

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA MARIA COSTA DE OLIVEIRA SOUZA

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE *Lentinula*
edodes EM CULTIVO SUBMERSO

CURITIBA
2009

CAROLINA MARIA COSTA DE OLIVEIRA SOUZA

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE *Lentinula*
edodes EM CULTIVO SUBMERSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel D. Nosedá
Profa. Dra. Michele R. Spier

CURITIBA
2009



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


Aos quinze dias do mês de dezembro de 2009, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Trigésima Sétima Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

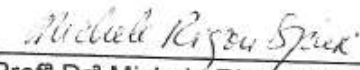
A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Marco Aurélio S Carvalho Filho (UP), Sônia Cachoeira Stertz (UFPR), Miguel Daniel Nosedá (UFPR), Michele Rigon Spier (UFPR) e Carlos Ricardo Soccol (UFPR – orientador da dissertação).

Às 14h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Carolina Maria Costa de Oliveira Souza** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: "**Produção de Matabólitos com Atividade Antimicrobiana e Antioxidante por *Lentinula edodes* em Cultivo Submerso**". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.


Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos professores Dr Marco Aurélio S Carvalho Filho, Dr^a Sônia Cachoeira Stertz, Dr Miguel Daniel Nosedá, Dr^a Michele Rigon Spier e Dr Carlos Ricardo Soccol declarou a candidata Aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

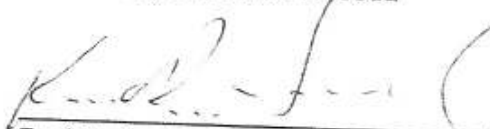
Curitiba, 15 de Dezembro de 2009.


Prof^a Dr^a Sônia Cachoeira Stertz


Prof^a Dr^a Michele Rigon Spier


Prof Dr Miguel Daniel Nosedá


Prof Dr Marco Aurélio S Carvalho filho


Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especialmente pais e irmão, que na convivência familiar me ensinaram valores significativos na caminhada da minha vida. Alguns quero citar: Professor Soccol, William, Andréa, Carolina, Caroline, Lucianna, Sascha, Michele, Gessiel, Gustavo e Luciano.

Com eles aprendi a amar, respeitar, compreender, lutar pelos sonhos, aprendi que somos especiais, cada um de nós com seus dons, precisando desenvolvê-los e aprimorá-los.

Agradeço a Deus, que me ensinou a ter fé, e com a fé perseverar e perseverando seguir a jornada sem jamais duvidar que chegaria ao fim desta etapa. Agradeço a Deus que nos momentos de cansaço e preocupações colocou para brilhar dias tenebrosos, colocou a natureza ao meu redor, mostrando a Sua grandiosidade, colocou o sorriso nos lábios dos amigos, a mão amiga, o abraço fraterno, a palavra de carinho, sempre incentivando a lutar pela vitória.

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas especiais na minha vida, que mesmo nos momentos de estresse não me recriminaram, mas acataram aquele momento, compreendendo e ofertando carinho, conseguindo dispersar a ansiedade, arrancando sorrisos.

Agradeço ao Professor Carlos Soccol, Professor Miguel Nosedá, Professora Michele Rigon, Professora Vanete Soccol, Professora Larissa Alvarenga, Professora Juliana Moura e aos doutorandos Silvana Alban e Luciano Campestrini pela ajuda neste trabalho e pela disponibilidade de material e utilização de seus laboratórios, sem os quais não seria possível esta pesquisa.

RESUMO

Os basidiomicetos têm se mostrado uma inesgotável de substâncias bioativas que podem ter ação antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e antimicrobiana, entre outros. *Lentinula edodes*, também chamado de shiitake é o segundo cogumelo comestível mais consumido no mundo, nativo do leste asiático, decompõe madeira degradando lignina e celulose para obtenção de energia. Além de sua destacada utilização na culinária, tem importância farmacêutica por produzir substâncias com propriedades medicinais para o tratamento e controle de pressão arterial, redução do nível de colesterol, fortalecimento do sistema imunológico, inibição do desenvolvimento de tumores, além de atividade antimicrobiana contra vírus, fungos e bactérias. Este trabalho teve por objetivo avaliar a existência do efeito antimicrobiano nos caldos provenientes da fermentação submersa das cepas de *L. edodes* LPB 1, LPB 2, LPB 4, LPB 5, LPB 6 e LPB 10 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Essa ação foi demonstrada por inibição do crescimento bacteriano em teste em microplacas através da redução da absorbância a 630nm ao longo de um período de 24h, permitindo avaliar a taxa da inibição do desenvolvimento microbiano perante os caldos fermentados, concentrados e neutralizados. O resultado observado indicou que o caldo de cultivo de *L. edodes* LPB 10 concentrado apresentou inibição de 97% contra *E. coli* e *P. aeruginosa* além de inibir em 96% o crescimento de *S. aureus*, já a maior atividade contra *L. monocytogenes* foi de *L. edodes* LPB 5 (98% de inibição), tendo este desempenho se repetido para as outras bactérias. Por esta razão teve seu caldo precipitado e ultrafiltrado, sendo a fração entre 10 - 30 KDa a de melhor efeito antimicrobiano. A ação antioxidante dos extratos etanólicos das biomassas liofilizadas das 6 cepas de *L. edodes* estudadas, foi testada contra os radicais livres superóxido, hidroxil e DPPH. Os melhores desempenhos em termos de inibição do radical superóxido foi de 48% pelo *L. edodes* LPB 4, 42% de inibição do radical DPPH pelo *L. edodes* LPB 2 e 154% de inibição do radical hidroxil pelo *L. edodes* LPB 10.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*, Antimicrobiano, Antioxidante, Fermentação submersa, Shiitake.

ABSTRACT

Basidiomycetes have been noticed as a good source of bioactive substances that may function as antitumoral, immunomodulatory, antioxidant, hypocholesteremic, hypoglycaemic and antimicrobial, and *Lentinula edodes* is part of this group. Also called shiitake, is the second most consumed edible mushroom in the world, native to eastern Asia and decomposes wood, degrading lignin and cellulose to obtain energy. In addition to its use in culinary, it possesses important medicinal substances, with medicinal properties for the treatment of blood pressure control, reduction in the level of cholesterol, strengthening the immune system, inhibiting the development of tumors in addition to antimicrobial activity against viruses, fungi and bacteria. This study aimed to evaluate the existence of antimicrobial effect on submerged fermentation broths from the strains of *L. edodes* LPB 1, LPB 2, LPB 4, LPB 5, LPB 6 and LPB 10 against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. This action was demonstrated by inhibition of bacterial growth in microplate test through the reduction of the absorbance in 630nm over a period of 24 hours, allowing to assess the inhibition rate of microbial development with the fermented broths, concentrated and neutralized. The results indicated that the concentrated cultivation broth of *L. edodes* LPB 10 showed inhibition of 97% against *E. coli* and *P. aeruginosa* in addition to inhibiting the growth of *S. aureus* in 96%, already the largest activity against *L. monocytogenes* was from *L. edodes* LPB 5 (98% inhibition) and this performance was repeated against the other bacteria, because of that, its broth was precipitated ultrafiltered. The 10 - 30 KDa fraction shown the best antimicrobial effect. The antioxidant effect from ethanolic extracts of freeze dried biomass was determined from 6 strains of *L. edodes*, specifically against superoxide, hydroxyl and DPPH free radicals, getting better performance the inhibition of 48% against superoxide radical by *L. edodes* LPB 4, 42% of inhibition against DPPH radical by *L. edodes* LPB 2 and 154% of inhibition against hydroxyl radical by *L. edodes* LPB 10.

Key words: *Lentinula edodes*, Antimicrobial, Antioxidants, Submerged fermentation, Shiitake.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	4
QUADRO 2	- CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO <i>L. edodes</i>	12
QUADRO 3	- HISTÓRICO DA NOMENCLATURA DO <i>L. edodes</i>	12
QUADRO 4	- COMPOSIÇÃO DO MEIO FAN	21
QUADRO 5	- COMPOSIÇÃO DO MEIO MELAÇO DE CANA SUPLEMENTADO (MCS)..	21
QUADRO 6	- ESQUEMA DE PREENCHIMENTO DOS POÇOS DAS MICROPLACAS ...	26
QUADRO 7	- AÇÚCARES DA AMOSTRA	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- DIAGRAMA DA FORMAÇÃO DA ANSA	8
FIGURA 2	- CICLO DE VIDA DE UM COGUMELO DO FILO BASIDIOMYCOTA	9
FIGURA 3	- <i>L. edodes</i> EM ESTUFA DE CULTIVO	11
FIGURA 4	- CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. edodes</i>	16
FIGURA 5	- FLUXOGRAMA GERAL DA PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARCTERIZAÇÃO DO EXTRATO CONTENDO ANTIMICROBIANO E TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
FIGURA 6	- INÓCULOS DAS BACTÉRIAS EM CALDO BHI	19
FIGURA 7	- CEPAS DE <i>L. edodes</i> DURANTE CRESCIMENTO EM PLACA DE PETRI.	20
FIGURA 8	- SHAKER E <i>ERLENMEYER</i> COM <i>L. edodes</i> APÓS 21 DIAS	22
FIGURA 9	- CUBA DE ELETROFORESE COM AMOSTRAS, DURANTE A CORRIDA .	25
FIGURA 10	- TESTE ANTIMICROBIANO	27
FIGURA 11a	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>S. aureus</i>	33
FIGURA 11b	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>S. aureus</i>	33
FIGURA 12a	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>L.monocytogenes</i>	33

FIGURA 12b	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>L. monocytogenes</i>	33
FIGURA 13a	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>E. coli</i>	33
FIGURA 13b	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>E. coli</i>	33
FIGURA 14a	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>P. aeruginosa</i>	33
FIGURA 14b	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> LPB 1 CONTRA <i>P. aeruginosa</i>	33
FIGURA 15	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>S. aureus</i>	34
FIGURA 16	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>S. aureus</i>	35
FIGURA 17	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>L. monocytogenes</i>	36
FIGURA 18	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>L. monocytogenes</i>	36
FIGURA 19	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>E. coli</i>	37
FIGURA 20	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>E. coli</i>	38
FIGURA 21	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>P. aeruginosa</i>	38
FIGURA 22	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>P. aeruginosa</i>	39
FIGURA 23	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DE <i>L. edodes</i> L 5 CONTRA <i>S. aureus</i>	41
FIGURA 24	- GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DE <i>L. edodes</i> L 5 CONTRA <i>E. coli</i>	41
FIGURA 25a	- ELETROFORESE DAS FRAÇÕES ULTRAFILTRADAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA (COM REDUÇÃO)	45
FIGURA 25b	- ELETROFORESE DA FRAÇÃO TOTAL (SEM REDUÇÃO)	45
FIGURA 26	- PICOS DO RMN DA AMOSTRA DO PRECIPITADO TOTAL	47

FIGURA 27	- PICOS DO RMN DA AMOSTRA DO PRECIPITADO ULTRAFILTRADO (10 - 30 KDa)	48
FIGURA 28	- INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 1	50
FIGURA 29	- INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 10	50
FIGURA 30	- INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 4	51
FIGURA 31	- INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 6	52
FIGURA 32	- INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 5	52
FIGURA 33	- INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 2	53
FIGURA 34	- INIBIÇÃO DO RADICAL OH^{\cdot} PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 1	54
FIGURA 35	- INIBIÇÃO DO RADICAL OH^{\cdot} PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 4	55
FIGURA 36	- INIBIÇÃO DO RADICAL OH^{\cdot} PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 10	55
FIGURA 37	- INIBIÇÃO DO RADICAL OH^{\cdot} PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 6	56
FIGURA 38	- INIBIÇÃO DO RADICAL OH^{\cdot} PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 5	57
FIGURA 39	- INIBIÇÃO DO RADICAL OH^{\cdot} PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 2	57
FIGURA 40	- TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 1	58
FIGURA 41	- TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 10	59
FIGURA 42	- TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 4	59
FIGURA 43	- TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 6	60
FIGURA 44	- TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 5	60
FIGURA 45	- TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE <i>L. edodes</i> L 2	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- MIC DOS CALDOS FERMENTADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>S. aureus</i> ...	43
TABELA 2	- MIC DOS CALDOS FERMENTADOS DE <i>L. edodes</i> CONTRA <i>E. coli</i>	43
TABELA 3	- QUANTIDADE DE PROTEÍNA DOS CALDOS FERMENTADOS DE <i>L. edodes</i>	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVO GERAL	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3 REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 ANTIMICROBIANOS	3
3.2 SISTEMA OXIDATIVO	5
3.3 BASIDIOMICETOS	7
3.4 <i>Lentinula edodes</i>	10
3.4.1 Classificação	12
3.4.2 Propriedades biológicas	13
3.4.3 Cultivo de <i>Lentinula edodes</i>	15
3.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 MICRORGANISMOS	19
4.1.1 Cultivo e manutenção das cepas bacterianas.....	19
4.1.2 Cultivo e manutenção das cepas de <i>Lentinla edodes</i>	20
4.2 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO DE <i>L. edodes</i>	20
4.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE <i>L. edodes</i>	21
4.4 PROCESSAMENTO DAS BIOMASSAS	22
4.5 PROCESSAMENTO DOS CALDOS FERMENTADOS	23
4.5.1 Concentração dos caldos fermentados de <i>L. edodes</i>	23
4.5.2 Preparo de amostras do caldo de <i>L. edodes</i> L 5 por precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ e ultrafiltração	23
4.5.3 Preparo de amostras do caldo de <i>L. edodes</i> L 5 por precipitação com etanol	24
4.6 ELETROFORESE	24

4.6.1 Preparo do gel de separação	24
4.6.2 Preparo do gel de empilhamento	25
4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
4.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	27
4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
4.9.1 Prospecção de agentes anti-radical superóxido	28
4.9.2 Prospecção de agentes anti-radical hidroxil	28
4.9.3 Teste de 2,2 – <i>diphenyl</i> – 1 <i>picrylhydrazyl</i> (DPPH)	29
4.10 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS CALDOS FERMENTADOS	30
4.10.1 Dosagem de proteínas	30
4.10.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
4.10.3 Composição Mossacarídica	31
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	32
5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	43
5.3 ELETROFORESE	44
5.4 ANÁLISES DOS CALDOS	45
5.4.1 Composição Monossacarídica	45
5.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	46
5.4.3 Quantificação de proteína por Lowry	48
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
5.2.1 Prospecção de agentes anti-radical superóxido	49
5.2.2 Prospecção de agentes anti-radical hidroxil	54
5.2.3 Teste de 2,2 – <i>diphenyl</i> – 1 <i>picrylhydrazyl</i> (DPPH)	57
6 CONCLUSÕES	62
7 PERSPECTIVAS	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Muitos basidiomicetos têm efeitos terapêuticos comprovados, sendo antitumorais, imunomoduladores, podendo interferir na bronquite crônica (Wasser; Weis, 1999). Além disso, mostram excelente ação antioxidante (Mau, Lin, Song, 2002).

Lentinula edodes, também conhecido como shiitake, é um dos cogumelos comestíveis mais populares no mundo, sendo um dos que apresenta maior cultivo entre cogumelos, tendo atingido uma produção de 7,5 milhões de toneladas em 2000 (Kitzberger *et al.*, 2007).

Normalmente utilizam-se árvores para o cultivo deste cogumelo, sendo que a castanheira, o carvalho e o olmo são as mais comuns. No entanto, estas árvores não são nativas do Brasil, por isso os produtores costumam fazer um cultivo paralelo dessas árvores para a produção do substrato (Barbosa *et al.*, 1999). Há também a utilização de substrato sólido como farelos, serragem e bagaços.

O *L. edodes* apresenta algumas propriedades funcionais, como antihipercolesterêmica, antimicrobiana e antioxidante, que têm sido intensamente investigadas (Hatvani, 2001; Manzi & Pizzoferatto, 2000; Mau *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2003). Apresenta esses compostos bioativos no corpo de frutificação e no micélio. De seu basidiocarpo têm sido isoladas proteínas com potente atividade antifúngica (Ngai & Ng, 2003). Há também relatos sobre sua atuação no controle de doenças em animais pelo aumento de sua atividade imunológica (Chang, 1996). Os estudos indicam o potencial deste cogumelo para o controle de doenças de plantas causadas por bactérias e fungos, ou ativando resistência em plantas (Di Pietro *et al.*, 2006).

O advento dos antimicrobianos permitiu o controle e cura de inúmeras doenças infecciosas. Porém, dez anos após a descoberta da penicilina foi caracterizada a resistência de algumas espécies de bactérias. Desta forma o surgimento de resistência adquirida aos antimicrobianos passou a ser um problema cada vez mais preocupante. O uso excessivo, de forma indiscriminada de antimicrobiano em seres humanos e em animais é o principal fator para emergência de resistência (Low & Scheld, 1998). Este estudo busca a obtenção de novas substâncias efetivas contra patógenos bacterianos, utilizando fonte natural que

apresenta também atividade antioxidante, pois é conhecido que os radicais livres são nocivos ao organismo, podendo provocar alterações no DNA, nas proteínas e nos ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas células, além de estarem relacionados com o desenvolvimento de determinadas doenças, como o câncer, doenças cardiovasculares, cataratas e doença de Alzheimer. Outra vantagem deste cogumelo é a produção de polissacarídeos β -D-glucanas que possuem ação antitumoral. Essas qualidades permitem vislumbrar a comercialização não só de substâncias isoladas, mas também preparações nutracêuticas que são extratos parcialmente purificados com aplicação terapêutica, que em geral apresentam baixa toxicidade, mesmo em doses mais elevadas (Smânia, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi realizar o cultivo submerso de *L. edodes* para análise do caldo e da biomassa quanto a atividade antimicrobiana e antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das biomassas de diferentes cepas de *L. edodes*.

- Pesquisar a atividade antimicrobiana dos caldos das fermentações da cepa mais efetiva de *L. edodes* frente bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas.

- Realizar a purificação e caracterização parcial da(s) substância(s) responsável pela atividade antimicrobiana.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos ou antibióticos são substâncias produzidas por microorganismos, que matam outros microorganismos ou inibem seu crescimento. Juntamente com os quimioterápicos, compostos químicos sintéticos, são empregados no tratamento ou prevenção de doenças causadas por agentes infecciosos formando a classe dos antimicrobianos (Moreira, 2004).

A história dos agentes antimicrobianos é dividida em três grandes eras. A primeira, conhecida também como a era dos alcalóides, data de 1630 constando de registros da utilização do extrato de casca de cinchona para tratamento da malária e de raiz de ipecacuanha para tratamento da desintéria amebiana (Pelczar *et al.*, 1997), sendo esses extratos e seus derivados (alcalóides, quinina e emetina) um único grupo conhecido como recurso terapêutico.

A segunda era, conhecida como a dos compostos sintéticos, foi marcada pela descoberta do médico alemão Paul Ehrlich em 1908 que conduziu a primeira pesquisa sistemática para compostos (neste caso, compostos de arsênio), encontrando um que tinha efeito antimicrobiano sem ser tóxico para humanos, o composto 606 de Ehrlich, também chamado salvarsan, ativo contra o treponema causador da sífilis. Esse composto foi usado como tratamento de escolha da sífilis até 1940 quando foi substituído pela penicilina (Jorgensen *et al.*, 1999) que havia sido descoberta pelo microbiologista britânico Alexander Fleming em 1929 devido à contaminação de uma placa inoculada com *Staphylococcus aureus* por um fungo (do gênero *Penicillium*) formando uma zona clara ao redor de sua colônia, mostrando o poder inibitório da substância produzida pelo mesmo.

Em 1936 o químico francês Jacques Tréfouël e sua equipe descobriram um composto incolor chamado sulfanilamida, substância com atividade tanto contra microrganismos cultivados em meios laboratoriais quanto presentes em tecidos animais vivos (Pelczar *et al.*, 1997). Quando o efeito curativo das sulfonamidas (derivados das sulfanilamidas) foi demonstrado em ratos, estudos em pacientes com erisipela e outras infecções foram iniciados. Tendo neste mesmo ano o início da

terceira era, conhecida como a era moderna dos antibióticos, marcada pelo controle das infecções por estreptococos e pneumococos com o uso que já vinha sendo feito das sulfonamidas. Em 1941 a penicilina tornou-se disponível em quantidades suficientes para uso clínico (Godman & Gilman, 2003). A terceira era é a que perdura até hoje.

Desde seu início até os dias atuais surgiram inúmeros agentes antimicrobianos e o conhecimento dos mecanismos moleculares de replicação das bactérias, fungos e vírus facilitou o desenvolvimento racional de compostos capazes de interferir nos ciclos vitais dos mesmos (Godman & Gilman, 2003).

Esses compostos tem sua classificação baseada na estrutura química e no mecanismo de ação, podendo ser observada no QUADRO 1 abaixo.

CLASSES DOS ANTIMICROBIANOS		EXEMPLOS DE ANTIMICROBIANOS
Agentes que inibem síntese da parede celular bacteriana		Penicilinas, cefalosporinas, ciclocerinas, vancomicinas, bacitracina e antifúngicos azóis (clorimazol, fluconazol e itraconazol)
Agentes que atuam diretamente sobre a membrana celular do microrganismo, afetando a sua permeabilidade e resultando em extravasamento de compostos intracelulares		Detergentes como polimixina e antifúngicos poliênicos, nistatina e anfotericina B (que se ligam aos esteróis da parede celular)
Agentes que afetam a função das subunidades ribossômicas 30S ou 50S, causando inibição reversível da síntese protéica		Cloranfenicol, tetraciclina, pristinamicinas eritrominas, clindamicina (todos bacteriostáticos)
Agentes que se ligam às subunidades ribossômicas 30S e alteram a síntese protéica, resultando em morte celular		Aminoglicosídeos
Agentes que afetam o metabolismo bacteriano dos ácido nucléicos		Rifamicinas (rifampicina) que inibem a RNA-polimerase Quinolonas que inibem as topoisomerasas
Antimetabólitos		Trimetoprim e sulfanamidas (bloqueiam enzimas essenciais no metabolismo do folato)
Agentes Antivirais	Análogos do ácido nucléico	Aciclovir ou ganciclovir (inibem seletivamente a DNA-polimerase viral) Zidovudina ou lamivudina (inibem a transcriptase reversa)
	Inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa	Nevirapina ou efavirenz
	Inibidores de outras enzimas virais essenciais	Inibidores da protease do HIV ou da neuraminidase do vírus influenza

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

FONTE: GOODMAN & GILMAN (2003)

No final da década de 1940 apareceram as resistências de estreptococos hemolíticos, gonococos e pneumococos à sulfonamida, além dos meningococos que também se tornaram resistentes a esta substância (Berghe & Vlietinck, 1991).

Para que um antimicrobiano seja eficaz ele deve atingir o alvo, ligar-se a ele e interferir na sua função. A resistência bacteriana a um antimicrobiano pode ser dividida em três categorias gerais: o fármaco não atinge seu alvo, o fármaco não é ativo, ou o alvo é alterado (Nikaido, 1994; Spratt, 1994).

A resistência de algumas espécies e logo o surgimento de resistência adquirida aos antimicrobianos passou a ser um problema cada vez mais preocupante. O uso excessivo, de forma indiscriminada tanto em seres humanos como em animais é o principal fator para emergência de resistência (Low & Scheld, 1998).

3.2 SISTEMA OXIDATIVO

A oxidação é essencial para a produção de energia, que serve como combustível para diversos processos biológicos em organismos vivos. Entretanto a produção contínua de oxigênio derivado de radicais livres está envolvida no início de várias doenças como o câncer, artrite reumatóide e aterosclerose, assim como processos degenerativos associados com envelhecimento (Mau *et al.*, 2002). Embora quase todos os organismos possuam uma defesa antioxidante e um sistema de reparo que os protege contra danos provocados pela oxidação, esses sistemas são insuficientes para a sua prevenção total (Simic, 1988; Turkoglu *et al.*, 2006).

