

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CARINA MOLINS BORBA

**EXTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS DE COGUMELOS DOS GÊNEROS *Agaricus*
E *Lentinula*, CULTIVADOS EM REJEITOS AGROINDUSTRIAIS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

BAGÉ

2013

CARINA MOLINS BORBA

**EXTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS DE COGUMELOS DOS GÊNEROS *Agaricus*
E *Lentinula*, CULTIVADOS EM REJEITOS AGROINDUSTRIAIS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Pampa.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Caroline Costa Moraes

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Manera

BAGÉ

2013

Aos meus, sempre incansáveis, pais:

Tania Maria Molins Borba e Paulo Ferreira Borba.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Tania e Paulo por todo o amor e dedicação a mim, pelas diversas orações e palavras de incentivo.

Aos meus irmãos Fábio e Catiane, ao sobrinho/irmão Thiago e aos cunhados Milene e Leonardo pelo companheirismo e torcida incessável.

A Prof.^a Dr.^a Caroline Costa Moraes, pela orientação e confiança depositada em mim logo em sua chegada à UNIPAMPA, por todos os conselhos e incentivos os quais levarei para sempre.

A Prof.^a Dr.^a Ana Paula Manera, pela co-orientação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho pela inestimável ajuda na parte estatística desse trabalho, empréstimo de equipamentos e claro o grande auxílio nos períodos de matrícula.

Ao professor Roger Junges da Costa pela participação na Banca Examinadora e pelas valorosas colaborações.

Aos demais professores do curso de Engenharia de Alimentos pela dedicação e ensinamentos.

Àqueles que foram meus braços, minha cabeça e meus olhos nos momentos que precisei me ausentar: Cleber Klasener e Lilianne Tassinari. Muito obrigada por confiarem e acreditarem em mim quando eu mesma duvidava da minha capacidade. Palavras jamais serão suficientes para agradecer, esse trabalho é tão de vocês quanto meu.

Aos demais colegas e ao técnico Luciano Almeida do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos pela convivência e ajuda.

Aos senhores Cleber Argenta e Ten. Leopoldo pelas colaborações de material e bibliografia.

Às “flores” que encontrei e que fizeram esse longo caminho percorrido mais alegre Aline Argenta, Carolina Ferrer e Helena Brito.

A FAPERGS e CNPQ pelas bolsas concedidas.

A todos que mesmo indiretamente fizeram parte dessa trajetória.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

Os metabólitos produzidos por diversas espécies de cogumelos apresentam ação antimicrobiana contra grupos de bactérias de alta importância para a indústria de alimentos como os pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação antimicrobiana de extratos de cogumelos comestíveis *Agaricus subrufescens* e *Lentinula edodes*, sobre os micro-organismos patogênicos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os micélios foram cultivados por fermentação em estado sólido, utilizando como substrato palha e farelo de arroz. A extração do composto antimicrobiano foi testada utilizando-se três solventes: água, etanol e acetato de etila em temperatura ambiente e a 60°C. Para a verificação da capacidade inibitória dos extratos obtidos utilizou-se a técnica de difusão em disco. Os extratos de *Lentinula edodes* testados apresentaram capacidade inibidora sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em ambas as temperaturas, formando halos inibitórios de até 15,73±2,69 mm. Já os extratos de *Agaricus subrufescens* apresentaram inibição apenas quando extraídos à 60°C e utilizando-se acetato com halo médio de 11,97±1,43 mm.

Palavras-chave: Cogumelos. Fermentação em Estado Sólido. Antimicrobianos. *Agaricus subrufescens*. *Lentinula edodes*

ABSTRACT

The metabolites produced by several species of mushrooms have antimicrobial action against bacteria groups of high importance for the food industry as those belonging to the genus *Staphylococcus*. The purpose of this work was to investigate the antimicrobial action of extracts of edible mushroom *Agaricus subrufescens* and *Lentinula edodes*, on pathogenic micro-organisms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The mycelium were grown by solid-state fermentation, using as substrate straw and rice bran. The extraction of the antimicrobial compound was tested using three solvents: water, ethanol and ethyl acetate at room temperature and at 60°C. For the verification of the inhibitory capacity of extracts obtained technique was used disk diffusion. The extracts of *Lentinula edodes* strains tested showed inhibiting capacity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in both temperatures, forming inhibitory halos up to 15.73± 2.69mm. Already the extracts of *Agaricus subrufescens* showed inhibition only when extracted at 60°C and using ethyl acetate if inhibitory halo up to 11,97±1,43 mm.

Keywords: Mushrooms. Solid-state fermentation. Antimicrobial. *Agaricus subrufescens*. *Lentinula edodes*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura de um fragmento de celulose_____	16
Quadro 1- Exemplos de produtos produzidos através de FES_____	18
Figura 2 – Potencial de interação e utilização dos fungos_____	22
Figura 3 – Estrutura das hifas_____	23
Figura 4 – Cogumelos mais cultivados e consumidos no Brasil_____	26
Quadro 2- Classificação Taxonômica do cogumelo Shiitake_____	28
Quadro 3 - Fatores ambientais ótimos para cultivo de <i>Lentinula edodes</i> _____	28
Figura 5 – <i>Agaricus subrufescens</i> _____	29
Quadro 4 - Composição mineral do <i>A. subrufescens</i> _____	30
Figura 6 – Micélio fúngico em placa de Petri com Ágar Batata Dextrose Acidificado____	34
Figura 7 – Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> (sin. <i>Agaricus subrufescens</i>) em pó, da marca Herbarium_____	34
Figura 8 – Produção de inóculo em arroz parboilizado_____	35
Figura 9 – Inoculação do substrato_____	36
Figura 10 – Substrato após o período de colonização_____	37
Figura 11 – Erlenmeyer contendo micélio, palha e solventes_____	38
Figura 12 – Extração em mesa agitadora_____	39
Figura 13 – Halos de Inibição_____	40
Gráfico 1 - Teste de Inibição de <i>Escherichia coli</i> por Extrato de <i>Lentinula edodes</i> ____	41
Gráfico 2 - Teste de Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> por Extrato de <i>Lentinula edodes</i>	43
Quadro 5 - Halos Inibitórios obtidos nas diferentes extrações_____	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo Geral	14
3.2	Objetivos Específicos	14
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1	Bioconversão de resíduos agroindustriais	15
4.2	Fermentação em estado sólido (FES)	17
4.3	Fungos	20
4.3.1	Estrutura física dos fungos	22
4.3.2	Estruturas de esporulação, crescimento e fatores ambientais	23
4.3.3	Fisiologia dos fungos	24
4.3.4	Filo Basidiomycota	24
4.4	Cogumelos	25
4.5	<i>Lentinula edodes</i>	27
4.6	<i>Agaricus subrufescens</i>	28
4.7	Compostos bioativos em cogumelos	30
4.7.1	Compostos bioativos presentes em <i>Lentinula edodes</i>	30
4.7.2	Compostos bioativos presentes em <i>Agaricus subrufescens</i>	31
4.8	Antimicrobianos	32
4.8.1	Antimicrobianos em alimentos	32

5	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	Cogumelos	34
5.2	Substrato	35
5.3	Inóculo	35
5.4	Fermentação em sacos plásticos	36
5.5	Extração de compostos antimicrobianos	37
5.6	Teste inibitório	39
5.7	Análise estatística	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1	Fermentação em estado sólido	41
6.2	Capacidade inibitória sobre <i>Escherichia coli</i> dos extratos obtidos de <i>Lentinula edodes</i>	41
6.3	Capacidade inibitória sobre <i>Staphylococcus aureus</i> dos extratos obtidos de <i>Lentinula edodes</i>	43
6.4	Capacidade inibitória sobre <i>Escherichia coli</i> dos extratos obtidos de <i>Agaricus subrufescens</i>	44
6.5	Capacidade inibitória sobre <i>Staphylococcus aureus</i> dos extratos obtidos de <i>Agaricus subrufescens</i>	45
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
8	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	49
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Fungos e bactérias possuem papel de destaque na decomposição da biosfera, estando ligados diretamente ao ciclo do carbono, nitrogênio e outros nutrientes. Esses ciclos são de extrema importância, já que através deles são devolvidos ao solo compostos ricos em nitrogênio, que servirão de substrato para o desenvolvimento de plantas e animais (ZDRADEK, 2001). Além dessa função ambiental, os fungos destacam-se também há mais de 2.000 anos, através de sua participação indispensável na produção de alimentos como as leveduras da panificação e os bolores *Penicillium* utilizados para a fabricação de queijos, além de muitos outros produtos alimentícios (RAVEN, 2011).

Estima-se que existam 1,5 milhões de espécies de fungos divididos em 4 classes principais: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota (CARVALHO, 2007). A classe dos Basidiomycotas possui como principal característica a presença de estruturas chamadas basídios, onde ocorre a formação dos esporos. Mais de 25.000 espécies pertencem a essa classe de fungos e seus principais representantes são os fungos macroscópicos, conhecidos como cogumelos (CARVALHO, 2007; LEMOS, 2009).

