

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**COMPORTAMENTO AGRONÔMICO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE *Ganoderma lucidum* CULTIVADAS EM
SERRAGEM**

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
Título de Mestre em Agronomia (Energia
na Agricultura)

BOTUCATU-SP

Fevereiro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**COMPORTAMENTO AGRONÔMICO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE *Ganoderma lucidum*
CULTIVADAS EM SERRAGEM**

STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Marli Gerenutti

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
Título de Mestre em Agronomia (Energia
na Agricultura)

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

V614c Viana, Sthefany Rodrigues Fernandes, 1988-
Comportamento agrônômico e caracterização bioquímica de linhagens de
Ganoderma lucidum cultivadas em serragem / Sthefany Rodrigues Fernandes
Viana. - Botucatu : [s.n.], 2014
xii, 55 f. : tabs., grafs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni
Coorientador: Marli Gerenutti
Inclui bibliografia

1. Cogumelos - Cultivo. 2. Cogumelos medicinais. 3. Po-lissacarídeos.
4. Fenóis. I. Minhoni, Marli Teixeira de
Almeida. II. Gerenutti, Marli. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências
Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “COMPORTAMENTO AGRONÔMICO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE *Ganoderma lucidum* CULTIVADAS
EM SERRAGEM”

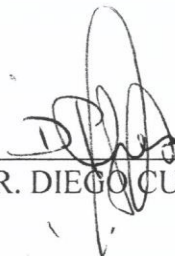
ALUNA: STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

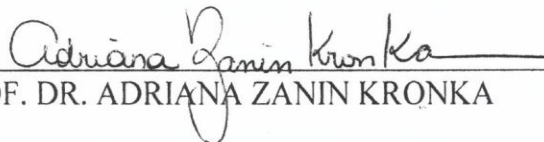
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. DIEGO CUNHA ZIED



PROF. DR. ADRIANA ZANIN KRONKA

Data da Realização: 06 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho ao meu filho Kadu, meus pais Marli e José Francisco, minhas irmãs Carolina, Gabriela e Juliane, meus avós, Sonia, "vô Zé" (in memorian), Lucia e André através dos seus esforços inesgotáveis, foram os principais responsáveis pela minha formação, bem como a minha maior fonte de inspiração para sempre lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Doutora Marli Teixeira de Almeida Minhoni, obrigada por todo carinho e empenho em me tornar uma pesquisadora e uma mulher mais forte em cada momento de minha vida. A Sra. sempre será um exemplo de pesquisadora, mulher e mãe para mim. Obrigada por saber exigir e elogiar nos momentos certos, e me impulsionar sempre para frente. Obrigada pelo constante estímulo para lutar pelos meus objetivos, mas, principalmente, agradeço o vínculo de amizade construído nesses anos de convívio.

À minha co-orientadora Professora Doutora Marli Gerenutti, exemplo de disciplina e compromisso com a docência. Agradeço pelo auxílio, companheirismo e pela confiança em mim depositada. A constante orientação de meus passos como pesquisadora e por tudo que eu já aprendi e irei aprender nessa nova jornada de pesquisas no doutorado.

Aos professores e alunos colaboradores do meu projeto Prof. Dr. Fernando Broetto (UNESP IBB), Dra. Profa. Erna Bach (UNINOVE), Dra. Prof. Magali G. Silva (UNISO), Prof. Dr. Eustáquio S. Dias (UFLA), Profa. Dra. Denise Grotto (UNISO), Profa. Dra. Meire C. Andrade (USC), Dra. Maria Aparecida de Jesus (INPA), Maiara A. C. Sousa (UFLA), Stefani Magalhães (UNISO), Maria Lúcia (UNISO), Thaisa B. Pickler (UNISO).

Aos meus colegas do Módulo de Cogumelos Meire, João, André, Fabrício, Dennis, Ivandro, Toninho, Fátima, agradeço os grandes momentos que passamos juntos e a amizade conquistada com todos vocês. Sem vocês não seria tão divertido pesquisar e produzir cogumelos.

Aos meus colegas de repúblicas e departamentos Marília, Laís, Ivana, Érika, Djanira, obrigado pela amizade, companheirismo e por serem parte da minha história.

Àos meus tios: Tio Guilherme por acreditar em mim e sempre me apoiar, **Tia Jônia** por ser muito mais que tia, minha amiga e parceira para todas as horas, **Tia Marlene** pelas “filosofadas” intermináveis e que fazem todo o sentido e me ajudam a entender esse mundão, **Tia Marcia** obrigada por sempre olhar por mim, e ser minha amiga. **À toda minha família pelo carinho, amor e apoio de todos vocês.**

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado iluminando meus caminhos, me concebendo oportunidades e aprendizados.

A CAPES, importante órgão de fomento à pesquisa, agradeço o financiamento das minhas atividades de pós-graduando.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão deste trabalho, meu sincero agradecimento.

“Educação gera conhecimento, conhecimento gera sabedoria,
e, só um povo sábio pode mudar seu destino.”
Samuel Lima

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO GERAL.....	05
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1 REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	07
4.2 PRODUÇÃO DE COGUMELOS.....	08
4.3 <i>Ganoderma lucidum</i>	11
4.3.1 Histórico.....	11
4.3.2 Compostos bioativos.....	11
4.3.3 Cultivo.....	14
4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS DE BASIDIOMICETOS.....	17
4.4.1 Polissacarídeos.....	17
4.4.2 Compostos fenólicos.....	19
5. REFERÊNCIAS.....	20
6. CAPÍTULO 1. PRODUÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Ganoderma lucidum</i> EM SUBSTRATO À BASE DE SERRAGEM.....	26
6.1 INTRODUÇÃO.....	26
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
6.2.1 Linhagem, inoculação e “semente”.....	28
6.2.2 Substrato de cultivo.....	31
6.2.3 Incubação.....	33
6.2.4 Produção.....	34
6.2.5 Colheita e armazenamento.....	35
6.2.6 Variáveis analisadas.....	35
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.3.1 Certificação das linhagens.....	36
6.3.2 Dados de incubação.....	37
6.3.3 Dados de cultivo.....	40
6.4 CONCLUSÃO.....	43
6.5 REFERÊNCIAS.....	43
7. CAPÍTULO 2. QUANTIFICAÇÃO DE β -GLUCANAS E FENÓLICOS TOTAIS	

EM CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE LINHAGENS <i>Ganoderma lucidum</i> PRODUZIDAS EM SUBSTRATO SÓLIDO.....	45
7.1 INTRODUÇÃO.....	45
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
7.2.1 Quantificação de β -glucanas.....	46
7.2.2 Quantificação fenólicos totais.....	49
7.2.2.1 Extrato bruto de compostos fenólicos em cogumelos.....	49
7.2.2.2 Curva de calibração de ácido gálico.....	50
7.2.2.3 Leitura em espectrofotômetro.....	50
7.2.3 Quantificação de proteínas no <i>Ganoderma lucidum</i>	51
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
7.4 CONCLUSÃO.....	53
7.5 REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Revisão de literatura	
Tabela 1. Produção mundial de cogumelos no ano de 2012.....	10
Tabela 2. Correlação entre cogumelos e seus efeitos terapêuticos.....	12
Tabela 3. Condições ótimas para o cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i>	14
Capítulo 1	
Tabela 4. Formulações de substratos à base de serragem, comumente utilizados para cultivo de basidiomas de <i>Ganoderma</i>	27
Tabela 5. Origem das linhagens de <i>G. lucidum</i> utilizadas.....	29
Tabela 6. Formulação de substrato sólido para a produção de <i>Ganoderma lucidum</i>	31
Tabela 7. Duração de fases de cultivo do <i>Ganoderma lucidum</i>	37
Capítulo 2	
Tabela 8. Resultados dos doseamentos de β -glucanas, compostos fenólicos e proteínas.....	52
Tabela 9. Concentração de β -glucanas (g/100g de cogumelo seco) de cogumelos comestíveis e medicinais por método HPLC e método enzimático.	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Revisão de literatura.	
Figura 1. Fotos de cogumelos cultivados em diversos sistemas.....	09
Figura 2. <i>Ganoderma lucidum</i>	11
Figura 3. <i>Ganoderma lucidum</i> A: em formato de rim. B: em formato de chifre.....	15
Figura 4. Esquema da estrutura química de uma β -(1-3)(1-6)-glucana.....	18
Figura 5. Exemplos de flavonóides mais comumente encontrados. A: catequinas e B: antocianinas.....	20
Capítulo 1	
Figura 6. Características para identificação <i>Ganoderma lucidum</i>	30
Figura 7. Sacos com filtros de Tyvec nos sacos de cultivo.....	32
Figura 8. Posição dos sacos de cultivos em caixas, prontos para serem esterilizados.....	32
Figura 9. Método utilizado para fechamento da boca dos sacos de cultivos, utilizando grampos.....	33
Figura 10. Disposição dos sacos de cultivo na sala de incubação.....	34
Figura 11. Estufa rústica para produção de <i>Ganoderma lucidum</i>	34
Figura 12. Etiqueta do Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP).....	36
Figura 13. Crescimento micelial das linhagens de <i>Ganoderma lucidum</i> 144 e 202 em placas de Petri.....	38
Figura 14. Formação de primórdios nos sacos de cultivo do <i>Ganoderma lucidum</i>	39
Figura 15. Corrida micelial com 25 dias de incubação das linhagens de <i>Ganoderma lucidum</i>	39
Figura 16. Dados médios, originais, de Eficiência Biológica das linhagens de <i>Ganoderma lucidum</i>	40
Figura 17. Dados médios, originais, de Rendimento basidiomas de <i>Ganoderma lucidum</i>	41
Figura 18. Formatos dos cogumelos produzidos das linhagens de <i>Ganoderma lucidum</i>	42
Figura 19. Substrato exaurido de cultivo de basidiomas de <i>Ganoderma</i>	

lucidum, com característica “prensada” e leve..... 43

Capítulo 2

Figura 20. Fluxograma do método enzimático, para quantificação de β -glucanas..... 48

Figura 21. Ilustração do método enzimático, para quantificação de β -glucanas..... 49

Figura 22. Ilustração do método Folin-Ciocalteu, para quantificação de compostos fenólicos..... 51

1.RESUMO

O fungo *Ganoderma lucidum* (Fr.) Krast, também conhecido como Lingzhi ou Reish, é um basidiomiceto pertencente à família Ganodermataceae, muito estudado por suas características medicinais. Imunomodulação e atividade antitumoral são algumas de suas indicações mais importantes à saúde humana, devem-se principalmente à presença de polissacarídeos e triterpenóides, que há séculos são utilizados na China, Japão e Coréia por fins terapêuticos. Com a crescente demanda por pesquisa com uso de *Ganoderma lucidum* no tratamento de doenças, a otimização da produção comercial tornou-se necessária para atender as demandas de mercado e de pesquisa. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: 1. avaliar e comparar a eficiência biológica e o rendimento de 7 linhagens de *G. lucidum*, 351, 1002, 0901, 0809, 339, 144, 202, cedidas por produtores e pesquisadores ao banco de linhagens do Módulo de Cogumelos FCA/UNESP. Todas cultivadas em substrato à base de serragem de eucalipto; 2. quantificar as concentrações de β -glucanas, fenólicos totais e proteínas nas linhagens estudadas. O substrato de cultivo foi composto de 80% de material volumoso (serragem de eucalipto) e 20% de farelos (trigo e soja) contendo 620g cada saco de cultivo. A quantificação das β -glucanas foi realizada por método enzimático; para a quantificação de fenólicos totais, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu e para proteínas totais o método utilizado foi de Lowry. O cultivo, desde a inoculação do substrato até a colheita dos basidiomas, durou, em média, 65 dias. Em relação a eficiência biológica as linhagens obedeceram a seguinte ordem $351 \geq 1002 \geq 0901 = 0809 = 339$ com 15,00%, 13,10%,

11,77%, 11,29% e 10,87%. O rendimento obedeceu a mesma ordem de significância, e obtiveram os seguintes valores: 5,95, 4,98, 4,31, 4,29, e 4,18g Kg⁻¹ das linhagens respectivamente. A linhagem com maior concentração de β -glucanas foi a 1002 com 10,50g/100g de cogumelo seco. As linhagens com maior concentração de fenólicos totais foram 1002 e 0809, ambas com média de 0,300mg/1g de cogumelo seco. E em relação a concentração de proteínas a linhagem 1002 também foi a que obteve maior valor com 0,766mg/1g de cogumelo seco. Concluiu-se que a linhagem 1002 cedida ao Módulo de cogumelos (FCA/UNESP) oriunda de produtor da cidade de Florianópolis, SC - Brasil, é a linhagem mais indicada em relação a rendimento e concentração de compostos bioativos.

Palavras-chave: rendimento, eficiência biológica, compostos fenólicos, β -glucanas.

2. SUMMARY

AGRONOMIC BEHAVIOR AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF STRAINS OF *Ganoderma lucidum* CULTIVATED SAWDUST

Botucatu, 2014. 65p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: STHEFANY RODRIGUES FERNANDES VIANA

Adviser: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

Co-adviser: MARLI GERENUTTI

The fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Krast , also known as Lingzhi or Reish, is a basidiomycete belonging to Ganodermataceae family, widely studied for its medicinal characteristics . Immunomodulation and antitumor activity are some of his most important insights to human health, are mainly due to the presence of polysaccharides and triterpenoids , which are used for centuries in China, Japan and Korea for therapeutic purposes. With the growing demand for research use of *Ganoderma lucidum* in treating diseases , optimization of commercial production became necessary to meet market demands and research . The objectives of this study were: 1 . evaluate and

compare the biological efficiency and yield of 7 strains of *Ganoderma lucidum* , 351 , 1002, 0901 , 0809 , 339 , 144 , 202 , assigned by producers and researchers to bank lines Module Mushrooms FCA / UNESP . All grown on substrate with sawdust ; 2 . quantify the concentrations of β - glucan , total phenolics and proteins in the strains studied . The culture substrate was composed of 80 % of bulk material (sawdust) and 20% bran (wheat and soybeans) containing 620g each bag cultivation . Quantification of β - glucans was performed by enzymatic method ; for quantification of total phenolic used the Folin - Ciocalteu total protein and the Lowry method was used . The cultivation , from inoculation to harvest the substrate of the mushroom lasted , on average, 65 days. Relative biological effectiveness strains obeyed the following order $351 \geq 1002 \geq 0901 = 0809 = 339$ with 15.00% , 13.10 % , 11.77 % , 11.29 % and 10.87 % . The yield followed the same order of significance , and obtained the following values : 5.95, 4.98 , 4.31 , 4.29 , and 4.18 g kg⁻¹ strains respectively. The line with the highest concentration of β - glucans was 1002 with 10.50 g/100 g of dry mushroom. The strains with the highest concentration of total phenolics were 1002 and 0809 , both with an average of 0,300 mg/1g of dried mushroom . And in relation to protein concentration lineage 1002 was also the one with higher value with 0.766 mg/1g of dried mushroom . It was concluded that the strain in 1002 ceded to the module mushrooms (FCA / UNESP) originating from a producer from the city of Florianópolis , SC - Brazil , the lineage is most appropriate in relation to yield and concentration of bioactive compounds .

Keywords: Yield, biological efficiency , phenolic compounds , β - glucans .

3. INTRODUÇÃO GERAL

Para o cultivo de cogumelos, a seleção do substrato é de fundamental importância para o sucesso da produção e obtenção do produto final desejado. O cultivo pode ser realizado em potes (de vidro ou plástico), em sacos plásticos ou em toras de madeira. As tecnologias de cultivo em substrato sólido para a produção de micélio ou corpo de frutificação ainda necessitam de tecnologias e estudos mais aprofundados.

