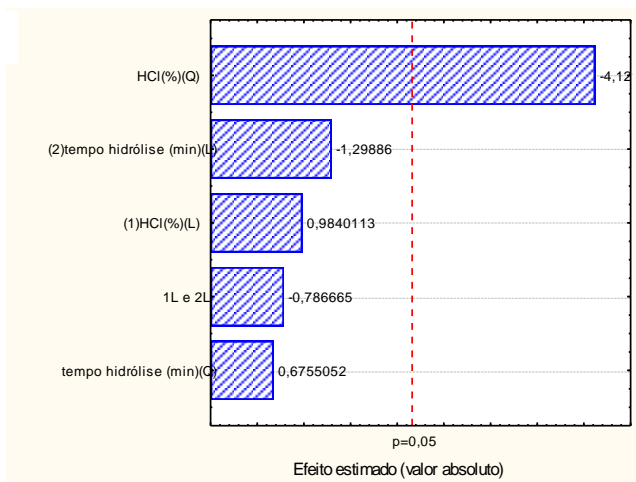


Figura 4.9 – Gráfico de Pareto (A) e curva de contorno (B) para a resposta carbono em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise para FT.

Correlacionando o carbono nos hidrolisados convertido em biomassa de *A. subrufescens* podemos observar no gráfico de Pareto (Figura 4.10A) que somente a concentração de HCl (Q) é significativo ( $p < 0,05$ ). Podemos observar para o modelo quadrático que a concentração de HCl e o tempo de hidrólise (L) influem negativamente sobre a bioconversão (Tabela 17C, APÊNDICE C). A análise de variância observada na Tabela 18C (APÊNDICE C) indica que o modelo não é bom para predição, por isso as equações não foram

consideradas. A percentagem de variação explicada passou de 7,8 % no modelo linear para 57,68 % no modelo quadrático,  $R^2=0,57$ , indicando que o modelo falha em descrever a superfície de resposta observada na Figura 4.10B. A máxima variação explicável foi 68,97 % indicando que tanto o erro experimental como o erro por falta de ajuste contribuíram para a inadequação ao modelo.

A



B

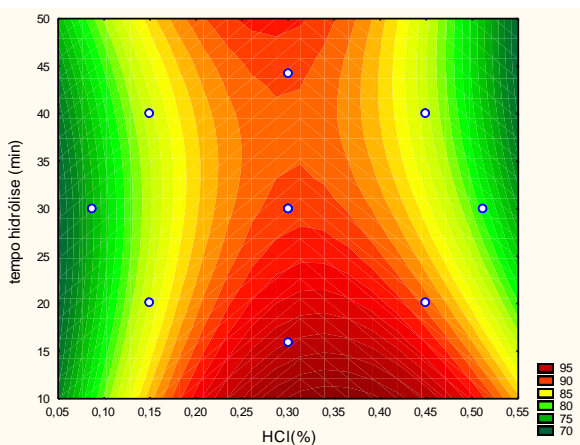


Figura 4.10 – Gráfico de pareto (A) e curva de contorno (B) para a resposta bioconversão de carbono em biomassa em função da concentração de HCl e tempo de hidrólise para FT.

A bioconversão da fonte de C em biomassa fúngica atingiu valores próximos de 90 % para a concentração de HCl 0,3 % (0) e 30 min (0) de hidrólise (Figura 4.10B). Poderíamos supor que a biomassa obtida seria devido ao consumo total da fonte de carbono, mas pela análise da bioconversão podemos averiguar que em concentrações baixas ou maiores de HCl o rendimento foi menor, independente do tempo de hidrólise. Na concentração de HCl 0,51 % e tempo de hidrólise de 30 min foi obtido em média 21,8 g.L<sup>-1</sup> de C, porém a bioconversão foi de 77,7 %. Na concentração de HCl 0,09% e tempo de 30 min o C foi de 13,45 g.L<sup>-1</sup> e a biomassa 9,5 g.L<sup>-1</sup>, ou seja, bioconversão de 70,6 %.

#### **4.3.8 Temperatura ótima de incubação e pH ótimo do substrato para o cultivo de *Agaricus subrufescens***

Os resultados de rendimento de biomassa de *A. subrufescens* em relação aos fatores pH inicial e temperatura de incubação ótimos estão apresentados na Tabela 4.9, realizados em hidrolisados do resíduo RC (HCl 0,3 % e 30 min de hidrólise).

Tabela 4.9 – Resultados da influência dos fatores temperatura de incubação e pH inicial no delineamento composto central rotacional sobre a biomassa de *Agaricus subrufescens* em hidrolisado do resíduo da cervejaria.

Experi- mento	Repli- cata	Temperatura de incubação (°C)	pH inicial	Bio massa (g.L <sup>-1</sup> )
1	1	23,0	5,5	9,88
2	1	23,0	6,5	7,19
3	1	29,0	5,5	15,17
4	1	29,0	6,5	12,47
5	1	21,8	6,0	8,43
6	1	30,2	6,0	16,03
7	1	26,0	5,3	13,22
8	1	26,0	6,7	10,64
9 (C)	1	26,0	6,0	12,49
10 (C)	1	26,0	6,0	12,81
11 (C)	1	26,0	6,0	12,55
12	2	23,0	5,5	9,78
13	2	23,0	6,5	8,64
14	2	29,0	5,5	15,11
15	2	29,0	6,5	12,74
16	2	21,8	6,0	8,04
17	2	30,2	6,0	16,25
18	2	26,0	5,3	12,43
19	2	26,0	6,7	10,04
20 (C)	2	26,0	6,0	11,47
21 (C)	2	26,0	6,0	11,64
22 (C)	2	26,0	6,0	12,41

Podemos observar na Tabela 19C (APÊNDICE C) e no gráfico de pareto (Figura 4.11A) que todos os fatores, exceto temperatura de incubação (Q), apresentam coeficientes significativos para  $p < 0,05$ . Por meio dessa tabela foi obtido o modelo que representa os resultados obtidos para biomassa. A primeira equação corresponde ao modelo completo (4.9) e a segunda, ao modelo simplificado (4.10), considerando apenas os fatores e as interações que são significativas ( $p < 0,05$ ).

$$y = 12,23 + 5,29 * X_1 - 1,99 * X_2 - 0,30 * X_1^2 - 0,90 * X_2^2 - 0,31 * X_1 * X_2 \quad (4.9)$$

$$y = 12,23 + 5,29 * X_1 - 1,99 * X_2 - 0,90 * X_2^2 \quad (4.10)$$

A análise de variância para validar o modelo quadrático para a resposta biomassa pode ser observada na Tabela 20C (APÊNDICE C). O modelo possui 96,47 % da variação explicada e 97,86 % da máxima variação explicável e seu  $R^2=0,96$ .

O melhor resultado de biomassa foi de  $16,27 \text{ g.L}^{-1}$  para a temperatura de  $30,2 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 6,0, porém na Figura 4.11B podemos verificar que a maior biomassa seria obtida para essa temperatura e menor nível de pH, ou seja, 5,3 ( $-\alpha$ ).

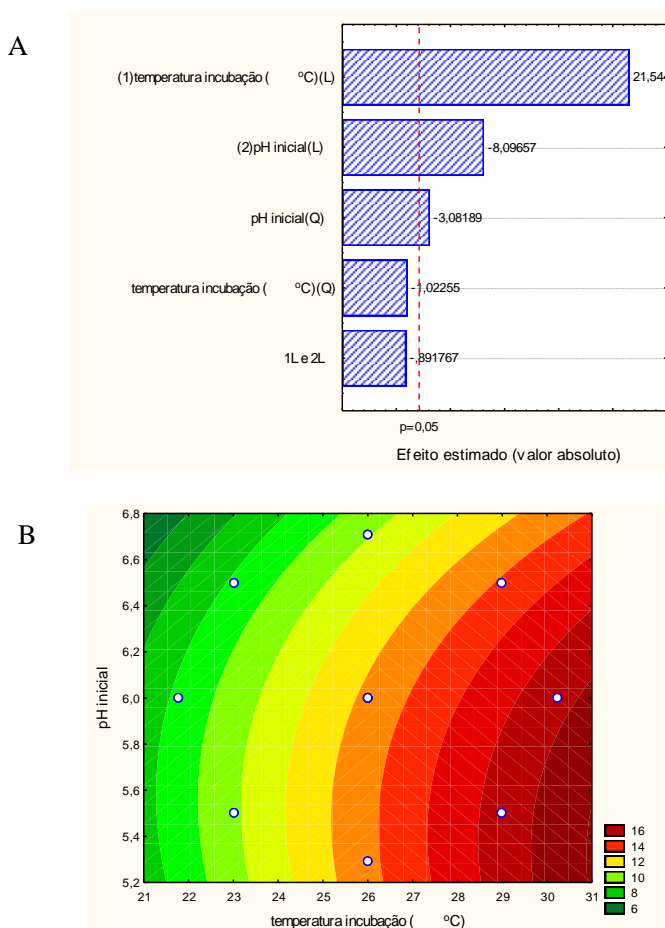


Figura 4.11 – Gráfico de pareto (A) e superfície de resposta (B) para a biomassa de *Agaricus subrufescens* em função da temperatura de incubação e do pH inicial do hidrolisado RC.

Para Hamedi, Vahid e Ghanati (2007) os resultados mais eficientes de cultivo de *A. subrufescens* em relação à biomassa ( $9,08 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram em pH inicial 5,64 e temperatura de incubação de  $24,6 \text{ }^\circ\text{C}$ . Lin e Yang (2006) obtiveram maiores resultados de biomassa ( $10,86 \text{ g.L}^{-1}$ ) em pH 6,02 a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ . Gao e Gu (2007) em cultivo em biorreator obtiveram maior rendimento de biomassa ( $10,76 \text{ g.L}^{-1}$ ) e polissacarídeos em pH 5,4 a  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ . Essa variação entre os diversos trabalhos pode estar relacionada aos diferentes isolados estudados.

#### **4.3.9 Elaboração de formulações em hidrolisados do resíduo da cervejaria (RC) e do farelo de trigo (FT)**

Para a elaboração de formulações de substratos de cultivo utilizando os hidrolisados dos resíduos RC e FT, e identificação dos principais parâmetros ambientais para maior produção de biomassa, foram realizados os experimentos que apontam as melhores condições de hidrólise, suplementação da fonte de nitrogênio, detoxificação, pH inicial e temperatura de incubação no cultivo em frascos.

Consideração a produção de biomassa de *A. subrufescens* seria indicada a hidrólise para os dois resíduos com concentrações de HCl 0,45 % (1:10, p:V), durante 16 ou 20 min de hidrólise a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Porém, a bioconversão do carbono em biomassa fúngica foi maior em hidrolisados utilizando menores concentrações de HCl, assim como, valores inferiores de carbono são necessários para o cultivo em biorreator. Considerando esses valores, as hidrólises dos resíduos devem ser realizadas com HCl 0,15 % e 20 min de hidrólise com adição de carvão ativo ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) nessa etapa, e posterior separação, também para facilitar o cultivo em biorreator. Esses hidrolisados dos resíduos RC e FT fornecem em torno de 6,4 e  $15,4 \text{ g.L}^{-1}$  de carbono, respectivamente.

A suplementação deve ser realizada com a concentração final dos nutrientes ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de 1 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 de extrato de levedura, 0,1 de  $\text{MgSO}_4$ , 0,32 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 0,25 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O pH inicial deve ser corrigido para 5,3 e a temperatura de incubação aproximadamente  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tendo em perspectiva a continuidade da pesquisa, o cultivo de *A. subrufescens* em biorreator *airlift* será realizado com essas formulações, as quais serão comparadas quanto à cinética de crescimento com o meio de cultura Melin-Norkrans Modificado (MARX, 1969; ROSSI, 2006), contendo  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose como fonte de carbono, em condições controladas (ROSSI, 2006).



**CAPÍTULO V**  
**EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E**  
**ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS**  
**POLISSACARÍDEOS**



## 5 EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS

### 5.1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de membranas em processos biotecnológicos tem sido desenvolvida principalmente na área de separação/fracionamento de compostos bioativos. A separação de polissacarídeos, assim como de oligossacarídeos, conforme sua massa molar, pode ser utilizada para purificar extratos brutos (BOTELHO-CUNHA et al., 2010; RAU, 2002). Diversos polissacarídeos extraídos de fungos e purificados, a exemplo do Sonifilan<sup>®</sup>, Lentinan<sup>®</sup>, e Krestin<sup>®</sup>, são comercializados no Japão desde a década de 80 como medicamentos no tratamento de pacientes com câncer (MIZUNO, 1999; WASSER; WEIS, 1999). A atividade biológica dos polissacarídeos depende de sua estrutura química, relacionada ao tipo da cadeia principal e de suas ramificações, da massa molar, e da solubilidade em água (ZHANG et al., 2003). A atividade antitumoral desses polissacarídeos envolve principalmente sua atividade sobre células do sistema imunológico, como monócitos, células NK e macrófagos, pela ativação de citocinas e secreção de interleucinas (BROWN; GORDON, 2003).

As técnicas mais comumente empregadas para avaliação da ativação de células do sistema imunológico estão baseadas na pesquisa da produção de citocinas por essas células (BERNARDSHAW et al., 2005; FØRLAND et al., 2010; SORIMACHI et al., 2001). A produção de citocinas pode ser mensurada pela expressão de proteínas ou indiretamente pela detecção de mRNA. Técnicas como a reação de Transcrição Reversa seguida de PCR (RT-PCR) permitem uma amplificação exponencial do gene de interesse. Essa amplificação aumenta a sensibilidade de detecção, entretanto a análise não é quantitativa.

Os polissacarídeos da parede celular de *A. subrufescens* apresentam diversas atividades, como imunomodulação, atividade antitumoral e antiviral (OHNO et al., 2001; MIZUNO et al., 1990a SOUSA et al., 2007). Polissacarídeos extraídos das frutificações apresentaram estrutura química (1→6)-(1→3)-β-glucanas (CAMELINI et al., 2005; OHNO et al., 2001), com massa molar de 1700 e 2000 g.mol<sup>-1</sup> (DONG et al., 2002; MIZUNO et al., 1990a). No entanto, outro polissacarídeo antitumoral foi extraído a partir do seu micélio cultivado em substrato líquido. Esse polissacarídeo foi identificado como

glucomanana, de cadeia principal (1→2)-β-mananas e ramificações (1→3)-β-glucanas (MIZUNO et al., 1999). A massa molar dessa glucomanana foi determinada por diversos autores, com os seguintes valores: 380 g.mol<sup>-1</sup> (FUJIMIYA et al., 1998), 274 g.mol<sup>-1</sup> (LIN; YANG, 2006) e 170 g.mol<sup>-1</sup> (DONG et al., 2002). Essa variação é dependente do fungo isolado em estudo, e dos diferentes métodos de extração e de determinação da massa molar dos polissacarídeos.

Para a separação desses polissacarídeos, em função de sua massa molar, pode ser utilizada a cromatografia líquida, seguida de precipitação por solventes orgânicos. O etanol é o principal álcool utilizado para a recuperação dos polissacarídeos (CAMELINI et al., 2005; MIZUNO et al., 1990a). Geralmente, o volume de álcool necessário para uma recuperação total do polissacarídeo tem proporção de 3:1 de extrato aquoso contendo os polissacarídeos. Essa quantidade é elevada e gera um resíduo na recuperação do produto.

No entanto, uma alternativa que pode ser utilizada para reduzir o volume do extrato polissacarídico e separar as moléculas pela sua massa molar são as membranas de filtração. Esse processo contribui para a diminuição da quantidade de álcool utilizado na precipitação, conjuntamente com a possibilidade de seleção do polissacarídeo de interesse. A tecnologia permite um aumento da produção do polissacarídeo visando a escala piloto e industrial.

Neste experimento, foram obtidos extratos polissacarídicos da biomassa de *A. subrufescens* produzidos em diferentes sistemas: frutificações, micélio em substrato sólido e micélio obtido em cultivo submerso. Esses polissacarídeos foram separados por membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF). A distribuição da massa molar dos polissacarídeos e a atividade biológica *in vitro* foram utilizadas para monitorar a qualidade daqueles concentrados e separados pelas membranas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Material biológico

Para obtenção dos polissacarídeos foi utilizada biomassa de *A. subrufescens*, isolado UFSC 51, produzida em três diferentes sistemas:

1) Frutificações coletadas em cultivo comercial, localizada em Biguaçu, Santa Catarina, em 2004. Essas amostras foram utilizadas na

pesquisa de mestrado da mesma autora, e estavam desidratadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

2) Micélio em grãos de trigo, cultivado conforme a subseção 4.3.1.1, porém, incubado durante 45 dias para total colonização dos grãos, visualmente observada (Figura 5.1) pelo microscópio óptico. A amostra foi desidratada a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até peso constante, e triturada.