Quando o mecanismo de proteção antioxidante se torna desbalanceado por fatores como a deterioração de funções fisiológicas, pode ocorrer o desencadeamento de doenças e a aceleração do envelhecimento (Mau *et al.*, 2005). Em média 95% do O₂ mitocondrial prossegue a via da cadeia respiratória. Uma pequena porcentagem, entre 2% a 5% escapa esta via de oxidação completa e segue os passos da redução, com formação de produtos de redução parcial (ou oxidação incompleta) denominados radicais livres (Youngson, 1995).

Além disso, em situações fisiopatológicas, como hipoxia, as enzimas antioxidantes estão inibidas e nestas condições a xantino-dehidrogenase, habitualmente redutora de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), para a produção de ácido úrico, vira a forma xantino-oxidase com capacidade de formar

ânion superóxido (um radical livre). Outro fator que contribui para a formação de radicais livres se deve às fontes externas, como as radiações ionizantes (Packer, 1999).

De acordo com Rosa (1998), os radicais livres são moléculas muito instáveis que possuem elétrons desemparelhados, os quais conferem uma grande reatividade e alta toxicidade para muitas biomoléculas. Os radicais livres, ânions superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são responsáveis pela geração de um terceiro radical livre, a hidroxila (OH^*) que é o mais instável e tóxico.

Quase todos os organismos vivos têm sistemas de proteção contra a ação tóxica dos radicais livres, utilizando enzimas como a superoxidase, desmutase e catalase ou componentes como ácido ascórbico, tocoferol e glutathione (Niki *et al.*, 1994).

Estes sistemas estão representados principalmente pela ação das enzimas superoxidodesmutase (SOD), catalase-peroxidase e glutathione peroxidase.

A superoxidodesmutase é uma enzima plasmática e mitocondrial que acelera consideravelmente a passagem do ânion $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , sendo que a SOD requer cobre, zinco e magnésio em seu sítio ativo (Rosa, 1998).

A enzima catalase-peroxidase tem ação similar a superoxidodesmutase e catalisa a transformação de H_2O_2 em H_2O e O_2 (molecular). Seu sítio de ação está limitado aos peroxissomas (Rosa, 1998).

A glutathione peroxidase é outra enzima com ação parecida com a da catalase-peroxidase, mas impede a propagação dos radicais livres ao reduzir os peróxidos instáveis, que se formam quando os radicais livres atacam os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados são muito suscetíveis à peroxidação, especialmente em suas duplas ligações (Rosa, 1998).

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, outros compostos vegetais e ainda enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. O termo antioxidante significa que impede a oxidação prejudicial de outras substâncias químicas, que ocorrem nas reações metabólicas corpóreas ou por fatores exógenos como as radiações ionizantes (Packer, 1999).

Existe uma segunda linha de defesa que auxilia os sistemas enzimáticos antioxidantes. Estes sistemas se denominam captadores de radicais livres e são capazes de frear as reações de oxidação. Nesta segunda linha de defesa encontram-se o ácido ascórbico (vitamina C) a nível citoplasmático, β -caroteno (vitamina A) e α -tocoferol na membrana celular.

Quando os sistemas antioxidantes fisiológicos estão com sua capacidade excedida pelo envelhecimento ou por uma produção excessiva de radicais livres (por motivos patológicos, radiações entre outros) pode afetar a síntese protéica dos ácidos nucléicos, de membranas celulares, com transtornos da permeabilidade, canais iônicos, provocando profundas alterações metabólicas. Estes produtos vitamínicos captadores de radicais livres têm chamado a atenção de pesquisadores nas últimas décadas, considerando a hipótese de sua administração por via oral durante períodos prolongados para aumentar a eficiência dos sistemas antioxidantes orgânicos (Youngson, 1995).

A capacidade antioxidante seria demonstrada por uma diferença em quanto a evolução de altas concentrações plasmáticas de antioxidantes hidrossolúveis, como a vitamina C, contribuem para a prevenção da oxidação da LDL (lipídeo de baixa densidade) e os mesmos antioxidantes contidos dentro da LDL, como os tocoferóis, β -caroteno e licopenos influenciam na susceptibilidade da lipoproteína a oxidação (Marzzoco & Torres, 1999).

3.3 BASIDIOMICETOS

O reino Fungi compreende seres essencialmente terrestres, heterotróficos (agindo como sapróbios, parasitas ou simbiontes mutualistas para sua sobrevivência), unicelulares e pluricelulares (muitos deles filamentosos), todos possuem parede celular e produzem esporos. Não são móveis, não produzindo células ciliadas ou com flagelos em nenhuma etapa de seu ciclo de vida. Estão agrupados de acordo com seu ciclo reprodutivo por divisão Zygomycota, divisão Ascomycota e divisão Basidiomycota, na qual estão inseridos os basidiomicetos (Raven *et al.*, 1996).

Os filamentos fúngicos são também conhecidos por hifas e uma massa de hifas é chamada micélio. Em geral, os basidiomicetos possuem micélio bem desenvolvido, formado por hifas septadas, cujas paredes contêm quitina. Os septos são perfurados pelos chamados dolíporos, em locais onde a parede celular é espessada em forma de barril, no centro do qual existe uma perfuração coberta por uma capa membranosa, o parentosoma (Bononi & Rodrigues, 1983).

A plasmogamia efetua-se muito cedo no desenvolvimento do micélio, seja através da fusão de duas hifas haplóides geneticamente diversas, seja pela fusão de uma hifa haplóide com um esporo. A hifa resultante é dicariótica e mantém-se dessa forma por muito tempo. Cresce por um processo denominado de divisão celular conjugada, no qual há a formação de *clamp-connections*, também chamadas de fíbulas ou ansas. Estas são espécies de ganchos que auxiliam na distribuição, nas duas células filhas, dos quatro núcleos produzidos por divisão mitótica dos dois núcleos da dicarionfase, como mostra a FIGURA 1. Muitas vezes, persiste uma dilatação na altura dos septos que dividem as células filhas, motivo pelo qual o micélio, que então recebe o nome de micélio fibulado, torna-se facilmente reconhecível como micélio típico de basidiomicetos (Raven *et al.*, 1996).

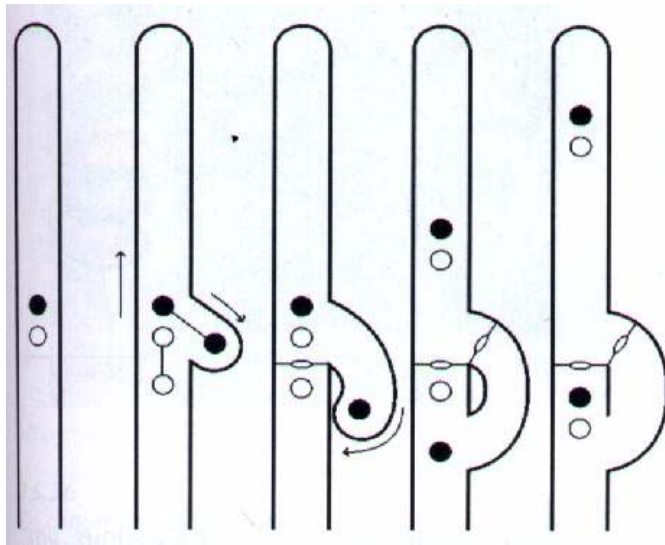


FIGURA 1 - DIAGRAMA DA FORMAÇÃO DA ANSA

FONTE: RAVEN *et al.*, 1996

Em determinadas condições, ainda não bem conhecidas, o micélio dicariótico passa a produzir basídios, nos quais ocorre a cariogamia. Segue-se a

meiose, com produção de quatro núcleos, que migram para protuberâncias desenvolvidas no ápice do basídio. Tais protuberâncias são sustentadas por pequenos pedículos, os esterigmas. Após a formação dos quatro esporos, estes são eliminados (Trabulsi, 2004).

Em muitas espécies, os basídios reúnem-se em corpos de frutificação com forma característica, o basidiocarpo (conhecido popularmente como cogumelo), onde os basídios constituem, juntamente com células estéreis, o himênio. Outras espécies não produzem basidiocarpos. Em muitas delas, o basídio sempre se desenvolve a partir de um esporo que germina. A reprodução do micélio vegetativo, por esporos dos mais variados tipos, pode realizar-se tanto no estágio monocariótico como no estágio dicariótico (Trabulsi, 2004). O ciclo de vida dos basidiomicetos pode ser visto na FIGURA 2, mostrando todas as fases.

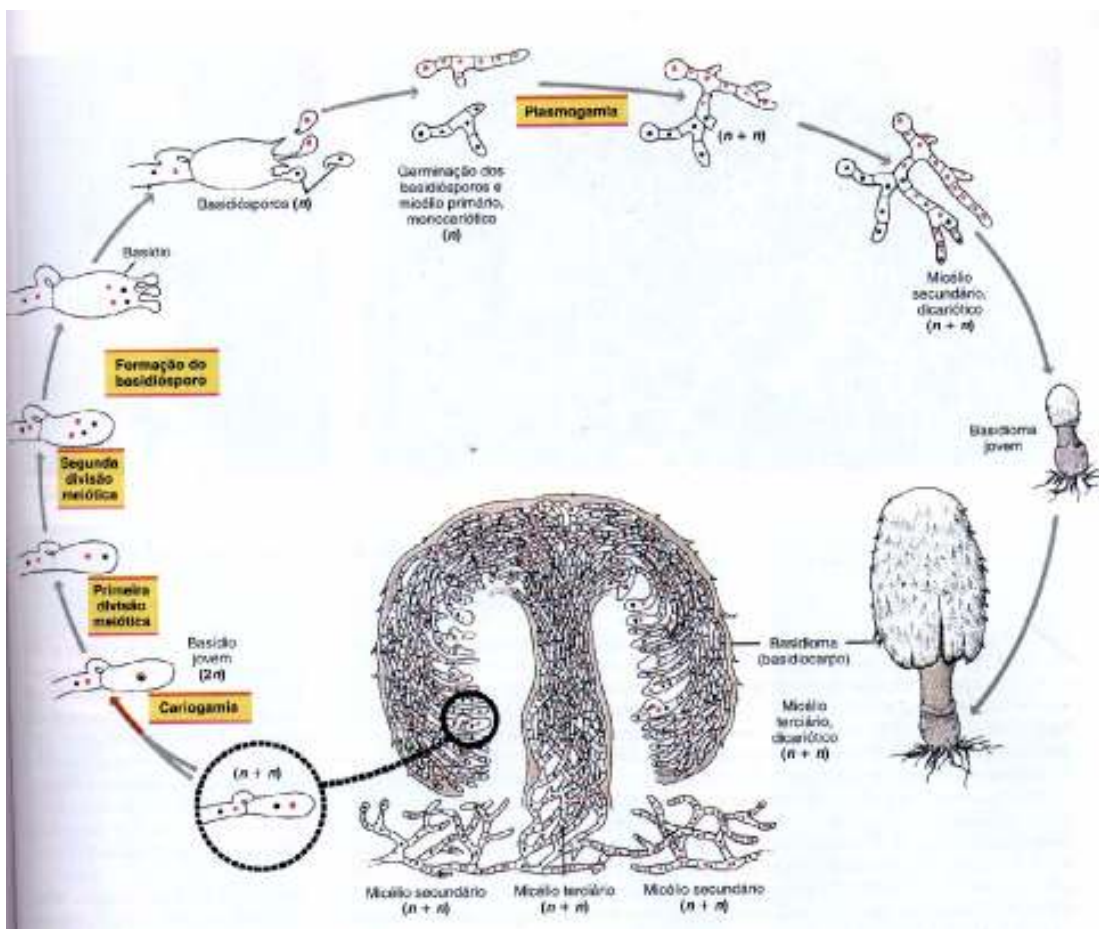


FIGURA 2 – CICLO DE VIDA DE UM COGUMELO DO FILO BASIDIOMYCOTA

FONTE: RAVEN *et al.*, 1996

Os Basidiomicetos são divididos em três subclasses: Teliomycetidae, Phragmobasidiomycetidae e Holobasidiomycetidae, de acordo com o tipo de basídio que produzem (Maziero, 1990).

Os Teliomycetidae são caracterizados pela produção de esporos com parede espessada, os teliósporos, nos quais ocorre a cariogamia. As duas ordens que constituem essa subclasse são de enorme importância econômica, pois reúnem alguns dos principais patógenos das culturas agrícolas. São as temidas ferrugens - dentre as quais merecem menção os gêneros *Puccinia*, *Gymnosporangium* e *Cronartium* e outros parasitas, entre eles o *Ustilago maydis*, que ataca o milho e forma galhas características negro-pulverulentas, razão pela qual recebe popularmente o nome de carvão de milho (Maziero, 1990).

Os Phragmobasidiomycetidae possuem basídios septados tanto longitudinalmente como em transversalmente, a exemplo *Exinia* sp. e *Auricularia* sp, respectivamente. Os basidiocarpos dos Phragmobasidiomycetidae são bem desenvolvidos, especialmente depois de períodos prolongados de chuva, quando absorvem água e se expandem (Maziero, 1990).

Ainda segundo Maziero (1990) os Holobasidiomycetidae possuem basídios inteiros, isto é, não-septados, freqüentemente reunidos em basidiocarpos bem desenvolvidos. Quase todos os fungos comestíveis conhecidos, inúmeros fungos venenosos e muitos fungos de micorriza pertencem a essa subclasse. Entre os venenosos as espécies de *Amanita* ou *Inocybe patoullardi*. *Psilocybe mexicana* produz os alucinógenos psilocibina e psilocina, usados em rituais religiosos indígenas. No grupo dos comestíveis estão os tão apreciados champignons (*Agaricus* sp.) e o shiitake (*Lentinula edodes*) amplamente utilizado na culinária oriental.

3.3.1 *Lentinula edodes*

Lentinula edodes é um cogumelo (FIGURA 3), pertencente à divisão Basidiomycota, sendo o segundo cogumelo comestível mais popular do mundo por seu sabor, paladar e qualidade (Jong & Birmingham, 1993). Além disso, é um dos

mais conhecidos e mais bem caracterizados cogumelos usados com propósitos medicinais (Royse, 1996; Ooi, 2000). Apresentando em sua composição 85-95% de água, 10-17% de proteínas (matéria seca), 25-40% de aminoácidos totais, mas com quantidades restritas de metionina, cistina, valina e isoleucinas (Crisan & Sands, 1978), 83% de carboidratos (matéria seca) dos quais 13% são fibras (Breene, 1990).



FIGURA 3 – *L. edodes* em estufa de cultivo

FONTE: O autor (2007)

Seu habitat natural compreende a zona temperada do nordeste asiático, onde ocorrem em troncos de madeira de árvores decíduas (Hocking, 1997), pois é lignolítico, tendo a habilidade de degradar e utilizar esta madeira dura como fonte de nutrientes sendo por isso conhecido como fungo da podridão branca (Hatvani, 2001).

Este basidiomiceto é sensível à temperatura, sendo a faixa de temperatura considerada ótima para seu crescimento micelial de aproximadamente 25°C, podendo haver variação conforme a cepa. Em temperaturas abaixo de 5°C e acima de 35°C o crescimento micelial é interrompido (Faria *et al.*, 2004). Segundo Campbell e Racjan (1999) o *L. edodes* pode sobreviver em temperaturas inferiores a -30°C, entretanto o micélio morre em temperaturas superiores a 45°C.

Na China e no Japão, cogumelos fazem parte do cardápio usual da população. No mercado mundial o *L. edodes* detém o segundo lugar, atrás somente do champignon-de-paris (*Agaricus bisporus*). No Brasil, devido à existência de uma grande colônia asiática, há mercado consumidor em potencial, tendo, porém, somente alguns pequenos produtores (Anke, 1997).

3.3.2 Classificação do *L. edodes*

O *Lentinula edodes* é também chamado cogumelo negro da floresta (nome comum), cogumelo perfumado na China (shiang-gu), Coréia (pyogo) e Tailândia (hed hom) ou shiitake (nome japonês) sendo este último o nome mais divulgado no Brasil (Chang & Miles, 2000).

Esta espécie foi primeiramente chamada de *Agaricus edodes* pelo botânico inglês Miles Joseph Berkeley em 1878, sendo mais tarde rebatizada por Sing como *Lentinus edodes*, permanecendo por muitos anos *Lentinus edodes* (Berkeley) Singer. Pela atual nomenclatura, referente ao QUADRO 2, a espécie é chamada *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, sendo este último o responsável pela classificação do shiitake no gênero *Lentinula*. O QUADRO 3 mostra a nomenclatura atribuída ao *L. edodes* ao longo dos anos.

REINO	FUNGI
FILO / DIVISÃO	Basidiomycota
CLASSE	Agaricomycetidae
ORDEM	Agaricales
FAMÍLIA	Marasmiaceae
GÊNERO	<i>Lentinula</i>
ESPÉCIE	<i>Lentinula edodes</i>

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *L. edodes*

FONTE: KIRK *et al.* (2001)

NOME	ANO
<i>Agaricus edodes</i>	1877
<i>Collybia shiitake</i>	1886
<i>Armillaria edodes</i>	1887
<i>Agaricus russaticeps</i>	1888
<i>Lepiota shiitake</i>	1889
<i>Lentinus tonkinensis</i>	1890
<i>Mastaleuomyces edodes</i>	1891
<i>Cortinellus shiitake</i>	1899
<i>Tricholoma shiitake</i>	1918
<i>Cortinellus berkeleyanus</i>	1925
<i>Lentinus shiitake</i>	1936
<i>Cortinellus edodes</i>	1938
<i>Lentinus edodes</i>	1941
<i>Lentinula edodes</i>	1975

QUADRO 3 – HISTÓRICO DA NOMENCLATURA DO *L. edodes*

FONTE: PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990)

3.3.3 Propriedades biológicas do *L. edodes*

Os basidiomicetos têm se mostrado uma grande fonte de substâncias bioativas que vão desde substâncias com ação antitumoral, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, imunomoduladora, antimutagênica, antimicrobiana a substâncias com atividade antioxidante (Cui *et al.*, 2006; Methacanon *et al.*, 2005; Lee, *et al.*, 2004, Shon & Nam, 2001).

O *L. edodes* apresenta algumas propriedades funcionais, como antihipercolesterêmicos, antimicrobianos e antioxidante que têm sido intensamente investigadas (Hatvani, 2001; Manzi & Pizzoferatto, 2000; Mau *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2003). Ainda foi confirmado que o shiitake pode aumentar a atividade imunológica de animais submetidos à terapia com o mesmo (Chang, 1996).

Lima *et al.* (2001) observou efeitos antimutagênicos de extratos de *L. edodes* em células da medula óssea de camundongos tratados com agentes alquilantes, ciclofosfamida e etilnitrosourea. Assim como Miyaji *et al.* (2006) demonstrou esse potencial antimutagênico *in vitro*, agindo como agente protetor da célula HEp-2 da ação do metil metanosulfonado, indicando que esta ação se deve a mecanismos diferentes, pela indução de enzimas que agem no processo mutagênico, pela reparação do DNA (ácido desoxirribonucléico) danificado e pela captura ou simples inativação do agente alquilante (Kada *et al.*, 1982; Kuroda *et al.*, 1992).

Este basidiomiceto tem sido pesquisado pelos benefícios medicinais que proporciona, mais notadamente a propriedade antitumoral, por produzir um polissacarídeo chamando lentinana, uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3) ramificada em C-6 por unidades de glucopiranosose β (1 \rightarrow 6), são duas ligações glucopiranosídicas (1 \rightarrow 6) para cada cinco ligações de glucopiranosídicas β (1 \rightarrow 3) responsável por este efeito (Chihara, 1970; Maeda *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1999).

Um estudo realizado pelo Hospital General de São Francisco na Califórnia, em pacientes HIV positivos, mostrou que estes quando tratados com lentinana obtiveram um aumento nas células CD 4 além de alguns apresentarem atividade de neutrófilos (Gordon *et al.*, 1998). A lentinana inibiu o crescimento de tumor primário e metastásico num tratamento realizado pelo Centro de Pesquisas do Instituto do

Câncer Miyagi utilizando injeções intratumorais (Ebina, 2005). Em comparação com outros agentes quimioterápicos, a lentinana apresenta poucas reações adversas e baixa toxicidade para as células normais do paciente (Wasser & Weis, 1999).

A glicoproteína KS-2 (identificada como proteoglicana) obtida pela extração do micélio cultivado de shiitake tem ação contra o carcinoma de Ehrlich's e contra o Sarcoma 180, tanto na administração por via intraperitoneal como pela via oral (Shida *et al.*, 1975; Mizuno, 1999).

Já foi relatado que frações de shiitake extraídas com água quente e etanol diminuem os níveis de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, inibindo parcialmente o acúmulo de fibrilas colágenas e suprimem a super expressão de genes para α -actina em músculo liso. Inibem as mudanças morfológicas e proliferação de células hepáticas envolvidas no processo de fibrose de uma forma dose-dependente e sem citotoxicidade (Akamatsu, 2004).

A diminuição dos níveis de colesterol, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) foi verificada em ratos espontaneamente hipertensivos, que tinham dieta suplementada com shiitake seco, pela primeira vez por Kaneda e Tokuda em 1966 (Kabir *et al.*, 1987; Jong & Birmingham, 1993).

Os extratos de shiitake são também pesquisados por trazerem outros benefícios ao sistema imunológico, tendo propriedades antivirais e por sua utilização em tratamentos de inflamações crônicas, como atrite (Takehara *et al.*, 1979).

A atividade antiviral foi verificada *in vitro* contra os Herpes simplex virus (tipo I e II) contra o poliovirus e contra o WEE virus pela utilização do EP3, um derivado da lignina proveniente do extrato do meio de cultura do *L. edodes* (Sorimachi *et al.*, 1990). Atividades contra diversos vírus como da hepatite e do herpes, adenovirus tipo 12, além da ação antiparasitária foram relatadas (Koga, 1994; Yamamoto *et al.*, 1997; Jong & Birmingham, 1993; Wasser & Weis, 1999).

O estipe do *L. edodes* é rico em quitina e quitosana, conferindo-lhe uma forte ação antioxidante principalmente na habilidade como quelante de íons ferro e contra radicais hidroxila, mostrando que esta parte do cogumelo deve ser mais aproveitada tanto para alimentação como para indústria farmacêutica (Yen *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana do extrato de shiitake também tem sido investigada devido ao fato de se considerar o mesmo como uma fonte natural de

antibióticos (Smânia *et al.*, 1995). A lentionina, uma substância composta por sulfa (Yasumoto *et al.*, 1971) e a bis-metilsulfonil-metil-disulfito, um derivado da lentionina, tem forte ação inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Takazawa *et al.*, 1982). O extrato obtido através da técnica de extração supercrítica de fluidos (SFE) utilizando alta pressão e uma mistura de CO₂ com solventes, neste caso etanol, conferiu aumento na ação antioxidante, especialmente dentro de uma faixa de 5%(v/v) a 15% (v/v) de acordo com Kitzberger *et al.* (2007), este mesmo fluido mostrou-se eficiente antimicrobiano, contra o crescimento de algumas bactérias Gram positivas como *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*.