O fungo *Ganoderma lucidum* já é reconhecido há muito tempo por suas propriedades medicinais, tendo grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e produtos nutracêuticos. Existem relatos de que seus compostos agem no sistema imunológico e nas vias bioquímicas, alterando a resposta celular, principalmente, em relação às suas atividades antitumorais e imunomoduladoras. As pesquisas sugerem que esses efeitos se devem, sobretudo, à presença de triterpenóides e glucanas. É comumente utilizado na China para “acalmar os nervos”, “melhorar a memória”, “retardar a senilidade”, agente antitumoral, entre outras finalidades. Entretanto, a quantidade e qualidade destes compostos variam em função da linhagem e fase de crescimento (vegetativo e reprodutivo) do fungo, condições ambientais, processamento, preparação de formulações, tipo de cultivo (substrato e tratamento deste).

Uma das formas inteligentes de aproveitamento de resíduos agroindustriais é o cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais. Pois, os resíduos, como casca de café, palhas de trigo, arroz e milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar, folhas de

bananeira, entre outros, são materiais orgânicos renováveis, ricos em carbono e energia. A massa de resíduos produzida pelas culturas é elevada, apresentando um potencial elevado para uso em solos, nutrição animal e produção de biomassa proteica de fungos, precedidos ou não de processos de compostagem e/ou tratamentos térmicos.

A biotransformação ou bioconversão de resíduos agrícolas na fungicultura resulta em cogumelos de valor nutritivo e comercial elevados. Ainda, buscando fechar o ciclo dos cultivos de cogumelos, o próprio substrato exaurido (pós-cultivo) pode e deve ser utilizado no condicionamento de solos, nutrição de plantas e animais. Como exemplo, sua utilização como alimento para ruminantes, pois os resíduos de cultivo de *Pleurotus* sp. proporciona digestibilidade melhorada ao animal em comparação ao alimento não colonizado pelo fungo (REGULY, 1996).

Além da sustentabilidade da fungicultura, a saúde e a qualidade de vida também são condições muito valorizadas nos dias atuais e, por essa razão, tem-se buscado novas terapias e fármacos menos nocivos à saúde. Neste sentido, em 2006, foi incorporada um informe técnico à normativa técnica nº19 de 29 de agosto (BRASIL, 2006), considerando legal o comércio dos cogumelos em cápsulas, comprimidos e tabletes na categoria de novo alimento, e permaneceu vetada a comercialização de extratos, líquidos isolados ou associados. E, no ano de 2010, a normativa RDC nº14 de 31 de março de 2010 incluiu os fungos multicelulares como medicamentos fitoterápicos, liberando assim a comercialização do produto na forma de extratos, sendo considerado um passo importante para incentivar as pesquisas científicas na área, incluindo-se estudos envolvendo a extração, purificação, toxicidade e análise do mecanismo de ação no organismo perante as doenças específicas, a fim de avaliar e concretizar o seu efeito no ser humano (BRASIL,2010).

No Brasil, a potencialidade medicinal dos cogumelos ainda não é reconhecida pela ANVISA, embora sejam utilizados há muito tempo em países asiáticos, América do Norte e Europa. Dessa forma, o aproveitamento da cultura de cogumelos medicinais ainda é pouco explorado no país, e o desenvolvimento de novos produtos contribuirá para o aumento do consumo pela população.

O interesse em desenvolver pesquisa com as β -glucanas, e investigar suas substâncias bioativas provenientes de corpos de frutificação do cogumelo, é devido à sua utilização milenar na cultura chinesa como agente promotor da saúde. Este estudo se propõe a quantificar a concentração de β -glucanas no cogumelo medicinal *G. lucidum* e comparar quanto a diferentes linhagens comercializadas com fins terapêuticos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Reaproveitamento de resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais são ricos em matéria orgânica e muitos destes contêm concentrações elevadas de compostos lignocelulósicos, como a celulose, hemicelulose e lignina. A utilização destes resíduos para o cultivo de cogumelos é uma das formas de reaproveitamento dos mesmos, com a finalidade de obtenção de uma massa proteica rica em vitaminas, fibras, compostos bioativos, etc. Os resíduos selecionados para cada cultivo de cogumelos variam com o cogumelo a ser cultivado, tipo de cultivo e com a disponibilidade dos mesmos na região. Por exemplo, na Europa, um dos resíduos mais utilizados é a palha de trigo (LOSS, 2013). A produtividade obtida com este resíduo é suficiente, dispensando o uso de suplementos como farelos de cereais (soja, milho, arroz) na formação do substrato. Por outro lado, Silva et al. (2009) relatam a necessidade de suplementar o substrato de cultivo com outros materiais nitrogenados como farelo de milho, soja, uréia, que contêm níveis elevados de nitrogênio, fontes de fósforo e sais minerais, suficientes para a otimização desses fungos.

Um aspecto muito importante na produção de cogumelos se dá pelo fato do mesmo ser ecológico, pois seus substratos são provenientes de resíduos

agroindustriais, não havendo emissão de lixo no final do processo (WASSER, 2005). A capacidade do fungo em crescer e produzir cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio e com a sua capacidade metabólica de ativar mecanismos fisiológicos, necessários para utilizar os nutrientes do substrato (MATA; DELPECH; SAVOIC, 2001). Muito destes resíduos não são diretamente utilizados pelos animais seja pela palatabilidade ou digestão, entre outros fatores inadequados.

A frutificação de cogumelos na natureza é um processo lento, podendo levar meses para produzir os corpos de frutificação. Com condições artificiais, a produção pode ser acelerada, favorecendo as pesquisas (EIRA, 2003). Pesquisas constantes são realizadas no teste de novas matérias-primas disponíveis, temperatura, pH, umidade, luminosidade, CO₂, oxigenação, relação C/N com o objetivo de fornecer ao microrganismo condições ótimas de crescimento (BONONI; TRUFFEM, 1986). O substrato e as condições de cultivo interferem até mesmo na qualidade nutricional e nas concentrações de substâncias bioativas dos cogumelos (YONG et al., 2003).

O cultivo de cogumelos axênicos, ou seja, cogumelos cultivados com substrato esterilizados (vapor úmido sob pressão), e em câmaras climatizadas, garante um padrão elevado de substrato, sendo assim um ponto positivo para produtores que necessitam padronizar seus procedimentos para o cultivo em série. Os farelos de soja e de arroz são as fontes mais utilizadas como nutrientes para a suplementação do substrato, pois estimulam o crescimento miceliano de diversas espécies de cogumelo basidiomiceto (ROSSI; MONTEIRO; MACHADO, 2001). As vantagens mencionadas fazem com que o cultivo de cogumelos desperte cada vez mais interesse de investidores e produtores rurais, como uma alternativa a mais para a renda familiar (JONG; BIRMINGHAM, 1992).

4.2 Produção de cogumelos

O cultivo de cogumelos expandiu-se por todo o mundo, representando uma importante atividade comercial devido ao seu valor gastronômico e medicinal, podendo ser produzidos de várias formas (Figura1).



Figura 1. Fotos de cogumelos cultivados em diversos sistemas: **A.** *Lentinula edodes* em toras; **B.** *Lentinula edodes* em blocos de serragem axênicos; **C.** *Flamulina velutipes* em sacos com serragem axênicos; **D.** *Pleurotus ostreatus* em blocos de serragem axênicos; **E.** *Pleurotus ostreatus* em potes com substrato de serragem axênico; **F.** *Agaricus bisporus* em composto pasteurizado (B, C, D e E Sthefany Viana), (A e F, Módulo de cogumelos UNESP-FCA).

Segundo levantamento de 2012 da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação- FAO, os maiores produtores de cogumelos do mundo compreende na China, Estados Unidos e Holanda. No ano de 2010, a produção de cogumelos foi de 7,4 milhões de toneladas. A China, neste aspecto, é o gigante, contando com 66,0% da produção total. Aproximadamente 90% da produção mundial foi originária de somente 6 países (FAOSTAT, 2013).

Apesar da baixa produção de cogumelos no Brasil se comparado aos países da Tabela 1, o mercado interno permanece em plena expansão, em virtude da descoberta de suas propriedades medicinais e culinárias, ainda existe a necessidade de desenvolvimento de tecnologias de cultivo adequadas para as condições do país, visto que, durante muitos anos, as tecnologias usadas foram adaptações das utilizadas nos países desenvolvidos, que possuem condições climáticas e matérias-primas diferentes das do Brasil (DIAS, 2010).

Tabela 1. Produção mundial de cogumelos no ano de 2012. Fonte: FAOSTAT (2013).

PAÍS	PRODUÇÃO (t)
1. China	5.158.810
2. Estados Unidos	470.450
3. Holanda	307.000
4. Polônia	220.000
5. Espanha	146.000
6. Japão	61.500

De acordo com o Censo Agropecuário do IBGE (2013), foram produzidas no Brasil 5.894 toneladas de cogumelos comestíveis no ano de 2006 (in natura e em conserva), tendo como espécie mais cultivada o *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), em segundas o *Agaricus blazei* Murril (Cogumelo do Sol) e o *Lentinula edodes* (Shiitake).

Conforme Conrad et al., (2013), cerca de 70% da produção estão concentradas no estado de São Paulo, nos municípios de Mogi das Cruzes e Suzano. Os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo são os que mais consomem cogumelos, em função do maior número de imigrantes europeus nos mesmos. Porém, na maior parte do país, ainda existe um baixo consumo de cogumelos, devido ao fato de ser uma cultura exótica, com estigma de conter substâncias tóxicas e ao seu elevado custo de produção, entre outros fatores.

O consumo per capita no Brasil é de apenas 30g ano⁻¹, muito baixo se comparado a 4 kg ano⁻¹ na França e 1,3 kg ano⁻¹ na Itália. O fator cultural, o custo elevado, a falta de informação e preparo do produto acabam por gerar esta imensa diferença de dados entre os países (TEIXEIRA, 2006).

4.3 *Ganoderma lucidum*

4.3.1 Histórico

O *Ganoderma lucidum*, também conhecido como cogumelo Reishi, no Japão, ou como Ling zhi, na China, é um dos cogumelos medicinais mais populares no Japão, China e Estados Unidos. Na história antiga da China, há mais de 4.000 anos, o *G.*

lucidum era reservado somente para os imperadores, por serem muito raros na natureza e considerado como o “elixir da vida”. Estudos científicos com este cogumelo iniciaram-se em 1972, quando pesquisadores japoneses desenvolveram métodos de produção eficientes e mostraram que os basidiomas podem conter várias cores. Essa variação de cor refere-se às condições ambientais de cultivo e representam também diferentes concentrações de substâncias bioativas (BUCHANAN et al., 2001).

A palavra chinesa *lingzhi* significa "erva de potência espiritual" e também reconhecida como "cogumelo da imortalidade" (AURORA, 1996), em virtude dos seus supostos benefícios para a saúde e provável ausência de efeitos colaterais, o que lhe concede uma reputação elevada no Oriente.

A chave taxonômica do *G. lucidum* é a seguinte: Reino Fungi; Divisão Eumycota; Subdivisão Basidiomycota; Classe Basidiomycetes; Ordem Aphyllophorales; Família Ganodermataceae/Polyporaceae; Gênero Ganoderma; Espécie *Ganoderma lucidum* (w. Curtis; Fries Karsten) (URBEN, 2004). Conforme descreve u Aurora (1996), quando novo, o *G. lucidum* (Figura 2) é um cogumelo tenro, suberoso e achatado, com chapéu visível de cor avermelhada e em formato de rim e, de acordo com a idade do espécime, pode apresentar poros brancos a acastanhados na sua parte inferior.



Figura 2. *Ganoderma lucidum*. Fonte: Disponível em: <http://factoidz.com/images/user/26598.jpg> Acesso em: 05 dez. 2011.

4.3.2. Compostos bioativos

O *G. lucidum*, assim como outros cogumelos, contém, em sua parede celular, substâncias funcionais importantes, destacando-se, as β -glucanas,

compostos fenólicos e os triterpenóides. Estas substâncias têm sido supostamente responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde humana, como atividade imunorreguladora, antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena (BRAUER; KIMMONS; PHILLIPS, 2001). No Japão e na China, este cogumelo tem sido utilizado em tratamentos de câncer, para estimular o sistema imune após radioterapia, quimioterapia e doenças autoimunes e até mesmo para tratar sintomas de doenças virais, como constipações, gripe, aftas e hepatite (Tabela 2) (GHAFAR et al., 2002).

Tabela 2. Correlação entre cogumelos e seus efeitos terapêuticos (STAMETS, 2001).

Efeitos Terapêuticos	COGUMELOS (*)																
	Ab	Cs	Ff	Fv	Ga	Gf	Gl	Go	He	Io	Le	Ls	Pl	Po	Pu	Sc	Tv
Antibacteriano		*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
Antifúngico						*					*					*	
Antiinflamatório					*		*		*	*			*		*		
Antioxidante		*															*
Antitumoral	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*		*		*	*	*
Antiviral	*		*		*	*			*	*		*	*	*	*	*	*
Homeostásico						*	*				*			*			
Hipoglicemiante	*	*				*	*				*						
Sistema cardiovascular		*					*	*						*			
Hipocolesterolemizante	*	*		*		*	*				*			*			
Imunomoduladora	*	*		*		*	*	*		*	*				*		*
Regulador sistema renal	*	*					*				*						*
Longevidade		*					*			*	*				*		*
Sistema respiratório		*			*	*	*	*							*		
Sistema neurológico		*					*	*	*					*			
Potencial sexual		*									*						
Anti-estresse		*				*	*				*						

(*) Ab= *Agaricus blazei* (Royal Sun Agaricus); Cs= *Cordyceps sinensis* (Cordyceps); Ff= *Fomes fomentarius* (Tinder fungus); Fv= *Flammulina velutipes* (Enoki); Ga= *Ganoderma applanatum* (Artist Conk); Gf= *Grifola frondosa* (Maitake); Gl= *Ganoderma lucidum* (Reishi); Go= *Ganoderma oregonense* (Oregon ganoderma); He= *Hericium erinaceus* (Yamabushitake); Io= *Inonotus obliquus* (Chaga); Le= *Lentinus edodes* (Shiitake) (Split-gill Polypore or Suehirotake); Ls= *Laetiporus sulphureus* (Chicken-of-the Wood or SulphurTult) (Tukey Tail or Yun Zhi); Pl= *Phelinus lineus* (Meshimakobu); Po= *Pleurotus ostreatus* (Oyster); Pu= *Polyporus umbellatus* (Zhu ling); Sc= *Schizophyllum commune*; Tv= *Trametes vesicolor*.

Os triterpenóides no *Ganoderma* spp., são também conhecidos como ácidos ganodéricos e já foram descritas mais de 150 moléculas diferentes no *Ganoderma* spp.. Alguns exemplos de triterpenos encontrados no *G. lucidum*, são os ácidos ganodéricos A e B, e estudos demonstram efeitos principais, como anti-inflamatório e antiteratogênico. Essas moléculas também diferem na proporção em

cogumelos mais novos ou mais velhos. Boh et.al, (2000) que a maior quantidade de triterpenóides foi encontrada nos talos (6,4 mg / g de peso seco ao ar), seguido pela camada mais jovem do píleo (2,5 mg / g), a camada mais antiga do píleo (0,6 mg / g) e a superfície superior do corpo de frutificação (0,6 mg / g). E descreve outros efeitos farmacológicos estudados com atividades: anti-hepatotóxicas, hepatoprotetoras, anti-tumorais, anti-angiogênicos, anti-hipertensivos, hipocolesterolêmicos, anti histaminicás, atividade anti-HIV, e antioxidante.

Os polissacarídeos de basidiomas, há tempo contém atenção científica, por representarem diversa classe estrutural de macromoléculas biológicas com vastas propriedades físico-químicas (bioativas). Polissacarídeos solúveis em água, têm demonstrado que os ser mais ativos no sistema imunológico, com ligações glicosídicas β -1-3- D e β -1-6- D glucanas, que pode ser observada se for precipitado com etanol. As cadeias laterais pequenas dessas glucanas e sua estrutura organizada helicoidal demonstram uma maior estimulação do sistema imunológico . Alguns polissacarídeos insolúveis em água também foram identificados como anti-tumorais (FANG et al., 2002).