Figura 5.1 – Micélio de *Agaricus subrufescens* cultivado em grãos de trigo após 45 dias de incubação.

3) Micélio obtido da FSm em biorreator *airlift* utilizando meio de cultura Melin-Norkrans Modificado (MARX, 1969) com composição de nutrientes em  $\text{g.L}^{-1}$  de: 16 de glicose, 4,8 de extrato de malte, 0,75 de  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , 0,15 de  $\text{MgSO}_4$ , 0,7 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,025  $\text{CaCl}_2$ , 0,025 de  $\text{NaCl}$ ,  $10\text{ }\mu\text{g}$  de tiamina-HCl,  $1,2\text{ mL.L}^{-1}$  de solução de  $\text{FeCl}_3$  1 %. O pH inicial foi 6 e a temperatura do cultivo foi mantida próxima de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o cultivo o micélio foi centrifugado e filtrado sob vácuo em papel filtro Whatman n° 42.

### 5.2.2 Extração dos polissacarídeos

Cinquenta gramas do material biológico foram colocados em balão extrator com condensador, com adição de 250 mL de água destilada (extrato 1:5), e aquecida a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 h. O material foi filtrado sob vácuo em papel filtro Whatman n° 42. Essa etapa foi

repetida duas vezes e os filtrados foram misturados.

Em alíquotas de 40 mL dos diferentes extratos foram adicionados 120 mL de EtOH 96° GL para precipitação dos polissacarídeos. As amostras foram centrifugadas a 1100 g durante 10 min, e os precipitados desidratados a 55 °C até peso constante.

### 5.2.3 Separação dos polissacarídeos através de membranas

A separação dos polissacarídeos por membranas foi realizada no Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Foram testadas membranas de microfiltração (Milipore, EUA), duas de ultrafiltração preparadas pelo LABSEM e uma de nanofiltração (GE Osmonics Labstore, EUA), denominadas MF, UF1 e UF2, e NF, respectivamente, com características descritas conforme a Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição físico-química e características de operação das membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF).

	MF	UF1	UF2	NF
<b>Polímero</b>	Acetato de celulose	PVDF	PVDF	Poliamida e polisulfona
<b>Porosidade/Tamanho de corte</b>	0,22 µm	100 a 150 g.mol <sup>-1</sup>	10 g.mol <sup>-1</sup>	Rejeição de 98 % de MgSO <sub>4</sub>
<b>Pressão de operação (bar)</b>	0,5	2	4	20

Para a separação dos polissacarídeos foi utilizada a filtração perpendicular, empregando-se a célula mostrada na Figura 5.2, construída em aço inoxidável e operada sob pressão. Para cada membrana e em cada filtração foram utilizados 40 mL dos extratos a serem testados, sob pressões adequadas de operação, até a redução do volume para 10 mL (retentado). Os retentados que continham os polissacarídeos foram precipitados com 30 mL de EtOH 96° GL, prosseguindo conforme seção 5.2.2.



Figura 5.2 - Célula utilizada para filtração com sistema de suporte para membrana de micro e ultrafiltração e controle automático de pressão

#### 5.2.4 Obtenção de $\beta$ -glucanas para uso como controle

Os polissacarídeos das frutificações foram extraídos conforme a seção 5.2.2. O isolamento das  $\beta$ -glucanas de maior massa molar, eliminando também as  $\alpha$ -glucanas presentes no extrato bruto, foi realizado por cromatografia líquida de troca-iônica, gel permeação e de afinidade, seguindo a método proposto por Camelini et al. (2005).

#### 5.2.5 Atividade biológica *in vitro*

Os polissacarídeos do extrato bruto e dos retentados (material retido pelas membranas), além das  $\beta$ -glucanas (controle), foram testados na ativação de macrófago RAW 264.7 observado através da expressão dos mRNAs das citocinas Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). Também foram testados na ativação de linfócitos T de células Jurkat com detecção expressiva do mRNA da IL-2. Ambos os ensaios utilizaram 10  $\mu$ g de cada amostra, mantidos em incubação durante 24 h em duplicata (PASETTI, 2009; CELMER, 2010).

Extratos brutos e  $\beta$ -glucanas isoladas das frutificações de *A. subrufescens* foram utilizados para análise de genotoxicidade em células

da linhagem HepG2 por meio do teste de cometa (ANGELI et al., 2009; ANEXO). Esses polissacarídeos também foram utilizados para a realização de testes de atividade antiviral, para HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), e modificados quimicamente através da sulfatação (SOUSA, 2008). Os polissacarídeos sulfatados também foram analisados quanto a sua massa molar.

### **5.2.6 Determinação da massa molar**

A massa molar foi estimada por meio de CLAE-IR utilizando a coluna TSK Gel 5000 PW (7.8×300 mm, Tosoh Corporation, Japão) com pré-coluna (5x75 mm, Tosoh Corporation, Japão) acoplada no cromatógrafo Perkin Elmer série 200 com detector de Índice de Refração Perkin Elmer série 200a acoplado ao detector UV a 280 nm, fase móvel NaCl 0,2 M, fluxo 1 mL.min<sup>-1</sup>. A curva padrão foi realizada com padrões dextrans de massa molar 2.000, 670, 410, 150, 50 e 12 g.mol<sup>-1</sup> (Sigma, EUA) com concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> e injeção de 20 µL.

As amostras dos extratos brutos, retentados e filtrados foram analisadas na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> dissolvidas na fase móvel. Também foi analisada a massa molar da β-glucana isolada através da cromatografia líquida.

Ao extrato bruto do micélio em grãos foi adicionado 1 % da enzima α-amilase AMG 200L (Novozyme, Brasil), pH 4,5, aquecido a 55 °C durante 30 min, com posterior resfriamento. Esse extrato hidrolisado foi submetido à centrifugação durante 10 min a 11000 g, e coletado o sobrenadante. Esse processo foi repetido três vezes. A massa molar do sobrenadante, contendo o polissacarídeo do micélio, também foi analisada.

## **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3.1 Rendimento do polissacarídeo**

A concentração inicial dos extratos variou segundo a fonte de obtenção do polissacarídeo, frutificação, micélio em grãos e micélio isolado do cultivo em biorreator. O rendimento de retenção do polissacarídeo nas diferentes membranas, calculado em relação às concentrações iniciais, podem ser observados na Tabela 5.2.



Tabela 5.2 – Concentração inicial dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens* extraídos da frutificação, micélio em grãos e micélio isolado da FSm e seus respectivos percentuais de retenção pelas membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF).

<b>Extrato</b>	<b>Amostra inicial</b> ( $\text{g}_{\text{poliss.}}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<b>MF</b> (%)	<b>UF1</b> (%)	<b>UF2</b> (%)	<b>NF</b> (%)
<b>Frutificação</b>	7,15	39,0	55,5	68,0	98,0
<b>Micélio + grão</b>	4,89	13,9	39,5	72,3	96,1
<b>Micélio isolado</b>	1,17	48,7	56,2	98,3	98,3

Podemos observar que a membrana de nanofiltração reteve maior quantidade de polissacarídeos, indiferentemente do extrato utilizado. Esses níveis de retenção são satisfatórios quando se considera a pequena perda de polissacarídeos no permeado, resultando num processo altamente eficiente e de alta produtividade. Como esperado, as menores retenções de polissacarídeos foram observadas quando se utilizaram as membranas de microfiltração, que pela sua própria natureza, possuem tamanho médio de poros superiores àqueles encontrados em membranas de ultra e nanofiltração.

Observamos, ainda, que ocorreu maior retenção de polissacarídeos pelas membranas UF2, em relação às membranas UF1. Essas diferenças são importantes e estão relacionadas aos menores tamanhos médios de poros das membranas UF2.

É importante ressaltar a capacidade de retenção de solutos, principalmente pelas membranas de micro e ultrafiltração, onde a massa molar é mais importante do que as propriedades físico-químicas dos solutos, considerando-se também, a conformação espacial do soluto e sua capacidade de agregação com outros solutos de igual ou de diferentes naturezas. A agregação pode ser maior ou menor dependendo da força iônica ou do pH do meio e pode aumentar artificialmente os tamanhos dos solutos, aumentando a retenção pelas membranas. Essa consideração é importante porque não se investigou o nível e a intensidade de possíveis interações entre os polissacarídeos presentes nos extratos. Também uma menor retenção total de polissacarídeos pode ser desejável quando se quer fracionar uma mistura, ou também, conjugando-se diferentes tipos de membranas, é possível separar e concentrar polissacarídeos de naturezas distintas em relação, principalmente, às suas massas molares.

A Figura 5.3 mostra os percentuais de retenção dos polissacarídeos dos extratos, em função do ponto de corte (função do tamanho médio de poros) das membranas.

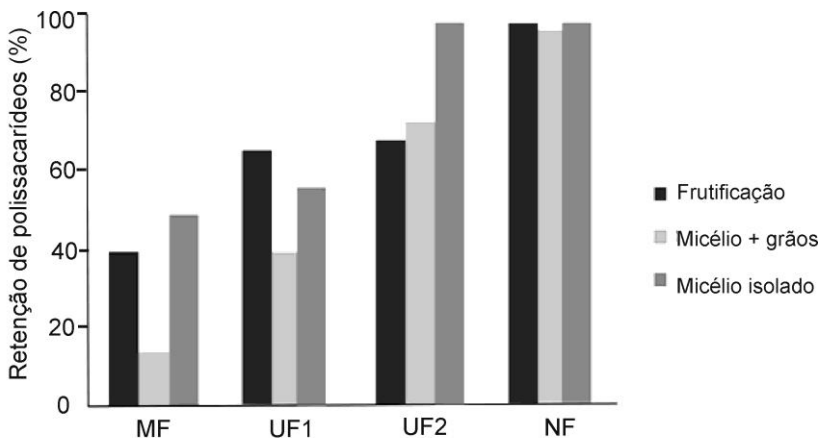


Figura 5.3 – Percentuais de retenção das membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF), para os polissacarídeos de *Agaricus subrufescens* extraídos da frutificação, micélio em grãos e micélio isolado da FSM.

O rendimento das  $\beta$ -glucanas isoladas por cromatografia líquida foi similar aos resultados encontrados na membrana de microfiltração, com a média de 39,4 % em relação aos polissacarídeos dos extratos brutos, considerando os três estágios de maturação das frutificações. Isso indica que a microfiltração é uma alternativa eficiente de separação dos polissacarídeos de maior massa molar, permitindo a obtenção das  $\beta$ -glucanas com maior rapidez, visando o aumento da escala produtiva.

### 5.3.2 Massa molar e atividade biológica *in vitro*

A curva padrão da massa molar, observada na Figura 1D (APÊNDICE D), apresentou equação da reta  $Y = -0,5121x + 9,8273$  e  $R^2 = 0,9628$ , ou seja, uma linearidade satisfatória para estimar a massa molar dos polissacarídeos presentes nos extratos. A Tabela 5.3 apresenta a massa molar média dos constituintes presentes nos extratos brutos e nos seus respectivos retentados, com confirmação dos resultados através das análises dos permeados, porém não apresentados na tabela.

Tabela 5.3 – Análise da massa molar e atividade em macrófagos dos polissacarídeos de *Agaricus subrufescens* presentes nos extratos obtidos da frutificação, micélio em grãos e micélio isolado da FSm e nos retentados obtidos na separação pelas membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF).

Extrato		Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )					Atividade biológica <i>in vitro</i>	
		627	310	25	21	17	TNF $\alpha$ <sup>1</sup>	iNOS <sup>2</sup>
<b>Frutificação</b>	<b>Extrato</b>	+	nd <sup>3</sup>	nd	nd	+	+	-
	<b>MF</b>	+	nd	nd	nd	-	+	+
	<b>UF1</b>	+	nd	nd	nd	-	+	+
	<b>UF2</b>	+	nd	nd	nd	+	+	-
	<b>NF</b>	+	nd	nd	nd	+	+	-
	<b><math>\beta</math>-glucana<sup>4</sup></b>	+	nd	nd	nd	-	+	+
<b>Micélio+grão</b>	<b>Extrato</b>	nd	+	+	+	nd	+	-
	<b>MF</b>	nd	+	-	-	nd	+	-
	<b>UF1</b>	nd	+	-	-	nd	+	-
	<b>UF2</b>	nd	+	+	+	nd	+	-
	<b>NF</b>	nd	+	+	+	nd	+	-
<b>Micélio isolado</b>	<b>Extrato</b>	nd	+	nd	+	nd	+	+
	<b>MF</b>	nd	+	nd	-	nd	+	+
	<b>UF1</b>	nd	+	nd	-	nd	+	-
	<b>UF2</b>	nd	+	nd	+	nd	+	-
	<b>NF</b>	nd	+	nd	+	nd	+	-

<sup>1</sup>Liberação da citocina Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ .

<sup>2</sup>Ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível.

<sup>3</sup>Não foi detectado.

<sup>4</sup>Polissacarídeo isolado utilizando cromatografia líquida, segundo Camellini et al. (2005).

A maior massa molar dos polissacarídeos extraídos da frutificação tem aproximadamente o dobro daquele encontrado no extrato do micélio, porém ambos foram retidos por todas as membranas utilizadas. O polissacarídeo de massa molar 17 g.mol<sup>-1</sup> foi extraído somente das frutificações e o de massa molar 21 g.mol<sup>-1</sup> foi encontrado no micélio, obtido tanto em FES como FSm. Ambos os polissacarídeos foram separados pelas membranas MF e UF1, que retiveram polissacarídeos de maior massa molar.

A quantidade da substância de massa molar 25 g.mol<sup>-1</sup>, presente no extrato do micélio em grãos interferiu no resultado do polissacarídeo de massa molar 310 g.mol<sup>-1</sup>. Quando foi adicionada a enzima  $\alpha$ -amilase houve a redução do polissacarídeo, evidenciando a presença de amido de origem vegetal em grande quantidade. A ausência desse polissacarídeo no extrato do micélio isolado confirma esse resultado.

Os cromatogramas dos extratos brutos da frutificação, micélio em grãos e micélio isolado estão representados na Figura 5.4. Podemos observar que o cromatograma do extrato do micélio em grãos após o uso da enzima é muito similar em relação aos polissacarídeos encontrados no cromatograma do extrato oriundo do micélio.

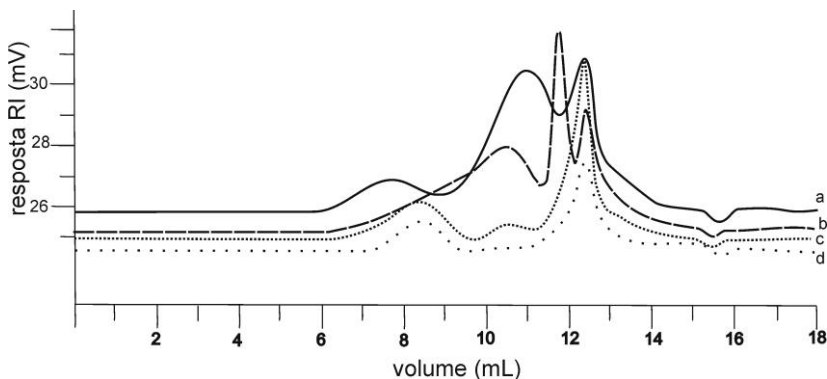


Figura 5.4 – Cromatogramas obtidos por CLAE com detecção de IR para os extratos brutos obtidos da frutificação de *Agaricus subrufescens* (a), micélio em grãos (b), micélio isolado da FSm (c), após o uso da  $\alpha$ -amilase no extrato do micélio em grãos (d).

Observamos em Botelho-Cunha et al. (2010), a imobilização de enzimas no biorreator utilizado para separação dos oligossacarídeos hidrolisados através de membranas de nanofiltração. Como perspectiva, essa tecnologia poderia ser utilizada para hidrolisar o amido dos extratos de *A. subrufescens* cultivado em meio sólido. A caracterização dos retentados quanto a sua salinidade e teor de proteínas, também pode ser aplicada para as frações obtidas em nossos estudos.

Podemos observar na Figura 5.4 um pico detectado com volume de permeação de aproximadamente 12 mL para todos os cromatogramas. Porém, esse constituinte não foi incluído nos resultados de massa molar dos constituintes devido a sua presença estar associada ao tempo de retenção do solvente dos polissacarídeos, ou seja, solução salina utilizada como fase móvel (NaCl 0,2M). Esse resultado foi evidenciado quando houve a análise dos padrões de massa molar e na injeção somente do solvente, também descrito por Ohno et al. (1986).