3.3.4 Cultivo de *Lentinula edodes*

O cultivo de *L. edodes* é o mais antigo dentre todos os cogumelos comestíveis, sendo o primeiro registro datado do ano de 199, no Japão, no qual foi dado um cogumelo desta espécie ao então Imperador Chuai por nativos de Kyushu, apesar deste ser considerado um cultivo primitivo (Singer, 1961). De acordo com Ito (1978) o cultivo do *L. edodes* propriamente dito teve origem na China a cerca de 800 anos atrás e foi introduzido no Japão por fazendeiros chineses entre o final do século XVII e início do século XVIII, onde foi aperfeiçoado. No Brasil, seu cultivo comercial começou a ser desenvolvido em toras de eucalipto, a partir dos anos 90. São utilizadas toras de árvores para o cultivo deste cogumelo, sendo que a castanheira, o carvalho e o olmo são as mais comuns, como estas árvores não são nativas do Brasil, produtores costumam fazer um cultivo paralelo dessas árvores para a produção do substrato (Barbosa *et al.*, 1999). O cultivo em toras ainda é comum no Brasil e a madeira mais utilizada é o eucalipto (Eira *et al.*, 2005).

Os troncos utilizados para o cultivo possuem, em geral, de 9 à 18 cm de diâmetro e de 1 à 1,20 m de comprimento. A árvore cortada permanece na floresta por cerca de 20 à 30 dias para diminuir a umidade e para permitir que substâncias que possam ser nocivas ao desenvolvimento do micélio sejam eliminados (naturalmente metabolizados). Somente então é que se cortam os troncos nos tamanhos desejados e retiram-se os galhos (Bononi & Rodrigues, 1983).

Para a inoculação dos troncos é preciso perfurá-los, sendo duas perfurações a cada 10 cm² e com 1 a 1,5 cm de diâmetro por 1,5 a 2,0 cm de profundidade (abaixo do nível da casca). O método mais simples para a realização desta tarefa é através de furadeira elétrica. Os orifícios devem ser recobertos com parafina fundida, para impedir a perda de água e o ataque de insetos, não podendo a parafina estar muito quente para não matar o micélio. No Brasil, um grande problema são as formigas que se alimentam da matriz, se não estiver devidamente protegida (Bononi *et al.*, 1995).

O local ideal para a incubação do shiitake possui as seguintes características: terreno em declive, com boa drenagem, ventilação moderada e insolação de 30%. Pode-se ainda realizar esta etapa em locais especialmente construídos, como casas de cultivo, onde se tem o controle de temperatura, umidade, luminosidade e ventilação. A temperatura ideal para o desenvolvimento do micélio da maioria das linhagens é de 24 - 28° C. Após a total colonização, os troncos são transferidos para um local mais úmido, menos ensolarado e com temperaturas entre 12 e 20° C. que são propícias para o desenvolvimento dos corpos de frutificação (Bononi *et al.*, 1995).

A colheita inicia-se geralmente de 12 a 18 meses após o inóculo. O pico da produção acontece no 2º e 3º ano de colheita. Sendo que o ciclo total pode durar até 7 anos. Em média, colhem-se 20% do peso inicial da madeira em cogumelos. Os cogumelos estão bons para serem colhidos após 4 ou 5 dias do aparecimento dos botões, como mostra a FIGURA 4. A mesma metodologia se aplica ao cultivo em barracões que devem ser climatizados tanto para a incubação quanto para a produção dos cogumelos (Bononi *et al.*, 1995).



FIGURA 4 – CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. edodes*
FONTE: O autor (2007)

3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa traz grandes vantagens para a produção micelial, gerando uma grande quantidade de biomassa em um espaço compacto e em menor tempo, em comparação com outros tipos de fermentação (Friel & McLoughlin, 2000; Yang & Liao, 1998).

Este procedimento também tem sido bastante utilizado para a produção de exopolissacarídeos, pelo baixo custo e elevada taxa de produtividade, permitindo ainda uma produção maciça utilizando um pequeno espaço (Joo *et al.*, 2004). Sua extração é feita a partir do caldo fermentado, assim como para os antimicrobianos, que é mais eficiente do que a extração realizada quando se tem o cultivo do corpo de frutificação, além dos vários meses que são necessários para obtenção dessa fase do basidiomiceto (Kawagoe *et al.* 2004).

Ainda há pouco estudo com relação à fermentação submersa, estudos principalmente voltados à otimização da produção de exopolissacarídeos (de basidiomicetos) é que tem surgido com maior frequência, pois parâmetros como temperatura, pH inicial, agitação influenciam decisivamente no cultivo do cogumelo (Fang *et al.*, 2002). Devem ser levados em consideração a concentração de macro e micronutrientes no meio, taxa de inoculação e tempo de cultivo, variáveis que também modificam o produto final que se quer obter a partir da fermentação.

Outra vantagem desse tipo de cultivo é possibilitar o aproveitamento de resíduos agroindustriais como melaço de soja, melaço de cana, vinhaça de soja entre outros, permitindo o desenvolvimento de um processo ecologicamente correto e atrativo do ponto de vista do custo-benefício (Rubell, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados nesta pesquisa estão descritos em detalhes nos tópicos subseqüentes, sendo a FIGURA 5 um esquema resumido dos mesmos.

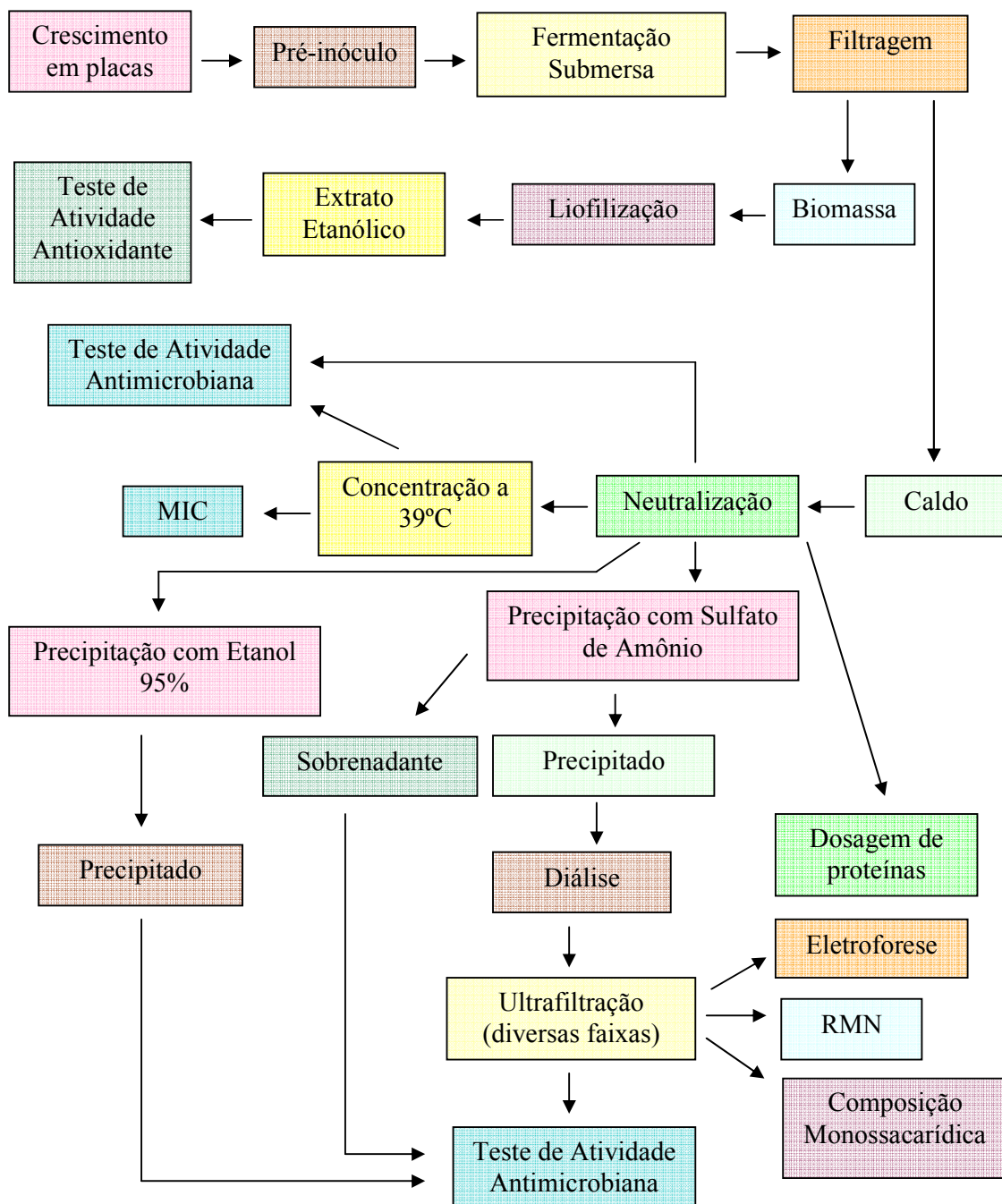


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA GERAL DA PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO CONTENDO ANTIMICROBIANO E TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1 MICRORGANISMOS

Nos experimentos realizados 6 cepas de *L. edodes* foram utilizadas, todas isoladas por Leifa Fan, na China, no ano de 2006 e cedidas ao Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal do Paraná. As mesmas encontram-se atualmente depositadas no cepário da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR do Laboratório de Processos Biotecnológicos-I (LPB-I) sendo designadas como *Lentinula edodes* LPB 1, *Lentinula edodes* LPB 2, *Lentinula edodes* LPB 4, *Lentinula edodes* LPB 5, *Lentinula edodes* LPB 6 e *Lentinula edodes* LPB 10.

As 5 espécies bacterianas utilizadas como agentes patogênicos nos testes de atividade antimicrobiana foram adquiridas no *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo estas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.1.1 Cultivo e manutenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas foram mantidas congeladas com criopreservante, sendo passadas para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), incubando a 37°C por 24h, para obterem crescimento como mostra a FIGURA 6, e serem utilizadas nos experimentos.



FIGURA 6 – INÓCULOS DAS BACTÉRIAS EM CALDO BHI

3.1.2 Cultivo e manutenção das cepas de *Lentinla edodes*

As cepas de basidiomicetos utilizadas foram repicadas para tubos de ensaio com BDA (Ágar Batata Dextrose), incubadas a 24°C por 7-10 dias e posteriormente armazenadas a temperatura ambiente. Para a manutenção das mesmas, novos repiques foram realizados a cada três meses.

4.2 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO DE *L. edodes*

Os basidiomicetos foram preparados em placas de Petri com meio BDA, na proporção de 20 mL por placa previamente esterilizados a 121°C, pressão de 1 atm, durante 15 minutos, em autoclave vertical (Phoenix®). A partir dos tubos de ensaio contendo os basidiomicetos, um quadrado (aproximadamente 1cm²) de ágar com micélio foi cortado com auxílio de um bisturi e transferido para o centro da placa, sendo incubados a 24°C por aproximadamente 15 dias, para obter o crescimento micelial até preenchimento da totalidade da placa, como ilustrado na FIGURA 7. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (Veco®).



FIGURA 7 – CEPAS DE *L. edodes* DURANTE CRESCIMENTO EM PLACA DE PETRI

O micélio crescido nas placas de *Petri* foram raspados e colocados em frascos *Erlenmeyers* (1000 mL) contendo 500 mL de meio Fan (2002), descrito no

QUADRO 4, sendo utilizada 1 placa para cada 100mL de meio. Em seguida a incubação foi realizada sob agitação de 120 rpm em incubador rotatório de bancada refrigerada (Novatécnica), a temperatura de 24°C, por um período de sete dias. O micélio foi filtrado em tela (malha de 0,5 mm²), e com auxílio de uma espátula esta biomassa foi passada através da tela com 50 mL de meio Fan esterilizado. A suspensão de micélio quebrado foi denominada de pré-inóculo, obtendo uma concentração micelial de aproximadamente 2,5 g/L.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Glicose	10g
Extrato de Levedura	3,95g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,3g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,5g
Água Deionizada	q. s. p. 1000mL
pH 5,9 – 6,1	

QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO FAN

FONTE: FAN (2002)

4.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Leninula edodes*

Para o cultivo submerso utilizou-se um meio a base de melão de cana, implementado com alguns componentes (vide composição no QUADRO 5), o qual foi denominado Meio Melão de Cana Suplementado (MCS), desenvolvido durante este estudo.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Melão de Cana	4° Brix
Extrato de Levedura	2,0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,3g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,6g
Água Deionizada	q. s. p. 1000mL
pH 5,9 – 6,1	

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO MELAÇO DE CANA SUPLEMENTADO (MCS)

Para a inoculação foram utilizados 3 frascos *Erlenmeyers* com capacidade para 1000 mL, contendo 500 mL de meio para cada cepa de *L. edodes*, ocorrendo, assim, fermentações em triplicata. Adicionou-se 10% (v/v) da solução de pré-inóculo. Após a inoculação, estes frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm em incubador rotatório de bancada refrigerada (Novatécnica®), a temperatura de 24°C, de acordo com a FIGURA 8. Cultivos foram interrompidos em 7, 14, 21, 28 e 35 dias para separação de biomassa e análise da atividade antioxidante da mesma. A análise da atividade antimicrobiana foi realizada com os caldos provenientes de todas as semanas de incubação para a cepa *L. edodes* LPB 1 para se ter um parâmetro da semana em que a resposta do antimicrobiano fosse mais efetiva. As demais cepas *L. edodes* LPB 2, LPB 4, LPB 5, LPB 6 e LPB 10, tiveram a atividade antimicrobiana testada apenas do caldo da incubação pelo período de 21 dias.



FIGURA 8 – SHAKER E *ERLENMEYER* COM *L. edodes* APÓS 21 DIAS

Os caldos fermentados sofreram um processo de filtração, utilizando papel de filtro (qualitativa 80G) para separar os caldos das biomassas.

4.4 PROCESSAMENTO DAS BIOMASSAS

As biomassas obtidas foram congeladas a -22°C, liofilizadas (Liofilizador Thermo Electron Corporation®) e maceradas em etanol absoluto (1 g de biomassa

em 30 mL de solvente). Em seguida a biomassa macerada foi separada do solvente por centrifugação e com o sobrenadante foi realizada a determinação da atividade antioxidante.

4.5 PROCESSAMENTO DOS CALDOS FERMENTADOS

4.5.1 Concentração dos caldos fermentados de *L. edodes*

Uma amostra, de aproximadamente 20 mL, dos caldos foi reservada para ser utilizada no teste. O restante foi concentrado até atingir volume equivalente a 10% de seu volume inicial, em estufa com pressão reduzida (Med Center Einrichtungen GmbH®) e a uma temperatura controlada de 39°C. Em seguida todas as amostras dos caldos (concentrados e não concentrados) tiveram seus pHs ajustados para 7,0. Antes de serem utilizados nos testes antimicrobianos, foram filtrados em filtro milipore 0,22 µm a fim de ficarem estéreis.

4.5.2 Preparo de amostras do caldo de *L. edodes* LPB 5 por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ultrafiltração

O caldo fermentado do *L. edodes* LPB 5 sofreu adição de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para precipitação de proteínas na proporção de 60% (p/v), mantido em geladeira overnight (Yang *et al.*, 1992) e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi testado com relação à atividade antimicrobiana e o precipitado foi ressuspenso em água milli-Q e dialisado contra água deionizada (a fim de remover os sais).

O dialisado foi ultrafiltrado em membranas com diferentes linhas de corte, no sistema Amicon®, 1 KDa, 10 KDa, 30 KDa, 50 KDa e 100 KDa, resultando 5 frações.

4.5.3 Preparo de amostras do caldo de *L. edodes* LPB 5 por precipitação com etanol

O caldo fermentado do *L. edodes* LPB 5 foi precipitado com etanol 95% (na proporção de 1:4 v/v) e mantido a 4°C (overnight), para a precipitação de exopolissacarídeos, posteriormente centrifugado a 6.000 rpm (Gern, 2005). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de exopolissacarídeos foi analisado quanto à atividade antimicrobiana.

4.6 ELETROFORESE

As frações provenientes da ultrafiltração passaram por uma eletroforese para verificação da eficácia desta metodologia como separação de frações e para indicar em que faixa a(s) substância(s) com atividade antimicrobiana se encontra, tendo sido este procedimento realizado segundo Laemmli (1970).

Um sistema em cuba vertical, com placas de vidro e espaçadores previamente lavados, limpos com álcool 70% e secos, montados em suporte tendo as laterais vedadas com gel de agarose 1% foi utilizado.

4.6.1 Preparo do gel de separação

Após a montagem do sistema foi adicionado o gel de separação (concentração de 12%) formado por acrilamida 30% (4 mL), 2,5 mL de solução Tris HCl - 1,5M (pH 8,8), dodecil sulfato de sódio (SDS 10%) (0,1 mL), persulfato de amônio 10% (70 µL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED) (7 µL) e água ultra pura (3,35 mL). Ao final da polimerização deste gel, o gel de empilhamento (vide item seguinte) foi adicionado sobre ele.

4.6.2 Preparo do gel de empilhamento

O gel de empilhamento (concentração 4%) tem em sua composição acrilamida 30% (1,3 mL), 2,5 mL Tris HCl - 0,5M (pH 6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS 10%) (0,1 mL), persulfato de amônio 10% (70 μ L), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED) (14 μ L) e água destilada (6,1 mL). Em seguida um molde plástico, também chamado de pente, foi encaixado entre as placas de vidro, nesta camada de gel para a formação dos poços de aplicação.

Com a polimerização do gel de empilhamento há a retirada do pente e aplicação das amostras nos poços, incluindo o padrão. As amostras foram previamente preparadas com 1 mL de solução Tris HCl - 0,5M (pH 6,8), glicerol (0,8 mL), dodecil sulfato de sódio (SDS 10%) (1,6 mL), azul de bromofenol 0,2% (0,2 mL) e betamercaptoetanol (0,4 mL) e fervidas durante 3 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada a temperatura ambiente, com amperagem determinada em 30A conforme FIGURA 9. O tampão de corrida foi diluído 5 vezes, de sua solução estoque de Tris (4,5 g), glicina (21,6 g), SDS (1,5 g) e água destilada (q.s.p. 300 mL).

O padrão foi formado por 4 marcadores de massa molecular, sendo os mesmos em 150 KDa, 66 KDa, 29 KDa, 12,4 KDa.

A revelação das bandas do gel foi feita por coloração de prata.

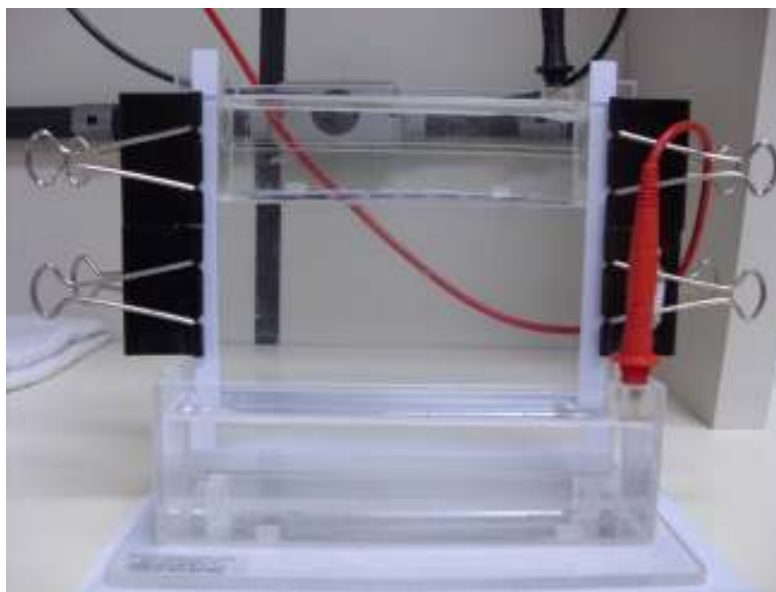


FIGURA 9 – CUBA DE ELETROFORESE COM AMOSTRAS, DURANTE A CORRIDA

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A inibição das bactérias patogênicas foi determinada pelo método de microdiluição (Devienne & Raddi, 2002). Para a realização deste teste os patógenos sofreram um processo de reativação em caldo BHI, que foi incubado à 37°C, *overnight*. Os caldos foram diluídos 1/10 em solução salina 0,9% e usados como inóculo. Microplacas (TPP®) de 96 poços com capacidade volumétrica de 200 µL foram empregadas para o teste, que foi realizado em triplicata. O experimento consistiu de branco, controle positivo, controle negativo e amostra a ser testada, sendo cada um montado da maneira apresentada no QUADRO 6 abaixo.

	BRANCO	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO	TESTE DE AMOSTRA
CALDO BHI	90 µL	90 µL	90 µL	90 µL
AMOSTRA	90 µL	---	---	90 µL
CALDO MCS	---	90 µL	90 µL	---
H ₂ O DEIONIZADA	---	---	20 µL	---
INÓCULO	20 µL	20 µL	---	20 µL

QUADRO 6 – ESQUEMA DE PREENCHIMENTO DOS POÇOS DAS MICROPLACAS

As microplacas foram incubadas a 37°C e leituras espectrofotométricas, a 630 nm, foram feitas a cada duas horas no aparelho Power Wave XS da BioTec®, com auxílio do programa Kc Junior como na FIGURA 10. Das absorbâncias posteriores diminuiu-se àquelas obtidas no tempo 0 e as médias das triplicatas foram usadas para a construção das curvas de crescimento e inibição, a fim de observar a ação antimicrobiana dos caldos fermentados (fúngicos) frente aos patógenos.



FIGURA 10 – TESTE ANTIMICROBIANO

Os cálculos de porcentagem de inibição foram efetuados utilizando a equação a seguir:

$$I(\%) = [(Inc. DO controle - Inc. DO amostra) / Inc. DO controle] \times 100$$

Onde I(%) é a porcentagem de inibição da amostra em relação ao controle, “Inc. DO controle” é o incremento da densidade óptica do controle e “Inc. DO amostra” é o incremento da densidade óptica da amostra (Caron, 2008).

4.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Os caldos fermentados foram preparados em diluições seriadas partindo de uma concentração de 2,5 mg/mL (primeira diluição) testados conforme metodologia descrita no tópico 3.7, sendo incubados por um período de 24h e tendo a leitura das absorbâncias realizada. A atividade antimicrobiana foi testada contra uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e uma Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) sendo considerada como concentração inibitória mínima a maior diluição capaz de inibir 50% do crescimento do inóculo bacteriano.

4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Há vários testes que podem ser empregados nesta etapa, tanto na busca direta de algum componente antioxidante específico como na verificação da ação contra um radical livre ou agente com capacidade oxidante. Nesta etapa 3 diferentes testes foram realizados nos extratos obtidos a partir das biomassas liofilizadas.

4.9.1 Prospecção de agentes anti-radical superóxido

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Liu *et al.* (1997), gerando-se o radical superóxido em tampão Tris-HCl (16 mM, pH 8,0), sendo 78 µM de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, 50 µM nitroazul tetrazolim, 10 µM metassulfato de fenazina e extrato de micélio de cogumelo em concentrações distintas (0,7 mg/mL, 1,4 mg/mL e 2,1 mg/mL). A cor da reação foi detectada a 560 nm pela leitura das absorvâncias usando o aparelho Power Wave XS (BioTec®). O branco foi feito com a mesma solução, trocando apenas a amostra por etanol absoluto. A vitamina C (ácido ascórbico) e a glicose ficaram como controles positivo e negativo, respectivamente, neste experimento. Para o cálculo da taxa de inibição do radical superóxido utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = [(A1 - A) \times 100] / AP$$

Onde A é a média das absorvâncias do branco, A1 é a média das absorvâncias das amostras e AP é a média das absorvâncias do controle positivo, neste caso o ácido ascórbico.