Relatórios sobre a atividade farmacológica dos polissacarídeos dos *Ganoderma* descrevem principalmente seus efeitos anti-tumorais, por serem diretamente ligados à imunoestimulação, embora outros efeitos benéficos também sejam conhecidos.

As pesquisas demonstram que os compostos fenólicos também contêm muitos efeitos benéficos à saúde por sua capacidade antioxidante, prevenindo diversas doenças cardiovasculares, neurológicas e cancerígenas. Estes compostos têm, também, atividade anti-inflamatória, impedem a aglomeração de plaquetas sanguíneas e de radicais livres no organismo e protegem moléculas como o DNA, inibindo possíveis processos carcinogênicos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Nos países como China e Japão, há grande incentivo aos produtores e pesquisadores, visto que os cogumelos são considerados alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos, podendo ser utilizados como chás e/ou cápsulas para prevenir doenças, direcionando-os na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de novas espécies (FURLANI; GODOY, 2005).

Há dez anos, as vendas mundiais de cogumelo medicinal foram estimadas em US\$ 10 bilhões e, no que se refere somente às vendas de cogumelos

estimulantes do sistema imunológico, aumentaram as vendas em cerca de três vezes entre 2002 e 2003 (UNDERWOOD, 2003).

4.3.3. Cultivo

Normalmente, os produtos existentes no mercado são procedentes do corpo de frutificação ou de esporos. Contudo, seu desenvolvimento natural é um processo lento e vulnerável a condições do cultivo. Além da bioquímica do organismo, pode variar de acordo com as associações de linhagens, substratos, clima, épocas de maturação do fungo, até mesmo com manejo dos cultivos (RUBEL, 2012).

O *G.lucidum* é descrito como um cogumelo muito escasso na natureza e, pelo constante aumento e exigências dos mercados internacionais, é necessário o cultivo comercial de corpos de frutificação ou de biomassa micelial em meio líquido. Há um aumento nas pesquisas, básicas e aplicadas, envolvendo melhorias nas tecnologias de cultivo, produtos farmacêuticos e formulações nutracêuticas.

A qualidade do fungo e o teor de substâncias bioativas, em todos os processos de cultivo, variam com a linhagem do fungo, localização e condições do cultivo, tipo de substrato, fase do crescimento do fungo, os procedimentos de processamento, de formulação e preparo de produtos (HABIJANIC; BEROVIC, 2000). Os métodos mais tradicionais de cultivo de corpos de frutificação são em toras naturais ou em substrato à base de serragem, dispostos em sacos/garrafas plásticas. Ambas as tecnologias de cultivo dependem dos mesmos fatores ambientais principais, como: temperatura, umidade e oxigênio (Tabela 3).

Tabela 3. Condições ótimas para o cultivo de *Ganoderma lucidum*. (BOH et al., 2007)

	Incubação	Formação de Primórdio e Produção
Temperatura	25-32 °C	27-32°C
Umidade relativa	65-70%	90% após a formação do tampão 70-80% durante a formação e desenvolvimento do basidiomas 30-40% fase final, para colheita
Oxigenação	Oeróbio estrito	Formação rim: ventilação elevada Formação de chifre: ventilação reduzida
Luz	Ausência	50-450 lux
pH	4,2-5,3	-

Alguns fatores são cruciais para a diferenciação do micélio vegetativo em primórdios. A umidade alta é necessário, preferencialmente 90-95%, para encorajar a sua formação, e em relação ao formato do píleo o aumento de ventilação na câmara deixa o corpo de frutificação em formato de rim, diferentemente se a concentração de CO₂ estiver alta (>0,1%) o corpo de frutificação desenvolve-se em formato de “chifre” (Figura 3). A formação de primórdios demora cerca de 25 dias, após a formação do tampão. Após a colheita, é comum secagem imediata sob o sol ou com calor (60° C) por 2-3 dias.

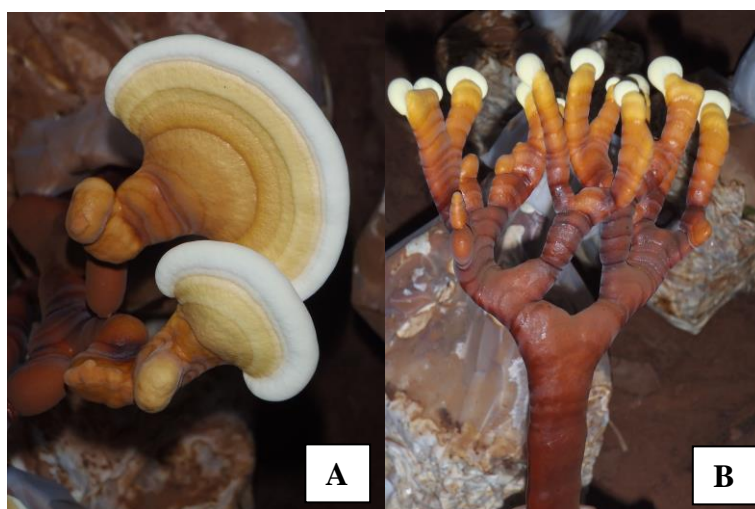


Figura 3. *Ganoderma lucidum* A: em formato de rim. B: em formato de chifre. Fonte: Módulo de Cogumelos FCA/UNESP.

Boh et al. (2007) descrevem métodos de cultivo em toras não esterilizadas, tendo estas um longo tempo de incubação de até 3 anos. Por este motivo, este método atualmente não é mais utilizado, pois também demanda muita mão de obra, podendo ser comparado à produção shiitake em toras no Brasil, que, com a introdução da tecnologia de blocos de serragem, foi perdendo espaço ao longo tempo e mãos de obra necessária. Já as toras esterilizadas são muito utilizadas por obterem um alto rendimento em um tempo curto de incubação (4-5 meses).

O cultivo em substrato sólido formulado para a produção de *G. lucidum* varia com a região e com o produtor, não havendo uma formulação “perfeita”. Chen (2004) publicou informações detalhadas sobre a formulação, condições de substrato e as consequências dela para o cultivo *G. lucidum*, tais como: baixo teor de açúcar (1% de sacarose) estimula a formação e ativação de enzimas de decomposição de lignina; o cálcio participa do processo de diferenciação do micélio para a formação do cogumelo; excesso

de umidade no substrato impede a troca de ar e causa suprimento de oxigênio; serragem muito fina também prejudica a troca de ar; pedaços de madeira no substrato podem perfurar o saco de cultivo e propiciar contaminações.

Alguns produtores formulam o substrato com base na relação C/N (70:1 a 80:1), uma escolha eficaz e de baixo custo. Gonzalez-Matute et al., (2002) relatam que para estimular a diferenciação do micélio, indução de primórdios e, também, para aumentar produção de substâncias bioativas, produtores acrescentam açúcares e outros ingredientes, como, por exemplo, casca de semente de girassol, que foi utilizada em um substrato como energia principal, com adição de 5% de malte, e observaram que a taxa de crescimento do cogumelo foi melhorada. Teste com substrato a base de serragem suplementada com vinhaça na proporção de 4:1, umidade é de 60% e a relação C/N de 70 a 80. A produção de *G. lucidum*, por apresentar teor elevado de carboidratos e nitrogênio, sendo nutritivo para o crescimento micelial (HSIEH; YANG, 2004).

O cultivo de *G. lucidum* em substratos formulados pode ser feito em potes ou em plásticos de polipropileno resistente ao calor. O substrato mais utilizado, é à base de serragem suplementada com 10% de farelo de arroz, 3% de CaCO_3 e com umidade de 58 a 65%. O filtro para a trocas gasosas é feito com um colar de cano pvc, colocado na boca do saco e com um tampão de algodão no seu orifício. O tratamento térmico é feito com calor úmido sem pressão (95-100°C, durante 5 horas) em diversos equipamentos, como tambores adaptados ou equipamento desenhado para este processo. Após o resfriamento do substrato, este é inoculado, podendo ser com semente líquida ou semente sólida (a base de serragem ou grãos). Normalmente a inoculação é feita em ambientes limpos, contudo depende muito da estrutura e técnica de cada produtor (REISHI, 2009).

A incubação para o crescimento miceliano do fungo com as condições de incubação ideais (temperatura com variação de 10-38°C, umidade durante todos os processos varia de 30 a 95%, luz e ventilação adequada a cada momento da diferenciação micelial), após a inoculação do micélio, dura em média 3-4 semanas. A produção é induzida com a alteração da temperatura da sala para 28°C, em média, e com o aumento da umidade relativa do ar para 85-90%. Comumente, os basídios iniciarão a produção em 1 ou 2 semanas após a incubação, e, nos 2-3 meses seguintes, os cogumelos estão prontos para serem colhidos. O mesmo substrato pode proporcionar uma seguida colheita (ROYSE, 1996).

Nos Estados Unidos e no Canadá, a formulação é a seguinte: 80% de serragem de carvalho, 18% farelo de trigo grosso, 1% sacarose, 1% carbonato de cálcio (ou o sulfato de cálcio) e umidade 67 a 70%. O cultivo é em potes com 500 g de substrato seco, composto por 400 g de serragem de carvalho, 90 g farelo de trigo, 5 g de sacarose, 5 g de carbonato e 1 litro de água. Tem sido considerada a melhor pelos produtores (CHEN, 2004).

4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS DE BASIDIOMICETOS

4.4.1. Polissacarídeos

Polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos, conectados por ligações glicosídicas, com massa molecular de média a alta. Diferenciam-se, principalmente, em função dos monômeros constituintes, tipo de ligação, comprimento da cadeia e número de ramificações.

São utilizados em setores industriais, tais como: farmacêutico, alimentício, cosmético, químico, têxtil, etc. São também utilizados como substâncias emulsificantes, texturizantes, estabilizantes e espessantes (KARACSONYI; KUNIAK, 1994). Essas macromoléculas, sintetizadas pelos seres vivos em geral, exercem diversas funções no organismo como armazenamento de energia (amido e glicogênio) e principalmente na estruturação (celulose, quitina e peptideoglicano) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Os polissacarídeos são os componentes mais importantes dos macrofungos, podendo ser isolados do corpo de frutificação, do micélio ou provenientes das culturas puras destes organismos, em laboratório, na forma de exopolissacarídeos. Há décadas, esses polissacarídeos vêm sendo estudados, principalmente pelas propriedades imunomoduladora, antiinflamatória, anticoagulante, entre outras (ZAIDMAN et al., 2005).

Os polissacarídeos são classificados como: homopolissacarídeos, polímeros cujas cadeias principais são formadas por unidades iguais de monossacarídeo glucose, e heteropolissacarídeos, sendo formados principalmente por cadeias de fucose e/ou manose. (ZHANG et al., 2007).

As glucanas são homopolissacarídeos, cujas cadeias principais são formadas por unidades de α - e/ou β -Glc ligadas (1→3), (1→6) e/ou (1→4). As glucanas

são as mais abundantes nos basidiomicetos, podendo ser encontradas intracelularmente, como constituintes da parede celular e na forma de exopolissacarídeos (RUIZ-HERRERA, 1991).

Dentre as glucanas que já foram descritas para basidiomicetos, as β -D-glucanas são as mais comuns, apresentando-se nas formas lineares ou ramificadas, e com diferentes massas moleculares. Esta molécula, apresenta estrutura química formada por uma cadeia principal constituída por unidades de β -glucose ligadas (1-3), podendo apresentar substituições em O-6 por uma única unidade de glucose, a cada três unidades da cadeia principal (Figura 4).

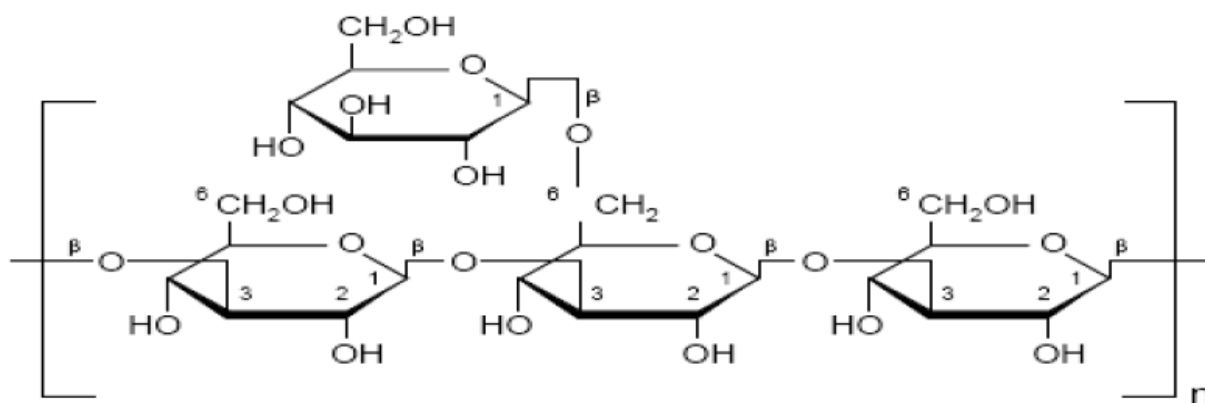


Figura 4. Esquema da estrutura química de uma β -(1-3)(1-6)-glucana (YANAKI et al., 1983).

Em todos os estágios de vida dos fungos há atividade das β -glucanases, até mesmo na autólise, e quase sempre está relacionada aos processos de sobrevivência, degradação de polissacarídeos e patogenicidade (CAO; LIN, 2003). As β -1,3-glucanases fúngicas foram classificadas como enzimas constitutivas presentes na maioria das espécies dos fungos e possuem dois mecanismos de ação distintos. São específicas para substratos contendo seqüências lineares de três ou mais unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas do tipo (1-3) com uma extremidade terminal não-redutora. No entanto, é tolerado um grau de substituição moderado de resíduos de glucose, e as β -1,3-glucanases podem atuar sobre (1-3) (1-6)-glucanas, por exemplo (MANNERS et al., 1976).

As ligações do tipo (1-6) ocorrem em conjunto com ligações do tipo β (1-3) em polímeros produzidos pela maioria dos microrganismos, e estão associadas à atividade das β 1,3-glucanases. O mecanismo de ação destas enzimas atuam

aleatoriamente, hidrolisando o substrato. Considerando que os microrganismos não produzem glucanases específicas, e sim, um conjunto de enzimas com propriedades diferentes (massa molar, pH e temperatura ótimos), porém, com a mesma especificidade (MARTIN et al., 2006).

4.4.2. Compostos fenólicos

Atualmente já foram detectados mais de 8000 compostos fenólicos. Na Figura 5, tem-se a estrutura química dos dois compostos fenólicos mais encontrados na natureza, catequinos e antocianinas. São encontrados em uma grande variedade de plantas (cebola, café, etc), frutas (maçã, uva, goiaba), chás, vinhos e produtos industrializados (ex. pigmentos: antocianinas – azul a vermelho, antoxantinas – tons amarelados) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). São basicamente formados por um anel aromático com no mínimo um hidrogênio substituído por um grupo hidroxila.

Compostos fenólicos são considerados metabólicos secundários nas plantas e nos fungos, e agem como antioxidantes, pois são capazes de retardar ou até mesmo impedir danos causados pela oxidação no organismo. Os antioxidantes tem habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios. É presente em pequenas concentrações se comparado às substâncias oxidantes. Dentre os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais destacam-se os ácidos fenólicos, os taninos, os flavonóides e os tocoferóis (STAFUSA, 2013).

Os antioxidantes podem ser divididos em antioxidantes primários e secundários. Os primários atuam principalmente sobre radicais livres, doando ions de H⁺ ou elétrons aos mesmos, e assim, estabilizando-os. Já os secundários têm diversos modos de ação, ou seja, através de ligações de íons metálicos, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação ultra violeta (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007). Representam flavonóides (composto fenólico) com estruturas benzênicas, tendo substituintes grupamentos hidroxilas (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999).