O emprego de cogumelos na alimentação humana ocorre desde a antiguidade, já que esses organismos são excelentes fontes de aminoácidos essenciais, proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, fibras, possuem sabor agradável, baixas quantidades de gorduras saturadas, trans e colesterol (CARVALHO, 2007; CONFOTIN, 2006; ZDRADEK, 2001). Além das significativas características nutricionais, os cogumelos destacam-se pelas capacidades terapêuticas como ação antitumoral (BERNARDI et al., 2010; PACCOLA et al., 2004; PARK, et al., 2003; DONINI et al., 2006; CARVALHO, 2007), antiviral (BERNARDI et al., 2010; PARK et al., 2003; DONINI et al. 2006; CARVALHO, 2007), antitrombótica (LEMOS,2009), anti-inflamatória (CARVALHO, 2007), hipoglicêmica (LEMOS, 2009; CARVALHO, 2007), imunomoduladora (PARK et al., 2003), antioxidante (OYETAYO, 2009;), prevenindo doenças como asma (LEMOS,2009) e arteriosclerose (WISBECK et al., 2002; LEMOS,2009), entre outras e principalmente atividades antifúngica(BERNARDI et al., 2010; PACCOLA et al., 2004; DONINI et al. 2006;), bacteriostática (TUTIDA et al., 2007) e antimicrobiana(KITZBERGER, 2005; WISBECK et al., 2002; BERNARDI et al.. 2010; PACCOLA et al., 2004; PARK et al., 2003; OYETAYO, 2009; DONINI et al. 2006; CARVALHO, 2007).

O principal problema na difusão do consumo de cogumelos está no fato de algumas espécies serem venenosas e alucinógenas. Porém a produção de cogumelos comestíveis, como os pertencentes às espécies *Agaricus*, *Lentinula* e *Pleurotus*, apresenta-se em grande ascensão (ZDRADEK, 2001; CONFORTIN, 2006; DIAS, 2010; MAIO, 2003, SHIBATA & DEMIATE, 2003; LEMOS, 2009).

Os cogumelos possuem papel de destaque no meio ambiente por sua ação de bioconversão, isso porque, para sua manutenção eles necessitam decompor resíduos vegetais, por serem organismos não produtores de clorofila, para absorver os açúcares provenientes da celulose e hemicelulose (ZDRADEK, 2001). Para essa obtenção de açúcares esses fungos produzem enzimas lignocelulases que permitem a degradação de resíduos de indústrias madeireiras, e de agroindústrias como a arrozeira, ricos em lignina e celulose (SHIBATA & DEMIATE, 2003; MARINO et al., 2008; MINOTTO et al. 2008; CONFORTIN, 2006; LEMOS, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Segundo dados do Instituto Rio Grandense de Arroz o Rio Grande do Sul produziu na safra 2011/2012, 7.371 toneladas de arroz (IRGA, 2012). O beneficiamento de arroz fornece aproximadamente 19% de casca, utilizada na geração de energia nos engenhos beneficiadores, 9% de farelo, de onde se realiza a extração de óleo e gera-se farelo desengordurado, além da palha que é deixada nas lavouras (ZDRADEK, 2001).

Uma opção é utilizar esses resíduos como substrato para o cultivo de cogumelos, aproveitamento a capacidade desses organismos de degradar rejeitos agroindustriais através da fermentação em estado sólido, sendo que os substratos depois de decompostos podem ser utilizados como fertilizantes ou ração animal.

A fermentação em estado sólido é bastante empregada na produção de enzimas, pigmentos, biomassa entre outros bioprodutos e consiste no cultivo de micro-organismos sobre partículas sólidas, como a palha de arroz (SCHMIDELL et al. 2001; ZDRADEK, 2001).

Durante seu desenvolvimento, Basidiomycotas realizam a síntese de substâncias com ação antimicrobiana e antifúngica, que servem como mecanismos de defesa para garantir sua sobrevivência, sendo que os primeiros estudos mencionados sobre essas substâncias secretadas por organismos pertencentes a essa classe datam do final da década de 1940 (CARVALHO, 2007).

Antimicrobianos podem ser definidos como substâncias produzidas por micro-organismos ou sintetizadas quimicamente que matam ou inibem o crescimento de outros micro-organismos (SOUZA, 2009) e essas substâncias estão entre alguns dos maiores avanços da farmacoterapia (KTIZBERGER, 2005).

Na indústria de alimentos a deterioração dos produtos pela ação microbiana é um ponto de grande importância, quando se tem como objetivo levar até o consumidor alimentos seguros e de elevada qualidade (Jay, 2005).

Unindo-se a importância de substâncias antimicrobianas na indústria de alimentos, ao crescente interesse da população por produtos naturais e a importância da agroindústria para a região de Bagé, o presente trabalho propõe o estudo da atividade antimicrobiana de cogumelos na fase micelial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a ação antimicrobiana de extratos de *Agaricus subrufescens* e *Lentinula edodes*, sobre os micro-organismos patogênicos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar o melhor solvente para a extração dos compostos antimicrobianos, entre água, etanol e acetato de etila;
- Avaliar a interferência da temperatura ambiente e 60°C na extração dos compostos antimicrobianos;
- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos extratos obtidos frente aos micro-organismos patogênicos *S. aureus* e *E. coli*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Bioconversão de resíduos agroindustriais

Resíduos diferenciam-se de lixo pelo fato de possuírem valor econômico agregado, possibilitando seu reaproveitamento dentro do próprio processo produtivo por conterem substâncias de alto valor. Com tecnologia adequada, esse material pode ser convertido em produtos comerciais ou matéria-prima para processos secundários (DEMAJORIVIC, 1995; LAUDENBERG et al., 2003 citado por PELIZER et al., 2007).

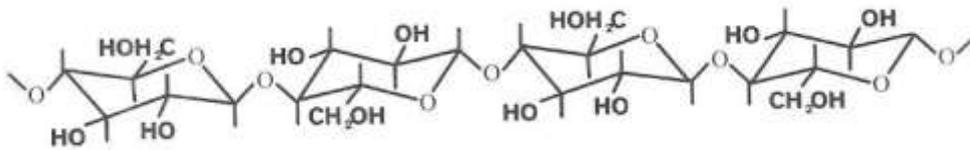
Os resíduos agroindustriais são geralmente sazonais, condicionados pela maturidade da cultura ou oferta de matéria-prima, surgindo do processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de álcool entre outros. São diversos os exemplos de resíduos como bagaços, vísceras, águas residuais, palhas e cascas como a do arroz que representa cerca de 20 a 25% do peso do grão (MATOS, 2005).

A maioria dos rejeitos das indústrias de alimentos são pobres em nutrientes como proteínas e vitaminas, mas na maioria das vezes, ricos em fibras não digeríveis. Para aumentar o valor agregado desses resíduos uma opção interessante é a bioconversão por ação de micro-organismos, principalmente fungos. Nesse ponto, os cogumelos podem auxiliar na transformação dessa grande quantidade de biomassa lignocelulósica em alimento humano, além da produção de compostos com benefícios a saúde e auxílio na conservação do meio ambiente. Resíduos como palha, farelo de arroz, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar são amplamente utilizados como substrato para o cultivo desses organismos, por serem baratos e prontamente disponíveis (VILLAS BÔAS & ESPOSITO, 2000; WISITRASSAMEEWONG, 2012).

A biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza é realizada com grande efetividade pelos fungos, sendo a maioria pertencente ao filo *Basidiomycota*. As duas principais decomposições são: decomposição branca (*White rot*), onde são degradados todos os componentes da madeira; decomposição parda (*Brown-rot*), onde são degradados principalmente polissacarídeos. Para poderem biodegradar os materiais lignocelulósicos os fungos produzem uma série de enzimas extracelulares e compostos de baixa massa molecular. Os componentes dos materiais lignocelulósicos então são despolimerizados a compostos menores para serem transportados pela parede celular e metabolizados (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são compostos por celulose, hemiceluloses, lignina, pequenas quantidades de extrativos e sais minerais. A celulose é um polímero linear parte amorfo parte cristalino, formado por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas. Representa cerca de 50% da composição dos materiais lignocelulósicos e parte de sua estrutura pode ser observada na figura 1 (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Figura 1- Estrutura de um fragmento de celulose.



Fonte: Esposito & Azevedo (2010)

A hemicelulose representa em média 20% da composição dos lignocelulósicos, apresentam-se na forma de homo ou heteropolímeros ramificados compostos por anidro-açúcares da glicose, manose, galactose, xilose e arabinose. Já a lignina representa de 20 a 30% da composição dos lignocelulósicos. É formada basicamente por unidades de fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa. Os extrativos são compostos fenólicos e resinas solúveis em solventes orgânicos e água que representam cerca de 2 a 4% da composição dos materiais lignocelulósicos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Existe um interesse crescente sobre o uso de celulases e hemicelulases para a valorização de biomassa vegetal. As lignocelulases são produzidas no substrato de cultivo dos cogumelos em fases diferentes do desenvolvimento (LARGETEAU et al., 2011).