4.9.2 Prospecção de agentes anti-radical hidroxil

A metodologia aqui colocada foi uma adaptação realizada a partir da descrita por Liu *et al.* (1997), gerando-se o radical hidroxila em solução tampão fosfato de

sódio (0,15 mM, pH 7,4), adicionando 33 mmol de vitamina C (ácido ascórbico), 33 mmol de CuSO₄, 4 mmol de citocromo C por litro de solução tampão e extrato de micélio de cogumelo em várias concentrações (0,7 mg/mL, 1,4 mg/mL e 2,1 mg/mL). A mistura deve ser incubada a 25°C por 90 min. A transmitância da solução após reação foi medida a 550 nm usando o aparelho Power Wave XS (BioTec®). Tiourea e glicose servem como controle positivo e negativo respectivamente e o branco foi feito com a utilização de etanol absoluto no lugar da amostra. Todas as amostras, o branco e os controles tanto positivo quanto negativo foram testadas em triplicata. Para o cálculo da taxa, em porcentagem, de inibição do radical hidroxil a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Inibição (\%)} = (T - T2 / T - T1) \times 100$$

Onde T é a média das transmitâncias do branco, T1 é a média das transmitâncias do controle positivo e T2 é a média das transmitâncias das amostras.

4.9.3 Teste de 2,2 – *diphenyl* – 1 *picrylhydrazyl* (DPPH)

Alíquotas de 1000 µL de extratos de micélio com 0,7 mg/mL, 1,4 mg/mL e 2,1 mg/mL devem ser adicionados a 4 mL de solução alcoólica de DPPH (0,004 %). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi lida em 517 nm pelo aparelho Power Wave XS (BioTec®) (Turkoglu *et al.*, 2006). O branco foi feito com a mesma solução, trocando apenas a amostra por etanol absoluto. Todas as amostras e o branco foram testados em triplicata. A porcentagem de inibição do radical livre formado pelo DPPH foi calculada seguindo a fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = [(A - A1) / A] \times 100$$

Onde A é a média das absorbâncias do branco e A1 é a média das absorbâncias das amostras.

4.10 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS CALDOS FERMENTADOS

4.10.1 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína das amostras foi realizada pelo método de Lowry (1951) sendo que 50 µL de amostra foram adicionados a 50 µL de reagente de Lowry constituído por carbonato de sódio anidro (2 g), hidróxido de sódio (0,4 g), sulfato de cobre (0,02 g), tartarato de sódio (0,04 g) e água (102 mL). A reação ocorre a temperatura ambiente por 10 minutos, ocorrendo em seguida a adição de 50 µL do reagente de Folin, sendo incubada a temperatura ambiente por mais 20 minutos.

Ao término da reação foi realizada a leitura da absorbância (660 nm) das reações referentes a cada amostra (todas foram analisadas em triplicata).

4.10.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Neste experimento os espectros foram obtidos em espectrômetros BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 100,63 MHz para os núcleos de ^{13}C .

As amostras de precipitado de L. edodes LPB 5 total e a fração 10 – 30 KDa foram solubilizadas em solventes deuterados (D_2O) e acetona. O deslocamento químico expresso em ppm foi determinado utilizando-se acetona como padrão interno (30,2 ppm) (Gonçalves, 2005).

4.10.3 Composição Mossacarídica

Neste teste a fração entre 10 – 30 KDa do precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ proveniente do caldo fermentado de *L. edodes* LPB 5, foi liofilizado, sendo pesado 1 mg do mesmo e em seguida hidrolisado com 1mL de ácido trifluoracético (TFA) 1 M por 2 horas à 120 °C, após este período congelado e liofilizado. O passo seguinte foi o de redução, realizada com a adição de 0,5 mL de água deionizada, borohidrido de sódio (NaBH_4) (3 mg) a temperatura ambiente *overnight*. A solução foi neutralizada com ácido acético até pH 5,0 e nova liofilização. Por último realizou-se três lavagens com metanol, adicionando-se ao final 1 mL de anidrido acético à 120 °C por 1 hora, adicionando-se 1,5 mL de clorofórmio e agitando em vórtex. A fase aquosa foi descartada e a fase clorofórmica lavada com solução de bicarbonato de sódio 0,5 N (Gracher, 2005). A amostra foi analisada em aparelho de cromatografia gasosa para obtenção dos açúcares e suas respectivas porcentagens.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo Programa Statistica versão 6.0 / 2001, da STATSOFT®, por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey $p < 0,05$, utilizando um delineamento em blocos inteiramente casualizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Diversas pesquisas comprovam que o shiitake possui compostos com atividade antibiótica, atuando sobre microrganismos de natureza fúngica, bacteriana e viral (Tonucci, 2004).

A primeira análise realizada foi para determinar em que período de cultivo se encontrava maior efetividade dos caldos, tendo sido escolhida a cepa de *L. edodes* LPB 1 para esta constatação. Com isso, pôde-se observar que 21 dias de cultivo é o período mais efetivo, sendo as diferenças de crescimento bacteriano entre estes caldos e os controles positivos, significativas ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$) apesar de alguns dos caldos oriundos de 7, 14, 28 e 35 também terem apresentado ação antimicrobiana contra alguns patógenos. Isso pode ser observado na FIGURA 11 contra *Staphylococcus aureus*, na FIGURA 12 contra *Listeria monocytogenes*, na FIGURA 13 contra *Escherichia coli* e na FIGURA 14 contra *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente após a concentração dos caldos, tendo como resultados em todos os testes que este processo potencializa a ação antimicrobiana, tornando-a mais acentuada. Essa constatação está de acordo com o estudo realizado por Ishikawa *et al.* (2001) que obtiveram como resultado maior atividade antibacteriana do filtrado da cultura de *L. edodes* em meio líquido entre 18-25 dias de incubação, a 25°C em caldo extrato de malte, neste caso contra *Bacillus subtilis*.

Para se fazer a análise dos gráficos, deve-se observar que quanto maior a absorbância maior o crescimento bacteriano, portanto, quanto menor a absorbância, maior a efetividade do caldo.

De acordo com as legendas das figuras abaixo, L 1n é o caldo do *L. edodes* LPB 1 não concentrado e L 1c é o caldo do *L. edodes* LPB 1 concentrado. Relacionando esse dado com o período de cultivo, sendo 7d (7 dias), 14d (14 dias), 21d (21 dias), 28d (28 dias) e 35d (35 dias).

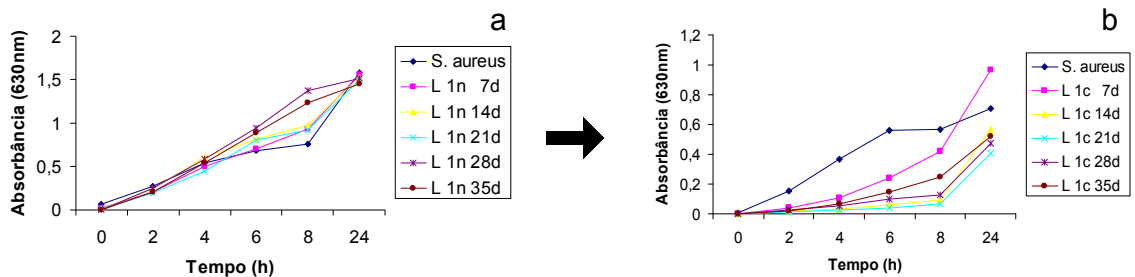


FIGURA 11 a – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *S. aureus*

FIGURA 11 b – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *S. aureus*

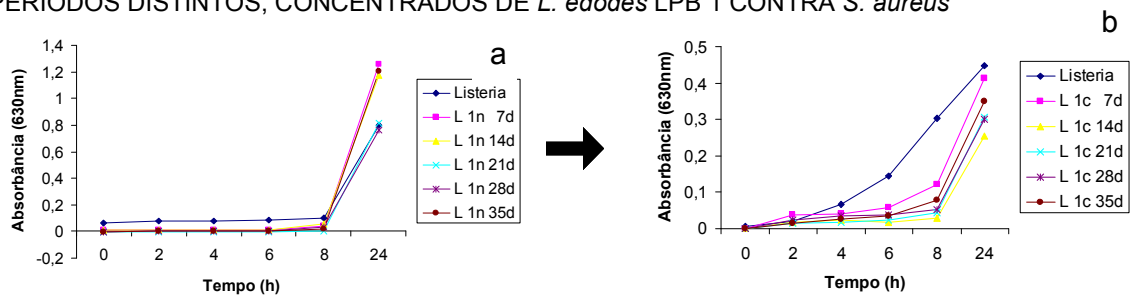


FIGURA 12 a – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *L.monocytogenes*

FIGURA 12 b – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *L.monocytogenes*

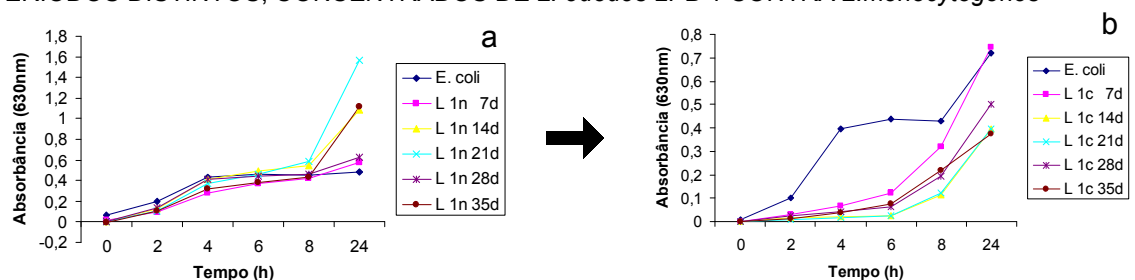


FIGURA 13 a – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *E. coli*

FIGURA 13 b – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *E. coli*

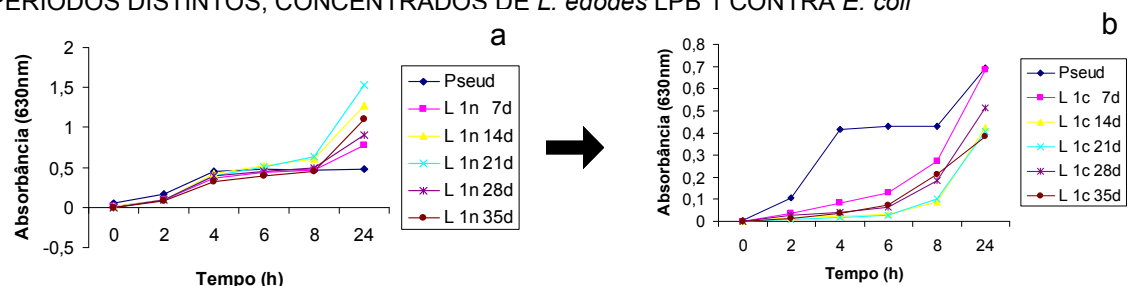


FIGURA 14 a – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *P. aeruginosa*

FIGURA 14 b – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS FERMENTADOS POR PERÍODOS DISTINTOS, CONCENTRADOS DE *L. edodes* LPB 1 CONTRA *P. aeruginosa*

As fermentações dos caldos seguintes deram-se diretamente dentro de 21 dias, sendo os testes realizados com as amostras não concentradas e concentradas, permanecendo os resultados sempre mais significativos após concentração.

A FIGURA 15 se refere à atividade dos caldos não concentrados e neutralizados das diferentes cepas de *L. edodes* frente à bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* num período de 24h.

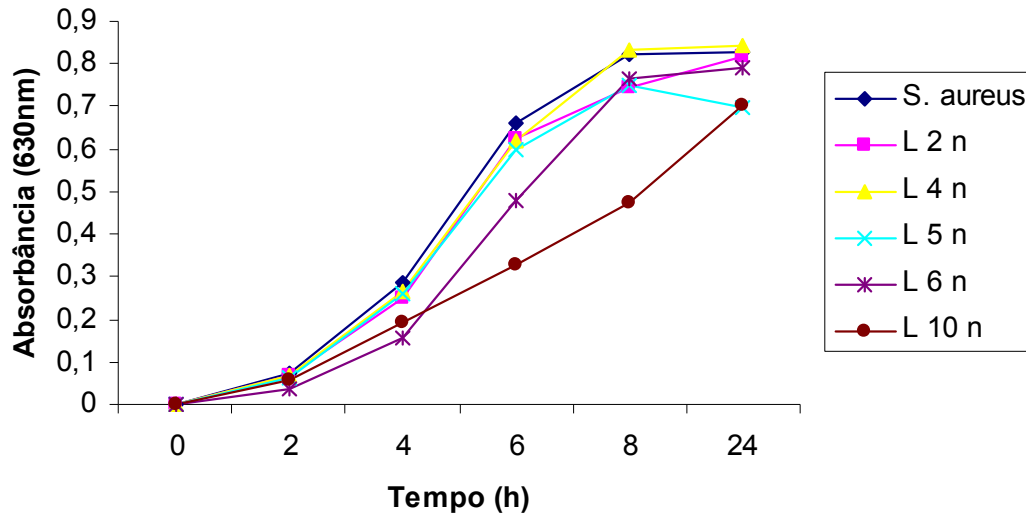


FIGURA 15 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *S. aureus*

Apesar da atividade não muito acentuada, todos os caldos apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus*, especialmente o caldo proveniente da fermentação do *L. edodes* LPB 10 ($p < 0,01$), por ter sido o mais efetivo contra o crescimento do patógeno. Esta ação antimicrobiana ficou ressaltada após o processo de concentração dos caldos, permitiu maior eficácia dos fermentados, como mostra a FIGURA 16.

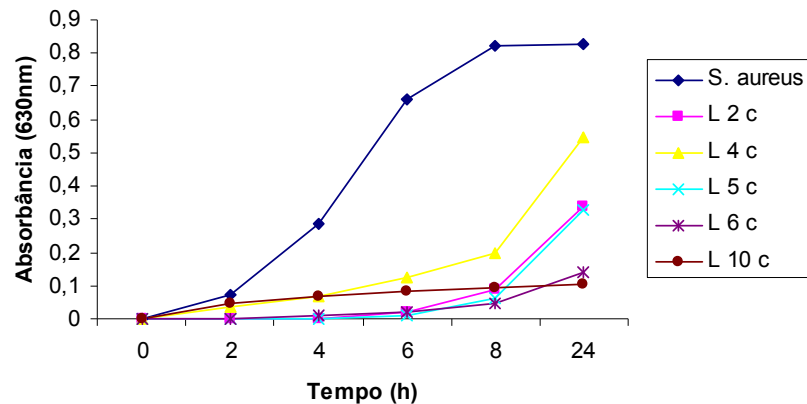


FIGURA 16 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *S. aureus*

Pode-se ver claramente que todos os caldos obtiveram ação contra o patógeno, mostrando-se ainda o caldo proveniente do *L. edodes* LPB 10 o mais efetivo após 24h (88% de inibição), apesar do melhor desempenho nas primeiras 8h dos caldos de *L. edodes* LPB 6, LPB 5 e LPB 2 (diferença não significativa entre estas amostras) com taxa de inibição de aproximadamente 96% ($p < 0,01$) para os três caldos citados. Esses resultados reafirmam os que foram obtidos por Hatvani (2001) que obteve um crescimento de apenas 11% em relação a seu controle, durante um período de 24h, contra este mesmo patógeno, observou ainda inibição de 95% para *Streptococcus pyogenes* e praticamente 100% para *Bacillus megaterium*, quando utilizou uma das frações do extrato de micélio do *L. edodes*. Este resultado tbém foi atingido por Bianco (1981) que observou atividade antibiótica contra *S. aureus* e *Bacillus subtilis* utilizando a cortinelina, um composto isolado do shiitake.

Contra outro patógeno também Gram positivo, neste caso a *Listeria monocytogenes*, os caldos também mostraram ter ação, principalmente no concentrado. Quanto aos caldos não concentrados apenas o *L. edodes* LPB 10 foi realmente efetivo, o que muda após concentração. É o que mostram as FIGURAS 17 e 18 respectivamente.

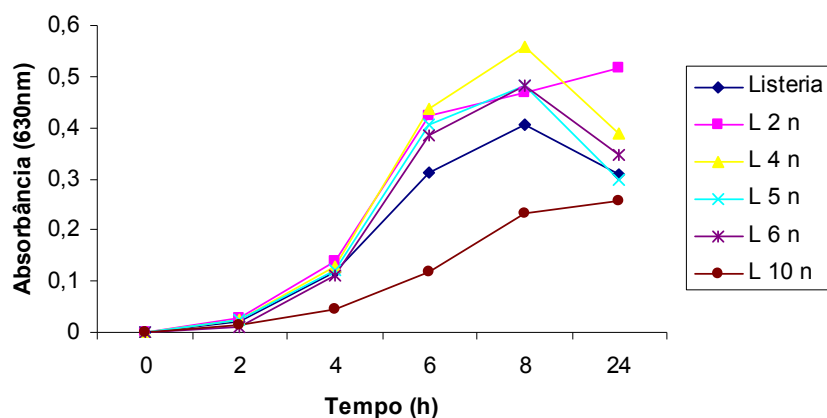


FIGURA 17 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *L. monocytogenes*

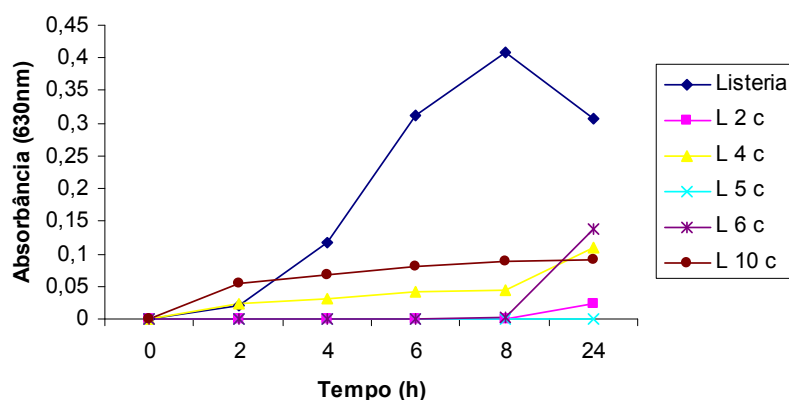


FIGURA 18 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *L. monocytogenes*

Apesar da destacada atividade antimicrobiana dos caldos de *L. edodes* LPB 2, LPB 5 e LPB 6 até às 8h (amostras não apresentam diferenças significativas entre si), o desempenho do caldo de *L. edodes* L 5 merece fundamental atenção pelo fato de não ter crescimento bacteriano em sua presença durante 24h, mantendo-se sobre o eixo X do gráfico, isso pode indicar uma ação bactericida, por não se perceber nenhum crescimento, sendo atingindo uma taxa de inibição de 100% ($p < 0,01$). Pelo pequeno crescimento percebido nos caldos LPB 2 e LPB 6 entre 8 e 24h pode-se crer que seu mecanismo segue uma forte ação bacteriostática, mas não bactericida.

Estas hipóteses precisam ser pesquisadas mais profundamente para uma conclusão mais definitiva, mas estes caldos parecem ter comportamento similar ao extrato do píleo de *L. edodes* que tem ação bacteriostática enquanto que o extrato da estipe e o filtrado micelial apresentam atividade bactericida sobre certos patógenos (Piccinin, 2000).

Também foram realizados testes contra bactéria Gram negativas, obtendo bons resultados. Na FIGURA 19 é possível observar a ação dos caldos não concentrados contra *Escherichia coli*.

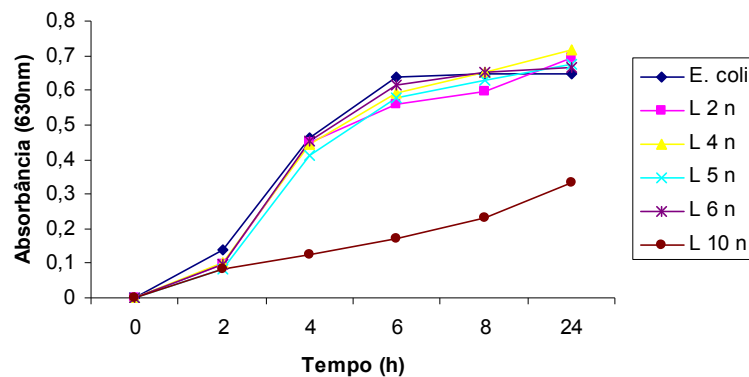


FIGURA 19 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *E. coli*

Neste caso é possível reparar que apesar de todos os caldos mostrarem efeito antimicrobiano, apenas o caldo fermentado de *L. edodes* LPB 10 apresenta significativa ação, sendo de aproximadamente 46% ($p < 0,01$) de inibição. Ação esta que se mantém evidente para o caldo concentrado em 24h com inibição de aproximadamente 100% ($p < 0,01$), obtendo comportamento semelhante ao caldo de *L. edodes* LPB 5 frente a *L. monocytogenes*, podendo ser este também uma substância com ação bactericida. Após concentração os outros caldos também são efetivos, principalmente os de LPB 5 e LPB 2 (amostras não possuem diferença significativa entre si), como mostra a FIGURA 20.

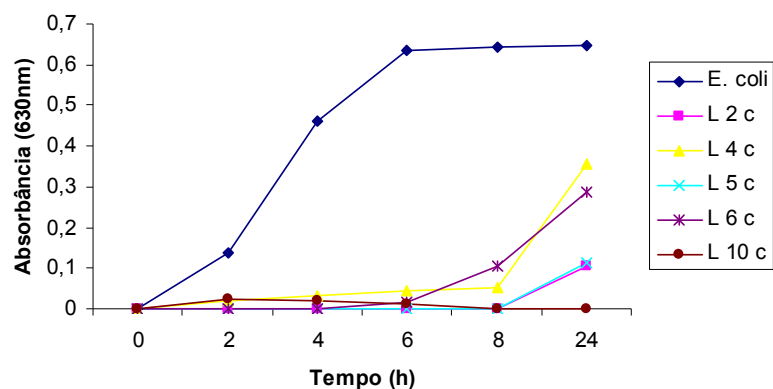


FIGURA 20 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *E. coli*

Além da *E. coli* os caldos também foram testados contra *P. aeruginosa*, uma outra bactéria patogênica Gram negativa e obtiveram desempenho satisfatório, de acordo com as FIGURAS 21 abaixo e na FIGURA 22 na página seguinte.

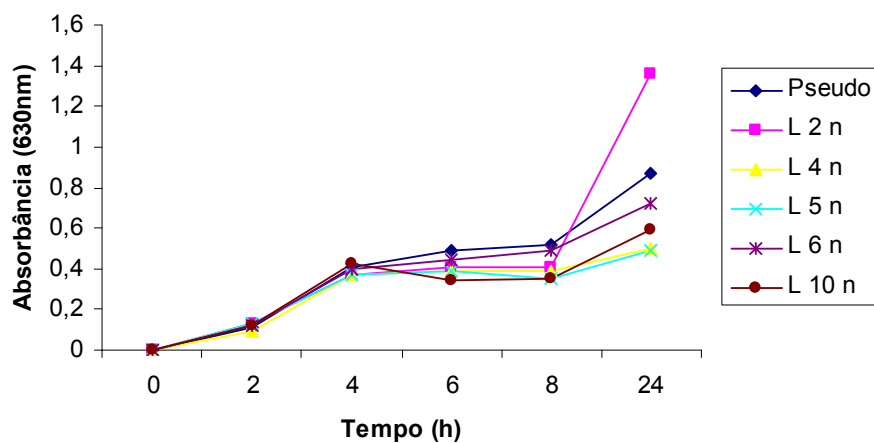


FIGURA 21 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS NÃO CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *P. aeruginosa*

Dos caldos não concentrados apenas o LBP 6 não difere significativamente do controle, não se mostrando eficazes, apesar do crescimento bacteriano apresentar-se menor pela leitura da absorbância. Os caldos provenientes de *L. edodes* LPB 4, LPB 5 e LPB 10 mostraram atividade antimicrobiana.