A maior massa molar do polissacarídeo das frutificações ( $627 \text{ g.mol}^{-1}$ ) foi inferior à encontrada por outros autores (DONG et al., 2002; MIZUNO et al., 1990a). Para a maior massa do polissacarídeo do

micélio ( $310 \text{ g.mol}^{-1}$ ), o valor foi próximo ao encontrado por Fujimiya et al. (1998) de  $380 \text{ g.mol}^{-1}$ , e por Lin e Yang (2006) de  $274 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Essas diferenças de massa molar dos polissacarídeos da frutificação e do micélio podem estar relacionadas a uma estrutura dinâmica da parede celular fúngica que está sujeita a modificações em diferentes fases na vida de um fungo. Para *A. bisporus* as diferenças foram encontradas no complexo glucana-glucosaminaglicana que dispõe de menor número de ligações nas frutificações para a reorientação da parede, aumentando a flexibilidade, permitindo alongação axial, e inserção de novos polímeros até um máximo de expansão. Por outro lado, no micélio existe um aumento na proporção de ramificações na cadeia principal do polissacarídeo, conferindo maior rigidez a parede celular (MOL; WESSELS, 1990). Isso, possivelmente, resulta em um polissacarídeo de menor massa molar quando extraído do micélio.

Todos os polissacarídeos extraídos e retentados pelas membranas ativaram os macrófagos RAW 264.7 através da expressão da citocina TNF- $\alpha$ , inclusive as  $\beta$ -glucanas isoladas (controle). Porém, somente algumas amostras ativaram os macrófagos através da expressão de iNOS, como nos retentados da frutificação de MF e UF1, e  $\beta$ -glucanas, que não continham a substância de massa molar  $17 \text{ g.mol}^{-1}$ . Também os polissacarídeos do extrato bruto do micélio e do seu retentado pela membrana de MF ativaram a expressão de iNOS. Na dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess, as mesmas amostras não demonstraram atividade na mesma concentração ( $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada amostra) utilizada na RT-PCR. Isso se deve à maior sensibilidade do método de RT-PCR, mesmo em baixas concentrações de polissacarídeos.

Os polissacarídeos não expressaram mRNA da IL-2 dos linfócitos T de células Jurkat. Esses resultados estão em conformidade com o tipo de receptores de células do sistema imunológico que as glucanas mais comumente se ligam, ou seja, receptores presentes em macrófagos, monócitos, células endoteliais, células NK e células dendríticas (BERNARDSHAW et al., 2005; FØRLAND et al., 2010; SORIMACHI et al., 2001; YUMINAMOCHI et al., 2007). Por outro lado, Førland et al. (2010) relataram a expressão de IL-2 em células dendríticas derivadas de monócitos quando incubadas com o extrato de *A. subrufescens*, atividade que não foi encontrada em nossos resultados devido a diferença de célula utilizada.

Shu, Wen e Lin (2003) também monitoraram a atividade dos polissacarídeos de diferentes massas molares no substrato líquido de cultivo de *A. subrufescens*, na mesma linhagem de macrófagos e expressão de TNF- $\alpha$ , analisando quantitativamente a liberação da

citocina através do método de ELISA, porém utilizando uma concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de polissacarídeos. Foi observado que quanto maior a massa molar do polissacarídeo, maior a liberação da TNF- $\alpha$ . Neste trabalho todas as frações apresentaram ativação dessa citocina, pois todas continham os polissacarídeos de maior massa molar incluídas na sua composição. Por outro lado, a liberação de iNOS foi dependente da pureza do polissacarídeo de maior massa molar, ou seja, resultados positivos foram obtidos em frações que continham somente os polissacarídeos de maior massa molar oriundas das frutificações e do micélio em grãos.

Xiao et al. (2007) utilizaram a tecnologia de membranas acopladas em série para separar os polissacarídeos do extrato de *A. subrufescens*. As membranas de MF, UF e NF acopladas permitiram fracionar os polissacarídeos em: massa molar menor que  $10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , entre  $10$  e  $50 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $50$  a  $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e maior que  $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A filtração do extrato, primeiramente pela membrana de MF, proporciona uma diminuição no *fouling* das membranas subsequentes, evitando a obstrução dos poros. Para a fração com polissacarídeos maiores que  $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  foi relatada acentuada atividade na proliferação de linfócitos de células esplênicas, num modelo *ex vivo*.

Esses polissacarídeos, denominados imunomoduladores, são compostos que modificam as respostas biológicas ativando ou desativando o sistema imunológico. As células do sistema imunológico são normalmente ativadas por meio de antígenos específicos, porém algumas substâncias como as  $\beta$ -glucanas podem agir sobre essas células de maneira inespecífica (CHIRIGOS, 1992; DALMO; BØGWALD, 2008). Os imunoestimulantes são utilizados para amplificar as respostas imunológicas que ocorrem naturalmente contra patógenos infecciosos e células tumorais (DALMO; BØGWALD, 2008; MIZUMOTO et al., 2005).

Células do sistema imunológico, como os macrófagos, estão envolvidas em diversos processos diferentes, como o remodelamento de tecidos durante a embriogênese e reparo de lesões, remoção de células lesadas, senescentes ou apoptóticas, subsequentes a uma injúria ou infecção, hemopoiese e homeostase, bem como o reconhecimento de células neoplásicas (HETLAND et al., 2008; MURPHY; BITTAR; BITTAR, 1996). A atividade pró-vasculogênica das  $\beta$ -glucanas de *A. subrufescens* em embriões de galinha descrita em Camelini et al. (2006) pode estar diretamente relacionada com essa propriedade dos macrófagos.

Outra função dos macrófagos é prover uma linha de defesa contra

a invasão microbiológica, e também reconhecendo e eliminando as células tumorais. Esta atividade pode ocorrer de maneira direta, envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e fatores de necrose tumoral, ou indiretamente, pela secreção de citocinas, processamento e apresentação de antígenos, regulando o sistema imunológico (KLIMP et al., 2002). Sendo assim, os macrófagos se incluem entre as principais células apresentadoras de antígenos (APC's), ficando na interface entre o sistema imunológico inato e adaptativo (JANEWAY, 2001).

As  $\beta$ -glucanas isoladas das frutificações de *A. subrufescens* através de cromatografia líquida apresentaram somente o polissacarídeo de  $627 \text{ g.mol}^{-1}$ . Esse resultado confirma que a estrutura (1 $\rightarrow$ 6)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanas (CAMELINI et al, 2005) é o polissacarídeo de maior massa molar, e que pode ser isolado também pela microfiltração.

O extrato bruto e essas  $\beta$ -glucanas purificadas do isolado UFSC-51, não apresentaram efeitos genotóxicos *in vitro* para células HepG2. Além de não apresentarem toxicidade ao DNA, proporcionaram atividade antigenotóxica nas concentrações de 5, 15 e  $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essa atividade protetora foi proporcionada quando os danos foram induzidos no DNA por substâncias tóxicas como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bleomicina e doxorrubicina. Uma maior proteção foi demonstrada conforme o aumento das concentrações dos polissacarídeos (ANEXO).

As  $\beta$ -glucanas isoladas foram mais efetivas na proteção ao dano causado por doxorrubicina do que os extratos brutos. Isto pode estar relacionado ao seu mecanismo de ação, pois a doxorrubicina, além de causar danos através dos radicais livres, pode interagir com a topoisomerase II formando complexos de DNA passíveis de clivagem. Adicionalmente, pela sua intercalação é possível inibir a replicação nucleotídica e a ação das enzimas DNA e RNA-polimerase (MINOTTI et al., 2004). Esses resultados foram apresentados por Angeli et al. (2009) e confirmam a segurança alimentar dos polissacarídeos extraídos do isolado UFSC-51 para o consumo humano, também demonstrada para outros isolados (ANGELI et al., 2006; BELLINI et al., 2003; GUTERREZ et al., 2004; LUIZ et al., 2003).

Os polissacarídeos de *A. subrufescens* também apresentaram baixa citotoxicidade para as linhagens VERO and GMK AH1, porém não inibiram a replicação dos vírus causadores de herpes HSV-1 e HSV-2 testadas *in vitro*. Quando os polissacarídeos foram modificados quimicamente por meio de sulfatação apresentaram massa molar reduzida de  $627 \text{ g.mol}^{-1}$  para  $8 \text{ g.mol}^{-1}$ . Esse resultado implicou a quebra

da cadeia principal (1→6)- $\beta$ -glucanas, fato que foi analisado estruturalmente. A reação deveria ter aumentado a massa molar do polissacarídeo devido à adição de grupos sulfatos. Williams et al. (1991) também relataram uma diminuição da massa molar na sulfatação das glucanas de *Saccharomyces cerevisiae* devido a uma excessiva hidrólise provocada pelo ácido sulfúrico.

Apesar da redução da massa molar, a atividade antiviral do polissacarídeo de *A. subrufescens*, modificado pela sulfatação, foi relevante para as duas cepas, inibindo a replicação viral. Essa ação virucida foi mais efetiva quando as células foram tratadas simultaneamente com o polissacarídeo sulfatado (SOUSA et al., 2007).

Zhang et al. (2003) verificaram que a introdução de grupos iônicos em  $\beta$ -glucanas atuou não só aumentando a sua solubilidade aquosa, como também mudando o efeito de repulsão eletrostática exercida pelo hidrogênio e capacitando a cadeia polimérica a adotar conformação mais estendida em solução aquosa. Essa alteração conformacional aliada à presença de grupos sulfato foi sugerida como facilitadora da ligação do polissacarídeo às partículas virais, o que interferiria na adesão dos vírus às células hospedeiras. Assim,  $\beta$ -glucanas sulfatadas podem ser consideradas como promissores agentes anti-HSV.

Além dessa atividade antiherpética *in vitro* detectada para o extrato obtido de *A. subrufescens* modificado pela sulfatação, é importante ressaltar outros fatores relacionados a essa ação farmacológica como sua baixa toxicidade *in vitro*, o que habitualmente é um fator limitante na segurança de um fármaco; seu mecanismo de ação diferente dos fármacos atualmente disponíveis no mercado, como o aciclovir; sua ação inibitória da multiplicação viral, quando comparada a de outros compostos da mesma classe; e a ausência de atividade anticoagulante *in vitro*, comparada com a heparina, indicando seletividade de ação (SOUSA, 2008).

Polissacarídeos obtidos do micélio de *A. subrufescens* em FES e FSm, e separados por membranas, estão sendo testados biologicamente em continuidade aos trabalhos. Esses processos permitem o aumento da produção e a padronização do processo de obtenção dos polissacarídeos bioativos. A membrana de microfiltração permite o isolamento do polissacarídeo de maior massa molar com segurança, já que o processo pode ser realizado com rapidez por meio da inclusão de maior pressão no sistema, diminuindo o risco de contaminações microbiológicas.



**CAPÍTULO VI**  
**CONSIDERAÇÕES FINAIS**



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Agaricus subrufescens* (= *A. brasiliensis*) é um fungo que vem sendo amplamente consumido no Brasil e em outros países, devido às suas propriedades nutricionais e medicinais, relacionadas principalmente aos polissacarídeos da parede celular. Processos biotecnológicos podem ser utilizados para aumento da escala produtiva desses polissacarídeos por meio de cultivo do micélio.

O processo de produção requer permanentemente o uso de um isolado com características estáveis durante todas as fases do desenvolvimento. Portanto, previamente ao desenvolvimento do processo, foram estabelecidos métodos de preservação e recuperação do fungo. Os métodos estabelecidos foram os seguintes: cultivo em meio de batata dextrose ágar (BDA) inclinado em tubo de ensaios com a adição de carvão ativo (A); cultivo em BDA com adição de óleo mineral após crescimento miceliano (B); e discos dessa cultura imersos em água Mili Q (C), todos armazenados sob refrigeração a 8 °C durante um período de até 12 meses. Foi monitorada periodicamente a viabilidade do micélio, velocidade de crescimento radial e estabilidade genética com base na técnica de polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD).

Entre os métodos de preservação foram observadas variações na viabilidade do micélio: método A permitiu que o fungo mantivesse 75 % da viabilidade no período de estocagem inicial e final; no método B 50 % da viabilidade foi mantida no final do período; e no método C apresentou completa perda de viabilidade no 12º mês após cultivo. Em geral, a velocidade de crescimento radial de *A. subrufescens* diminuiu ao longo do período de preservação. No entanto, maiores velocidades foram obtidas quando o meio BDA foi suplementado com carvão ativo. A similaridade genética do micélio mantido pelas técnicas A e B aumentou (> 99 %) quanto mais longo foi o período de preservação. O carvão ativo demonstrou ser um ingrediente eficiente para a preservação e recuperação do fungo *A. subrufescens*, sem alterações significativas na sua morfologia e genética durante o período de 12 meses de estocagem.

Na produção de biomassa fúngica podem ser utilizados os processos de fermentação no estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm). A FES para a produção de *A. subrufescens* utilizando como substrato grãos de trigo pré-tratados, teve como objetivo aumentar o conteúdo de polissacarídeo fúngico no meio. Esse polissacarídeo foi identificado como glucomanana de cadeia principal (1→2)-β-mananas e

ramificações (1→3)- $\beta$ -glucanas. O tempo de cozimento e molho após o cozimento do grão, e conseqüentemente o teor de umidade, o pH do substrato, temperatura de incubação e a quantidade inicial de inoculante são fatores importantes na produção dessas glucomananas. O tempo de cozimento de 21 min., seguido de 24 min. de molho após o cozimento dos grãos de trigo, demonstrou ser ótimo para a produção das glucomananas pelo fungo. A adição de  $\text{CaSO}_4$  (até 3 %) e  $\text{CaCO}_3$  (até 1 %) teve uma importante influência no pH do substrato. A concentração de glucomananas foi maior quando o substrato não foi suplementado com cálcio, ou com a adição máxima de 0,25 %  $\text{CaCO}_3$  (pH 6,6). A quantidade inicial de inoculante necessária para a melhor produção de glucomananas ( $6,89 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi aproximadamente 10,3 % (p/p), enquanto a temperatura ótima de incubação foi  $27,2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

*Agaricus subrufescens* também foi cultivado em meio líquido (FSm), em hidrolisados dos resíduos agroindustriais, farelo de trigo (FT) e do resíduo da cervejaria (RC). A concentração de HCl, o tempo de hidrólise, a suplementação do hidrolisado, o pH inicial e a temperatura de incubação são fatores que influenciam a produção da biomassa, quantidade de carbono e bioconversão.

Para a FSm de *A. subrufescens* nos hidrolisados de FT e RC verificou-se que a concentração de HCl e o tipo de resíduo foram importantes na produção de biomassa. Os menores valores de carvão ativo durante a hidrólise e de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  usado como suplemento nos hidrolisados,  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, foram usados nos experimentos subsequentes.

Verificou-se uma maior biomassa de *A. subrufescens* nos substratos com hidrolisados de RC ( $9,65 \text{ g.L}^{-1}$ ) e FT ( $22,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtidos usando-se a concentração de HCl 0,45 % e o tempo de 20 min. de hidrólise. O carbono no hidrolisado de RC foi maior conforme o aumento da concentração de HCl e o tempo de hidrólise, com valor de  $18,7 \text{ g.L}^{-1}$  para os valores de HCl 0,45 % e 40 min. de hidrólise. Já a bioconversão do carbono do resíduo RC em biomassa fúngica atingiu valores próximos de 93,8 % quando se utilizou a concentração de HCl 0,15 % e o tempo de 20 min de hidrólise.

Para os hidrolisados de FT, o carbono resultou em concentração superior, atingindo  $28,1 \text{ g.L}^{-1}$  quando se utilizou com HCl 0,51 % e 30 min de hidrólise. A bioconversão de FT atingiu valores próximos de 90 % para a concentração de HCl 0,3 % e 30 min de hidrólise. Também foi obtida maior biomassa de *A. subrufescens* em substrato com pH 5,3 e temperatura de incubação de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . A definição dos parâmetros ótimos para crescimento de *A. subrufescens* foram importante na obtenção dos

polissacarídeos da parede celular.

Polissacarídeos extraídos da frutificação (controle), do micélio em grãos e do micélio obtido em meio líquido foram separados pela massa molar utilizando-se membranas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF1 e UF2) e nanofiltração (NF). O rendimento de retenção das frações e a massa molar dos polissacarídeos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Índice de Refração (CLAE-IR). As frações dos polissacarídeos foram testadas na ativação de macrófagos *in vitro* por meio da expressão dos mRNAs do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS).