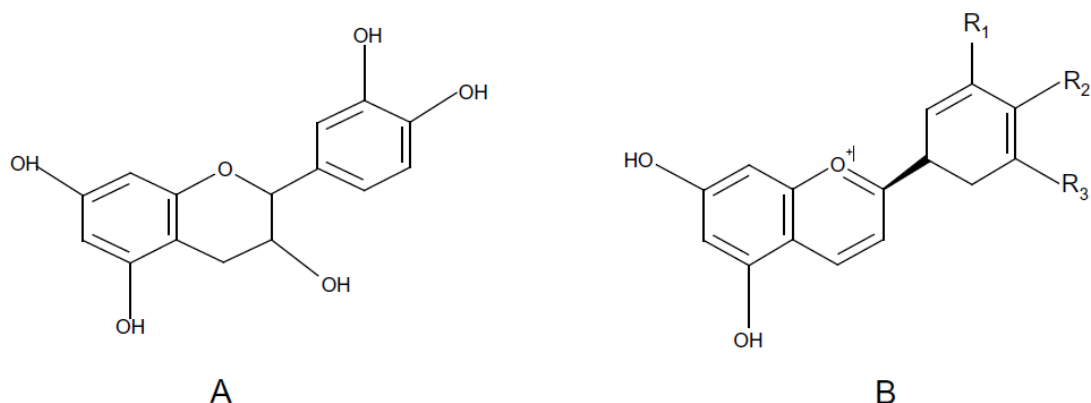


Figura 5. Exemplos de flavonóides mais comumente encontrados. A: catequinas e B: antocianinas. (SILVA et al., 2010).

Pesquisas demonstram muitos efeitos benéficos dos compostos fenólicos à saúde, pela capacidade antioxidante, prevenção de diversas doenças cardiovasculares, neurológicas, cancerosas, atividades antiinflamatória e a de impedimento de aglomeração de plaquetas sanguíneas. Uma vez que protegem moléculas como o DNA, impedem assim alguns processos carcinogênicos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000 LEVER, 1972).

A atividade antioxidante elevada é devido, principalmente, aos flavonóides dessas moléculas Apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas também amplamente encontradas em frutas como maçã, goiaba, cebola, café, uva (GRAHAM, 1992; VAN ACQUIRE, 1996).

Os compostos designados como não-flavonóides tem sua atividade antioxidante relacionada com a posição dos grupos hidroxilas na molécula, que quanto mais próximo do grupo fenil estiver do grupo hidroxila, maior será a capacidade antioxidante. (HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970).

5. REFERÊNCIAS

AURORA, D. **Mushrooms demystified**. 2. ed. [S.l.], Ten Speed Press, 1996.

BONONI, V. L.; TRUFEM, S. F. B. **Cogumelos comestíveis**. 3. Ed, São Paulo: Ícone, 1986.

BOH, B.; HODZAR, D.; DOLNICAR, D.; BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. **Food Technol Biotechnol**. V.1, p.11–18, 2000.

BOH B.; BEROVIC, M. Jingsong Zhang, Lin Zhi-Bin. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. **Biotechnology Annual Review**, v.13,p. 265-301, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico nº 19 de 29 de agosto de 2006 (Revoga o informe Técnico nº6, de 31 de janeiro de 2003) Assunto: Procedimentos para o enquadramento dos Cogumelos comestíveis em cápsulas, comprimidos e tabletes na área de alimentos. Disponível em:<http://anvisa.gov.br/alimentos/informes/19_300806.htm> Acesso em:03 Julho 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Assunto: Registro de medicamentos fitoterápicos. DOU nº 63, 5 de abril de 2010. Disponível em: <http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/RDC%2014_2010.pdf. Acesso em:03 Julho 2013.

BRAUER, D.; KIMMONS T.; PHILLIPS, M. Efeitos do manejo sobre o conteúdo de polissacarídeo de alto rendimento e peso molecular de shiitake (*Lentinula edodes*) cogumelos. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 2001.

BUCHANAN, P. K. et al. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with special reference to species of medicinal and nutraceutical importance. IN: **Proc. Int. Symposium Ganoderma Sci**, Auchland, 27-29 Abril, 2001. Disponível em: <<http://www.ganopoly.com>.> Acesso em: 5 dez. 2011.

CAO, L. Z.; LIN, Z. B. Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells *in vitro*. **Acta Pharmacology Sinica**, v. 24, n. 4, p. 321-326, 2003.

CHEN, A.W. Growing *Ganoderma* mushrooms. In: Mushroom Grower's Handbook I, Part III: Mushrooms Worldwide, Chapter 11: Mushrooms for the tropics. p. 224–284,2004. Disponível em: available at http://www.mushworld.com/service/handbook/english/eng-book1/chapter11-01_p.224.pdf. Acesso em: 15 maio 2013

CONRAD, R. W. et al. **Análise econômica de cultivo e processamento de cogumelos champignon em Pelotas – RS**. IN: XX Congresso de iniciação científica UFPEL. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/EN/EN_00084.pdf>. Acesso em 22 jan. 2013.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542010000400001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 jan.. 2013.

EIRA, A. F. Cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann. Viçosa: Aprenda Fácil, p.396, 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Top production – Hongos y trufas – 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 16 set. 2012.

FANG JN, BAO XF and YUEN WH. Studies on the polysaccharides from spores of *Ganoderma lucidum*. In: *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics*, Zhi-Bin Lin (ed), **Proceedings of International Symposium on Ganoderma Research, Shangha**, Beijing, Medical University Press, pp. 98–103,2002.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

GHAFFAR, M. A. et al. Regressão do cancer de próstata após a administração de genisteína polissacarídeo Combinada (GCP), um suplemento nutricional: relato de caso, **Jornal de Medicina Alternativa e Complementar**, p. 493-497, 2002.

GONZALES-MATUTE, R.; FIGLAS, D.; DEVALIS, S. DELMASTRO, N.C. Sunflower seed hulls as a main nutriente source for cultivating *Ganoderma lucidum*. **Micologia aplicada internacional**. 14(2), p 19-24, 2002.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **Journal Agriculture Food Chemister**, Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

HABIJANIC, J; BEROVIC M. The relevance of solid-state substrate moisturing on *Ganoderma lucidum* biomass cultivation. **Food Technol Biotechnol** v.38, p225–228, 2000.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 52, n. 6, p. 481- 504, 2000.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica, Ciudad de La Habana**, v.18, n. 1, p. 12-14, 1999.

HSIEH, C; YANG, F.C. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Bioresour Technol**, v.91, p.105–109, 2004.

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **American Journal Enol Vitic.**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA**. São Paulo, v.1, n 4, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/horti/default.asp?t=2&z=t&o=19&u1=1&u2=1&u3=1>>. Acesso em: 17 jan. 2013.

JONG, S. C., BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom Ganoderma. **Adv. Applied Microbiology**, v. 37, p. 101-134, 1992.

KARACSONYI, S.; KUNIAK, L.; Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. **Carbohydrate Polym journal**, v. 24, p.107-111, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 273-279, 1972.

LOSS, E. M S. **Aproveitamento de resíduos da cadeia produtiva do milho para cultivo de cogumelos comestíveis**. Disponível em: <http://www.bicentede.uepg.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=373>. Acesso em: 14 jan. 2013.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MANNERS, D. J. et al. Some properties of a fungal D-glucanase preparation. **Carbohydrate Research**, v. 49, p. 383-388, 1976.

MARTIN, K. L. et al. Purification and characterization of the extracellular α -1,6-glucanases from the fungus *Acremonium* strain OXF C13 and isolation of the gene/s encoding these enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 351-357, 2006.

MATA, G.; DELPECH, P.; SAVOIC, 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, n. , p. 118-122, 2001.

MINHONI, M. T. A., FURLAN DE JESUS, J. P.; VIEIRA, F. R. Produção de micélio de cogumelos comestíveis. In: SALES-CAMPOS, C.; VAREJÃO, M. J. C. **Bioconversão de resíduos da Amazônia para cultivo de cogumelos comestíveis**. Manaus: Inpa, 2011.

REISHI, The wood logs are then placed in greenhouses with strictly controlled environmental factors. Reishi natural log method. 2009 disponível em <http://www.reishi.com/cultivation-e.htm>. Acesso em: setembro 2013.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. [S.l.]: Editora Universitária/UFPel, p330, 1996.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.

ROYSE, D.J. **Specialty mushrooms**. In: Progress in New Crops, Janick J (ed), Arlington, VA, ASHS Press, p. 464–475, 1996.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido**: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/11111/2006.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 17 out. 2012.

RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of β -glucans in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 60, p. 73-81, 1991.

SILVA, A. C. et al. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 4, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências agrárias**, Londrina, v.31, n. 3, p.669-682, jul/set. 2010

STAMETS, P. Mycomedicinals: an informational booklet on medicinal mushrooms. **Cross-Index of Mushrooms and targeted disease complexes**, 2001.

STAFUSSA, A. P. Propriedades antioxidantes e perfil dos compostos fenólicos de cogumelos. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, f.38, 2013.

TEXEIRA, Thaise. Cogumelos: alternativa para pequenos. **A Granja**, n.692, 2006.

UNDERWOOD, A. **The magic of mushrooms**. Newsweek, 142-161, 2003.

URBEN, A. (Org.). O cultivo de *Ganoderma lucidum* com a técnica “JUN-CAO” In: **Produção de cogumelos por meio de Tecnologia Chinesa modificada**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

VAN ACQUIRE, S. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic Biol Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnol**, v. 60, p. 258-274, 2005.

YONG, K. P. et al. Determination of β -glucan concentration in *Agaricus blazei* Murill mushroom by enzymatic method. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, v. 23, n. 3, 2003.

ZAIDMAN, B. et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology Biotechnol.**, v. 67, p. 453-468, 2005.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharide from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Food Science and Technol.**, v. 18, p. 4-19, 2007.

WASSER S. P.; COATES, P.; BLACKMAN, M.; CRAGG, G.; LEVINE, M. Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*). **Journal Encyclopedia of Dietary Supplements**. New York: Marcel Dekker. p. 680–90, ; 2005.

6. CAPÍTULO 1. PRODUÇÃO DE LINHAGENS DE *Ganoderma lucidum* EM SUBSTRATO À BASE DE SERRAGEM

6.1 INTRODUÇÃO

Muitos resíduos agrícolas são utilizados no cultivo de cogumelos. Os resíduos lignocelulósicos fornecem, especialmente, carbono. Os farelos, por sua vez, fornecem especialmente nitrogênio e outros macro e micro nutrientes (aminoácidos e proteínas). Para a formulação de substrato é normalmente utilizada uma mistura desses dois compostos, sendo que estas concentrações são muito variadas e, geralmente, utilizam-se materiais disponíveis na região (MACEDO et al., 2012).

A energia contida no substrato é proveniente principalmente dos materiais nitrogenados e quanto maior seu nível, mais baixa é a relação C/N e mais caro fica o composto. Com isso, deve-se estudar as melhores condições e região para cada linhagem de fungo escolhido para cultivo. Já foi possível verificar cultivos de linhagens iguais de fungo, produzidas em lugares diferentes, que não apresentaram o mesmo resultado (MINHONI et al., 2011).

O efeito estimulatório no crescimento de *P. ostreatus* pela adição de farelos em substratos foi relatada por Donini et al. (2005), contudo a variação de 10% quanto de 20% de farelo de arroz favoreceu o crescimento do cogumelo de forma semelhante. Os resultados mostraram que somente a adição de farelos de trigo e de soja influenciaram de forma significativa no crescimento micelial de três linhagens de *P.*

ostreatus avaliadas, e os resultados mais expressivos deram-se nos substratos suplementados com farelo de soja a 20% (DONINI et al., 2005).

O cogumelo *Ganoderma lucidum* é raramente encontrado na natureza e por isso seu cultivo se fez necessário. O cultivo do mesmo, antes realizado em troncos de árvores, hoje é feito em substrato à base de serragem. O sucesso do cultivo depende de fatores ambientais (temperatura, umidade e oxigênio), composição do substrato e linhagem do fungo propriamente dito (Tabela 4).

Tabela 4. Formulações de substratos à base de serragem, comumente utilizados para cultivo de basidiomas de *Ganoderma*. Fonte: Chen, 2004

Substrato	Serragem (%)	Farelos (%)	Suplementos (%)	CaCO ₃ (%)	H ₂ O (%)	Referências
1	80	18	Sacarose 1	1	67	Chen e Miles, 1996
2	80	20	-	Um pouco	70	Hseu, 1993
3	78	20	-	2	*	Liu et al., 1990
4	75	25	-	-	*	Lu e Chang, 1975
5	87	10	-	3	*	Tong e Chen, 1990
6	93,5	5	MgSO ₄ 0,2	-	*	Triratana et al., 1991
7	serragem:lascas de madeira de carvalho (1: 1) (2,2kg por saco com substrato úmido) lascas de madeira encharcadas e fermentadas em melaço enriquecido acrescidas de água (em 50mL de melaço são colocados 5 galões de água)					Stamets, 2000

* quantidade adequada de água, segundo os autores.

Na colonização micelial de *Ganoderma lucidum*, a temperatura de incubação ideal é entre 25°C e 32°C, sendo que o micélio chega a suportar extremos que vão de 10°C a 38°C. O teor de umidade ideal do substrato de serragem é 65 - 70% e pH entre 4,2 - 5,3, é considerado ótimo. O crescimento micelial não requer luminosidade, já o oxigênio é indispensável para seu desenvolvimento, visto que *G. lucidum* é um aeróbio estrito. Essa troca gasosa é feita pelo filtro contido no saco de cultivo. Na fase seguinte, de formação de primórdios, *G. lucidum* desenvolve a 20 - 34° C, com temperatura ótima compreendida entre 27°C a 32°C. A umidade da sala deve ser elevada para cerca de 90% durante a indução primordial e rebaixada para 70-80% na fase de formação do tampão. Na fase final de desenvolvimento do basidiomas, a umidade é reduzida ainda mais, por volta de 30 - 40%. À respeito de iluminação, 50-450 lux são necessários na formação de primórdios e no desenvolvimento do basidiomas (BOH et al., 2007).

A temperatura de secagem dos cogumelos para armazenamento é muito importante, pois os processos de oxidação são elevados quando submetidos a temperaturas acima de 50°C, causando mudanças significativas na qualidade dos basidiomas e, em especial, nos compostos bioativos, como por exemplo os flavonoides (ELMASTAS et al., 2007).

Os processos de produção de fungos comestíveis e medicinais estarão sempre ligados a qualidade e durabilidade do produto final, havendo sempre a necessidade de estudar métodos mais viáveis para cada linhagem do fungo adequando a cada região de cultivo. Este trabalho tem como objetivo produzir cogumelos *G.lucidum* em substratos à base de serragem, analisar sua eficiência biológica e sua produtividade de basidiocarpos, para seleção de uma linhagem mais produtiva, nas condições de cultivo com relação C/N baixo, em substrato esterilizado.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O cultivo de *G. lucidum* foi realizado na Empresa Yuki Cogumelos, situada na cidade de Araçoiaba da Serra - SP, no ano de 2013.

6.2.1 Linhagem, inoculação e “semente”

As linhagens utilizadas, doadas por produtores e pesquisadores, estavam armazenadas em tubos e placas de Petri, todas em meio BDA ou crescidas em substrato de cultivo (Tabela 5). Para a multiplicação das linhagens, utilizou-se a metodologia descrita por Minhoni et al. (2005). O meio de cultura utilizado foi batata dextrose ágar (BDA), esterilizado por calor úmido a 121°C a 1 Kgf/cm², durante 15 minutos. Após resfriamento até cerca de 45°C - 50°C, 20mL do meio de cultura (BDA) foram vertidos em placas de Petri (90 cm x 15 cm), em ambiente de câmara de fluxo laminar horizontal (MINHONI et al., 2011). Fez-se a transferência de pequenos fragmentos de micélio das linhagens (contido em placas de Petri) para as placas de Petri agora preparadas com meio BDA. Incubaram-se tais linhagens a 25°C, em ambiente escuro, até que a colônia ocupasse 2/3 da placa. As placas com melhor crescimento micelial foram selecionadas para o preparo da “semente”.