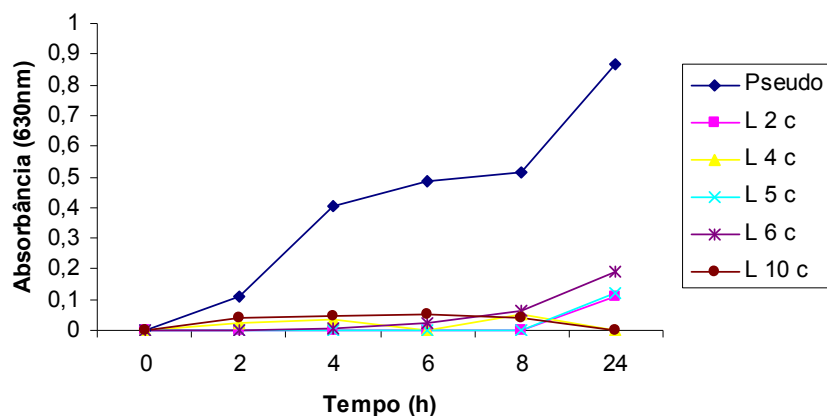


FIGURA 22 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CALDOS CONCENTRADOS DE *L. edodes* CONTRA *P. aeruginosa*

Seguindo a tendência apresentada pela FIGURA 21 (vide página 38), na FIGURA 22 é notória a atividade dos caldos originados a partir da fermentação do *L. edodes* LPB 5, LPB 4 e LPB 10 (amostras não diferem significativamente entre si), o que confere a esses caldos uma eficácia maior contra esse patógeno, significativas ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

É especialmente interessante reparar que caldo de *L. edodes* LPB 5 obteve comportamento semelhante contra as outras bactérias patogênicas, tendo esta cepa destaque no estudo, pois é um indício de que produz um composto com grande eficácia tanto contra patógenos Gram positivos como Gram negativos. Em função disto o seu caldo foi utilizado para os demais procedimentos, visando a pré-purificação do componente com ação antimicrobiana. Desempenho similar para a cepa LPB 2. A cepa de *L. edodes* LPB 10 também obteve bastante eficiência contra todos os patógenos, especialmente os Gram negativos, o que vem a contrariar Coletto (1981) que observou efeito inibitório apenas contra *S. aureus* e *B. subtilis* mas não contra *E. coli*. Entretanto reforça os resultados obtidos por Herrmann (1962) and Komemushi *et al.* (1995) comprovando efeito para bactérias tanto Gram positivas quanto negativas.

É relevante observar que todos os caldos, especialmente quando concentrados, são efetivos, tanto contra agentes patogênicos Gram positivos como Gram negativos, isto permite afirmar que o processo de concentração potencializa o efeito antimicrobiano, provavelmente por aumentar a quantidade da substância

responsável em um determinado volume de amostra. Além disso, vários caldos se mantiveram com absorbância sobre o eixo X do gráfico durante período de crescimento bacteriano. Como este fato ocorreu também com cepas diferentes de *L. edodes*, isso pode indicar um comportamento padrão entre alguns caldos contra determinadas bactérias, o que pode ser um indicativo de que a substância responsável pela atividade antimicrobiana pode ter sido produzida por cepas diferentes.

A amostra correspondente ao caldo precipitado com etanol 95%, permitindo a extração do exopolissacarídeos não apresentou atividade antimicrobiana.

Ao caldo fermentado de *L. edodes* LPB 5 foi-se adicionando sulfato de amônio, resultando em um precipitado e um sobrenadante. A parte sobrenadante não apresentou atividade antimicrobiana. Já o precipitado apresentou atividade. Isso é um indicativo de que a substância com atividade antimicrobiana tem caráter protéico.

As FIGURAS 23 e 24, a seguir, mostram o resultado da atividade antimicrobiana deste precipitado, já ultrafiltrado em diferentes faixas de pesos moleculares, frente a *S. aureus* e *E. coli* respectivamente. A fração AM 1 é correspondente ao precipitado total (apenas dialisado), AM 2 o precipitado que ficou na faixa de 10 a 30 KDa, AM 3 o precipitado na faixa 30-50 KDa, AM 4 o precipitado na faixa de 50-100 KDa, AM 5 o precipitado na faixa superior a 100 KDa e AM 6 o precipitado na faixa de 1 a 10 KDa. Todas as amostras testadas estavam na concentração de 5 mg/mL.

Em ambos os experimentos a fração AM 2 (10-30 KDa) obteve melhor desempenho, além de ter se mostrado ativa por maior período de tempo.

Contra *S. aureus* a amostra AM 2 foi a única que se diferenciou significativamente das outras amostras e do controle positivo (crescimento do patógeno) significativamente ao nível de 1% de probabilidade. Contra a *E. coli* as amostras AM 2, AM 3 e AM 4 não apresentaram diferença significativa entre si, apenas do controle positivo ($p < 0,01$).

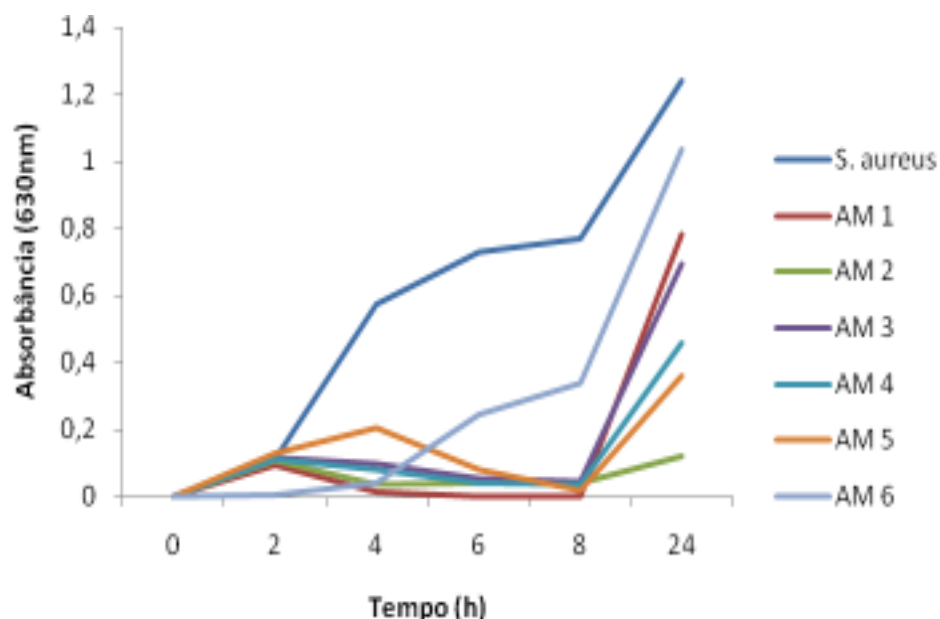


FIGURA 23 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DE *L. edodes* LPB 5 CONTRA *S. aureus*

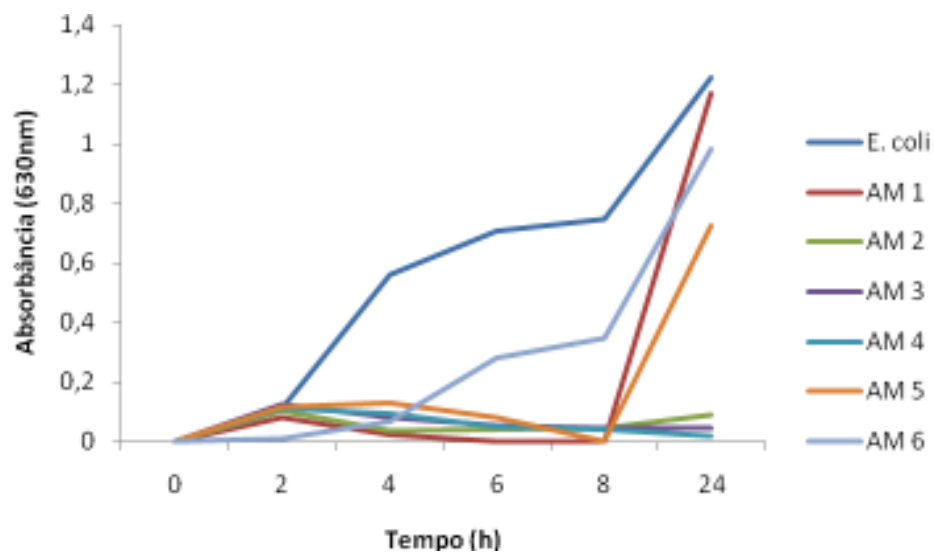


FIGURA 24 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DE *L. edodes* LPB 5 CONTRA *E. coli*

Em ambos os experimentos a fração AM 6 (1-10KDa) foi a menos ativa. Já contra a *E. coli*, as frações AM 3 (30-50KDa) e AM 4 (50-100KDa) também se mostraram efetivas.

No tópico 5.3 é possível analisar as bandas protéicas dessas amostras.

Os estudos atualmente realizados estão focados no corpo de frutificação e no micélio por possuírem componentes com atividade antimicrobiana (Turkoglu *et al.*, 2006) e nos diferentes extratos provenientes dos mesmos, como extratos clorofórmicos e de acetato de etila de cogumelo secos que possuírem atividade contra *Streptococcus mutans* e *Prevotella intermedia* (Hirasawa *et al.*, 1999).

Komemushi, *et al.* (1996) verificou atividade inibitória contra alguns fungos e bactérias nos caldos fermentados de *L. edodes*, que também mostrou efeito bloqueando a síntese do vírus do herpes tipo 1 em cultura de tecido celular (Sarkar *et al.* 1993) contra vírus e diminuiu a infectividade e o efeito citopático do vírus da imunodeficiência humana (Suzuki *et al.* 1989).

O mesmo desempenho é realizado por outras partes deste basidiomiceto, como no caso dos estudos realizados por Kitzberger, *et al.* (2007) com extratos do corpo de frutificação de *L. edodes* (por solvente e por pressão de gás carbônico), mostrando ação contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* e *E. coli*. Esse efeito pode ter sido provocado pelo composto sulfurado chamado lentinina e seus derivados, que apesar de estarem presentes tanto no corpo de frutificação como no micélio do *L. edodes* podem estar sendo excretado para o meio de cultivo, assim como a lentinamicina, outro composto a ser considerado, pois é o responsável pela ação em extratos clorofórmicos de micélio provenientes da fermentação submersa (Hasegawa *et al.*, 2005). Há também a ocorrência de um composto antibacteriano formado por um álcool β -fenetil e lentinamicina, isolado a partir de cultura de micélio em meio líquido por Komemushi *et al.* (1996). Pela ação de extratos miceliais de *L. edodes* contra *S. aureus* e *E. coli*, um mecanismo pode se dar pela formação de ácido oxálico, um cristal comum na superfície celular de muitos cogumelos, incluindo o shiitake (Bender, *et al.* 2001).

Os resultados aqui obtidos apontam para excreção dessas substâncias, que se comprovada pode vir a ser uma vantagem, pois a extração e purificação são mais fáceis do que do produto intrínseco. Há também a possibilidade do responsável pela atividade antimicrobiana ser um composto inédito, sendo necessário mais estudo sobre especificamente o caldo proveniente destas fermentações.

5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (MIC) é a maior diluição capaz de inibir 50% do crescimento do inóculo, esta relação de inibição variou de acordo com a cepa e com o patógeno testado.

Apenas o caldo de *L. edodes* LPB 1 e o *L. edodes* LPB 5 mantiveram atividade antimicrobiana na diluição 1:8, 48,9% e 59,5% de inibição respectivamente contra *S. aureus* de acordo com a TABELA 1 abaixo.

TABELA 1 – MIC DOS CALDOS FERMENTADOS DE *L. edodes* CONTRA *S. aureus*

% Inibição contra <i>S. aureus</i>	Diluições dos caldos fermentados (a partir de solução 5mg/mL)				
	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10
<i>L. edodes</i> LPB 1	67,6	66,7	55,8	48,9	43,2
<i>L. edodes</i> LPB 2	67,2	57,2	37,6	32,5	26,3
<i>L. edodes</i> LPB 4	59,7	57,6	56,2	46,3	40,3
<i>L. edodes</i> LPB 5	75,5	71,6	62,8	59,5	52,7
<i>L. edodes</i> LPB 6	58,9	51,6	36,8	27,9	26,2
<i>L. edodes</i> LPB 10	53,9	48,6	37,2	32,4	29,8

Já contra *E. coli* as mesmas cepas apresentaram atividade até a diluição 1:10 sendo 47,3% para *L. edodes* LPB 1 e 49,3% para *L. edodes* LPB 5, conforme TABELA 2.

TABELA 2 – MIC DOS CALDOS FERMENTADOS DE *L. edodes* CONTRA *E. coli*

% Inibição contra <i>E. coli</i>	Diluições dos caldos fermentados (a partir de solução 5mg/mL)				
	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10
<i>L. edodes</i> LPB 1	66,5	63,1	60,3	52,4	47,3
<i>L. edodes</i> LPB 2	52,3	50,3	45,1	42,6	40,9
<i>L. edodes</i> LPB 4	59,2	57,3	48,2	45,1	39,8
<i>L. edodes</i> LPB 5	76,2	72,3	65,8	58,4	49,3
<i>L. edodes</i> LPB 6	66,7	51,7	45,8	34,2	30,7
<i>L. edodes</i> LPB 10	61,9	58,6	44,8	33,5	29,1

5.3 ELETROFORESE

Para a verificação da efetividade da separação das frações por ultrafiltração e para determinar a característica das frações com atividade antimicrobiana mais acentuada foi realizado um processo de eletroforese com redução, resultando na FIGURA 25a, na página seguinte.

Comparando com o padrão utilizado é possível ter idéia dos pesos moleculares que as bandas protéicas contidas nas amostras AM 2 (10-30KDa), AM 3 (30-50 KDa), AM 4 (50-100KDa), AM 5 (< 100 KDa) e Total (amostra do caldo não processado).

A fração AM 2 foi a que se mostrou com melhor atividade antimicrobiana e foi a que apresentou melhor separação de bandas ao longo de todo o processo. Mas ainda é possível ver no gel de eletroforese resultante desta fração que aparecem aproximadamente 7 bandas (vide FIGURA 25a), podendo ser uma delas (ou algumas delas) a responsável por esta atividade. Como as amostras dessas frações sofreram redução, essas bandas podem ser subunidades geradas por este processo. Isso fica mais claro na FIGURA 25b, onde é possível ver o padrão da amostra total sem redução. É possível notar o aparecimento de aproximadamente 4 bandas na faixa de 10 – 30 kDa indicando que algumas das faixas que aparecem na eletroforese com redução são subunidades de uma mesma proteína.

Para a determinação de banda responsável pela atividade antimicrobiana há necessidade de continuidade do processo de purificação dessa fração, para que fique apenas uma banda protéica ao final do processo.

É importante notar que a banda que aparece na faixa de 29KDa da fração AM 2 aparece nas outras frações superiores, mostrando a necessidade de se repetir o processo de filtração, ou mesmo a escolha de outro processo para melhor separação das frações. Isso pode ser um indício de que esta banda interfere na atividade antimicrobiana, uma vez que as outras frações testadas também apresentam atividade, mesmo que seja menos acentuada que a fração AM 2.

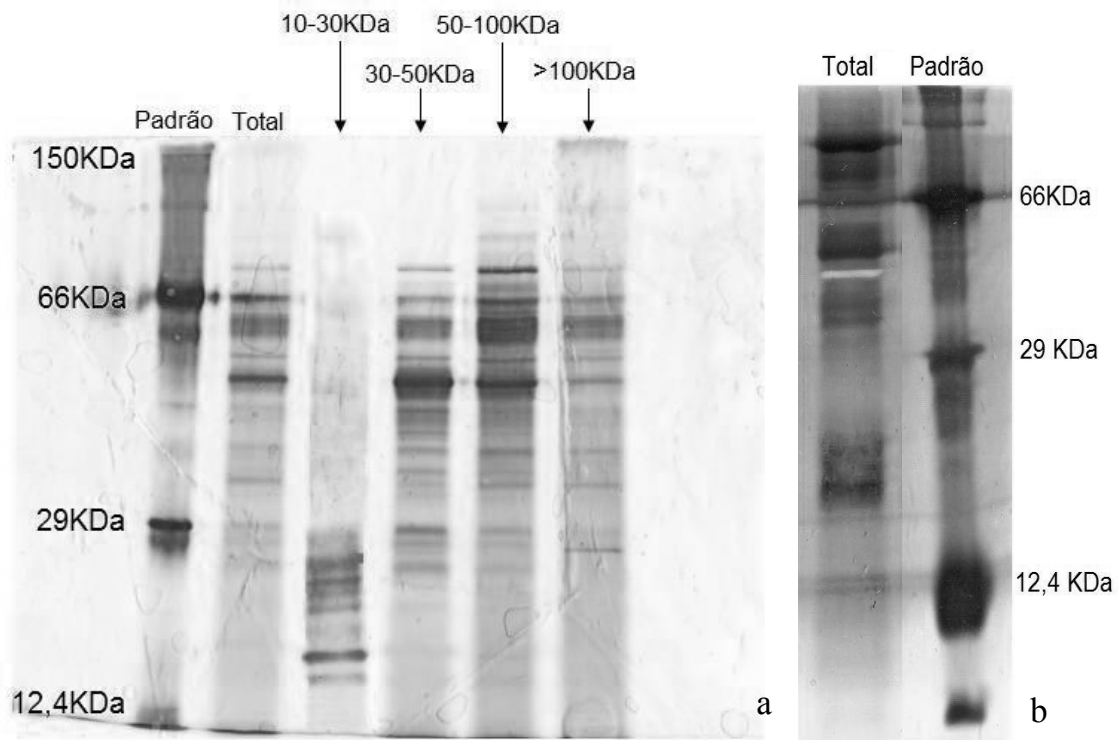
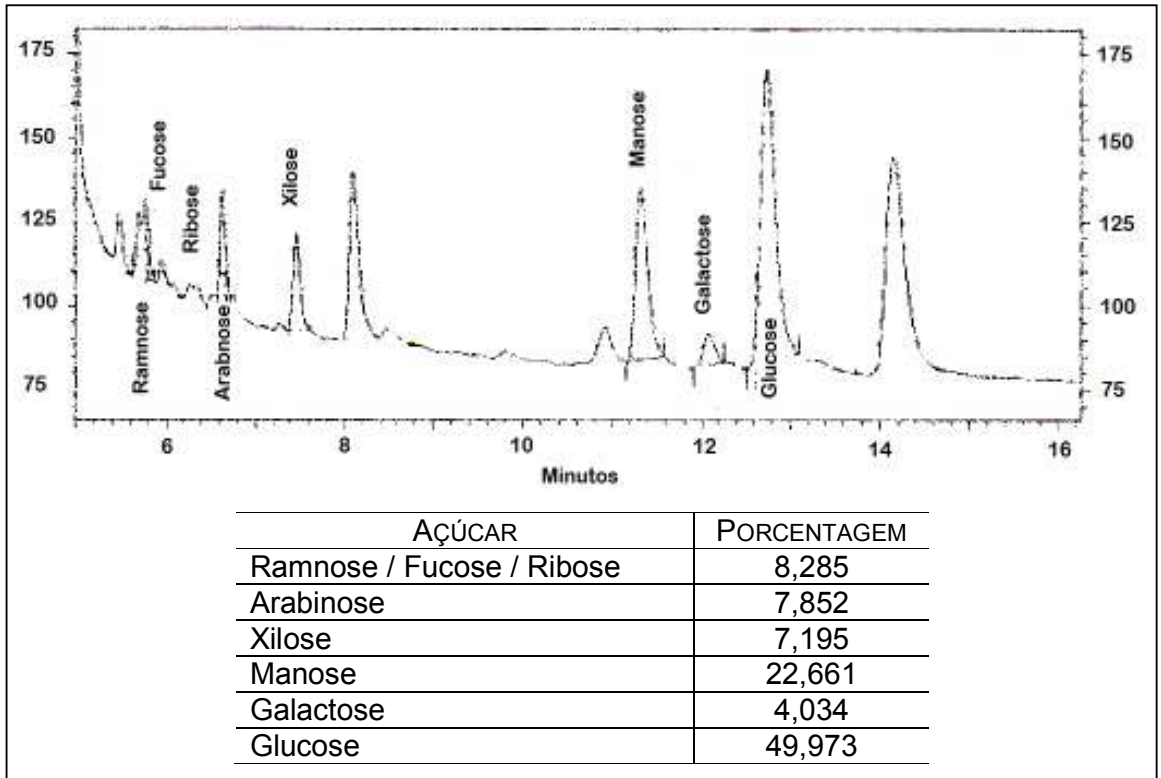


FIGURA 25a – ELETROFORESE DAS FRAÇÕES ULTRAFILTRADAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA (COM REDUÇÃO); FIGURA 25b - ELETROFORESE DA FRAÇÃO TOTAL (SEM REDUÇÃO)

5.4 ANÁLISES DOS CALDOS

5.4.1 Composição Monossacarídica

No QUADRO 7 (página seguinte) é possível ver o cromatograma e a relação dos tipos de açúcares e suas quantidades, dentro da quantidade total de açúcares da amostra AM 2 que é de 64 mg/g.



QUADRO 7 – AÇÚCARES DA AMOSTRA

5.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

De acordo com o espectro do RMN, a amostra de precipitado total apresenta picos indicando a presença de proteína, caracterizada pelas regiões de carbono carbonílico (150-180 ppm), carbonos com dupla ligação (125-140 ppm), carbono ligado a nitrogênio (35-45 ppm) e carbonos ligados a hidrogênios (CH₂) em cadeias laterais (15-30 ppm) (Ducatti, 2005). Além disso, também há a presença de carboidratos caracterizados pela região anomérica (90-110 ppm) e carbono do anel glicídico (60-80 ppm) (Gonçalves, 2005). Pela área dos picos é possível perceber que tanto proteínas como carboidratos estão muito presentes na amostra, conforme mostra a FIGURA 26.