Depois de vários ciclos de cultivo de cogumelos a produtividade diminui e o subproduto residual, ou seja, o que sobrou do substrato deve ser descartado corretamente para evitar problemas ambientais como contaminação da água e solo, pela alta carga orgânica e de sais (RIBAS et al., 2009). Uma opção é a utilização desse subproduto como ração animal como sugerido por Hadar, et al. (1993), que defendiam a utilização de cogumelos do gênero *Pleurotus* na biodegradação de resíduos lignocelulósicos para produção de ração animal, devido ao aumento da digestibilidade dos resíduos.

Zdradek (2001), estudou a otimização do crescimento de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* utilizando como substrato casca de arroz, palha de arroz e gramíneas, obtendo

aumentos de até 81% de digestibilidade do *P. ostreatus* quando utilizou-se a gramínea aguapé e 30% quando a gramínea utilizada foi o junco.

Maio (2003), em seu estudo investigou a influência da composição do substrato sobre o valor nutricional do *P. ostreatus*. Substratos enriquecidos com quantidades variadas de farelo de arroz e submetidos a diferentes valores de pH apresentaram concentrações variadas de carboidratos, lipídeos e proteínas. Com pH 9 e 10% de farelo as maiores concentrações foram de carboidrato. Quando se utilizou pH 7 e 10% de farelo as maiores concentrações foram de lipídeos e com pH 7 com 20% de farelo foram obtidas maiores concentrações de proteínas demonstrando que a composição nutricional dos cogumelos é alterada em função do substrato.

Rossi et al. (2003) analisou a produção de *Lentinula edodes* em bagaço de cana, enriquecido com farelo de arroz e melação de cana. Os experimentos suplementados com 25 e 30% de farelo de arroz apresentaram a maior eficiência biológica e maior peso médio de cogumelos. Sendo que qualquer quantidade de farelo de arroz adicionada geram cogumelos de qualidade, com melhor produção do ponto de vista de venda para suplementação de 15% de farelo de arroz.

4.2 Fermentação em estado sólido(FES)

Schmidell et al. (2001, p.247-248) definem fermentação em estado sólido como:

Processos que referem-se à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida.

Além das características que servem para definir a fermentação em estado sólido outras merecem destaque como (PINTO et al., 2005):

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes;
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomerações das suas partículas individuais;
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas as dos habitats naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não são completamente acessíveis ao micro-organismo.

É difícil definir uma data inicial para a utilização desse tipo de fermentação visto que, provavelmente deve ser mais antiga que o próprio homem. Por estimular o crescimento de micro-organismo na natureza em sólidos úmidos serviu como base para o desenvolvimento de quase todos os processos fermentativos antigos, sendo diversos os alimentos que utilizam esse processo e que fazem parte da dieta de diferentes povos a séculos. Um exemplo é o molho de soja, que já era produzido na China em 1.000 aC e o “chiang” (similar ao “miso”) produzido entre 2.500 e 500 aC. Esses dois produtos são obtidos através da modificação enzimática utilizando uma massa umidificada de cereal cozido, geralmente arroz, no qual houve crescimento de *Aspergillus oryzae* (SCHMIDELL et al., 2001; PANDEY, 2003).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a necessidade de se apressar a produção de penicilina, desencadeou o desenvolvimento de processos que envolviam fermentações líquidas em grandes tanques, e assim os processos em estado sólido foram negligenciados. Porém no Japão o processo foi sendo aperfeiçoado, o que conduziu o país a obtenção de tecnologia de fermentação em estado sólido cada vez mais avançada (SCHMIDELL et al., 2001).

O Quadro 1 mostra alguns produtos que podem ser obtidos a partir de FES, o substrato e o fungo utilizado (PINTO et al. 2005).

Quadro 1- Exemplos de produtos produzidos através de FES

PRODUTO	PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS	SUBSTRATOS
Pectinases	<i>Lentinula edodes</i>	Resíduos de frutas
	<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de café
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de milho
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo Resíduos de chá
Lipases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de maçã Bagaço de cana Resíduo de goiaba Resíduo de abacaxi

Fonte: Adaptada de Pinto, et al.(2005)

Pandey, (2003) destaca que a FES oferece muitas oportunidades no processamento de resíduos agroindustriais, principalmente por requerer menor energia, produzir menor quantidade de águas residuais e auxiliar o meio ambiente resolvendo o problema de eliminação de resíduos sólidos. As principais linhas de pesquisa utilizando esse tipo de

fermentação são o enriquecimento proteico de resíduos agroindustriais, destoxificação de resíduos e produção de compostos de alto valor agregado.

Alguns pontos devem receber atenção durante a utilização da FES (PANDEY et al., 1995; PANDEY et al., 1996; OOIJKAAS et al., 2000; PANDEY, 2003):

- *Efeitos da transferência de calor e massa*: esses efeitos são algumas das maiores dificuldades encontradas quando se está lidando com um processo de fermentação em estado sólido. Durante a fermentação grande quantidade de calor é gerado, de forma diretamente proporcional a atividade metabólica dos micro-organismos, como as matrizes utilizadas na fermentação geralmente possuem baixas condutividades térmicas, a retirada de calor do processo pode ser muito lenta, o que as vezes ocasiona desnaturação do produtos acumulados nas matrizes. Isso ocorre porque no início do processo a temperatura e a concentração de oxigênio permanecem uniformes, porem com a evolução da fermentação a transferência de oxigênio toma lugar e a temperatura aumenta.

- *Atividade de água*: este também é um fator crítico, já que influencia a atividade dos micro-organismos, sendo parâmetro fundamental para a transferência de massa de água e solutos para células microbianas.

-*Escolha do suporte*: é um ponto importante porque além de suprir as necessidades nutricionais das culturas ainda serve como base para as células, devendo-se levar em consideração seu valor e disponibilidade. Pode ser natural como os resíduos agroindustriais ou inertes como perlite.

-*Escolha do fermentador*: nos diversos processos de fermentação, o fermentador ou biorreator, propicia o ambiente para o crescimento e atividade dos micro-organismos que provocam a reação biológica, existindo diversos parâmetros que influenciam na adequação do biorreator que será empregado no processo de fermentação.

Como qualquer processo a fermentação em estado sólido possui vantagens e desvantagens que são apresentadas a seguir (SCHMIDELL et al., 2001).

Vantagens:

-Apresenta uma aceleração na taxa de reação devido ao direto contato entre o substrato e micro-organismo;

-Devido a menor quantidade de água empregada, o volume do reator é menor do que no processo submerso, essa baixa quantidade de água também reduz os custos de capital investido e de energia consumida;

-Os baixos teores de umidade empregados, juntamente com a alta concentração de inóculo incorporado ao meio, reduzem, ou muitas vezes até eliminam o problema de contaminação;

-As condições de crescimento empregadas são geralmente semelhantes às condições naturais de crescimento dos fungos filamentosos, o que possibilita em muitos casos, maiores rendimentos na obtenção de produtos de utilização industrial;

-Em diversos casos é possível obter rendimentos maiores em comparação à fermentação submersa.

Desvantagens:

-Dependendo das características do meio e do tipo de reator utilizado, pode haver dificuldade na dissipação de calor;

-Dificuldade em acompanhar parâmetros do processo como pH, temperatura, umidade, aeração e crescimento de micro-organismos;

-Dificuldade para coletar amostras representativas durante a fermentação, devido a não homogeneidade do substrato;

-De acordo com o processo, pode haver a necessidade de um controle mais rigoroso das condições ambientais nos locais de acesso à fermentação, principalmente quando houver a produção de esporos de fungos.

4.3 Fungos

Micologistas acreditam na existência de cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos no mundo, tanto unicelulares, como as leveduras, como multicelulares, sendo descritas apenas cerca de 90 mil. Com exceção dos insetos, os fungos são os seres vivos mais numerosos existentes (RAVEN, 1996; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; RAVEN, 2011).

Os fungos ao contrário das plantas não possuem a capacidade de obtenção de energia por fotossíntese. Assim, para obtenção de energia, esses organismos secretam enzimas e absorvem as moléculas orgânicas geradas, como por exemplo, fungos que possuem a capacidade de degradar as ligações entre as subunidades de glicose que formam a celulose, para posterior absorção dessas moléculas. Quanto à forma de obtenção de alimentos, os fungos podem ser classificados em três grupos (RAVEN, 1996; RAVEN, 2011; SOUZA et al. 2006):

-Fungos Saprófitos: são aqueles que crescem sobre material orgânico em decomposição. Ex.: Cogumelos.

-Fungos Simbióticos: são aqueles que crescem em associação com outros organismos. Ex.: Fungos que formam micorrizas com as raízes de plantas, auxiliando na absorção de água e nutrientes em troca de carboidratos essenciais.

-Fungos Parasitas: são aqueles geralmente dotados de hifas especializadas, os haustórios, que absorvem alimento diretamente da célula de outros organismos. Ex.: Ferrugens.

Juntamente com bactérias e outros grupos heterotróficos os fungos desempenham papel de decompositores na biosfera, tornando possível que o material orgânico retorne ao meio ambiente através da reciclagem. Esse processo envolve a liberação de dióxido de carbono na atmosfera e devolução ao solo de substâncias, como os compostos nitrogenados (RAVEN, 1996).

