

RODRIGO OTAVIO DE FARIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
LENTINULA BORYANA (BERK & MONT) PEGLER**

CURITIBA

2004

RODRIGO OTAVIO DE FARIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
LENTINULA BORYANA (BERK & MONT) PEGLER**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná UFPR.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA

2004

## AGRADECIMENTOS

A toda a minha família pelo apoio.

Ao professor David pela orientação e pela liberdade para trabalhar.

Ao professor Guilherme pelas orientações no laboratório e pela amizade.

A professora Fany e a Marilza pelos seus trabalhos na coordenação do curso de pós-graduação.

Aos colegas do laboratório, Ricardo, Marcelo Muller, Marcelo Barga, Graciele, Farah, Wellington, Viviam e Alexandre, pela convivência e amizade.

Aos colegas do grupo de Química de Carboidratos, pelas varias vezes que me ajudaram com os trabalhos sobre polissacarídeos.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Lauro pelas análises no GC-MS.

A Dra. Maria Angela Amazonas por ceder as cepas dos cogumelos utilizadas nos experimentos e pelo auxílio durante os trabalhos.

Ao Professor Mangrich e sua equipe pela ajuda nas análises das melaninas.

Aos meus colegas da turma do mestrado pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos professores Aguinaldo, Berenice, Maria Benegina, Roberto Pontarolo, David, Gorin, Fontana, Emanuel, Marcelo Iacomini, Miguel, Leda e Liu pelos conhecimentos transmitidos durante os cursos.

Ao professor Leonardo pelo empréstimo da máquina fotográfica e todo o auxílio com a dissertação

Aos alunos da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Wesley e Juliana e ao professor Maurício pelo auxílio nas análises sobre a atividade antimicrobiana.

A todas as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A Deus por colocar todas estas pessoas boas e pacientes no meu caminho, pela saúde e pelos ensinamentos desta vida.

**Dedico esta dissertação a minha  
esposa Samira, por todo o apoio e  
amor que ela sempre me deu.**

**"A nossa recompensa está no esforço, não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa" (Gandhi)**

**"Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova" (Gandhi)**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Características gerais do <i>Lentinula edodes</i> .....	2
1.2 O mercado e o desenvolvimento das técnicas de cultivo comercial do <i>Lentinula edodes</i> .....	3
1.3 Técnicas para melhoria do cultivo de <i>Lentinula edodes</i> .....	4
1.4 Atividades biológicas relacionadas ao <i>Lentinula edodes</i> e seus componentes.....	5
1.5 Conhecimento sobre o <i>Lentinula boryana</i> .....	8
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	9
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	10
3.1 GERAL.....	10
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
4.1. ESTRATÉGIA GERAL DOS EXPERIMENTOS DA DISSERTAÇÃO.....	11
4.2 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS UTILIZADAS.....	13
4.3 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Lentinula edodes</i> e <i>Lentinula boryana</i> .....	14
4.3.1 Obtenção das frações orgânicas e dos precipitados etanólicos dos corpos de frutificação de <i>L. boryana</i> e <i>L. edodes</i> .....	15
4.3.2 Gelo e degelo.....	15
4.3.3 Determinação dos rendimentos e dosagem de proteínas.....	15
4.3.4 Determinação da distribuição das macromoléculas por HPSEC-MALLS.....	16
4.3.5 Determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos.....	16
4.3.6 Análise e das ligações glicosídicas dos polissacarídeos por metilação.....	17
4.3.7 Análise das ligações glicosídicas por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN- <sup>13</sup> C) .....	17

4.4 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS NO CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DOS MACROFUNGOS <i>Lentinula boryana</i> E <i>Lentinula edodes</i> EM MEIO SÓLIDO (BATATA DEXTROSE ÁGAR).....	18
4.4.1 Estudos comparativos sobre o crescimento micelial entre <i>Lentinula boryana</i> (BERK. & MONT.) PEGLER E <i>Lentinula edodes</i> (BERK.) PEGLER.....	19
4.4.1.1 Preparo dos meios de cultura, incubação e condições de cultivo.....	20
4.4.1.2 Crescimento micelial radial.....	20
4.4.1.3 Análises estatísticas.....	20
4.4.1.4 Efeito do pH inicial no crescimento micelial dos macrofungos.....	20
4.4.1.5 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento micelial dos macrofungos.....	21
4.4.2 Efeito das condições do meio no crescimento micelial de <i>Lentinula boryana</i> (BERK. & MONT.) Pegler crescido sobre membranas.....	21
4.4.2.1 Preparo dos materiais.....	21
4.4.2.2 Determinação do crescimento radial e da massa micelial seca de <i>Lentinula boryana</i> .....	21
4.4.2.3 Efeito do pH inicial do meio no crescimento micelial (radial e massa seca) de <i>Lentinula boryana</i> .....	22
4.4.2.4 Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre o ganho de massa micelial seca de <i>L. boryana</i> após 10 dias de cultivo.....	22
4.4.2.5 Efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de malte no crescimento micelial (radial e massa seca) de <i>Lentinula boryana</i> .....	22
4.5 OBSERVAÇÃO DOS FATORES INFLUENCIADORES DA PRODUÇÃO DE PIGMENTO TIPO MELANINA POR <i>L. boryana</i> E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DESTA MELANINA. ....	23
4.5.1 Registro fotográfico.....	23
4.5.2 Efeito da temperatura na produção de melanina.....	23
4.5.3 Efeito da idade do micélio e da disponibilidade de nutrientes na produção de melanina em resposta à variação de temperatura.....	23
4.5.4 Efeitos dos contaminantes e da interação entre micélios na produção de melanina.....	24
4.5.5 Efeito da concentração de ágar na produção de melanina .....	24
4.5.6 Efeito do oxigênio na produção de melanina.....	24
4.5.7 Estimativa da produção de melanina por <i>L. boryana</i> e <i>L. edodes</i> em meio líquido nas temperaturas de 20 e 28 °C. ....	25
4.5.7.1 Preparo do inóculo de <i>Lentinula boryana</i> e <i>Lentinula edodes</i> em meio sólido(BDA) .....	25

4.5.7.2 Preparo do meio líquido de batata dextrose e extrato de malte.....	25
4.5.8 Avaliação da atividade antibiótica <i>in vitro</i> dos caldos de cultivo de <i>L. boryana</i> e <i>L. edodes</i> e da melanina purificada. ....	26
4.5.9 Preparo dos materiais para o antibiograma.....	27
4.5.10 Purificação da melanina produzida por <i>L. boryana</i> e obtenção das amostras utilizadas nas análises de RPE, RMN e IV. ....	28
4.5.11 Estudo da interação entre íons metálicos e as melaninas produzidas por <i>L. boryana</i> por espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).....	28
4.5.12 Análise da melanina “purificada” por ressonância magnética nuclear (RMN).....	29
4.5.13 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da melanina produzida por <i>L. boryana</i> .....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>5.1. ESTUDO COMPARATIVO SOBRE OS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Lentinula boryana</i> (BERK. &amp; MONT.) PEGLER E DO <i>Lentinula edodes</i> (BERK.) PEGLER</b> .....	30
5.1.1 Rendimentos obtidos nas extrações com água a 100 °C e nos processos de gelo e degelo.....	30
5.1.2 Dosagem de proteínas nos precipitados etanólicos.....	31
5.1.3 Determinação da distribuição das macromoléculas por HPSEC-MALLS.....	31
5.1.4 Determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos dos dois macrofungos.....	34
5.1.5 Análise das ligações glicosídicas dos polissacarídeos por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN- <sup>13</sup> C) e por metilação.....	35
5.1.6 Avaliação do potencial biotecnológico do <i>L. boryana</i> pela análise dos polissacarídeos presentes no corpo de frutificação.....	46
<b>5.2 ESTUDOS COMPARATIVOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL ENTRE <i>Lentinula boryana</i> (BERK. &amp; MONT.) PEGLER E <i>Lentinula edodes</i> (BERK.) PEGLER</b> .....	48
5.2.1 Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial dos macrofungos.....	48
5.2.2 Efeito do pH inicial no crescimento radial de <i>L. boryana</i> e <i>L. edodes</i> .....	49
5.2.3 Efeito da fonte de nitrogênio sobre o crescimento radial dos macrofungos.....	52
<b>5.3 EFEITO DAS CONDIÇÕES DO MEIO NO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Lentinula boryana</i>(BERK. &amp; MONT.) PEGLER CRESCIDO SOBRE MEMBRANAS</b> .....	55
5.3.1 Efeito do pH inicial no crescimento micelial de <i>L. boryana</i> (crescimento radial e massa seca do micélio) .....	55
5.3.2 Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre o ganho de massa	

micelial seca de <i>L. boryana</i> após 10 dias de cultivo.....	57
5.3.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de malte no crescimento micelial (radial e massa seca) de <i>Lentinula boryana</i> .....	58
5.3.4 Avaliação dos resultados sobre o cultivo dos macrofungos em placas de Petri com BDA.....	60
<b>5.4 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROCÓPICA E OBSERVAÇÃO DOS FATORES INFLUENCIADORES NA PRODUÇÃO DE MELANINA POR <i>L. boryana</i></b> .....	<b>63</b>
5.4.1 Caracterização espectrográfica do pigmento tipo melanina.....	66
5.4.1.1 Estudo da interação entre íons metálicos e as melaninas produzidas por <i>L. boryana</i> por espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).....	66
5.4.1.2 Análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear (RMN) da melanina “purificada” .....	70
5.4.1.3 Espectrometria de infravermelho da melanina produzida por <i>L. boryana</i> .....	74
5.4.1.4 Avaliação sobre os resultados sobre a caracterização espectrográfica da melanina produzida por <i>L. boryana</i> .....	76
5.4.2 Observação dos fatores influenciadores na produção de pigmento tipo melanina por <i>L. boryana</i> .....	78
5.4.2.1 Efeito da temperatura na produção de pigmento tipo melanina.....	78
5.4.2.2 Efeito da idade do micélio e da disponibilidade de nutrientes na produção de melanina em resposta a variação de temperatura.....	79
5.4.2.3 Efeito dos contaminantes e da interação entre micélios na produção de melanina por <i>L. boryana</i> .....	82
5.4.2.4 Efeito da concentração de ágar e do oxigênio na produção de pigmento tipo melanina por <i>Lentinula boryana</i> .....	85
5.4.2.5 Estimativa da produção de melanina por <i>L. boryana</i> e <i>L. edodes</i> em meio líquido nas temperaturas de 20 e 28 °C.....	87
5.4.2.6 Avaliação da atividade antibiótica <i>in vitro</i> dos caldos de cultivo de <i>L. boryana</i> e <i>L. edodes</i> e da melanina purificada.....	87
5.4.3 Possíveis aplicações de melaninas e perspectivas de futuros trabalhos com <i>L. boryana</i> como produtor de melanina .....	92
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS APLICADAS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE <i>Lentinula boryana</i> .....	12
FIGURA 2.	CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Lentinula boryana</i> E <i>Lentinula edodes</i> .....	13
FIGURA 3	ESQUEMA SOBRE A AVALIAÇÃO QUÍMICA DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Lentinula edodes</i> e <i>Lentinula boryana</i> .....	14
FIGURA 4	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS NO DESENVOLVIMENTO DOS MACROFUNGOS.	18
FIGURA 5	ANÁLISES DAS MACROMOLÉCULAS PROVENIENTES DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. boryana</i> POR HPSEC-MALLS.....	32
FIGURA 6	ANÁLISES POR HPSEC-MALLS DAS MACROMOLÉCULAS PROVENIENTES DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. edodes</i> .....	33
FIGURA 7	ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO pptLb.....	36
FIGURA 8	ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO pptLe.....	37
FIGURA 9	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DE LbI.....	40
FIGURA 10	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DE LeI.....	41
FIGURA 11	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DE LbS.....	44
FIGURA 12	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C LeS.....	45
FIGURA 13	EFEITO DA TEMPERATURA.....	48
FIGURA 14	EFEITO DE pH INICIAL .....	49
FIGURA 15	VARIAÇÃO DO pH DO MEIO.....	51
FIGURA 16	EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DE <i>Lentinula boryana</i> . .....	53
FIGURA 17	EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DE <i>Lentinula edodes</i> . .....	54
FIGURA 18	. EFEITO DO pH INICIAL NO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>L. boryana</i> .....	56
FIGURA 19	CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>L. boryana</i> SOBRE MEMBRANAS....	56
FIGURA 20	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.....	58
FIGURA 21	EFEITO DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE MALTE.....	59
FIGURA 22	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE MALTE.....	59
FIGURA 23	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOSÍNTESE DE DHN-MELANINA PROPOSTA POR BUTLER E DAY (1998) REVISADO POR LANGFELDER et al. (2003) .....	64
FIGURA 24	VIA DA SÍNTESE DE DOPA-MELANINA(STAINSACK, 1998).....	65
FIGURA 25	RPE SÓLIDO DO MICÉLIO MELANILIZADO DE <i>L. boryana</i> , ANALISADO A 77 K.....	68
FIGURA 26	RPE SÓLIDO DO MICÉLIO MELANIZADO DE <i>L. boryana</i> , ANÁLIZADO A 77 K, REFERENTE A REGIÃO ENTRE 1500 E 4000 GAUSS.....	69
FIGURA 27	RPE SÓLIDO DA MELANINA “PURIFICADA” PROVENIENTE DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>L. boryana</i> .....	68

FIGURA 28	RPE SÓLIDO DA MELANINA “PURIFICADA”.....	69
FIGURA 29	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA MELANINA “PURIFICADA”.....	72
FIGURA 30	ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DA MELANINA “PURIFICADA”.....	73
FIGURA 31	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA MELANINA PRODUZIDA POR <i>L. boryana</i> .....	75
FIGURA 32	MICÉLIO DE <i>Lentinula boryana</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CRESCIMENTO.....	81
FIGURA 33	MICÉLIO DE <i>Lentinula boryana</i> EM DUAS TEMPERATURAS DIFERENTES.....	81
FIGURA 34	INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE MELANINA POR <i>L. boryana</i> .....	84
FIGURA 35	VARIAÇÃO DO MICÉLIO DE <i>L. boryana</i> EM DIFERENTES CULTIVOS.....	84
FIGURA 36	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGAR NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO TIPO MELANINA POR <i>L. boryana</i> .....	86
FIGURA 37	INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO TIPO MELANINA.....	86
FIGURA 38	ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR <i>L. boryana</i> E <i>L.</i> <i>edodes</i> .....	88
FIGURA 39	ANTIBIOGRAMA DOS CALDOS DE CULTIVO DE <i>L. boryana</i> e <i>L.</i> <i>edodes</i> .....	91
FIGURA 40	ANTIBIOGRAMA DA MELANINA PRODUZIDA POR <i>Lentinula</i> <i>boryana</i> .....	91

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	QUANTIDADES DE H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (100mM), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100mM) E K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (100mM) A SEREM ADICIONADAS NO BDA PARA OBTENÇÃO DE DIFERENTES pHs.....	20
TABELA 2	RENDIMENTOS ENCONTRADOS PARA OS PRECIPITADOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE <i>L. boryana</i> E <i>L. edodes</i> .....	30
TABELA 3	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES pptLb e pptLe, LbI, LeI, LbS e LeS.....	34
TABELA 4	PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS ENCONTRADOS NOS ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DAS AMOSTRAS LbI E LeI.....	38
TABELA 5	PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS ENCONTRADOS NOS ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DAS AMOSTRAS LbS E LeS.....	42
TABELA 6	RESULTADO DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E SOLÚVEIS DOS COGUMELOS DOIS MACROFUNGOS.....	43
TABELA 7	ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADIAL DE <i>Lentinula boryana</i> EM DUAS FASES.....	50
TABELA 8	COMPARAÇÃO ENTRE OS ASSINALAMETOS ENCONTRADOS NO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA MELANINA “PURIFICADA” COM OS DADOS DA LITERATURA.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ara	Arabinose
BDA	Batata dextrose ágar
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a massa
COMP. MONOS	Composição monossacarídica
DHN	Dihidroxinaftaleno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPA	Dihidroxifenilalanina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ext. levedura	Extrato de levedura
Ext. malte	Extrato de malte
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Glc	Glucose
IV	Infravermelho
<i>L. boryana</i>	<i>Lentinula boryana</i>
<i>L. edodes</i>	<i>Lentinula edodes</i>
Lbl	Fração insolúvel do extrato de <i>Lentinula boryana</i>
LeI	Fração insolúvel do extrato de <i>Lentinula edodes</i>
LbS	Fração insolúvel do extrato de <i>Lentinula boryana</i>
LeS	Fração insolúvel do extrato de <i>Lentinula edodes</i>
ppm	partes por milhão
Rha	Raminose
RLO	Radical livre orgânico
RMN- <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear do carbono 13
RPE	Ressonância Eletroparamagnética
rpm	Rotações por minuto
TFA	Ácido Trifluoracético
TEMP.	Temperatura

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\text{CH}_3\text{I}$	iodeto de metila
$\text{CuSO}_3$	Sulfato de cobre
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido sulfúrico
$\text{HCl}$	Ácido clorídrico
$\text{NaOH}$	Hidróxido de sódio
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Cloreto de amônio
$\text{NH}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	Tatarato de amônio
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Fosfato de amônio
p/v	Peso por volume

## RESUMO

O objetivo principal do trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico do cogumelo *Lentinula boryana* (Shiitake das Américas). Para isto foram feitos experimentos comparando os polissacarídeos presentes nos corpos de frutificação de *L. boryana* e *L. edodes*. Neste trabalho foi demonstrado que os polissacarídeos de *L. boryana* possuem características semelhantes a do *L. edodes*. Sabendo-se que o *L. edodes* é considerado um cogumelo medicinal devido às atividades biológicas dos polissacarídeos do seu corpo de frutificação, pode ser esperado que o *L. boryana* também possua atividades biológicas similares, o que é potencial biotecnológico a ser explorado no futuro. Foram realizados experimentos sobre o crescimento micelial em placas onde foi demonstrado que *L. boryana* possui características de cultivo similares a *L. edodes*, mas possui maior sensibilidade a temperaturas elevadas (acima de 25 °C) e é mais sensível a concentrações elevadas de fontes simples de nitrogênio. Durante os estudos também foi verificado que a 28 °C o crescimento micelial é interrompido e ocorre a produção de um pigmento escuro que fica disperso no meio e no micélio. Com isso buscou-se avaliar o que seria este pigmento por análises espectrográficas (RPE, IV e RMN). Os resultados destas análises sugerem que este pigmento é uma melanina, provavelmente uma DOPA-melanina. Também foram verificados os fatores que influenciam na produção de melanina por *L. boryana*, nestas análises foi verificado que esta produção é estimulada pela elevação da temperatura e pela presença de outros microorganismos no meio de cultivo. A disponibilidade de nutrientes e de oxigênio também mostrou ser importante para a sua produção. As melaninas são substâncias que vêm sendo estudadas há muitos anos, existem trabalhos que demonstram possíveis aplicações das melaninas na indústria e na medicina. Considerando o fato que o *L. boryana* produz melanina e estas possuem interesse biotecnológico isto pode sugerir mais um potencial para o *L. boryana* a ser explorado no futuro.

## 1. INTRODUÇÃO

Os trabalhos, apresentados nesta dissertação, foram realizados visando uma avaliação inicial do potencial biotecnológico do basidiomiceto *Lentinula boryana*. Estes trabalhos fazem parte de um projeto maior, uma parceria entre UFPR e Embrapa Florestas-PR, que visa avaliar o potencial econômico de macrofungos nativos do território brasileiro, principalmente da região sul do país. O projeto também busca determinar quais condições de cultivo destes macrofungos são necessárias, para que no futuro seja possível o seu cultivo comercial

Especificamente, nos estudos desenvolvidos durante o mestrado foi selecionado um cogumelo do gênero *Lentinula*, o macrofungo *Lentinula boryana* nativo das Américas, para o qual as informações são escassas. Este cogumelo foi selecionado devido ao interesse existente nas propriedades terapêuticas dos polissacarídeos de uma outra espécie do mesmo gênero, o *Lentinula edodes*. Com isso, durante os trabalhos do mestrado foram feitos estudos comparando quimicamente os polissacarídeos produzidos por *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana*. Visando conhecer as melhores condições de cultivo foram verificadas quais condições físicas e nutricionais afetam o seu crescimento micelial, estas informações serão úteis em experimentos futuros no sentido de melhorar a produtividade de biomassa, aumentando assim a produção do cogumelo ou de massa micelial.

O foco da dissertação é o cogumelo *Lentinula boryana*, mas a maior parte das informações apresentadas nesta introdução é sobre o *Lentinula edodes* (Shiitake), isto porque é a espécie mais estudada, que portanto contém uma vasta literatura. A revisão mostrará que há muito conhecimento sobre o cultivo de *L. edodes* e as propriedades terapêuticas de seu corpo de frutificação e do micélio, sugerindo que seria interessante avaliar se o *L. boryana* tem este mesmo potencial. Outras informações, que serão apresentadas a seguir, sobre *L. edodes* relacionadas às técnicas de cultivo, aos seus polissacarídeos e às suas aplicações, por vezes sugeriram o direcionamento nos estudos que foram realizados com *L. boryana*.

### 1.1 Características gerais de *Lentinula edodes*

*Lentinula edodes* é o representante mais famoso do gênero *Lentinula*. É um cogumelo nativo da Ásia, conhecido como Shiitake, cogumelo da Floresta ou shiang-ku (cogumelo perfumado). Ele é um cogumelo lignolítico, ou seja, possui a habilidade de degradar e utilizar a madeira dura como fonte de nutrientes para seu desenvolvimento (HATVANI, 2001). Já foram identificadas mais de 100 diferentes cepas de Shiitake, sendo que pode haver variações entre elas conforme a adaptação às condições ambientais (CAMPBELL; RACJAN, 1999).

A temperatura é um fator importante para o crescimento micelial de *L. edodes*. A faixa de temperatura considerada ótima para o crescimento micelial é próxima a 25 °C, mas pode haver variação conforme a cepa. Em temperaturas abaixo de 5° C e acima de 35°C o crescimento micelial é interrompido. Sabe-se que o Shiitake pode sobreviver em troncos em temperaturas inferiores a -30° C, entretanto o micélio morre em temperaturas superiores a 45°C (CAMPBELL; RACJAN, 1999).

Além da temperatura existem outras diferenças entre as cepas, tais como o nível de colonização da madeira, ou seja, na velocidade em que degradam a madeira e a utilizam como fonte nutricional, na quantidade de água (umidade) ideal do substrato, no tempo de frutificação e na qualidade e quantidade dos corpos de frutificação produzidos (CAMPBELL; RACJAN, 1999).

## 1.2 O mercado e o desenvolvimento das técnicas de cultivo comercial de *Lentinula edodes*

Nos dias atuais o Shiitake é o segundo cogumelo comestível mais comercializado e consumido no mundo, ficando atrás apenas do cogumelo *Agaricus bisporus* conhecido como Champignon de Paris (MIZUNO, 1995).

A história do cultivo artificial de Shiitake na China ultrapassa 900 anos (ZHANXI; ZHANHUR, 2001). Como visto o Shiitake está sendo explorado comercialmente há séculos, mas recentemente houve um aumento da ordem de sete vezes no consumo e produção mundial deste cogumelo, passando de 207.000 toneladas em 1983 para 1.573.000 toneladas em 1997 (SALMONES et al., 1999; ROYSE; VAZQUEZ, 2001). Em parte isto ocorreu porque anos atrás estudos com o cogumelo *Lentinula edodes* mostraram potencialidades para uma aplicação medicinal, bem como na indústria de alimentos, o que levou a uma expansão da sua produção e motivou muitos trabalhos científicos para um maior discernimento sobre o cogumelo. Muitas destas aplicações medicinais estão relacionadas aos polissacarídeos ( $\beta$ -D-Glucanas) que estão presentes no corpo de frutificação ou são produzidos durante o crescimento micelial (HATVANI, 2001; YANG et al., 2001).

Como relatado anteriormente, o Shiitake é de origem asiática. Nos países asiáticos como China e Japão o consumo deste cogumelo é bastante popular. Nestes dois países mais de 93 % do cultivo deste cogumelo é feito em troncos de carvalho (CAMPBELL; RACJAN, 1999). Mas nestes e em outros países estão sendo produzidos e testados novos meios de cultivo deste organismo.

Na Europa, o cultivo comercial do Shiitake começou nos anos 60, utilizando o tradicional método de cultivo externo em toras de carvalho. Como neste método o tempo para o cultivo é muito elevado, houve um interesse em desenvolver métodos alternativos para a produção do cogumelo. Foi então desenvolvido um sistema de cultivo em tronco sintético ou em sacos plásticos, o qual utiliza serragem suplementada com outras fontes de carbono e nitrogênio. Hoje este sistema está bem difundido em todo mundo, fato que pode ser atribuído à vantagem de que o tempo requerido para frutificação é inferior quando comparado com o de troncos de carvalho. Uma desvantagem deste sistema é a obrigatoriedade de se fazer uma esterilização dos substratos, o que requer um alto

investimento inicial e um alto consumo de energia para o processo (CHANG; MILES, 1989; MATA; SAVOIE; DELPECH, 1998). Apesar disso, o aumento e o melhor controle da produtividade compensam o investimento.

O método “Jun-Cao” que foi desenvolvido pelos chineses na década de 1980 (ZHANXI; ZHANHUA, 2001), também utiliza sacos plásticos, porém substitui a serragem por gramíneas. Esta técnica vem sendo difundida no Brasil pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (URBEN et al., 1999)

Em 1983, Leatham obteve o corpo de frutificação do Shiitake em meio líquido complexo, o que sugeriu a possibilidade de desenvolvimento de um cultivo hidropônico do Shiitake (LEATHAM, 1983; CHANG; MILES, 1989), porém este método não é utilizado em escala comercial .

### 1.3 Técnicas para melhoria do cultivo de *Lentinula edodes*

Para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, como relatado no item 1.2, e para que melhores resultados fossem alcançados, muitos trabalhos sobre o cultivo mostram tentativas para aumentar o crescimento micelial e diminuir o tempo de início da frutificação. Em alguns destes trabalhos foram feitos estudos testando:

- Fontes de carbono como a glucose e outros carboidratos, adicionando-se glutamato, ácidos casamínicos e lignina solúvel (BOYLE, 1998; MATA; DELPECH; SAVOIE, 2001);
- Fontes inorgânicas de nitrogênio como sais nitrogenados de fosfato, cloreto e sulfato, além de fontes mais complexas como extrato de malte e de levedura (BOYLE, 1998);
- Temperatura e umidade ideais para o crescimento (CAMPBELL; RACJAN, 1999);
- Atividades enzimáticas com a suplementação de diferentes nutrientes (HATVANI; MÉCS, 2002; ZUSWELL et al., 1995; OHGA et al., 2000);
- Diferentes inóculos líquidos e sólidos verificando o tempo para a frutificação (KAWAI et al., 1995).

Além de estudos sobre as condições de cultivo, foram utilizados resíduos agrícolas como o bagaço da cana, casca e polpa de café, sabugo de milho, cevada, casca de arroz, farelo de arroz, coroas de abacaxi, entre outros, visando aproveitar tais resíduos como fonte de nutrientes para os cogumelos (SALMONES et al., 1999).

#### 1.4 Atividades biológicas relacionadas ao *Lentinula edodes* e seus componentes

Diversos estudos foram realizados e foram constatadas possíveis aplicações medicinais para o Shiitake, incluindo compostos do corpo de frutificação e do micélio. Compostos como polissacarídeos, peptideo-glucanas e terpenóides foram extraídos utilizando água quente ou fria e outros solventes, como acetato de etila. Muitas frações que contém polissacarídeos foram obtidas e alguns dos polissacarídeos nelas identificados.

Em 1970 Chihara et al.(1970) isolaram e caracterizaram, do corpo de frutificação do Shiitake, um polissacarídeo puro que ficou conhecido como lentinana. A lentinana é uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3) ramificada em C-6 por unidades de glucopiranosose  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6), são duas ligações glucopiranosídicas (1 $\rightarrow$ 6) para cada cinco ligações de glucopiranosídicas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) (CHIHARA, 1970; MAEDA et al., 1988). Este polissacarídeo tem como características principais sua insolubilidade em água fria, ácido e quase todos os solventes orgânicos como álcool, éter, clorofórmio, piridina e hexametilfosforamida, é pouco solúvel em água quente e dimetil sulfóxido, e é bem solúvel em solução aquosa de álcali e ácido fórmico. Análises elementares da lentinana mostram que 40,54 % é de Carbono e 7,02 % é de hidrogênio, não possui nitrogênio, fósforo ou enxofre (CHIHARA et al., 1970; SASAKI; TAKASUKA, 1976). Este polissacarídeo apresenta atividade antitumoral no sarcoma 180 (CHIHARA et al., 1970) e contra vários tumores sinérgicos e autóctones, bem como previne a oncogênese química e viral (BOHN; BEMILLER, 1995; WASSER; WEIS, 1999). A lentinana não apresenta efeitos tóxicos sobre as células tumorais, mas inibe o crescimento do tumor por estimular o sistema imune do hospedeiro. A  $\beta$ -D-glucana liga-se a superfície do linfócito ou em proteínas séricas específicas que ativam macrófagos, linfócitos “T-helper”, células NK (*Natural Killers*) e outros efetores celulares. Em comparação com outros agentes quimioterápicos, a lentinana apresenta poucas reações adversas e baixa toxicidade para as células normais do paciente (WASSER; WEIS, 1999).

Além da atividade antitumoral, existem outras possíveis aplicações na medicina para o cogumelo e seus compostos. O Shiitake possui habilidade de diminuir os níveis de colesterol do sangue. Esta habilidade foi relatada pela primeira vez por Kaneda e Tokuda (1966) que verificaram que em ratos que tinham sua dieta suplementada com Shiitake ocorria diminuição do nível de colesterol. Kabir et al. (1987) examinaram o efeito de Shiitake seco na pressão sangüínea e na composição lipídica do sangue de ratos espontaneamente hipertensivos (SHRs) e verificaram diminuição dos níveis de VLDL e HDL (revisado por JONG; BIRMINGHAM, 1993).

Também foram relatadas atividades antibacterianas dos extratos de *Lentinula edodes* (WASSER; WEIS, 1999; HATVANI, 2001). Foram relatadas atividades contra diversos vírus como da hepatite e do herpes (herpes simplex vírus tipo 1 e 2), adenovirus tipo 12, além da ação antiparasitária (KOGA, 1994; YAMAMOTO et al., 1997; JONG; BIRMINGHAM, 1993; WASSER; WEIS, 1999).

Com relação o uso da lentinana em pacientes com câncer ou HIV positivos algumas considerações relevantes foram discutidas por Wasser e Weis (1999): Muitos pacientes com câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) têm imunodisfunção e morrem de infecções por fungos oportunistas como da candidíase, aspergilose, dermafiteose e esporotricose, entre outros. É extremamente importante proteger o paciente com AIDS destas infecções. A lentinana do *Lentinula edodes*, quando usada junto com o AZT (3'-azido-2'-deoxitiamina), suprimiu a expressão superficial da imunodeficiência humana. Lentinana e lentinana sulfatada exibiram potentes atividades anti-HIV, resultando na inibição da replicação viral e na fusão celular. Segundo os autores, a terapia da AIDS precisa incluir uma estratégia para estimular o sistema imune, onde a lentinana seria um potencial candidato para este uso (WASSER; WEIS, 1999).

Além da lentinana outros compostos, inclusive polissacarídeos têm sido isolados do corpo de frutificação ou do micélio de *Lentinula edodes*.

Shida et al, (1975) isolaram uma heterogalactana de um extrato tricloroacético do corpo de frutificação do *Lentinula edodes*. Este heteropolissacarídeo é constituído de uma cadeia principal de galactopirranose com ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow6)$  com substituição no carbono 2 por unidades de L-fucopirranose ou D-manose (SHIDA et al., 1975). Estes mesmos autores, em 1978, isolaram e caracterizaram uma D-glucana  $\alpha(1\rightarrow3)$ , a qual possui

unidades glucopirranose com ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow3)$  e  $\alpha(1\rightarrow4)$  numa proporção de 5,3 para 1 respectivamente( SHIDA et al., 1978).

A glicoproteína KS-2 foi obtida pela extração com água quente do micélio cultivado de Shiitake, seguido de precipitação com etanol. Este composto foi identificado com sendo uma proteoglicana com a fração glicídica de  $\alpha$ -manana e com os amino ácidos serina, treonina, alanina, prolina etc., na fração peptídica. Este composto foi efetivo contra o carcinoma de Ehrlich's e contra o Sarcoma 180, tanto na administração por via intraperitoneal como pela via oral (revisado por MIZUNO, 1995).

A partir do micélio de *Lentinula edodes* cultivado em bagaço e fibra de arroz pode ser obtido um extrato chamado LEM (extrato do meio de cultura do *Lentinula edodes*), este extrato tem um rendimento de 6 gramas por kilograma de micélio cultivado. Este extrato, quando solubilizado em água e precipitado com 4 volumes de etanol, recebe o nome de LAP, é uma proteoglicana (açúcar:proteína 57,6:24,8). LAP têm uma composição monossacarídica principal é basicamente de xylose: arabinose: galactose: glucose (30,2: 17,4: 20,3: 19,9) (SUGANO et al., 1984) Tanto o LEM quanto o LAP apresentaram diversas atividades biológicas entre elas a inibição da carcinogênese de fígado de rato, atividade imunopotencializadora, inibição da transcriptase reversa do HIV (revisado por YAMAMOTO et al., 1997).