O substrato da “semente” foi constituído por 20 kg de serragem de eucalipto (base seca) para 6 kg de farelos (trigo, milho e soja, na proporção de 1:1:1) e 0,682 kg de calcário calcítico com umidade calculada em 62%. As quantidades, em percentagem, foram de: 75%, 22,5% e 2,5%, respectivamente. A esterilização foi feita em autoclave a 121°C e a 1,5 Kgf/cm², durante 1 hora e 30 min. Após esfriamento, foi realizada a inoculação.

Tabela 5. Origem das linhagens de *G. lucidum* utilizadas.

Linhagem	Origem (Cidade/UF)	Veículo
351	EMBRAPA Brasília/DF ⁽¹⁾	Placas de Petri com BDA
1002	Produtor Florianópolis/SC ⁽²⁾	Placas de Petri com BDA
0901	Produtor Taboão da Serra/ SP ⁽²⁾	Placas de Petri com BDA
0809	China/Fujian (“Juncao”) ⁽⁴⁾	Tubo com meio BDA
339	EMBRAPA Brasília/DF ⁽¹⁾	Placas de Petri com BDA
144	Empresa Funghi e Flora Valinhos/SP ⁽⁵⁾	Saco de cultivo a base de serragem esterilizada
202	EMBRAPA Brasília/DF ⁽¹⁾	Placas de Petri com BDA

1-EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia –CENARGEM, Brasília, DF. 2-Linhagem cedida por produtores 4-Fujian Agricultural University 5-Empresa Funghi e Flora Valinhos, São Paulo.

Para tanto, um segmento de 1/4 (tipo “pizza”) de meio de cultura BDA com micélio corrido de cada linhagem foi colocado na posição invertida na superfície (centro) do substrato em condições assépticas (câmara de fluxo laminar). As sementes foram incubadas à temperatura de 25°C, em ambiente escuro durante 30 dias, com inspeções diárias para verificação de eventuais contaminantes.

A identificação da espécie *Ganoderma lucidum*. Se deu através de chaves dicotômicas da família Ganodermataceae, da ordem Polyporales. São fungos de grupos de cogumelos diversos, decompositores de madeira e seus esporos são mantidos em tubos. No qual uma característica, é que a camada de tubo de um polyporales não é facilmente removida com uma cama, a identificação pode depender da reação em KOH e características microscópicas. Segundo Ryvardeen (1991), a família Ganodermataceae tem esporos de coloração marrom-amarelada, esporos de parede dupla, endósporos ornamentada e amarelo castanho, liso e exoesporo hialino. Seus basidiomas podem ser

anual a perene, com coloração variável, amarelo, vermelho, marrom escuro ou preto. Estipitado a pileado, velutina a glabra.

Geralmente ocorre a presença de cutícula, que pode ser laçada e brilhante, de coloração marrom-avermelhado ou opaca de coloração marrom-escuro. A superfície dos poros em geral apresenta coloração creme, com tamanhos regulares de 4-7 mm, tubos estratificados, podendo ser de colorações variáveis, duplex ou apresentando diversas bandas ou zonas.

Seu sistema hifálico é di-trimitico, com hifas generativas com ansas, geralmente hialinas, e de difícil visualização em espécimes secas. Hifas conectivas parede fina, de coloração hialina a amarelo. E hifas esqueléticas arboriformes ou não, geralmente com parede espessa de coloração amarelo a amarelo-escuro e de diâmetros variáveis. Basídios com 04 esterigmas, basidiósporos ornamentados e truncados, de parede dupla e de tamanhos variáveis. E para a identificação da espécie *lucidum*, a cor pode variar de avermelhada a marrom, com basidiósporos elipsoide 10-12 x 6,5-8 um, com pilocystidia clavada (alguns ramificadas, amiloide (coradas com KOH) e com parede espessas (Figura 6) (Vieira et al, 2006).

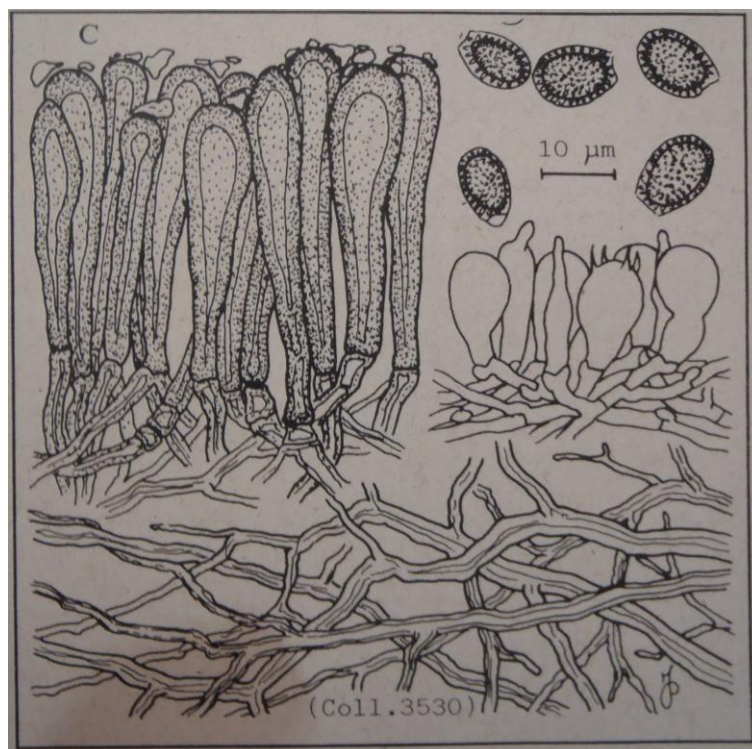


Figura 6. Características para identificação *Ganoderma lucidum*. Fonte: Ryvarden, 1991.

6.2.2 Substrato de cultivo

O substrato de cultivo foi composto de 77,8% de serragem de eucalipto peneirado em peneira com malha de 1,5cm x 1,50cm (material volumoso), 9,7% de farelo de trigo, 9,7% de farelo de soja, 2,7% de CaCO₃ e água (volume necessário para obter 62% de umidade). As massas secas utilizadas foram de 34,66kg de serragem, 2,84kg de farelo de trigo, 2,80kg de farelo de soja, 690g de CaCO₃ e 24,6L de água (Tabela 6).

A escolha dos ingredientes deu-se em função da disponibilidade dos mesmos na região do cultivo, especialmente no caso da serragem de eucalipto. As massas dos ingredientes sólidos foram calculadas com base na umidade de cada material para se alcançar 62%, ao final da mistura do substrato úmido. A secagem dos materiais, para calculo de umidade, foi realizada em estufa a 100°C.

Tabela 6. Formulação de substrato sólido para a produção de *Ganoderma lucidum*

Formulação	Umidade (%)	Massa Úmida (kg)	Massa seca (kg)	Carbono (kg)	Nitrogênio (kg)
Serragem	43	34,66	19,76	4,62	0,04
Farelo trigo	13	2,84	2,47	0,88	0,05
Farelo soja	12	2,80	2,47	0,41	0,07
CaCO ₃	0	0,69	0	0	0
Relação C/N -38/1					

Após mistura e homogeneização das massas em betoneira, fez-se a adição de água de modo parcial, sempre homogeneizando a mistura. A seguir, foram dispostos 620g (massa úmida) em sacos plásticos de polipropileno, espessura de 12 micras, de 12 x 22cm (diâmetro e altura) contendo em sua porção superior central um filtro de Tyvec[®] e sanfonado (Figura 7).

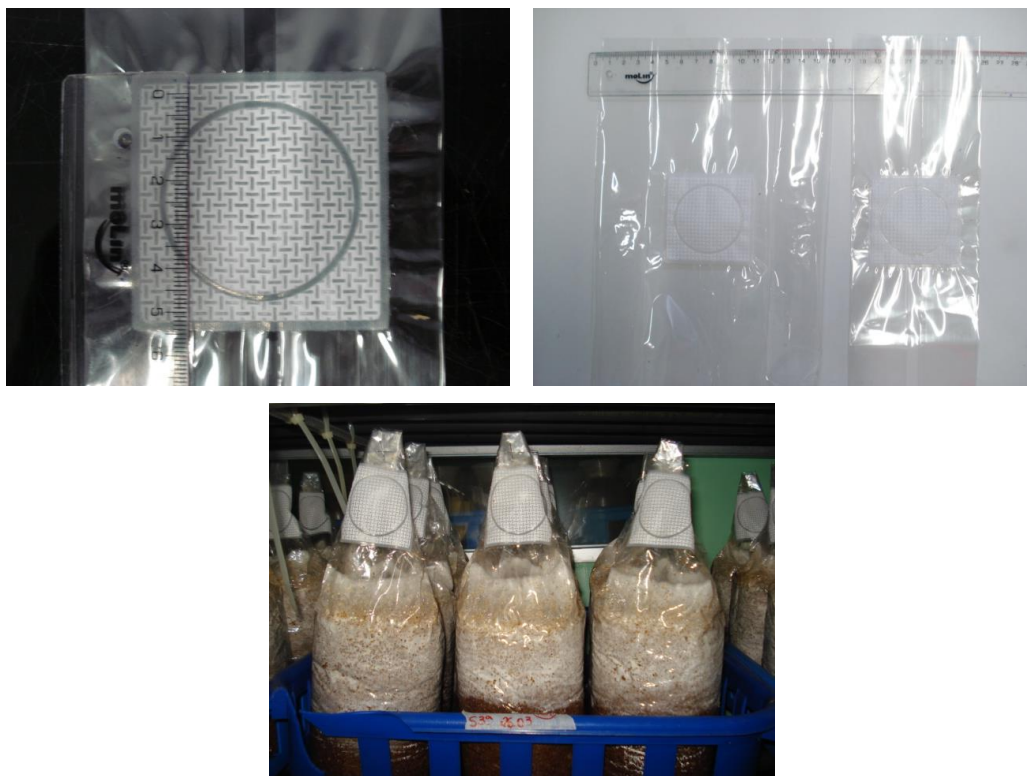


Figura 7. Sacos com filtros de Tyvec nos sacos de cultivo.

Foram preparados 20 sacos (repetições) para cada linhagem. Na sequência, fez-se um furo no centro da massa do substrato, utilizando um pistão de metal (diâmetro de aproximadamente 3,0 cm). Os sacos foram dispostos em caixas, com a boca do saco dobradas e encostada no saco ao lado para a esterilização (Figura 8). A esterilização foi feita em autoclave a temperatura de 121°C, pressão de 1,5 kg/cm², durante 1 hora e trinta minutos.



Figura 8. Posição dos sacos de cultivos em caixas, prontos para serem esterilizados.

A seguir, os sacos contendo as “sementes” foram armazenados em uma sala até seu resfriamento natural e, no dia seguinte, tais “sementes” foram inoculadas em laboratório higienizado, em câmara de fluxo laminar horizontal. Cada saco recebeu em média 20g de inóculo (spwan). Por último, a boca dos sacos foi dobrada e fixada com grampo (Figura 9) (grampeador comum de escritório) e identificados com o nome da linhagem e o número do saco (MINHONI et al., 2011).



Figura 9. Método utilizado para fechamento da boca dos sacos de cultivos, utilizando grampos.

6.2.3 Incubação

Os sacos foram mantidos em salas de alvenaria (Figura 10) (piso, parede e teto), com isolamento térmico parcial, ou seja, no teto e em uma das paredes, para manutenção da temperatura em torno de 21°C (com variação de cerca de 2°C), ausência de luz, umidade relativa entre 60 - 70% e renovação de ar via exaustão do ar interno por exaustor instalado na base de uma das paredes da sala, na frequência de 10 min hora⁻¹. Estas condições favoráveis à colonização do substrato foi mantida até a emissão dos primórdios, quando, então, as unidades amostrais foram abertas e transferidas a estufa de produção com umidade relativa aumentada.



Figura 10. Disposição dos sacos de cultivo na sala de incubação.

6.2.4 Produção

Após 40 dias de incubação, abriu-se a boca dos sacos após a colonização total do substrato. A seguir os sacos foram transferidos para uma estufa rústica (Figura 11). Esta foi instalada na margem de um grupo de arbóreas. O piso, de terra, foi coberto com calcário calcítico.

A estrutura foi feita com arcos de ferro de construção e a cobertura com sombrite 70% (na face interna) e lona transparente (na face externa). A dimensão foi de 1,5m x 1,0m x 0,5m (comprimento x largura x altura). Os sacos foram dispostos ao acaso em caixas plásticas na estufa e estas, no chão da mesma. A umidade relativa da estufa variou entre 70% a 90% e a temperatura entre 15°C e 37°C. O fotoperíodo natural foi de 12 horas de luz e 12 horas de ambiente escuro.



Figura 11. Estufa rústica para produção de *Ganoderma lucidum*.

6.2.5 Colheita e armazenamento

A colheita foi feita quando os cogumelos atingiram a maturidade (preferencialmente em forma de rim), limpos e pesados individualmente assim que colhidos. A maturidade é definida quando desaparece a borda branca do basidioma. Os cogumelos foram secos em estufa de circulação de ar $40 \pm 5^\circ\text{C}$, até peso constante. A seguir, os basidiomas foram dispostos em sacos de papel para análises subsequentes.

6.2.6 Variáveis analisadas

A eficiência biológica é o índice mais utilizado para expressar o rendimento da biomassa fúngica, o que facilita a comparação dos resultados com outros autores (SALES-CAMPOS; ANDRADE, 2011).

As variáveis analisadas foram: eficiência biológica (EB%) e rendimento (R g Kg^{-1}).

$$\text{EB (\%)} = \frac{\text{Massa fresca dos basidiomas (g)}}{\text{Massa seca do substrato (g)}} \times 100$$

O Rendimento é expressa pela massa fresca de basidiomas sobre a massa fresca do composto, segundo fórmula:

$$\text{R (g kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Massa fresca dos basidiomas (g)}}{\text{Massa fresca do substrato (kg)}}$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos, linhagens de *Ganoderma lucidum* (351, 1002, 0901, 0809, 339, 144 e 202),

cada qual com 20 repetições, onde a unidade experimental correspondeu a um saco com 620g de composto úmido.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.2.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Certificação das linhagens

As características das linhagens 351, 1002, 0901, 339 e 202 foram avaliadas no Instituto de Botânica de São Paulo, pela Dra. Adriana Gugliotta, a qual certificou-as como sendo relativas ao *G. lucidum*.

A linhagem 144, por não ter produzido basidiomas, não foi avaliada em termos de confirmação da espécie *G. lucidum*. A linhagem 0809 teve confirmação como sendo *G. lucidum*, no Módulo de Cogumelos, com base em suas características morfológicas (macro e microscópicas). Em seguida, estas linhagens foram armazenadas na coleção de Fungos do Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP) do Instituto de Botânica, contendo o número: SP 417436 (Figura 12).

INSTITU INSTITUTO de BOTÂNICA
São Paulo - Brasil **SP 417436**

GANODERMATACEAE

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst.

Det.: A.M. Gugliotta.

Data: 18/IV/2012

BRASIL, SP, Município de Araçoiaba da Serra,
 Cultivado na empresa Yuki Cogumelos.

Col.: S.R.F Vieira.

Data: IV/2012

Obs.: Linhagem fornecida por produtor de Taboão da Serra (SP), e cultivado em substrato a base de serragem (70%) e farelo de trigo (20%).

Figura 12. Etiqueta do Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP).