Geralmente esses organismos são lembrados pelas pessoas de forma negativa, principalmente pela deterioração de frutos, pães e outros alimentos, estrago em couros, paredes, etc. Porém, embora existam espécies prejudiciais, a maioria dos fungos possui função benéfica, como:

-Produção de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico;

-Produção de fármacos, como os antibióticos;

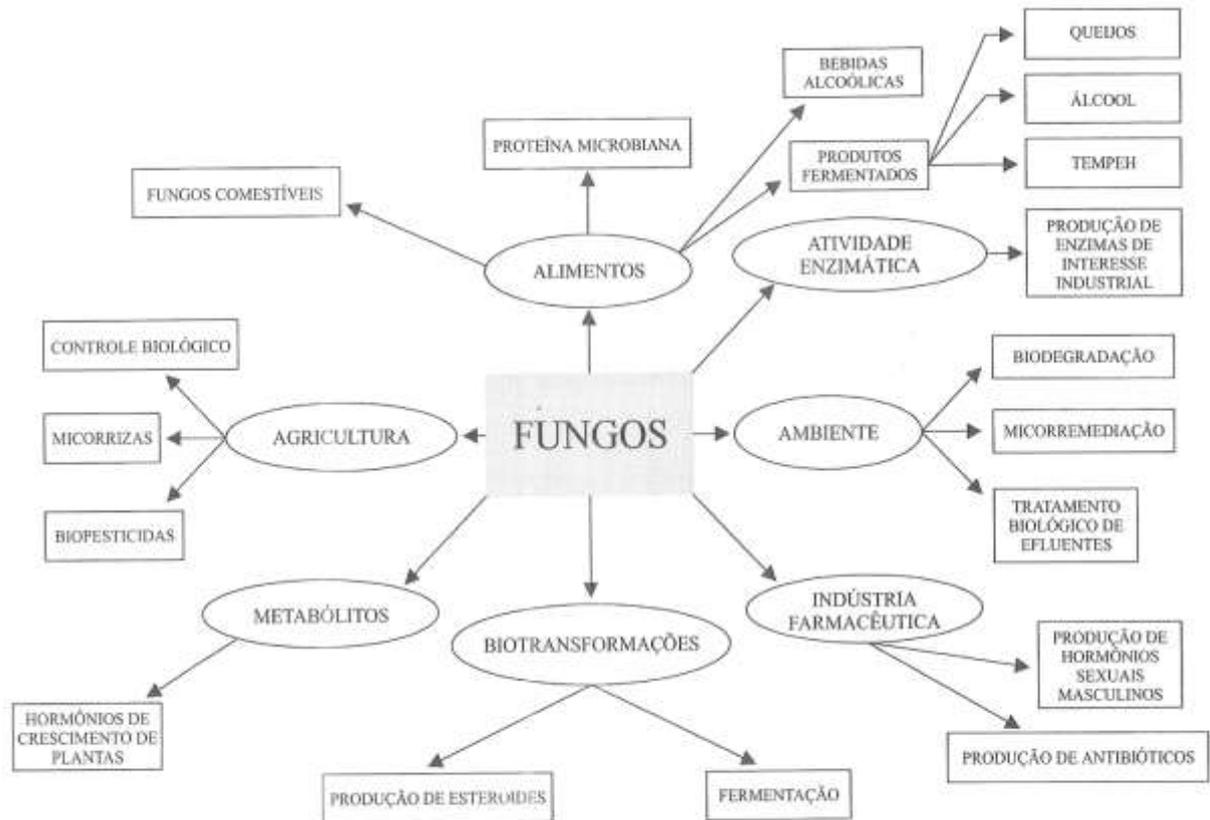
-Produção de enzimas de interesse industrial e elevado valor econômico como as celulasas, lacases, xilanasas, amilases e pectinases;

-Controle de insetos-pragas na agricultura;

-Produção de bebidas fermentadas como cerveja e vinhos, queijos entre outros alimentos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

A figura 2 apresenta um esquema do potencial de interação e utilização dos fungos.

Figura 2- Potencial de interação e utilização dos fungos.



Fonte: Esposito & Azevedo (2010)

4.3.1 Estrutura física dos fungos

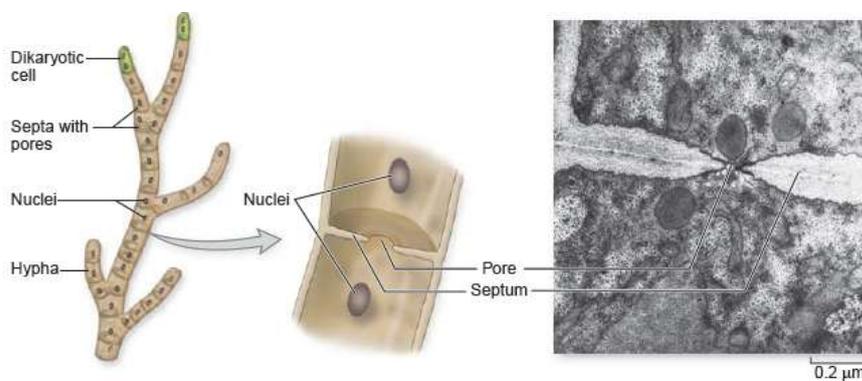
Os fungos podem apresentar sua fase vegetativa em duas formas morfológicas básicas: a leveduriforme e a hifal. Os leveduriformes são células únicas delimitadas e pequenas. Suas colônias são semelhantes as das bactérias, apresentando aspecto céreo-brilhante e coloração variada quando isoladas *in vitro*. Alguns fungos desse tipo podem formar pseudomicélio, mantendo suas células unidas enquanto se dividem em determinadas condições de crescimento em meios sólido (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

A estrutura física do outro grupo de fungos é formada por filamentos conhecidos como hifas, que podem ser tubos contínuos ou com ramificações contendo citoplasma e núcleos múltiplos ou ainda formadas por uma sequência de células lado a lado. Quando analisadas microscopicamente, é possível observar dois tipos básicos de hifas, as que apresentam paredes transversais (septos) e as que não apresentam essas paredes (aseptados). Unidas em grande

quantidade as hifas dão origem a uma massa, o micélio, do grego “myketos” que significa fungos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; RAVEN, 2011).

O crescimento dessas hifas ocorre de forma rápida quando o fungo encontra condições favoráveis, podendo um fungo produzir mais de 1 km de micélio em 24 horas, consequência da presença de poros que permitem o livre fluxo do citoplasma ao longo das hifas, o que torna o transporte das proteínas sintetizadas mais eficiente. A figura 3 mostra a estrutura de uma hifa (RAVEN, 1996; RAVEN, 2011).

Figura 3- Estrutura das hifas.



Fonte: RAVEN (2011)

Assim como os insetos, aracnídeos e crustáceos o corpo dos fungos é constituído, em sua essência, pelo polissacarídeo quitina, que consiste em unidades repetidas de β 1,4 N-acetilglucosamina, podendo ocorrer mudanças de uma forma ou outra, devido fatores como condições do meio, temperatura ou oxigênio/CO₂ disponível (RAVEN, 1996; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; RAVEN, 2011).

4.3.2 Estruturas de esporulação, crescimento e fatores ambientais

Ao contrário de plantas e animais, que possuem ciclo de vida obrigatório, nos fungos isso é facultativo, ou seja, se as condições do meio são ideais para o crescimento somático (vegetativo) então esse crescimento ocorre, se não, uma sequência de etapas leva ao processo de esporulação (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Esses esporos, produzidos em grande quantidade, são os responsáveis pela grande disseminação desses organismos no planeta. Essas pequenas e leves estruturas são dispersas nos mais variados ambientes permitindo sua instalação em locais adequadas para seu desenvolvimento (TERÇARIOLI et al. , 2010).

Pode-se pensar nos esporos como estruturas análogas às sementes dos vegetais e o processo de esporulação como a “reprodução”. Porém, isso não é aplicável às formas levuriformes, já que nesses fungos a esporulação relaciona-se com a sobrevivência e a dispersão e não ao aumento de indivíduos. A diferenciação na produção de esporos baseia-se no tipo de divisão nuclear: esporos sexuais via meiose e esporos assexuais por mitose (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

O crescimento dos fungos é extremamente influenciado pelas condições do meio como temperatura, umidade, pH e aeração. Esses fatores afetam de maneiras diferentes as distintas espécies, fazendo assim que cada uma possua seus ótimos, crescendo dentro de determinadas faixas para cada fator. De forma geral a maioria dos fungos cresce em condições normais de temperatura e aeração, sendo a maioria mesófila (25-35°C), pH entre 5 e 7 e alta umidade (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

4.3.3 Fisiologia dos fungos

Os requisitos nutricionais dos fungos assemelham-se aos requisitos humanos, isso porque sua principal fonte de energia é a glicose, proveniente das fontes de carbono. Alguns também necessitam de vitaminas como tiamina (B1), biotina (B7), riboflavina (B2), potássio, magnésio e cálcio, além de substâncias nitrogenadas como sais de amônia e nitratos. Assim os fungos absorvem esses elementos, os cataboliza e produz cerca de uma dúzia de metabólitos precursores com os quais sintetizará, por anabolismo, macromoléculas que compõem sua biomassa (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; TERÇARIOLI et al., 2010).