Uma fração rica em lignina solúvel, proveniente de LEM, foi obtida por ultrafiltração e cromatografia em coluna hidrofóbica, sendo chamada de JLS-18. A atividade antiviral desta fração foi analisada frente ao Herpes simplex vírus tipo I (HSV-I) onde foi visto que JLS-18 possui uma atividade específica muito superior ao LEM (1752,0 e 26,1 respectivamente) (YAMAMOTO et al., 1997).

Em trabalho realizado por Sorimachi et al. (1997) foi verificado a atividade antiviral de um derivado da lignina proveniente de LEM (extrato do meio de cultura do *Lentinula edodes*), este derivado foi chamado de EP3. Os resultados demonstraram que o EP3 apresenta atividade, *in vitro*, contra os Herpes simplex virus (tipo I e II) contra o poliovirus e contra o WEE virus (SORIMACHI, et al., 1997).

### 1.5 Conhecimento sobre o *Lentinula boryana*

O *Lentinula boryana*, que é um fungo comestível, chamado de Shiitake das Américas ou cogumelo do carvalho, cresce nas regiões subtropicais e tropicais do continente americano, desde do sudoeste dos Estados Unidos até a América do Sul. Por muito tempo foi conhecido pelo nome de *Lentinus cubensis* e modernamente, seguindo a classificação de Pergler (1983), foi chamado de *Lentinula boryana* (GUZMÁN et al., 1993). Este fungo tem um crescimento mais lento que o Shiitake, porém para o *L. boryana*, não há relatos de estudos para que se conheçam profundamente as características fisiológicas deste organismo, não foram feitos estudos cinéticos adequados nem mesmo foram determinadas quais as melhores condições para o cultivo. Nem mesmo foram feitas análises químicas sobre os polissacarídeos presentes no micélio ou corpo de frutificação.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na literatura foi encontrado pouca informação sobre o cogumelo *Lentinula boryana*, o que contrasta com o extenso conhecimento existente sobre o *Lentinula edodes*. Dois aspectos principais podem ser observados na literatura: Primeiro que o domínio das técnicas de cultivo de *L. edodes* permitiram que ele fosse um dos cogumelos comestíveis mais produzidos e comercializados do mundo. Segundo que existem muitos trabalhos científicos sobre *L. edodes* e seus metabólitos bioativos, principalmente polissacarídeos ( $\beta$ -D-Glucanas). A comprovação das propriedades medicinais certamente motivou o desenvolvimento do mercado e este, por sua vez, promoveu novos estudos sobre o cogumelo e seus produtos.

A escassa literatura existente sobre *L. boryana* restringe-se a aspectos relacionados à sua taxonomia, distribuição geográfica e cultivo. Não foi encontrada nenhuma referência sobre seu potencial biotecnológico.

Assim, este trabalho se propôs a dar início à avaliação do potencial biotecnológico do cogumelo neotropical *L. boryana*, buscando também indicar possíveis direcionamentos a serem tomados em futuros experimentos. Estes trabalhos aqui apresentados fazem parte de um projeto maior, coordenado pela Embrapa Florestas, em parceria com a UFPR intitulado “Bioprospecção e potencial de uso da macromicota do estado do Paraná”.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de um cogumelo neotropical *Lentinula boryana*, comparando com seu congênere asiático *Lentinula edodes*, que é mundialmente conhecido como Shiitake e é amplamente comercializado pelas suas propriedades gastronômicas, nutricionais e medicinais.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Comparar os rendimentos e as características químicas dos polissacarídeos presentes nos corpos de frutificação do *Lentinula boryana* com as do *Lentinula edodes*

2) Verificar quais condições físicas e químicas básicas são mais adequadas para o crescimento micelial do *Lentinula boryana*.

3) Caracterizar os pigmentos produzidos pelo micélio de *Lentinula boryana*, reconhecer os fatores que influenciam a sua produção e verificar a atividade antibacteriana destes pigmentos.

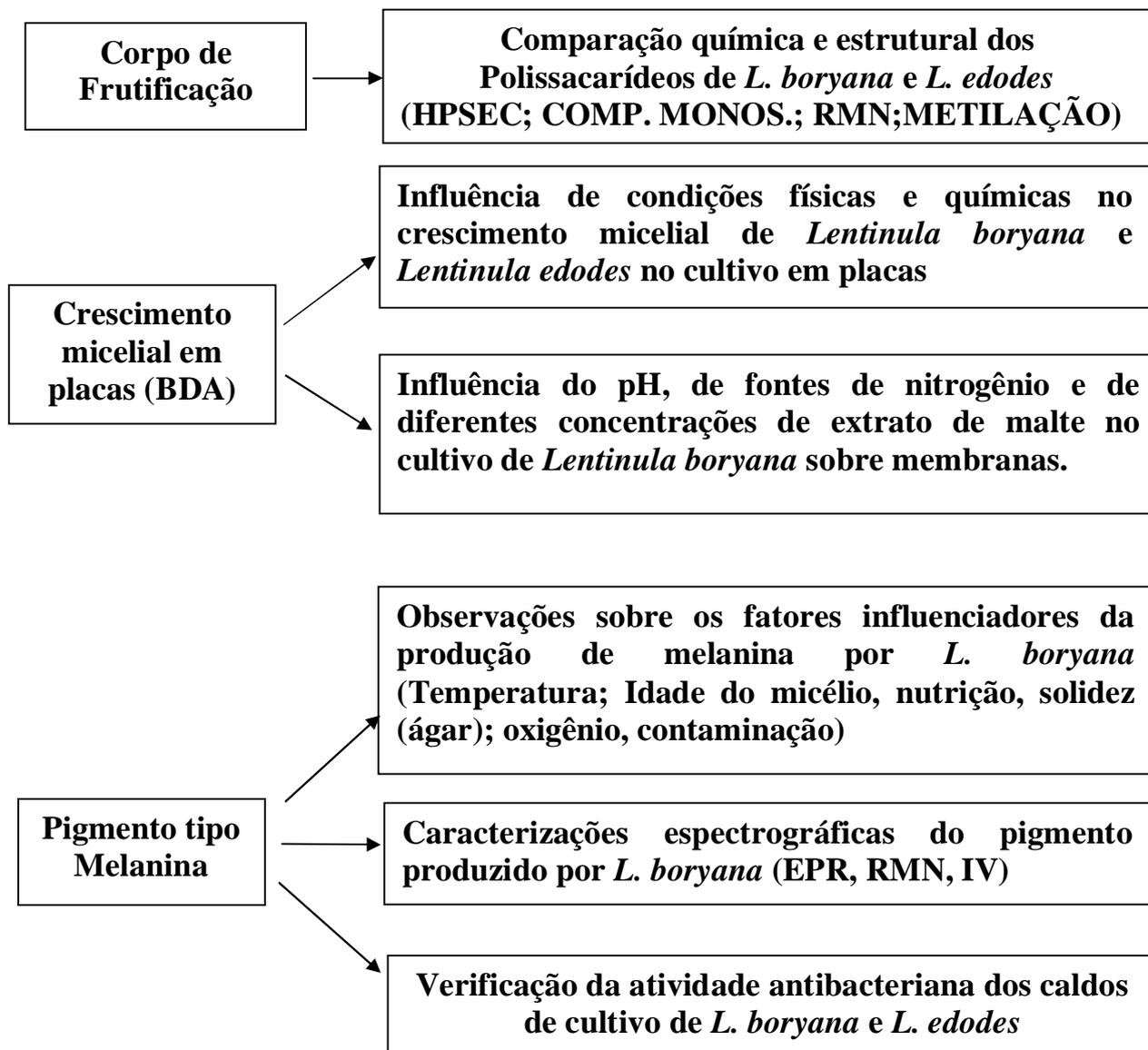
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ESTRATÉGIA GERAL DOS EXPERIMENTOS DA DISSERTAÇÃO

O esquema mostrado na figura 1 é um resumo das estratégias que foram seguidas para iniciar a avaliação da potencialidade de *Lentinula boryana*. Estas estratégias podem ser divididas em três grupos:

- Foi feito um estudo comparativo entre os polissacarídeos presentes no corpo de frutificação de *L. boryana* e *L. edodes*, com o intuito de averiguar a similaridade entre os dois cogumelos neste particular, o que poderia levar a uma previsão por analogia, para *L. boryana*, das mesmas atividades biológicas atribuídas a *L. edodes*.
- Foram realizados estudos verificando quais condições de cultivo proporcionariam o melhor crescimento micelial de *Lentinula boryana*.
- Durante os estudos sobre o crescimento micelial foi verificado que ocorria escurecimento das placas em determinadas situações. Foram feitas análises espectrográficas para caracterizar este pigmento e foram investigados os fatores que influenciam a sua produção.

**FIGURA 1. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS APLICADAS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Lentinula boryana***



#### 4.2 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS UTILIZADAS

As cepas dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana* utilizadas nos trabalhos são provenientes da coleção de culturas de macrofungos da Embrapa Florestas.

*Lentinula boryana* foi isolado no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Florestas, a partir de material silvestre procedente do morro do Anhangava, município de Quatro Barras, Paraná, coletado e identificado pelo micólogo André de Meijer em 15 de agosto de 1999. A cepa foi re-isolada, em 09 de setembro de 2002, do corpo de frutificação proveniente da tora 194 de *Eucalyptus grandis*, de um experimento instalado na Embrapa Florestas .

*Lentinula edodes* (linhagem L54) foi gentilmente cedida à Embrapa Florestas pela Universidade Chinesa de Hong Kong em 06 de agosto de 1999.

As culturas foram mantidas em placas com Batata-Dextrose-Agar (BDA) sob refrigeração a 4 °C. A cada 90 dias foram repicadas, incubadas a 20 °C até a cobertura total da placa pelo micélio e novamente estocadas a 4 °C.

Os corpos de frutificação utilizados nos experimentos de análise dos polissacarídeos provieram de cultivo em toras *Eucalyptus spp.* do experimento acima citado (Figura 2).

**FIGURA 2. CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *Lentinula boryana* E *Lentinula edodes***

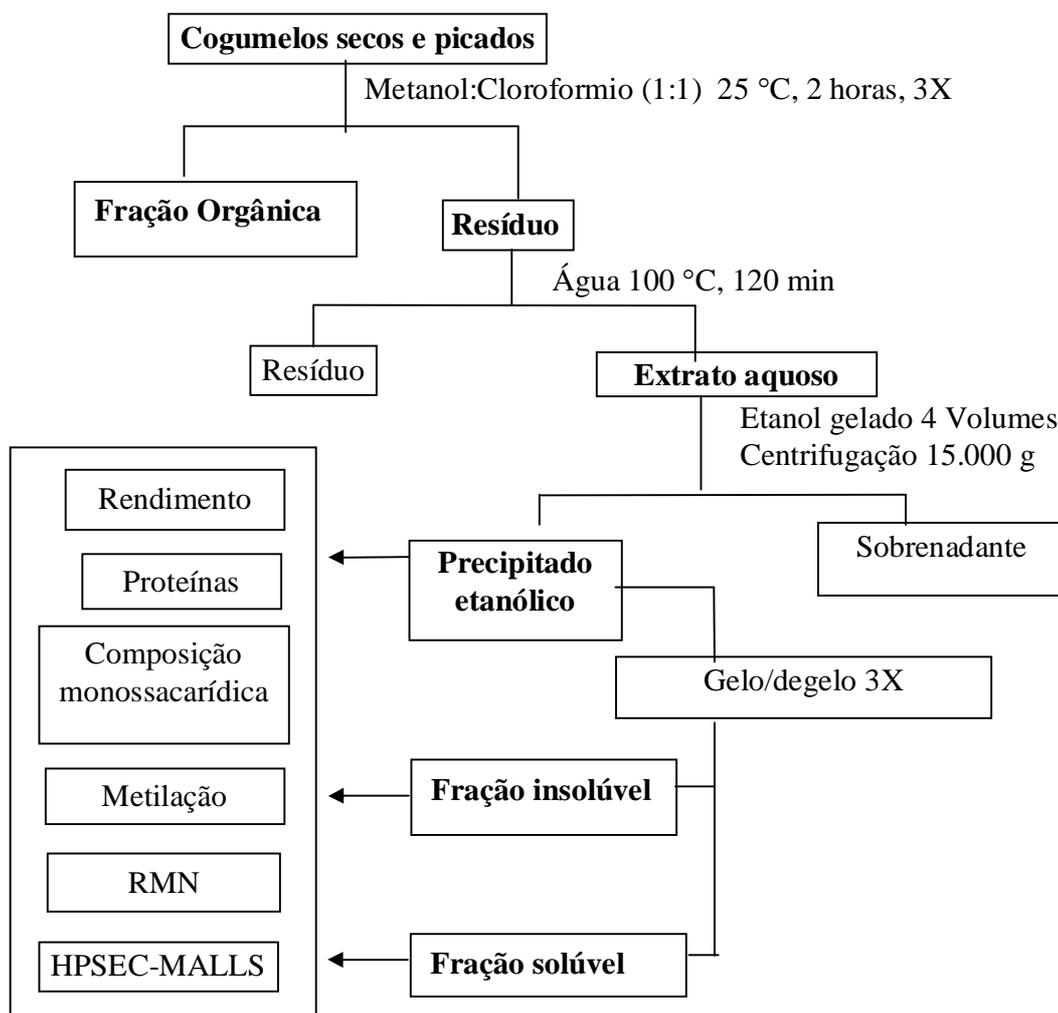


Cogumelos provenientes de um experimento de cultivo em toras de *Eucalyptus spp.* da Embrapa-Florestas-Pr, **A** – *L. edodes*; **B** – *L. boryana*

### 4.3 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana*

A figura 3 mostra, esquematicamente, quais etapas foram realizadas para comparar quimicamente os polissacarídeos presentes nos corpos de frutificação dos dois cogumelos.

**FIGURA 3. ESQUEMA SOBRE A AVALIAÇÃO QUÍMICA DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana***



#### 4.3.1 Obtenção das frações orgânicas e dos precipitados etanólicos dos corpos de frutificação de *L. boryana* e *L. edodes*

Os cogumelos secos e picados (10 g) foram extraídos com 200 ml de solução dos solventes metanol:clorofórmio (1:1), 3 vezes consecutivas, sendo mantidos sob agitação em agitador magnético, à temperatura ambiente por duas horas. Os materiais foram filtrados em algodão e os sobrenadantes chamados de **Fração Orgânica LB**, referente ao *L. boryana*, e **Fração Orgânica LE**, referente ao *L. edodes*.

Com os resíduos insolúveis das Frações Orgânicas, foram feitas as extrações com água a 100° C, por duas horas. Os materiais foram filtrados duas vezes em algodão. Os extratos foram reduzidos de volume em rotavapor e precipitados com 3 volumes de etanol (96 °GL) gelado. Os precipitados foram separados dos sobrenadantes por centrifugação, sendo estes redissolvidos em água quente e secos por liofilização. Estes precipitados foram chamados de **Precipitado etanólico *L. boryana* (pptLb)** e **Precipitado etanólico *L. edodes* (pptLe)**.

#### 4.3.2 Gelo e degelo

Os precipitados etanólicos, obtidos no item 4.3.1, foram dissolvidos em água quente e congelados em freezer (-18 °C). Os materiais congelados foram deixados em geladeira (4 °C) até o descongelamento total. As frações insolúveis foram separadas das solúveis por centrifugação. As frações insolúveis foram novamente dissolvidas em água quente e o processo foi repetido mais duas vezes. Finalizadas as etapas, as frações foram reunidas sendo chamadas de **LbI** e **LeI** as frações insolúveis, e **LbS** e **LeS** as frações solúveis.

#### 4.3.3 Determinação dos rendimentos e dosagem de proteínas

Para a determinação dos rendimentos, de **pptLb**, **pptLe**, **LbI**, **LeI**, **LbS** e **LeS**, as amostras secas foram pesadas, em balança analítica, antes e depois do processo de extração e do gelo e degelo.

A proteínas foram dosadas nos precipitados etanólicos, nas frações insolúveis e nas frações solúveis pelo método descrito por Lowry (LOWRY, 1951).

#### 4.3.4 Determinação da distribuição das macromoléculas por HPSEC-MALLS

Para esta análise as amostras foram dissolvidas em água MILLI-Q, filtradas em membranas MILLIPORE de 0,22  $\mu\text{m}$  e analisadas por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC-MALLS).

#### 4.3.5 Determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos

Cada amostra (2 mg) foi pesada e hidrolisada com solução de TFA 1 M, em estufa a 100 °C por doze horas (GORIN et al., 1996). Depois de hidrolisada a amostra foi evaporada na temperatura ambiente em placa de Petri. O material hidrolisado foi ressolubilizado, em água destilada, e colocado em balão de 50 ml para rotavapor.

Os monossacarídeos obtidos na hidrólise do material foram examinados por CCD, os quais foram reduzidos pela adição de boridreto de sódio, acompanhando-se o pH com papel indicador universal (Merck 0-14), pH 10, por 12 horas à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963). A redução foi terminada pela neutralização com a adição de algumas gotas de ácido acético. Então o material foi seco e lavado quatro vezes com metanol, em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

Após a lavagem com metanol, foi feita a acetilação dos derivados reduzidos utilizando 1 (um) ml de anidrido acético e 1 (um) ml de piridina (WOLFROM; THOMPSON, 1963). O meio reacionário foi mantido por 12 horas a temperatura ambiente. Após este período a reação foi interrompida pela adição de gelo moído e os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio. Para retirada da piridina e quebra total do anidrido acético, foram feitas diversas lavagens com solução de sulfato de cobre a 5%(p/v) até quando não ocorreu alteração na coloração da solução de  $\text{CuSO}_4$ . A fração clorofórmica foi filtrada em algodão com carbonato de sódio anidro. Após secura, os derivados alditóis-acetato foram ressolubilizados em acetona e analisados em CG-EM, comparando seus valores de  $R_t$  e seus perfis de IE-MS com padrões de alditóis acetato (Sigma Co.). Foi utilizada uma coluna capilar (DB-225 30 m x 0.25mm d.i) e o Hélio como gás de arraste (fluxo de 2  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Foi utilizado a seguinte programação da rampa de temperatura:

elevação da temperatura em 50 °C por um minuto até 220 °C (40 °C min<sup>-1</sup>), temperatura mantida isotermicamente até o final da corrida (25 min).

#### 4.3.6 Análise das ligações glicosídicas dos polissacarídeos por metilação

A amostra (2 mg) foi pesada e dissolvida em 1 ml de DMSO, agitada em agitador magnético por 10 minutos. Em seguida foram adicionados aproximadamente 50 mg de NaOH pulverizado. A mistura foi agitada fortemente por alguns minutos e então foram adicionadas cinco frações de 0,1 ml de iodeto de metila (CH<sub>3</sub>I), com 5 minutos de agitação entre cada adição, terminadas estas etapas foram adicionados 0,5 ml de CH<sub>3</sub>I, 1 ml de DMSO e 50 mg de NaOH pulverizado, então a reação foi mantida sobre agitação durante 12 horas. A metilação foi interrompida com adição de gelo moído e neutralização com ácido acético, e os derivados metilados extraídos com clorofórmio. O clorofórmio contendo o material foi lavado 10 vezes com água destilada e mantido à temperatura ambiente até a secura, então o material foi hidrolisado por 2 horas com solução de HCl(3,5%) em metanol a 80 °C, foi feita neutralização com carbonato de prata e o sobrenadante foi retirado e evaporado a temperatura ambiente. No material seco foi adicionado 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, sendo mantido em estufa a 100 °C por 14 horas. O material foi neutralizado com carbonato de bário até pH 7 e o sobrenadante foi reduzido com boro hidreto de sódio por 4 horas à temperatura ambiente. O material foi lavado, acetilado e analisado conforme descrito no item 4.3.5 (WOLFROM; THOMPSON, 1963).

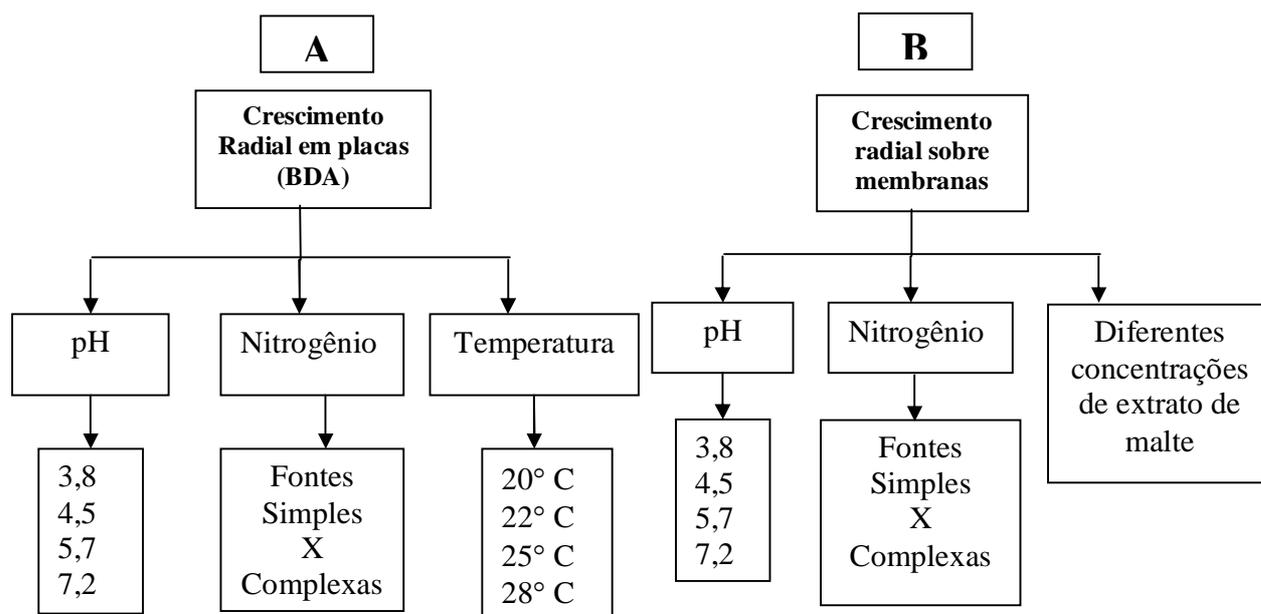
#### 4.3.7 Análise das ligações glicosídicas por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C)

As amostras foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O ou DMSO (deuterado) conforme a análise. Então foram colocadas em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro interno e os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 foram obtidos em espectrômetro BRUKER, Avance, DRX 400. Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos com o carbono desacoplado em 100.24 MHz, para o núcleo de <sup>13</sup>C, sendo realizadas varreduras de 50 a 100 mil *scans*, utilizando o DMSO ou acetona ( $\delta_H$  2.224,  $\delta_C$  30.2) como padrão interno.

#### 4.4 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS NO CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO DOS MACROFUNGOS *Lentinula boryana* E *Lentinula edodes* EM MEIO SÓLIDO (BATATA DEXTROSE ÁGAR).

Na figura 4 a estão relacionados os experimentos que comparam a influência das condições de cultivo no crescimento radial dos macrofungos *L. boryana* e *L. edodes* em placas contendo BDA. A figura 4 b é referente aos experimentos sobre a influência do meio no crescimento radial e no ganho de massa micelial seca de *L. boryana*, estes experimentos foram realizados sobre membranas colocadas sobre o meio de cultivo (BDA).

**FIGURA 4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS NO DESENVOLVIMENTO DOS MACROFUNGOS.**



Esquema dos experimentos realizados em placas de cultivo contendo BDA(batata dextrose e ágar) A- Comparativo entre *L. edodes* e *L. boryana*. B- Crescimento de *L. boryana* sobre membranas em placas de cultivo com BDA

#### 4.4.1 Estudos comparativos sobre o crescimento micelial entre *Lentinula boryana* (BERK. & MONT.) PEGLER e *Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER

Parte destes experimentos foi desenvolvida tendo como referência os trabalhos realizados por Mitchell e Doelle (1989a) e Mitchell (1989b), com algumas modificações.

##### 4.4.1.1 Preparo dos meios de cultura, incubação e condições de cultivo

O meio de batata dextrose e ágar (BDA) comercial (Biobras®) (3,9 g) foi dissolvido em 90 ml de água destilada e preparado conforme instruções do fabricante. Os demais nutrientes foram dissolvidos em 10 ml de água destilada nas quantidades especificadas. Todos os componentes dos meios foram autoclavados, separadamente, a 120 °C por 15 minutos e então misturados. Então a mistura foi distribuída em placas de Petri estéreis de 90 mm de diâmetro (10 ml/placa). Após gelificação, cada placa recebeu um disco de 6 mm de diâmetro de uma cultura recente do macrofungo em BDA. No estudo do efeito da temperatura as placas foram mantidas em diferentes salas climatizadas, nos demais experimentos as placas foram incubadas no escuro a 20 °C.

Para a determinação do pH do meio O BDA foi pesado e dissolvido, com aquecimento, em 10 vezes o seu peso em água MILLI-Q. O pH foi medido em pHmetro quando a mistura estava em 30°C.

Para a determinação do efeito da temperatura sobre o crescimento micelial dos macrofungos as placas contendo meio BDA foram preparadas, inoculadas e incubadas no escuro em diferentes salas climatizadas a 20 °C, 22 °C, 25 °C e 28 °C, com variação de  $\pm 1$  °C.

##### 4.4.1.2 Crescimento micelial radial

O crescimento micelial foi desenvolvido em placas estéreis (descartáveis), de 90 mm de diâmetro, contendo meio de batata-dextrose-ágar comercial (BIOBRÁS). Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para acompanhar o crescimento radial do micélio, foram traçadas retas perpendiculares nas placas e foram feitas medições, com a ajuda de um paquímetro, do micélio em crescimento, considerando o diâmetro maior entre as hifas. Estas medidas foram realizadas a cada 24 horas.

Com as informações sobre os diâmetros dos micélios, foram feitos gráficos relacionando os raios das colônias (mm) com o tempo (dias). Foram aplicadas linhas de tendência dos gráficos e o nível de crescimento micelial radial foi estabelecido pela inclinação (coeficiente angular) destas linhas de tendência.

#### 4.4.1.3 Análises estatísticas

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão e as médias foram consideradas significativamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ . Para isto foi utilizado o programa STATISTICA: ANOVA/ MANOVA de uma ou mais vias (dependendo da análise) e o teste Tukey para as análises de significância.

#### 4.4.1.4 Efeito do pH inicial no crescimento micelial dos macrofungos

O BDA (3,9 g) foi dissolvido em 90 ml de água destilada e esterilizado. Com o meio ainda líquido, foram adicionados os seguintes compostos descritos na TABELA 1.

**TABELA 1 QUANTIDADES DE H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100mM) E K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100mM) A SEREM ADICIONADAS NO BDA PARA OBTENÇÃO DE DIFERENTES pHs**

	pH 3,8	pH 4,5	pH 5,7	pH 7,2
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (100mM)	10,0 ml	6,5 ml	—	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100mM)	—	3,5 ml	10,0 ml	1,0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (100mM)	—	—	—	9,0 ml

As placas contendo meio BDA em diferentes pHs foram preparadas e inoculadas, conforme descrito no item 4.4.1.2 e então foram incubadas no escuro a 20 °C.

#### 4.4.1.5 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento micelial dos macrofungos

Em 90 ml do BDA preparado foram adicionados, individualmente, 10 ml das soluções contendo 0,5, 1,0 e 2,0 gramas das fontes de nitrogênio simples e complexas, sendo as simples: tartarato de amônio ( $\text{NH}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ); cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); fosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), e as complexas: extrato de levedura e extrato de malte.

As placas contendo os meios foram preparadas e inoculadas, conforme descrito no item 4.4.1.1 e então foram incubadas no escuro a 20 °C.

#### 4.4.2 Efeito das condições do meio no crescimento micelial de *Lentinula boryana* (BERK. & MONT.) Pegler crescido sobre membranas

##### 4.4.2.1 Preparo dos materiais

As membranas utilizadas nestes experimentos foram obtidas a partir do corte de sacos de diálise, MEMBRA-CEL MD20 X 100CLR. Os sacos foram hidratados, abertos e cortados nas dimensões de 5 cm por 5cm. Estas membranas foram colocadas em erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de água destilada e foram esterilizadas em autoclave a 120 °C por 15 minutos

Todos os materiais foram preparados conforme descrito no item 4.4.1.1, apenas que, após a gelificação dos meios, as membranas previamente esterilizadas foram colocadas no centro das placas. Da mesma forma, as inoculações foram realizadas conforme descrita anteriormente (item 4.4.1.1), apenas os inóculos foram colocados sobre as membranas. Foi feita incubação das placas no escuro a 20 °C.

##### 4.4.2.2 Determinação do crescimento radial e da massa micelial seca de *Lentinula boryana*

Os crescimentos radiais foram determinados conforme descrito no item 4.4.1.2. As massas miceliais secas foram determinadas retirando os micélios crescidos sobre as

membranas, com ajuda de uma espátula de inox. Os micélios foram secos em estufa a 60 °C e dessecador até peso constante.

#### 4.4.2.3 Efeito do pH inicial do meio no crescimento micelial (radial e massa seca) de *Lentinula boryana*

As placas contendo BDA com diferentes pHs iniciais foram preparadas como descrito no item 4.4.1.4, então foram adicionadas as membranas às placas e foram feitas as inoculações conforme descrito no item 4.4.2.1. As medidas de crescimento foram realizadas diariamente e as massas secas dos micélios foram determinadas após 7 e 12 dias de cultivo.

#### 4.4.2.4 Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre o ganho de massa micelial seca de *L. boryana* após 10 dias de cultivo

Em 90 ml do BDA, preparado conforme item 4.4.1.1, foram adicionados, individualmente, 10 ml das soluções contendo 0,5 gramas das fontes de nitrogênio: tartarato de amônio ( $\text{NH}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ); sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); fosfato de amônio monobásico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), peptona, extrato de levedura e extrato de malte.

Após incubação de 10 dias no escuro a 20 °C, os micélios foram removidos e a massa micelial seca foi determinada conforme descrito no item 4.4.2.2.

#### 4.4.2.5 Efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de malte no crescimento micelial (radial e massa seca) de *Lentinula boryana*

Em 90 ml de BDA preparado, conforme item 4.4.1.1, foram adicionados, individualmente, 10 ml das soluções contendo 0,25; 0,5; 1; 2; 3 gramas de extrato de malte, previamente esterilizado. Foram adicionadas as membranas e as placas foram incubadas a 20 °C no escuro, conforme descrito no item 4.4.2.1. As medidas do crescimento radial foram realizadas todos os dias, semelhante ao item 4.4.1.2, e as massas secas foram obtidas após 7 e 11 dias de fermentação, conforme descrito no item 4.4.2.2.

#### 4.5 OBSERVAÇÃO DOS FATORES INFLUENCIADORES DA PRODUÇÃO DE PIGMENTO TIPO MELANINA POR *L. boryana* E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DESTA MELANINA.

##### 4.5.1 Registro fotográfico

Durante o crescimento micelial de *Lentinula boryana* nas diferentes condições de cultivo, ocorreram mudanças na coloração do meio de cultivo e do próprio micélio. Estas mudanças de coloração foram registradas por fotografias utilizando uma máquina digital marca D-150 Zoom OLYMPUS brio zoom, as placas foram colocadas a uma distância média de 50 cm da câmara fotográfica.

##### 4.5.2 Efeito da temperatura na produção de melanina

A produção de pigmento escuro ocorreu durante o experimento sobre efeito da temperatura no crescimento micelial de *L. boryana* e *L. edodes*, conforme descrito no item 4.4.1.5. Para confirmar esta observação foram feitas novas placas e repetido o experimento, e então foi feito registro fotográfico, conforme item 4.5.1.

##### 4.5.3 Efeito da idade do micélio e da disponibilidade de nutrientes na produção de melanina em resposta à variação de temperatura

Três placas contendo BDA foram preparadas e inoculadas, conforme descrito no item 4.4.1.2, e então foram incubadas no escuro, durante 15 dias, após este período as placas foram transferidas para sala de cultivo a 28 °C. Após 20 dias as placas foram retiradas e fotografadas, conforme item 4.5.1.

Outras três placas, contendo BDA, foram preparadas, foi adicionada a membrana sobre o meio e foi feita a inoculação sobre esta membrana, conforme descrito no item 4.4.2.1. Inicialmente estas três placas foram mantidas em sala de cultivo a 20 °C. Após 12 dias de incubação os micélios crescidos sobre as membranas foram transferidos para três novas placas, que continham BDA recentemente preparado. Após este período estas novas

placas foram mantidas a 28 °C, por mais 20 dias. Então as placas foram retiradas e fotografadas, conforme item 4.5.1.

#### 4.5.4 Efeitos dos contaminantes e da interação entre micélios na produção de melanina

Em placas de Petri de 150 mm de diâmetro interno contendo 30 ml de BDA, preparado conforme descrito no item 4.4.1.1, foram inoculados dois discos (6 mm) de BDA contendo uma cultura nova de *L. boryana* e dois discos de *L. edodes*, as placas foram mantidas em sala de cultivo a 20 °C os resultados foram observados e fotografados conforme item 4.5.1.

#### 4.5.5 Efeito da concentração de ágar na produção de melanina

Em meio líquido de extrato de batata (Extração Longa), dextrose (2%) e extrato de malte (1%), preparado conforme será apresentado no item 4.5.7.2, foram adicionados diferentes concentrações de ágar bacteriológico (0; 0,5; 1; 2; 3 %). Três ml destes meios foram colocados em tubos de ensaio de 70 mm de altura com um diâmetro interno de 10 mm. Após o resfriamento e gelificação do meio, cada tubo recebeu um disco de BDA (6 mm de diâmetro) contendo uma cultura recente de *Lentinula boryana*. Os tubos foram incubados durante dois dias, no escuro em sala climatizada a 20 °C. Após este período, os tubos foram transferidos para 28 °C, permanecendo nestas condições por 28 dias. Os resultados foram observados e registrados por fotografia conforme item 4.5.1.