Na separação com membranas houve aumento da retenção dos polissacarídeos de todos os extratos à medida que o tamanho dos poros da membrana diminuiu. A maior retenção ocorreu na membrana MF para os polissacarídeos oriundos do micélio (48,7 %). Já a menor retenção (13,9 %) foi obtida para o extrato do micélio em grãos. A membrana UF2, com poros menores do que UF1, reteve quantidades similares, cerca de 70 %, tanto nos polissacarídeos da frutificação como no micélio em grãos. A membrana NF permitiu retenção praticamente total para todos os polissacarídeos. A maior massa molar dos polissacarídeos extraídos da frutificação ( $627 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foi aproximadamente o dobro daquele encontrado no extrato do micélio ( $310 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), obtido tanto em FES como FSM. Ambos os polissacarídeos foram retidos por todas as membranas de filtração utilizadas. O polissacarídeo de massa molar  $17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  foi extraído somente das frutificações e o de massa molar  $21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  foi encontrado no micélio. Esses polissacarídeos foram separados pelas membranas MF e UF1, favorecendo a separação e retenção do polissacarídeo de maior massa molar. Todos os polissacarídeos dos extratos brutos e os retentados nas membranas ativaram os macrófagos através da expressão da citocina TNF- $\alpha$ . Porém, somente os extratos brutos da frutificação e do micélio (cultivo líquido) e seus polissacarídeos de maior massa molar ativaram os macrófagos através da expressão de iNOS.

Resultados importantes também foram obtidos após análise de citotoxicidade e genotoxicidade dos polissacarídeos das frutificações, sugerindo que o consumo do isolado UFSC 51 é seguro. O polissacarídeo protegeu ainda o DNA de danos causados por substâncias tóxicas, além de apresentar atividade antiherpética quando foi sulfatado. Baseado nesses resultados, pesquisas complementares estão sendo desenvolvidas para a obtenção de produtos biotecnológicos com finalidade nutricional e farmacêutica.



## **CAPÍTULO VII**

### **CONCLUSÕES**





## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento na área de preservação de *A. subrufescens* visando a produção de biomassa fúngica e polissacarídeos para a alimentação e saúde, por meio de processos tais como a fermentação em estado sólido a base de grãos de trigo e a submersa utilizando hidrolisados de resíduos agroindustriais. A utilização de membranas para a separação de polissacarídeos bioativos em função de sua massa molar viabiliza a obtenção de frações de interesse biotecnológico em escala industrial, com possibilidade de redução dos custos de produção.

No que se refere ao método de preservação de *A. subrufescens*, o carvão ativo demonstrou ser um ingrediente eficiente na composição do meio de cultura, tanto para o armazenamento quanto para a recuperação do fungo, sem causar alterações significativas nas suas características morfológicas e genéticas, durante o período de até 12 meses de estocagem, na metodologia utilizada.

A definição e a otimização dos principais fatores para a FES de *A. subrufescens* e obtenção de polissacarídeos bioativos são fundamentais para o aumento da escala produtiva, podendo contribuir para a área de alimentos funcionais. O polissacarídeo do micélio de *A. subrufescens* obtido por meio da FES foi identificado como glucomanana, similar ao obtido do micélio cultivado em FSm. A quantificação das glucomananas em substrato sólido por meio da CLAE-IR também é uma inovação. Essa técnica é promissora na utilização das glucomananas como indicador de biomassa em substratos sólidos.

Para a FSm de *A. subrufescens*, a utilização dos hidrolisados de resíduos agroindustriais, como o farelo de trigo e resíduo da cervejaria, representam uma fonte adequada de carbono para o crescimento do fungo e obtenção de polissacarídeos. Esse aproveitamento dos resíduos pode diminuir os custos de produção além de destinar os resíduos de forma apropriada.

Todos os polissacarídeos, tanto da frutificação quanto do micélio, obtidos em substratos sólido e líquido, e suas frações separadas pela massa molar, ativaram os macrófagos pela expressão da citocina TNF- $\alpha$ . Porém, somente as frações contendo polissacarídeos de maior massa molar, extraídos das frutificações e do micélio puro de *A. subrufescens*, foram capazes de ativar os macrófagos pela expressão de iNOS. Além disso, os polissacarídeos das frutificações também não apresentam efeitos citotóxicos nem genotóxicos, corroborando com a segurança do

consumo do isolado UFSC 51.

A análise da massa molar dos polissacarídeos e a atividade biológica *in vitro* em células do sistema imunológico podem ser utilizadas para a seleção da fração de interesse biotecnológico. Além disso, essas análises podem ser realizadas para monitorar a qualidade do produto final também em escala comercial de produção.

Baseado nesses resultados, pesquisas complementares estão sendo desenvolvidas para a obtenção de produtos biotecnológicos com finalidade nutricional e farmacêutica. Sendo assim, a escolha do processo dependerá de diversos fatores, entre os quais estão aqueles relacionados à finalidade do produto, aos aspectos econômicos, e a qualidade do produto final.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996. 865 p.
- ANDERSSON, H. C.; GRY, J. **Phenylhydrazines in the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*)**: occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations. *TemaNord* 2004:558, Nordic Council of Ministers. Copenhagen: Ekspressen Tryk & Kopicenter Press, 2004. 123 p.
- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and  $\beta$ -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel lectrophoresis/Hep G2 assay. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 699-703, 2009.
- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; GONZAGA, M. L. C.; SOARES, S. A.; RICARDO, M. P. S. N.; TSUBOY, M. S.; STIDL, R.; KNASMULLER, S.; LINHARES, R. E.; MANTOVANI, M. S. Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, p. 285-291, 2006.
- ANTHEUNISSE, J. Viability of lyophilized microorganisms after storage. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 39, n. 1, p. 243-248, 1973.
- ARORA, A.; RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 318, p. 920-926, 2004.
- ATIENZAR, F. A.; VENIER, P.; JHA, A. N.; DEPLEDGE, M. H. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations **Mutation Research**, v. 521, p. 151-163, 2002.
- BAMIAS, A., DIMOPOULOS, M. A. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. **European Journal of Internal Medicine**, v. 14, p. 459-469, 2003.

BAÑOS, J. G.; TOMASINI, A.; SZAKÁCS, G.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 105-110, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299 p.

BELLINI, M. F.; GIACOMINI, N. L.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. **Toxicology In Vitro**, v. 17, p. 465-469, 2003.

BERNARDSHAW, S.; HETLAND, G.; ELLERTSEN, L. K.; TRYGGESTAD, A. M. A.; JOHNSON, E. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells *in vitro*. **Inflammation**, v. 29, p. 4-6, 2005.

BETA GLUCAN RESEARCH. Review year 2003: **Beta glucan Research Papers, Patents and Patent Application**. Disponível em: <<http://www.betaglucan.org>>. Acesso em: 23 de agosto de 2003.

BOREK, C. Beta-glucan boosts immunity. **Nutrition Science News** [2003]. Disponível em: <<http://www.newhope.com/nutritionsciencenews>>. Acesso em: 17 de dezembro de 2004.

BOTELHO-CUNHA, V. A.; MATEUS, M.; PETRUS, J. C. C.; PINHO, M. N. Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 29-36, 2010.

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](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm)>. Acesso em: 01 de julho de 2003.

BREENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, p 883-894, 1990.

BROWN, G. D; GORDON, S. A new receptor for  $\beta$ -glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.

BROWN, G. D; GORDON, S. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.

BRUM, A. A. **Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos**. Florianópolis, 2005. 112 p Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos utilizando o *Statistica***. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; MIRÓN, A. S.; PASCUAL, V. G.; CHISTI, Y. Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 602-610, 2001.

CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A. G.; TAVARES, L. A. Structural characterization of  $\beta$ -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1295-1299, 2005.

CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; MARASCHIN, M.; DIAS, P. F.  $\beta$ -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. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 35, p. 36-47, 2006.

CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 849-850, 2007.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR., G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CASTILLO, A. **Cosmético, cosmecêutico e cosmiátrico** [2005?] Sociedade Brasileira de Cosmiatria. Disponível em: <<http://www.sociedadebrasileiradecosmiatria.org/sbc/notic.htm>>. Acesso em: 19 de junho de 2005.

CELMER, A. J. **Triagem in vitro de compostos com potencial atividade imunomodulatória em macrófagos**: Padronização de RT-PCR para detecção de marcadores de ativação. Florianópolis, 2010. 80 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947-1950, 2007.

CHANG, L. T.; ELANDER, R. P. Long-term preservation of industrially important microorganisms. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 49-57. 466 p.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition Review**, v. 54, p. 91-93, 1996.

CHANG, S. T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 1st century: nongreen revolution. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 1-8, 1999.

CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. Medicinal mushrooms - A prominent source of nutraceuticals for the 21st century. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 1, n. 4, p. 257-279, 2003.

CHANG, S. T., BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 473-476, 1996.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 482-492, 2006.

CHEN, A. W. **A practical guide to the cultivation of *Agaricus blazei*, a mushroom of culinary and biomedical importance**. 2003. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>>. Acesso em: 03 de março de 2005.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus code protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 403-409, 2004.

CHIRIGOS, M. A. Immunomodulators: current and future development and application. **Thymus**, v. 19, Suppl 1S7-20, 1992.

CHISTI, M. Y. **Airlift Bioreactors**. Nova Iorque: Elsevier Applied Sciences, 1989. 345 p.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Prediction of liquid circulation in airlift reactors with biological media. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 42, p. 211-219, 1988.

CHISTI, Y.; WENGE, F.; MOO-YOUNG, M. Relationship between riser and downcomer gas hold-up in internal-loop airlift reactors without gas-liquid separations. **The Chemical Engineering Journal**, v. 57, p. 7-13, 1995.

CHO, C. W.; LEE, D. Y.; KIM, C. W. Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 21-26, 2003.

CLARK, T. A.; ANDERSON, J. B. Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: Evolution in long-term culture. **Genetics**, v. 167, p. 1663-1675, 2004.

CLEARY, J. A.; GRAHAM, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and  $\beta$ -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- $\beta$ -D-glucan. **Immunology and Cell Biology**, v. 77, p. 395-403, 1999.

COGUMELO DO SOL®. **Linha Cosmética**. Disponível em:  
<<http://www.cogumelodosol.com.br>>. Acesso em: 19 de junho de 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **TRIGO-BRASIL**. Série Histórica de Área Plantada. Safras 1976/77 a 2008/09 em mil hectares. Disponível em:  
<<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Process Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3872-3875, 2000.

CROAN, S. C.; BURDSALL JR., H. H.; RENTMEESTER, R. M. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 5, p. 908-916, 1999.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Substrates for industrial fermentation. In: **Biotechnology: A textbook of industrial microbiology**. Tradução Thomas D. Brock. Wisconsin: Science Tech Publishers, 1990. p. 59-63. 357 p.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J.  $\beta$ -Glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 384-396, 2008.

DELMANTO, R.; LIMA, P.; SUGUI, M.; EIRA, A.; SALVADORI, D.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v. 496, p. 15-21, 2001.

DEMIRBAS, A.  $\beta$ -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 90, p. 773-777, 2005.



DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall  $\beta$ -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 6. p. 179-213. 636 p.

DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2671-2678, 2007.

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

DUARTE FILHO, P. F. M.; OLIVEIRA, V. L.; ROSSI, M. J. ; FURIGO JR, A.; PIZZOLATTI, M. G. Metabólitos secundários que afetam o crescimento e a viabilidade de culturas de fungos ectomicorrízicos. In: FERTBIO2008, 2008, Londrina-PR. **Fertbio2008: Desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental**. Londrina-PR: F&B Eventos e Comunicação, v. 1, p. 48-49, 2008.

EGUCHI, F.; WATANABE, Y.; ZHANG, J.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMOTO, H.; FUKUHARA, T.; HIGAKI, M. Inhibitory effects of hot water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Traditional Medicines**, v. 16, p. 201-207, 1999.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal: *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 398 p.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exopolysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT**, v. 40, p. 30-35, 2007.

FAZENDA, M. L.; SEVIOUR, R.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Submerged culture fermentation of “Higher Fungi”: The macrofungi. In: **Advances in Applied Microbiology**. Reino Unido: Elsevier, 2008. v. 63. p. 33-103.

FØRLAND, D. T.; JOHNSON, E.; TRYGGESTAD, A. M. A; LYBERG, T.; HETLAND, G. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro*. **Cytokine**, v. 49, p. 245-250, 2010.

FUJIMIYA, Y.; EBINA, T. Surimoto Forestry Co., Ltd., Japan. **Antitumor active substances**. U.S. Patent 6,093,694. 2000.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; NAKASHIMA, H.; MATUMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; EBINA, T.; KATAKURA, R. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 46, p.147-159, 1998.

GADD, G. M. Signal transduction in fungi. In: GOW, N. A. R.; GADD, G. M. **The Growing Fungus**. London: Chapman and Hall, 1995. p. 183-210.

GADEN, E. L. JR.; BOKANGA, M.; HARLANDER, S.; HESSELTINE, C. W.; STEINKRAUS, K. H. **Applications of Biotechnology in Traditional Fermented Foods**. Panel on the Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods, National Research Council. Washington: National Academy Press, 1992. 208 p. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/1939.html>>. Acesso em: 01 de julho de 2008.

GAO, H.; GU, W. Y. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 202-210, 2007.

GASSER, R. B. Molecular tools: advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 69-89, 2006.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 577-587, 2009.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados a micologia**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1996. 93 p.

GUTERREZ, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L.R., JORDÃO, B.Q., 2004. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 301-309, 2004.

HALLOCK, R. M. The taste of mushrooms. **McIlvainea**, v. 17, p. 33-41, 2007.

HAMEDI, A.; VAHID, H.; GHANATI, F. Optimization of the medium composition for production of mycelia biomass and exo-polysaccharide by *Agaricus blazei* Murill DPPH 131 using response-surface methodology. **Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 456-464, 2007.

HANTER, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate  $\beta$ -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 267-271, 2002.

HASHIM, M. A.; GUPTA, B. S. A study on the effect of operating parameters on the cross-flow microfiltration of yeasts. **Bioseparation**, v.7, p. 17-23, 1997.

HENGXIANG, C.; QIN, L.; YONGZHEN, T.; HONGFENG, Z.; LINA, Z.; KAN, D. Structure and chain conformation of a (1  $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucan from the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the antioxidant activity of its sulfated derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 771-778, 2008.

HETLAND, G.; JOHNSON, E.; LYBERG, T.; BERNARDSHAW, S.; TRYGGESTAD, A. M. A.; GRINDE, B. Effects of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Immunity, Infection and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, p. 363-370, 2008.

HILGER, S.; SIGG, L.; BARBIERI, A. Size fractionation of phosphorus (dissolved, colloidal and particulate) in two tributaries to Lake Lugano. **Aquatic sciences**, v. 61, p. 337-353, 1999.

HOLIDAY, J. C. **Mycelium? Fruitbodies? Extracts? Questions on quality in medicinal mushroom products or what's the best stuff?** 2003. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2005.

HÖLKER, U.; HÖFER, M; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HOLTEKJØLEN, A. K.; UHLEN, A. K.; BRÅTHEN, E.; SAHLSTRØM, S.; KNUTSEN, S. H. Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 348-358, 2006.

HUANG, S. J.; HUANG, L. C.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. **Antioxidant properties of *Agaricus blazei***. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>>. Acesso em: 26 de março de 2004.

HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; MOSLEM, M. A. Fungi: an unusual source for cosmetics. **Fungal Diversity**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2010.

INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.). Committee on the use of complementary and alternative medicine by the American Public. **Complementary and Alternative Medicine in the United States**, Washington: National Academy Press, 2005. 360 p. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/11182.html>> Acesso em: 01 de julho de 2008.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, v. 17, p. 277-284, 1997.

ITO, H., SUMIYA, T. H. Iwade Research Institute of Mycology Co., Ltd., Japan. **Oral drugs for treating AIDS patients**. U.S. Patent 6,120,772. 2000.

IWADE, I.; MIZUNO, T. Cultivation of Kawariharatake (*Agaricus blazei* Murill). **Food Review International**, v. 13, n. 3, p. 383-390, 1997.

JANEWAY JR, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect**, v. 3, n. 13, p. 1167-1171, 2001.

JOHANSSON, L.; TUOMAINEN, P., YLINEN, M.; EKHOLM, P.; VIRKKI, L. Structural analysis of water-soluble and -insoluble  $\beta$ -glucans of whole-grain oats and barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 267-274, 2004.

KALK, J. P.; LANGLYKKE, A. S. Cost estimation for biotechnology projects. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 363-385. 466 p.

KAWAGISHI, T.; KANDO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 393-403, 1990.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, p. 12-24, 2005.

KLEMM, D; SHAMAUDER, H, P; HEINZE, T. Cellulose. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 6. p. 275-319. 636 p.