Compostos como monossacarídeos, aminoácidos e vitaminas são levados para dentro da célula dos fungos sem modificações, através dos diferentes mecanismos de transporte por membranas, enquanto outros como os polissacarídeos e proteínas necessitam ser hidrolisados antes de serem absorvidos pelas células. Essa hidrólise ocorre através da ação de enzimas, sendo que a ausência de enzimas específicas pode ocasionar o fracasso do crescimento fúngico em determinado substrato (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

4.3.4 Filo Basidiomycota

A classificação filogenética dos fungos tem sido alvo de muitas discussões, sendo que em 2007, com auxílio do sequenciamento molecular, foram definidos 7 filós: Microsporidia, Blastocladiomycota, Neocalismastigomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Basidiomycota e Ascomycota (RAVEN, 2011).

O filo Basidiomycota é composto de 22.300 espécies, distribuídas em 3 classes, 41 ordens e 165 famílias. Sua principal característica é a presença de basídios, estruturas de reprodução sexuada que dão suporte aos basidiosporos. Os principais basidiomicetes são os macrofungos, também conhecidos como cogumelos, as ferrugens e os carvões (RAVEN, 1996; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010 RAVEN, 2011).

Os basidiomicotas são tipicamente miceliais, sendo que alguns apresentam estruturas ou estado levuriformes. Outras características de destaque são a parede celular formada por quitina β -(1,3)- β (1,6)-glucanos e α (1,3)-glucano, proteína xilomona e presença em muitos casos de fíbulas nas hifas. E seus esporos de origem assexual são formados por brotação, fragmentação do micélio e produção de conídios, artrósporos ou oídios (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

As utilizações de fungos do filo Basidiomycota pelo homem são as mais diversas, como (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010):

-Fonte de proteínas: *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, etc.;

-Produção de substâncias metabólicas: *Pycnoporus sanguineus*;

-Clareamento de efluentes de indústrias têxteis e de celulose: *Trametes vilosa*, *Phallinus flavomarginatus*.

4.4 Cogumelos

Os cogumelos ou macromicetos são conhecidos a mais de 3.000 anos pelos povos asiáticos, e na Europa o cultivo iniciou nos anos de 1.700, estima-se a existência de 45.000 espécies descritas na literatura internacional (DIAS et al.,2004; URBEN, 2004).

Segundo estimativas da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a produção de cogumelos e trufas no ano de 2010 em países como Estados Unidos e Itália foram respectivamente 359.000 e 800.000 toneladas.

O Brasil não possui tradição na produção de cogumelos e seus dados não constam nas estatísticas da FAO, porém o cultivo no país encontra-se em ampla expansão, sendo as principais regiões produtoras o sul e sudeste. Acredita-se que a utilização dos cogumelos no país tenha iniciado no século XIX, com os indígenas, sendo muitas tribos conhecidamente consumidoras de cogumelos como Umutina, Bororó e Caipó. O cultivo teve início em 1943 através de técnicos do Instituto Biológico de São Paulo e ganhou destaque com a chegada de

imigrantes chineses e japoneses ao estado de São Paulo (FURLANI & GODOY, 2007; DIAS, 2010; SILVA, 2011).

Esses imigrantes tiveram tamanha importância, que rapidamente São Paulo tornou-se referência de cultivo de cogumelos no Brasil e por muito tempo, apenas nesse estado a atividade possui relevância econômica. Essa relação direta com os imigrantes, fez com que a produção até hoje esteja em sua maioria restrita a pequenas propriedades, com utilização de trabalho familiar e técnicas rudimentares, passadas de geração para geração (SILVA, 2011).

Ao contrário de países da Ásia e Europa onde o consumo de cogumelos por habitante chega a 4,0 kg, no Brasil o consumo é de 70g por habitante e geralmente restrito à pequenos grupos, principalmente por fatores como tradição, preço, e crença de que são venenosos ou alucinógenos (DIAS et al., 2004; DIAS, 2010; ROSA, 2011).

Existem mais de 200 gêneros de macrofungos com espécies utilizadas pelas pessoas, sendo 20 espécies as mais comumente empregadas com propósito alimentar e medicinal, entre esses estão os cogumelos mais cultivados e consumidos no Brasil: *Agaricus bisporus* mais conhecido como Champignon, *Lentinula edodes* ou Shiitake (Figura 4a) e *Pleurotus spp* ou Shimeji (Figura 4b). Mundialmente estes três cogumelos representam $\frac{3}{4}$ dos cogumelos cultivados. A espécie medicinal *Agaricus blazei* também vem ganhando espaço por suas propriedades medicinais sendo produzido no Brasil e exportado para o Japão (FURLANI & GODOY, 2007; MARSHALL & NAIR, 2009, BETT & PERONDI, 2011).

Figura 4 - Cogumelos mais cultivados e consumidos no Brasil: a) *Lentinula edodes* ou Shiitake; b) *Pleurotus spp* ou Shimeji.



Fonte: Urben (2004)

As principais vantagens do cultivo de cogumelos são (MAIO, 2003):

-Redução da poluição ambiental, visto que o cultivo utiliza como substratos resíduos agrícolas como palha de arroz e milho, bagaço de cana-de-açúcar, que podem ser adaptados conforme a produção agrícola regional;

-Pode ser uma opção de renda adicional para os produtores;

-Enriquecimento da dieta populacional pela alta qualidade de suas proteínas, minerais e vitaminas;

-Melhora dos padrões econômicos, já que os cogumelos são produtos bastante procurados para exportação.

4.5 *Lentinula edodes*

A *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, ou Shiitake (do japonês *shiia* = tipo de árvore e *take* = cogumelo) como é mais conhecido, é um dos cogumelos mais cultivados no mundo. Algumas bibliografias o trazem como ocupando o 2º lugar em volume de produção, o que representa cerca de 10% do total de cogumelos da produção mundial, enquanto outras o colocam em 3º lugar, atrás das diversas espécies de *Pleurotus* juntas. O início de seu cultivo ocorreu durante a Dinastia Sung na China, entre os anos de 960 e 1127 DC, sendo que atualmente os maiores produtores mundiais são os japoneses, que aperfeiçoaram o cultivo e também foram responsáveis por trazer para o Brasil a *L. edodes* através de seus imigrantes, a mais de 30 anos (TEIXEIRA & MACHADO, 2004; FURLANI & GODOY, 2005; HASSEGAWA et al.,2005; SAMPAIO & QUEIROZ, 2006; DIAS, 2010; BETT & PERONDI, 2011).

O Shiitake pertence ao grupo de fungos da podridão da madeira, crescendo naturalmente sobre tronco de árvores mortas ou tocos. Seu cultivo ocorre geralmente em árvores como a castanheira, carvalho e omo porém no Brasil a cultura do Shiitake, foi adaptada para troncos de eucalipto, o que representou um grande avanço já que essa árvore é considera um recurso renovável, preservando dessa forma as espécies nativas (SOUZA, 2009; DIAS, 2010).

Sua classificação taxonômica é apresentada no Quadro 2.

Quadro 2- Classificação Taxonômica do cogumelo Shiitake

REINO	<i>Fungi</i>
FILO/DIVISÃO	Basidiomycota
SUBDIVISÃO	<i>Basidiomycotina</i>
CLASSE	<i>Basidiomycetes</i>
SUBCLASSE	<i>Olobasidiomycetidae ser. Hymenomycetes</i>
ORDEM	<i>Agaricales</i>
FAMÍLIA	<i>Tricholomataceae</i>
GÊNERO	<i>Lentinula</i>
ESPÉCIE	<i>L. edodes</i>

Fonte: TEIXEIRA & MACHADO (2004).

O Shiitake é bastante nutritivo, apresentando 17,5% de proteínas em base seca, como nove aminoácidos essenciais em proporções similares as de boas proteínas para alimentação humana. Contém ainda 8,0% de lipídeos, 67,5% de carboidratos; 8% de fibras e 7% de cinzas. Seu conteúdo de água varia entre 85 e 95%. Os minerais estão presentes em quantidades de 2,6 a 6,5% em base seca, com teores significantes de cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio (TEIXEIRA & MACHADO, 2004).

O quadro 3 apresenta os fatores ambientais ótimos de cultivo para o Shiitake.

Quadro 3 - Fatores ambientais ótimos para cultivo de *Lentinula edodes*

FATOR	
Temperatura de Esporulação (°C)	22-26
Temperatura de Crescimento Micelial (°C)	24-27
Temperatura de Frutificação (°C)	8-16
Umidade Substrato (%)	58-62
Umidade Relativa do Ar (%)	80-90
pH	4,0-5,5

Fonte: Adptado de TEIXEIRA & MACHADO, 2004.

4.6 Agaricus subrufescens

Esse cogumelo medicinal encontra-se em meio a uma grande discussão do ponto de vista de nomenclatura, existindo correntes divergentes a respeito de as espécies *Agaricus subrufescens*, *Agaricus blazei* Murrill, e *Agaricus brasiliensis* serem iguais ou não (KERRIGAN, 2005; GYÖRFI et al., 2010; WISITRASSAMEEWONG et al., 2012; ZIED et al., 2012).