#### 4.5.6 Efeito do oxigênio na produção de melanina

O BDA foi preparado conforme item 4.4.1.1, e 3 ml do mesmo foram colocados em cada tubo de ensaio de tampa rosqueada, com as seguintes dimensões: altura-100 mm; diâmetro interno 12 mm. Após a gelificação o meio foi inoculado com um disco de 6 mm BDA contendo uma cultura recente de *L. boryana*. Os tubos foram fechados de maneira que não permitissem a troca de gases com o ambiente e foram incubados no escuro a 20 °C. Depois de 5 dias de incubação, três tubos foram abertos, e suas tampas foram mantidas

parcialmente fechadas. Estes três tubos, juntamente com outros três que ficaram mantidos fechados foram transferidos para 28 °C e mantidos nestas condições por 20 dias.

4.5.7 Estimativa da produção de melanina por *L. boryana* e *L. edodes* em meio líquido nas temperaturas de 20 e 28 °C.

4.5.7.1 Preparo do inóculo de *L. boryana* e *L. edodes* em meio sólido(BDA)

Em placas de Petri de 150 mm de diâmetro interno, foram adicionados 30 ml de BDA, preparado conforme descrito no item 4.4.2.1, adicionado de extrato de malte (2%). Nestas placas foram colocadas 4 membranas esterilizadas e sobre estas membranas foram colocados 4 inóculos de cada um dos dois macrofungos. As placas foram mantidas a 20 °C por 10 dias. Após este período os micélios crescidos sobre as membranas foram retirados com ajuda de uma espátula de inox. Separadamente, quatro micélios de cada fungo, crescidos sobre as membranas, foram colocados em liquidificador de metal, previamente esterilizado, acrescido de 33,33 ml de água destilada estéril. O micélio foi moído durante 5 segundos na velocidade máxima do equipamento, então o micélio foi filtrado em peneira de aço inoxidável, a fração retida na peneira foi retornada ao liquidificador e o processo foi repetido mais duas vezes.

Cada frasco de cultivo foi inoculado com 10 ml desta suspensão de micélio.

4.5.7.2 Preparo do meio líquido de batata dextrose e extrato de malte

O meio de cultivo líquido foi preparado pela extração dos nutrientes de batatas compradas no mercado local. As batatas foram lavadas, descascadas, e ralada em ralador, e então 240 g destas batatas raladas foram extraídas em água destilada a 100 °C, por trinta minutos. Ao extrato obtido foram adicionados 24 g de glucose anidra e 12 g de extrato de malte. Foi completado o volume de água para 1080 ml.

Este meio líquido (90 ml cada) foi transferido para 12 erlenmeyers de 500 ml. O meio e os demais materiais utilizados foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120 °C. Após o resfriamento, foram adicionados 10 ml de suspensão de micélio (inóculo).

Metade dos frascos foram inoculados com o *L. boryana* e outra metade foi inoculada com *L. edodes*. Então foi feito um cultivo em duas etapas, na primeira etapa os frascos foram inoculados sem agitação, no escuro a 20 °C por 21 dias. Após este período iniciou-se uma segunda etapa, em que três frascos de cada macrofungo foram transferidos para um agitador de frascos (120 rpm), no escuro em sala climatizada de 28 °C. Os demais frascos foram mantidos nas mesmas condições da primeira etapa. Passados 10 dias da segunda etapa, em condições estéreis, foram retirados 1 ml de cada um dos 12 frascos, este procedimento foi repetido por mais 4 vezes com um intervalo de 5 dias entre cada retirada de amostras. As amostras foram congeladas e armazenadas em freezer a -10 °C. Depois da última retirada de alíquotas, as densidades ópticas das amostras foram analisadas em espectrofotômetro marca FEMTO modelo 700 *plus*, em 475 nm (NAKAMURA et al., 2003).

#### 4.5.8 Avaliação da atividade antibiótica *in vitro* dos caldos de cultivo de *L. boryana* e *L. edodes* e da melanina purificada.

Neste experimento foram utilizados os meios de cultivo obtidos no experimento sobre a produção de melanina por *L. boryana* e *L. edodes* item 4.5.7. Após 30 dias da segunda etapa, foi separado um frasco de cada macrofungo crescidos nas duas condições (20 e 28 °C), os meios de cultivo foram separados do micélio por filtração em lã de vidro. 50 ml de cada caldo de cultivo foram colocados em béquer de 250 ml, e os frascos foram mantidos em estufa ventilada a 50 °C até a secura. Foram retirados com espátula 20 mg do resíduo de cada béquer e dissolvidos em 200 µl de água destilada, 20 µl destas soluções foram aplicados em discos de antibiograma, estes discos foram secos em liofilizador.

#### 4.5.9 Preparo dos materiais para o antibiograma.

O meio ágar Muller Hinton (BIOBRAS) comercial (3,8 g) foi pesado e dissolvido em 100 ml de água destilada, após 10 minutos a temperatura ambiente. O meio foi aquecido até a fervura.

Da mesma forma o meio ágar Nutriente (BIOBRAS) (3,1 g) foi pesado e dissolvido em 100 ml de água destilada, após 10 minutos a temperatura ambiente. O meio foi aquecido até a fervura, em seguida os materiais foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C. O ágar nutriente foi colocado em tubos de ensaio que foram mantidos inclinados até a gelificação. Cerca de 30ml do ágar Muller Hinton foram transferidos para placas de Petri estéreis de 190 mm de diâmetro.

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* metacilina resistente (MSRA) foram inoculadas nos tubos contendo o ágar nutriente e incubadas a 36 °C por 24 horas. Após este período, com auxílio de uma alça de platina, foi retirado uma alíquota de cada bactéria e feita uma solução em NaCl 0,9%. A turbidez destas soluções foi ajustada entre os valores de 0,05 e 0,1 da escala de MCFARLAND (0,05; 0,1 e 0,2 ml de cloreto de bário em 10 ml de ácido sulfúrico).

Com a ajuda de um *swab* de cabo plástico as bactérias foram inoculadas homogeneamente nas placas com o meio Muller Hinton. Após a secagem (alguns minutos) foram adicionados os discos contendo os meios de cultivo em estudo. Como controle positivo foram colocados discos comerciais contendo os antibióticos gentamicina, clindamicina e vancomicina. Então as placas foram inoculadas a 36 °C. Após 24 horas as placas foram retiradas e fotografadas.

Paralelamente, foi feita a verificação da atividade antibacteriana da melanina produzida. Para isto foi utilizada a melanina “purificada”, conforme descrito a seguir no item 4.5.10, 150 mg desta melanina foram dissolvidos em 150 µl de solução de KOH (0,05 M). Foram adicionados em cada disco de antibiograma 5, 10 e 15 µl desta solução de melanina. Como controle negativo foi utilizada esta mesma solução de KOH (0,05M). Os demais procedimentos foram idênticos aos citados acima.

#### 4.5.10 Purificação da melanina produzida por *L. boryana* e obtenção das amostras utilizadas nas análises de RPE, RMN e IV.

O micélio de *L. boryana* foi cultivado em meio líquido (BD e 1% de extrato de malte) durante 21 dias a 20 °C e então foi transferido para sala a 28 °C, item 4.5.7. Após 30 dias em 28 °C, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração em lã de vidro. Este micélio foi extraído a quente (70 °C), com solução de NaOH 0,1 M. Foram feitas três extrações a quente e as extrações foram agrupadas. Então foi feita a precipitação da melanina com a adição de HCl até pH 3 e o precipitado foi retirado do sobrenadante por centrifugação. Este precipitado foi dissolvido em NaOH (1 M), para cada 1 ml de solução de NaOH foram adicionados 4 ml de água destilada. Então a melanina foi precipitada novamente com HCl e retirada por centrifugação. Este processo foi repetido mais três vezes e ai então a melanina foi seca por liofilização (DELLA-CIOPPA et al., 1998).

Os micélios utilizados nas análises do EPR e do infravermelho foram obtidos da mesma maneira acima, sem que tenha sido realizada a extração com NaOH.

O exsudato analisado por infravermelho foi retirado do micélio de *L. boryana* produzido em meio sólido contendo BDA e extrato de malte (1%). Este micélio foi crescido em 20 °C por 10 dias e então transferido para 28 °C, sendo mantido assim por 60 dias.

#### 4.5.11 Estudo da interação entre íons metálicos e as melaninas produzidas por *L. boryana* por espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Para as análises de RPE as amostras sólidas (liofilizadas) foram colocadas em tubos de quartzo e analisadas em espectrômetro BRUKER, modelo ESP 300 E, banda X (9,5 GHz) com modulação de frequência de 100 KHz. As amostras foram analisadas a 77 K (nitrogênio líquido). Foram utilizados também os programas WIN-EPR<sup>®</sup> Version 1.0 e o programa SinFonia<sup>®</sup>.

#### 4.5.12 Análise da melanina “purificada” por ressonância magnética nuclear (RMN)

Para esta análise, 50 mg da melanina “purificada” foram dissolvidos em NaOH/D<sub>2</sub>O. As amostras dissolvidas foram colocadas em tubo de RMN de 5 mm de diâmetro interno e os espectros de ressonância magnética nuclear carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) e de RMN-<sup>1</sup>H foram obtidos como descrito anteriormente no item 4.3.7.

#### 4.5.13 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da melanina produzida por *L. boryana*

Foi pesado 1 mg das amostras a serem analisadas e adicionados 99 mg de KBr grau espectroscópico. Então foram feitas pastilhas destas misturas em pastilhadora com 8 toneladas por cm<sup>2</sup> de pressão. Estas pastilhas foram analisadas em espectrofotômetro marca BIO-RAD série Excalibur.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ESTUDO COMPARATIVO SOBRE OS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *Lentinula boryana* (BERK. & MONT.) PEGLER E DE *Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER.

#### 5.1.1 Rendimentos obtidos nas extrações com água a 100 °C e nos processos de gelo e degelo

Como descrito no item 4.3.1 de materiais e métodos, os corpos de frutificação, doados para as análises pelos pesquisadores da EMBRAPA–FLORESTAS, foram extraídos com água quente e precipitados com 3 volumes de etanol gelado.

Os precipitados etanólicos de *L. boryana* e *L. edodes* foram chamados de **pptLb** e **pptLe**, respectivamente. Do processo de gelo e degelo, conforme descrito no item 4.3.2, as frações insolúveis e as frações solúveis em água gelada foram chamadas de **LbI** e **LbS** para o *L. boryana* e **LeI** e **LeS** para o *L. edodes* respectivamente. Os rendimentos das extrações, as proporções das frações solúveis e insolúveis estão demonstrados na tabela 2.

**TABELA 2. RENDIMENTOS ENCONTRADOS PARA OS PRECIPITADOS ETANÓLICOS, FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DE *L. boryana* E *L. edodes***

	Precipitado etanólico mg/g de cogumelo	Fração insolúvel (G/D) %(p/p) precipitado total	Fração (G/D) solúvel %(p/p) precipitado total
<i>Lentinula boryana</i>	50,58 ( <b>pptLb</b> )	22,4 ( <b>LbI</b> )	77,6 ( <b>LbS</b> )
<i>Lentinula edodes</i>	73,32 ( <b>pptLe</b> )	11,5 ( <b>LeI</b> )	88,5 ( <b>LeS</b> )

Estes resultados mostram que o **pptLb** foi menor que **pptLe**, mas não pode-se com isto concluir que a concentração de polissacarídeos presentes nos corpos de frutificação de *Lentinula boryana* é inferior ao *Lentinula edodes*, uma vez que não foi feita uma extração exaustiva, durante várias horas, com um acompanhamento da extração de carboidratos.

#### 5.1.2 Dosagem de proteínas nos precipitados etanólicos

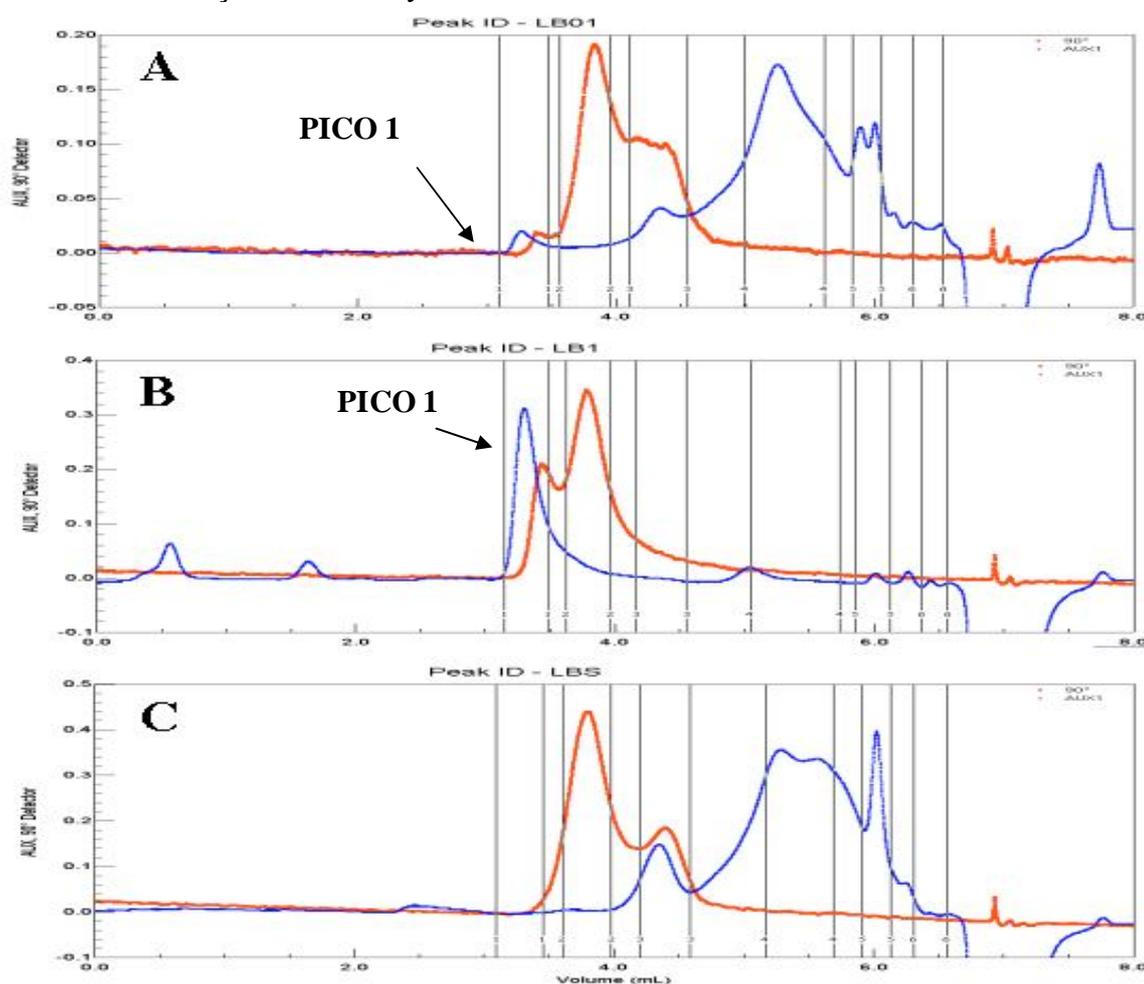
As quantidades de proteínas encontradas nos precipitados etanólicos dos corpos de frutificação de ambos os cogumelos foram bastante similares, sendo que para o *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana* foram encontrados respectivamente 62 e 58 mg por grama de precipitado.

#### 5.1.3 Determinação da distribuição das macromoléculas por HPSEC-MALLS

Nas análises por HPSEC-MALLS, as amostras, que são misturas de macromoléculas, são passadas em uma coluna de exclusão estérica e detectadas por dois detectores diferentes, um de índice de refração RID (linhas azuis nos gráficos) que indicam as concentrações relativas das moléculas e outro de espalhamento de luz (linhas vermelhas nos gráficos) que são referentes às massas moleculares relativas das moléculas.

O perfil de distribuição das macromoléculas encontradas no precipitado etanólico (**pptLb**), na fração insolúvel (**LbI**) e na solúvel (**LbS**) de *Lentinula boryana* estão mostrados na figura 5 (a), (b) e (c) respectivamente.

**FIGURA 5. ANÁLISES DAS MACROMOLÉCULAS PROVENIENTES DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. boryana* POR HPSEC-MALLS**

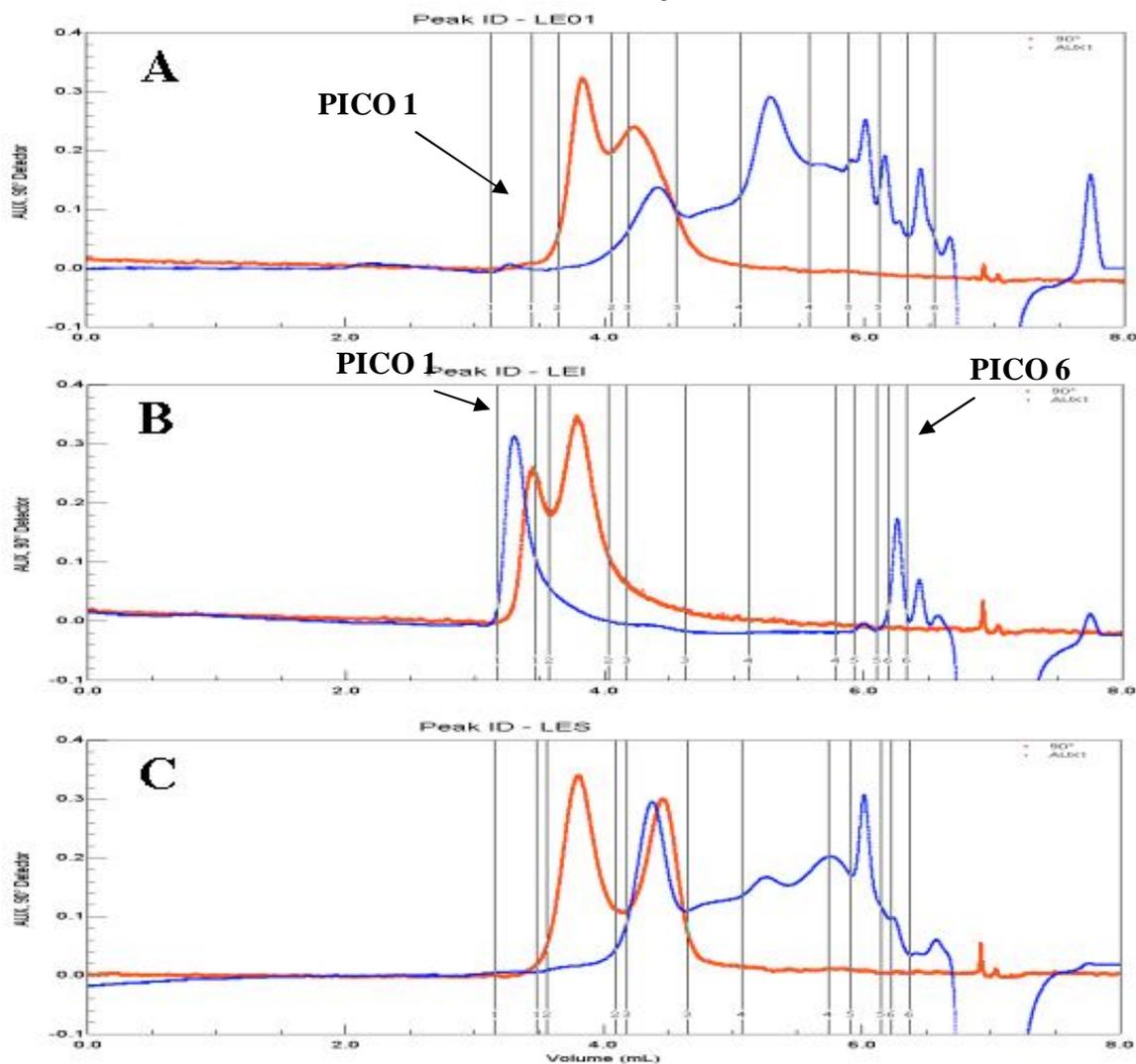


Espectros de HPSEC-MALLS de A – pptLb (precipitado proveniente de *L. boryana*); B – LbI (fração insolúvel no processo de gelo e degelo- G/D) ; C – LbS (fração solúvel no G/D). Linhas vermelhas referentes ao espalhamento de luz; Linhas azuis referentes ao índice de refração.

Como era esperado, as análises do HPSEC-MALLS sugerem que, com o processo de gelo e degelo, houve uma prévia separação das moléculas, as moléculas com peso molecular maior ficaram insolúveis em água gelada, o que pode ser observado pelo aumento da concentração (linha azul) do pico 1 na figura 5 b em relação ao pico 1 da figura 5 a. Os perfis apresentados no HPSEC-MALLS juntamente com os rendimentos apresentados na tabela 2 sugerem que a fração solúvel (**LbS**) é a porção maior do precipitado etanólico (**pptLb**), mas possivelmente têm maior número de macromoléculas.

As análises do HPSEC-MALLS das frações, **pptLe**, **LeI** e **LeS**, referentes ao cogumelo *L. edodes*, estão mostradas na figura 6 (a), (b) e (c), respectivamente.

**FIGURA 6. ANÁLISES POR HPSEC-MALLS DAS MACROMOLÉCULAS PROVENIENTES DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. edodes*.**



Espectros de HPSEC-MALLS de A – pptLe (precipitado proveniente de *L. edodes*); B – LeI (fração insolúvel no processo de gelo e degelo- G/D) ; C – LeS (fração solúvel no G/D). Linhas vermelhas referentes ao espalhamento de luz; Linhas azuis referentes ao índice de refração

Novamente para o *L. edodes* as análises do HPSEC-MALLS sugerem uma purificação parcial com o processo de gelo e degelo, sendo que as moléculas com pesos moleculares maiores ficaram na fração insolúvel (pico 1 da figura 6 b ).

O comportamento das amostras **pptLb** e **pptLe** frente ao processo de gelo e degelo foi muito similar, mas ao menos uma diferença pode ser observada, que foi a maior concentração de um “contaminante” na fração insolúvel do *L. edodes*, representado pelo pico 6 da figura 6 b.

#### 5.1.4 Determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos dos dois macrofungos

As composições monossacarídicas dos polissacarídeos das amostras foram obtidas por análise, em CG-EM, dos derivados alditóis-acetato, conforme descrito no item 4.3.5 de materiais e métodos. Os resultados destas análises estão mostrados na tabela 3.

**TABELA 3. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES pptLb e pptLe, LbI, LeI, LbS e LeS**

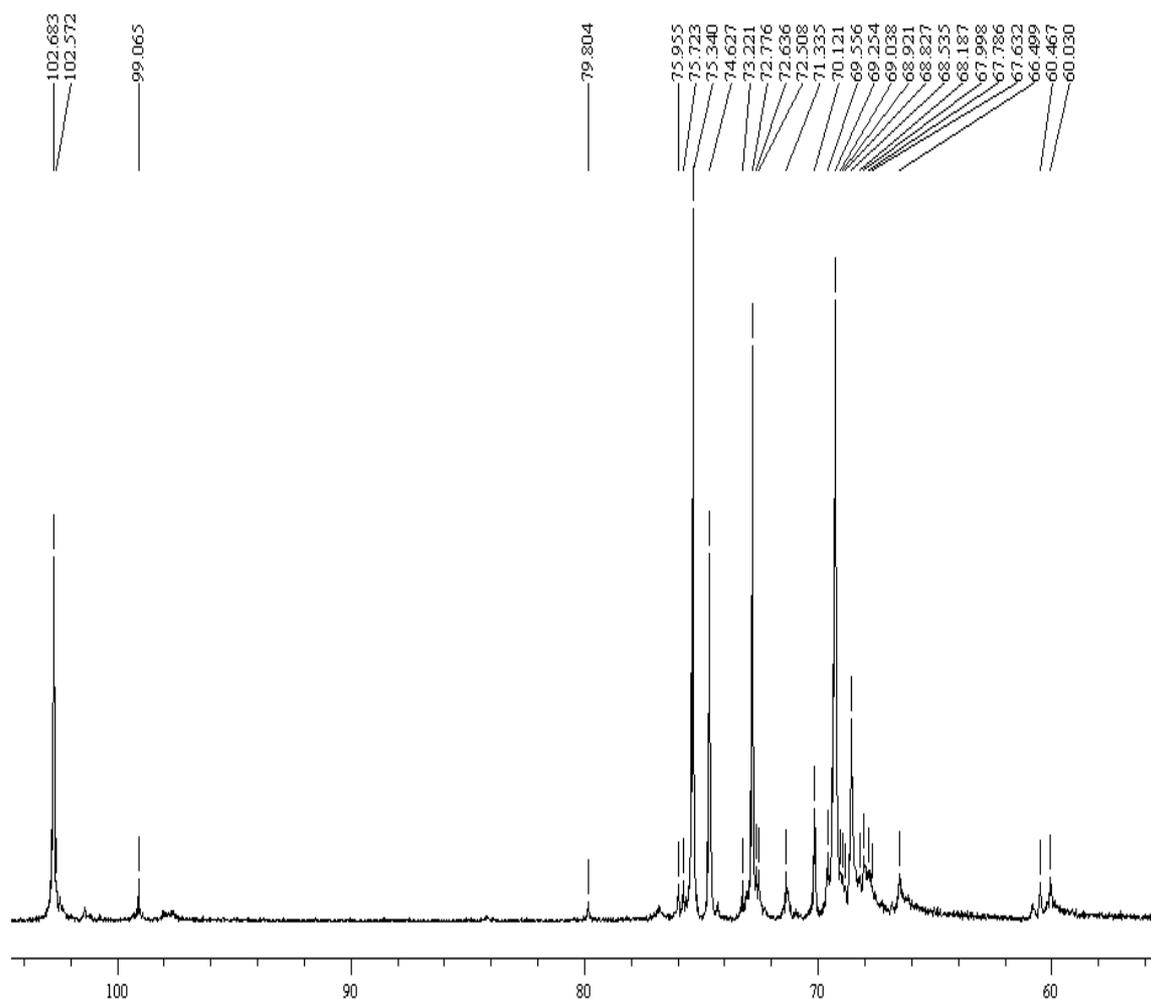
Frações	Composição monossacarídica(%)							
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
<b>pptLb</b>	0,9	1,5	1,4	1,2	0,4	8,6	15,3	70,7
<b>LbI</b>		0,8		0,2		5,2	6,3	87,5
<b>LbS</b>		4,7	1,5	0,9	0,3	14,4	23,7	54,2
<b>pptLe</b>	0,6	3,8	2,8	0,5	0,5	11,4	20,2	60,2
<b>LeI</b>			3,1	1,8		14,6	9,6	71,5
<b>LeS</b>		3,1	1,1	1,0		16,9	22,7	54,9

Ambos os precipitados etanólicos de *Lentinula boryana* e *Lentinula edodes* e (**pptLb** e **pptLe**) apresentaram, nas suas composições monossacarídicas, uma predominância muito similar de três açúcares principais: glucose, galactose e manose. Apenas a glucose em **pptLb** apresentou uma concentração um pouco mais elevada de 70,7 % em relação ao **pptLe** (60,2%). Também pode-se observar que com o processo de gelo e degelo, ocorreu um aumento da concentração de glucose nas frações **LbI** e **LeI**.

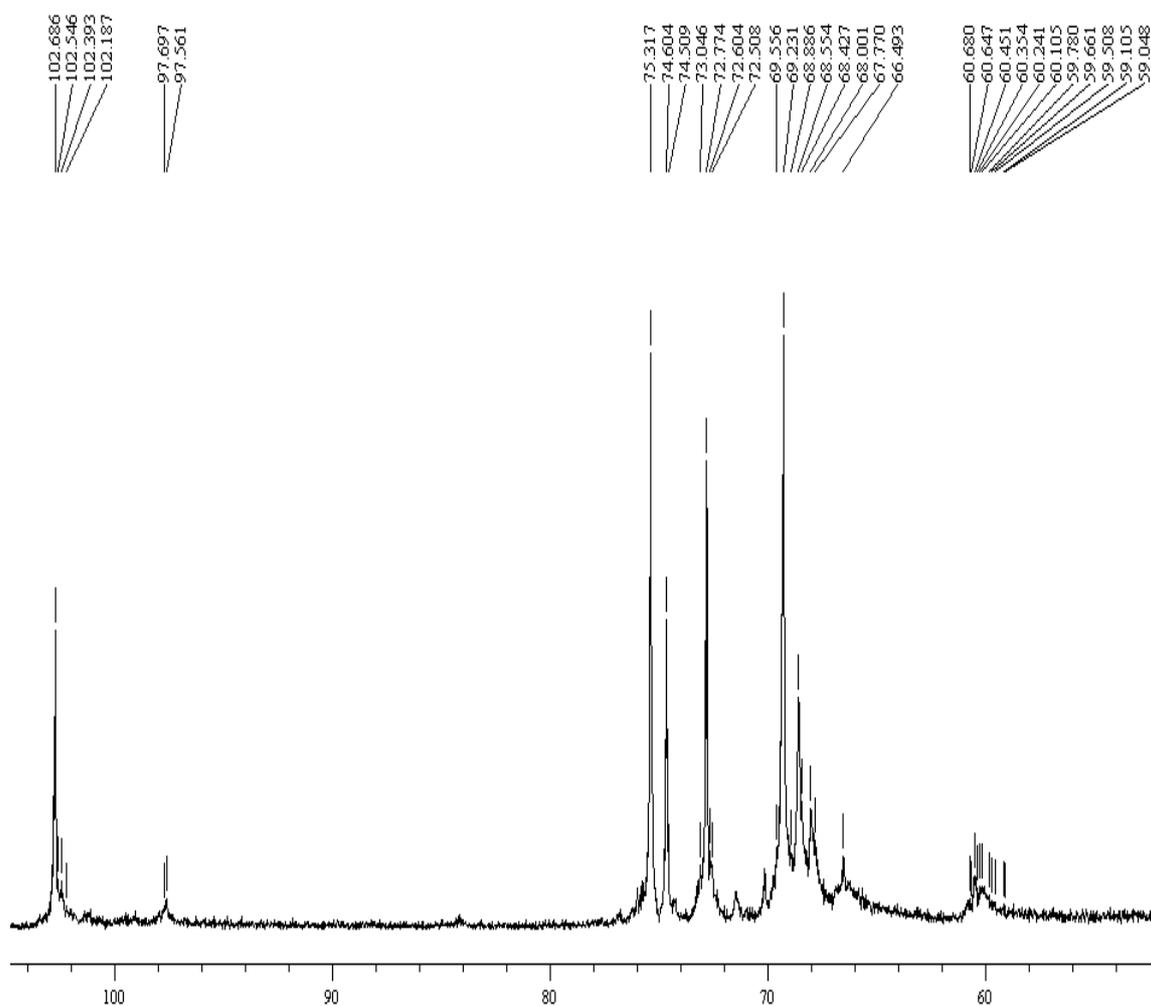
### 5.1.5 Análise das ligações glicosídicas dos polissacarídeos por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) e por metilação

As análises das ligações glicosídicas dos polissacarídeos dos precipitados etanólicos (**pptLb** e **pptLe**) foram feitas por RMN-<sup>13</sup>C, conforme descrito no item 4.3.7. Estas análises visam a observação, no espectro de picos característicos das ligações glicosídicas.

Na figura 7 está mostrado o espectro de RMN-<sup>13</sup>C do precipitado etanólico de *L. boryana*, onde pode ser observado na região de carbono anomérico dois principais sinais em  $\delta 102,6$  e  $\delta 102,7$ , característicos de ligação glicosídica do tipo  $\beta$  e o sinal em  $\delta 99,1$  referente a unidades em configuração  $\alpha$ . A região referente a carbono 6 livre mostra picos em  $\delta 60,0 - \delta 50,5$  com pequena intensidade, na região referente a ligação do carbono 6 ligado ( $\delta 67,6 - \delta 69,5$ ) há picos de grande intensidade. Estes dados sugerem presença de ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 6). A figura 8 é referente ao precipitado etanólico de *L. edodes* e pode ser observado um espectro semelhante ao obtido para *L. boryana*, com uma pequena diferença nos sinais em  $\delta 97,7$  e  $\delta 97,6$  que podem sugerir unidades de  $\alpha$ -Galp e  $\alpha$ -Manp.

**FIGURA 7. ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO pptLb.**

Espectro de Ressonância Nuclear Magnética do precipitado etanólico de *L. boryana*. Para esta análise a amostra foi dissolvida em  $\text{D}_2\text{O}$ . Deslocamentos químicos expressos em ppm.

**FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO pptLe**

Espectro de Ressonância Nuclear Magnética do precipitado etanólico de *L. edodes*. Para esta análise a amostra foi dissolvida em  $\text{D}_2\text{O}$ . Deslocamentos químicos expressos em ppm.

Com o intuito de comparar os polissacarídeos presentes nas frações **LbI**, **LeI**, **LbS** e **LeS**, foram feitas análises de RMN-<sup>13</sup>C (item 4.3.7) e por espectrometria de massa dos derivados alditois-acetato parcialmente metilados, item 4.3.6 de materiais e métodos. Os resultados destes dois tipos de análises estão apresentados em conjunto. Os resultados da metilação estão apresentados em porcentagens, mas não são referentes a todos os derivados encontrados, são relativos apenas aos maiores picos.

A figura 9 e 10 são referentes aos espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações insolúveis em água fria de *L. boryana* (**LbI**) e *L. edodes* (**LeI**), respectivamente. Os principais assinalamentos observados nos espectros e os tipos de ligações que eles sugerem estão relacionados na tabela 4.