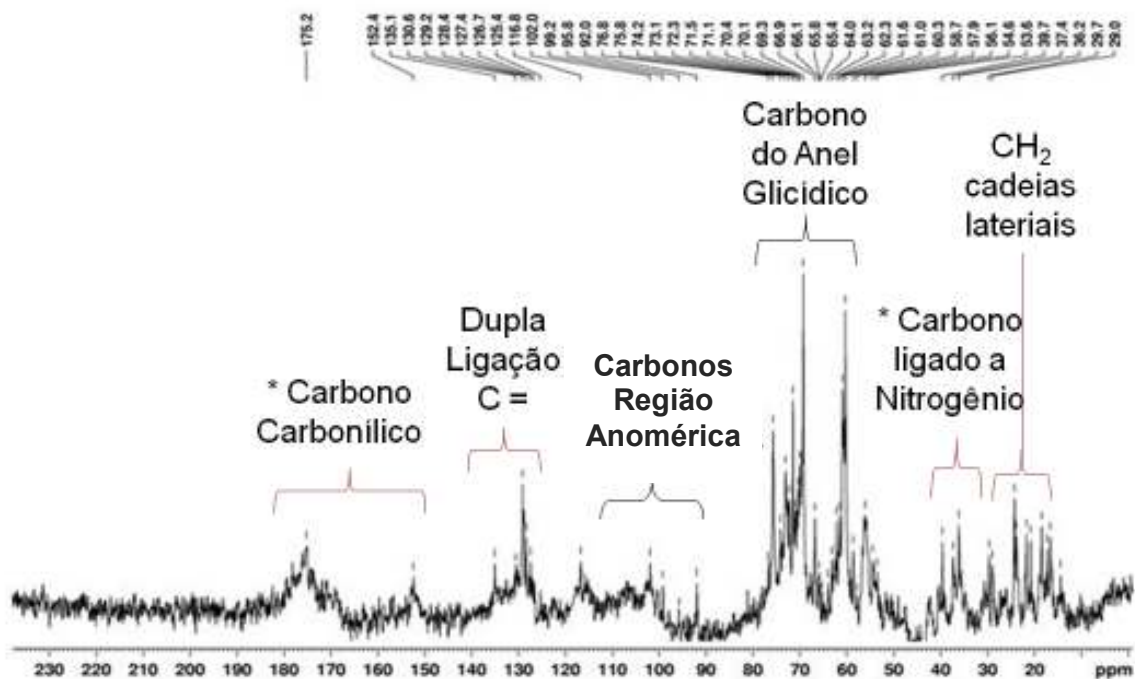


FIGURA 26 – PICOS DO RMN DA AMOSTRA DO PRECIPITADO TOTAL

Em comparação com a FIGURA 26 acima, a FIGURA 27 mostra o espectro da amostra AM 2 (na faixa de 10 – 30 KDa) onde é possível notar que as regiões características de carboidratos se sobressaem. Mostra que o processo de purificação do eficiente eliminando sinais presentes na amostra total, mas também leva a crer que a característica da molécula com a atividade antimicrobiana seja uma glicoproteína ou ainda uma proteoglicana, mediante a área dos picos característicos de carboidratos, restando apenas uma pequena área indicativa de proteína, neste caso da ligação carbono com nitrogênio e dos carbonos ligados a hidrogênios nas cadeias laterais.

Além da análise dos picos resultantes do RMN a quantidade total de açúcar (64mg/mL) em relação à quantidade total de proteína (12mg/mL, vide item 4.4.3 seguinte) mostra maior quantidade de carboidratos na amostra mesmo com a parcela de proteínas presente, reforçando a idéia de um caráter glicoprotéico da molécula.

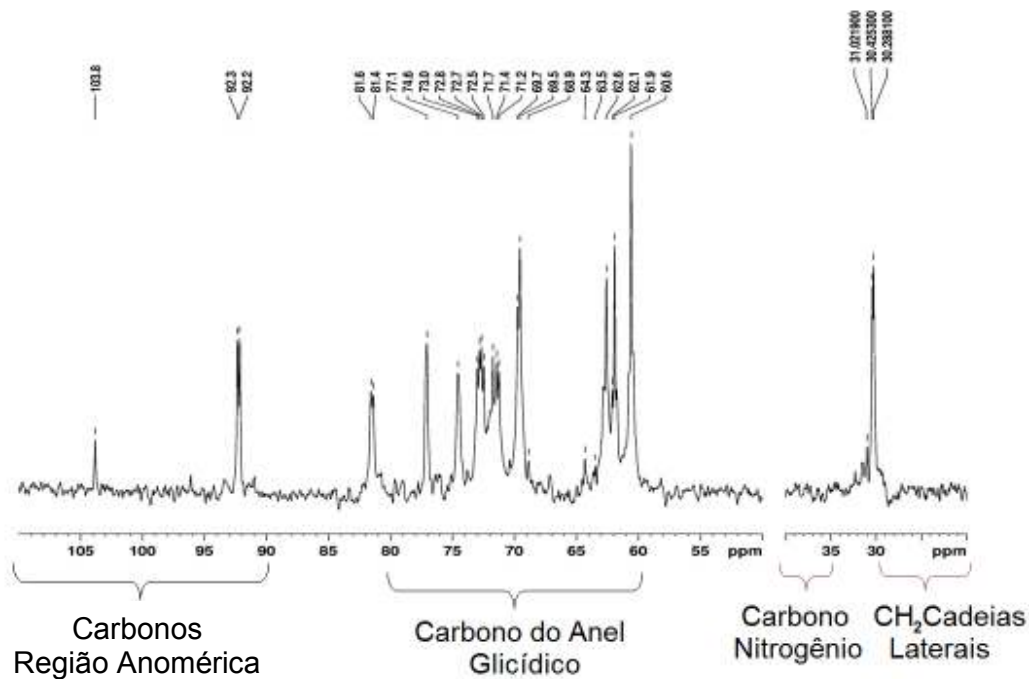


FIGURA 27 – PICOS DO RMN DA AMOSTRA DO PRECIPITADO ULTRAFILTRADO (10 – 30KDa)

4.4.3 Quantificação de proteína por Lowry

A TABELA 3 mostra a quantidade de proteína dos caldos ao final de 7, 14, 21, 28 e 35 dias de fermentação de todas as cepas de *L. edodes* deste estudo. A quantidade total de proteína da fração AM 2 (10-30 KDa) é de 12mg/g.

TABELA 3 – QUANTIDADE DE PROTEÍNA DOS CALDOS FERMENTADOS DE *L. edodes*

CEPAS	QUANTIDADE DE PROTEÍNA EM mg/mL (DURANTE OS TEMPOS DE FERMENTAÇÃO)				
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS	35 DIAS
<i>L. edodes</i> LPB 1	3,42	1,51	2,37	2,48	2,05
<i>L. edodes</i> LPB 2	3,26	3,47	6,51	6,12	2,84
<i>L. edodes</i> LPB 4	2,95	2,19	2,04	1,67	1,85
<i>L. edodes</i> LPB 5	6,98	6,52	5,57	5,12	3,06
<i>L. edodes</i> LPB 6	3,30	1,78	2,17	1,69	1,12
<i>L. edodes</i> LPB 10	3,90	1,69	2,01	2,40	1,02

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os cogumelos vêm sendo notados por sua ação antioxidante (Cheung *et al.*, 2003), ainda não se sabem os mecanismos de ação, variando as teorias de acordo com os radicais livres que são combatidos. Em geral, foram atribuídas propriedades antioxidantes a algumas proteínas (Tong *et al.*, 2000), aminoácidos como prolina e metionina (Amarowicz & Shahidi, 1997) e compostos fenólicos como as quinonas, que são encontradas em cogumelos (Kasuga *et al.*, 1995) podendo ser uma explicação para esta ação.

5.5.1 Prospecção de agentes anti radical superóxido

O radical superóxido tem uma notável facilidade em reagir. Apesar de ser menos reativo que o radical hidroxila, interage rapidamente com radicais específicos como o óxido nítrico, tornando-se altamente nocivo (Halliwell & Whiteman, 2004).

Os extratos das biomassas liofilizadas têm seu potencial medido pela cor da reação entre os mesmos e o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) aqui gerado juntamente com o nitroazul tetrazolim. Em todos os casos, os extratos menos concentrados (0,7 mg/mL) foram os mais efetivos.

Para os extratos das biomassas de *L. edodes* LPB 1, a fermentação de 7 dias apresentou o melhor resultado, 39% ($\pm 0,004$) de inibição do radical superóxido com diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade do controle, tendo uma queda após 14 dias e um pequeno aumento após 21 dias de fermentação como mostra a FIGURA 28.

Esses resultados são melhores dos que o obtido por Liu *et al.* (1997) para componente de comercialização Lentinan (polissacarídeo extraído do corpo de frutificação do *L. edodes*) que mostrou uma inibição de 3, 5 e 0,9% para concentrações respectivas de 5, 20 e 80 $\mu\text{g/mL}$. Apesar das concentrações aqui utilizadas serem maiores, o Lentinan aparenta declínio da atividade inibitória com o aumento da concentração.

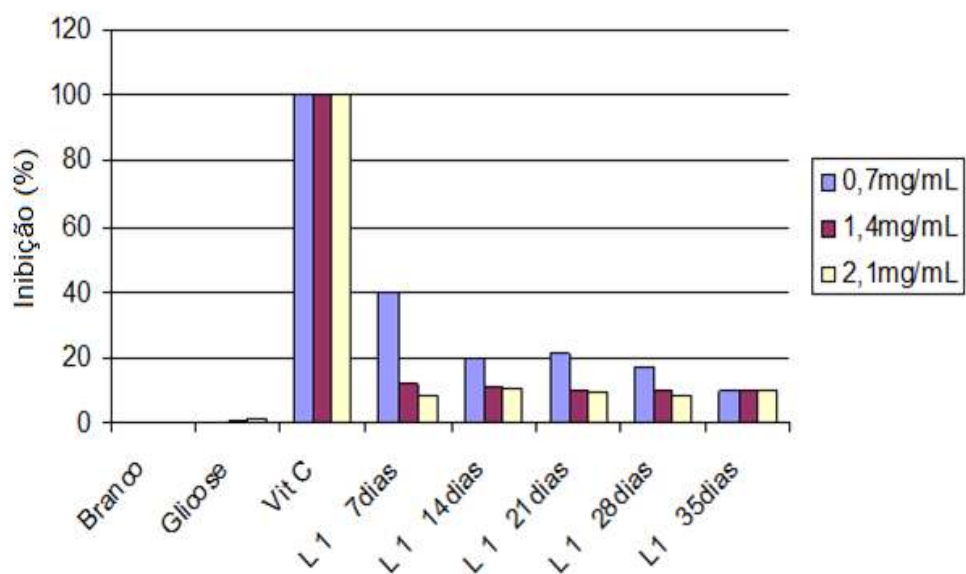


FIGURA 28 – INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 1

Os extratos de *L. edodes* LPB 10, mostrado na FIGURA 29, seguem um padrão diferente dos de LPB 1, obtendo melhor desempenho na menor concentração e após 35 dias de fermentação, tendo uma queda após 7 dias e em seguida melhora progressiva da atividade contra o radical $O_2^{\cdot-}$. Esses resultados reforçam os encontrados por Dubost, *et al.* (2007) que apesar de ter utilizado metodologia diferente obteve o shiitake como mais efetivo.

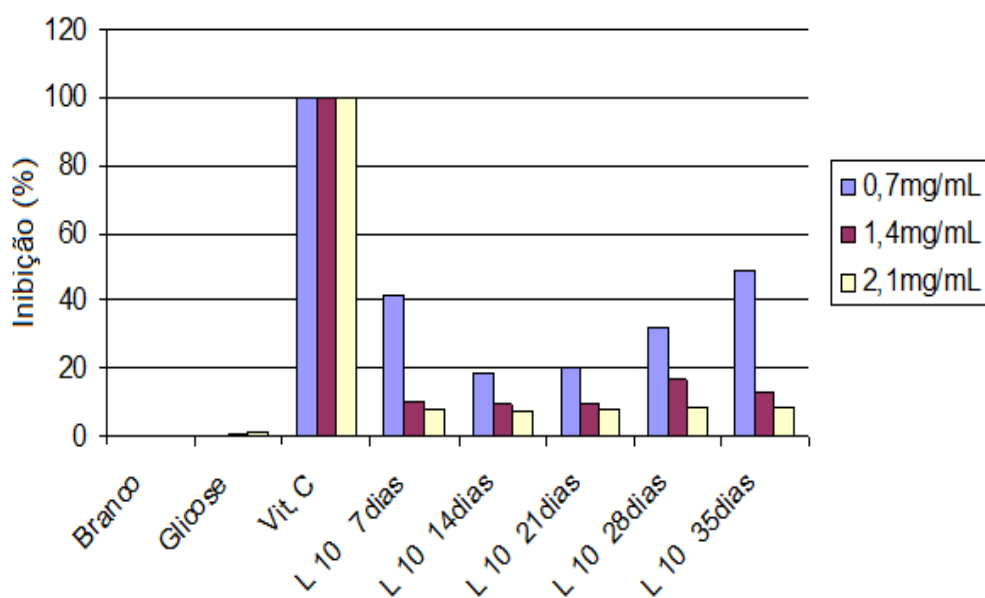


FIGURA 29 – INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 10

Os extratos de *L. edodes* LPB 4 tiveram comportamento diferente dos anteriores, tendo ação inibitória crescente até fermentação de 28 dias, como se observa pela FIGURA 30, com diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade do controle.

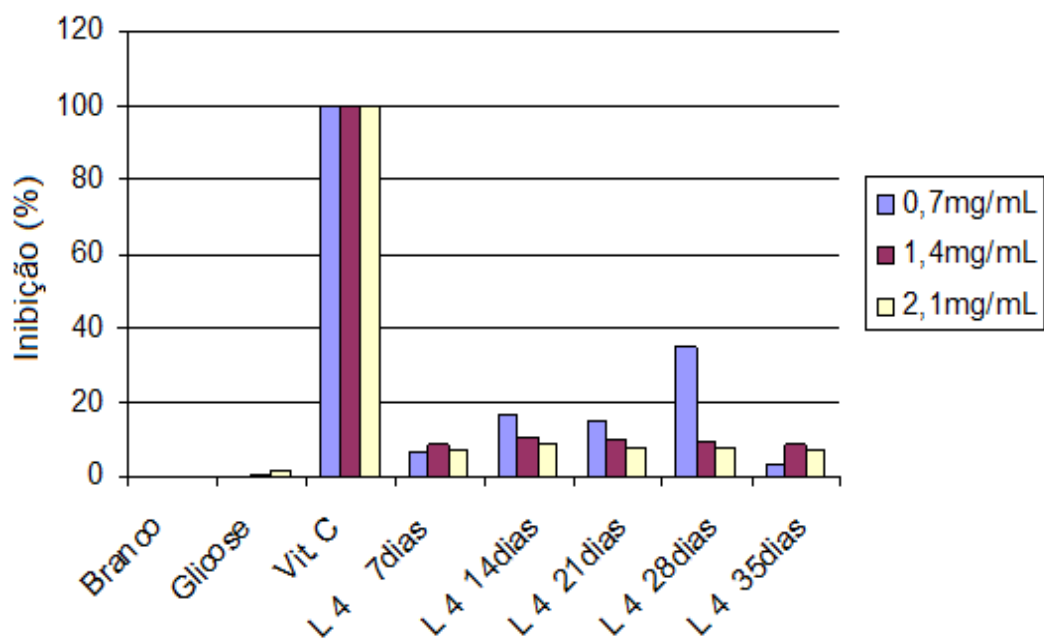


FIGURA 30 – INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\bullet-}$ PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 4

Os extratos de *L. edodes* LPB 6 obtiveram melhor desempenho em 21 dias de fermentação, diferentemente dos anteriores e tendo uma queda progressiva com o decorrer dos dias de fermentação, ver FIGURA 31.

Segundo Cheung *et al.* (2003) o extrato de *L. edodes* é o de maior atividade antioxidante, apresentando 75,9% de inibição, diferente do resultado aqui obtido.

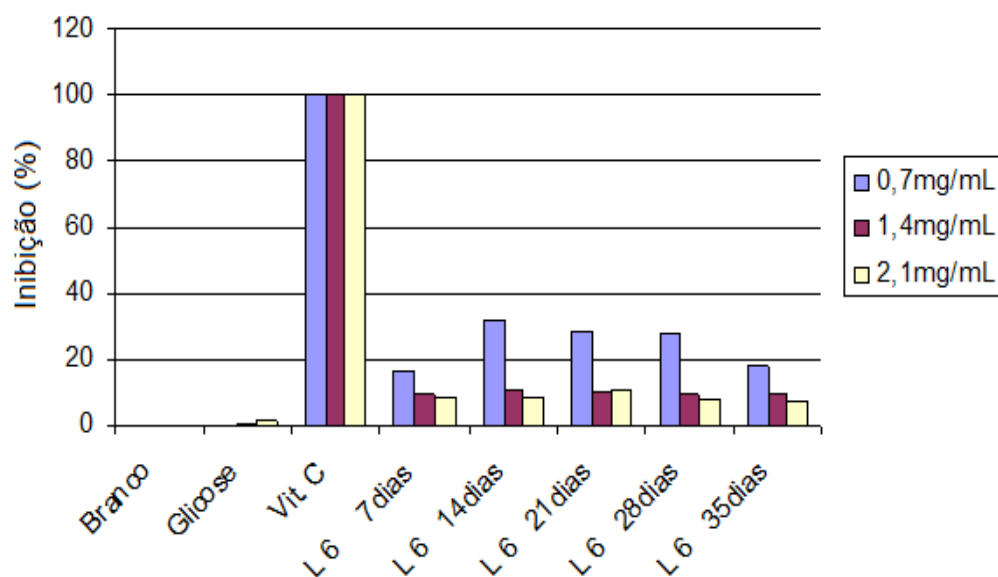


FIGURA 31 – INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\bullet-}$ PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 6

As FIGURAS 32 e 33 referem-se respectivamente aos extratos de *L. edodes* LPB 5 e LPB 2, que também obtiveram taxa de inibição satisfatória a partir de 21 dias de fermentação, sendo importante salientar que o extrato de LPB 5 teve melhor ação aos 35 dias de fermentação, o que mostra um metabolismo similar ao do LPB 10. Esse fator também parece ser o responsável pelos pequenos picos de atividade antioxidante ao decorrer da fermentação.

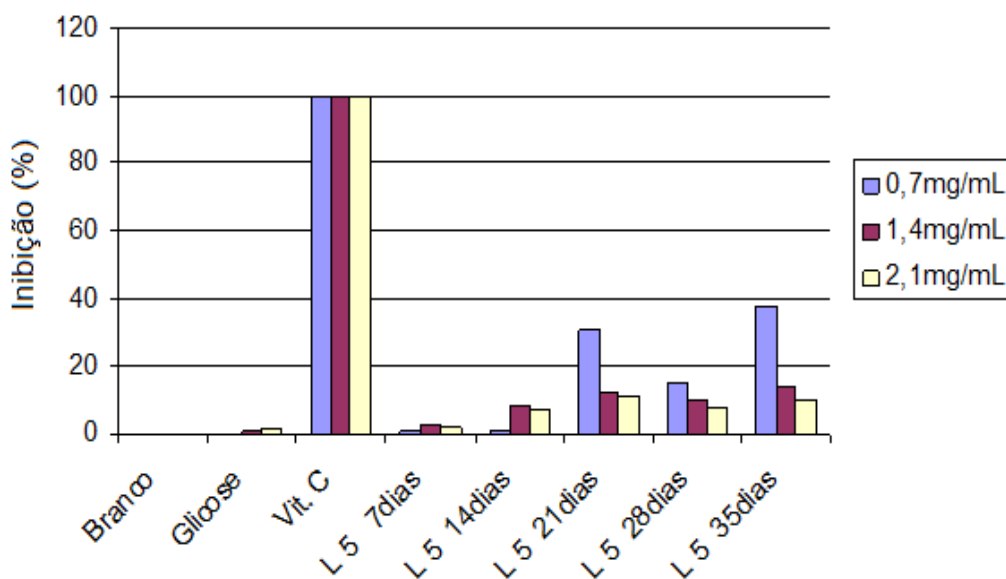


FIGURA 32 – INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\bullet-}$ PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 5

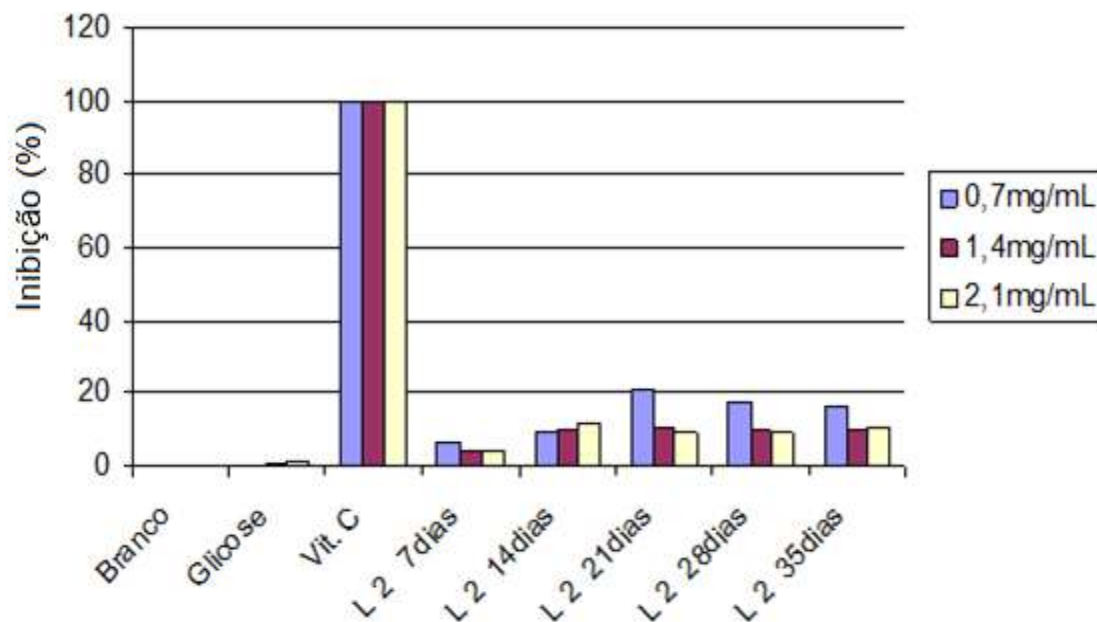


FIGURA 33 – INIBIÇÃO DO RADICAL $O_2^{\bullet -}$ PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 2

Não se tem elucidado o mecanismo de ação dos componentes com essa atividade, mas segundo Wang *et al.* (1996) compostos hidroxil-fenólicos podem reagir com radical superóxido pela transferência de um elétron ou por captação de hidrogênio, podendo ser esta a via de ação, assim como nas plantas, a redução da atividade dos radicais superóxido está relacionada com a quantidade de grupos hidroxil nos complexos de polissacarídeos-proteína Liu *et al.* (1997) possivelmente presentes nos extratos pela maceração do micélio. Essa ação também pode ser explicada pela interação de diferentes flavonóides presentes no micélio (Zhishen *et al.*, 1999) e conseqüentemente nos extratos.

Uma vantagem foi à continuidade da ação antioxidante apesar do processo prévio de liofilização, o que aponta esse processo como uma alternativa comercial.

5.5.2 Prospecção de agentes anti-radical hidroxil

Várias reações químicas fisiológicas podem vir a gerar o radical hidroxil (OH^*) dentre elas a chamada reação de Fenton, quando um íon ferro ou cobre reage com uma molécula de peróxido de hidrogênio, pela reação de Haber-Weiss, quando íons metálicos catalisam a reação entre peróxido de hidrogênio e superóxido (Schneider & Oliveira, 2004), podendo este radical, reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucléicos (Jenkins, 1988) não existindo sistema enzimático de defesa contra o mesmo (Pal, 1994).

É neste contexto que se destaca a importância dos resultados obtidos neste teste pelos extratos de *L. edodes*. Em todos os casos, aumento da concentração refletiu o aumento na taxa de inibição do radical hidroxil, observando os melhores resultados na faixa de 2,1 mg/mL, variando apenas o tempo de fermentação de acordo com a cepa em questão.

Para os extratos de *L. edodes* LPB 1, o melhor resultado ocorreu com 14 dias de fermentação, obtendo uma taxa de inibição de 108% ($\pm 0,02$) ($p < 0,01$), sendo mais efetivo que o controle positivo como mostra a FIGURA 34.