O *A. subrufescens* foi amplamente cultivado e consumido nos Estados Unidos do final do século XIX até o início do século XX, sendo descrito primeiramente por C. H. Peck em

1813. Em 1918 na Flórida, Estados Unidos, essa espécie foi reidentificada a partir de estudos micológicos de cogumelos realizados pelo pesquisador W.A.Murril e chamada de *Agaricus blazei* Murril. Em 1960 foi encontrado no Brasil, originário das serras da Mata Atlântica, tendo sido descoberto no sul do estado de São Paulo, por um pesquisador japonês, senhor Furumoto, que enviou amostras para serem analisadas no Japão identificado como *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann. O *Agaricus blazei*, também é conhecido por Himematsutake pelos japoneses, Cogumelo do Sol[®] ou Cogumelo Piedade no Brasil e em 2002, Wasser, et al. rejeitaram a nomenclatura *A. blazei* para a espécie brasileira e propuseram a nomenclatura de *Agaricus brasiliensis* (KERRIGAN, 2005; WISITRASSAMEEWONG et al., 2012).

O pesquisador R. W. Kerrigan baseado em testes genéticos demonstrou que o *A. blazei* e *A. brasiliensis* são geneticamente similares ao *A. subrufescens*. Partindo do princípio que a nomenclatura *A. subrufescens* é a mais antiga e assim teria prioridade, esta será a adotada no presente trabalho (KERRIGAN, 2005; GYÖRFI et al., 2010).

Estes cogumelos possuem corpo de frutificação de pequeno a grande, com píleo branco, amarelo ou marrom, lamela pálida ou rósea quando jovem tornando-se marrom chocolate posteriormente. Basídios lisos e de cor marrom-escuro, como pode ser observado na Figura 5. A variabilidade morfológica da espécie é consequência da influência de diferentes climas e ecossistemas. Por ser um cogumelo tropical sua temperatura de frutificação ideal é entre 25-29°C (FIRENZUOLI, 2007; ZIED, 2011; WISITRASSAMEEWONG et al., 2012).

Figura 5 - *Agaricus subrufescens*



Fonte: ESPOSITO & AZEVEDO (2010)

Agaricus subrufescens encontra-se no grupo dos organismos saprófitas secundários, ou seja, ele não degrada compostos lignocelulósicos complexos, exigindo uma segunda fase de

compostagem para se desenvolver e passam como todos os fungos, a maior parte de seu ciclo de vida na fase de micélio vegetativo, onde decompõem, absorvem e armazenam nutrientes para a fase reprodutiva (SHIBATA & DEMIATE, 2003).

Györfi et al.(2010) analisou o *A. subrufescens* quanto a sua composição mineral, encontrando altos valores de potássio, fósforo, cálcio, magnésio e zinco quando comparados ao *A. bisporus* (Champignon), a espécie apresentou também baixos valores de sódio como pode ser observado no Quadro 4.

Quadro 4 - Composição mineral do *A. subrufescens*

Mineral	Quantidade (mg/kg de matéria seca)
Potássio	28-30
Fósforo	7-11
Cálcio	1-1,5
Magnésio	1-1,5
Zinco	140-250
Sódio	140-180

Dados: GYÖRFI et al.(2010)

Por sua composição variada o *A. subrufescens* pode ser utilizado para enriquecimento nutricional de outros produtos, como molho de tomate demonstrado por Monteiro (2008).

4.7 Compostos bioativos presentes em cogumelos

4.7.1 Compostos bioativos presentes em *Lentinula edodes*

São diversas as citações na literatura de compostos biologicamente ativos isolados e purificados a partir da *Lentinula* (FURLANI & GODOY, 2005).

Hasegawa et al. (2005) obteve compostos, não identificados, com ação antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* de filtrados de culturas líquidas de *L. edodes* cultivadas em meios suplementados com grãos de arroz. No trabalho de Tutida et al. (2007) um isolado desse cogumelo chegou a apresentar 52,4% de inibição contra *Puccinia recôndita* f. sp tritici em testes in vitro, fungo causador de doenças em culturas de trigo.

Isolados de *Lentinula edodes* reduziram significativamente a ocorrência de murcha bacteriana em tomateiros, provavelmente induzindo a resistência da planta (SILVA et al., 2007). Paccola et al. (2001) confirmaram a ação fungistática de compostos intra e

extracelulares de *L. edodes* contra *Candida albicans*, um patógeno humano, e Paccola et al. (2004) demonstraram o efeito radioprotetor e antimutagênico de extratos de *Lentinula* em células eucarióticas expostas a radiação UV.

Carvalho (2007), demonstrou a capacidade de extratos de *Lentinula edodes* de inibir a atividade de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* e de leveduras como *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Caldos provenientes de fermentações submersas de *L. edodes*, demonstraram potencial como antimicrobianos frente a patógenos bacterianos de importância para a saúde humana, um grande avanço visto que os antibióticos comerciais vem tornando-se obsoletos rapidamente em consequência da resistência adquirida dos micro-organismos (SOUZA, 2009).

4.7.2 Compostos bioativos presentes em *Agaricus subrufescens*

Amostras de *A. blazei* Murril (sin. *A. subrufescens*), apresentam valores significativos de β -glucanos, homo- e hetero-glucanos, com concentrações entre 7 e 10g/100g de cogumelos. Essas substâncias são bastante estudadas por apresentarem propriedade benéfica a saúde humana como atividade anti-inflamatória e antioxidante (PARK et al. 2003). Enquanto Valence et al. (2011) detectaram altas concentrações de polissacarídeos com propriedade medicinais em amostras de biomassa de *A. subrufescens*.

Dois isolados de *A. blazei* (sin. *A. subrufescens*) testados por Silva et al. (2007) apresentaram potencial de induzir resistência em plantas de berinjela contra a doença bacteriana conhecida como murcha, ocasionada por *Ralstonia solanacearum*.

Além dos extratos de *L. edodes*, Paccola et al. (2004) testaram extratos de *A. blazei* que demonstraram o mesmo efeito radioprotetor e antimutagênico em células eucarióticas expostas a radiação UV.

Mourão et al.(2011) estudaram a ação antioxidante de compostos presentes no *A. brasiliensis* em diferentes fases de maturação. A melhor condição de extração foi utilizando-se metanol como solvente a 60°C por 60 minutos e cogumelos com basidiocarpos ainda fechados, estado de maturação menor, apresentaram as maiores concentrações de antioxidantes.

4.8 Antimicrobianos

Segundo MADIGAN et al. (2004) agentes antimicrobianos são produtos químicos naturais ou sintéticos que matam ou inibem o crescimento de outros micro-organismos. Esses agentes podem ocasionar a morte do micro-organismos como os bacteriocidas, fungicidas e viriocidas ou apenas inibir o seu desenvolvimento como os bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos.

A atividade inibitória de substâncias sobre micro-organismos é conhecida a muito tempo, sendo que os primeiros relatos datam de mais de 3.000 anos atrás quando médicos chineses usavam fungos para o tratamento de feridas infecciosas, porém essas substâncias receberam destaque em 1929, quando Alexander Fleming descobriu em Londres um agente antibacteriano produzido por fungos do gênero *Penicillium*. Durante um experimento com estafilococos, fungos contaminaram as placas, Fleming observou que ao redor de certo fungo as colônias de bactéria sofriam lise celular, apresentando-se translúcidas. O cientista então colocou o fungo para crescer na superfície de um caldo nutriente, verificando que uma substância antimicrobiana era secretada no meio. Esse caldo é o que hoje se conhece como penicilina (LIMA et al., 2001; CARVALHO, 2007).

4.8.1 Antimicrobianos em alimentos

A Organização Mundial da Saúde estima que 20% da produção de alimentos é perdida por deterioração, além disso, esses produtos podem servir de veículo para doenças transmitidas por alimentos, conhecidas como DTA, sendo muitas dessas potencialmente fatais. Para evitar esses dois problemas a indústria investe em métodos de conservação, sendo um deles os aditivos conservadores (EVANGELISTA, 2000).

Segundo a Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conservadores são “substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas”. A maioria desses conservadores são agentes químicos, o que torna o estudo de agentes antimicrobianos de origem natural de grande importância para a ciência e tecnologia de alimentos, visto que crescem os debates e preocupações da população e dos órgãos governamentais sobre o uso de conservantes químicos (ANVISA, 1997; CLEVELAND et al., 2001).

Na procura por biomoléculas ativas os cogumelos vêm ganhando destaque como produtores de antimicrobianos. Extratos de *Lentinula edodes* apresentaram atividade antimicrobiana contra doenças em plantas frutíferas como maracujazeiro e outras plantas produtoras de alimentos como tomateiro (GODOY, 2008).

Porém, essa atividade antimicrobiana não está restrita apenas para área agrônômica. Oyetayo (2009) testou extratos de 4 tipos de cogumelos silvestres com concentrações que variavam entre 12,5mg/ml até 100mg/ml, sendo que todos demonstraram capacidade inibitória sobre micro-organismos patogênicos de interesse na indústria de alimentos como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Shigella* e *Salmonella*.