**TABELA 4 PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS ENCONTRADOS NOS ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C DAS AMOSTRAS LbI E LeI**

Tipos de Ligações	Principais regiões de assinalamentos <sup>1</sup>	
	<i>Lentinula boryana</i>	<i>Lentinula edodes</i>
	( <b>LbI</b> )	( <b>LeI</b> )
C-1 O-substituído em conf. β	δ 102,7 - δ 102,8	δ103,0 - δ103,1
C-3 O-substituído em conf. β	δ 85,8 – δ 86,5	δ85,9 – δ86,9
C-6 O-substituído em conf. β	δ 68,5 – δ 68,2	δ68,3 – δ68,6
Carbono 6 livre	δ 60,7 – δ 60,9	δ60,3 – δ61,2

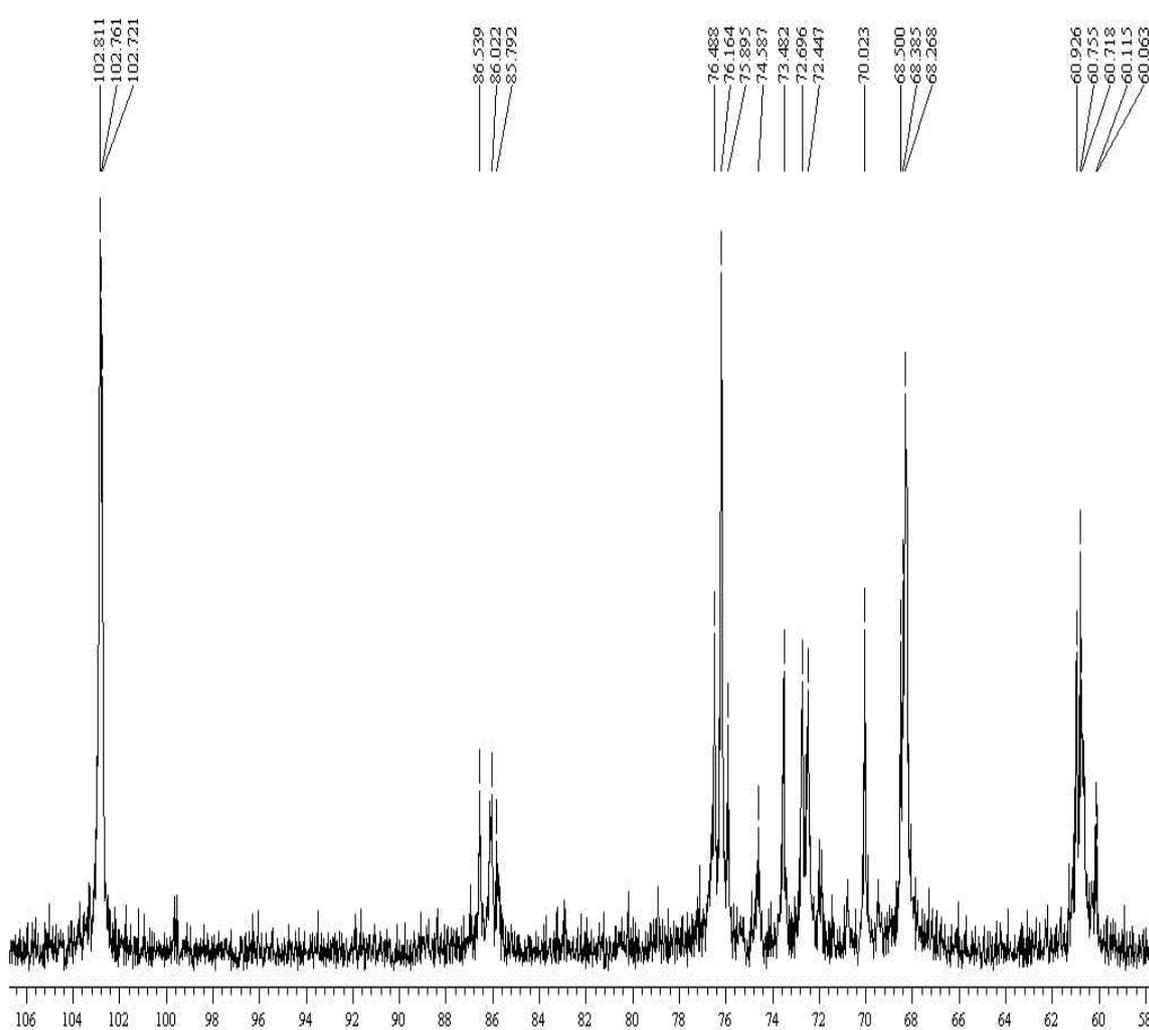
1- Assinalamentos referentes às figuras 9 e 10

As análises por metilação das ligações glicosídicas dos polissacarídeos das amostras por vezes concordam e outras vezes discordam com assinalamentos encontrados nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C. Por exemplo, a evidência da ligação do tipo (1→3) foi confirmada pela presença, em grande proporção do derivado 2,4,6-O-Me-Glucose (53,58% para o **LbI** e 39,79% para o **LeI**). A ligação do tipo (1→6) foi evidenciada pela presença do derivado 2,4-O-Me-Glucose que indica pontos de ramificação nas cadeias dos polissacarídeos (glucose ligada no C1, C3,C6), mas proporções deste derivado foram muito diferentes para as duas amostras ( 32,75% para a **LbI** e 6,92% para a **LeI**) estas proporções encontradas não eram esperadas uma vez que, nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C, os assinalamentos referentes

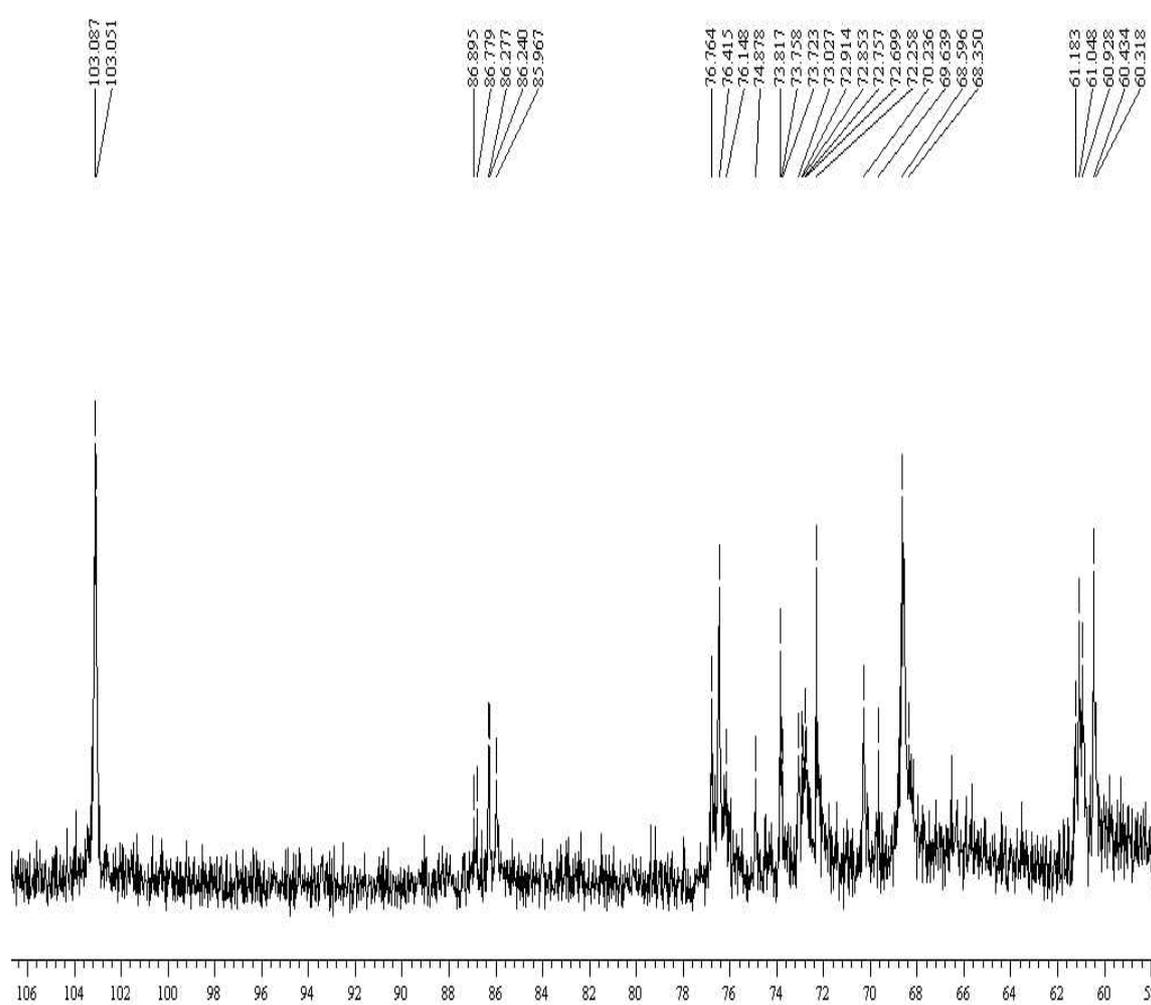
a carbono 6 ligado são proporcionais para as duas amostras, portanto era esperado proporções semelhantes deste derivado. A literatura relata que a lentinana encontrada no *L. edodes* é um polissacarídeo de baixa solubilidade em água (CHIHARA et al., 1970), portanto deve estar presente na fração insolúvel do extrato (**LeI**). A lentinana é um polissacarídeo formado por cadeias de glucose com ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) com ramificações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) numa proporção de 5 ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) para 2  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (MAEDA et al., 1988). Considerando isto, era esperado que a proporção do derivado 2,4-O-Me-Glucose fosse maior. A lentinana possui uma massa molecular estimada entre 300 kDa a 800 kDa (MAEDA et al., 1988). Esta grande massa molecular pode ter dificultado a metilação, pelo iodeto de metila, das unidades da glucose das ramificações, podendo ser este o motivo pelo qual ocorreu a baixa proporção do derivado. Outra possibilidade é que a diferença entre as proporções esteja relacionada à presença de uma glucana  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3) (SHIDA, et al., 1978), ou seja a proporção excedente do derivado 2,4,6-O-Me-Glucose, pode não ser referente a  $\beta$ -glucana e sim a uma  $\alpha$ -glucana.

As proporções de terminais não redutores (2,3,4,6-O-Me-Glucose) encontrados para o **LbI** e **LeI** foram de 4,09% e 16,58%, respectivamente. As proporções de terminais não redutores e de pontos de ramificações, das cadeias dos polissacarídeos, deveriam ser similares, mas isto não ocorre, portanto é mais uma evidência de que o processo de metilação pode não ter sido totalmente efetivo nos pontos de ramificação.

Nas análises dos derivados metilados também foi evidenciada a presença dos derivados 2,3,6-O-Me-Glucose (8,10%-**LbI**; 30,62%-**LeI**) que é referente a ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 4) e do derivado 2,4,6-O-Me-Manose (1,48%-**LbI**; 6,92%-**LeI**) o que é referente a unidades de manose com ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 3). As unidades de glucose com ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 4) podem ser referentes ao glicogênio que é o polissacarídeo de reserva dos fungos (GRIFFIN, 1994). Como visto, estas ligações citadas acima não foram evidenciadas nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C, isto pode ter ocorrido por que quando estas amostras foram dissolvidas em DMSO deuterado, parte do material foi solubilizado enquanto outra parte ficou precipitado.

**FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DE LbI**

Espectro de Ressonância Nuclear Magnética da fração insolúvel no processo de gelo e degelo de *L. boryana*. Para esta análise a amostra foi dissolvida em DMSO deuterado. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

FIGURA 10. ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DE LeI

Espectro de Ressonância Nuclear Magnética da fração insolúvel no processo de gelo e degelo de *L. edodes*. Para esta análise a amostra foi dissolvida em DMSO deuterado. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

Nas figuras 11 e 12 estão representados os espectros de RMN-<sup>13</sup>C das amostras **LbS** e **LeS**, respectivamente. Os principais assinalamentos observados nos espectros e os tipos de ligações que eles sugerem estão relacionados na tabela 5.

**TABELA 5 PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS ENCONTRADOS NOS ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C DAS AMOSTRAS LbS E LeS**

Tipos de Ligações	Principais regiões de assinalamentos	
	<i>Lentinula boryana</i> (LbS)	<i>Lentinula edodes</i> (LeS)
C-1 <i>O</i> -substituído em conf. β	δ 103,9 - δ102,5	δ103,9
C-1 <i>O</i> -substituído em conf. α	δ 100,4 – δ 99,2	δ99,3 – δ99,1
C-3 <i>O</i> -substituído em conf. β	δ85,9 – δ 85,8	δ86,1 – δ85,9
C-6 <i>O</i> -substituído em conf. β	δ86,07 – δ 85,9	δ68,05
Carbono 6 livre e	δ 60,7 – δ 60,9	δ62,2 – δ61,7

Os principais derivados alditóis-acetato parcialmente metilados encontrados para as frações solúveis correspondentes ao *L. boryana* e *L. edodes* estão relacionados na tabela 6, onde pode ser observada para o **LbS** a predominância do derivado 3,4-*O*-Me-Galactose referente a unidades de galactose com ligações do tipo (1→2) e (1→6). Já para o **LeS** a predominância foi do derivado 2,3,6-*O*-Me-Glucose referente a glucose ligada em (1→4). Nos dois fungos o derivado referente a ligação do tipo (1→3) apresentou porcentagens semelhantes, o que ocorreu também com 2,4-*O*-Me-Glucose e o 2,3,4-*O*-Me-Galactose.

**TABELA 6 RESULTADO DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DOS MACROFUNGOS**

Derivados alditóis-acetato parcialmente Metilados	Frações	
	LbS (%)	LeS (%)
2,4,6- <i>O</i> -Me-Glucose	<b>10,15</b>	<b>8,74</b>
2,3,6- <i>O</i> -Me-Glucose	<b>15,23</b>	<b>41,35</b>
2,4- <i>O</i> -Me-Glucose	<b>16,72</b>	<b>11,08</b>
2,3,4- <i>O</i> -Me-Galactose	<b>18,03</b>	<b>17,51</b>
3,4- <i>O</i> -Me-Galactose	<b>39,88</b>	<b>21,32</b>

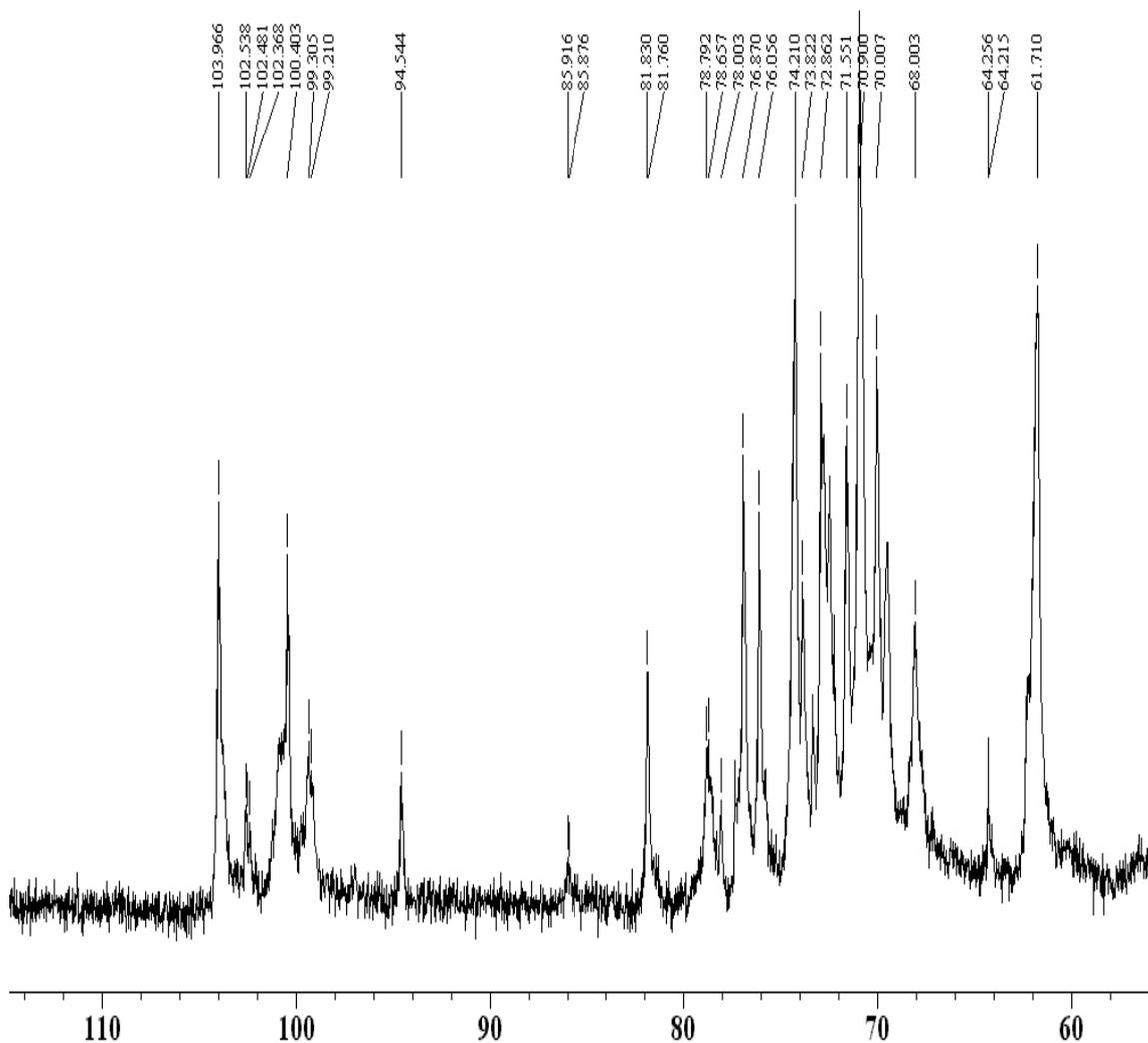
Como visto nas análises de HPSEC-MALLS estas duas frações apresentam uma quantidade variada de diferentes macromoléculas, isto dificulta em muito a avaliação dos resultados de RMN e de metilação, portanto seria inviável sugerir com certa precisão qual a relação entre os derivados alditóis-acetato parcialmente metilados encontrados e os assinalamentos dos espectros de RMN-<sup>13</sup>C.

Shiida et al. (1975) isolaram do corpo de frutificação de *L. edodes* uma heterogalactana, solúvel em água. Os autores sugerem que se trata de uma heterogalactana constituída por um esqueleto principal com unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose com ligação (1→6), a qual está parcialmente substituído no carbono 2 por fucose ou manose, mas é possível também que as cadeias laterais contenham a mesma estrutura do esqueleto principal. Os derivados 2,3,4-*O*-Me-Galactose e 3,4-*O*-Me-Galactose encontrados no presente trabalho podem ser constituintes desta heterogalactana relatada no trabalho referido (SHIDA et al., 1975). Isto sugere que o corpo de frutificação de *L. boryana* pode conter uma heterogalactana também.

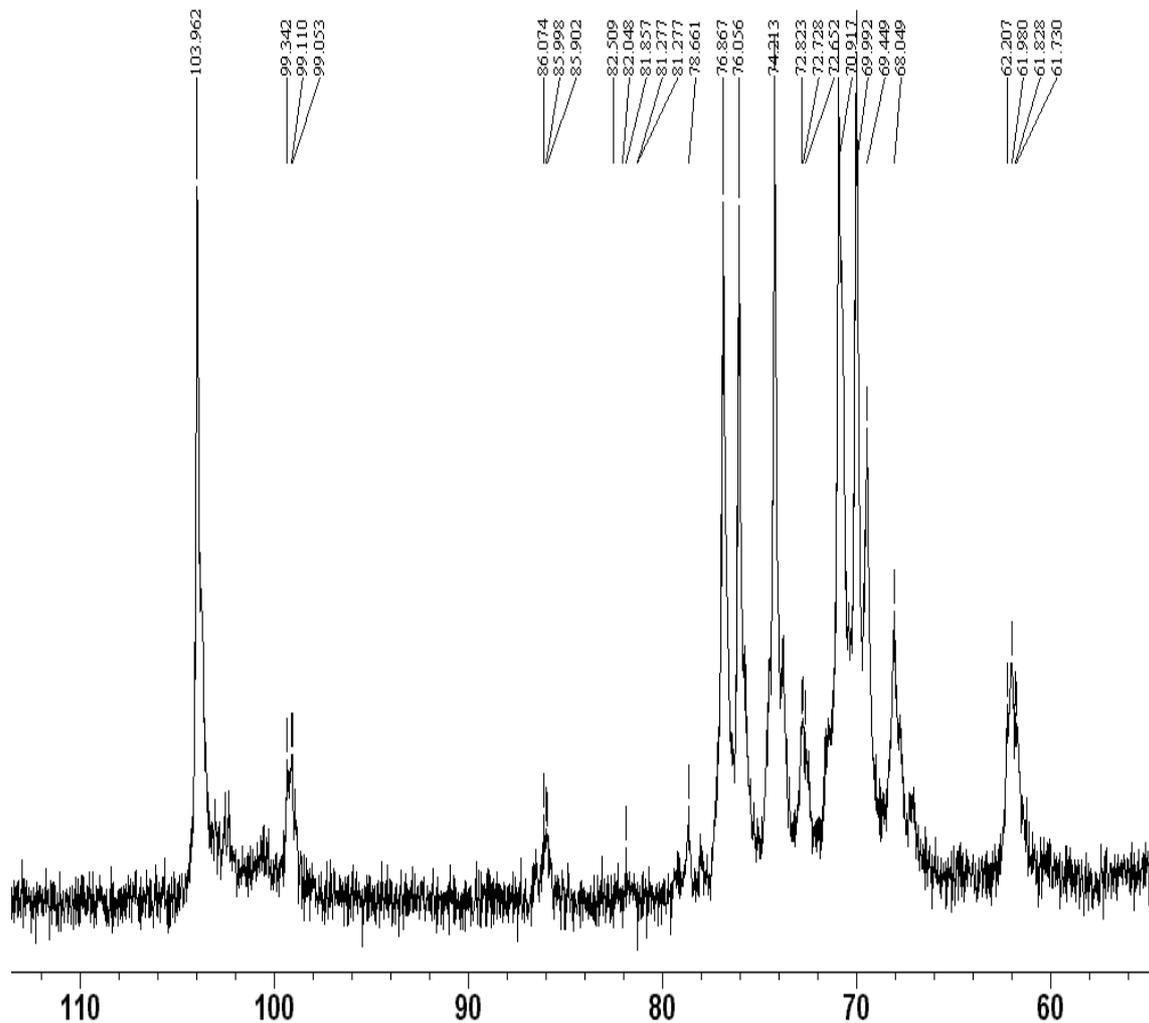
No trabalho realizado por Zhang et al.(1999) foi demonstrada a estrutura química de uma glucana  $\alpha(1\rightarrow3)$  de *L. edodes* no qual propõe algumas relações entre os assinalamentos de RMN-<sup>13</sup>C com as respectivas ligações:  $\delta$ 101,7 e  $\delta$ 100,6 (C-1),  $\delta$ 83,2 (C-3) mas este polímero referido por Zhang et al.(1999) apresentou insolubilidade na água, portanto, provavelmente não estaria presente nas amostras **LbS** e **LeS**. Neste mesmo

trabalho foi identificado uma glucana  $\beta(1\rightarrow3)$  com solubilidade na água, que apresentou os seguintes assinalamentos similares aos encontrados para a lentinana,  $\delta 103,3(\text{C-1})$ ,  $\delta 86,8(\text{C-3})$   $\delta 68,5(\text{C-6 ligado})$  o que foi similar ao encontrado para as amostras **LbI**, **LeI**, **LbS** e **LeS**.

**FIGURA 11. ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DE LbS**



Espectro de Ressonância Nuclear Magnética da fração solúvel no processo de gelo e degelo de *L. boryana*. Para esta análise a amostra foi dissolvida em D<sub>2</sub>O. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

**FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C LeS**

Espectro de Ressonância Nuclear Magnética da fração insolúvel no processo de gelo e degelo de *L. edodes*. Para esta análise a amostra foi dissolvida em D<sub>2</sub>O. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

### 5.1.6 Avaliação do potencial biotecnológico do *L. boryana* pela análise dos polissacarídeos presentes no corpo de frutificação

*Lentinula edodes* é considerado um cogumelo medicinal e este “rótulo” é muitas vezes devido às atividades dos polissacarídeos presentes no corpo de frutificação. O objetivo de fazer uma comparação entre os polissacarídeos de *Lentinula boryana* e *Lentinula edodes* foi para observar as similaridades e diferenças entre eles, avaliando assim o potencial do *L. boryana* como cogumelo medicinal.

Não há relatos na literatura que mostram características dos polissacarídeos contidos no corpo de frutificação de *Lentinula boryana*, sendo este o primeiro trabalho que busca fazer esta verificação. De maneira geral os resultados mostraram que *L. boryana* possui polissacarídeos com características químicas muito semelhantes aos do *L. edodes*, sugerindo que *L. boryana* tem potencial para ser um cogumelo medicinal como o *L. edodes*. As análises de RMN-<sup>13</sup>C e metilação mostraram que o polissacarídeo lentinana provavelmente tenha ficado na fração insolúvel do *L. edodes* e é provável que o *L. boryana* também possua um ou mais polissacarídeos com unidades de glucose com ligações tipo  $\beta(1\rightarrow3)$ , com ramificações  $\beta(1\rightarrow6)$ , semelhantes a lentinana. Mas, afirmar inteiramente que *L. boryana* tem atividades biológicas iguais aos do *L. edodes* é muito precipitado, principalmente por que se sabe que pequenas alterações na estrutura dos polissacarídeos como no grau de ramificação do polissacarídeo (BOHN; BEMILLER, 1995), ou a conformação espacial (tripla hélice) podem alterar sua atividade imunopotencializadora (MAEDA et al., 1988; BOHN; BEMILLER., 1995).

No início dos trabalhos, a amostra de corpos de frutificação de *L. boryana*, disponível, foi de apenas 10 gramas de cogumelo seco. Com isso foi possível apenas realizar estas análises, não sendo possível fazer um isolamento completo dos polissacarídeos. Em julho de 2003 houve uma maior produção deste cogumelo e todo material foi desidratado e armazenado. Assim será possível, em futuros trabalhos, isolar e caracterizar alguns dos polissacarídeos presentes. O isolamento e caracterização da glucana  $\beta(1\rightarrow3)$  com ramificações  $\beta(1\rightarrow6)$  pode aumentar os indícios de que o *L. boryana* é um cogumelo medicinal, mas para a confirmação do seu potencial como cogumelo medicinal são necessários testes de suas atividades biológicas. Os dados contidos na literatura

mostram muitas atividades biológicas de *L. edodes*, como anti-tumoral, anti-inflamatória, antiviral, antitrombótica, antidiabética, antibacteriana (CHIHARA et al., 1970; SASAKI; TAKASUKA, 1976; MAEDA, et al., 1988; CHIHARA; 1990; JONG; BIRMINGHAM, 1993; BEMILLER, 1995; BOHN; BEMILLER, 1995; MIZUNO, 1999; WASSER; WEIS, 1999). Estes trabalhos podem ser utilizados como referências para o desenvolvimento destes futuros trabalhos sobre as atividades biológicas de *L. boryana*.

Além das  $\beta$ -glucanas, os resultados sugerem que há outros polissacarídeos diferentes no corpo de frutificação de *L. boryana*. Em futuros trabalhos podem ser feitos estudos procurando isolar e caracterizar outros polissacarídeos como galactanas (SHIDA et al., 1975),  $\alpha$ -glucanas (SHIDA et al., 1978; ZHANG et al., 1999), bem como avaliar suas atividades biológicas.

## 5.2 ESTUDOS COMPARATIVOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL ENTRE *Lentinula boryana* (BERK. & MONT.) PEGLER E *Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER

Nestes experimentos foram verificadas as influências que determinadas condições de cultivo têm sobre o crescimento dos dois macrofungos. Foram testadas as influências da temperatura, do pH inicial, e de diferentes fontes de nitrogênio. Estes experimentos foram feitos em placas de Petri contendo BDA (batata, dextrose e ágar) comercial. Como medida de crescimento foi determinado o nível de crescimento radial, que é uma relação entre o raio da colônia do micélio e o tempo em dias, conforme descrito no item 4.4.1.2 de materiais e métodos.

### 5.2.1 Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial dos macrofungos

Foram testados os efeitos de diferentes temperaturas (20, 22, 25 e 28 °C) no crescimento radial dos dois macrofungos, descrito no item 4.4.1.3 de materiais e métodos. Nas quatro temperaturas testadas *L. edodes* teve uma velocidade de crescimento radial significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior a *L. boryana* (figura 13).

Entre 20 °C e 25 °C, a velocidade de crescimento radial não variou significativamente para *L. edodes*. Já para *L. boryana*, o crescimento foi significativamente mais rápido em 20 °C e 22 °C quando comparado com as duas outras temperaturas. Na temperatura de 28 °C, nos primeiros dias o crescimento foi mais lento aos demais e após 7 dias ocorreu produção e liberação de um pigmento escuro no meio e o crescimento micelial foi interrompido. Este pigmento escuro foi estudado mais detalhadamente e os resultados estão apresentados a partir da seção 5.4.

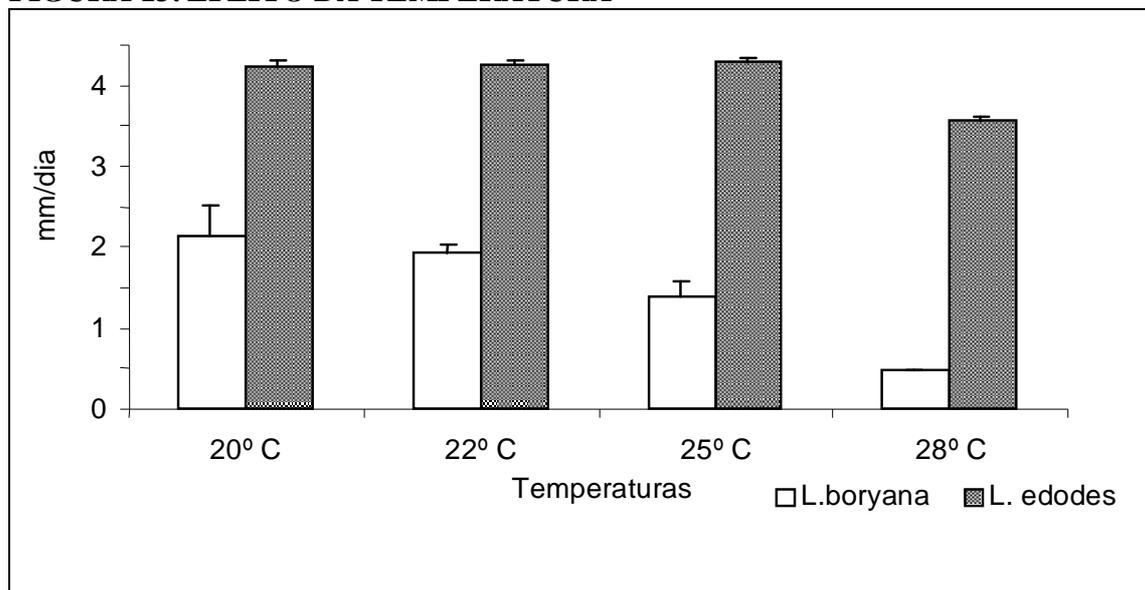
**FIGURA 13. EFEITO DA TEMPERATURA**

Gráfico sobre velocidade de crescimento micelial radial em placas de cultivo contendo BDA de *L. boryana* e *L. edodes*, nas temperaturas de 20 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C.

### 5.2.2 Efeito do pH inicial no crescimento radial de *L. boryana* e *L. edodes*

Neste experimento foi feita a variação do pH inicial dos meios de cultivo (BDA) com a adição de diferentes proporções de sais de fosfato inorgânicos, conforme descrito no item 4.4.1.6. Considerando o período total do experimento, *L. edodes* cresceu mais rapidamente ( $p \leq 0,05$ ) nos valores de pH iniciais de 4,5 e 5,7 do que nos mais extremos, enquanto que, para *L. boryana*, a velocidade de crescimento radial não foi influenciada significativamente pelo pH inicial (figura 14). Entretanto o crescimento do *L. boryana* não ocorreu em velocidade constante, o que pode ser observado na tabela 7, em valores iniciais de pH de 3,8, 4,5 e 5,7 a velocidade de crescimento foi maior nos primeiros oito dias e desacelerou ligeiramente na etapa final da fermentação. Para o pH inicial de 7,2, a velocidade do crescimento radial na primeira fase (0-8 dias) foi significativamente menor do que nos demais valores de pH, mas na segunda fase (8-16 dias) houve aceleração no crescimento o que resultou numa velocidade de crescimento global (0-16 dias) igual às velocidades obtidas neste período com os outros valores de pH iniciais (figura 14).