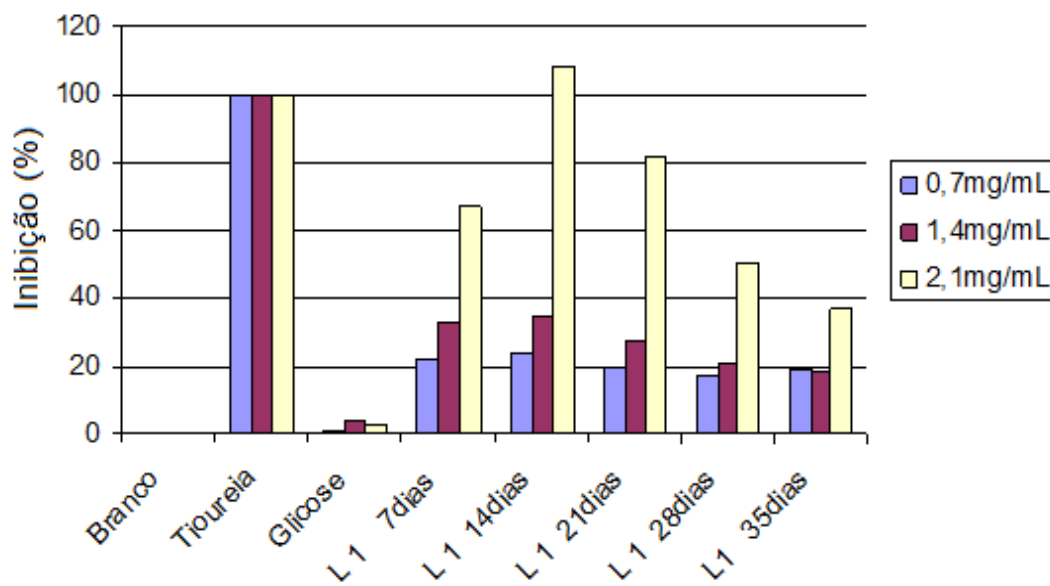


FIGURA 34 – INIBIÇÃO DO RADICAL OH^* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 1

De acordo com a FIGURA 35 em 21 dias de fermentação o extrato de *L. edodes* LPB 4 obteve o melhor resultado entre todos os extratos testados, ao provocar 154% ($\pm 0,009$) de taxa de inibição ($p < 0,01$). Observou-se o segundo melhor desempenho para extrato de *L. edodes* LPB 10 que atingiu aproximadamente 153% ($\pm 0,02$) de taxa de inibição ($p < 0,01$) em 7 dias de fermentação (vide FIGURA 36), ambos superiores ao controle positivo deste teste ao atingir 154% ($\pm 0,009$) de taxa de inibição. A diferença entre desempenho e o tempo de fermentação reforça a idéia de diferença de metabolismo entre as cepas.

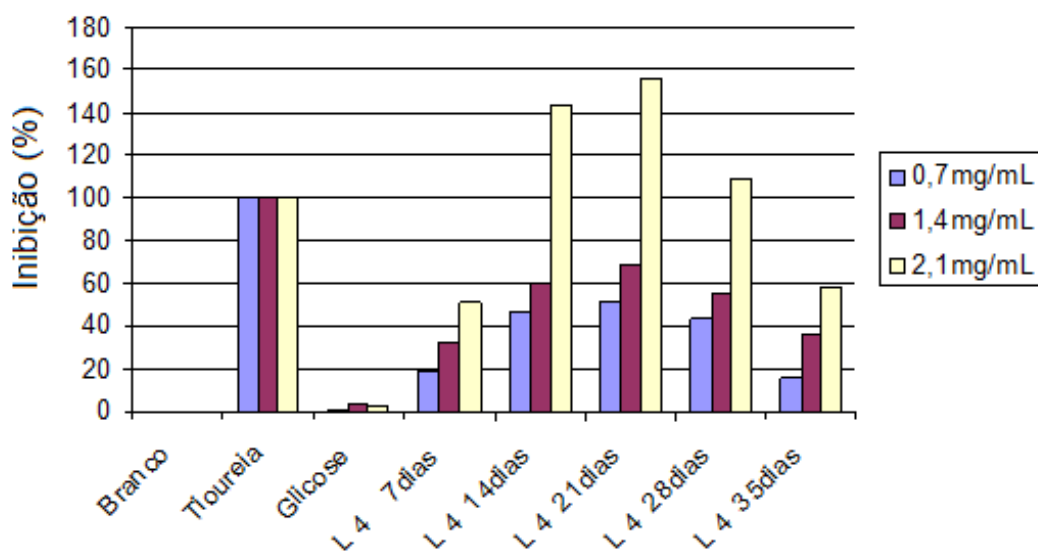


FIGURA 35 – INIBIÇÃO DO RADICAL OH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 4

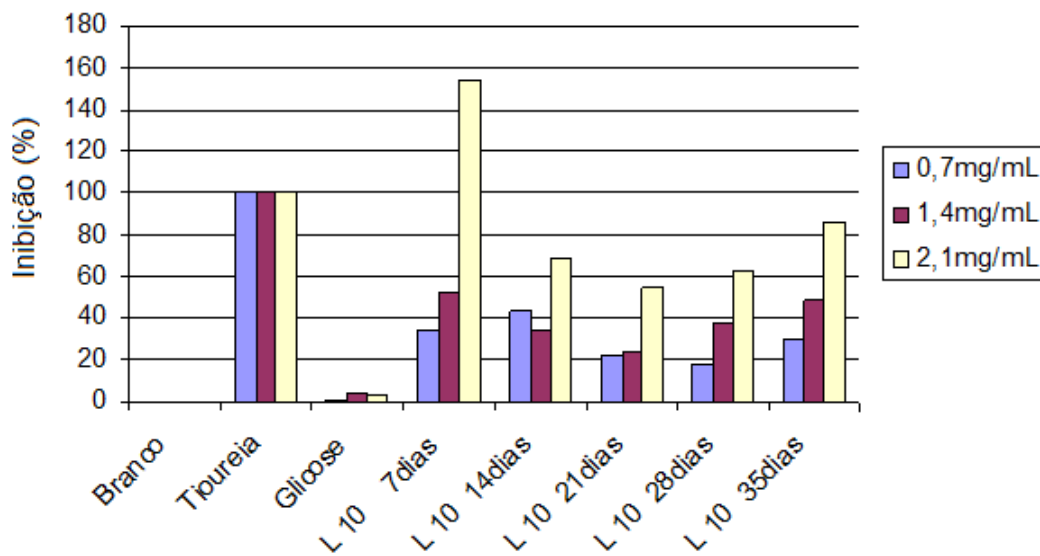


FIGURA 36 – INIBIÇÃO DO RADICAL OH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 10

Assim como o extrato de *L. edodes* LPB 4, o LPB 6 obteve seu melhor desempenho em 21 dias de fermentação, apresentando como taxa de inibição 131% ($\pm 0,05$) ($p < 0,01$), também ficando bem acima do valor obtido pelo controle como aparece na FIGURA 37 abaixo.

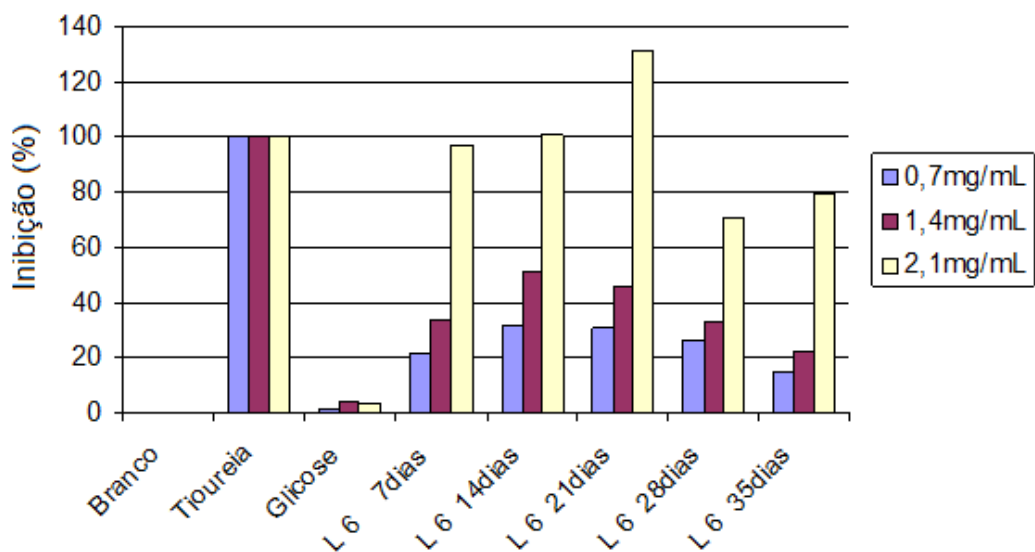


FIGURA 37 – INIBIÇÃO DO RADICAL OH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 6

Tanto no extrato de *L. edodes* LPB 5 (FIGURA 38) quando no LPB 2 (FIGURA 39) os melhores desempenhos foram obtidos em 35 dias de fermentação, obtendo valores bem próximos quanto a taxa de inibição do radical, sendo de 81% ($\pm 0,004$) para o primeiro e 89% ($\pm 0,002$) para o segundo apresentando diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade. Estes dados indicam que ambas as cepas possuem um metabolismo celular quanto a excreção e o consumo do componente responsável pela ação antioxidante contra o radical hidroxil.

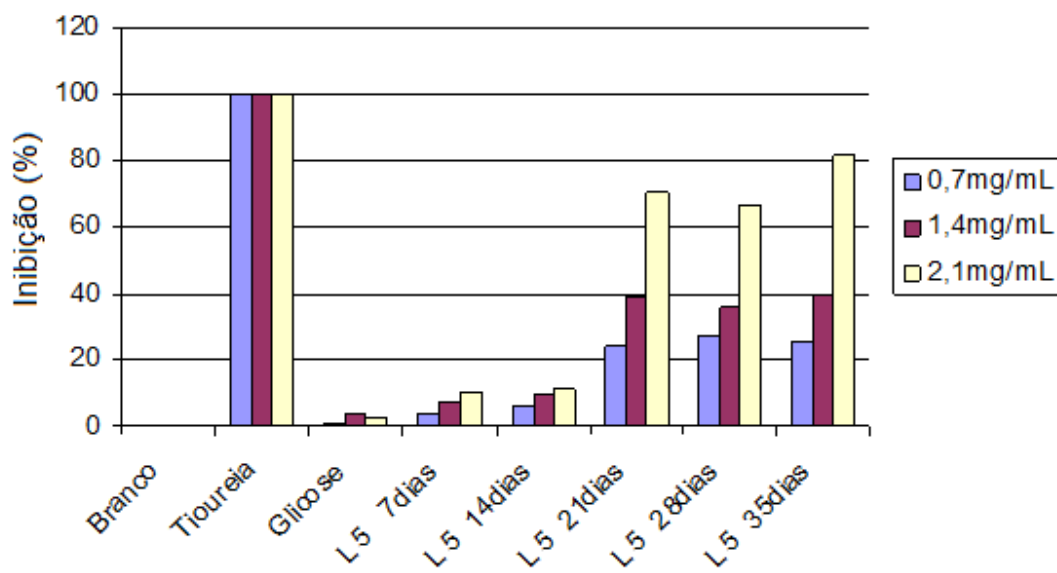


FIGURA 38 – INIBIÇÃO DO RADICAL OH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 5

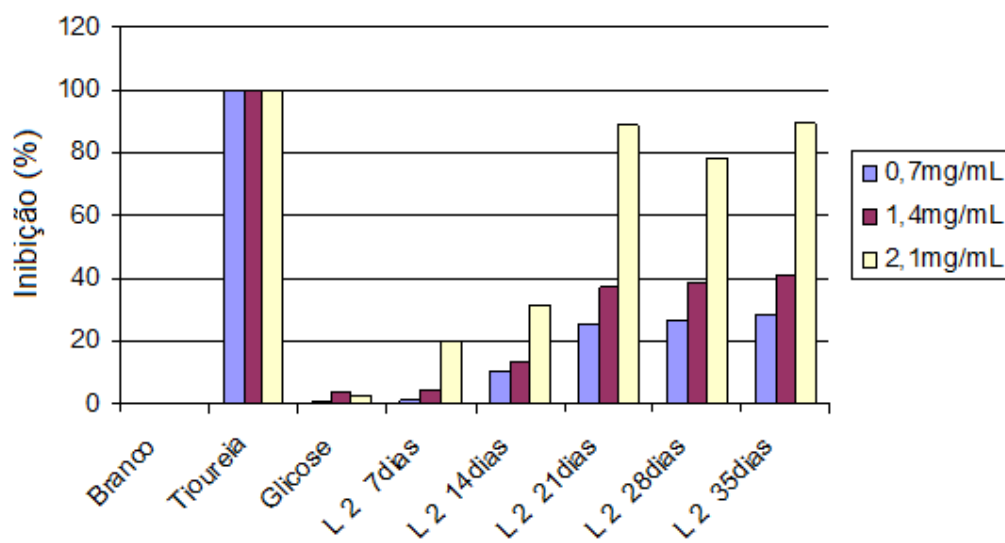


FIGURA 39 – INIBIÇÃO DO RADICAL OH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 2

5.5.3 Teste de 2,2 – diphenyl – 1 picrylhydrazyl (DPPH)

Atualmente, nas mais diversas pesquisas de ponta, o presente teste é considerado um dos mais utilizados para busca da avaliação da atividade antioxidante (Duh *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2002). O DPPH* é um radical livre

estável que aceita 1 elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética (Soares *et al.*, 1997). A reação entre as moléculas de DPPH* e antioxidantes resulta na mudança de coloração da solução que de roxa passa a ser amarelada (Elmastas *et al.*, 2007).

Neste teste, o desempenho dos extratos foram variados, mas muito positivos, mostrando eficiência em reagir com o radical DPPH.

De acordo com a FIGURA 40 é possível observar que o extrato etanólico da biomassa liofilizada de *L. edodes* LPB 1 tem melhor desempenho na inibição do radical gerado pelo DPPH* quando se encontra na concentração de 1,4 mg/mL. Além disso, o desempenho é similar entre as semanas de fermentação (para todas as concentrações), tendo um queda apenas na fermentação de 14 dias. Isso pode ter ocorrido pelo consumo do próprio basidiomiceto de algum componente com essa ação durante seu crescimento. As diferenças entre amostras foram significativas ao nível de 5% de probabilidade.

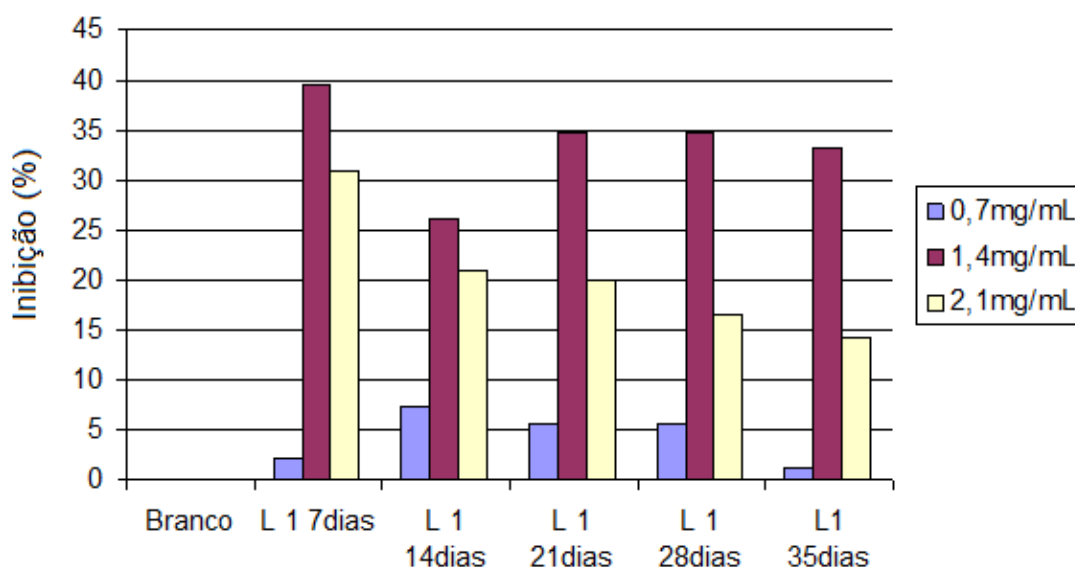


FIGURA 40 – TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 1

Semelhante aos resultados apresentados pelos extratos de *L. edodes* LPB 1, os extratos de *L. edodes* LPB 10 também são mais efetivos em sua maioria na concentração mediana, com exceção apenas do extrato de 35 dias que obteve maior desempenho em 2,1 mg/mL, como mostra a FIGURA 41. É possível perceber também que para *L. edodes* LPB 1 e LPB 10 as melhores taxas de inibição foram

após 7 dias de fermentação, sendo de 39% ($\pm 0,02$) para o primeiro e 38% ($\pm 0,01$) para o segundo ($0,01 \leq p < 0,05$).

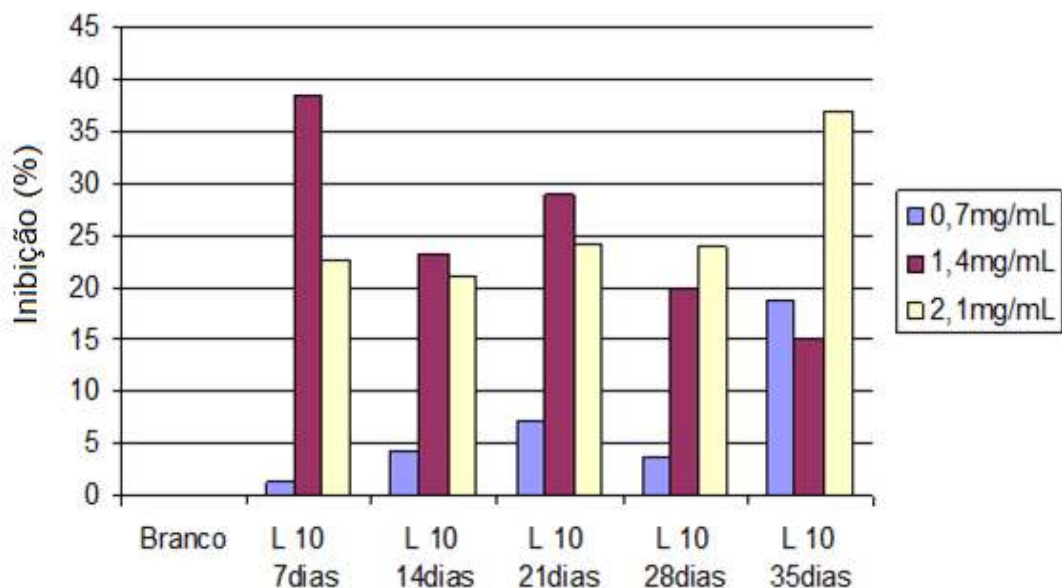


FIGURA 41 – TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 10

Nas figuras que se seguem é possível perceber que a ação antioxidante torna-se mais destacada à medida em que a concentração do extrato aumenta, sendo nestes casos a 2,1mg/mL. Para o *L. edodes* LPB 4, o melhor resultado foi em 21 dias de cultivo 26% ($\pm 0,006$) ($0,01 \leq p < 0,05$) conforme aparece na FIGURA 42.

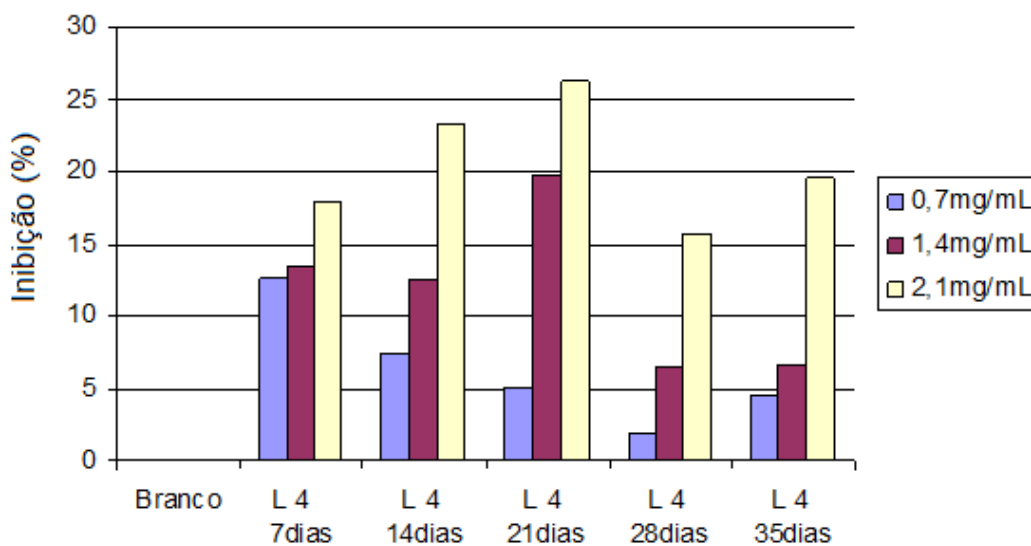


FIGURA 42 – TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 4

Já para os extratos de *L. edodes* LPB 6 e LPB 5 a maior taxa de inibição foi aos 35 dias de fermentação, obtendo uma inibição de 34% ($\pm 0,009$) ($p < 0,01$), vide FIGURA 43 e 32% ($\pm 0,01$) ($0,01 \leq p < 0,05$), vide FIGURA 44.