6.3.2 Dados da incubação (fase vegetativa)

Na Tabela 7, têm-se os períodos, em dias, de incubação das linhagens nas placas de Petri e nos sacos de cultivo, além de formação de primórdios e produção. As repicagens do fungo nas placas de Petri, em termos de velocidade crescimento (mm/dia), variaram de uma repicagem a outra, contudo a qualidade e vigor da placa, a olho nú, sempre refletiu a uma boa incubação. Com isso, é de extrema importância a manutenção da linhagem nas placas de Petri para seu sucesso na produção. O micélio das linhagens 144 e 202 eram irregulares e com aparência “rala” (Figura 13).

Tabela 7. Duração de fases de cultivo do *Ganoderma lucidum*.

Linhagem	Placas de Petri		Sacos de cultivo	
	Incubação (25°C)	Incubação (21±2°C)	Produção (15 a 37°C)	
-----Dias-----				
351	7	28-30	25-30	
339	7	28-30	25-30	
0901	7	28-30	25-30	
1002	7	28-30	30-35	
202	13	40	-	
144	10	28-30	-	
0809	9	28-30	25-30	

Ao final de 30 dias de incubação, todas as linhagens já haviam ocupado todo o substrato e também já apresentavam diferenciação no micélio superior do saco, ou seja, na região mais oxigenada (por estar mais próximo ao filtro de trocas gasosas) e de início de desenvolvimento micelial (Figura 14). A linhagem 202 é a exceção, pois mesmo com 40 dias de incubação, ainda não havia colonizado totalmente o substrato e tampouco apresentado diferenciação miceliana para frutificação (Figura 15). Esta diferenciação miceliana foi normalmente observada como uma massa estromática contendo primórdios.

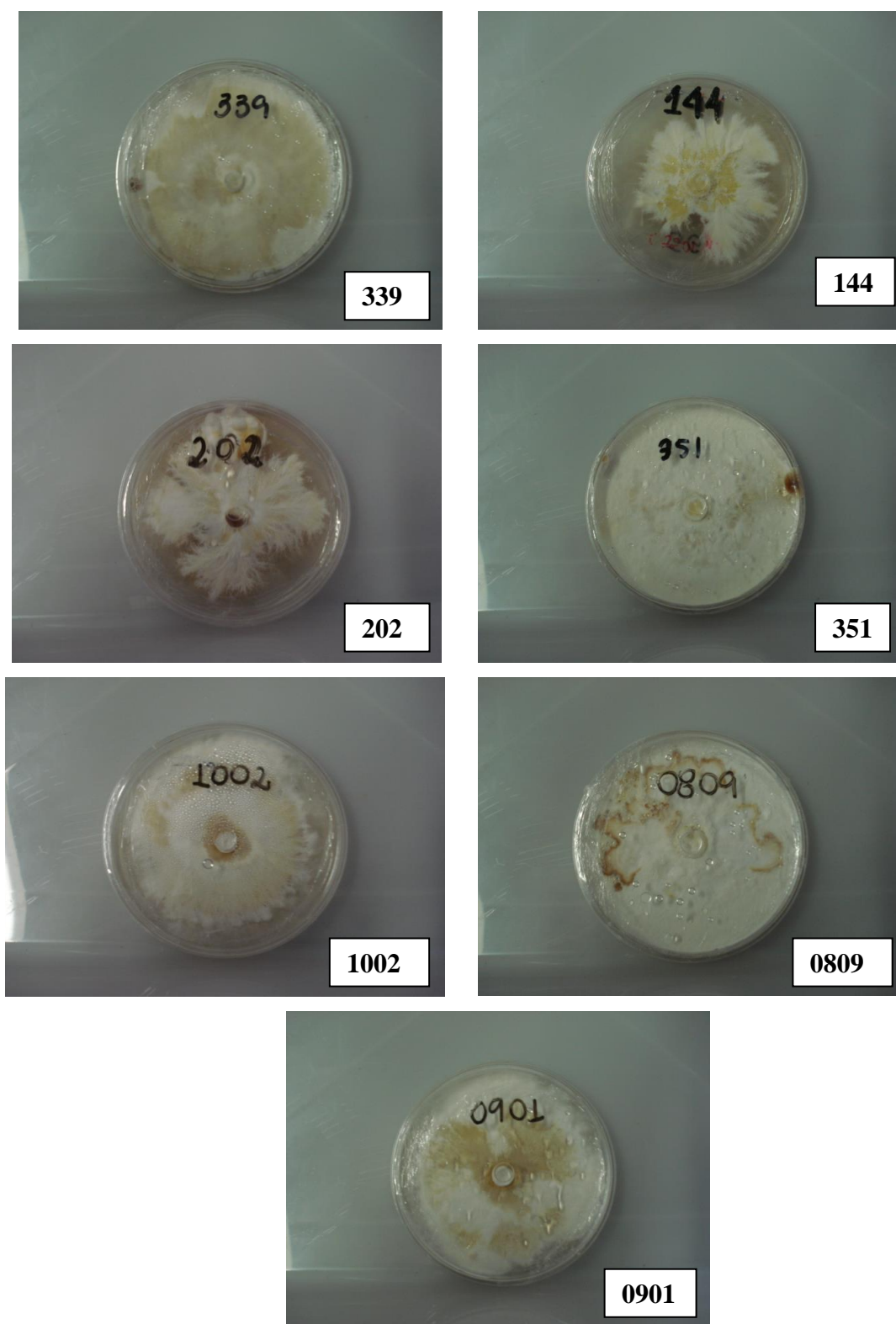


Figura 13. Crescimento micelial das linhagens de *Ganoderma lucidum* em placas de Petri.



Figura 14. Formação de primórdios nos sacos de cultivo do *Ganoderma lucidum*.

Segundo Boh et al. (2007), a formação de primórdios inicia-se após 50 - 60 dias de incubação, com exposição à luz e com o aumento de oxigênção na sala. No presente trabalho, período longo para a formação de primórdios foi também observado somente para linhagem 202..

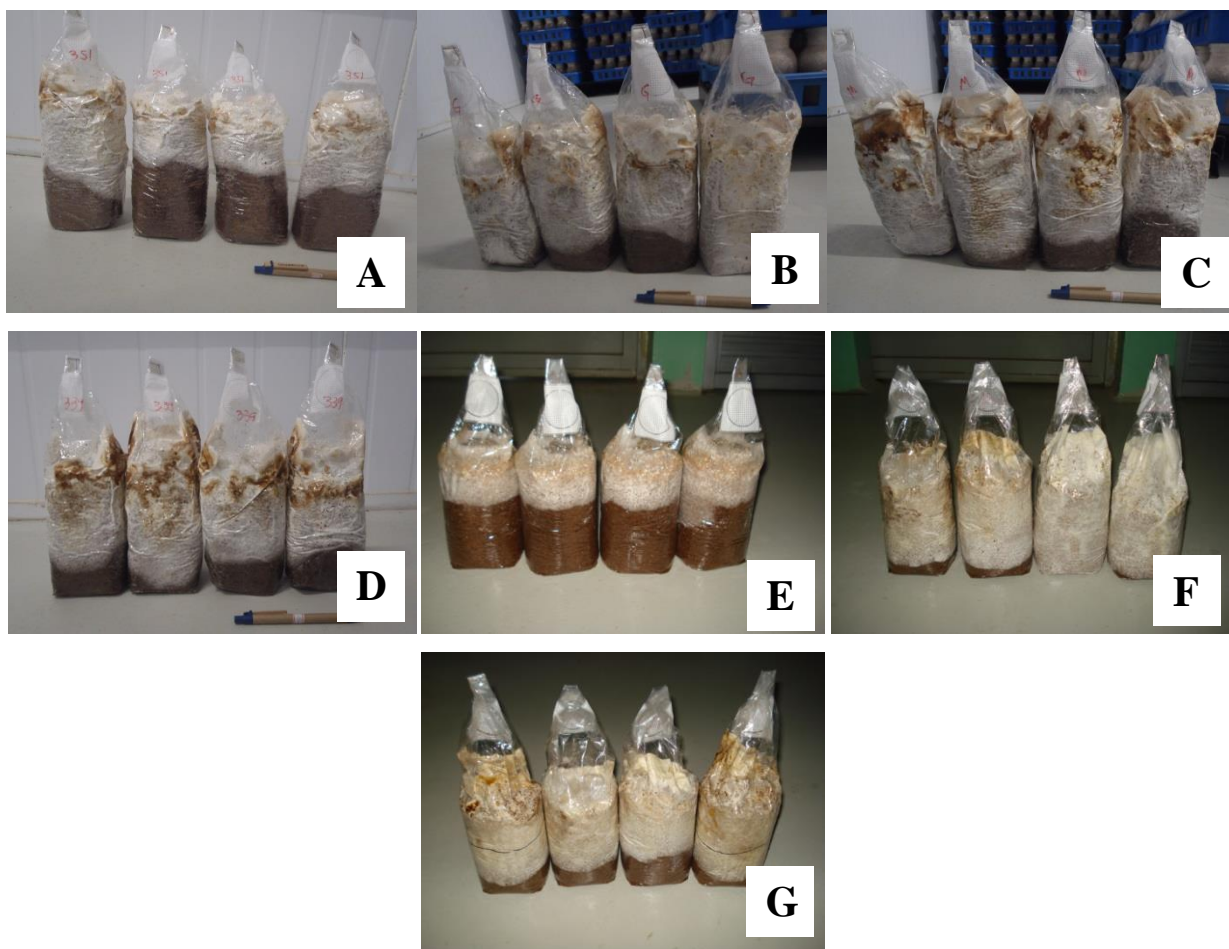


Figura 15. Corrida micelial com 25 dias de incubação das linhagens de *Ganoderma lucidum*. A: linhagem 351, B: Linhagem 1002, C: linhagem 0902, D: linhagem 339, E: linhagem 202, F: linhagem 144 e G: linhagem 0809.

Após a abertura da boca dos sacos, aos 40 dias de incubação, os primórdios da maioria das linhagens desenvolveram-se para basidiomas. Contudo, para a linhagem 144, o estroma alto até então formado não se modificou para basidiomas. Para a linhagem 202, até então sem estroma, também não houve produção de primórdios. Em seguida, os blocos destas duas linhagens foram perdendo água gradativamente, adquiriram odor acético e contaminações por bolores verdes

6.3.3. Dados do cultivo

A colheita de basidiomas foi semanal, durante um período de 35 dias. Na Figura 16, têm-se dados médios de EB (%) obtidos com as linhagens 351, 1002, 0901, 0809 e 339 de *G. lucidum*, ou seja, 15,00%, 13,10%, 11,77%, 11,29% e 10,87%, respectivamente. Embora as linhagens não tenham diferido entre si, foi notória a proeminência da linhagem 351 e 1002 em relação as demais.

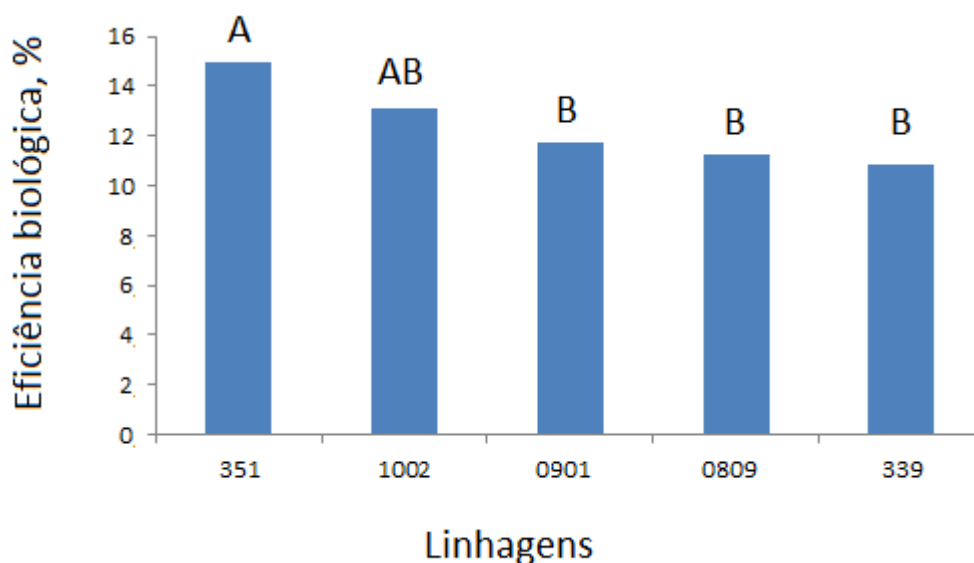


Figura 16. Dados médios, originais, de Eficiência Biológica das linhagens de *Ganoderma lucidum*. Barras com letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%) CV(%)=20,43 DMS=2,60.

Os dados de rendimento estão plotados na figura 17. O rendimento das linhagens 351, 1002, 0901, 0809 e 339 obedeceram o mesmo padrão estatístico obtido na EB; os valores de rendimento foram 5,95g/kg, 4,98g/kg, 4,31g/kg, 4,29g/kg e 4,18g/kg, respectivamente. Em termos de massa fresca de basidiomas produzida por estas linhagens,

no substrato com 620g, das médias foram de 35,33g, 30,87g, 27,77g, 26,60g e 25,60g, respectivamente.

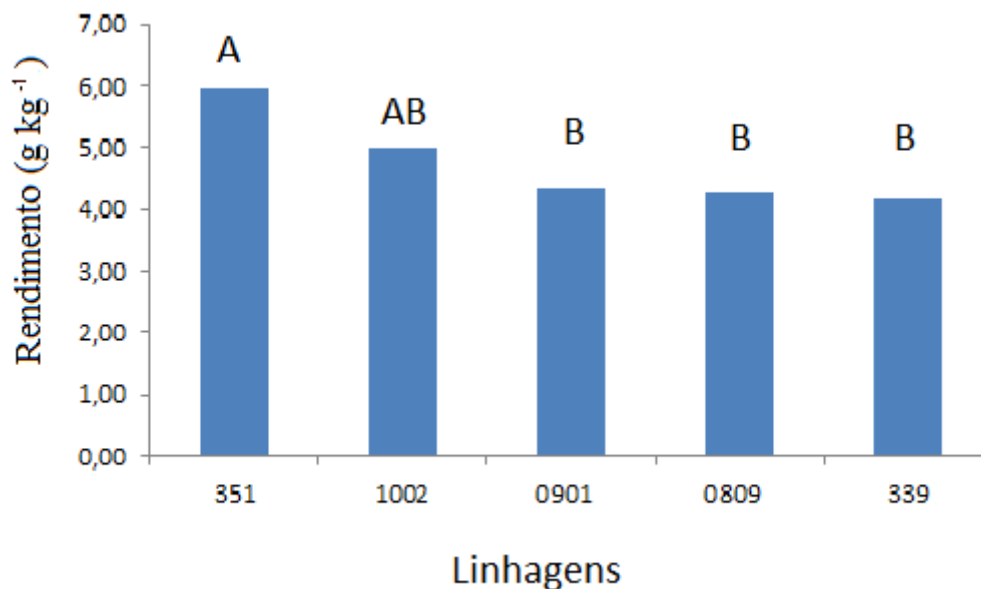


Figura 17. Dados médios, originais, do Rendimento basidiomas em termos de massa de *Ganoderma lucidum*. CV(%) = 20,35 DMS = 0,98. Letras maiúsculas comparam resultados em cada coluna ao teste Tukey $\leq 0,05$.

O rendimento produzido neste trabalho é inferior aos apresentados por Stamets (2001). Este autor obteve rendimento médio de 125 - 200g de cogumelos frescos para 2,2kg - 2,3kg de substrato úmido. No presente trabalho, o rendimento foi estimado para 2,2kg de substrato úmido, obtido rendimento de 125,36g, 106,45g, 98,53g, 94,38g e 90,83g, para as linhagens 351, 1002, 0901, 0809 e 339 respectivamente.