FIGURA 14. EFEITO DE pH INICIAL

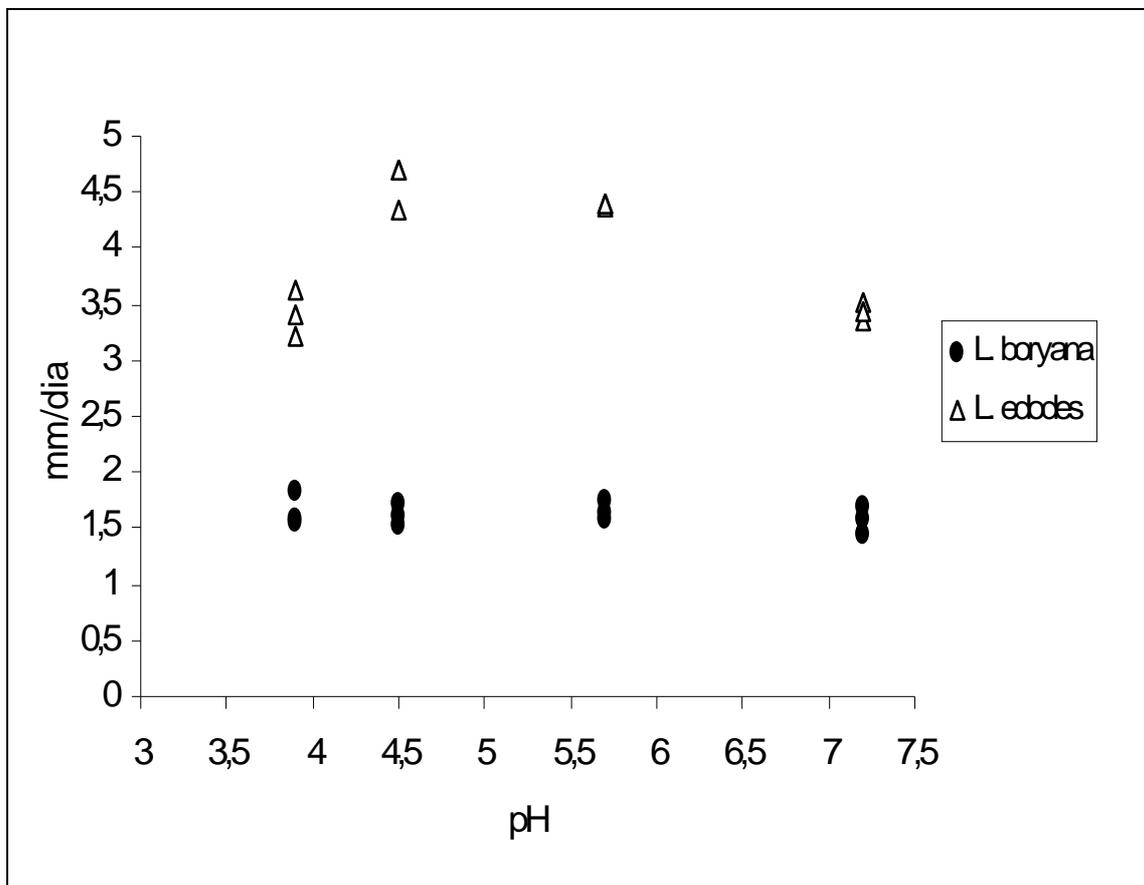


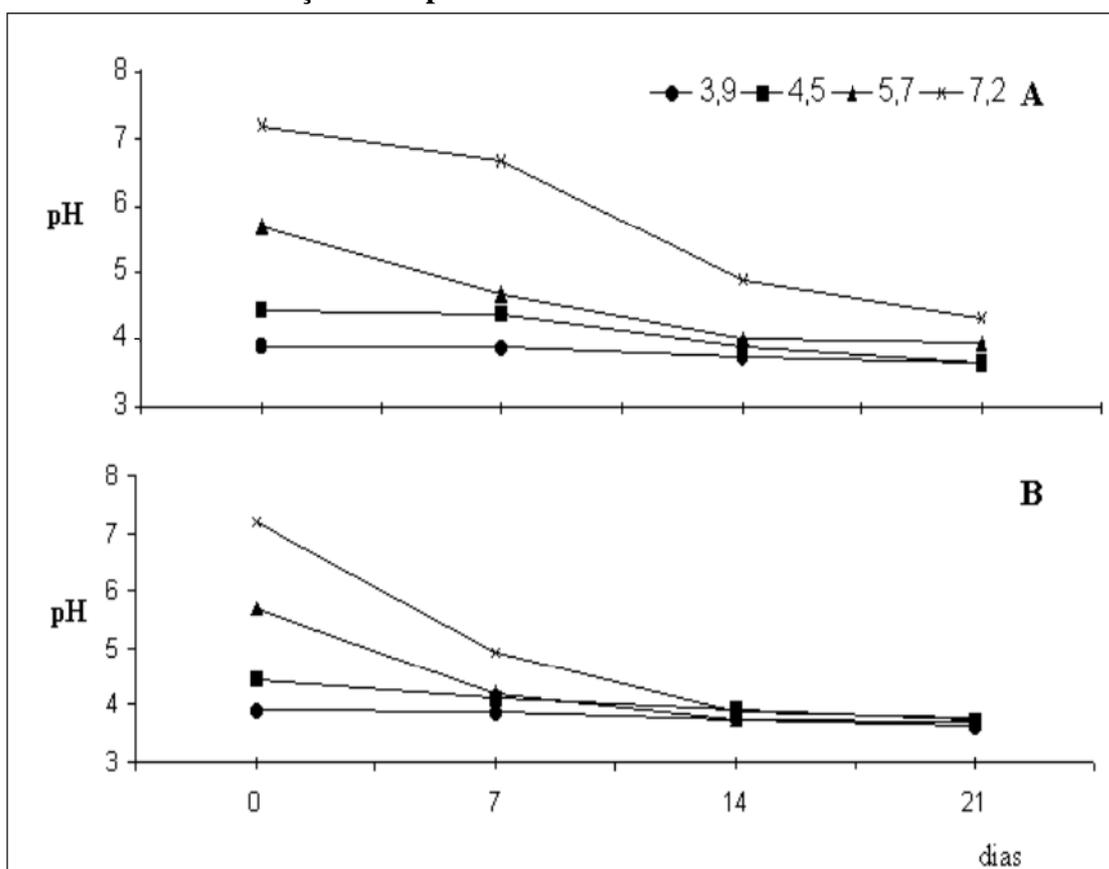
Gráfico sobre a influência do pH inicial no nível de crescimento micelial radial de dois macrofungos do gênero *Lentinula*

TABELA 7 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADIAL DE *Lentinula boryana* EM DUAS FASES

pH	Velocidade de crescimento radial de <i>L. boryana</i> (mm/dia) ( $\pm$ erro padrão)	
	1ª Fase (0-8 dias)	2ª Fase (8-16 dias)
3,9	1,71 $\pm$ 0,11	1,64 $\pm$ 0,15
4,5	1,78 $\pm$ 0,11	1,41 $\pm$ 0,08
5,7	1,79 $\pm$ 0,09	1,57 $\pm$ 0,12
7,2	1,23 $\pm$ 0,02	1,59 $\pm$ 0,01

Nas figuras 15 a e 15 b estão apresentados as variações do pH do meio durante a crescimento micelial de *L. boryana* e *L. edodes*, respectivamente. Observa-se que para os dois macrofungos as curvas foram similares nos valores de pH de 3,9, 4,5 e 5,7. No pH 7,2, porém, *L. boryana* apresentou uma mínima variação até o sétimo dia, em contraste com o *L. edodes* ocorreu uma redução drástica do pH no mesmo período.

**FIGURA 15. VARIAÇÃO DO pH DO MEIO**



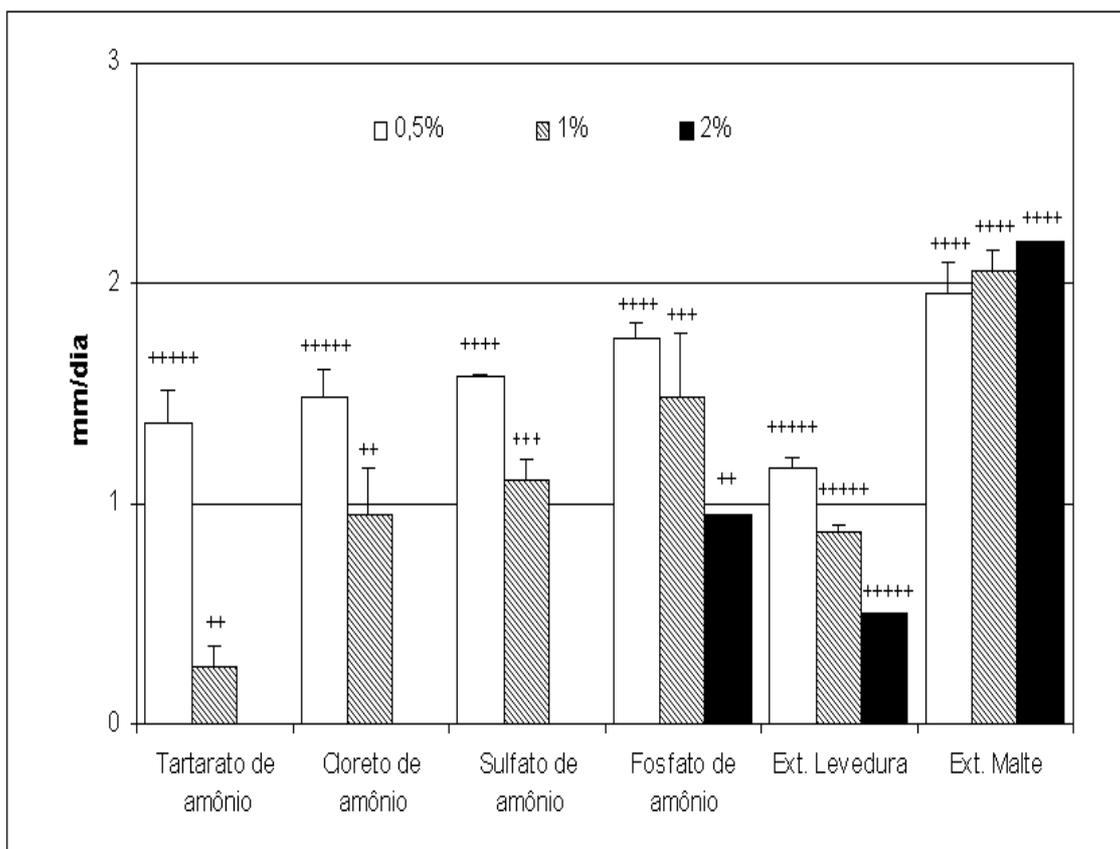
Diminuição dos valores de pH do meio de cultivo durante o crescimento micelial dos macrofungos. A- *L. boryana* e B- *L. edodes*

### 5.2.3 Efeito da fonte de nitrogênio sobre o crescimento radial dos macrofungos

Estes experimentos foram realizados para verificar o crescimento radial das duas espécies de *Lentinula* frente a diferentes fontes de nitrogênio, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% (p/v). Os dados estão mostrados nas figuras 16 e 17. Dado que o crescimento radial não representa diretamente a quantidade de biomassa obtida, uma vez que a densidade do micélio pode variar, também foi anotado um índice qualitativo da densidade micelial nas placas.

Para *L. boryana* (figura 16), observar-se que houve uma diminuição da velocidade de crescimento radial e da sua densidade micelial com o aumento das concentrações das fontes simples de nitrogênio. Tanto que na concentração de 2%, apenas houve desenvolvimento do micélio no meio em que o fosfato de amônio monobásico foi adicionado.

**FIGURA 16. EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DE *Lentinula boryana*.**



Densidade micelial: (+) muito baixa; (++) baixa; (++++) média; (+++++) boa; (++++++) muito boa.

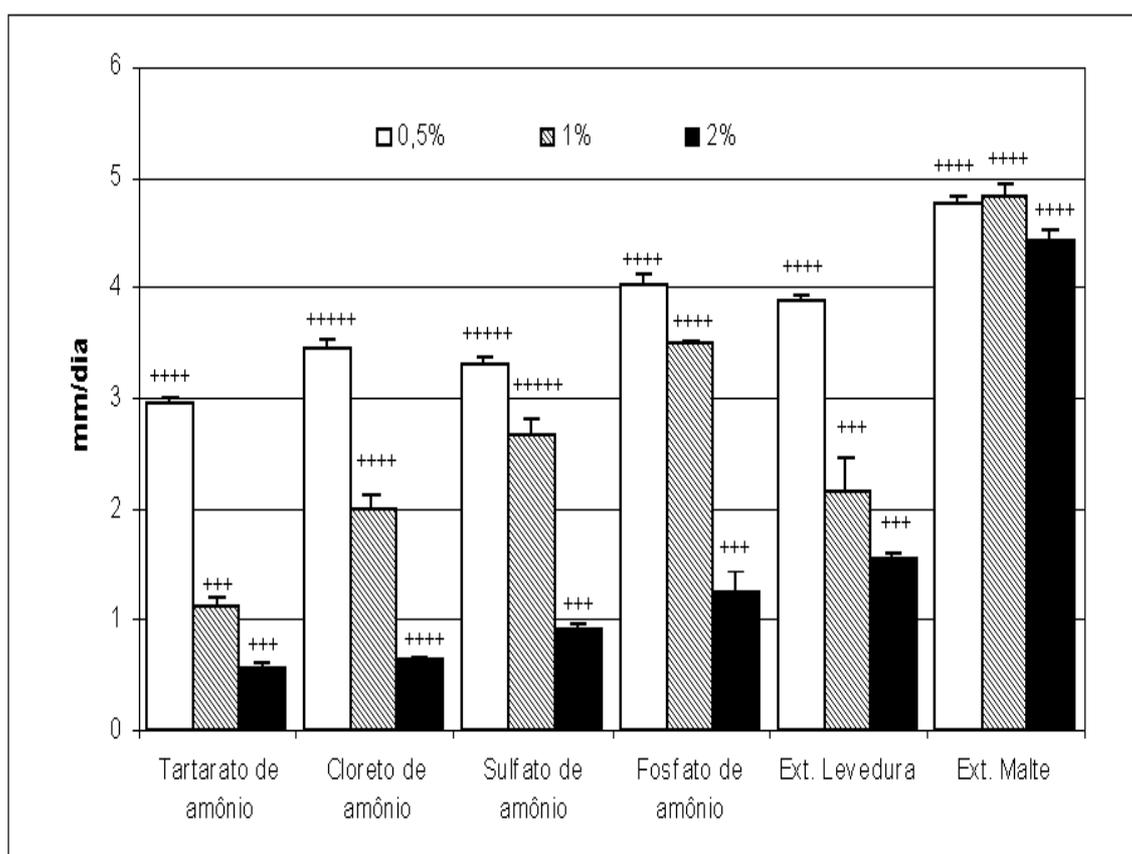
Com relação às fontes complexas de nitrogênio sobre o *L. boryana*, o aumento da concentração de extrato de levedura produziu queda na velocidade de crescimento radial micelial, este fato não ocorreu com a adição progressiva de extrato de malte. Nenhuma alteração significativa da densidade micelial foi observada para essas fontes complexas de nitrogênio

Considerando a combinação a velocidade de crescimento e a densidade micelial, o extrato de malte foi a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento do *L. boryana*.

O comportamento de *L. edodes* (figura 17), foi muito similar ao do *L. boryana*, ou seja apresentou diminuição da velocidade de crescimento radial com o aumento da concentração das fontes simples de nitrogênio, e numa avaliação global, os melhores resultados também foram com a adição de extrato de malte ao meio. Apenas foram

observadas duas diferenças entre os comportamentos dos dois macrofungos: que entre as fontes simples de nitrogênio, para o *L. edodes*, o melhor crescimento com adição de 0,5% de fosfato de amônio e as melhores densidades miceliais foram com a adição de cloreto e sulfato de amônio. Outra diferença foi que o *L. edodes* cresceu em todas as fontes simples na concentração de 2%, o que mostra que esse macrofungo é mais tolerante frente ao aumento da concentração de nitrogênio que o *L. boryana*.

**FIGURA 17. EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL DE *Lentinula edodes*.**



Densidade micelial: (+) muito baixa; (++) baixa; (++++) média; (+++++) boa; (++++++) muito boa.

### 5.3 EFEITO DAS CONDIÇÕES DO MEIO NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Lentinula boryana*(BERK. & MONT.) PEGLER CRESCIDO SOBRE MEMBRANAS

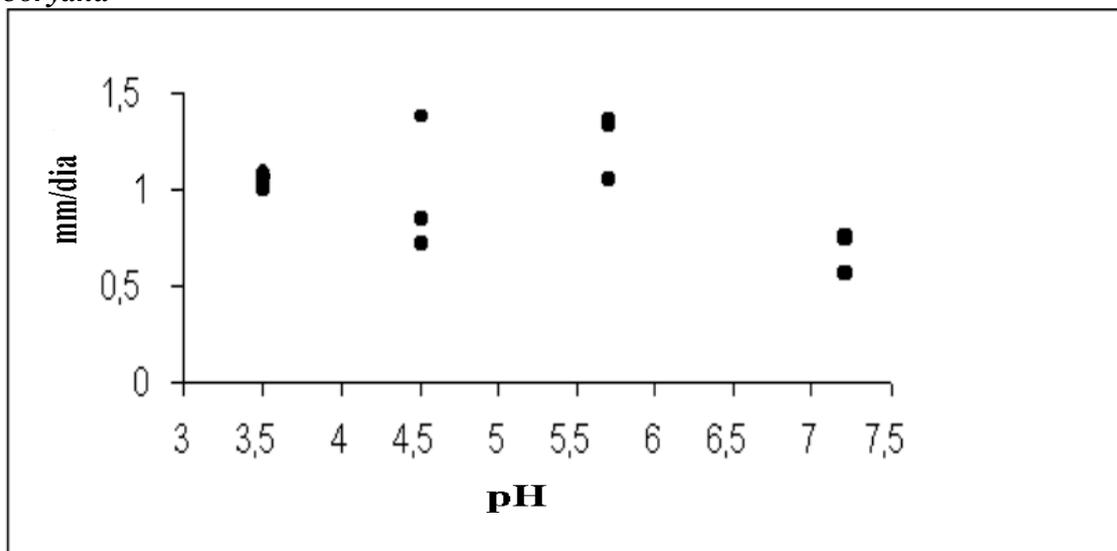
Estes experimentos foram realizados visando conhecer melhor os efeitos, de algumas condições de cultivo, no crescimento micelial de *Lentinula boryana*. Como relatado na seção anterior, o crescimento micelial radial não representa diretamente a quantidade de biomassa obtida, uma vez que a densidade do micélio pode variar. Nestes experimentos procurou-se minimizar este problema, fazendo com que o micélio fosse crescido sobre membranas, para que pudesse ser retirado e determinada sua massa seca. A técnica está detalhada no item 4.4.2.2 de materiais e métodos.

#### 5.3.1 Efeito do pH inicial no crescimento micelial de *L. boryana* (crescimento radial e massa seca do micélio)

Neste experimento as condições de cultivo utilizadas foram as mesmas do experimento sobre a influência do pH inicial, que tiveram seus resultados apresentados no item 5.2.2, a diferença foi que o micélio se desenvolveu sobre membranas,

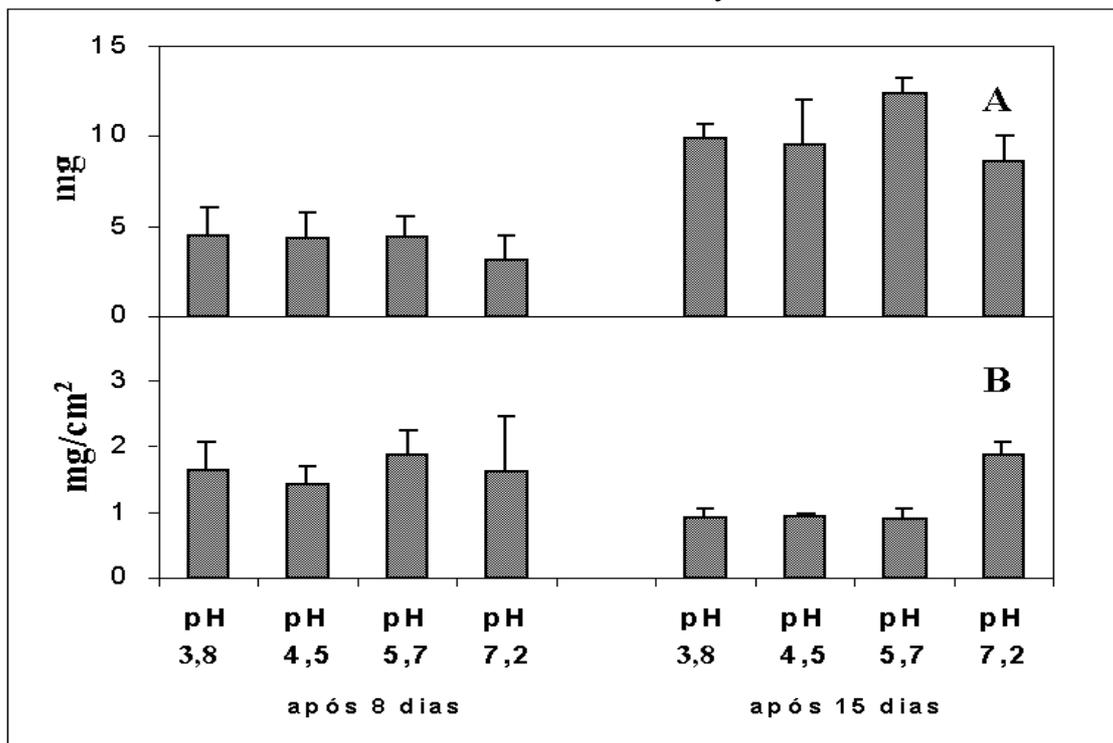
Uma pequena redução no nível de crescimento micelial radial com o pH inicial de 7,2. (figura 18). Quanto a massa micelial seca, após 15 dias de cultivo, não ocorreu diferença significativa entre os valores de pH iniciais de 3,8, 4,5 e 5,7, mas no pH 5,7 a quantidade de biomassa produzida foi significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior que no pH inicial de 7,2.

**FIGURA 18. EFEITO DO pH INICIAL NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *L. boryana***



Variações no nível de crescimento micelial radial de *L. boryana* frente a valores de pHs iniciais de 3,5, 4,5, 5,7 e 7,2.

**FIGURA 19. CRESCIMENTO MICELIAL DE *L. boryana* SOBRE MEMBRANAS**



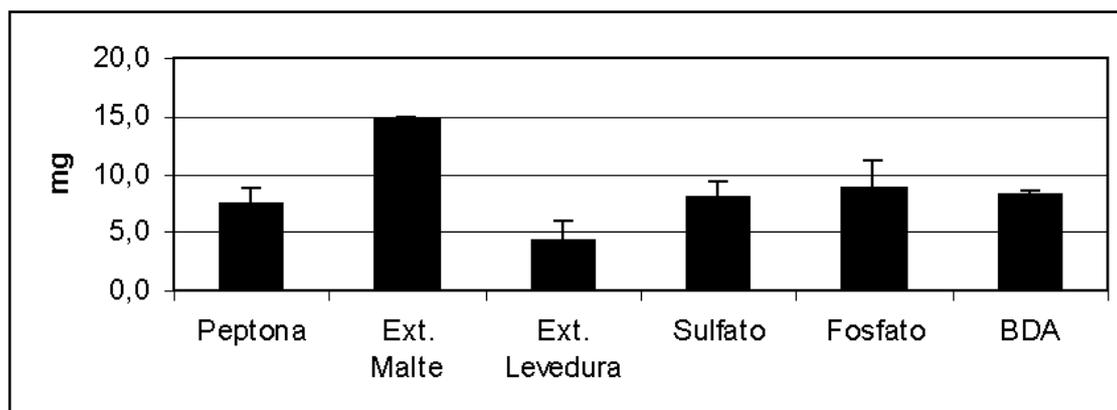
Crescimento micelial em duas fases (após 8 dias) – (após 15 dias); **A**- massa seca do micélio; **B**- massa seca do micélio pela área da colônia.

Os dados da tabela 7, da seção anterior, sugerem que o crescimento micelial radial não é uniforme, sendo que para os valores de pH iniciais de 3,8, 4,5 e 5,7 ocorre uma ligeira desaceleração da primeira fase para a segunda fase e com o pH de 7,2 ocorre uma aceleração. Na figura 19 b, pode ser observado que a densidade micelial também não tem uma evolução uniforme, com os pHs 3,8, 4,5 e 5,7 ocorre uma redução na densidade micelial na segunda fase e com pH 7,2 esta relação não é alterada nas duas fases. A diminuição da densidade micelial na segunda fase de cultivo pode estar relacionada a diminuição do pH do meio ou a diminuição dos nutrientes.

### 5.3.2 Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre o ganho de massa micelial seca de *L. boryana* após 10 dias de cultivo

Neste experimento foram testadas as influências que diferentes fontes de nitrogênio teriam sobre o ganho de massa micelial seca do *L. boryana* após 10 dias de cultivo, item 4.4.2.4 de materiais e métodos.

Na figura 20 pode ser observado que, após 10 dias de cultivo, a adição de 0,5 % (g/v) de extrato de malte gerou um aumento na massa micelial significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior quando comparado às demais fontes e ao BDA, estes resultados aumentam as evidências de que extrato de malte é a melhor opção para o ganho de massa micelial de *L. boryana*. Isto corrobora com os resultados do experimento 4.4.1.7, da seção anterior.

**FIGURA 20. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO**

Ganho de massa micelial seca de *L. boryana* após 10 dias de incubação

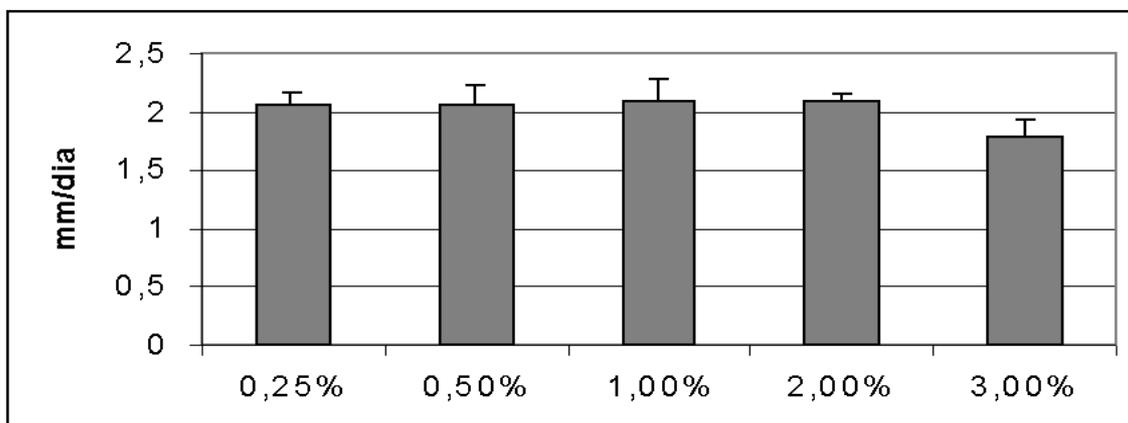
### 5.3.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de malte no crescimento micelial (radial e massa seca) de *Lentinula boryana*

Neste experimento foram adicionados, ao meio de cultivo (BDA), concentrações crescentes de extrato de malte (0,25 a 3%). Foram estabelecidos os níveis de crescimento pelo crescimento radial das hifas e pela massa seca de micélio obtido após 7 e 11 dias de cultivo, item 4.4.2.5 de materiais e métodos.

Na figura 21, onde há apenas informações sobre o crescimento radial, verifica-se que não há diferenças significativas no desenvolvimento com o aumento da concentração de extrato de malte. Este fato poderia indicar que a adição deste suplemento não resulta em muitos benefícios para o crescimento micelial. Mas na figura 22 a, onde estão demonstrados dados sobre o ganho de massa micelial seca, pode-se observar que, após 11 dias de cultivo, os micélios crescidos nos meios com as duas concentrações mais elevadas (2 e 3%) de extrato de malte tiveram sua massa seca superior ao meio mais pobre de extrato de malte (0,25%).

A figura 22 b é referente à relação entre a massa micelial seca pela área ocupada pelo micélio (densidade micelial). Nesta figura pode-se observar que há um decréscimo na densidade micelial da primeira para a segunda fase e que esta diminuição é mais evidente com as concentrações menores de extrato de malte. Esta diminuição na densidade pode estar relacionada à diminuição da concentração de nutrientes do meio, uma vez que nos meios mais concentrados este efeito foi minimizado.

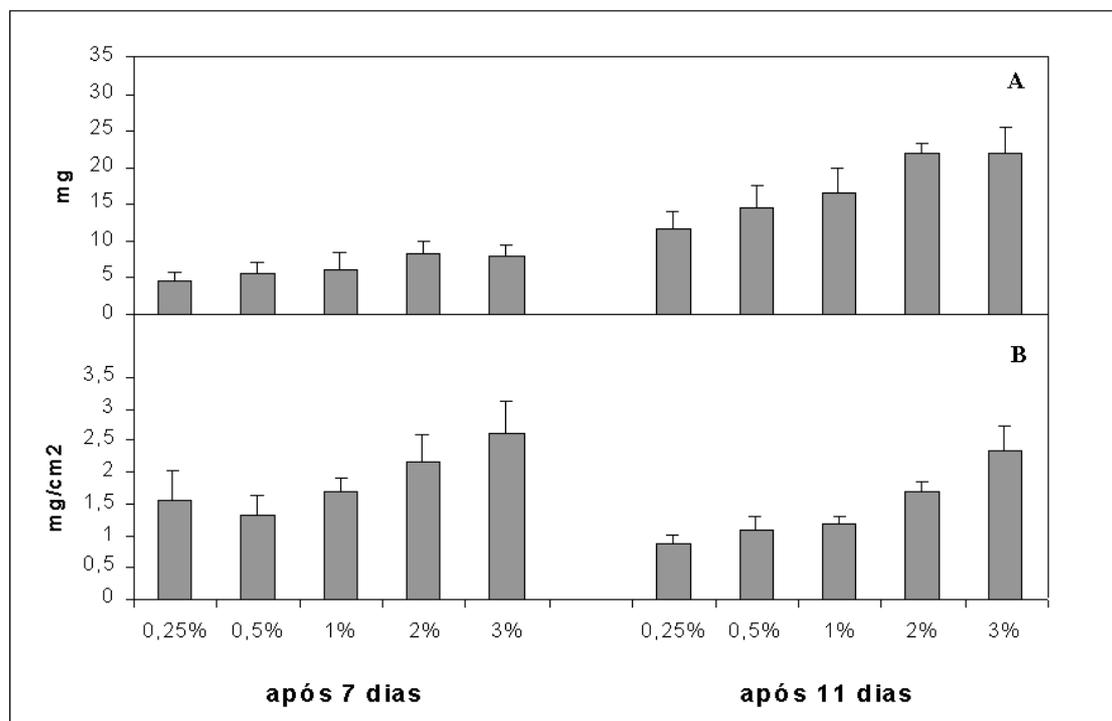
**FIGURA 21. EFEITO DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE MALTE**



Foram adicionadas concentrações variadas de extrato de malte e verificado o crescimento radial de *L. boryana* após 11 dias de fermentação

NO CRESCIMENTO RADIAL DE *L. boryana* APÓS 11 DIAS DE FERMENTAÇÃO

**FIGURA 22. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE MALTE**



Efeito sobre o crescimento micelial de *L. boryana* em duas fases de desenvolvimento: **A**- massa micelial seca; **B**- Massa micelial seca pela área da colônia (densidade micelial)

#### 5.3.4 Avaliação dos resultados sobre o cultivo dos macrofungos em placas de Petri

Nas condições experimentais utilizadas no laboratório *L. edodes* apresentou uma velocidade de crescimento micelial radial superior a *L. boryana*, o que está de acordo com o que foi relatado anteriormente por Mata et al. (2001). Estes autores trabalharam com diferentes cepas dos dois cogumelos e verificaram que na média as cepas de *L. edodes* tiveram um crescimento micelial radial mais elevado que as de *L. boryana*, embora algumas cepas de *L. boryana* tenham apresentado velocidades de crescimento semelhantes a algumas cepas de *L. edodes*. Que mostra que há variação entre as velocidades de crescimento de cepas de uma mesma espécie. Portanto os resultados obtidos no presente trabalho mostram apenas que a cepa L-54 de *L. edodes* cresce mais rápido que a cepa de *L. boryana* nativa do Paraná e que estes resultados não podem ser generalizados.

Com os resultados dos experimentos sobre o efeito da temperatura no crescimento micelial dos macrofungos, ocorreu uma diminuição na velocidade de crescimento de *L. boryana* com aumento de temperatura, o que sugere que a cepa de *L. boryana*, nativa do estado do Paraná, tem maior sensibilidade a temperaturas mais elevadas que esta cepa L-54 de *Lentinula edodes* e provavelmente a temperatura ótima de cultivo desta cepa de *L. boryana* é inferior a da cepa L-54 de *L. edodes*. Nestes experimentos *L. boryana* apresentou uma velocidade de crescimento maior nas temperaturas de 20 e 22 °C, estes resultados estão de acordo ao indicado na literatura que coloca que a temperatura ótima para o crescimento micelial de *L. boryana* está entre 20 a 22 °C (GUZMAN et al., 1993), mas considerando que na menor temperatura testada (20 °C) ocorreu maior nível de crescimento seria interessante refazer este experimento utilizando temperaturas inferiores a 20 °C, procurando assim definir melhor a temperatura ótima de crescimento da cepa de *L. boryana* em estudo.