Paccola et al. (2001) conseguiram inibir a levedura patogênica *Candida alicans* através de extratos de *Lentinula edodes*, e Wisbeck et al. (2002) descreveram que a linhagem DSM de *Pleurotus ostreatus* chegou a apresentar 80% de inibição para *Staphylococcus aureus*.

Estes são apenas alguns dos relatos encontrados na bibliografia sobre a potencialidade dos cogumelos para produzir antimicrobianos naturais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cogumelos

Os cogumelos utilizados foram *Lentinula edodes* cedido pelo laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais da Universidade Federal de Santa Catarina, mantido em ágar Batata Dextrose acidificados a 4°C (Figura 6) e *Agaricus subrufescens* obtido em farmácias locais em cápsulas, da marca Herbarium¹ (Figura 7).

A intenção inicial do trabalho era o cultivo das duas espécies de cogumelos, porém devido à contaminação da cultura mãe de *Agaricus subrufescens* optou-se pelo estudo da extração de antimicrobianos da forma comercial.

Figura 6 - Micélio fúngico em placa de Petri com Ágar Batata Dextrose acidificado



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) - UNIPAMPA

Figura 7 – Cogumelo *Agaricus blazei* (sin. *Agaricus subrufescens*) em pó, da marca Herbarium



Fonte: Divulgação, disponível em <http://www.herbarium.net>

5.2 Substrato

Como substrato para fermentação foi utilizada palha de arroz obtida nas lavouras da região de Bagé e farelo de arroz fornecido pela Indústria Ceolin Alimentos.

A palha foi moída em moinho de facas, para aumentar a área de contato do inóculo com o substrato. Em embalagens plásticas de polipropileno foram colocados 1kg de palha e 3 diferentes quantidades de farelo de arroz: 100 g, 300 g e 500g para avaliação da influência do farelo de arroz sobre o desenvolvimento dos cogumelos, conforme citado por Donini et al. (2006).

O meio de cultura então foi autoclavado a 121°C por 30 minutos para eliminação de qualquer micro-organismo ou esporo presente, permitindo que o micélio de interesse pudesse se desenvolver sem competições por substrato.

5.3 Inóculo

Para o preparo de inóculo ou “semente” (Figura 8) utilizada a metodologia descrita por Györfi et al. (2010) com modificações. Grãos de arroz parboilizado cozidos por 20 minutos e escorridos. Em erlenmeyer de 250 mL foram pesados 15 g de arroz. Esse material, após autoclavado a 121°C por 15 minutos e resfriado, foi inoculado com 3 pedaços, de aproximadamente 1x1 cm, de ágar batata dextrose acidificado contendo micélio do cogumelo. Os erlenmeyer foram mantidos em estufa a 25°C por 10 dias na ausência de luz.

Figura 8 – Produção de inóculo em arroz parboilizado



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) - UNIPAMPA

5.4 Fermentação em sacos plásticos

As sementes produzidas foram inoculadas nos sacos plásticos contendo o substrato esterilizado, como observado na Figura 9. Esses sacos foram fechados e levados para estufa ajustada com temperatura de 25°C e umidade de 90% por 40 dias para colonização do substrato, na Figura 10 pode-se observar o substrato após esse período.

Figura 9 – Inoculação do substrato



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) - UNIPAMPA

Figura 10 – Substrato após o período de colonização



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) - UNIPAMPA

5.5 Extração de compostos antimicrobianos

Para a extração dos compostos antimicrobianos, foram utilizados como solventes: água destilada esterilizada, etanol e acetato de etila, em ordem decrescente de polaridade.

Em erlenmeyer colocou-se palha contendo micélio e os solventes na proporção de 1:10 no caso da *Lentinula edodes* (Figura 11) e o conteúdo das cápsulas comerciais (*Agaricus subrufescens*) com os mesmos solventes e proporção.

Figura 11 – Erlenmeyer contendo micélio, palha e solventes



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) - UNIPAMPA

Os recipientes foram levados para mesa agitadora (sem controle de temperatura), com rotação de 150rpm (Figura 12) e também para banho termostaticado à temperatura de 60°C durante 24 horas, para verificação da influência da temperatura sobre a extração.

Para garantir a não interferência da palha foram realizados experimentos controle onde a mesma era retirada após 1 hora de extração.

Figura 12 – Extração em mesa agitadora



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) – UNIPAMPA

5.6 Teste inibitório

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, foram utilizadas 2 espécies bacterianas como agentes patogênicos nos testes de atividade antimicrobiana, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, cedidos pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência, da Fundação Oswaldo Cruz.

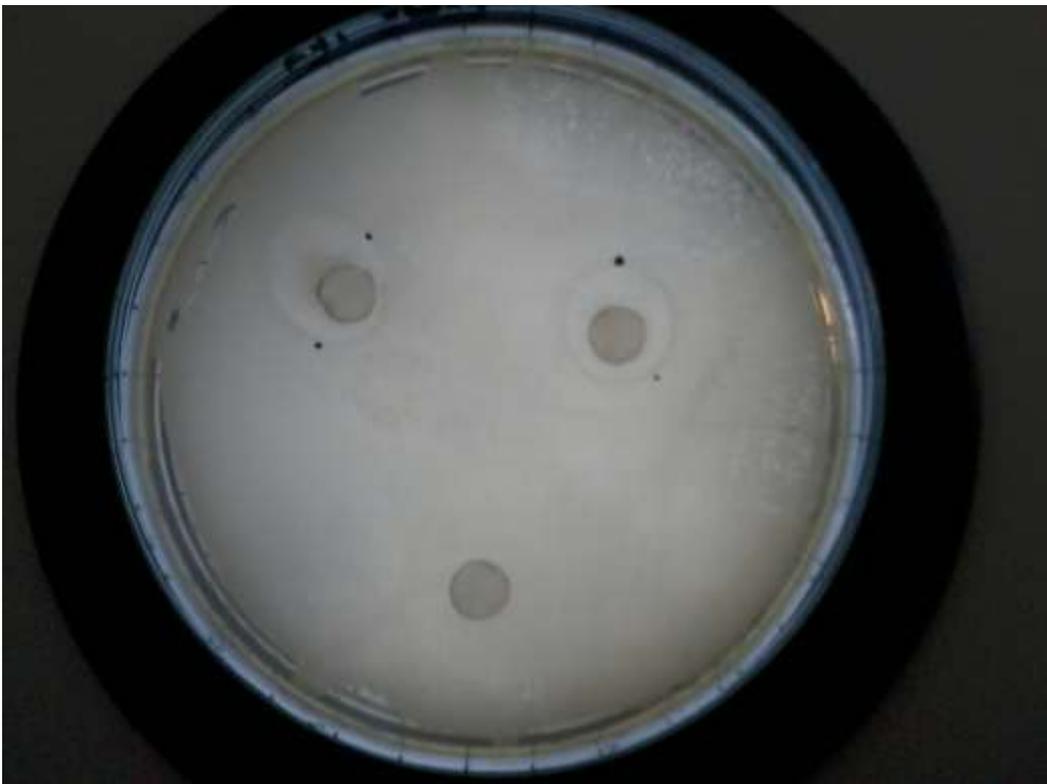
A atividade antimicrobiana foi avaliada imergindo discos de papel filtro, com 7 mm de diâmetro, nos extratos. Os discos foram posteriormente dispostos em placas de Petri esterilizadas e levados a estufa de circulação de ar, a temperatura de 35°C durante 24 horas para evaporação do solvente. Essa metodologia de análise encontra-se apresentada na norma de padronização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão (NCCLS, 2003).

Após o período de evaporação do solvente, placas com Ágar Müller Hinton foram inoculadas com 0,1 mL de caldo BHI, com turbidez de 56 NTU, contendo os micro-organismos padrões. Segundo a NCCLS (2003) o caldo com essa turbidez contém 1×10^6 unidades formadoras de colônia por mL(UFC/ml). Foi realizado também teste controle, onde foram colocados discos somente com os solventes, para garantir que os mesmos haviam sido evaporados.

As placas foram então incubadas em estufa microbiológica com temperatura de 35°C por 24 horas. Os halos produzidos pela inibição dos micro-organismos, como os observados na figura 13, foram medidos com auxílio de paquímetro digital.

As extrações foram realizadas em triplicata, para cada solvente. Para realização dos testes inibitórios nas placas de Petri, foram feitas tréplicas, totalizando assim 9 discos de cada solvente, para cada temperatura estudada.