As linhagens que cresceram mais rapidamente (Tabela 7), nas placas, ou seja, em 7 e 9 dias, produziram basidiomas. As linhagens que conseguiram desenvolver basidiomas apresentavam-se, na maioria, retorcidos (Figura 18). E no final das colheitas, o substrato apresentou-se com características “prensada”, leve e sem contaminações (Figura 19). Por outro lado, as linhagens que apresentaram um micélio mais fraco, “ralo” e disforme nas placas de Petri, ou seja, a linhagem 144 e 202, não produziram basidiomas. Embora a linhagem 144 tenha colonizado o substrato de cultivo normalmente, formou-se um estroma ao invés de primórdios. Para a linhagem 202, a colonização foi muito fraca e também, não houve formação de primórdios. Após a abertura

dos sacos para a frutificação, houve contaminações por fungos de coloração verde para estas duas últimas linhagens.

Rolim et al., (2007), comparando linhagens chinesas com linhagens brasileiras, também observou diferenças entre as mesmas, sendo uma das linhagens brasileiras a mais produtiva (massa e/ou compostos de interesse) nas condições do cultivo utilizadas. Este fato, muito comum, é um reflexo das características das linhagens e das condições de cultivo (substrato e ambiente).

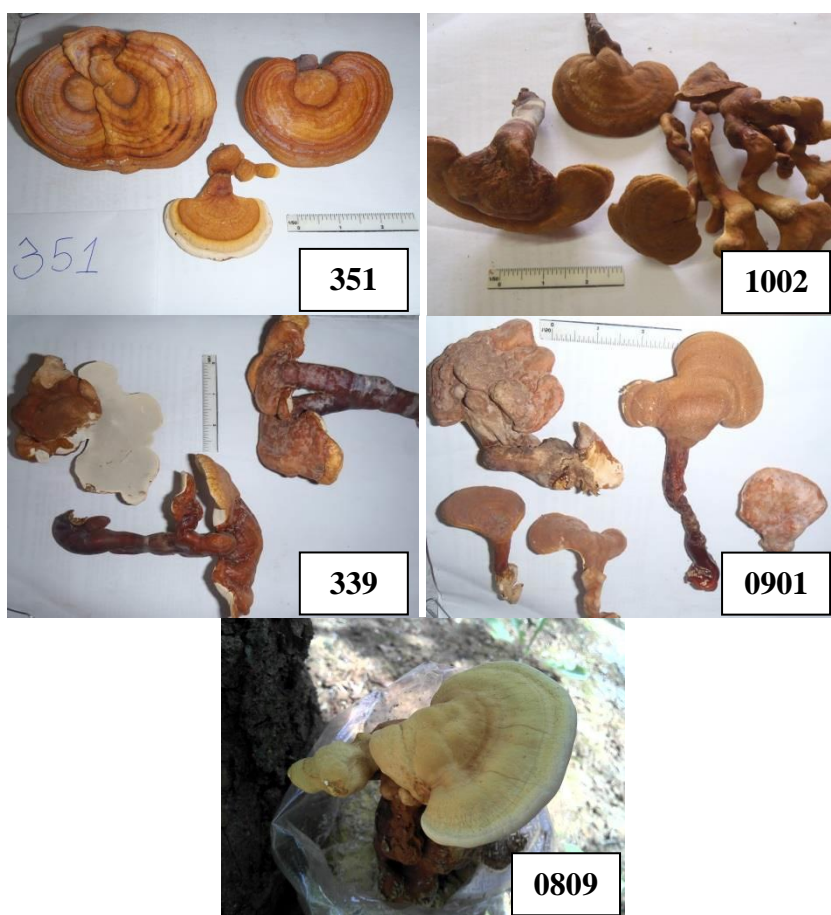


Figura 18. Formatos dos cogumelos produzidos das linhagens de *Ganoderma lucidum*.



Figura 19. Substrato exaurido de cultivo de basidiomas de *Ganoderma lucidum*, com característica “prensada” e leve.

6.4 CONCLUSÃO

Não houve diferencial estatístico entre a eficiência biológica e rendimento entre as linhagens 351, 1002, 0901, 0809 e 339.

O substrato com baixa relação carbono nitrogênio (CN 38:1), a base de serragem, suplementada com farelos de trigo e soja foi adequada a produção de basidiomas das linhagens 351, 339, 1002, 0901 e 0809.

6.5. REFERÊNCIAS

BOH, B.; BEROVIC, M.; JINGSONG, Z.; ZHI-BIN, L. *Ganoderma lucidum* e seus compostos farmacologicamente activos. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, 2007.

CHEN, AW. Growing *Ganoderma* mushrooms. In: AUTOR. **Mushroom Grower's Handbook I, Part III: Mushrooms Worldwide**, Chapter 11: Mushrooms for the tropics. p. 224–234. 2004.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

ELMASTAS, M.; ISILDAK, O.; TURKEKUL, I.; TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, Amsterdam, v.20, n.3/4, p.337-345, 2007.

MACEDO, A. J. P. et al. Crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. em resíduos lignocelulósicos disponíveis na Amazônia. **Caderno de Pesquisa**, v.

23, n. 2, 2011. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/request?cp11007>>. Acesso em: 20 out. 2012.

MINHONI, M. T. A. et al. **Cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – (Shiitake)**. 2 ed. Botucatu: FEPAF, p.42, 2005.

MINHONI, M. T. A., FURLAN DE JESUS, J. P.; VIEIRA, F. R. Produção de micélio de cogumelos comestíveis. In: Sales-Campos, C.; Varejão, M. J. C. **Bioconversão de resíduos da Amazônia para cultivo de cogumelos comestíveis**. Manaus: Editora Inpa, p. 66-76, 2011.

HABIJANIC, J; BEROVIC M. The relevance of solid-state substrate moisturing on *Ganoderma lucidum* biomass cultivation. **Food Technol Biotechnol**, v.38, p.225–228. 2000.

RYVARDEN, L. Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy. Synopsis Fungorum 5: Fungiflora-oslo-Norway. pp. 363, 1991.

ROLIM, L. N. ; URBEN, A. F. ; BUSO, G. S. C. ; CAVALCANTE, M. A. Q. . Diferenciação genética entre linhagens de *Ganoderma lucidum* utilizando a técnica de RAPD. In: 5 Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. Anais de 5 Congresso Brasileiro de Micologia. Recife: editora Universitária UFPE, 2007.

RUBEL, R. **Produção de Compostos bioativos de *Ganoderma Ludicum* por fermentação em estado sólido**: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica. Disponível em: <<http://dSPACE.c3sl.ufpr.br/dSPACE/bitstream/11222/11111/1/Rubel%202006.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 17 outubro 2012.

SALES-CAMPOS, C; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazonica**. v. 41, n. 1, p. 1-8, 2011.

Ceci Sales-Campos I; Meire Cristina Nogueira de Andrade II Aproveitamento de resíduos madeiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica*, vol.41 no.1 Manaus Mar. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672011000100001> Acesso em: 17 outubro de 2012.

STAMETS, P. Mycomedicinals: an informational booklet on medicinal mushrooms. In: **Cross-Index of Mushrooms and targeted disease complexes**. Cidade: Editora, p.4, 2001.

7. CAPÍTULO 2. QUANTIFICAÇÃO DE B-GLUCANAS E FENÓLICOS TOTAIS EM CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE LINHAGENS *Ganoderma lucidum* PRODUZIDAS EM SUBSTRATO SÓLIDO

7.1 INTRODUÇÃO

Alguns compostos produzidos por fungos basidiomicetos são, reconhecidamente antitumorais, desempenhando papel importante tanto na profilaxia como no tratamento dessas doenças. O mecanismo de ação é baseado, principalmente, na imunomodulação e ativação do sistema imunológico.

Os polissacarídeos presentes em cogumelos medicinais são substâncias modificadoras da resposta biológica (MRB), as quais auxiliam o organismo humano a se adaptar às situações de estresse, exercendo, assim, atividade inespecífica sobre os diversos sistemas corporais, promovendo homeostase (WASSER, 2005).

Estudos têm demonstrado que os polissacarídeos imunomoduladores mais ativos são as glucanas solúveis em água. As que ocorrem em fungos e são mais estudadas são as dos tipos β ,D (1-3), (1-6). As glucanas β ,D (1-3), (1-6) têm estrutura helicoidal. Sua cadeia principal é formada por moléculas de β ,D glucanas unidas entre si por ligações (1-3). Cada molécula de β glucose possui, unida à ela por ligações (1-6), de 1 a 15 ramificações.

Pesquisas com substâncias extraídas de cogumelos, em especial polissacarídeos do grupo das β -glucanas, têm mostrado ação biológica sobre uma série de processos biológicos (WASSER, 2005). O efeito antitumoral das β -glucanas não ocorre de forma direta sobre a célula neoplásica. A sua ação é atribuída à modulação da resposta imunológica, envolvendo ativação de células imunocompetentes, como macrófagos, células T e células dendríticas (LEE et al., 2003).

Os cogumelos, além de obter as macromoléculas como metabólicos primários (fibras, proteínas, carboidratos) também acumulam uma variedade de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, terpenos, policetídeos, esteroides, entre outros. Alguns destes compostos secundários são também reconhecidos, através de pesquisa, como portadores de efeitos medicinais e funcionais.(MIZUNO, 2002)

Compostos fenólicos agem como antioxidantes, não somente por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios. O acúmulo destes compostos também são dependentes do manejo, processamento, maturidade do fungo, período da colheita (SOARES, 2007).

O doseamento desses compostos nos cogumelos ainda tem grande discussão em realizar pesquisas para se padronizar métodos fáceis, viáveis e confiáveis. Tendo ainda a necessidade de especificar e avaliar esses métodos nas diferentes espécies de cogumelos disponíveis no mercado.

O objetivo do presente trabalho é quantificar as β -glucanas, em diferentes linhagens produzidas com as mesmas variações abióticas e nutricionais; E quantificar a concentração de fenólicos totais nos basidiomas das diferentes linhagens produzidas em substrato sólido.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens utilizadas foram as mesmas produzidas no capítulo anterior, com condições de cultivo e climáticos idênticos. Sendo elas: 351, 1002, 0901,0809 e 339.

7.2.1 Quantificação de β -glucanas

A metodologia foi testada e aprimorada no Instituto de Biociências IBB-Unesp sob a supervisão do prof. Dr. Fernando Broetto e as análises subsequentes foram realizadas nos laboratórios da UNISO (Universidade de Sorocaba-SP). As enzimas utilizadas neste trabalho foram doadas pela empresa NOVOZYMES Ltda.

A metodologia utilizada foi descrita originalmente por Prosky et al. (1988) e modificada pela "Foundation of Japanese Food Analysis Center", como Park et al. (2003) descreve (Figura 20 e 21). Algumas adaptações foram realizadas e descritas ao longo da metodologia. Para a determinação de β -glucanas extraídas da fibra insolúvel, foram utilizadas três repetições/tratamento.

Alíquotas de 1g das amostras das linhagens 351, 1002, 339, 0901 e 0809 de *G. lucidum* desidratadas, liofilizadas e trituradas com gelo seco em cadinho foram acondicionadas em frascos de Erlenmeyer (500mL) com 50mL de solução tampão fosfato 80mM e pH 6,0. Em seguida, adicionou-se 0,1mL de α -amilase termostável Termamyl 120L (Novo Nordisk) e incubou-se por 30min em banho-maria em ebulição. Após, adicionou-se 0,1mL de protease neutra bacteriana (Novo Nordisk), e o pH foi ajustado para 7,5 através da adição de NaOH 25mM e incubou-se novamente por 30 min a 60°C. E inseriu-se 0,3mL de amiloglicosidase AMG 200L (Novo Nordisk), ajustou-se o pH para 4,0-4,5 com HCl 75mM e incubou-se por 30 min a 60°C.

Após os tratamentos enzimáticos foram adicionados 200mL de solução 95% de álcool etílico e incubou-se a 60°C durante 60 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20000g por 10 minutos, para a separação das fibras solúveis em álcool (precipitado) das fibras insolúveis (sobrenadante). Os precipitados foram lavados com solução de álcool etílico e acetona (4:1) (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000).

O procedimento de lavagem dos precipitados foi repetido 3 vezes. Após evaporação parcial da solução, etanol acetona, adicionou-se a ela 10mL de solução de H₂SO₄ a 72% e incubou-se a 20°C, durante 4 horas, para hidrólise das fibras, compostas basicamente por β -glucanas. Em seguida, foram adicionados 140mL de água destilada e incubou-se em banho-maria em ebulição durante 2horas. Após este período, o pH foi ajustado para próximo de 6,0, utilizando NaOH 5M e completou-se o volume, com água destilada até 300mL.

Em seguida, as amostras foram filtradas em fibra de vidro e a quantidade de glicose foi determinada por método enzimático utilizando-se 4-

aminofenazona (0,025 mol/L), fenol (0,055 mol/L), glicose oxidase (1 U/mL) e peroxidase (0,15 U/mL) (LaborLab Ltda., Guarulhos/SP). A concentração de β -glucana (g/100g), presente nos cogumelos (base seca), foi calculada através da equação:

$$\beta\text{-glucana (g/100g)} = \text{Glicose (g/100g)} \times 0,9$$

Toledo (2013) descreveu em seu trabalho as transformações dos dados necessárias, para se chegar a quantificação da β -glucana em g/100g de cogumelo seco.

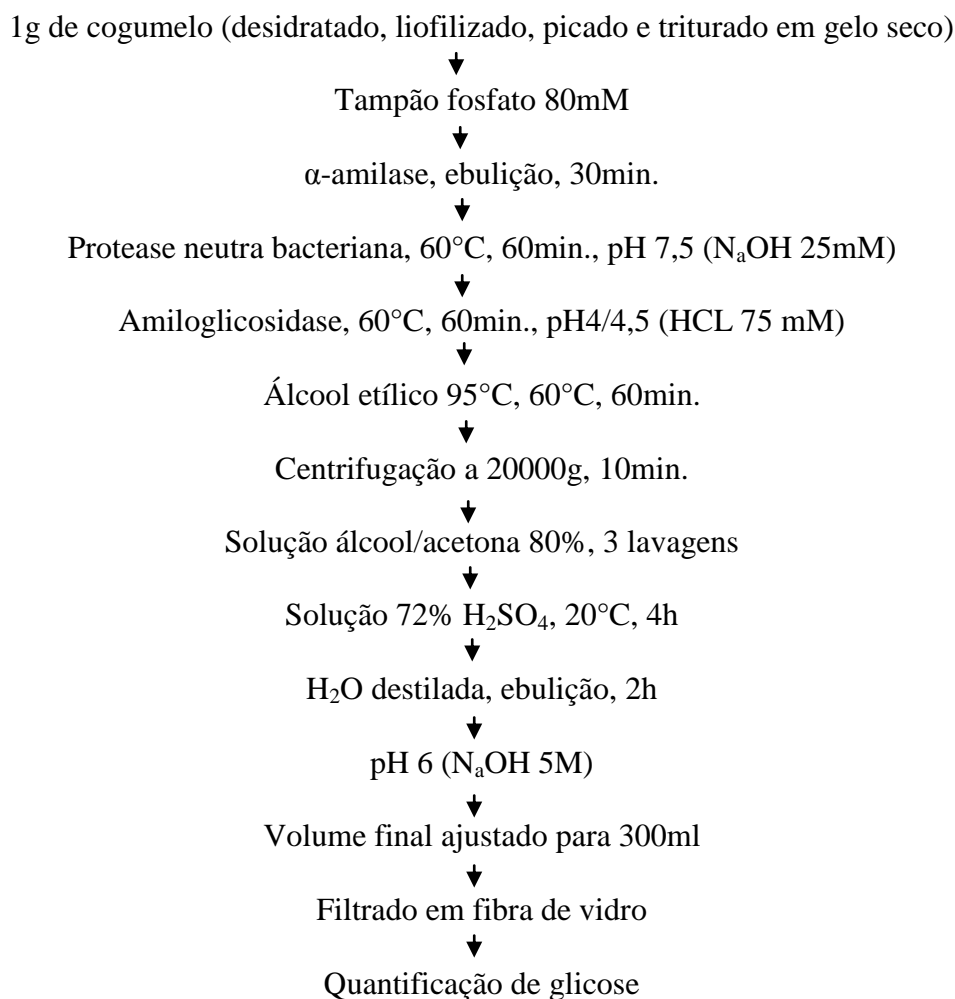


Figura 20. Fluxograma do método enzimático, para quantificação de β -glucanas.