Com os experimentos sobre a influência do pH sobre os dois macrofungos, foi verificado que, igualmente a *L. edodes*, o crescimento micelial de *L. boryana* diminui o pH do meio. A única diferença é que *L. boryana* reduziu mais lentamente o pH inicial 7,2 Segundo Chang e Hayes (1978), a mudança no pH do meio de cultivo de *L. edodes* é

devido a produção de alguns ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido succínico e ácido oxálico. A menor velocidade de diminuição do pH do meio por *L. boryana* pode estar relacionada à produção mais lenta destes ácidos. Em trabalho sobre cultivo submerso de *L. edodes*, Song e Cho (1987) procuraram determinar a influência da temperatura e do pH inicial no crescimento micelial do fungo. Seus resultados sugerem que o melhor pH inicial é entre 4,3 a 4,8, também foi observado que ocorreu uma diminuição do meio de 4,5 para 3,5.

Nos experimentos comparativos entre *L. edodes* e *L. boryana* frente a diferentes fontes de nitrogênio, o *L. boryana* mostrou ser mais sensível a concentrações mais elevadas de fontes simples de nitrogênio. No experimento, ambos os fungos apresentaram melhor desenvolvimento com a suplementação com extrato de malte. Esta preferência dos fungos por fontes complexas de nitrogênio foi verificada em diversos trabalhos revisados por Fog (1988). O efeito inibitório no crescimento micelial pelo aumento da concentração das fontes simples de nitrogênio poderia ser devido à presença de produtos tóxicos, que são formados pela reação entre estas fontes de nitrogênio e a matéria orgânica, estes produtos normalmente são gerados devido ao processo de autoclavagem (FOG, 1988), mas provavelmente isto não se aplica neste caso, isto por que as fontes foram autoclavadas separadamente. Uma possibilidade é que a adição destas fontes de nitrogênio tenha causado a inibição do crescimento por alterarem o pH do meio devido ao metabolismo da fonte de nitrogênio (FOG, 1988). Para a confirmação desta possibilidade, no futuro podem ser feitos experimentos para monitorar o consumo de nitrogênio e o pH do meio, verificando se há relação entre estas variáveis.

Os experimentos sobre o cultivo de *L. boryana* sobre membranas permitiram que fossem confirmadas algumas informações vistas nos experimentos sobre o crescimento radial, como que o desenvolvimento micelial não ocorre de maneira homogênea durante todo o cultivo, variando com o pH e a concentração de extrato de malte. Também foi possível confirmar que, dentre as fontes testadas, o extrato de malte era a mais adequada para estimular o crescimento do *L. boryana*.

Como visto, a utilização do cultivo sobre membranas produz respostas rápidas e confiáveis sobre o crescimento micelial de macrofungos. Esta técnica possui limitações relacionadas ao tipo de substrato a ser utilizado e à adaptação do fungo sobre as

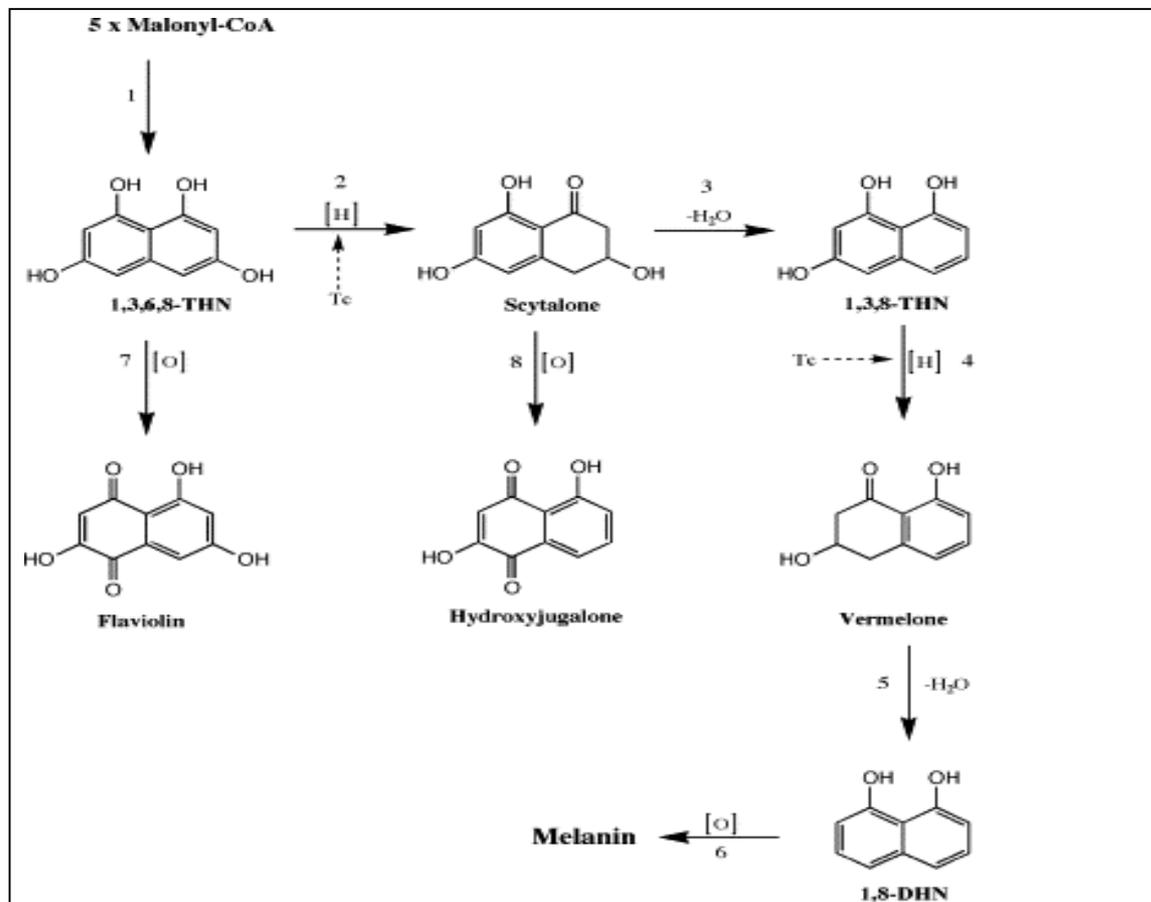
membranas. A determinação do crescimento micelial de macrofungos em meio sólido é complicada pelo fato da dificuldade em se separar o micélio do substrato. Existem métodos indiretos para a estimativa da massa micelial mas estes métodos são trabalhosos e têm suas limitações (BOYLE; KROPP, 1992). Com isso, a utilização do cultivo sobre membranas pode ser útil, em futuros experimentos, quando for almejada a obtenção de pequenas quantidades de micélio para análises.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E OBSERVAÇÃO DOS FATORES INFLUENCIADORES NA PRODUÇÃO DE MELANINA POR *L. boryana*

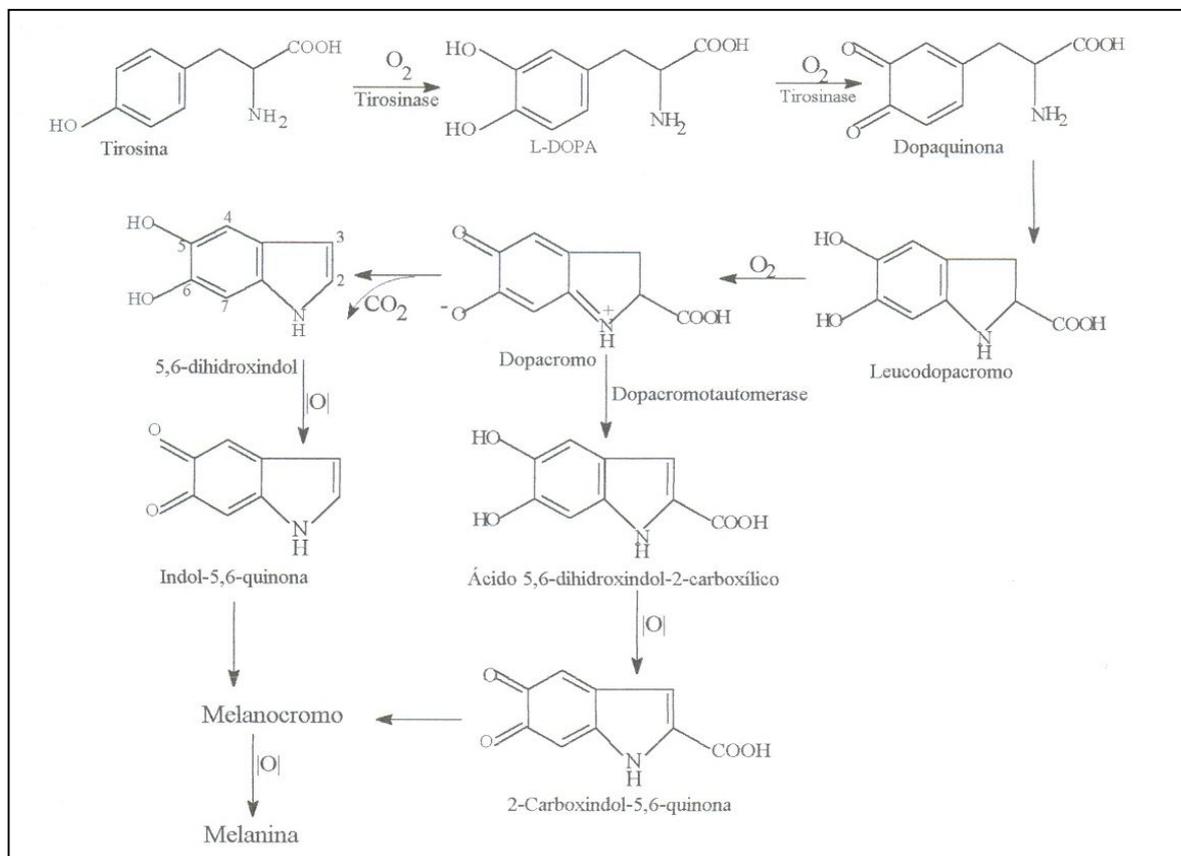
Durante os trabalhos sobre a influência da temperatura no crescimento micelial de *L. boryana* e *L. edodes* (seção 5.2.1), foi verificado que a 28 °C, nas placas que continham *L. boryana* ocorria escurecimento do meio. Suspeitou-se que se tratava de melaninas, então foram feitas análises espectroscópicas para confirmar ou não esta possibilidade. Antes da apresentação dos resultados desta seção, será feita uma breve explicação sobre o que são as melaninas.

De fato a melanina não é uma substância, mas sim um grupo de diversas substâncias todas com propriedades similares (LANGFELDER et al., 2003). As melaninas são compostos escuros geralmente pretos ou marrons, sendo macromoléculas formadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos (LANGFELDER et al., 2003);(BUTLER; DAY, 1998). As melaninas são produzidas por microorganismos, animais, protozoários e plantas, e usualmente estão complexadas com proteínas ou carboidratos (BUTLER; DAY, 1998). Os dois mais importantes tipos de melaninas são as DHN-melaninas e as DOPA-melaninas. As DHN-melaninas são chamadas assim porque um dos intermediários da sua via sintética é o 1,8-dihidroxinaphtaleno, figura 23. Da mesma forma, as DOPA-melaninas, recebem este nome por terem como precursor a L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), figura 24, (LANGFELDER et al., 2003). Existem também as GHB-melaninas que têm como precursor o glutamil-4-hidroxibenzeno (BUTLER; DAY, 1998). Outras classificações são aplicadas às melaninas sendo também divididas em três grupos, as eumelaninas, as feomelaninas e as alomelaninas (BILISNKA, 1996). As eumelaninas são pigmentos negros ou marrons, geralmente insolúveis, formados por seqüências de reações oxidativas, a partir da tirosina, DOPA, dopamina ou outras catecolaminas. As feomelaninas são pigmentos de cores mais claras como vermelho ou amarelo, podem ser obtidas de maneira semelhante às eumelaninas, mas também têm como precursores a cisteína ou a glutadiona (BILISNKA, 1996);(RILEY, 1997). As alomelaninas são mais comuns no reino vegetal, esses pigmentos são formados a partir da polimerização oxidativa de substratos fenólicos como catecol (BILISNKA, 1996);(STAINSACK, 1998).

**FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOSÍNTESE DE DHN-MELANINA PROPOSTA POR BUTLER E DAY (1998) REVISADO POR LANGFELDER et al. (2003)**



**FIGURA 24. VIA DA SÍNTESE DE DOPA-MELANINA (STAINSACK, 1998).**



#### 5.4.1 Caracterização espectrográfica do pigmento tipo melanina

De posse das informações sobre as melaninas, foram feitas análises espectroscópicas (infravermelho, RMN e RPE) do pigmento, procurando nos espectros obtidos características que pudessem ser relacionadas a um ou outro tipo de melanina.

##### 5.4.1.1 Estudo da interação entre íons metálicos e as melaninas produzidas por *L. boryana* por espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Esta espectroscopia produz informações a respeito dos radicais livres orgânicos, dos íons metálicos nos seus estados de oxidação e do sítio de complexação ao qual estão ligados (MANGRICH, 1993). O princípio da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é o da absorção de radiações eletromagnéticas, na faixa de frequência de microondas, por uma amostra submetida a um campo magnético. Amostras que apresentam elétrons desemparelhados na sua estrutura possuem um momento magnético de spin total diferente de zero (paramagnetismo). A técnica procura detectar a existência de elétrons desemparelhados e fazer a caracterização do ambiente químico no qual o mesmo se encontra. Substâncias diamagnéticas, ou seja que possuem spin total igual a zero, não podem ser analisadas por RPE. Para melhorar a resolução, geralmente os espectros de RPE são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção. A resolução pode ser melhorada, ainda mais, através da aquisição de espectros em segunda derivada, mas o inconveniente é que isto faz ocorrer decréscimo na relação sinal/ruído do espectro (STAINSACK, 1998).

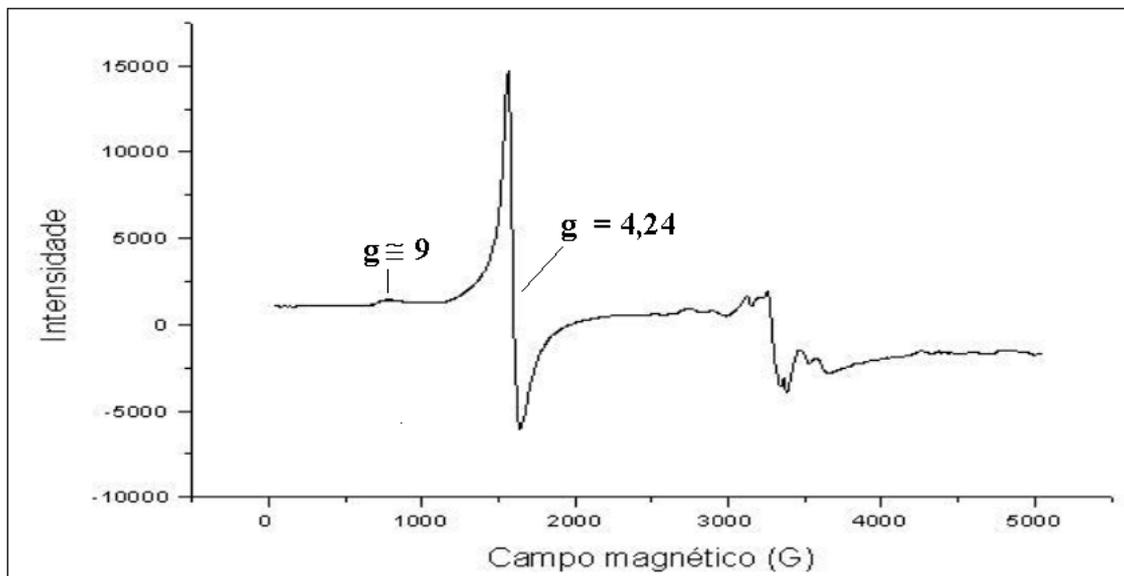
Apenas o espectro de RPE não fornece todas as informações sobre a amostra em estudo. Para obter mais informações químicas e estruturais da amostra é necessário representar o espectro matematicamente, e encontrar valores paramagnéticos que possam ser relacionados a detalhes da amostra, tais como a natureza dos radicais livres orgânicos, metais envolvidos e o seu estado de oxidação. O fator-g, que é um fator de proporcionalidade e é uma das características mais importantes na espectrometria de RPE, atua, por exemplo, como o  $\lambda_{\max}$  na espectroscopia eletrônica ou o máximo da banda no infravermelho, dado pelo número de onda ( $\lambda^{-1}\max$ ).

Nestes experimentos foram analisados por RPE os compostos presentes no micélio melanizado e a melanina que foi submetida ao processo de purificação por HCl, item 4.5.9 de materiais e métodos. Foram verificadas as características do radical livre formado e a interação das macromoléculas com os íons metálicos paramagnéticos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ). As informações obtidas são úteis para apoiar a hipótese de que o pigmento é uma melanina.

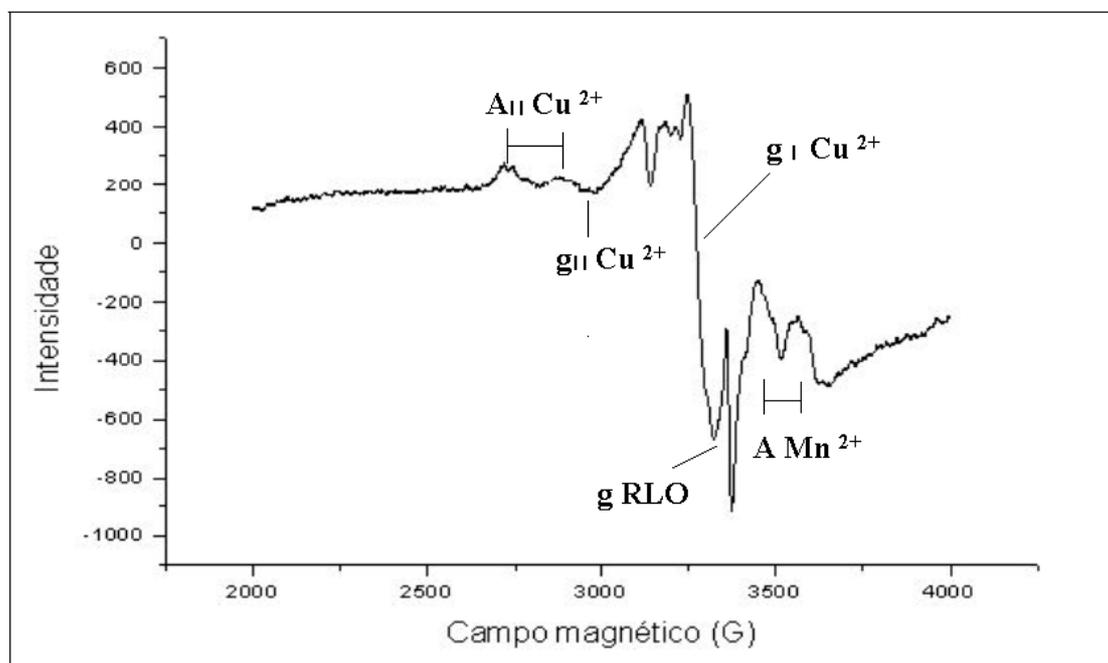
As figuras 25 e 26, são referentes à análise do micélio melanizado e as figuras 27 e 28 são referentes à melanina “purificada”. Algumas semelhanças podem ser observadas nestes espectros. Como por exemplo nas figuras 25 e 27 as linhas nas regiões de 1560 Gauss ( $g = 4,24$ ) e 730 Gauss ( $g \cong 9$ ) são referentes à presença do íon  $\text{Fe}^{3+}$  de spin alto em domínio diluído, ou seja o  $\text{Fe}^{3+}$  com distribuição homogênea de elétrons na camada de valência, em domínio diluído, que significa que a concentração do  $\text{Fe}^{3+}$  é relativamente baixa e não ocorre interação entre seus átomos. Nas figuras 26 e 28 pode ser observada, em melhor detalhe, a absorção em 3457 Gauss ( $g = 2,0041$ ) que é referente à presença do radical livre orgânico (RLO). Estes resultados são semelhantes aos indicados na literatura para radical livre de semiquinona de DOPA-melanina sintética (PASENKIEWICZ-GIERULA; SEALY, 1986; STAINSACK et al., 2003), isto sugere que o pigmento é uma melanina. Nestas mesmas figuras podem ser observados na região entre 2700 e 3270 Gauss os parâmetros referentes ao íons  $\text{Cu}^{3+}$  ( $g_{||}=2,745$ ;  $g_{\perp}=25$ ;  $A_{||} = 170$  Gauss).

Além das semelhanças, algumas diferenças podem ser observadas nestas figuras como que há um aumento de intensidade do radical livre orgânico (RLO) formado nos espectros da melanina “purificada” em relação aos espectros do micélio melanizado. Outra diferença que pode ser observada é que apenas nos espectros do micélio, figuras 25 e 26, são observadas 6 linhas referentes à presença do íon  $\text{Mn}^{2+}$  ( $A=112,37$  Gauss). Isto não é observado nos espectros da melanina “purificada” (figuras 27 e 28), apenas aparecem os parâmetros dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Vários trabalhos da literatura indicam que o íon  $\text{Mn}^{2+}$  está ligado aos grupos funcionais oxigenados como um complexo de esfera externa (GUIMARAES, 1997). Esta interação menos intensa do  $\text{Mn}^{2+}$  e o complexo da melanina provavelmente possibilita a retirada do mesmo pelo processo de purificação por precipitação com HCl.

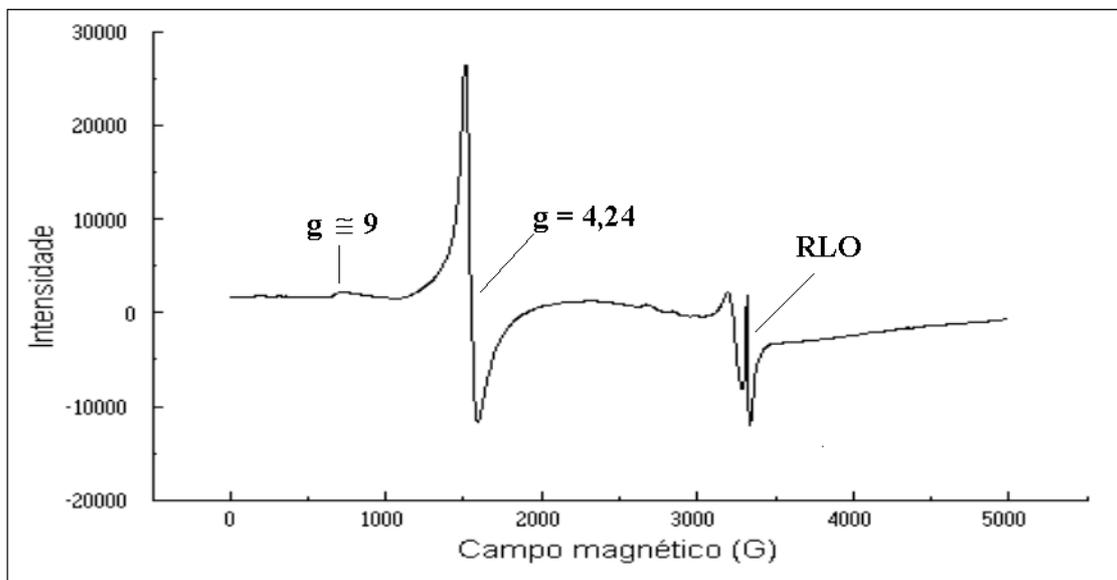
**FIGURA 25. RPE SÓLIDO DO MICÉLIO MELANILIZADO DE *L. boryana*, ANALISADO A 77 K**



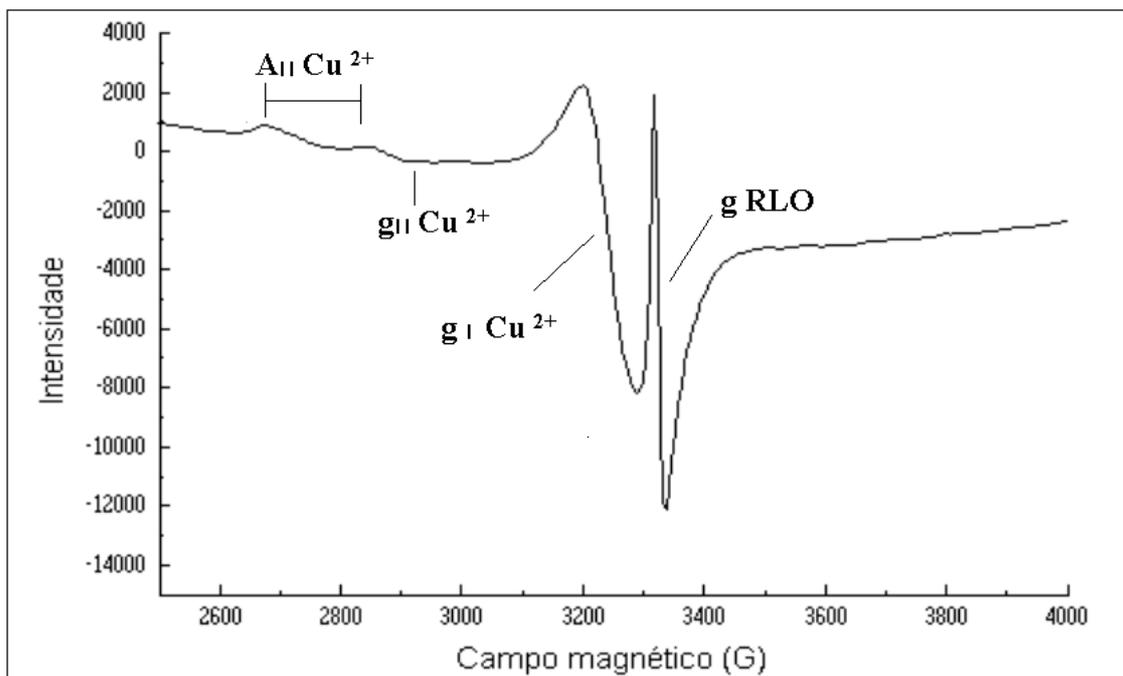
**FIGURA 26. RPE SÓLIDO DO MICÉLIO MELANILIZADO DE *L. boryana*, ANÁLIZADO A 77 K, REFERENTE A REGIÃO ENTRE 1500 E 4000 GAUSS**



**FIGURA 27. RPE SÓLIDO DA MELANINA “PURIFICADA” PROVENIENTE DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO DE *L. boryana***



**FIGURA 28. RPE SÓLIDO DA MELANINA “PURIFICADA”**



Melanina proveniente do cultivo em meio líquido de *L. boryana*. Análise referente a região de 2500 à 4000 gauss

#### 5.4.1.2 Análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear (RMN) da melanina “purificada”

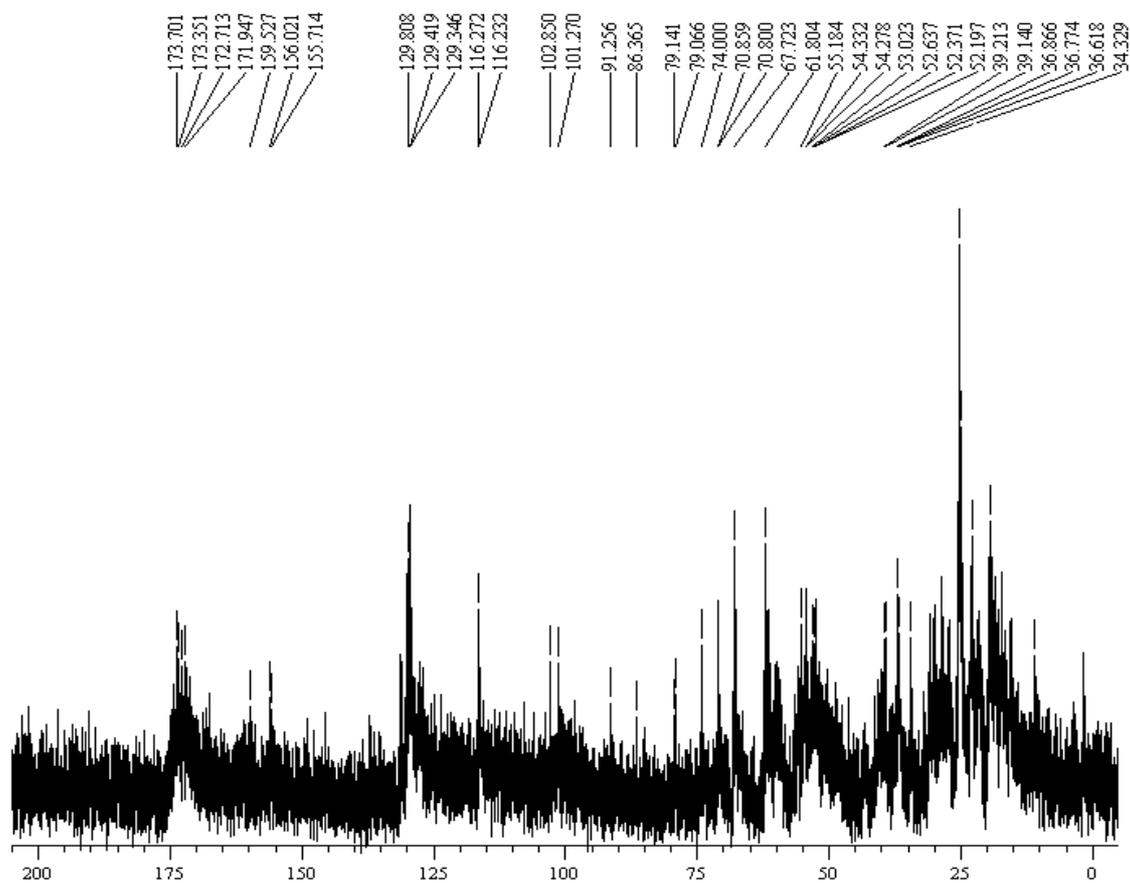
Para verificar as características dos grupos funcionais da melanina foi feita a espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H da melanina “purificada” proveniente do cultivo de *L. boryana*. Na figura 29 está mostrado o espectro do RMN-<sup>13</sup>C e na tabela 8 estão mostradas as regiões de maior intensidade de assinalamentos encontrados neste espectro. Nesta tabela está mostrada a relação ente este picos com os dados da literatura

**TABELA 8 COMPARAÇÃO ENTRE OS ASSINALAMETOS ENCONTRADOS NO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA MELANINA “PURIFICADA” COM OS DADOS DA LITERATURA**

Assinalamentos encontrados no experimento:	Dados da literatura
173-171 ppm	Na região de 170 ppm referente a grupamentos carboxilas (KELLMER et al., 1998); (TIAN et al., 2003)
130-129 ppm	Na região de 130 ppm referente a compostos aromáticos ou dupla ligação (C=C) (KELLMER et al., 1998); (TIAN et al., 2003)
102-101 ppm	Na região de 102 ppm que pode ser referente a ligação glicosídica do carbono 1, provavelmente da parede celular do fungo;
55-54 ppm	Na região próxima a 55 ppm referente a carbono ligado a nitrogênio.
25-19 ppm	Entre 15 e 40 ppm referentes as ligações simples entre grupos metil (-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) (KELLMER et al., 1998).

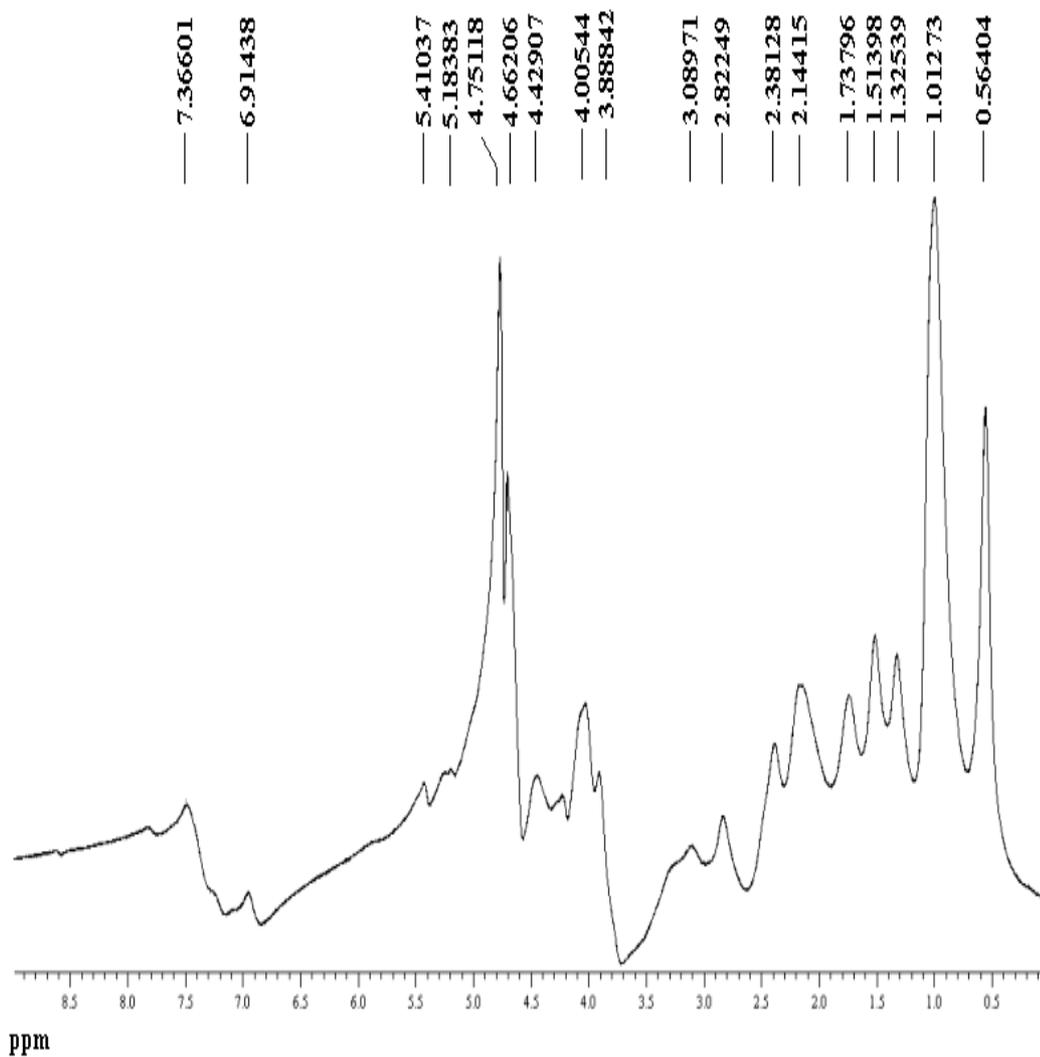
Na figura 30 está demonstrado o espectro de RMN-<sup>1</sup>H. As possíveis relações entre os assinalamentos encontrados e as estruturas estão relacionadas abaixo:

- Na entre região de 7,8 e 7,3 ppm podem ser visualizados picos e ,segundo a literatura, os picos na região de 7 ppm são referentes a H de compostos aromáticos e/ou de compostos fenólicos (KELLMER et al., 1998; KATRITZKY et al., 2002).
- Os picos na região entre 2,2 e 2,8 ppm podem ser referentes aos grupos metilenos (CH<sub>2</sub>) (KATRITZKY et al., 2002).
- Os picos na região entre 1 e 5 ppm podem ser referentes a H de carbono ligado a oxigênio (KELLMER et al., 1998), mais especificamente a região entre 3,7 e 4,2 ppm pode ser referente a H de carbono ligado a oxigênio ou nitrogênio (KATRITZKY et al., 2002).
- Região entre 0,8 e 1,0 ppm referente a H de CH<sub>3</sub> (KATRITZKY et al., 2002).