KLIGMAN, A. M. Cosmecêuticos: a Terceira Categoria. **Cosmetics & Toiletries** (Edição em Português), v. 14, p. 72-76, 2002.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143-61, 2002.

KOMURA, D. C.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6192-6199, 2010.

KONDO, K.; WATANABE, A.; IWANAGA, Y.; ABEB, I.; TANAKA, H.; NAGAOKA, M. H.; AKIYAMA, H.; MAITANI, T. Analysis of agaritine in mushrooms and in agaritine-administered mice using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 834, n. 1-2, p. 55-61, 2006.

KOZUKA, M.; OYAMA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; LEE, K. H. Cancer preventive agents 3: Antitumor promoting effects of *Agaricus blazei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 6, p. 568-572, 2005.

KUMAR, M. T.; HIROOMI, I.; RIKA, N.; HITOSHI, Y.; HAJIME, H.; SHIRO, N. **Immunological effects of extracts of *Agaricus blazei* grown in submerged culture**. 2004. Disponível em: <<http://www.mushworld.com>>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2005.

KUNAMNENI, A; PRABHAKAR, T.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1538-1542, 2007.

LAKHANPAL, T. N.; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2, p. 288-303, 2005.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores In: by INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1990. p. 282-287.

LEE, Y-K; CHANG, H-H; KIM, J-S; KIM, J. K.; LEE, K-S. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 57, 145-150, 2000.

LEUCCI, M. R.; LENUCCI, M. S.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 11, Pages 1168-1180, 2008.

LIN, J. H.; YANG, S. S. Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murril by submerged fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 39, p. 98-108, 2006.

LIU, G. Q.; WANG, X. L. Biotechnological products and process engineering: Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 78-83, 2007.

LUIZ, R. C.; JORDÃO, B. Q.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murrill mushroom organic extracts in wild type CHO(k1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mutation Research**, v. 528, p. 75-79, 2003.

MAHESHWARI, R.; NAVARAJ, A. Senescence in fungi: the view from *Neurospora*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 280, p. 135-143, 2008.

MANDALARI, G.; FAULDS, C. B.; SANCHO, A. I; SAIJA, A.; BISIGNANO, G.; LOCURTO, R.; WALDRON, K. W. Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. **Journal of Cereal Science**, v. 42, p. 205-212, 2005.

MANTOVANI, T. R. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Effect of addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 139-143, 2007.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, p. 477-482. 1996.

MARÍN, S.; CUEVAS, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 139-149, 2008.

MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 80-86, 2004.

MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, v. 26, p. 7481-7503, 2005.

MARX, D. H. The influence if ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to phatogenic fungi and soil bacteria. **Phytopatology**, v. 59, p. 153-163, 1969.

MATSUI, K.; KODAMA, N.; NANBA, H. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 172, p. 193-198, 2001.

MATSUI, T. O.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 133-144, 2003.



MATTILA, P.; SUONPAA, K.; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, v. 16, p. 694-696, 2000.

MAYELL, M. Maitake extracts and their therapeutic potential. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 1, p. 48-60, 2001.

MENDONÇA, M. M.; KASUYA, M. C.; CADORIN, A.; VIEIRA, A. J. *Agaricus blazei* Cultivation for a Living in Brazil. In: **Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation. Part II. Mushrooms for Better Life.** Seoul: MushWorld, 2005. p. 208-218.

MIAO, L.; NIELSEN, M.; THEWALT, J.; IPSEN, H.; BLOOM, M.; ZUCKERMANN, M. J.; MOURITSEN, O. G. From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 1429-1444, 2002.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Review**, v. 56, p. 185-229, 2004.

MISAKI, A.; KAKUTA, M. Kikurage (Tree-ear) and Shirokikurage (White jellyleaf): *Auricularia auricula-judae* and *Tremella fuciformis*. **Food Review International**, v. 11, n.1, p. 211-218, 1995.

MISAKI, A.; KISHIDA, E. Straw mushroom, Fukurotake, *Volvariella volvacea*. **Food Review International**, v.11, p. 219-223, 1995.

MIZUMOTO, N.; GAO, J.; MATSUSHIMA, H.; OGAWA, Y.; TANAKA, H.; TAKASHIMA, A. Discovery of novel immunostimulants by dendritic-cell-based functional screening. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3082-3089, 2005.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Mill. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 7, n. 4, p. 707-714, 1999.

MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990a.

IZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2897-2905, 1990b.

MOL, P. C. Hyphal wall elongation during expansion growth of the common mushroom (*Agaricus bisporus*). 1989. 115 p. Tese (Doutorado). Universidade de Groningen, Alemanha.

MOL, P. C.; VERMEULEM, C. A; WESSELS, J. G. Diffuse extension of hyphae in stipes of *Agaricus bisporus* may be based on unique wall structure. **Mycological Research**, v. 94, p. 480-488, 1990.

MOL, P. C.; WESSELS, J. G. H. Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, v. 94, p. 472-479, 1990.

MOON, E. J.; KIM, J. W.; KIM, C. K. Fabrication of membranes for the liquid separation Part 2: Microfiltration membranes prepared from immiscible blends containing polysulfone and poly(1-vinylpyrrolidone-co-acrylonitrile) copolymers. **Journal of Membrane Science**, v. 274, p. 244-251, 2006.

MOORE, D.; CHIU, S. W. **Fungal products as food**. In: POINTING, S. B.; HYDE, K. D. Bio-Exploitation of Filamentous Fungi. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2001. p. 223-251.

MURPHY, P. M.; BITTAR, E. E.; BITTAR, N. Phagocytes in immunity and inflammation In: BITTAR, E. E.; BITTAR, N. **Principles of Medical Biology**. Connecticut:Elsevier, 1996, v. 6, p. 197-229.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3801-3806, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2453-2460, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004a.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, 094-100, 2004b.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681-1684, 2001.

NANDI, B. K.; UPPALURI, R.; PURKAIT, M.K. Preparation and characterization of low cost ceramic membranes for microfiltration applications. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 1-2, p. 102-110, 2008.

NEVES, M. A.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F.; LEITE, C. L.; CAMELINI, C. M.; RIBAS, L. C. C.; MENDONÇA, M. M. Physiological and genetic variability of commercial isolates of culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetidae) cultivated in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, n. 4, p. 575-585, 2005.

NIE, S.; XIE, M.; WANG, Y. Preparation of tea glycoprotein and its application as a calibration standard for the quantification and molecular weight determination of tea glycoprotein in different tea samples by high-performance gel-permeation chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 680-686, 2005.

NIENOW, A.W. Hydrodynamics of stirred bioreactors. **Applied Mechanical Review**, v. 51, p. 3-32, 1998.

OBORNÍK, M.; KLÍ, M.; DÍŇKA, L. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p. 1150-1155, 2000.

OEI, P. **Mushroom cultivation**: with especial emphasis on appropriate techniques for developing countries. Leiden: Tool publications, 1996. 274 p.

OHGA, S. Growth rate of mycelium of shiitake *Lentinus edodes*, in relation to water potential of medium. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, v. 34, n. 4, p. 413-420, 1990.

OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.

OHNO, N.; HAYASHI, M.; IINO, K.; SUZUKI, I.; OIKAWA, S.; OIKAWA, S.; SATO, K.; SUZUKI, Y.; YADOMAE, T. Effect of  $\beta$ -glucans on the antitumor activity of Grifolan. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 2149-2154, 1986.

OKUBO, J.; KAZUKUNI, K.; OHKUBO, S. **Method of cultivating *Agaricus blazei* mushroom**. U.S. Patent 5,048,227. 1991.

ONO, M.; TORISU, H.; FUKUSHI, J.; NISHIE, A.; KUWANO, M. Biological implications of macrophage infiltration human tumor angiogenesis. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 43, 69-71, 1999.

OOIJKAAS, L. P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R. M. Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 22, n. 6, p. 480-486, 1998.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, 25-33, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PASSETI, G. **Triagem *in vitro* de compostos naturais ou sintéticos com potencial atividade imunomodulatória em células Jurkat: Padronização de RT-PCR para detecção da expressão do mRNA da interleucina-2**, 2009. 104 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311-333, 2006.

PRAKASH, G. V. B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R. R. S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1530-1537, 2008.

PROSSER, J. I.; TOUGH, A. J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Critical Review Biotechnology**, v. 10, p. 253-274, 1991.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.

RAHARDJO, Y. S. P. **Fungal mats in solid-state fermentation**. 2005. 164 p. Tese (PhD). Universidade de Wageningen, Países Baixos.

RAU, U. Schizophyllan In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 6. p. 61-69. 636 p.

RICHTER, D. L.; BRUHN, J. N. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycetes cultures from cold storage in sterile water. **Canadian Journal Microbiology**, v. 35, p. 1055-1060, 1989.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.

ROIGÉ, M. B.; ARANGUREN, S. M.; RICCIO, M. B.; PEREYRA, S.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 233-237, 2009.

ROSS, G. D.; VĚTVIČKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VĚTVIČKOVÁ, J. Therapeutic intervention with complement and  $\beta$ -glucan in cancer (Review). **Immunopharmacology**, v. 42, p. 61-74, 1999.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator Airlift**. Florianópolis, 2006. 183 p. Tese (Doutorado em desenvolvimento de processos químicos e biotecnológicos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in a airlift bioreactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 175-181, 2002.

ROSSI, M. J.; STREIT, H. C.; FURIGO Jr, A.; BRUM, A. A.; MENDONÇA, M. M. Inoculante de *Agaricus brasiliensis* produzido em biorreator *Airlift* e encapsulado em gel de alginato de cálcio. In: **FERTBIO 2004**, CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO (XXVI Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, X Reunião Brasileira sobre Micorrizas, VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, V Reunião Brasileira de Biologia do Solo), 19 a 23 de julho de 2004, Lages – Santa Catarina – Brasil (Publicado em CD – ROM).

ROYSE, D. J.; SANCHEZ-VAZQUEZ, J. E. Influence of precipitated calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 225-228, 2003.

SAQIB, A.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. 2010. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2. 541 p.

SCRASE, R. Cultivating mushrooms: from pure culture to spawn production. **Mycologist**, v. 9, n. 2, p. 53-56, 1995.

SHIMOMURA, N.; HASEBE, K. Morphological mutation of *Lentinula edodes* mycelium, particularly detectable in the dikaryotic state. **Mycoscience**, v. 47, p. 224-227, 2006.

SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- $\alpha$  release capability of macrophage cell line RAW 264.7. **Biotechnology letters**, v. 25, p. 2061-2064, 2003.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SINDICERV. Sindicato Nacional da Indústria Cervejeira. **Fábricas de cerveja no Brasil**. Disponível em: <[http://www.sindicerv.com.br/pdf/Mapa\\_Unidades\\_Produtivas\\_Cerveja\\_Brasil.pdf](http://www.sindicerv.com.br/pdf/Mapa_Unidades_Produtivas_Cerveja_Brasil.pdf)>. Acesso em 22 de dezembro de 2008.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SMITH, J. E.; McKAY, D.; MOLINA, R. Survival of mycorrhizal fungal isolates stored in sterile water at two temperatures and retrieved on solid and liquid nutrient media. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 736-742, 1994.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnology Letters**, v. 24; p. 1839-1845, 2002.

SOARES, B. M. C.; SARON, E. S. Microanálise elementar de materiais: aplicações do sistema MEV-EDX. **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens**, v. 22, n. 1, 2010.

SOOD, R.; KINNUNEN, P. K. J. Cholesterol, lanosterol, and ergosterol attenuate the membrane association of LL-37(W27F) and temporin L. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1460-1466, 2008.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v. 26, p. 103-108, 2001.

SOUSA, F. T. G. **Avaliação da toxicidade e do mecanismo da ação anti-herpética do fungo *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem**, 2008. 94f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.



SOUSA, F. T. G., CAMELINI, C. M., MENDONCA, M. M., LEAL, P. C., NUNES, R., BARARDI, C. R. M., SIMÕES, C. M. O. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antiherpes activity of *Agaricus brasiliensis*. In: XVIII NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 2007, Rio de Janeiro. **Vírus: Reviews and Research/ Sociedade Brasileira de Virologia**. Rio de Janeiro: Imprinta Express Ltda, 2007. v. 12. p.126-127.

STAMETS, P. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. 3<sup>a</sup> Ed., California: Ten Speed Press, 2000. 592 p.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 60, p. 71-80, 1993.

STOYCHEV, I; HOMOLKA, L.; NERUD, F.; LISÁ, L. Activities of ligninolytic enzymes in some whiterot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 211-214, 1998.

SUI, Z.; YANG, R.; LIU, B.; GU, T.; ZHAO, Z.; SHI, D.; CHANG, D. Chemical analysis of *Agaricus blazei* polysaccharides and effect of the polysaccharides on IL-1 mRNA expression in skin of burn wound-treated rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 155-157, 2010.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharides from microorganisms, plants and animals. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides I – Polysaccharides from prokaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 5. p. 1-20. 532 p.

TAN, C. S.; STALPERS, J. A. Freeze-drying of fungal. **Mycologia**, v. 83, p. 543-584, 1984.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNGN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

TENG, W. L. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 2, p. 77-83, 1997.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. Starch. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. v. 6. p. 61-69. 636 p.

TRABULSI, L. R.. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

UCHIYAMA, S.; HARAMAKI, K. Christie, Parker & Hale, LLP, USA. **Use of *Agaricus blazei* Murill to prevent or treat skin and other disorders**. U.S. Patent 20020119164. August 29, 2002.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA): guidance for industry, bioanalytical method validation, 2001. p. 1-22.

VALVERDE, P. Bagazo y su futuro. **Cerveza y Malta**, v. 122, p. 7-26, 1994.

VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 221-237, 2005.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology: Review. **Journal of Membrane Science**, v. 297, p. 16–50, 2007.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Membrane separations in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 208-211, 2001.

VENDRELL-PASCUAS, S.; CASTELLOTE-BARGALLÓ, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 591-597, 2000.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 267-290, 2002.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 31-62, 1999.

WEETE, J. D. Structural and function of sterols in Fungi. **Advances in Lipid Research**, v. 23, p. 115-168, 1989.

WILLIAMS, D. L.; PETRUS, H. A.; McNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W.; Di LUZIO, N. R. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Immunopharmacology**, v. 22, p. 139-156, 1991.

YAMAGUCHI, H. **Schematic structure of fungus cell wall**. [2003?] Disponível em: <<http://www.sambomed.co.kr>>. Acesso em: 15 de setembro de 2004.

YUMINAMOCCHI, E.; KOIKE, T.; TAKEDA, K.; HORIUCHI, I.; OKUMURA, K. Interleukin-12- and interferon- $\gamma$ -mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. **Immunology**, v. 121, p. 197-206, 2007.

XIAO, Y.; HONGMEI, L.; HONG, Y.; RUGANG, Z. Extraction immunocompetent sections of *Agaricus blazei* Murill polysaccharides by membranes technology. In: **International Conference on Complex Medical Engineering**, 2007.

ZEISEL, S. H. Regulation of “nutraceuticals”. **Science**, v. 285, p. 1853-1855, 1999.

ZHANG, Z.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 33-40, 1995.

ZHANG, S.; HEA, B.; GE, J.; ZHAI, C.; LIU, X.; LIU, P. Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia–reperfusion rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 363-366, 2010.

ZHANG, M.; ZHANG, L.; WANG, Y.; CHEUNG, P. C. K. Chain conformation of sulfated derivatives of beta-glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2863-2870, 2003.

ZIMMERMAN, J. W.; LINDERMUTH, J.; FISH, P. A.; PALACE, G. P.; STEVENSON, T. T.; DeMONG, D. E. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a  $\beta$ -(1→3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 22014-22020, 1998.

## **APÊNDICES**



## APÊNDICE A – MATRIZ DO COEFICIENTE DE SIMILARIDADE DE DICE BASEADA NA ANÁLISE DE RAPD

Tabela 1A - Matriz do coeficiente de similaridade DICE obtida a partir dos perfis eletroforéticos utilizando os iniciadores AB1 a AB10 do DNA total de *Agaricus subrufescens* oriundos do micélio no 4º mês de preservação em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A1 e A2), BDA com óleo mineral (B1 e B2), ou discos em água (C1 e C2); em diferentes meios de recuperação: BDA (1) ou BDA com adição de carvão ativo (2), comparativamente com o micélio antes da preservação (0) e a frutificação (FR).