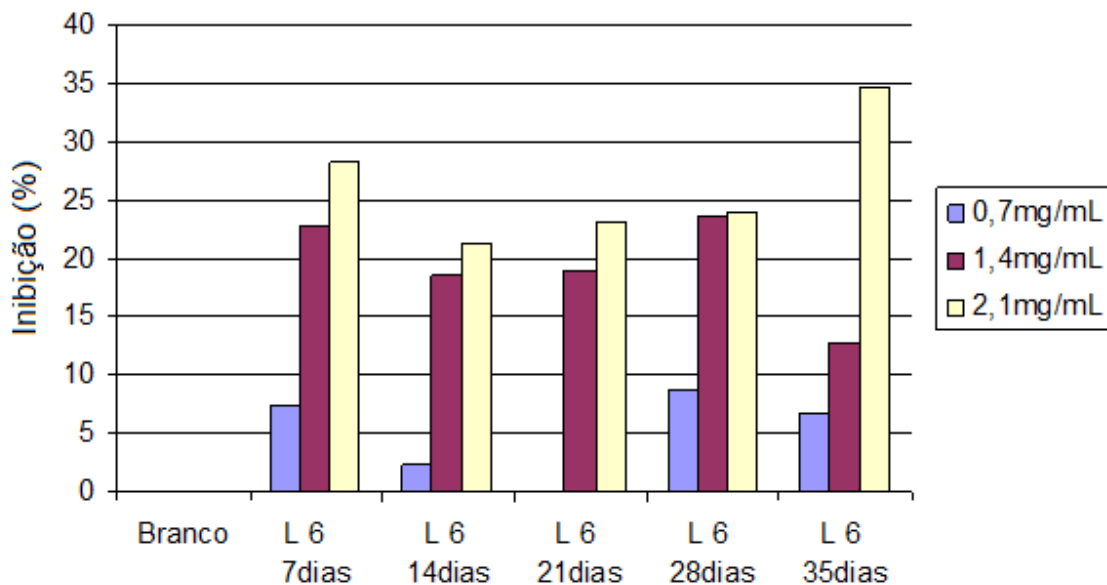


FIGURA 43 – TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 6

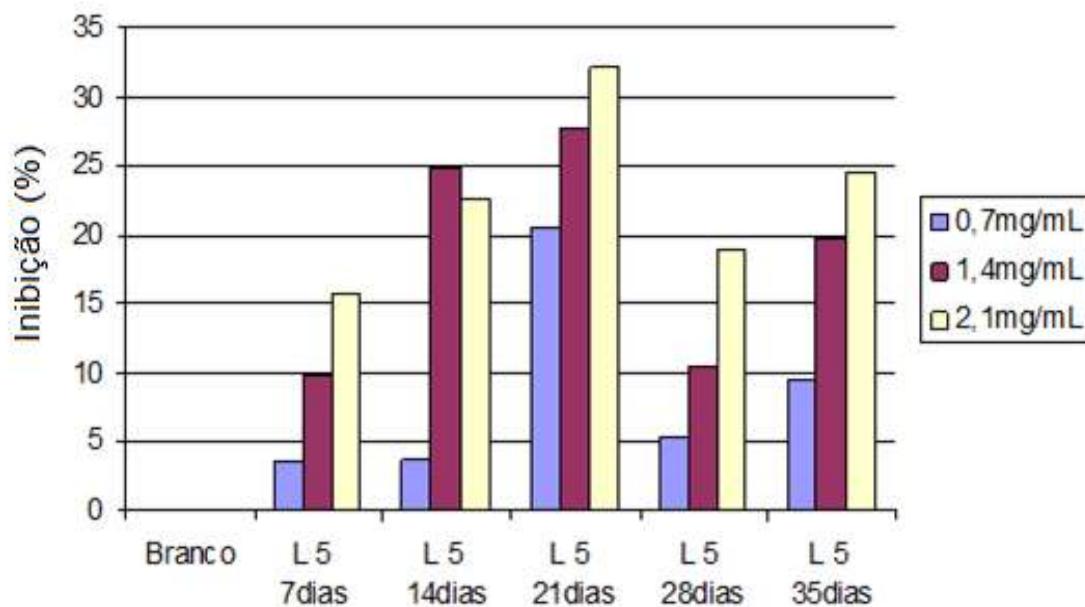


FIGURA 44 – TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 5

Dentre todas as amostras os melhores resultados foram os obtidos pelos extratos de *L. edodes* LPB 2, principalmente a 2,1 mg/mL e em 28 dias de fermentação, chegando a atingir uma inibição de 42% ($\pm 0,06$) de inibição ($0,01 \leq p < 0,05$), conforme a FIGURA 45.

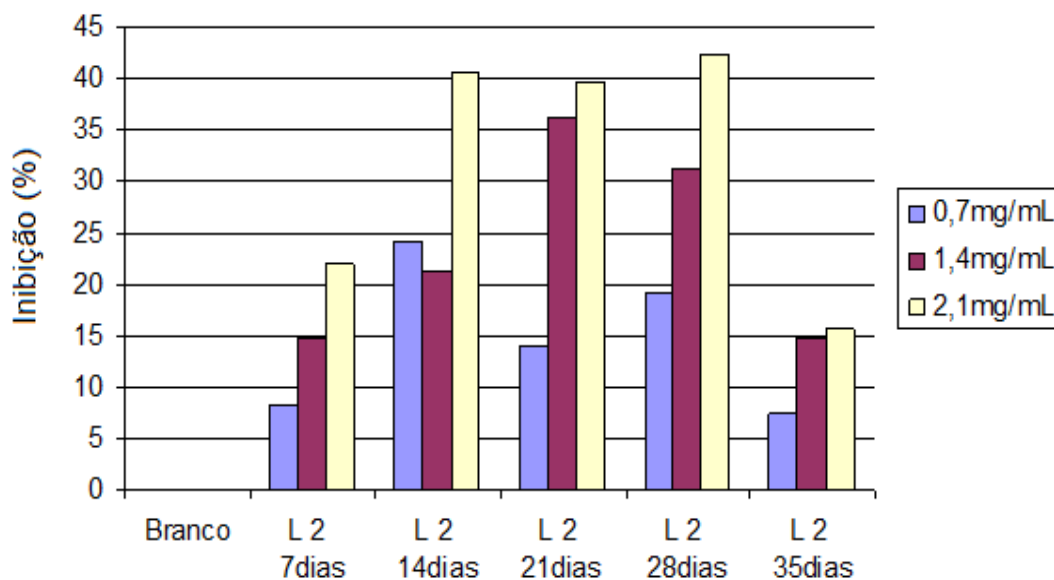


FIGURA 45 – TAXAS DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH* PELOS EXTRATOS DE *L. edodes* LPB 2

Os resultados foram significativos para este teste, principalmente por tratarem-se de compostos extraídos de shiitake, mostrando-se uma fonte natural de antioxidante. Estes extratos também se mostraram menos eficientes quando comparados a outros cogumelos como *Pleurotus ostreatus* e o *Agaricus bisporus* com taxas de 81% e 77% de inibição do DPPH* (Elmastas *et al.*, 2007).

Compostos isolados de cogumelos, incluindo o shiitake podem vir a substituir os compostos comerciais atualmente utilizados como aditivos alimentares e em cosméticos como o hidroxianisol butilado (BHA) e o α -tocoferol que apesar de chegarem a atingir uma taxa de inibição do DPPH* de aproximadamente 97% e 95% respectivamente (Yen & Wu, 1993) apresentam toxicidade tendo seu uso com quantidade limitada (Yang *et al.*, 2002; Mau *et al.*, 2004).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados aqui obtidos, pode-se observar o potencial dos caldos provenientes da fermentação submersa do *L. edodes* como antimicrobianos frente a diversos patógenos bacterianos de importância para a saúde humana principalmente porque o espectro de antibióticos comercialmente utilizados vem se tornando obsoleto em períodos curtos de tempo em relação à resistência adquirida pelos microrganismos.

Um destaque especial deve ser dado ao *L. edodes* LPB 5, pelo desempenho de seus extratos fermentados na atividade antimicrobiana. Há um forte indício que o componente responsável por essa ação seja uma glicoproteína ou proteoglicana de peso molecular compreendido entre 13 e 29 KDa e que tem uma ação bacteriostática, com um inibição de aproximadamente 90% contra as bactéria Gram positiva e negativa utilizadas.

Outros estudos mais específicos deste produto devem ser realizados, para a identificação da natureza desta molécula.

Além disso, o poder antioxidante dos extratos alcoólicos permite vislumbrar uma nova via no combate aos radicais livres, podendo ser aplicados não só para o auxílio em processos fisiopatológicos como também na indústria cosmética, alimentícia e de conservantes.

A novidade que surgiu neste estudo em relação a atividade antioxidante é a possibilidade de liofilizar a biomassa (antes da extração), com pouca perda desta ação (em relação ao que se tem descrito na literatura sobre a atividade da biomassa não processada). Isso permite a comercialização do produto com maior vida de prateleira, uma vez que a água é totalmente retirada pelo processo de liofilização e conserva as características da biomassa, tanto pela atividade biológica como pela qualidade nutricional deste cogumelo, podendo esta ser uma alternativa de produto nutracêutico, ou seja, qualquer substância considerada alimento ou parte de alimento que propicie benefícios médicos ou para a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças, como é o caso da biomassa do shiitake.

7 PERSPECTIVAS

Estudos de metodologia de purificação e identificação completa do antimicrobiano devem ser realizados, para que futuramente possam ser elucidados os mecanismos de ação, farmacocinética e farmacodinâmica desta molécula. Isso permitirá posteriormente a criação de novas formas farmacêuticas que fiquem disponíveis à comercialização. Também poderá vir a originar um produto para uso veterinário ou mesmo para uso em plantas, no caso da agricultura.

Com o surgimento do novo processo de produção, estudos de otimização da produção em cultivo submerso devem ser realizados, analisando a interferências dos fatores relacionados ao cultivo com a atividade antimicrobiana dos caldos (em consequência da produção da molécula responsável por esta atividade).

Pesquisas futuras devem verificar a ação antioxidante em outras frações extraídas por solutos com diferentes polaridades na biomassa liofilizada.

O processo de secagem de biomassa deve ser estudado como um importante fator na possível interferência na atividade antioxidante da mesma.

REFERÊNCIAS

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v 58, p. 355–359, 1997.

ANKE, T.; **Fungal biotechnology**; London, Editora Chapman & Hall, 1997.

AKAMATSU, S. *et al.* "Hepatoprotective Effect of Extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine induced liver injury, **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 1957-1960, 2004.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B.; FURLANETO, M. C.; **Microbiologia Básica**, São Paulo, Editora Atheneu, 1999.

BENDER S, *et al.* The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v 3, p.118, 2001.

BERGHE, V.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants, **Method for Plant Biochemistry**, v 6, p. 47–68, 1991.

BIANCO, C. Basidiomycetes in relation to antibiosis. II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. **Bacterial and Viral Immunology**, v. 75, p.267-274, 1981.

BONONI, V.L.R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S.F.B.; **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Editora Ícone: São Paulo, p. 206; 1995.

BONONI, V.L.R.; RODRIGUES, B.M.; **Cogumelos Comestíveis**. Instituto de Botânica: São Paulo, p. 16; 1983.

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

CAMPBELL, A. C.; RACJAN M. The commercial exploration of the white rot fungus *Lentinula edodes* (Shiitake). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v 43, p. 101-107, 1999.

CARON, C. R. **Avaliação de processo para isolamento de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus paracasei* em fermentação submersa**. Dissertação de mestrado, Setor de Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CHANG, L.W.; YEN, W.J.; HUANG, S.C.; DUH, P.D. Antioxidant activity of sesame coat. **Food Chemistry** v 78, p. 347–354, 2002.

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

CHANG, S. T.; MILES, P. G.; **Edible mushrooms and their cultivation**; ed. 1^a, editora CRC Press: Boca Ration, Florida; cap. 11, p. 189 – 190, 2000.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. C. E. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v 81, p. 249–255, 2003.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA F. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (An Edible Mushroom). **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

COLETTI, B. Basidiomiceli in relazione all'antibiosi nota II. Attivita'antibiotica dei miceli e dei liquidi di coltura. **Giorn. Batt. Virol. Immun.**, v 74, p. 267-274, 1981.

CRISAN, E. V.; SANDS, A.; **Nutritional value**. In: Chang, S. T.; Haveyes, W. A. The biology and cultivation of edible mushrooms. New York: Academic Press, 1978.

CUI, F. J.; LI, Y.; XU, Z. H. ; XU, H. Y. ; SUN, K. ; TAO, W. Y. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exopolymer by *Grifola frondosa* GF 9801 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v 97, p. 1209-1216, 2006.

DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiology**, v. 33, 2002.

DI PIERO, R.M. *et al.* Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v 37, p.176-180, 2006.

DUBOST, N. J. *et al.*, Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated, **Food Chemistry**, 2007.

DUCATTI, D. R. B., **Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: Estudos de ressonância magnética nuclear**. Dissertação de mestrado (Setor de Ciências biológicas) - Universidade Federal do Paraná, 2005.

DUH, P.D.; TU, Y.Y.; YEN, G.C. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Lebnesmittel-Wissenschaft und-Technologie** v 32, p. 269–277, 1999.

EBINA T. Antitumor effects of intratumoral injection of Basidiomycetes preparations, **Gan To Kagaku Ryoho**, Japão, v 11, p. 1654-6, 2005.

EIRA, F. C. *et al.*; Produção de shiitake em substratos à base de sabugo de milho. **Revista Brasileira e Milho e Sorgo**, Brasil, v 4, n 2, p. 141 – 148, 2005.

ELMASTAS, M. *et al.*; Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis** v 20, p. 337–345, 2007.

FAN, L. **Produção de exopolissacarídeos de *Agaricus blazei* e teste antitumorais**. Tese de doutorado, Setor de Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FANG, Q. H.; TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 1375-1379. 2002.

FARIA, R. O. **Avaliação do potencial biotecnológico de *Lentinula boryana* (BERK & MONT) Pegler**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FRIEL, M.T. AND MCLOUGHLIN, A.J. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. **Biotechnology Letters**, v 22, p. 351-354. 2000.

GERN; J. C. **Production and characterization of extra-cellular polysaccharide from submerged fermentation by *Agaricus brasiliensis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GRACHER, A. H. P.; **Caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação de *Ganoderma multiplicatum***. Tese de mestrado (Setor de Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná. 2005.

GONÇALVES, A. G. **Modificações químicas em oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas**. Tese de doutorado (Setor de Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. 2005.

GOODMAN, GILMAN; **As bases farmacológicas da terapêutica**; ed 11^a, editora Mcgraw Hill: Nova Yorque, 2003.

GORDON M; *et. al* A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV-positive patients: a phase I/II trial. **J Med.** AIDS Activities Division, San Francisco General Hospital, CA, USA., v 29, p. 305-30, 1998.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v 142, p. 231–255, 2004.

HASSEGAWA, R. H.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes **Electronic Journal of Biotechnology**, 2005.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v 17, p. 71–74. 2001.

HERRMANN, H. Cortinellin, eine antibiotisch wirksame substanz aus *Cortinellus shiitake*. **Die Natur. Wissenschaften**, v 49, p. 542, 1962.

HIRASAWA M; SHOUJI N; NETA T; FUKUSHIMA K; TAKADA K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (*Shiitake*, an edible mushroom). **Inter. J. Antimic. Agen.**, v 11, p. 151-157. 1999.

HOCKING, A. D.; **Fungi and food spoilage**;, Editora Blackie: Londres, ed. 2, 1997.

ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Antibacterial Activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 32, p. 206-210. 2001.

ITO, T., **Cultivation of *Lentinus edodes*, in the biology and cultivation of edible mushrooms.** Chang, S. T. And Hayes, W. A., Eds Academic Press: Nova Iorque, 1978.

JENKINS R. R. Free radical chemistry relationship to exercise. **Sports Med**, v 5, 156-70, 1988.

JONG S. C.; BIRMINGHAM J.M. Medicinal and therapeutic value of the Shiitake mushroom. Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, **Adv Appl Microbiol**, v 39, p. 153–184, 1993.

JOO, J. H.; *et al.* Optimization of submerged culture conditions for exopolysaccharide production in *Sarcodon aspratus* (Berk) **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v 20, p. 767–773, 2004.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D.& WASHINGTON, J. A. **Antimicrobial susceptibility test.** In- Dilution and Disk Diffusion Methods. Murray *et al.* MAS Press: Washington DC, p. 1526-1543. 1999.

KABIR, Y.; KIMURA, S.; TAMURA, T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, 34, p. 433-438, 1987.

KADA *et al.* **Environmental desmutagens and antimutagens.** In: E.J. Klekowski, Editor, *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, p. 137–151. 1982.

KASUGA, A.; AOYAGI, Y.; SUGAHARA, T. Antioxidant activity of fungus *Suillus bovinus* (L:Fr.) O. Kuntze. **Journal of Food Science**, v 60, p. 1113–1115, 1995.

KAWAGOE, M. *et al.* Submerged culture of *Agaricus blazei* mycelium in a bubble column fermentor. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v 37, p.1056-1061, 2004.

KIM, H.; KACEW, S.; LEE, B.; In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis miller*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, v 20, p. 1637-40, 1999.

KIRK, P. M. *et al.*; **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, ed 9^a, editor CABI Publishing: Reino Unido; p. 610-613, 2001.

KITZBERGER, C. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v 80, p. 631–638. 2007

KOGA, J. O.; YASUHIRO, H.; HAJIME. **Inhibitor of herpesvirus absorption** Int. A61K 031/70, U. S. n. 5,283,239, 1994.

KOMEMUSHI, S.; YAMAMOTO, Y.; FUJITA, T. Antimicrobial substance by *Lentinus edodes*. **J. Antibact. Antifung. Agents**, v 23, p. 81-86. 1995.

_____. _____. _____. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. **J. Antibact. Antifung. Agents**, v 24, p. 21-25. 1996.

KURODA *et al.*, Antimutagenicity in cultured mammalian cells, **Mutation Research** v. 267, p. 201–209, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, n 5259, p. 680-685, August 1970.

LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUM, J. W. Submerged culture conditions for production of micelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial**, v. 35, p. 369-376, 2004.

LIMA *et al.*, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylant agents *in vivo*, **Mutation Research** p. 23–32. 2001.

LIU, F.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T.; Free radical Scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts; **Life Sciences**, v. 60; p. 763-771, 1997.

LOW, D.; SCHELD, W. M.; Strategies for stemming the tide of antimicrobial resistance. **Jama**; n 279, p 394-395, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v 193, p. 265-275, 1951.

MAEDA, Y. Y.; WATANABE, S. T.; CHIHARA, C.; ROKUTANDA, M. Denaturation and renaturation of b-1,6; 1,3-Glucan, Lentinan, associated with expression of T-Cellmediated Responses. **Cancer Research**, v. 48, p. 671-675, 1988.

MANZI, P.; PIZZOFRATTO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, 68, 315–318. 2000.

MARZZOCO, A.; TORRES, B., B.; Bioquímica básica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, ed. 2. 1999.

MAU, J.L.; CHANG, C.N.; HUANG, S.J.; CHEN, C.C. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculanta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. **Food Chemistry** v 87, p. 111–118, 2004.

MAU, J. L.; CHAO, G-R.; WU, K-T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 5461–5467. 2001.

MAU, J. L.; LIN, H. C.; SONG, S. F.; Antioxidant properties of several specialty mushrooms; **Food Research International**, v. 35; p. 519-526; 2002.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J.; Antioiidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*; **Food Chemistry**, v. 93, p. 641-649, 2005.

MAZIERO, R.; **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp.** Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo. 1990.

METHACANON, P.; MADLA, S.; KIRTIKARA, K.; PRASITSIL, M. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. **Carbohydrate Polymers**, v 60, p.199-203, 2005.

MIYAJI, C.K.; POERSCH, A.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; CÓLUS, I.M.S. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEP-2 cells. **Toxicology in Vitro**, v 20, p. 1555-1559, 2006.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 47, n. 4, p. 707-714, 1999.

MOREIRA, L. B.; Princípios para uso racional de antibióticos: simpósio de atualização em antibióticos; **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, n 48, p 118-120, 2004.

NGAI, P.H.K; NG, T.B. Lentin, a novel and potent antifungal protein from ahitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. **Life Sciences**. v.73, p. 3363-3374, 2003.

NIKAIDO, H. Prevention of drugs access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science** 264: 382 – 388. 1994.

NIKI, E.; SHIMASKI, H.; MINO, M.; Antioxidantism-free radical and biological defense. **Gakkai Syuppan Center**: Tóquio, 1994.

OOI, V.E.C. Medicinally important fungi, **Mushroom Sci**. p. 41–51, 2000.

PACKER, L.; **Principal Oxidants and antioxidants**, Editora Academic Press: San Diego, 1999.

PAL Y. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, v 74, 139-62, 1994.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; Microbiologia: conceitos e aplicações. ed 2. v 1. Editora Makron Books, São Paulo, 1997.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível Shiitake (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fungicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. Tese de doutorados, Setor de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation. **Dubuque: Kendall; Hunt Publ.**, p. 217, 1990.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S.; **Biologia Vegetal**; Fungos, cap 12; ed. 5ª, Editora Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, p 192-214. 1996.

ROSA, J. F.; Estado actual de la terapeutica antioxidante: oxidacion y antioxidacion; **Rev. Fed. Argentina de Cardiologia**, 27, p. 496-498; 1998.

ROYSE, D.J., **Yield stimulation of shiitake by millet supplementation of wood-chip substrate**. In: Royse, D.J. (Ed.), Mushroom Biology and Mushroom Products, Proceedings of the 2nd International Conference, University Park, Pennsylvania, p. 277–283, 1996.

RUBEL, R. **Produção de Compostos Bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação no estado sólido: Avaliação da ação anti-tumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. Tese de doutorado, Setor de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SARKAR S, KOGA J, WHITLEY RJ, CHATTERJEE S. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. **Antiviral Res.** v 20, p. 293–303., 1993.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, 2004.

SHIDA , M.; HARYU, K.; MATSUDA, K. On the heterogalactan from the fruit body of *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 41, p. 211-218, 1975.

SHIMADA, Y.; MORITA, T.; SUGIYAMA, K. Dietary eritadenine and ethanolamine depress fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanolamine in rats. **Journal of Nutrition**, 3, 758–765, 2003.

SHON, Y.H. e NAM, K. S. Antimutagenicity and induction of carcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. **Journal of Ethnopharmacology**, 77, p. 103-109, 2001.

SIMIC, M. G.; Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, 202, p. 377-386; 1988.

SINGER, R.; **Mushrooms and truffles**, Leonard Hill (books): Londres, 1961.

SMÂNIA, E. F. A. **Esteróis e triterpenos isolados de espécies de Ganoderma karsten e sua atividade antimicrobiana**. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SMÂNIA, A., JR.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, Inglaterra, 45, 177–181, 1995.

SOARES, J.R. *et al.* Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v 26, p. 469–478, 1997.

SORIMACHI, K. *et al.* Anti-viral Activity of Water - Solubilized Lignin Derivatives *in Vitro*. **Agric. Biol. Chem**, v. 54(5), p. 1337-1339, 1990.

SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alteration. **Science** 264: 388-393. 1994.

SUZUKI H, OKUBO A, YAMAZAKI S, SUZUKI K, MITSUYA H, TODA S. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). **Biochem Biophys Res Commun** v 160, p. 367–73, 1989.

TAKAZAWA H, TAJIMA F, MIYASHITA C. An antifungal compound from Shiitake (*Lentinus edodes*). **Yakugaku Zasshi**, 102, 489–491. 1982.

TAKEHARA M, KUIDA K, MORI K. Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake). **Archives of Virology**, v 59, p. 269-74, 1979.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Fed batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganodermic acid. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 31, p. 20-28, 2002.

TONG, L. M.; SASAKI, S.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 48, p. 1473–1478, 2000.

TONUCCI, N. M. **Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micelio de *L. edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e Tobacco mosaic virus (TMV).** Dissertação de mestrado, Setor de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

TRABULSI, L., R. **Microbiologia**. 4. ed. São Pulo: Editora Atheneu, 2004.

TURKOGLU, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. African, **Journal of Biotechnology**, 5, 1146-1150. 2006.

TURKOGLU, A.; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sphaereus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, 2006.

WANG. *et. al.* Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the Spin trapping method. **Biochem. Pharmacol.** p. 687-691, 1996.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1, 31-62. 1999.

YAMAMOTO Y, Shirono H, Kono K, Ohashi. Immunopotentiating Activity of the Water-soluble Lignin Rich Fraction Prepared from LEM - The extract of the Solid Culture Medium of *Lentinus edodes* Mycelia. **Bioscience Biotech. Biochem.**, v. 61(11), p. 1909-1912, 1997.

YANG, J. H.; LING, Y. S.; The oxidation of *Cordyceps sinensis* preparation. **Academy Journal of Guangdong Collirium Pharmacy**, v. 13, p. 35-37. 1997.

YANG, F.C. AND LIAU, C.B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemistry** 33, 547-553, 1998.

YANG, J.H., LIN, H.C., MAU, J.L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry** v 77, p. 229–235, 2002.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3355-3359, 1992.

YASUMOTO K, IWAMI K, MITSUDA H. A new sulphur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as precursor for lenthionine. **Agric. Biol. Chem.**, 35, 2059-2069, 1971.

YEN, G.C., WU, J.Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsuaga*. **Food Chemistry** v 65, p. 375–379, 1993.

YEN, M. T.; TSENG, Y. H.; CHIAN, R. L.; MAU, J. L.; Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. **LWT - Food Science and Technology**, v 40, p. 255-261, 2007.

YOUNGSON, R.; **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes**; Editora Outras Palavra, Campus, Rio de Janeiro, 1995.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry** v 64, p. 555–559, 1999.