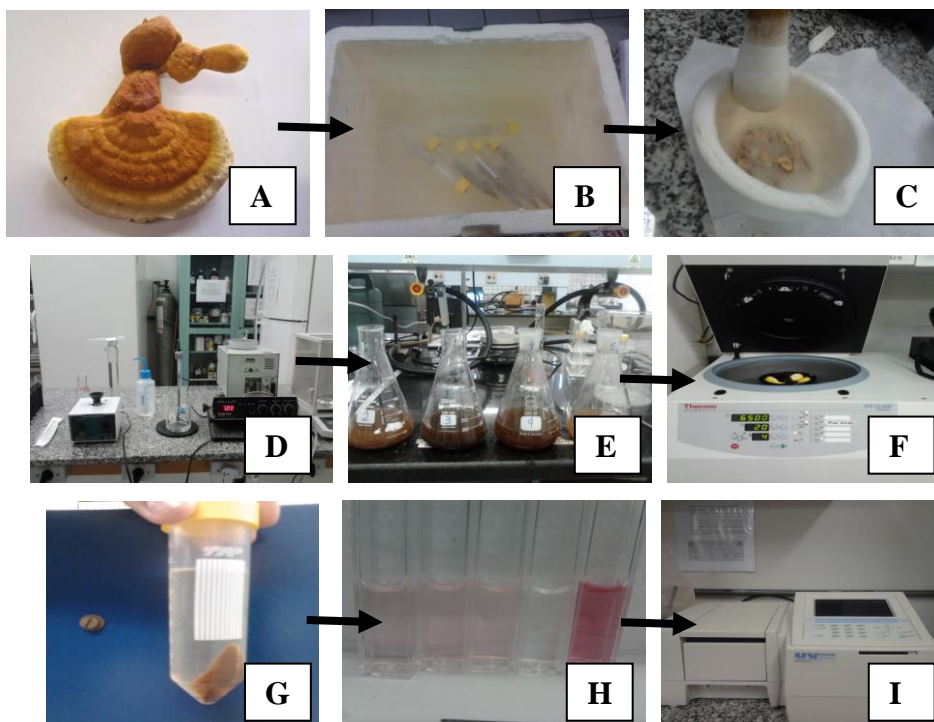


Figura 21. Ilustração do método enzimático, para quantificação de β -glucanas A: cogumelo desidratado, B: cogumelo picado e armazenado em tubos falcon com 1g cada, condicionados em gelo seco, C: cogumelo triturado com gelo seco, D: correção do pH, E: soluções incubando, F: centrífuga, G: tubos falcon com precipitado, H: kit enzimático para quantificação de glucose e I: espectrofotômetro.

7.2.2 Quantificação de fenólicos totais

Os fenólicos totais foram analisados através do método de Folin-Ciocalteu (Figura 22). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido clorogênico por mL (mg Eq. Ác. clorogênico/mL) (SWAIN; HILLIS, 1959). Os procedimentos metodológicos são descritos a seguir.

7.2.2.1 Extrato bruto de compostos fenólicos em cogumelos

Foram pesados 2g de basidiomas triturado, em moinho de facas, cada linhagem (351, 1002, 339, 0901 e 202) de *G. lucidum*, e acondicionadas em balão volumétrico de 50 mL. Em cada balão foi adicionado 50mL de álcool etílico a 70%, e incubou-se por 1hora. Em seguida, os balões foram incubados por 10 minutos em ultrassom e deixou-se decantar. O sobrenadante de cada balão foi parcialmente filtrado,

para outro balão de 100mL, usando-se filtro de fibra de vidro. Para filtrar o sobrenadante, o balão foi cuidadosamente manipulado para não resuspender o precipitado. A seguir, adicionou-se novamente, álcool etílico (70%) no precipitado e incubou-se por 30 minutos. Em seguida, incubou-se por 10 minutos no ultrassom e filtrou-se o sobrenadante da mesma maneira descrito acima. Este último procedimento foi realizado mais uma vez, contudo neste, toda a solução (precipitado + sobrenadante) foi filtrada. Finalmente, no balão contendo o filtrado acumulado, completou-se o volume, com álcool etílico a 70%, para 100mL. A solução foi armazenada em congelador para análise posterior.

7.2.2.2 Curva de calibração de ácido gálico

Foram pesados 50 mg de ácido gálico, colocado em um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada (SOLUÇÃO 1 = 0,5 mg/mL= 500µg/mL). Desta solução mãe foi preparada uma bateria de diluições, feitas em triplicata. Foram retirados os respectivos volumes 0,5mL, 1mL, 2mL, 3mL, 4mL e 5mL, quantitativamente, para balões volumétricos de 25 mL. Adicionou-se 1 mL do reagente fosfomolibdico-túngstico (reagente de Folin; reagente de complexação) e completou-se o volume para 25 mL com solução aquosa de carbonato de sódio 15% m/v. A leitura da curva foi feita a 760 nm após 30 minutos de incubação. O branco foi solução de carbonato de sódio 15%.

7.2.2.3. Leitura em espectrofotômetro

Um dia antes da quantificação, foi feita a solução de carbonato de sódio para sua total homogeneização, pois o material pode apresentar turbidez inicialmente. Para a solução de Na₂CO₃ a 15%, foram pesados 150g de Na₂CO₃ e diluídos em 1000mL de água destilada, em um Becker de 1L. Foram pipetados 2mL do extrato bruto (em etanol 70%) em um balão volumétrico de 10mL e completou seu volume com água purificada (Miliq). Em triplicata, foram transferidas alíquotas de 2mL da diluição para balões volumétricos de 25mL. Adicionou-se 1,0 mL de reagente de Folin e completou-se com solução de carbonato de sódio a 15% m/v. Incubou-se durante 30 minutos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo Multi spec- 1501)

num comprimento de onda de 760nm, utilizando a solução de carbonato de sódio 15% como branco.

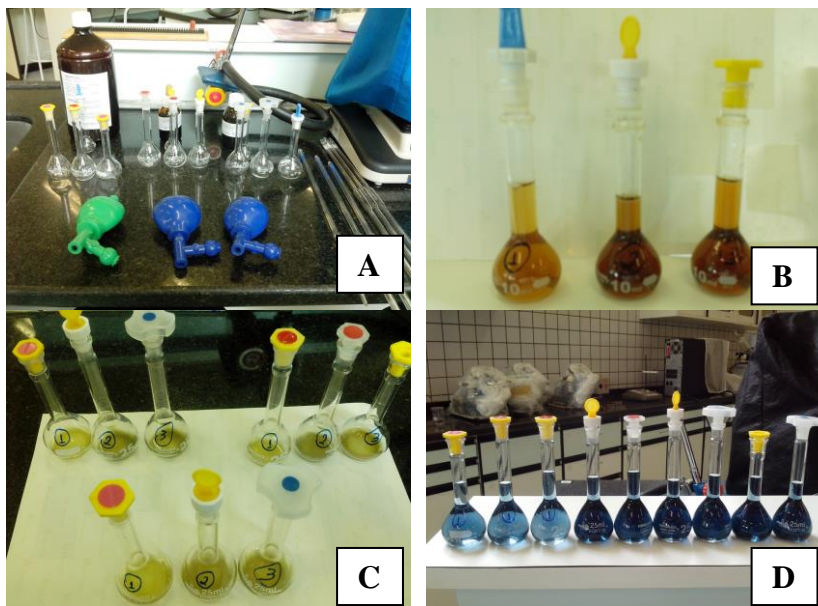


Figura 22. Ilustração do método Folin-Ciocalteu, para quantificação de compostos fenólicos. A: vidraria e reagentes, B: extrato bruto, C: reação, D: coloração final da reação.

7.2.4 Quantificação de proteínas no *Ganoderma lucidum*

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Lowry, em equivalentes de SAB/mL (Soro Albumina Bovina) (LOWRY, 1951). Esta análise foi realizada na Universidade Nove de Julho (UNINOVE-SP), pela Profa. Dra. Erna Bach.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.2

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de concentração de β -glucanas, fenólicos totais e proteínas estão apresentados na Tabela 8. A concentração de b-glucanas (nas fibras insolúveis) variou com as linhagens. Os valores foram de: 10,46; 9,73; 8,80; 8,46 e 4,66 g/100g de cogumelos seco para as linhagens 1002, 0809, 339, 351 e 0901 de *G. lucidum*, respectivamente.

Tabela 8. Resultados dos doseamentos de β -glucanas, compostos fenólicos e proteínas.

Linhagem	B-glucanas (g/100g de cog seco)	Fenólicos (mg/1g de cog seco)	Proteínas (mg/1g de cog seco)
1002	10,46 A	0,300 A	0,766 A
0809	9,73 B	0,300 A	0,738 B
339	8,80 C	0,208 B	0,556 D
351	8,46 C	0,240 B	0,601 C
0901	4,66 D	0,224 B	0,711 B
CV,%	3,02	4,04	1,40
DMS	0,62	0,29	0,02

Para cada coluna, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

Manzi e Pizzoferrato (2000) também verificaram variações na concentração de β -glucanas entre linhagens de *Pleurotus ostreatus* e de *Pleurotus eringui*. Para o *P. ostreatus*, as concentrações de β -glucanas foram de 0,24, 0,29 e 0,38g/100g de cogumelo seco), para linhagens SMR 127, SMR 138 e SMR 125, respectivamente. Para as linhagens de *P. eringui* as concentrações de β -glucanas foram de 0,22, 0,29 e 0,38 g/100g de cogumelo seco para as linhagens SMR 172, SMR 173 e SMR 133, respectivamente. Os valores observados por estes autores são inferiores aos observados no presente trabalho, em função da espécie e isolado fúngico bem como da metodologia utilizada. Os autores verificaram concentração de b-glucanas nas fibras solúveis, naturalmente com menor destes compostos; no presente trabalho observaram-se as b-glucanas nas fbras insolúveis, naturalmente com maior concentração destes compostos.

Eira (2003), num único cultivo de *Agaricus blazei* e com apenas um isolado deste, observou variação na concentração de β -glucanas por método enzimático, ou seja, de 3,90 a 6,79g/100g de cogumelo seco. O autor justificou este fato em função de variações físicas, químicas e biológicas naturalmente existente no sistemas de produção (substrato, ambiente, etc). Esta variação também é observada na concentração de glucanas nos cereais (PROSKY, 1988).

Park (2003), analisando a concentração de b-glucana em *A. blazei*, observou diferenças em função do ambiente de cultivo, ou seja, estufa e campo. A concentração de b-glucana foi maior nos cogumelos produzidos em campo (10,1g/100g de cogumelo seco) em relação aos basidiomas produzidos em estufa (8,4g/100g de cogumelos seco). Desta forma, e concordando com Zied (2011), é de fundamental importância a escolha da linhagem, bem como o método de cultivo.

Toledo et al. (2013) também descreveram variações na concentração de b-glucanas em cogumelos, em função da espécie, linhagem e método utilizado (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração de β -glucanas (g/100g de cogumelo seco) de cogumelos comestíveis e medicinais por método HPLC e método enzimático (fibras insolúveis). Fonte: TOLEDO, 2013

Linhagem	Método de quantificação	
	HPLC	Enzimático
<i>Lentinula edodes</i>	8,12	9,00
<i>Pleurotus ostreatus</i>	8,92	9,63
<i>Pleurotus eryngii</i>	6,00	6,72
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	4,87	7,03
<i>Agaricus subrufescens</i> CS10	5,75	6,03
<i>Agaricus subrufescens</i> CS7	4,20	5,00
<i>Agaricus subrufescens</i> CS9	4,00	4,27
<i>Agaricus subrufescens</i> CS5	3,84	4,10
<i>Agaricus subrufescens</i> CS2	3,05	3,26
<i>Agaricus subrufescens</i> CS1	2,70	2,11
<i>Agaricus bisporus</i>	2,99	3,36

Com relação às concentrações de fenólicos totais e proteínas, também se observaram diferenças entre as linhagens (Tabela 8). As linhagens que apresentaram maior concentração de b-glucanas, 1002 e 0809, também apresentaram maior concentração de fenólicos totais e proteínas.

Ressalte-se também que a linhagem 1002 foi a mais produtiva, contudo, nem sempre há uma relação direta entre produtividade e concentração de compostos na massa produzida. Este fato pode ser observado, por exemplo, para a linhagem 351 que, embora tenha sido também de maior produção de basidiomas, apresentou concentrações baixas de b-glucanas, fenólicos totais e proteínas.

7.4. CONCLUSÕES

O fator linhagem interfere com a concentração de b-glucanas, fenólicos totais e proteínas nos basidiomas.

Relação direta entre concentrações de b-glucanas, fenólicos totais e proteínas nos cogumelos, não é uma constante.

A linhagem 1002 foi a que apresentou maior concentração de β -glucanas, fenólicos totais e proteínas nos basidiomas.

7.5. REFERÊNCIAS

BACH, E. E. et al. Métodos de extração e quantificação de substâncias bioquímicas encontradas no cogumelo *Agaricus blazei* utilizado para fins terapêuticos. 5º congresso latino-americano de mutiagênese, carcinogênese e teratogênese ambiental. In: *Genetics and molecular biology* 21: 146, 1998.

BRASIL. Resolução RDC – nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2001.

EIRA, A.F. Cultivo do cogumelo medicinal: *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). **Viçosa: Aprenda Fácil**. p.398.2003.

HADDOW, W. R. Studies in Ganoderma. **Journal Arnold Arbore** v. 12, p. 25-46. 1931.

LEE et al. Polissacáideo purificado de *Ganoderma lucidum* inibe a apoptose espontânea e Faz-Mediated em neutrófilos humanos através da ativação da via de sinalização fofatidilinositol 3 quinase. **Journal of Biology Leucócitos**, v. 72, p. 207-216, 2003.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. β -glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MIZUNO, T. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill stimulate (Agaricomycetidaeae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 312-399, 2002

MCCLEARY, B.V ., GLENNIE-HOLMES, M., 1985. Enzymic quantification of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing* 91, 285–295.
WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology. Biotechnology.**, v. 60, p. 258-274, 2005.

PARK, Y. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCANO EM COGUMELO *Agaricus blazei* Murill POR MÉTODO ENZIMÁTICO. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.312-316, 2003.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food-products —

Interlaboratory study. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 1017-1023, 1988.

SOARES, A.A. Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill - Maringá : [s.n.], 2007.

SWAIN, R.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.10, p.63-68, 1959.

TOLEDO, R. C. C.; CARVALHO, M. A., LIMA, L. C. O.; VILAS-BOAS, E. V. B.; DIAS, E. S. Measurement of β -glucan and other nutritional characteristics in distinct strains of *Agaricus subrufescens* mushrooms. *African Journal of biotechnology*. v. 12, n.43, p.6203-6209, 2013

VAN HOOFF, A. et al. A single β -1,3-glucanase secreted by the maize pathogen *C. carbonum* acts by an exolytic mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, New York, v. 39, p. 259-267, 1991.

ZIED, D. **Produtividade e teor de β -glucana de *Agaricus subrufescens* Peck [*Agaricus blazei* (Murrill) SS. Heinemann], em função de diferentes práticas de cultivo e conversões energéticas**. 2011. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Energia na agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

WASSER S. P; COAST P; BLACKMAN M; CRAGG G; LEVINE M; Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*). **Journal Encyclopedia of Dietary Supplements**. New York: Marcel Dekker; p. 680–90, 2005.