	FR	0	A1	A2	B1	B2	C1	C2
FR	X							
0	0,912	X						
A1	0,912	0,968	X					
A2	0,919	0,960	0,992	X				
B1	0,903	0,960	0,960	0,967	X			
B2	0,910	0,951	0,968	0,975	0,992	X		
C1	0,927	0,967	0,984	0,992	0,975	0,983	X	
C2	0,927	0,967	0,984	0,992	0,975	0,983	1,000	X

Tabela 2A - Matriz do coeficiente de similaridade DICE obtida a partir dos perfis eletroforéticos utilizando os iniciadores AB1 a AB10 do DNA total de *Agaricus subrufescens* oriundos do micélio no 8º mês de preservação em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A1 e A2), BDA com óleo mineral (B1 e B2), ou discos em água (C1 e C2); em diferentes meios de recuperação: BDA (1) ou BDA com adição de carvão ativo (2), comparativamente com o micélio antes da preservação (0) e a frutificação (FR).

	FR	0	A1	A2	B1	B2	C1	C2
FR	X							
0	0,874	X						
A1	0,896	0,930	X					
A2	0,896	0,930	1,000	X				
B1	0,890	0,937	0,993	0,993	X			
B2	0,896	0,930	1,000	1,000	0,992	X		
C1	0,910	0,944	0,985	0,985	0,978	0,985	X	
C2	0,910	0,944	0,985	0,985	0,978	0,985	1,000	X

Tabela 3A - Matriz do coeficiente de similaridade DICE obtida a partir dos perfis eletroforéticos utilizando os iniciadores AB1 a AB10 do DNA total de *Agaricus subrufescens* oriundos do micélio no 12º mês de preservação em tubos contendo meio BDA com carvão ativo (A1 e A2), ou BDA com óleo mineral (B1 e B2); em diferentes meios de recuperação: BDA (1) ou BDA com adição de carvão ativo (2), comparativamente com o micélio antes da preservação (0) e a frutificação (FR).

	<b>FR</b>	<b>0</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>
<b>FR</b>	X					
<b>0</b>	0,926	X				
<b>A1</b>	0,913	0,968	X			
<b>A2</b>	0,913	0,968	1,000	X		
<b>B1</b>	0,935	0,968	0,978	0,978	X	
<b>B2</b>	0,913	0,968	1,000	1,000	0,978	X



## APÊNDICE B – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO DE *Agaricus subrufescens* EM GRÃOS

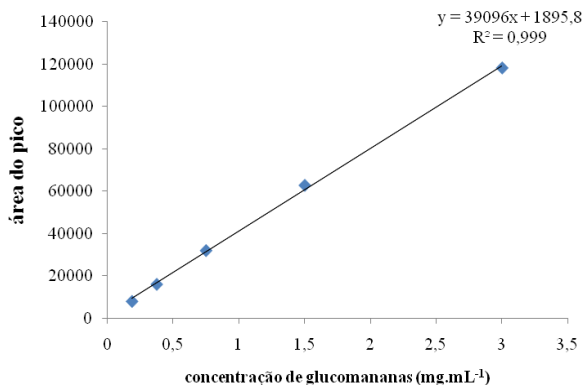


Figura 1B – Curva analítica para o padrão de glucomanana nas concentrações entre 0,187 e 3,00  $\text{mg.mL}^{-1}$  em relação as áreas dos picos de glucomananas detectadas por CLAE-IR.

Tabela 1B - Variação intra- and inter-dia das áreas dos picos de glucomananas detectadas por CLAE-IR.

Análise	Glucomananas ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Área do pico				CV (%)*	
		Intra-dia (n=3)			Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
1	0,375	15195	15179	15419	15264	0,88	3,00
2	0,375	14730	14510	14713	14651	0,84	
3	0,375	15279	15764	15573	15539	1,57	
4	0,75	32020	32201	32831	32351	1,32	1,24
5	0,75	31345	31885	31450	31560	0,91	
6	0,75	31650	31685	32515	31950	1,53	
7	1,50	61749	62424	60443	61539	1,64	5,17
8	1,50	64929	64030	64089	64349	0,78	
9	1,50	68571	68018	68016	68202	0,47	

\*Coeficiente de variação relativo à média das análises.

Tabela 2B – Exatidão do método de CLAE-IR.

Glucomananas (mg mL <sup>-1</sup> )		Exatidão (%) (n=3)		DP (%) <sup>b</sup>
0,375	91,18	87,00	93,06	3,10
0,75	103,86	101,17	102,50	1,35
1,50	101,70	106,50	113,07	5,70
Média <sup>a</sup>		100,00		8,16

<sup>a</sup>Refere-se a média de todas medidas da exatidão.

<sup>b</sup>Desvio padrão da média.

Tabela 3B – Áreas dos picos obtidos de diferentes amostras determinada através de CLAE-IR.

Amostras	Área do pico (n=3)			CV (%) <sup>*</sup>
1	49285	50723	49312	1,65
2	53775	53650	53670	0,13
3	61159	60086	60408	0,91

\*Coeficiente de variação relativo à média das análises.

Tabela 4B- Cálculo dos contrastes para o planejamento experimental fatorial fracionário saturado e espelho 2<sup>7-4</sup> para a concentração de glucomanana considerando os fatores volume de água de cozimento (A), quantidade de carbonato de cálcio (B), tempo de cozimento (C), tempo de molho após o cozimento (D), tempo de descanso após cozimento (E), tempo de autoclavagem (F) e inóculo inicial (G).

Fator	t <sub>i</sub>	t <sub>i</sub> '	½ (t <sub>i</sub> + t <sub>i</sub> ')	½ (t <sub>i</sub> - t <sub>i</sub> ')
A	-0,08	0,73	0,28	BD + CE + FG= -0,40
B	0,59	-0,24	0,17	AD + CF + DG= 0,35
C	1,95	1,71	1,83	AE + CF + EF= 0,12
D	1,86	1,29	1,57	AB + CG + EF= 0,28
E	0,12	-0,27	-0,07	AC + BG + DF= 0,19
F	0,19	-0,59	-0,20	BC + AG + DE= 0,39
G	1,11	-0,05	0,53	CD + BE + AF= 0,58

Tabela 5B – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores tempo de cozimento e tempo de molho após o cozimento para a resposta do teor de umidade dos grãos.

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	24,80167	1,159955	21,3816	0,000000	22,29574	27,30761
(1)tempo de cozimento (L)	0,46686	0,073229	6,3753	0,000024	0,30866	0,62506
Tempo de cozimento (Q)	0,00076	0,001555	0,4867	0,634559	-0,00260	0,00411
(2) tempo de molho(L)	0,97038	0,073229	13,2513	0,000000	0,81218	1,12858
Tempo de molho(Q)	-0,01608	0,001555	10,3440	0,000000	-0,01944	-0,01272
1L e 2L	-0,00487	0,001822	-2,6753	0,019071	-0,00881	-0,00094

Tabela 6B - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático da influência dos fatores tempo de cozimento e tempo de molho após o cozimento para a resposta do teor de umidade dos grãos.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	366,9021	5	73,38042	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	17,2488	16	1,07805	68,06	2,85
Falta de ajuste	13,7955	3	4,59850	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	3,4533	13	0,26563	17,31	3,41
Total	384,1509	21			

Varição explicada: 95,50 %

Máxima de variação explicável: 99,10 %

Tabela 7B – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores tempo de cozimento e tempo de molho após o cozimento para a resposta da glucomanas.

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	0,206595	0,301409	0,6854	0,505112	-0,444559	0,857749
(1)tempo de cozimento (L)	0,328727	0,019028	17,2759	0,000000	0,287620	0,369835
Tempo de cozimento (Q)	-0,007317	0,000404	-18,1141	0,000000	-0,008190	-0,006444
(2) tempo de molho(L)	0,242257	0,019028	12,7315	0,000000	0,201149	0,283364
Tempo de molho(Q)	-0,004292	0,000404	-10,6250	0,000000	-0,005165	-0,003419
1L e 2L	-0,001637	0,000473	-3,4575	0,004246	-0,002660	-0,000614

Tabela 8B - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático da influência dos fatores tempo de cozimento e tempo de molho após o cozimento para a resposta concentração de glucomanas.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	10,40514	5	2,081028	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	1,96097	16	0,122561	16,97	2,85
Falta de ajuste	1,72674	3	0,575580	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	0,23423	13	0,018018	31,94	3,41
Total	12,36611	21			

Variação explicada: 84,14 %

Máxima de variação explicável: 98,10 %

Tabela 9B – Coeficientes para o modelo linear do delineamento experimental completo 2<sup>2</sup> com pontos centrais para os fatores gesso e calcita para a resposta do pH.

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(9)	P	-95 %	+95 %
Média	6,405000	0,010138	631,7853	0,000000	6,382066	6,427934
Curvatura	-0,058750	0,007743	-7,5875	0,000034	-0,076266	-0,041234
(1)gesso (%)	-0,198333	0,004779	-41,5004	0,000000	-0,209144	-0,187522
(2)cal (%)	0,895000	0,014337	62,4250	0,000000	0,862567	0,927433
1 e 2	0,031667	0,006759	4,6854	0,001144	0,016378	0,046956

Tabela 10B - Análise de variância para ajuste do modelo linear da influência dos fatores gesso e calcita para a resposta do pH.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	2,380638	3	0,793546	F <sub>3,10</sub>	
Resíduos	0,013684	10	0,001368	579,90	3,70
F. ajuste	0,011834	1	0,011834	F <sub>1,9</sub>	
Erro puro	0,00185	9	0,000206	57,57	5,12
Total	2,394322	13			

Variação explicada: 99,42 %

Máxima de variação explicável: 99,92 %

Tabela 11B – Coeficientes para o modelo linear do delineamento experimental completo 2<sup>2</sup> com pontos centrais para os fatores gesso e calcita para a resposta da glucomananas.

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(9)	P	-95 %	+95 %
Média	6,188906	0,070906	87,28287	0,000000	6,02851	6,349307
Curvatura	0,142887	0,054156	2,63846	0,026982	0,02038	0,265396
(1)gesso (%)	-0,217626	0,033426	-6,51078	0,000110	-0,29324	-0,142012
(2)cal (%)	-0,903906	0,100277	-9,01412	0,000008	-1,13075	-0,677065
1 e 2	0,168202	0,047271	3,55826	0,006136	0,06127	0,275136

Tabela 12B - Análise de variância para ajuste do modelo linear da influência dos fatores gesso e calcita para a resposta da glucomananas.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	1,29741	3	0,43247	F <sub>3,10</sub>	
Resíduos	0,16050	10	0,01605	26,94	3,70
Falta de ajuste	0,07000	1	0,07000	F <sub>1,9</sub>	
Erro puro	0,09049	9	0,01005	6,96	5,12
Total	1,45791	13			

Varição explicada: 88,99 %

Máxima de variação explicável: 93,79 %

Tabela 13B – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores temperatura de incubação e quantidade de inóculo inicial para a resposta da concentração de glucomananas.

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	-34,6509	5,423142	-6,38945	0,000024	-46,3669	-22,9349
(1)temperatura (°C) (L)	2,7470	0,394580	6,96182	0,000010	1,8946	3,5994
temperatura (°C) (Q)	-0,0496	0,007474	-6,64272	0,000016	-0,0658	-0,0335
(2)inóculo (%) (L)	0,8145	0,190913	4,26653	0,000919	0,4021	1,2270
inóculo (%) (Q)	-0,0332	0,004204	-7,89414	0,000003	-0,0423	-0,0241
1L e 2L	-0,0047	0,006570	-0,71371	0,488023	-0,0189	0,0095

Tabela 14B - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático da influência dos fatores temperatura de incubação e quantidade de inóculo inicial para a resposta da concentração de glucomananas.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado</sub></b>
Regressão	7,535412	5	1,507082	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	0,679923	16	0,042495	35,46	2,85
Falta de ajuste	0,033419	3	0,011140	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	0,646504	13	0,049731	0,22	3,41
Total	8,215335	21			

Varição explicada: 91,72 %

Máxima de variação explicável: 92,13 %

## APÊNDICE C - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO DE *Agaricus subrufescens* EM HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

Tabela 1C – Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para a resposta da biomassa no 7º dia de cultivo.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(8)	P	-95 %	+95 %
Média	4,29625	0,320518	13,40407	0,000001	3,55713	5,035367
(1)Tempo hidrólise	2,36250	0,641037	3,68544	0,006171	0,88427	3,840733
(2)HCl	0,58500	0,641037	0,91258	0,388135	-0,89323	2,063233
(3)Resíduo	3,09500	0,641037	4,82812	0,001308	1,61677	4,573233
1 e 2	-0,56000	0,641037	-0,87358	0,407801	-2,03823	0,918233
1 e 3	0,81000	0,641037	1,26358	0,241958	-0,66823	2,288233
2 e 3	-1,47250	0,641037	-2,29706	0,050703	-2,95073	0,005733
1*2*3	-0,84250	0,641037	-1,31428	0,225183	-2,32073	0,635733

Tabela 2C – Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para a resposta da biomassa no 14º dia de cultivo.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(8)	P	-95 %	+95 %
Média	10,59000	0,100542	105,3296	0,000000	10,35815	10,82185
(1)Tempo hidrólise	2,12250	0,201083	10,5553	0,000006	1,65880	2,58620
(2)HCl	2,41000	0,201083	11,9851	0,000002	1,94630	2,87370
(3)Resíduo	6,34000	0,201083	31,5293	0,000000	5,87630	6,80370
1 e 2	0,82250	0,201083	4,0904	0,003484	0,35880	1,28620
1 e 3	-1,00750	0,201083	-5,0104	0,001039	-1,47120	-0,54380
2 e 3	2,51000	0,201083	12,4824	0,000002	2,04630	2,97370
1*2*3	0,72250	0,201083	3,5930	0,007053	0,25880	1,18620

Tabela 3C – Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para a concentração de carbono nos hidrolisados.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(8)	P	-95 %	+95 %
Média	14,34000	0,044274	323,8947	0,000000	14,23790	14,44210
(1)Tempo hidrólise	3,09750	0,088547	34,9813	0,000000	2,89331	3,30169
(2)HCl	3,68250	0,088547	41,5879	0,000000	3,47831	3,88669
(3)Resíduo	5,87750	0,088547	66,3770	0,000000	5,67331	6,08169
1 e 2	-0,40000	0,088547	-4,5174	0,001957	-0,60419	-0,19581
1 e 3	-0,14500	0,088547	-1,6375	0,140152	-0,34919	0,05919
2 e 3	0,20500	0,088547	2,3151	0,049291	0,00081	0,40919
1*2*3	-0,76750	0,088547	-8,6677	0,000024	-0,97169	-0,56331

Tabela 4C- Efeitos das alises do planejamento experimental fatorial incompleto  $2^{4-1}$  dos fatores limitantes na composição do hidrolisado.

Fator	Alises
1) HCl (%)	
2) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (g.L <sup>-1</sup> )	
3) Resíduo (FT e RC)	
4) Carvão ativo (g.L <sup>-1</sup> )	
1 x 2	3 4
1 x 3	2 4
1 x 4	2 3

Tabela 5C- Cálculo dos contrastes e respectivos índices estatísticos para a resposta da biomassa do planejamento experimental fatorial incompleto  $2^{4-1}$  dos fatores limitantes na composição do hidrolisado.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(16)	P	-95 %	+95 %
Média	14,11292	0,223928	63,02424	0,000000	13,63821	14,58762
(1)Conc HCl	3,53750	0,447857	7,89873	0,000001	2,58809	4,48691
(2) $\text{NH}_4\text{NO}_3$	-0,55250	0,447857	-1,23365	0,235148	-1,50191	0,39691
(3)Resíduo	7,67917	0,447857	17,14648	0,000000	6,72975	8,62858
(4)Carvão	0,83917	0,447857	1,87374	0,079349	-0,11025	1,78858
1 e 2	-0,54083	0,447857	-1,20760	0,244749	-1,49025	0,40858
1 e 3	1,10417	0,447857	2,46545	0,025375	0,15475	2,05358
1 e 4	1,54750	0,447857	3,45535	0,003257	0,59809	2,49691

Tabela 6C – Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para a resposta da biomassa obtida no cultivo de *A. subrufescens* no hidrolisado do resíduo RC.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	7,93333	0,131265	60,4374	0,000000	7,64975	8,21691
(1)HCl (L)	2,05394	0,160766	12,7759	0,000000	1,70662	2,40125
HCl (Q)	-2,12021	0,191350	-11,0802	0,000000	-2,53360	-1,70682
(2) Tempo hidrólise (L)	-1,54755	0,160766	-9,6261	0,000000	-1,89486	-1,20023
Tempo hidrólise (Q)	0,30229	0,191350	1,5798	0,138172	-0,11110	0,71568
1 e 2	-1,10000	0,227358	-4,8382	0,000324	-1,59118	-0,60882



Tabela 7C – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo RC para a resposta da biomassa de *Agaricus subrufescens* obtida no cultivo.