**FIGURA 29. ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA MELANINA “PURIFICADA”.**

Para esta análise a amostra foi dissolvida em NaOH/D<sub>2</sub>O. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

**FIGURA 30. ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H DA MELANINA “PURIFICADA”.**



Para esta análise a amostra foi dissolvida em NaOH/D<sub>2</sub>O. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

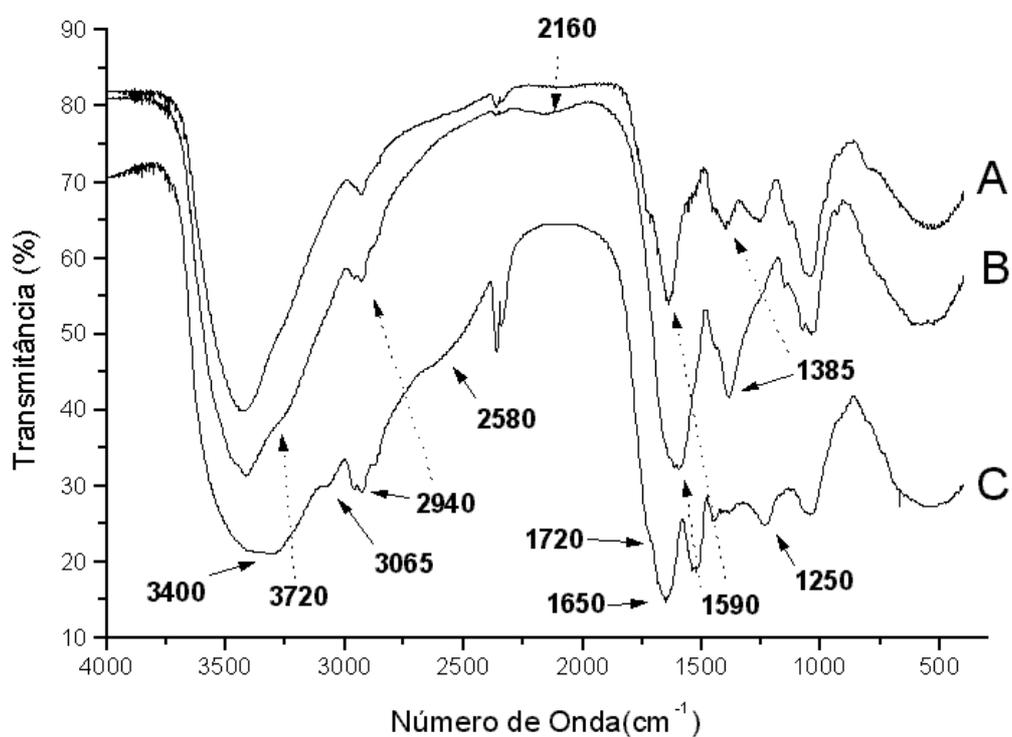
### 5.4.1.3 Espectrometria de infravermelho da melanina produzida por *L. boryana*

Com objetivo de avaliar os grupos funcionais presentes na melanina foram realizados espectros de infravermelho do exsudato melanizado retirado de cima do micélio, da melanina que foi liberada no meio e da melanina que foi “purificada” pelo processo de purificação com HCl (item 4.5.10 de materiais e métodos). Na figura 31 pode ser observado que estes espectros apresentam algumas diferenças, mas que de modo geral são bastante semelhantes. As características mais importantes que foram observadas são:

- Na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  para as três análises observa-se, bandas fortes de estiramento vibracionais referentes aos grupos -OH e -NH (HARKI et al., 1997; STAINSACK et al., 2003).
- No espectro da melanina “purificada” em  $3065\text{ cm}^{-1}$  pode ser observada com maior intensidade a banda referente ao estiramento da ligação C-H de compostos aromáticos.
- Nos três espectros podem ser observadas na região próxima a  $2940\text{ cm}^{-1}$  banda referentes à vibração de estiramento de ligação C-H de compostos alifáticos. (HARKI et al., 1997; STAINSACK, 1998).
- No espectro da melanina “purificada”, em  $2580\text{ cm}^{-1}$  pode ser observado o sobretom de C-O de ácido carboxílico, que tem sua banda em  $1250\text{ cm}^{-1}$ , em  $1720\text{ cm}^{-1}$ .
- Na região de 1650-1600 podem ser observadas bandas fortes que podem ser referentes ligação C=O de carbono de amida I, ou de C=C de grupos aromáticos ou de grupos carbonilas C=O e/ou grupos carboxilas (HARKI et al., 1997; KELLNER et al., 1998; STAINSACK et al., 2003)
- No espectro com a melanina purificada pode ser observada em  $1530\text{ cm}^{-1}$  uma banda que pode ser referente aos anéis aromáticos (KELLNER et al., 1998; STAINSACK, 1998).

- Nos espectros da melanina liberada no meio e do pigmento exsudato acima do micélio podem ser observadas bandas em 1590 e 1385 referentes ao carboxilato (BILINSKA, 1996; KELLNER et al., 1998).
- Nos três espectros a banda em  $1400\text{ cm}^{-1}$  pode ser referente a deformação C-OH de grupos fenóis (STAINSACK et al., 2003).

**FIGURA 31 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA MELANINA PRODUZIDA POR *L. boryana***



A - exsudato acima do micélio -; B- melanina liberada no meio; C - melanina “purificada”.

#### 5.4.1.4 Avaliação sobre os resultados de caracterização espectroscópica da melanina produzida por *L. boryana*.

As análises espectrográficas realizadas sugerem que o pigmento encontrado é uma melanina, provavelmente do tipo DOPA-melanina porque:

- As análises de RPE mostraram que o radical livre presente na melanina produzida por *L. boryana* possui um fator-g de 2,0041 que é bastante semelhante ao radical livre de semiquinona de DOPA-melanina sintética (PASENKIEWICZ-GIERULA; SEALY, 1986; STAINSCK et al., 2003).
- As análises por RMN do carbono 13 têm informações que contribuem na caracterização das melaninas como os assinalamentos próximos a 172 ppm referentes a grupamentos carboxilas, na região próxima a 130 ppm referentes a compostos aromáticos e em 55 ppm referentes à ligação carbono nitrogênio. Estes grupos químicos são encontrados nas estruturas de melaninas (BUTLER; DAY, 1998; TIAN et al., 2003; STAINSACK et al., 2003; LANGFELDER et al., 2003). Da mesma forma o RMN-<sup>1</sup>H mostra características dos grupamentos químicos que são encontrados para as DOPA-melaninas como na região entre 7,8 e 7,3 ppm referentes a H de compostos aromáticos ou de compostos fenólicos, região entre 3,7 e 4,2 ppm referente a H de carbono ligado a oxigênio ou nitrogênio (KATRITZKY et al., 2002).
- As análises por infravermelho mostram absorções em diversas regiões que são muito similares às encontradas para as DOPA-melaninas sintéticas por Harki et al. (1997) e Stainsack et al.(2003) como os grupos -OH e NH (3200-3400 cm<sup>-1</sup>) ligação carbono-hidrogênio C-H alifático (2940 cm<sup>-1</sup>), C=O de amida I ou C=C de compostos aromáticos ou de grupos carbonilas ou carboxilas (1650-1600 cm<sup>-1</sup>), bandas referentes aos anéis aromáticos (1530 cm<sup>-1</sup>), referentes a -OH de compostos fenólicos (1400cm<sup>-1</sup>) (HARKI et al., 1997);(STAINSACK et al., 2003).

Além destas análises, durante os trabalhos foram observadas algumas características químicas que são similares as de DOPA-melanina, como por exemplo a insolubilidade em solventes orgânicos como etanol, hexano, acetona e clorofórmio (dados não mostrados). Também foi visto que a melanina em questão é solúvel em meio básico (NaOH) e é precipitada com HCl em pH inferior a 3. Estas características foram anteriormente relatadas

para DOPA-melaninas de *Tuber melanosporum* e a DOPA-melanina sintética (HARKI et al., 1997)

Além das evidências mostradas anteriormente que sugerem que a melanina produzida por *L. boryana* é uma DOPA-melanina, outros fatos observados excluem as duas outras, exemplo que as DHN-melaninas não possuem em sua composição, nitrogênio e grupamentos carboxilas e as análises de RMN e de infravermelho indicam a presença destes grupamentos no complexo. De qualquer forma as DHN-melaninas são produzidas exclusivamente por ascomicetos (BUTLER; DAY 1998) e o *L. boryana* é um basidiomiceto. Nos espectros obtidos na cromatografia por infravermelho, não foi observada uma banda forte em  $1100\text{ cm}^{-1}$ , esta é uma banda característica da melanina tipo GHB-melanina (HARKI et al., 1997), portanto isto sugere que a melanina produzida por *L. boryana* não é uma GHB-melanina.

Outras análises podem ser realizadas para confirmar que a melanina produzida por *L. boryana* é uma DOPA-melanina, como por exemplo verificar a resistência a oxidação por peróxido de hidrogênio ou a precipitação por cloreto férrico (HARKI et al., 1997). Também poderiam ser realizadas estas mesmas análises espectrográficas com uma DOPA-melanina sintética e com uma DHN-melanina produzida por ascomicetos. Isto facilitaria a análise comparativa e a confirmação da identidade da melanina em estudo serviria como um padrão para análises comparativas de melaninas produzidas por fungos em geral.

## 5.4.2 Observação dos fatores influenciadores na produção de pigmento tipo melanina por *L. boryana*

### 5.4.2.1 Efeito da temperatura na produção de pigmento tipo melanina

Como relatado anteriormente, nos trabalhos sobre a influência da temperatura no crescimento de *Lentinula boryana*, que foram realizados em placas contendo BDA, item 4.4.1.5 de materiais e métodos, foi observado que com as temperaturas de 20, 22 e 25 °C o micélio e o meio de cultivo tinham aspectos característicos e normais, ou seja o micélio era de cor branca e o meio era claro, mas com a temperatura de 28 °C o micélio se desenvolveu mais lentamente nos primeiros dias e então o meio começou a escurecer e o crescimento foi interrompido. Este experimento foi repetido e foi feito o registro fotográfico. Na figura 32 a e b observa-se que a 28 °C, a colônia se desenvolveu menos quando comparada ao crescimento a 20 °C e o micélio e o meio ficaram escuros. Nos cultivos do *Lentinula edodes* em todas as temperaturas, não ocorreu este escurecimento do micélio ou do meio (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que a temperatura de 28 °C é desfavorável ao crescimento micelial de *L. boryana* e estimula a produção e liberação de melanina.

Com relação à localização, as melaninas fúngicas podem ser divididas em dois grupos: as melaninas ligadas à parede celular e as melaninas extracelulares. As melaninas ligadas à parede celular são encontradas ou em associação com a matriz fibrilar que se estende para fora de muitos fungos ou uma camada exterior distinta e bem definida. As melaninas extracelulares são encontradas fora da célula fúngica, ou seja, livres no meio, estas melaninas costumam ser distintas das melaninas ligadas à parede celular e podem ser formadas de duas maneiras: primeiro por ação de enzimas (fenoloxidasas) que são liberadas por fungos no meio de cultivo, estas fenoloxidasas podem oxidar componentes do meio e formar as melaninas. Uma segunda maneira de síntese de melaninas extracelulares é quando compostos fenólicos, que são secretados no meio de cultivo, são lentamente autooxidados formando as melaninas (LANGFELDER, et al., 2003);(BUTLER; DAY, 1998).

O fenômeno da estimulação da produção de melanina por incubação em temperaturas altas foi observado em um actinomicete por Filippova et al.(1987), revisado por Butler e Day (1998), onde mostrou que *Streptomyces galba* produz melanina apenas em temperaturas elevadas de crescimento (42-47 °C). O estímulo da produção das melaninas pode estar relacionado a uma característica física das mesmas que é a grande retenção de água que fica internalizada aos polímeros segundo Prota (1992), revisado por Butler e Day (1998) “todos os tipos de melanina, tanto as naturais como as sintéticas, contêm grandes quantidades de água no seu interior” e isto poderia reduzir a perda de água das células fúngicas.

Há alguns trabalhos que indicam que a melanina tem este efeito de termoproteção. Estes trabalhos incluem, por exemplo, o trabalho com mutantes albinos de *Monilinia fructicola* que mostrou menor resistência ao aumento de temperatura quando comparada à estirpe selvagem (BUTLER; DAY 1998; REHNSTROM; FREE, 1996). Além da proteção contra temperaturas elevadas, as melaninas têm um papel significativo na sobrevivência de fungos das regiões polares, por proteger as hifas das baixas temperaturas (ROBINSON, 2001). Nos trabalhos referidos não foram sugeridos mecanismos para explicar como a melanina exerce a termoproteção.

#### 5.4.2.2 Efeito da idade do micélio e da disponibilidade de nutrientes na produção de melanina em resposta a variação de temperatura

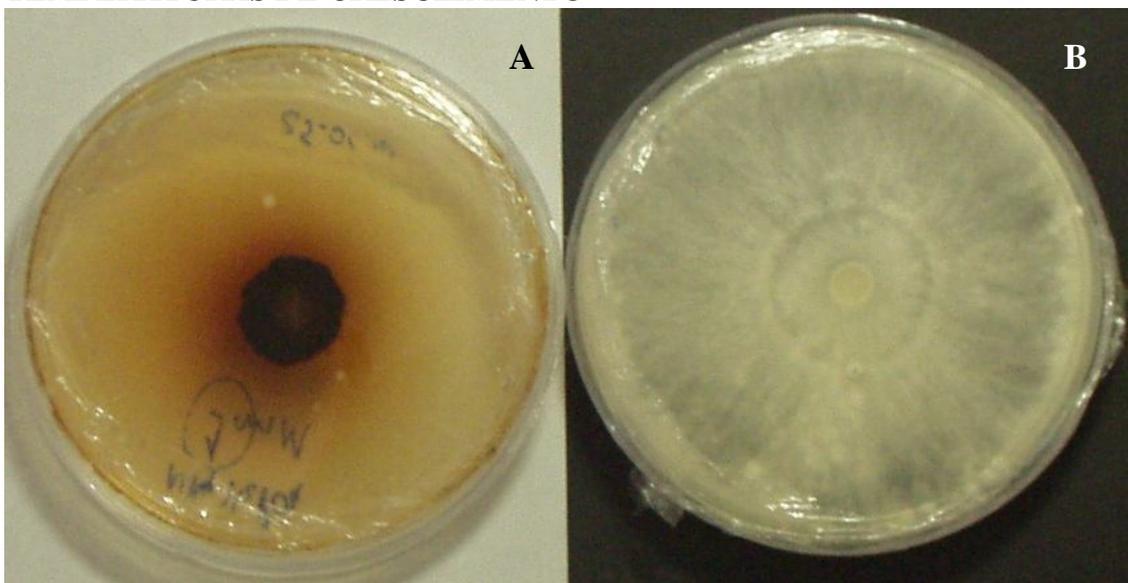
Como relatado anteriormente, a temperatura de 28 °C não é interessante para o crescimento micelial, mas estimula a produção de melanina, dado esta situação objetivou-se aumentar a produção de melanina pelo aumento da massa micelial, fazendo um cultivo em duas fases. Na primeira fase o micélio cresceu em 20 °C por 15 dias e após este período foi transferido para 28 °C, item 4.5.3 de materiais e métodos.

Como resultado desta mudança, o crescimento era interrompido e ocorria produção de pigmento na periferia da colônia (figura 33 a). Com isso acreditou-se que apenas as hifas mais novas, da periferia da colônia, tinham esta habilidade para produzir a melanina em resposta ao aumento de temperatura e que o micélio mais velho poderia ter perdido a habilidade de produzir pigmento. Para testar esta hipótese foi feito um experimento em que,

na primeira fase (12 dias em 20 °C), o micélio foi crescido sobre membrana e, na segunda fase, o micélio foi transferido para uma outra placa contendo um meio novo, antes de ser transferido para 28 °C, conforme descrito no item 4.6.3. Com este experimento foi possível observar, figura 32 b, que a produção de melanina não ocorreu apenas na periferia da colônia, mas em todo o micélio, inclusive a melanina produzida também ficou dispersa no meio de cultivo abaixo do micélio. Portanto, a produção de melanina não é apenas uma habilidade exclusiva do micélio mais novo, da periferia da colônia, e a disponibilidade de nutrientes é um fator limitante na produção de melanina, ou seja, a falta de produção de melanina abaixo do centro de colônia na figura 33 a provavelmente se deve à exaustão de nutrientes nesta região antes da aplicação do estímulo para produzir a melanina.

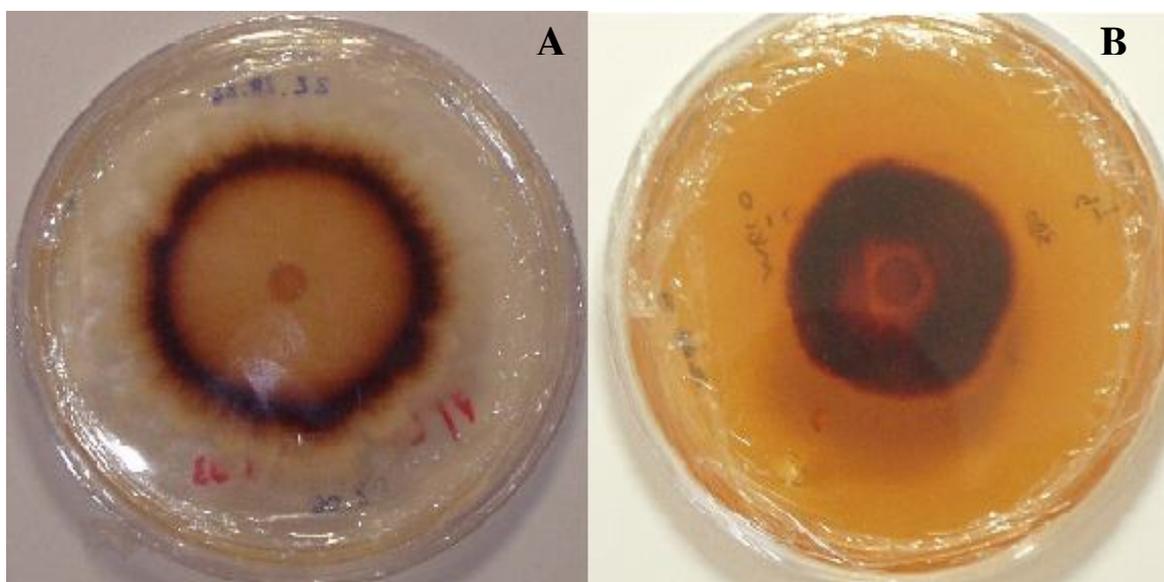
Existem trabalhos na literatura que mostram que condições nutricionais podem afetar a quantidade e a natureza (por exemplo: a cor) da melanina produzida por fungos. Muitas vezes a produção de melanina por fungos não pode ser evidenciada em condições naturais mas ocorre em cultivo no laboratório, justamente porque, nesta última condição, a disponibilidade de nutrientes é maior (BUTLER; DAY, 1998), o que reforça a possibilidade de que a concentração de nutrientes pode estar limitando a produção de melanina por *L. boryana*.

**FIGURA 32. MICÉLIO DE *Lentinula boryana* EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CRESCIMENTO**



Aspectos físicos observados após 28 dias de crescimento micelial de *Lentinula boryana* nas temperaturas de **A-28 °** e **B- 20 °c**

**FIGURA 33. MICÉLIO DE *Lentinula boryana* EM DUAS TEMPERATURAS DIFERENTES**



Crescimento micelial de *L. boryana* em duas fases com temperaturas de 20 °C (1ª fase) e 28°C (2ª fase): **A – Sem novo meio de cultivo**; **B- Com novo meio de cultivo**

#### 5.4.2.3 Efeito dos contaminantes e da interação entre micélios na produção de melanina por *L. boryana*

No desenvolvimento do inóculo, para o cultivo submerso, os micélios foram cultivados em placas grandes, a 20 °C (dados não mostrados). Durante estes estudos ocorreu acidentalmente, em algumas placas, contaminação por bactérias. Três destas placas, duas com e uma sem contaminação, foram transferidas para a sala climatizada com temperatura de 28 °C, passados alguns dias, pode-se verificar que as placas com a contaminação produziram mais melanina do que a placa não contaminada, figura 34 a e b.

O efeito da interação entre os micélios foi visto quando estava sendo desenvolvido o inóculo para o cultivo submerso de *L. boryana*. Nestes experimentos foram feitas placas contendo BDA e extrato de malte a 1% e os inóculos foram colocados em diversos pontos da superfície da placa (dados não mostrados), com isso era esperado que o micélio cobrisse mais rapidamente a placa, diminuindo assim o tempo de incubação, mas isto não ocorreu. Com a aproximação das hifas de diferentes colônias houve uma interrupção do crescimento micelial que impediu a junção dos micélios e o preenchimento completo da placa, figura 35 a, ou seja, o próprio micélio de *Lentinula boryana* inibe seu crescimento, mesmo que as colônias provenham da mesma cepa.

Visto que o *L. boryana* não teve boa interação entre hifas de diferentes inóculos, foi feito um experimento colocando, na primeira placa, quatro inóculos de *L. boryana*, na segunda, quatro inóculos de *L. edodes* e, na terceira, dois inóculos de cada um dos dois macrofungos, ver item 4.5.4.

Como esperado, novamente o *L. boryana* não teve boa interação entre os micélios, figura 35 b, para o *L. edodes* (segunda placa) também ocorreu diminuição do crescimento com a aproximação de colônias vizinhas (dados não mostrados).

Na terceira placa, figura 35 c, onde estavam os dois macrofungos, pode-se observar que, com a aproximação do micélio de *L. edodes*, houve produção e liberação de melanina pelo micélio periférico de *L. boryana*. Nota-se que, diferentemente ao ocorrido nas outras placas, ocorre o preenchimento da placa ou seja os micélios se tocam, mas não ocorre sobreposição dos micélios dos dois macrofungos. Quando esta placa foi inspecionada a formação do halo de pigmentação foi observada na região do micélio do *L. boryana*, mas

não pode ser descartada a hipótese que o *L. edodes* tenha contribuído para a formação do pigmento pois, como relatado por Savoi et al. (1998), é observada a formação de um pigmento de cor marrom na zona de contato entre as hifas de *L. edodes* e *Trichoderma sp.*

A produção e liberação de melanina por *Lentinula boryana* já tinham sido observadas com a mudança de temperatura e com a contaminação por bactérias, seguidas da mudança de temperatura, de 20 para 28 °C. O fato novo, observado com o experimento da interação entre os micélios, foi que, mesmo sem o aumento na temperatura, ocorreu produção de melanina pelo micélio periférico, mostrando realmente que a presença de outros microorganismos (contaminantes) no mesmo meio pode estimular a produção de pigmento tipo melanina por *L. boryana*.

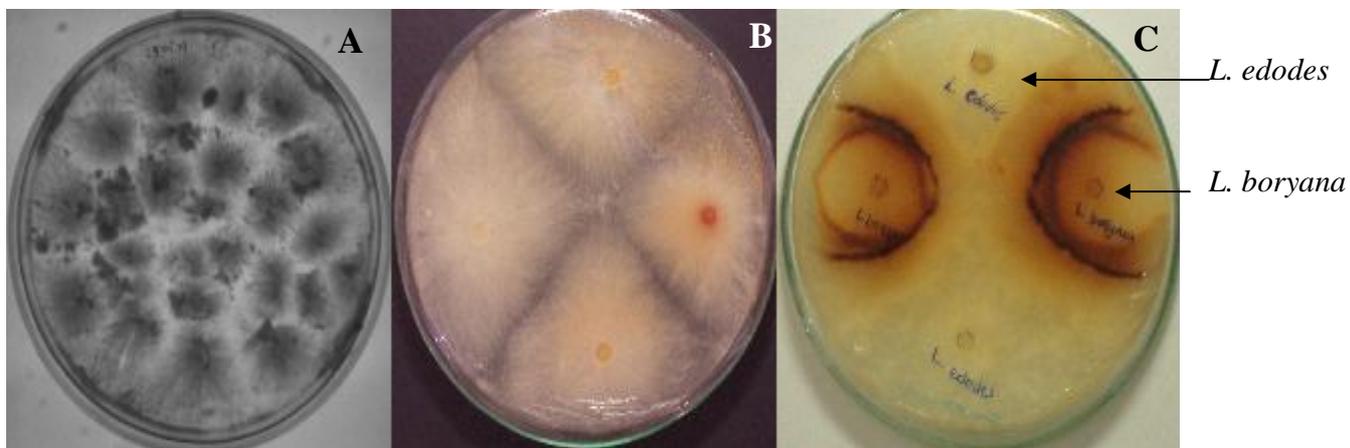
Uma das funções das melaninas, que estão presentes na parede celular dos fungos, é a proteção à célula contra lise enzimática (REHNSTROM; FREE, 1996; BUTLER; DAY, 1998). Portanto, esta produção de melanina poder ser uma tentativa de defesa do fungo contra enzimas líticas produzidas pelos contaminantes. Esta propriedade da melanina foi relatada por Kuo e Alexander (1967), quando foi verificado que *Aspergillus nidulans* possuía maior resistência à lise por quitinase e  $\beta$ 1,3-glucanase, devido à presença de melanina na sua parede celular. Isto também foi observado para o *Monilinia fructicola* onde a cepa selvagem foi mais resistente à digestão enzimática que a mutante deficiente de melanina (REHNSTROM; FREE, 1996). Estas e outras propriedades da melanina podem ser particularmente importantes para fungos que vivem no solo com uma associação muito próxima com outros organismos (REHNSTROM; FREE, 1996).

**FIGURA 34. INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE MELANINA POR *L. boryana***



Placas de cultivo contendo micélio de *L. boryana*. Inicialmente as placas foram incubadas a 20 °C e transferidas para 28 °C **A** – Sem contaminação; **B** – Com contaminação por bactérias

**FIGURA 35. VARIAÇÃO DO MICÉLIO DE *L. boryana* EM DIFERENTES CULTIVOS**



Placas com BDA **A** - Vários inóculos de *L. boryana*, **B** – Quatro inóculos de *L. boryana*, **C** – *L. boryana* e *L. edodes*

#### 5.4.2.4 Efeito da concentração de ágar e do oxigênio na produção de pigmento tipo melanina por *Lentinula boryana*

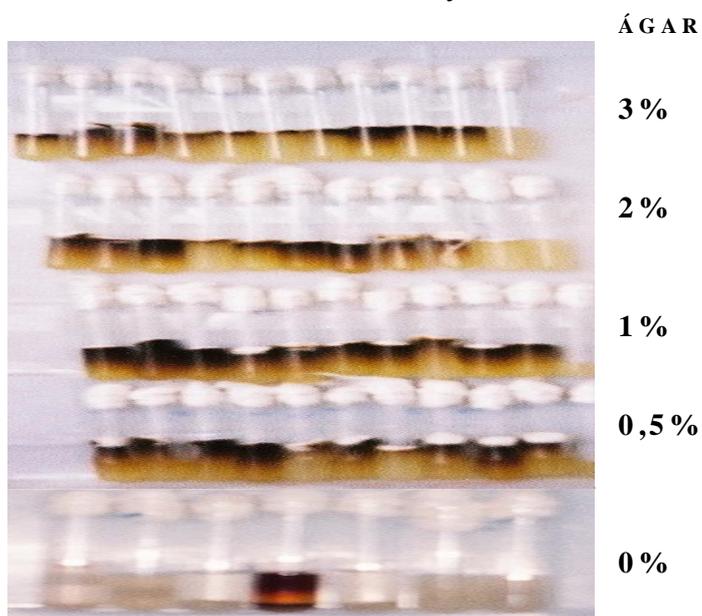
Para verificar a influência da quantidade de ágar na produção de melanina por *Lentinula boryana*, foi feito um experimento com extrato de batata acrescido de diferentes concentrações de ágar de 0 à 3%, como descrito no item 4.5.5 de materiais e métodos.

Com as concentrações de 0,5 e 1 %, a produção de pigmento foi um pouco maior quando comparado com as concentrações de ágar maiores de 2 e 3% (figura 36). Nesta mesma figura, nos meios sem o ágar (0 % de ágar), a produção de pigmento ocorreu em apenas um dos tubos. Observando mais cuidadosamente os tubos, foi visto que, apenas no tubo que ocorreu a produção de pigmento, o inóculo ficou aderido ao vidro do tubo, ficando em contato com o meio líquido e o ar. Nos demais tubos, em que os inóculos ficaram submergidos no meio líquido, não ocorreu produção de pigmento tipo melanina. Este fato sugeriu que o oxigênio poderia ter influência na produção de melanina. Para reforçar esta hipótese, foi feito um experimento em que inicialmente o micélio foi crescido, a 20 °C, durante cinco dias em tubos totalmente fechados, após este período todos os tubos foram transferidos para sala climatizada a 28 °C e metade destes tubos foram abertos e mantidos assim durante 20 dias, item 4.5.6 de materiais e métodos.

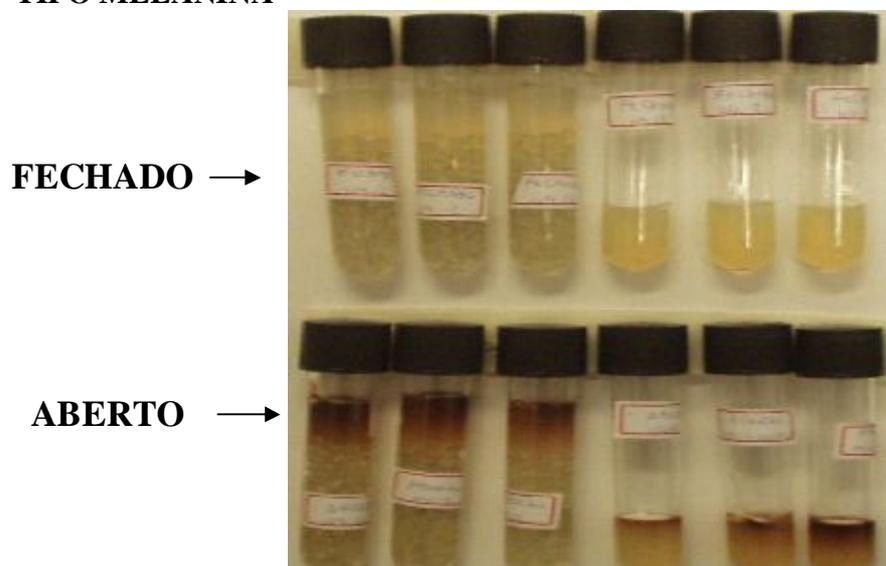
O resultado deste experimento pode ser observado na figura 37 onde se verifica que nos tubos que foram mantidos fechados não houve produção de melanina diferente ao ocorrido com os que foram abertos.

A literatura contém informações que podem ser relevantes sobre o efeito do oxigênio na produção de melanina. Durante a biogênese da melanina derivada da DOPA (dihidroxifenilalanina), ocorrem diversas etapas de oxidação dos substratos que irão resultar no complexo de melanina (RILEY, 1997; BUTLER; DAY, 1998), e, vendo que oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) é um substrato das enzimas responsáveis pela síntese da melanina, a ausência de oxigênio pode estar dificultando estas etapas da produção de melanina. Outra possibilidade é que a falta de oxigênio esteja interferindo em outros processos do metabolismo do fungo, tal como a síntese e secreção de fenoloxidasas.