Fator	Regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	2,0206	1,193404	1,6932	0,114237	-0,5576	4,5988
(1)HCl (L)	46,1159	3,459142	13,3316	0,000000	38,6429	53,5889
HCl (Q)	-47,1157	4,252228	-11,0802	0,000000	-56,3021	-37,9294
(2)Tempo de hidrólise (L)	-0,0581	0,062265	-0,9326	0,368049	-0,1926	0,0764
Tempo de hidrólise (Q)	0,0015	0,000957	1,5798	0,138172	-0,0006	0,0036
1L e 2L	-0,3667	0,075786	-4,8382	0,000324	-0,5304	-0,2029

Tabela 8C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático para a resposta da biomassa do cultivo no hidrolisado do resíduo RC.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	44,2165	5	8,84330	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	3,5806	16	0,22379	39,51	2,85
Falta de ajuste	2,2367	3	0,74556	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	1,3439	13	0,10334	7,21	3,41
Total	47,7972	21			

Varição explicada: 92,50 %

Máxima de variação explicável: 97,18 %

Tabela 9C – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo RC para a resposta da concentração de carbono no hidrolisado.

Fator	Regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	-0,6374	1,367594	-0,46604	0,648897	-3,5919	2,3172
(1)HCl (L)	51,8927	3,964042	13,09086	0,000000	43,3289	60,4565
HCl (Q)	-48,6250	4,872888	-9,97868	0,000000	-59,1522	-38,0978
(2)Tempo de hidrólise (L)	0,0034	0,071353	0,04705	0,963192	-0,1508	0,1575
Tempo de hidrólise (Q)	0,0008	0,001096	0,68577	0,504906	-0,0016	0,0031
1L e 2L	0,1778	0,086848	2,04726	0,061399	-0,0098	0,3654

Tabela 10C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático para a resposta da concentração de carbono hidrolisado do resíduo RC.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	315,9039	5	63,1807	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	11,9285	16	0,7455	84,74	2,85
Falta de ajuste	10,1635	3	3,3878	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	1,7650	13	0,1357	24,96	3,41
Total	327,8324	21			

Variação explicada: 96,36 %

Máxima de variação explicável: 99,46 %

Tabela 11C – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo RC para a resposta da bioconversão do carbono no hidrolisado em biomassa de *Agaricus subrufescens*.

Fator	Regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	161,202	11,03762	14,60475	0,000000	137,356	185,047
(1) HCl (L)	-203,606	31,99311	-6,36405	0,000025	-272,723	-134,489
HCl (Q)	116,455	39,32826	2,96111	0,011034	31,492	201,419
(2)Tempo de hidrólise (L)	-2,442	0,57588	-4,24018	0,000965	-3,686	-1,198
Tempo de hidrólise (Q)	0,016	0,00885	1,81266	0,093033	-0,003	0,035
1L e 2L	1,066	0,70093	1,52052	0,152323	-0,448	2,580

Tabela 12C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático para a resposta da bioconversão do carbono no hidrolisado do resíduo RC em biomassa de *Agaricus subrufescens*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	5986,131	5	1197,226	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	511,170	16	31,948	37,47	2,85
Falta de ajuste	396,204	3	132,068	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	114,966	13	8,843	14,93	3,41
Total	6497,301	21			

Variação explicada: 92,13 %

Máxima de variação explicável: 90,36 %

Tabela 13C - Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo FT para a resposta da biomassa de *Agaricus subrufescens* obtida no cultivo.

<b>Fator</b>	<b>Regressão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>t(13)</b>	<b>P</b>	<b>-95 %</b>	<b>+95 %</b>
Média	-8,9289	2,83434	-3,15025	0,007668	-15,052	-2,8057
(1) HCl (L)	100,1156	8,21547	12,18624	0,000000	82,367	117,8640
HCl (Q)	-97,1458	10,09905	-9,61931	0,000000	-118,963	-75,3282
(2)Tempo de hidrólise (L)	0,6618	0,14788	4,47552	0,000625	0,342	0,9813
Tempo de hidrólise (Q)	-0,0075	0,00227	-3,28483	0,005918	-0,012	-0,0026
1L e 2L	-0,5267	0,17999	-2,92606	0,011802	-0,916	-0,1378

Tabela 14C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático para a resposta da biomassa do cultivo no hidrolisado do resíduo FT.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado</sub></b>
Regressão	307,9864	5	61,5972	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	19,7750	16	1,2359	49,84	2,85
Falta de ajuste	12,1941	3	4,0647	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	7,5809	13	0,5831	6,97	3,41
Total	327,7614	21			

Varição explicada: 93,96 %.

Máxima de variação explicável: 93,90 %

Tabela 15C – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise para a resposta da concentração do carbono no hidrolisado do resíduo FT.

<b>Fator</b>	<b>Regressão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>t(13)</b>	<b>P</b>	<b>-95 %</b>	<b>+95 %</b>
Média	-5,4876	2,327380	-2,35786	0,034713	-10,5156	-0,4596
(1) HCl (L)	68,7772	6,746028	10,19521	0,000000	54,2033	83,3511
HCl (Q)	-47,7931	8,292708	-5,76327	0,000066	-65,7085	-29,8778
(2)Tempo de hidrólise (L)	0,8136	0,121429	6,69996	0,000015	0,5512	1,0759
Tempo de hidrólise (Q)	-0,0102	0,001866	-5,45216	0,000111	-0,0142	-0,0061
1L e 2L	-0,3215	0,147798	-2,17504	0,048676	-0,6408	-0,0022

Tabela 16C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático para a resposta da concentração de carbono no hidrolisado do resíduo FT.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	378,7940	5	75,758	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	12,8660	16	0,804	94,20	2,85
Falta de ajuste	7,7548	3	2,584	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	5,1116	13	0,393	6,57	3,41
Total	391,6605	21			

Variação explicada: 96,71 %

Máxima de variação explicável: 98,69 %

Tabela 17C – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores concentração de HCl e tempo de hidrólise do resíduo FT para a resposta da bioconversão do carbono no hidrolisado em biomassa de *Agaricus subrufescens*.

Fator	Regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	67,202	19,36821	3,46969	0,004148	25,359	109,044
(1) HCl (L)	208,259	56,13975	3,70965	0,002621	86,976	329,541
HCl (Q)	-284,456	69,01106	-4,12189	0,001203	-433,545	-135,366
(2) Tempo de hidrólise (L)	-0,509	1,01052	-0,50322	0,623229	-2,692	1,675
Tempo de hidrólise (Q)	0,010	0,01553	0,67551	0,511192	-0,023	0,044
1L e 2L	-0,968	1,22996	-0,78667	0,445582	-3,625	1,690

Tabela 18C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático para a resposta da bioconversão do carbono no hidrolisado em biomassa de *Agaricus subrufescens*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	658,181	5	131,6070	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	483,039	16	30,1890	4,35	2,85
Falta de ajuste	129,043	3	9,9263	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	353,996	13	27,2304	0,36	3,41
Total	1141,075	21			

Variação explicada: 57,68 %

Máxima de variação explicável: 68,97 %

Tabela 19C – Coeficientes para o modelo quadrático do delineamento composto central rotacional dos fatores temperatura de incubação e pH inicial para a resposta da biomassa no hidrolisado do resíduo RC.

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(13)	P	-95 %	+95 %
Média	12,23167	0,200701	60,94473	0,000000	11,79808	12,66525
(1)temperatura (L)	5,29572	0,245807	21,54419	0,000000	4,76469	5,82676
temperatura (Q)	-0,29917	0,292569	-1,02255	0,325174	-0,93122	0,33289
(2)pH inicial (L)	-1,99020	0,245807	-8,09657	0,000002	-2,52123	-1,45916
pH inicial (Q)	-0,90167	0,292569	-3,08189	0,008746	-1,53372	-0,26961
1L e 2L	-0,31000	0,347624	-0,89177	0,388726	-1,06100	0,44100

Tabela 20C - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático da influência dos fatores temperatura de incubação e pH inicial para a resposta da biomassa no hidrolisado do resíduo RC.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	130,7626	5	26,1525	F <sub>5,16</sub>	
Resíduos	4,7629	16	0,2977	87,84	2,85
Falta de ajuste	1,6210	3	0,5403	F <sub>3,13</sub>	
Erro puro	3,1419	13	0,2417	2,23	3,41
Total	135,2764	21			

Varição explicada: 96,47 %

Máxima de variação explicável: 97,86 %



## APÊNDICE D – RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

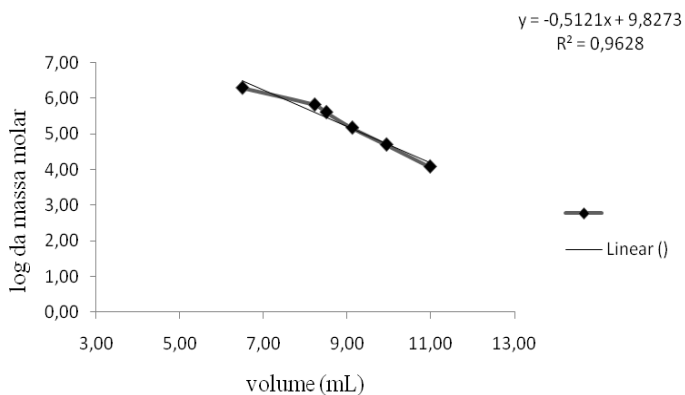


Figura 1D – Curva de calibração dos padrões dextranas de massa molar entre 12 e 2000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  calculada pelo log de sua massa em relação ao volume da fase móvel necessária para sua detecção na CLAE com IR, considerando o tempo de retenção e o fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .





**ANEXO  
PUBLICAÇÃO**

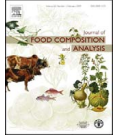




Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca



## Original Article

Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and  $\beta$ -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assayJose Pedro Friedmann Angeli<sup>a</sup>, Lucia Regina Ribeiro<sup>b</sup>, Carla M. Camelini<sup>c</sup>, Margarida M. de Mendonça<sup>c</sup>, Mario Sergio Mantovani<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Depto de Biologia, UNESP Rio Claro, SP, Brazil e Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 September 2008

Received in revised form 4 February 2009

Accepted 2 March 2009

## Keywords:

Agaricus blazei

Mushroom

 $\beta$ -glucan

Comet assay

Genotoxicity

Antigenotoxicity

HepG2 cell

Bleomycin

Doxorubicin

Food analysis

Food composition

## ABSTRACT

The mushroom *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) has been drawing attention because of its medicinal properties. Among its isolated compounds, special consideration is given to  $\beta$ -glucans, which are cell wall polysaccharides. The aim of the present work was to determine the genotoxic and/or antigenotoxic effects of the total polysaccharides of this mushroom and  $\beta$ -glucans, both extracted at different stages of fruiting body maturity (immature, mature stage with immature spores and mature stage with mature spores).  $\beta$ -glucan genotoxicity was examined using the comet assay in the HepG2 cell line. Additionally, the protective effect of total polysaccharides and  $\beta$ -glucans was tested against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bleomycin and doxorubicin. The results demonstrated that total polysaccharides and  $\beta$ -glucans had no genotoxic effects. On the contrary, they protected DNA against damage caused by the three inducers used. However, total polysaccharides had limited protective effects while being ineffective against doxorubicin. Interestingly, the largest protective effect was seen with extracts from the ripest stages and in the absence of isolated  $\beta$ -glucan.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Epidemiological studies have presented evidence that the occurrence of cancer in various organs such as stomach, colon, prostate and breast could be related to inappropriate diets (WCFR/IARC, 1997). The main factor involved in this process is related to the increase in mutation rate (Ferguson et al., 2005). Thus, a reduction in mutation rate in an organism could lead to a delay in the appearance of these neoplasms (Loeb et al., 2003). Introducing antimutagenic compounds into our diet would then be an attractive idea.

Among the products that arouse interest as a functional food is the mushroom *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) which is native to Brazil. The extract of this mushroom and isolated compounds have been widely studied due to their medicinal characteristics such as immune system stimulation, anticarcinogenic, antimuta-

genic and antioxidant properties (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990; Ohno et al., 2001; Dong et al., 2002).

Among the compounds isolated from the *A. blazei* are some polysaccharides with antitumor activity, including the  $\beta$ -glucans which have received much attention and which are credited with most of the mushroom's antitumor effects (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990; Ohno et al., 2001). Recently, we and others reported on the antimutagenic effect for  $\beta$ -glucan extracted from *A. blazei* (Angeli et al., 2006) and for  $\beta$ -glucans from different origins but having the same chemical structures (Chorvatovicová, 1993; Lazarova et al., 2004; Krizkova et al., 2006; Oliveira et al., 2007). A substantial part of this protective effect is due to an antioxidant property, where the compounds act mainly as reactive oxygen species (ROS) scavenger (Chorvatovicová, 1993; Lazarova et al., 2004). Thus, it is believed that this compound can be used as a chemopreventive agent, inhibiting the genotoxic actions of some harmful compounds.

It is important to emphasize that when extracting  $\beta$ -glucan from the fruiting body, the stage of maturity may influence the content and type of  $\beta$ -glucan found, which could result in great differences in biological responses (Camelini et al., 2005).

\* Corresponding author at: Universidade Estadual de Londrina – UEL, Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Genética Toxicológica, Brazil.  
Tel.: +55 43 33714417; fax: +55 43 33714527.

E-mail address: biomsm@uel.br (M.S. Mantovani).

Thus, the aim of the present work was to determine the genotoxic and/or antigenotoxic effects of total polysaccharides extracted at three different developmental stages of the mushroom (immature, SIa; mature with immature spores, SIla; and mature with mature spores, SIlla), with the total  $\beta$ -glucans extracted at these three different stages (SIb, SIlb and SIllb) being tested as well. The findings of the study would help establish the best way of supplementation and/or harvesting time for nutraceutical purposes. Genotoxicity assessment was carried out in the human hepatoma cell line (HepG2) which possesses a number of inducible phase I and phase II enzymes (Knasmüller et al., 1998) and has been used to investigate the chemoprotective effects of polysaccharides and  $\beta$ -glucan from *A. blazei* towards benzo(a)pyrene [B(a)P]-induced DNA damage in single cell gel electrophoresis (SCGE) assays—the Comet assay. Since these cells are of human origin, it is likely that they reflect the situation in humans better than other in vitro models (Knasmüller et al., 1998). Recently, Uhl et al. (1999, 2000) developed a protocol for the SCGE assay with HepG2 cells and found that this model can be used for the detection of genotoxic activities of different classes of genotoxic carcinogens.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Extraction and purification of the polysaccharide fraction

Extraction and purification were performed as stated in Camellini et al. (2005), also chemical analysis is presented in the mentioned work.

### 2.2. DNA damage inducer

In the induction of DNA damage, three compounds were used for induction of DNA damage:  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M, Nova Química), bleomycin (0.5  $\mu$ g/mL, Sigma–Aldrich), and doxorubicin (1  $\mu$ g/mL, Fluka); all compounds were diluted in Ca- and Mg-free PBS (phosphate-buffered saline).

### 2.3. HepG2 cell line and experimental protocols

The HepG2 cell line was kindly provided by Prof. Siegfried Knasmüller (Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna). The cells were kept under liquid nitrogen and cultivated with Minimal Essential Medium (MEM), supplemented with 15% fetal bovine serum, both from Gibco (Paisley, Scotland), and 1% penicillin/streptomycin stock in 75 cm<sup>2</sup> flasks (TPP). Under such conditions, the duration of the cell cycle was approximately 24 h.

In the genotoxicity protocol, the cells were exposed to three different concentrations (5, 15, and 45  $\mu$ g/mL, defined in previous experiments) of polysaccharide from the different stages of maturation for 24 h (concentrations determined in pilot experiments). As positive control, we used benzo(a)pyrene (10  $\mu$ g/mL), and for negative control we used 1% dimethyl sulfoxide (DMSO).

Concerning the treatments of antigenotoxicity, the cells were exposed simultaneously to polysaccharides and to one of the different DNA damage inducers for three hours, in the case of bleomycin and doxorubicin, and for 5 min in ice for  $H_2O_2$ .

### 2.4. Single cell gel electrophoresis (SCGE)

With regard to the comet assay, we used the protocol described by Uhl et al. (1999, 2000) based on the premises proposed by Tice et al. (2000). In the experiments, the survival of the cells was determined with trypan blue (Lindl and Bauer, 1994), where only cultures with viability >80% were analyzed for comet formation. Briefly, at the end of the treatments, the cells were trypsinized

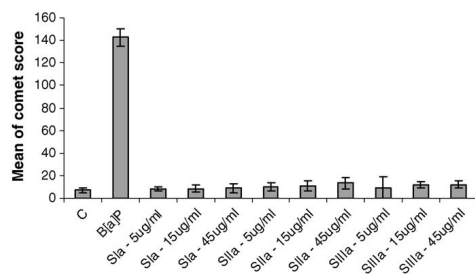
(0.1% for 5 min), transferred to slides previously gelatinized, and lysed. After electrophoresis (25 V, 300 mA), the cells were stained with ethidium bromide (10  $\mu$ g/mL, Sigma) and analyzed using a fluorescence microscopy (Nikon, model 027012).

Three independent repetitions were performed for each treatment. Regarding the comet assay, 100 cells were analyzed visually (Kobayashi et al., 1995), and classified according to the following criteria: (class 0) cells with undetectable damage—without tail; (class 1) cells with tails whose size was less than the diameter of the nucleus; (class 2) cells with tails whose size was from one to two times larger than the diameter of the nucleus; (class 3) cells with tails whose size was more than twice the diameter of nucleus. Afterward, the class value of each cell was summed to obtain the score (which ranged from 0 to 300); the mean and standard deviation was then calculated for each treatment. Apoptotic cells which had a totally fragmented nucleus were not considered in the analysis (Speit and Hartmann, 2005). The results obtained were evaluated using the Prism 4.0 statistical program for the Mann–Whitney test, which verified the difference among the treatments.

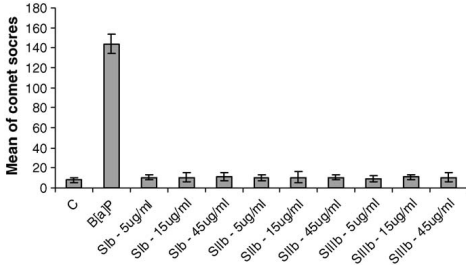
## 3. Results

The genotoxicity of total polysaccharides is depicted in Fig. 1. There was no alteration in cell viability (results not shown, considering optimal viability above 80%), nor was migration of DNA fragments as observed by the comet assay. The same can be observed in Fig. 2 which shows the results for only  $\beta$ -glucans. Similarly, there was no evidence of effects on cell viability (not shown) and DNA migration compared to control.

In testing for antigenotoxicity,  $\beta$ -glucan was combined with three DNA damage inducers. First, Fig. 3 presents the results of the combination with  $H_2O_2$ . In this case, the protective effect was noted at almost all concentrations of test substances, where smaller effects were observed with the total polysaccharides in the immature stage (SIa) and the greatest effects evidenced in the fraction containing only  $\beta$ -glucan in the mature stage (SIlb and SIllb). The same response pattern was seen in the treatment with bleomycin (Fig. 4), showing a protective effect with the majority of the concentrations tested, but a reduced protective effect with total polysaccharides from the early stage as well as a more pronounced effect with the fraction containing only  $\beta$ -glucan in the ripe stage. When comparing the results (Figs. 3 and 4), a greater protection was seen against hydrogen peroxide because data positive control damage are greater to hydrogen peroxide treatment.



**Fig. 1.** Effects of polysaccharides from *Agaricus blazei* on DNA migration in HepG2 cell line. Bars indicate the mean of scores  $\pm$  standard deviation of three independent repetitions (100 cells per slide were evaluated) (control DMSO, 1%; B[a]P, 5  $\mu$ g/mL; SIa, polysaccharides extracted in unripe phase; SIla, polysaccharides extracted in ripe but not sporulating phase; SIlla, polysaccharides extracted in ripe sporulating phase).

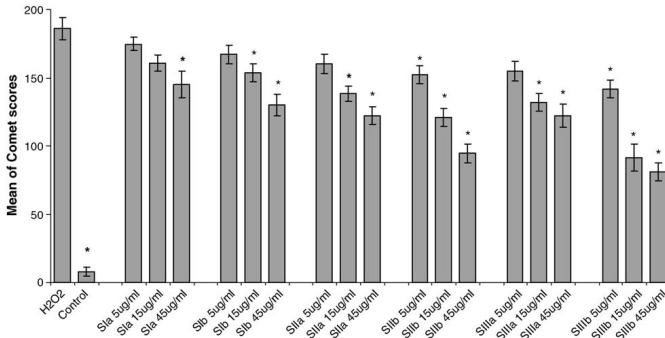


**Fig. 2.** Effects of  $\beta$ -glucans from *Agaricus blazei* on DNA migration in HepG2 cell line. Bars indicate mean of scores  $\pm$  standard deviation of three independent repetitions (100 cells per slide were evaluated) (control DMSO, 1%; B[a]P, 5  $\mu$ g/ml; Slb,  $\beta$ -glucans isolated in unripe phase; SIIIb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe but not sporulating phase; SIIlb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe sporulating phase).

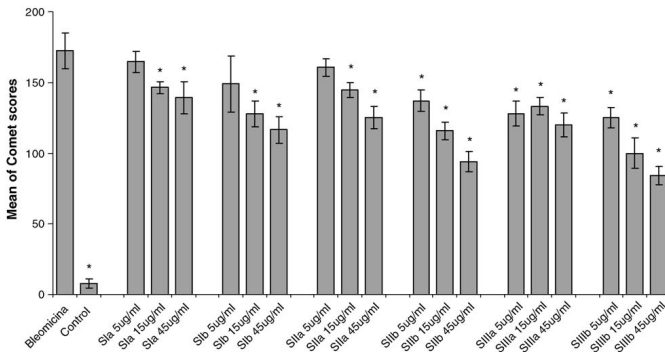
The results with doxorubicin differed from those with  $H_2O_2$  and bleomycin, where the combination of different fractions of mushrooms (Fig. 5) showed a protective effect only with the purified fractions (Slb, SIIIb and SIIlb) and only a slight effect for total polysaccharide at the highest concentration of the fractions from mature with mature spore stage (SIIIa).

**4. Discussion**

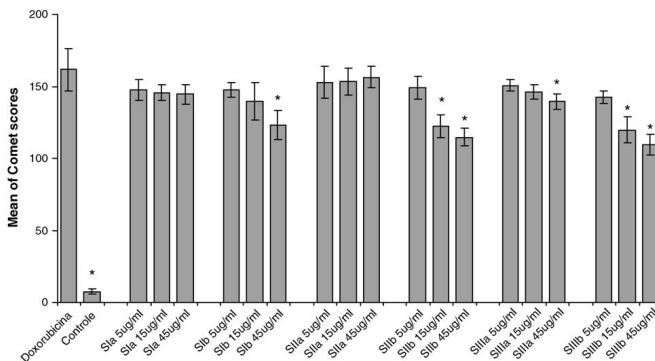
During the last few years, there has been a growing interest in the search for foods and food compounds with the capacity to prevent damage to genetic material, thereby acting as chemoprotective agents. The rationale for using chemoprotective compounds is based on their efficiency as well as on the understanding of their mechanism of action (Miadoková et al., 2005). Several mechanisms such as inhibition of genotoxic effects, free radical scavenging, inhibition of tumor growth, and modulation of signal transduction may be involved (Miadoková et al., 2005; De Flora et al., 1999). Thus, total polysaccharides and  $\beta$ -glucans isolated



**Fig. 3.** Effect of the *Agaricus blazei* fractions on DNA migration induced by  $H_2O_2$  in the HepG2 cell line. Bars indicate the mean of scores  $\pm$  standard deviation of three independent repetitions (100 cells per slide were evaluated) (control DMSO, 1%;  $H_2O_2$ , 100  $\mu$ M; Sla, polysaccharides extracted in unripe phase; SIIIa, polysaccharides extracted in ripe but not sporulating phase; SIIla, polysaccharides extracted in ripe sporulating phase; Slb,  $\beta$ -glucans isolated in unripe phase; SIIIb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe but not sporulating phase; SIIlb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe sporulating phase), (\*) indicates statistically different from  $H_2O_2$  ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Effect of the *Agaricus blazei* fractions on DNA migration induced by bleomycin in the HepG2 cell line. Bars indicate the mean of scores  $\pm$  standard deviation of three independent repetitions (100 cells per slide were evaluated) (control DMSO, 1%; bleomycin, 0.5  $\mu$ g/ml; Sla, polysaccharides extracted in unripe phase; SIIIa, polysaccharides extracted in ripe but not sporulating phase; SIIla, polysaccharides extracted in ripe sporulating phase; Slb,  $\beta$ -glucans isolated in unripe phase; SIIIb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe but not sporulating phase; SIIlb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe sporulating phase), (\*) indicates statistically different from bleomycin ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Effect of the *Agaricus blazei* fraction on DNA migration induced by doxorubicin in the HepG2 cell line. Bars indicate the mean of scores  $\pm$  standard deviation of three independent repetitions (100 cells per slide were evaluated) (control DMSO, 1%; doxorubicin, 1  $\mu$ g/ml; Sla, polysaccharides extracted in unripe phase; SIlb, polysaccharides extracted in ripe but not sporulating phase; SIlIb, polysaccharides extracted in ripe sporulating phase; SIlb,  $\beta$ -glucans isolated in unripe phase; SIlIb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe but not sporulating phase; SIlIb,  $\beta$ -glucans isolated in ripe sporulating phase, (\*) indicates statistically different from doxorubicin ( $p < 0.05$ ).

from the mushroom *A. blazei* were evaluated for their antigenotoxic potential against three genotoxins known to induce damage mainly through reactive oxygen species (ROS).

In the present study, there was no evidence of a genotoxic effect by total polysaccharides (which included polysaccharides with  $\alpha$  and  $\beta$  type linkages) from the mushroom cell wall and by  $\beta$ -glucans as well. Thus, it appears that they do not present a genotoxic risk if consumed by humans, which has been demonstrated by several works using extracts of the mushroom *A. blazei* and isolated  $\beta$ -glucans (Bellini et al., 2003, 2006; Luiz et al., 2003; Guterrez et al., 2004; Angeli et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Also in agreement to this, subchronic and chronic toxicity studies using *A. blazei* were performed in rats (Kuroiwa et al., 2005; Lee et al., 2008; Sumiya et al., 2008) using extracts and the lyophilized powder, in all experiments no carcinogenic effect was observed and only one study presented low toxicity, but this toxicity seems as stated by the author not related to genotoxicity.

In the antigenotoxicity experiments, total polysaccharides and  $\beta$ -glucan were combined with  $H_2O_2$ , bleomycin and doxorubicin, and the results showed a substantial reduction in damage caused by hydrogen peroxide and bleomycin. When comparing the results, a greater protection was seen against hydrogen peroxide, since bleomycin causes damage not only through the formation of free radicals, but also causes DNA strand breaks and inhibition of DNA synthesis (Minotti et al., 2004).

Regarding doxorubicin, total polysaccharides afforded poor protection, and only  $\beta$ -glucans showed a substantial protective effect. This can be explained by the drug's mechanism of action, where it is known that doxorubicin causes damage not only through the formation of free radicals, but also through its intercalation in DNA and inhibition of topoisomerase II (Minotti et al., 2004).

Thus, it is clear that total polysaccharides show smaller protective effects when compared to the purified  $\beta$ -glucans, which contain only polysaccharides with  $\beta$  linkages. This can be explained by the smaller amount of  $\beta$ -glucan in the total extracts, since it is known that  $\beta$ -glucan has an important antioxidant property (Krizkova et al., 2006; Slamenová et al., 2003; Angeli et al., 2006). Among the total polysaccharides, the protective effect seems to be determined by the time of extractions: the more mature the mushroom, the greater the protective effect due to the higher presence of  $\beta$  type (1  $\rightarrow$  3) and  $\alpha$  type (1  $\rightarrow$  4) linkages

in  $\beta$ -glucans purified in the ripe stage (Camelini et al., 2005). The same pattern is observed for purified  $\beta$ -glucans, where there is a greater amount of  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) linkages as the mushroom matures.

The mushroom is harvested during the immature stage for culinary purposes when its highest commercial value is achieved. However, the results indicate that it should be harvested during the more mature stages, since it is believed that during this time the mushroom can better express its bioactive properties, antioxidant and antitumor, considering that its linkages [ $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) and  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4)] are involved in its antitumor effect (Mizuno et al., 1990).

In general terms, we can suggest the use of  $\beta$ -glucan for chemopreventive purposes especially against ROS producing agents in vitro. Also chronic and subchronic assay are needed to determine the toxicity of polysaccharides and  $\beta$ -glucan prior to suggesting the incorporation of this compound in the human diet.

#### Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

#### References

- Angeli, J.P.F., Ribeiro, L.R., Gonzaga, M.L.C., Soares de, S.A., Ricardo, M.P.S.N., Tsuboy, M.S., Stidl, R., Knasmüller, S., Linhares, R.E., Mantovani, M.S., 2006. Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biology and Toxicology* 22, 285–291.
- Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Matuo, R., Terezan, A.P., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., 2006. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology In Vitro* 20, 355–360.
- Bellini, M.F., Giacomini, N.L., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., 2003. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology In Vitro* 17, 465–469.
- Camelini, C.M., Maraschin, M., de Mendonça, M.M., Zucco, C., Ferreira, A.G., Tavares, L.A., 2005. Structural characterization of  $\beta$ -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters* 27, 1295–1299.
- Chorvatovicová, D., 1993. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co60 in mice. *Strahlentherapie Onkologie* 167, 612–614.
- De Flora, S., Baccinello, C., Bagnasco, M., 1999. Rational and mechanism of cancer chemoprevention. *Recent Results Cancer Research* 151, 29–44.

- Dong, Q., Yao, J., Yang, X., Fang, J., 2002. Structural characterization of water-soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. Carbohydrate Research 337, 1417–1421.
- Ferguson, L.R., Bronzetti, C., De Flora, S., 2005. Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer. Mutation Research 591, 3–7.
- Gutierrez, Z.R., Mantovani, M.S., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Jordão, B.Q., 2004. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. Toxicology In Vitro 18, 301–309.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., 1989. Fraction and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydrate Research 186, 267–273.
- Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A.T., 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation Research 402, 185–202.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between the manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. MMS Communication 3, 103–115.
- Krizkova, L., Zitnanova, I., Mislovicova, D., Masarova, J., Sasinkova, V., Durackova, Z., Krajcovicova, J., 2006. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycconjugates: mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. Mutation Research 606, 72–79.
- Kuroiwa, Y., Nishikawa, A., Imazawa, T., Kanki, K., Kitamura, Y., Umemura, T., Hirose, M., 2005. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. Food and Chemical Toxicology 43, 1047–1053.
- Lazarova, M., Labaj, J., Kovacicova, Z., Slamenova, D., 2004. Diet containing fungal (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -glucan derivative exhibits protective effects against DNA lesions induced in freshly isolated rat cells. Neoplasma 51, 431–435.
- Lee, I.P., Kang, B.H., Roh, J.K., Kim, J.R., 2008. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murrill in a F344 rat two year bioassay. Food and Chemical Toxicology 46, 87–95.
- Lindl, T., Bauer, J., 1994. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena, New York.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R., Anderson, J.P., 2003. Multiple mutations and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 776–781.
- Luz, R.C., Jordão, B.Q., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., 2003. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murrill mushroom organic extracts in wild type CHO(k1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. Mutation Research 528, 75–79.
- Miadoková, E., Svidová, S., Vická, V., Prazmáříová, E., Tothová, K., Nad'ová, S., Kogan, G., Rauko, P., 2005. The role of natural biopolymers in genotoxicity of mutagens/carcinogens elimination. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 149, 493–496.
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., 1990. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agricultural and Biological Chemistry 54, 2889–2896.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L., 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacological Review 56, 185–229.
- Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N.N., Adachi, Y., Motoi, M., Yadao, T., 2001. Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. Biological Pharmaceutical Bulletin 24, 820–828.
- Oliveira, R.J., Matuo, R., Silva, A.F., Matiazzi, H.J., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., 2007. Protective effect of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (K1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. Toxicology In Vitro 21, 41–52.
- Slamenová, D., Lábaj, J., Krizková, L., Kogan, G., Sandula, J., Bregsen, N., Eckl, P., 2003. Protective effects of fungal  $\beta$ -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in F79 hamster lung cells. Cancer Letters 198, 153–160.
- Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. Methods in Molecular Biology 291, 85–95.
- Sumiya, T., Ikeda, Y., Broadmeadow, A., May, K., Pritchard, L., Horne, C., Burlinson, B., 2008. Himematsutake (Iwade Strain 101) extract (ABM-FD): genetic toxicology and a 3-month dietary toxicity study in rats. Food and Chemical Toxicology 46, 1949–1959.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis 35, 206–221.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmüller, S., 1999. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. Mutation Research 441, 215–224.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmüller, S., 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. Mutation Research 468, 213–225.