**FIGURA 36. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGAR NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO TIPO MELANINA POR *L. boryana***



**FIGURA 37. INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO TIPO MELANINA**

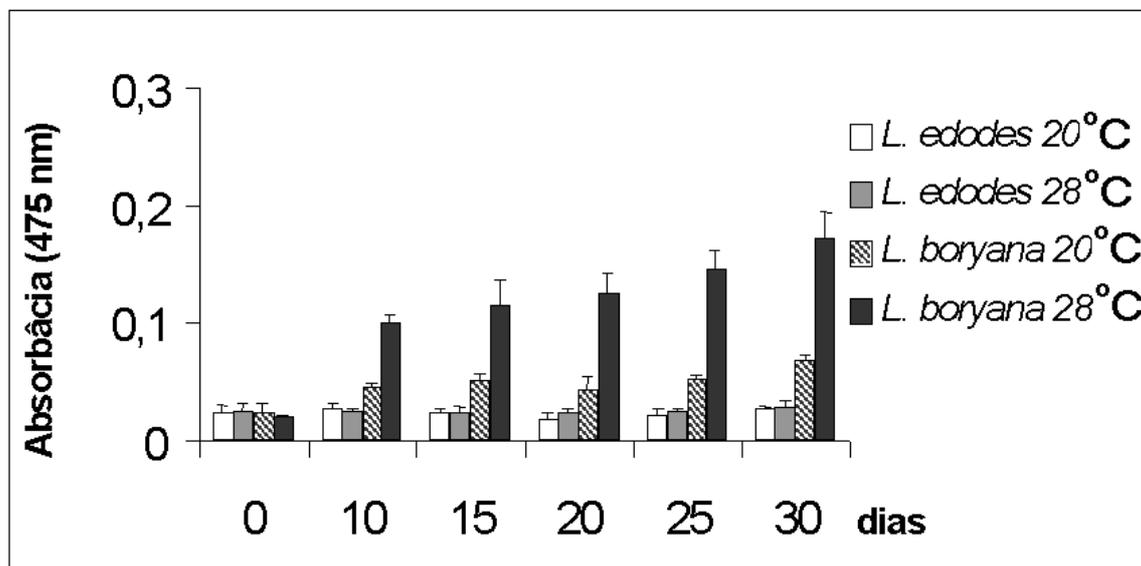


#### 5.4.2.5 Estimativa da produção de melanina por *L. boryana* e *L. edodes* em meio líquido nas temperaturas de 20 e 28 °C

Foram feitos cultivos de *L. boryana* e *L. edodes* em duas etapas. Na primeira os frascos contendo extrato de batata, dextrose e extrato de malte foram inoculados com os dois macrofungos e mantidos no escuro, à temperatura de 20 °C por 21 dias sem agitação, após este período três frascos de cada fungo foram transferidos para a 28 °C com agitação de 120 rpm e outros três continuaram nas condições anteriores. A produção de melanina foi estimada pelo aumento da absorbância a 475 nm, item 4.5.7 de materiais e métodos.

No gráfico apresentado na figura 38, verifica-se que ocorreu uma maior produção de melanina pela cultura de *L. boryana* que foi mantida a 28 °C, onde após 10 dias pode ser observada uma produção significativa de pigmento. Para os frascos contendo o *Lentinula boryana* que foram mantidos a 20 °C, ocorreu um aumento da absorbância, inferior aos da temperaturas de 28 °C, mas superior aos do *Lentinula edodes* nas duas temperaturas. Este fato pode significar que o *Lentinula boryana* tem a capacidade de produzir pigmento tipo melanina mesmo sem a elevação da temperatura, o que já havia sido observado quando foram colocados na mesma placa os dois macrofungos do mesmo gênero, item 5.5.3. Em futuros experimentos poderia ser feito o cultivo a 20 °C com agitação dos frascos, isto poderia aumentar a oxigenação do meio e então aumentar a produção de pigmento.

**FIGURA 38. ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR *L. boryana* E *L. edodes***



Foi estimada a produção de melanina extracelular pelo aumento da absorbância em 475 nm

#### 5.4.2.6 Avaliação da atividade antibiótica *in vitro* dos caldos de cultivo de *L. boryana* e *L. edodes* e da melanina purificada.

Como relatado anteriormente, os resultados apresentados no item 5.4.2.3 sugeriram que a presença de contaminantes como bactérias e outros fungos pode estimular a produção de melanina por *L. boryana*. De posse desta informação foram realizados experimentos para verificar se esta melanina ou outros compostos produzidos e liberados no meio poderiam ter algum tipo de atividade bactericida ou bacteriostática.

No experimento sobre a produção de melanina por *L. boryana* e *L. edodes* item 4.5.7, foi feito um cultivo em duas etapas: na primeira etapa os frascos foram mantidos a 20 °C durante 21 dias e na segunda etapa, parte destes frascos foram transferidos para 28 °C e parte foi mantida nas mesmas condições iniciais. Após 30 dias da segunda etapa de cultivo, foi feita a verificação da atividade antibacteriana do caldo de cultivo dos dois fungos nas duas condições, ver item 4.5.8 de materiais e métodos.

Os resultados deste experimento podem ser observados na figura 39 a e b. Com a presença dos discos contendo os extratos de *L. edodes*, não ocorreu inibição do crescimento das bactérias. Para o *L. boryana* verifica-se que nos discos do extrato onde houve maior

produção de melanina (28 °C) não foi percebida qualquer inibição do crescimento das bactérias, já para o extrato de *L. boryana* em que não foi feita a mudança da temperatura pode ser percebido halo de inibição das bactérias, tanto para o *Staphylococcus aureus* selvagem quanto para o *Staphylococcus aureus* metacilina resistente (MRSA). Mas este resultado pode ser um falso positivo uma vez que não foi feita a correção dos pHs dos caldos das culturas antes dos testes de atividade antibacteriana e sabe-se que pHs baixos inibem o crescimento das bactérias. O fato interessante é que somente foi observada atividade no caldo de cultivo do *L. boryana* a 20 °C, não verificada nos demais. Certamente é necessária repetição deste experimento, verificando se a atividade antibacteriana ocorreu devido ao pH do meio de cultivo ou a compostos produzidos pelo macrofungo.

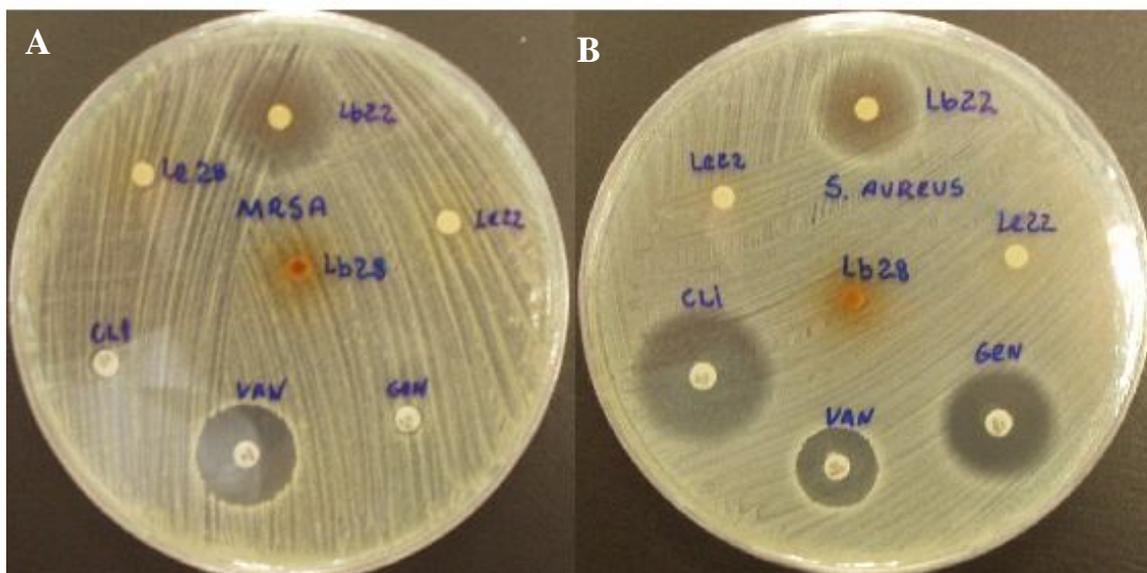
Juntamente com este experimento, foi feita a verificação da atividade antibiótica da melanina produzida pelo *L. boryana* que foi extraída do micélio e purificada conforme demonstrado no item 4.5.10 de materiais e métodos. Na figura 40 a e b pode ser observado que com as diferentes concentrações de melanina não houve inibição do crescimento das bactérias testadas. Estes resultados, juntamente aos verificados para o caldo de cultivo de *L. boryana* a 28 °C, sugerem que a melanina produzida por *L. boryana* não possui atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* selvagem e ou *Staphylococcus aureus* metacilina resistente (MRSA).

Há diversos relatos da atividade antibacteriana por muitos macrofungos (WASSER; WEIS, 1999; GUNDE-CIMERMAN, 1999). Inclusive com o *L. edodes* esta atividade foi relatada, mas na maioria dos trabalhos a atividade foi encontrada *in vivo* e é devido ao efeito indireto do polissacarídeo lentinana, que não possui atividade bactericida *in vitro*, mas estimula o sistema imune que combate a infecção bacteriana.(CHIHARA, 1990; JONG; BIRMINGHAM, 1993; WASSER; WEIS, 1999). Numa menor proporção foram feitos estudos *in vitro* onde foi demonstrado que outros compostos, diferentes da lentinana, extraídos do corpo de frutificação, têm atividade contra diversas espécies de bactérias (HIRASAWA et al., 1999). Estes autores acreditam que as atividades encontradas podem ser devido a presença de lentionina (1,2,3,5,6-pentatiapeno) e propõem a possibilidade da utilização de extratos de Shiitake na prevenção de cáries dentárias e periodontites. A

lentionina é considerado o princípio que é responsável pelo odor do Shiitake (YAVARI, 2003). Além de estar presente no corpo de frutificação, a lentionina pode ser detectada no micélio produzido em culturas submersas de *Lentinula edodes* (LELIK, 1997).

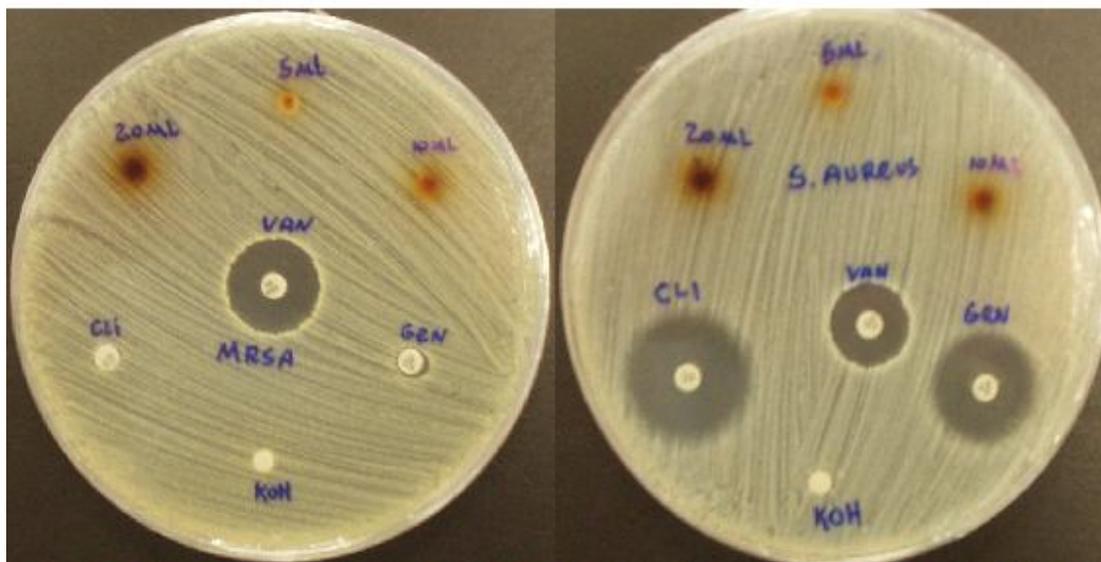
Como visto nos experimentos realizados no presente trabalho, não foi detectada atividade antibiótica dos caldos de cultivo de *L. edodes*, diferente do relatado na literatura que mostra que a cultura fluída de *Lentinula edodes* apresentou atividade antimicrobiana, contra *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, e esta atividade foi atribuída à presença da lentionina (HATVANI, 2001). Esta diferença nos resultados pode ter ocorrido porque foram aplicadas metodologias diferentes para verificação da atividade antibacteriana. No presente trabalho foi verificado ou não à formação de halo de inibição em cultivo em meio sólido e no trabalho de Hatvani (2001) foi vista a inibição do crescimento bacteriano em meio líquido. Outra possibilidade para esta diferença poderia ser que, durante os experimentos, os caldos de cultivo foram secos em estufa ventilada, a 50 °C, no trabalho de Hirasawa et al. (1999) os autores relatam que as temperaturas de 60 °C por 30 minutos ou de 100 °C por 5 minutos podem em alguns casos diminuir ou neutralizar a atividade antibacteriana dos extratos. Em futuros experimentos seria interessante realizar estes testes novamente sem utilizar o calor para a secagem dos caldos, possivelmente utilizar o processo de liofilização. Também seria interessante verificar esta atividade em diferentes estágios do cultivo dos dois macrofungos, fazer extrações com diferentes solventes orgânicos verificando a atividade antibacteriana dos extratos.

**FIGURA 39. ANTIBIOGRAMA DOS CALDOS DE CULTIVO DE *L. boryana* e *L. edodes***



Atividade antibacteriana dos caldos de cultivo de *L. boryana* e *L. edodes* crescidos nas temperaturas de 22 e 28 °C. **A-** *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (MRSA); **B-** *Staphylococcus aureus* (cepa selvagem). Como controle positivo da atividade antibacteriana foram utilizados discos com antibióticos: VAN- Vancimicina; GEN- Gentamicina; CLI- Clindamicina

**FIGURA 40. ANTIBIOGRAMA DA MELANINA PRODUZIDA POR *Lentinula boryana*.**



Atividade antibacteriana da melanina produzida por *L. boryana*. **A-** *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (MRSA); **B-** *Staphylococcus aureus* (cepa selvagem). Como controle positivo da atividade antibacteriana foram utilizados discos com antibióticos: VAN- Vancimicina; GEN- Gentamicina; CLI- Clindamicina

#### 5.4.3 Possíveis aplicações de melaninas e perspectivas de futuros trabalhos com *L. boryana* como produtor de melanina

O interesse na melanina produzida durante as investigações provém de suas possíveis aplicações. Abaixo estão relacionadas algumas das patentes americanas que foram desenvolvidas visando aplicar as propriedades das melaninas comercialmente:

- Utilização de cremes e loções com melanina no tratamento terapêutico de diversas lesões de pele, como psoríase, dermatite seborréica e eczema (OKUN; MILTON, 1976);
- Utilização de melanina no tratamento de doenças degenerativas, como doença de Parkinson, mal de Alzheimer, retinites pigmentosa, esquizofrenia e demência (BERLINER; ERWIN; MCGEE, 1993);
- Usos da melanina na inibição da angiogênese e da degeneração macular da retina (D'AMATO; ROBERT, 2003);
- Uso de melanina purificada ou biossintética em doenças que tem o excesso de produção de citocinas (TNF- $\alpha$ ), como caquexia, artrite, tendinites, doença inflamatória de intestino, septicemia, choque e alergia (MOHAGHEGHPOUR, 2001);
- Inibição da replicação do HIV *in vitro* por melaninas solúveis derivadas da L-tirosina e da L-DOPA (MONTEFIORE, 2001);
- Utilização de melaninas modificadas com habilidade de inibir a replicação do HIV (GARGER, 2002);
- Utilização da melanina para melhorar a coloração do cabelo (MEHL et al., 1999);
- Melanina em cremes e loções utilizados como protetores solares (PAWELEK, 1995);
- Utilização das melaninas em lentes protetoras dos olhos (GALLAS, 1991);
- Utilização de melaninas em método para detecção de tetraidrocanabinol na urina humana (WOODFORD, 1989);
- Proteção de roupas contra radiações UV-A e UV-B (LEE, 2000).

Para avaliar o potencial da utilização da melanina de *L. boryana* em aplicações biotecnológicas, será necessário estudar as suas propriedades. Vários trabalhos têm mostrado as propriedades de melaninas de outras fontes, e estas propriedades podem ser utilizadas em novos estudos com o *Lentinula boryana*.

Na literatura podem ser encontradas diversas referências que mostram a proteção exercida pela melanina contra as radiações solares principalmente contra os raios ultravioleta (WANG, Y.; CASADEVALL, 1994; REHNSTROM; FREE, 1996; RILEY, 1997; BUTLER; DAY, 1998; MACKINTOSHI, 2001; LANGFELDER et al., 2003). A DOPA melanina tem a capacidade de converter luz, UV, visível e infra-vermelho em calor, deste modo protege a célula dos efeitos danosos das radiações e da energia eletrônica (BUTLER; DAY, 1998), ou seja protege as células das mutações genéticas causadas pelas radiações (RILEY, 1997). Uma das mais relevantes indicações de que a melanina microbiana tem efeitos protetores contra as radiações está mostrado no trabalho de Zhadnova et al. (1994), onde foi visto que ocorreu um aumento na proporção de fungos melanizados em solos contaminados por radiação na região de Chernobyl (revisado por BUTLER; DAY, 1998). Como visto anteriormente, esta propriedade da melanina foi por diversas vezes explorada visando a produção de cremes, loções, lentes para a proteção solar. No futuro também poderiam ser feitos estudos para verificar a influência da luz solar ou da luz ultravioleta na produção de melanina por *Lentinula boryana*, para conhecer melhor a fisiologia do fungo e melhorar a produção de melanina ou então procurar aplicações desta melanina produzida por *L. boryana* em cremes ou loções.

As DOPA melaninas formam radicais livres e rapidamente os estabilizam. Esta formação e absorção de radicais livres funciona como uma esponja de outros radicais livres (BUTLER; DAY, 1998). Durante a sua formação as melaninas naturais e de DOPA-melaninas sintéticas absorvem metais em seu meio e devido a esta característica elas têm sido consideradas como ligantes de metais. Isto tem importância para a sobrevivência dos fungos, principalmente por que as melaninas previnem a entrada destes metais que muitas vezes são danosos aos organismos. Algumas melaninas fúngicas são bioabsorvedores eficientes de cobre e alguns fungos produzem mais melanina na presença de cobre (CAESARTONTHAT et al., 1995; BUTLER; DAY, 1998). Além de metais as melaninas podem proteger as células contra diversas substâncias nocivas como agentes oxidantes

(hipoclorito e permanganato), bem como podem aumentar a resistência dos fungos contra fungicidas (LARSSON; TJALVE, 1979; BUTLER; DAY, 1998). Em futuros estudos poderiam ser testadas a utilização de *L. boryana* e sua melanina na bioabsorção de metais pesados e substâncias tóxicas como agrotóxicos de resíduos agroindustriais.

As melaninas têm afinidade e absorvem substâncias carcinogênicas (LARSSON; TJALVE, 1979) e inibem o efeito citotóxico de quimioterápicos como Doxorubicina e Daunorubicina em células MOLT 4 (SVENSSON et al., 2003). Também apresentaram atividade antiviral (HIV) (MONTEFIORI, 1991). Com estas características das melaninas, poderiam ser feitos trabalhos sobre as atividades biológicas dos caldos de cultivo melanizados de *L. boryana*.

Caso no futuro, for encontrado aplicações para a melanina de *L. boryana* vai ser importante entender mais sobre a fisiologia deste fungo a fim de identificar estratégias para melhorar a produção de melanina. Na literatura há relativamente pouca informação sobre a fisiologia dos fungos produtores de melanina.

Ravishankar et al. (1995), revisado por Butler e Day (1998), em um trabalho com fungos marinhos do mangue, *Cirrenalia pygmaea*, mostrou que a hifa sem melanina apresentou maior suscetibilidade ao choque osmótico, propondo um papel para melanina na osmolaridade das células. Esta mesma função na osmolaridade foi observada em célula procariótica onde elevação da temperatura (acima de 30 °C) e o aumento da salinidade induziram a produção de melanina por *Vibrio cholerae* (COYNE; AL-HARTHI, 1992). Em futuros experimentos poderia ser testado se há diferença na produção de melanina por *L. boryana* com diferentes concentrações de NaCl ou outro sal qualquer, podendo com isso melhorar sua produção.

## 6 CONCLUSÕES

Com o estudo comparativo sobre os polissacarídeos dos corpos de frutificação de *L. boryana* e *L. edodes*, foi possível demonstrar que o *L. boryana* possui polissacarídeos semelhantes ao *L. edodes*. Sabendo-se que o *L. edodes* é considerado um cogumelo medicinal devido às atividades biológicas dos polissacarídeos do seu corpo de frutificação, com isso pode ser esperado que o *L. boryana* também possua atividades biológicas similares, o que seria um potencial biotecnológico a ser explorado. Em futuros trabalhos poderiam ser isolados e caracterizados polissacarídeos do corpo de frutificação e do micélio do *L. boryana*, também poderiam ser feitos testes para verificar suas atividades biológicas.

Com os trabalhos sobre o crescimento micelial em placas foi demonstrado que o *L. boryana* possui características de cultivo similares ao *L. edodes*. Considerando estes fatos pode ser esperado que os trabalhos sobre o cultivo de *L. edodes* podem ser utilizados como base para novos experimentos com o *L. boryana*, mas o trabalho apresentado nesta dissertação alerta para que sejam tomados alguns cuidados especiais, isto porque o *L. boryana* possui maior sensibilidade a temperaturas elevadas (acima de 25 °C) e a concentrações elevadas de fontes simples de nitrogênio.

As análises espectrográficas (RPE, IV e RMN) realizadas com o pigmento produzido por *L. boryana* sugerem que se trata de uma melanina, provavelmente uma DOPA-melanina. As observações dos fatores influenciadores da produção de melanina por *Lentinula boryana* sugerem que a elevação da temperatura e a presença de outros microorganismos no meio de cultivo estimulam a produção de melanina, bem como a disponibilidade de nutrientes e de oxigênio mostrou ser importante para a sua produção. O fato de que as melaninas possuem aplicações na indústria e na medicina e que o *L. boryana* produz estas melaninas revela um potencial biotecnológico a ser explorado para o macrofungo. No futuro podem ser feitos estudos para otimizar a produção de melanina e de enzimas envolvidas na sua produção, procurando possíveis aplicações para estes produtos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERLINER, D. L. Berliner; R. L. Erwin; D. R. McGee. **Methods of treating Parkinson's disease using melanin**. Int. A61K 037/00. U. S. n. 5,210,076, November 5, 1990, May 11, 1993.
- BILINSKA, B. Progress of infrared investigations of melanin structures. **Spectrochimica Acta**, v. 52, p. 1157-1162, 1996.
- BOHN, J.A.; BEMILLER, J. N. (1→3)- $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships **Carbohydrate Polymers**, v.28, p.3-14, 1995
- BOYLE, D.; KROPP, B. R. Development and comparison of methods for measuring growth of filamentous fungi on wood. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p.1053-1060, 1992.
- BOYLE, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biological Biochemistry**, v. 30(6), p. 817-823, 1998.
- BUTLER, M. J., and Day, A. W. Fungal melanins: A review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1115–1136, 1998.
- 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.
- CAESARTONTHAT, T. C.; KLOEKE. F.V., GEESEY G.G.; HENSON J.M. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61(5), p. 1968-1975, 1995.
- CHANG, S. T. ; HAYES, W. A. The biology and cultivation of edible mushrooms, San Diego, California, ACADEMIC PRESS INC. (LONDON) LTD. p. 445-459, 1978.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC Press, p. 189-223, 1989.
- 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.
- CHIHARA, G. Lentinan and its related polysaccharides as host defence potentiators: Their application to infectious diseases and cancer. **Immunotherapeutic Prospects of Infectious Diseases**. p. 9-18, 1990.

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

D'AMATO, R. J. D'Amato. **Use of melanin for inhibition of angiogenesis and macular degeneration.** Int. A61K 038/00. U.S. n. 6,525,019. September 28, 2001, February 25, 2003

DELLA-CIOPPA, G. Della-Cioppa, S. Garger Jr.; G. G. Sverlow; T. H. Turpen; L. K. Grill; M. R. Chedekal. **Melanin production by streptomyces.** Int. C12P 017/14; A61K 007/44, U. S. n. 5,814,495, March 14, 1995, September 29, 1998

FOG , K. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic-matter. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 63(3), p. 433-462, 1988.

GALLAS, J. M. Gallas. **Melanin hydrophilic contact lenses.** Int. C08L 089/04. U.S. n. 5,187,207, December 19, 1989, February 16, 1993.

GARGER, S. Garger Jr.; S. Neidleman. **Melanins with improved ability to inhibit HIV replication** Int. C12Q 001/06; C12Q 001/70; A01N 037/18. U.S. n. 6,440,691 October 1, 2001, August 27, 2002.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magnolia pubescens* (Tingui). **Carbohydr. Res.**, v. 282(1), p. 325-333, 1996.

GUIMARÃES, E. **Caracterização química, espectroscópica e por análise térmica de ácidos húmicos e vermicompostos obtidos de esterco de diferentes animais.** Curitiba, 1997.110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

GUZMÁN, G., et al. **EL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES**, México, D. F: Instituto Politécnico Nacional, p. 150-153, 1993.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal and Therapeutic Value of the Shiitake Mushroom. **Advances in applied Microbiology**, v. 39, p. 159-184, 1993.

KELLNER, R.; MERMET, J.M.; OTTO, M.; WIDMER, H. M. **Analytical Chemistry**, 1. ed. New York: Wiley-VCH, 1998.

HARKI, E.; TALOU, T.; DARGENT, R. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. **Food Chemistry**, v. 58(1-2), p. 69-73, 1997.

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.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 381-386, 2002.

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

IIZUKA, H. Production of *Lentinus edodes* mycelia extracts (LEM) **Food Reviews International**, v. 13(3), p. 343-348, 1997.

KATRITZKY.A.R.; AKHMEDOV, N.G.; DENISENKO, S.N.; DENISKO, O.V. H-1 NMR spectroscopic characterization of solutions of *Sepia melanin*, *Sepia melanin* free acid and human hair melanin. **Pigment Cell Research**, v. 15(2), p. 93-97, 2002.

KAWAI, G.; KOBAYASHI, H.; FUKUSHIMA, Y. Liquid culture induces early fruiting in Shiitake (*Lentinula edodes*). **Science and Cultivation of Edible Fungi**, p. 825-832, 1995.

Koga; Junichi Ohashi; Yasuhiro Hiratani; Hajime. **Inhibitor of herpesvirus absorption** Int. A61K 031/70, U. S. n. 5,283,239, January 14, 1992 February 1, 1994

KUO, M.-J.; ALEXANDER, M. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology*, v. 94(3), p. 624-629, 1967.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LARSSON, B.; TJALVE, H. Studies on the mechanism of drug-binding to melanin **Biochemical Pharmacology**, v. 28(7), p. 1181-1187, 1979.

LEATHAM, G. F. A chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*. **Mycology**, v. 75, p. 905, 1983.

LEE, K-F. Lee. **Ultraviolet radiation protective clothing**. Int. D03D 003/00 U.S. n. 6,034,003 December 29, 1997 March 7, 2000

LELIK, L.; VITANYI, G.; LEFLER, J.; HEGOCZKY, J.; NAGY-GASZTONYI, M. VERECZKEY, G. Production of the mycelium of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom and investigation of its bioactive compounds. **Acta Alimentaria**, v. 26(3), p. 271-277, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

MACKINTOSH, J. A. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin **Journal Of Theoretical Biology**, v. 211, p. 101-113, 2001.

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

MATA, G.; SAVOIE, J-M.; DELPECH, P.; OLIVIER, J-M. Reductions in the incidence of *Trichoderma spp.* using substrate supplementation with peat and an alternative spawn during cultivation of *Lentinula edodes* on pasteurized wheat straw. **Agronomie**, v. 18, p. 515-520, 1998.

MATA, G.; DELPECH P.; SAVOIE J. M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 118-122, 2001.

MEHL Sr., T. L. Mehl; N. Zaias. **Melanin enhanced hair coloration**. Int. A61B 017/36. U.S. n. 5,906,610 December 12, 1997, May 25, 1999.

MITCHELL, D.A. **Development of a model system and a mathematical model for solid-state fermentation**. 1989a. Thesis (Doctor of Philosophy in Biotechnology) - The University of Queensland, Austrália.

MITCHELL, D.A., DOELLE, H.W. & Greenfield, P.F., Suppression of penetrative hyphae of *Rhizopus oligosporus* by membrane filters in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology Techniques**. v. 3, p. 45-50, 1989b.

MIZUNO, T. Shiitake, *Lentinus edodes*: Funcional proprieties for medical and food purposes, **Food Reviews International**, v.11(1), p. 111-128, 1995.

MOHAGHEGHPOUR, N. Mohagheghpour. **Mediation of cytokines by melanin** Int. A61K 038/00. U.S. n. 6,242,415 February 12, 1997 June 5, 2001

MONTEFIORI, D.C.; ZHOU; J.Y. Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. **Antiviral Research**, v. 15(1), p. 11-26, 1991.

MONTEFIORI, D. C. Montefiori. **Method of inhibiting replication of HIV with water-soluble melanins** Int. A01N 037/18; A61K 037/02, U. S. n. 5,057,325 March 20, 1990, October 15, 1991

- NAKAMURA, K.; YOSHIDA, M.; UCHIWA, H.; KAWA, Y.; MIZOGUCHI, M. Down-regulation of melanin synthesis by a biphenyl derivative and its mechanism **Pigment Cell Res** v. 16, p. 494–500, 2003.
- OKUN, M. R. Okun; **Method of treating psoriasis**. Int. A01N 009/24, A61K 031/12, U.S. n. 3,987,202 December 23, 1974 October 19, 1976
- SUGANO, N.; IIZUKA, C.; MAEDA, R. **Anticancer drugs** Int. A61K 037/02; C12P 021/00; C12P 001/02; C12P 019/02 U. S. 4,461,760 July 8, 1982, July 24, 1984.
- PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; SEALY, R.C. Analysis of the electron-spin-resonance spectrum of synthetic dopa melanin. **Biochimica Et Biophysica Acta**. v. 884(3), p. 510-516, 1986.
- PAWELEK, J. Pawelek; M. P. Osber; S. J. Orlow. **Synthetic melanin as a sunscreen and tanning agent**. Int. C08G 063/06 U. S. n. 5,384,116 March 25, 1993 January 24, 1995.
- REHNSTROM, A.L.; FREE, S.J. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola* **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 321-330, 1996.
- RILEY, P.A. Melanin. **International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**. v. 29(11), p. 1235-1239, 1997.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151(2), p. 341-353, 2001, resumo.
- ROSSI, I.H.; MONTEIRO, A.C.; MACHADO, J.O.; BARBOSA, J.C. Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses for shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34(1), p. 61-65, 2003.
- ROYSE, D. J.; VAZQUEZ, J. E. S. Influence of substrate wood-chip particle size on Shiitake (*Lentinula edodes*) yield. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 229-233, 2001.
- SALMONES, D.; MATA G.; RAMOS L. M.; WALISZEWSKI K. N. Cultivation of Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. **Agronomie**, v.19, p. 13-19, 1999.
- SONG, C. H.; CHO, K. Y. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes*. **Mycologia**, v. 81(4), p. 524-522, 1989.
- SASAKI, T. ; TAKASUKA, N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 47, p. 99-104, 1976.
- SAVOIE, J. M., MATA, G.; BILLETTE, C. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma sp.* And Shiitake, *Lentinula edodes*. **Applied Microbiological Biotechnol.** v. 49, p. 589-593, 1998.

SHIDA, M.; UCHIDA, T.; MATSUDA, K. A (1→3)-alpha-d-glucan isolated from fruit bodies of *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 60(1), p. 117-127, 1978.

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

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

STAINSACK, J. **Estudos de estruturas de melaninas sintéticas através da interação com íons metálicos paramagnéticos**. Curitiba, 1998.102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

STAINSACK, J.; MANGRICH, A. S.; MAIA, C.M.B.F.; MACHADO, V.G.; DOS SANTOS, J.C.P.; NAKAGAKI, S. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 356, p. 243-248, 2003.

SVENSSON, S.P.S.; LINDGREN, S.; POWELL, W.; GREEN, H. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells **Pigment Cell Research**, v. 16(4), p. 351-354 2003.

TIAN, S.Y.; GARCIA-RIVERA, J.; YAN, B.; CASADEVALL, A.; STARK, R.E. Unlocking the molecular structure of fungal melanin using C-13 biosynthetic labeling and solid-state NMR. **BIOCHEMISTRY**, v. 42(27), p. 8105-8109, 2003.

URBEN, A. F *et al.* Cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais. Apostila EMBRAPA, 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.; LIN, H-C. ; MAU, J-L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, v. 72, p. 465-471, 2001.

YANG, X-T.; YANG Q-Y. The isolation, purification and identification of the two new polysaccharides (Le-2-1 and Le-2-2) of the mycelia of *Lentinus edodes*. **Science and Cultivation of Edible Fungi**, p.439-447, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to Uv light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60(10), p. 3864-3866, 1994.

WASSER, S.; WEIS, A. L. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 65-96, 1999.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, WHISTLER, R. L.; WOLFRON, M. L.A. Reduction with sodium borohydride. In (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, , v. 2, p. 65-68, 1963.

WOODFORD, W. J. Woodford. **Method for detecting tetrahydrocannabinol in human urine involving melanin precipitation**. Int. G01N 033/534; G01N 033/94 U.S. n. 4,843,020 January 14, 1988 June 27, 1989

YAVARI, I.; JABBARI A.; MORADI, S. An ab initio study of conformational properties of lenthionine **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v. 631, p. 225-229, 2003.

ZHANG, P. ; ZHANG, L.; CHENG, S. Chemical structure and molecular weights of  $\alpha(1\rightarrow3)$ -D-Glucan from *Lentinus edodes*. **Bioscience Biotechnol. Biochem.**, v. 63(7), p. 1197-1202, 1999.