Figura 13 – Halos de inibição



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos (LMTA) - UNIPAMPA

5.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através de Teste t com nível de significância de 5% em software *Statístico*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

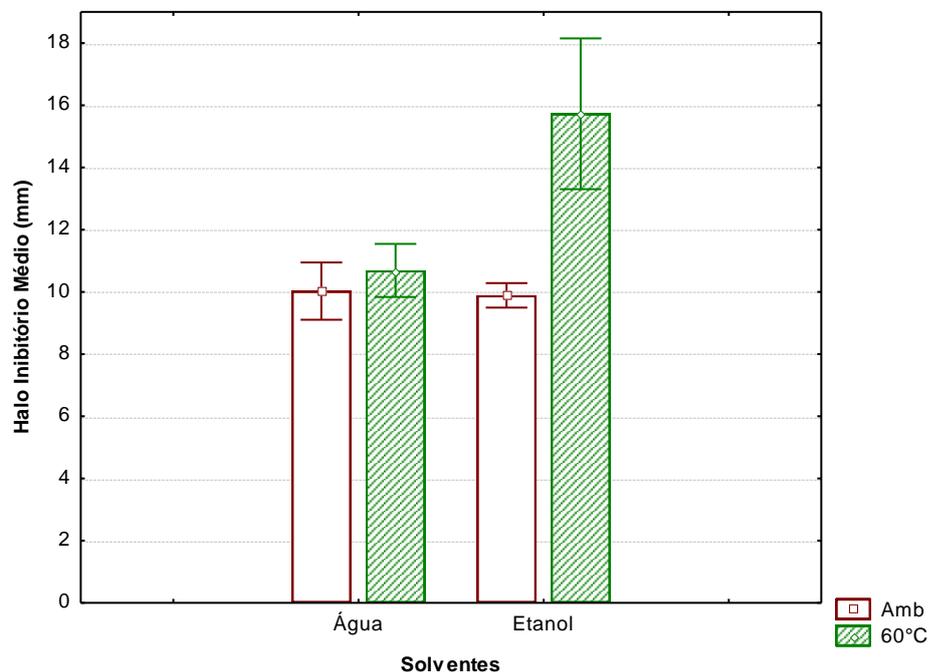
6.1 Fermentação em estado sólido

Foram testadas as variações de 10, 30 e 50% na quantidade de farelo adicionado ao meio, porém apenas a concentração de 30% apresentou desenvolvimento do micélio, sendo que as demais foram contaminadas com outros tipos de fungos. Sendo que a melhor adaptação foi da *Lentinula edodes*.

6.2 Capacidade inibitória sobre *Escherichia coli* dos extratos obtidos de *Lentinula edodes*

Os halos inibitórios médios, com os respectivos desvio-padrão, obtidos quando se testou o extrato de *Lentinula edodes* extraído utilizando-se os solventes água e etanol frente ao patógeno *Escherichia coli*, estão apresentados no Gráfico 1.

Gráfico 1- Teste de inibição de *Escherichia coli* por extrato de *Lentinula edodes*



Fonte: O autor (2013).

Nas extrações a temperatura ambiente os halos inibitórios médios para água e etanol foram $10,02 \pm 1,02$ mm e $9,88 \pm 0,43$ mm respectivamente. Para o acetato de etila não houve a presença de halos inibitórios. O teste t entre os halos inibitórios dos extratos obtidos a essa

temperatura, demonstrou que as médias de inibição dos dois solventes foram estatisticamente iguais.

Para extração em temperatura de 60°C os halos inibitórios médios foram 10,68±0,95 mm para água e 15,73±2,69 mm para etanol. Novamente não houve inibição para a extração utilizando acetato de etila como solvente. Para essa temperatura, as médias apresentaram diferença estatística, sendo assim o extrato obtido a essa temperatura possui maior capacidade inibitória quando se utiliza como solvente o etanol.

Souza (2009) testou a capacidade inibitória, através da técnica de micro-diluição, de caldos provenientes da fermentação submersa, durante 21 dias, de *Lentinula edodes* em meio de melão de cana suplementado, frente a diversos patógenos entre eles a *E.coli*. O teste de inibição também foi realizado após a concentração dos caldos. No estudo todos os caldos apresentaram efeito antimicrobiano contra *E. coli*, porém o caldo de *L. edodes* LPB 10 apresentou ação mais significativa, com aproximadamente 46% de inibição, antes de ser concentrado e após a concentração uma inibição praticamente completa.

Carvalho (2007) utilizando a técnica de difusão em ágar com Müller Hinton e acetato de etila como solvente, observou que os extratos de *Lentinula edodes* cultivados por 7 e 28 dias em Caldo Extrato de Malte Peptona, apresentaram capacidade antimicrobiana contra *Escherichia coli* com halos de inibição de aproximadamente 10 e 20 mm respectivamente.

Utilizando o cogumelo *Laetiporus sulphureus*, que assim como a *Lentinula edodes*, cresce em troncos de árvores Türkoglu et al. (2007), obtiveram halos de inibição para *Escherichia coli* de aproximadamente 10 mm, utilizando como solvente o álcool etílico, valores 66,6% superiores ao obtido com a extração em temperatura ambiente, porém quando a extração foi realizada com temperatura de 60°C os resultados do presente trabalho foram aproximadamente 57% superiores.

Hearst, et al. (2009), testaram a ação de extratos de *Lentinula edodes*, utilizando como solvente água em temperatura de 4°C, sobre diferentes micro-organismos entre eles 3 cepas de *Escherichia coli*. Os testes de inibição apresentaram halos de 9, 10 e 12 mm para as cepas *E. coli* NCTC 9001, *E. coli* 0157 NCTC 12900 e *E. coli* NCTC 25922 respectivamente, valores esses próximos ao encontrado para a extração a 60°C utilizando-se o mesmo solvente.

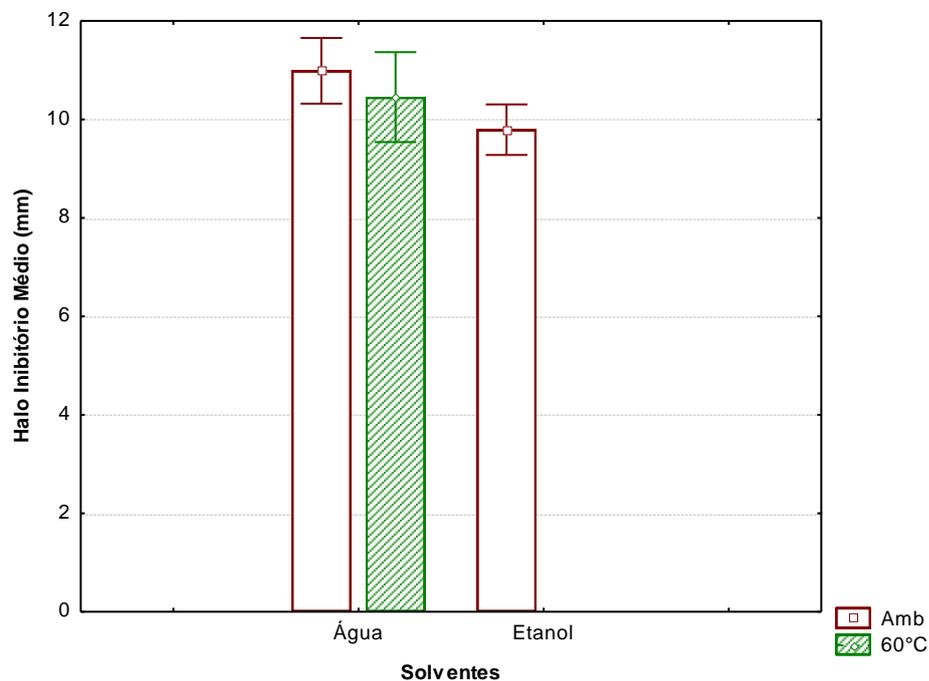
6.3 Capacidade inibitória sobre *Staphylococcus aureus* dos extratos obtidos de *Lentinula edodes*

O gráfico 2 apresentam os halos inibitórios médios, com os respectivos desvio-padrão, obtidos quando se testou o extrato de *Lentinula edodes*, utilizando-se os solventes água, etanol frente ao patógeno *Staphylococcus aureus*.

Nas extrações a temperatura ambiente os halos inibitórios médios para água e etanol foram $10,98 \pm 0,99$ mm e $9,79 \pm 0,70$ mm respectivamente. Para o acetato de etila não houve a presença de halos inibitórios. Para essa temperatura, as médias apresentaram diferença estatística, sendo assim o extrato obtido a essa temperatura possui maior capacidade inibitória quando se utiliza como solvente a água.

Para extração em temperatura de 60°C os halo inibitório médio foi $10,45 \pm 1,47$ mm para água . Não havendo inibição inibição para a extração utilizando etanol e acetato de etila como solventes.

Gráfico 2- Teste de inibição de *Staphylococcus aureus* por extrato de *Lentinula edodes*



Fonte: O autor (2013).

Todos os caldos provenientes de *Lentinula edodes* obtidos por Souza (2009), apresentaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, sendo que o caldo mais eficiente depois de 24 horas apresentou inibição de 88% do patógeno.

Schimidell et al. (2001) destacam como uma das desvantagens da fermentação em estado sólido a dificuldade para coletar amostras representativas durante a fermentação, devido a não homogeneidade do substrato, esse fator pode ser a justificativa para a ausência de halo inibitório para alguns extratos de *Lentinula edodes*, frente ao *Staphylococcus aureus* no presente trabalho, o que é o oposto do encontrado por Carvalho (2007) que utilizando a técnica de difusão em ágar com Müller Hinton e acetato de etila como solvente, observou que todos os extratos de *Lentinula edodes* testados em seu trabalho, apresentaram capacidade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* a partir do 14º dia de cultivo, sendo que o extrato obtido do cultivo da *Lentinula* em Caldo Extrato de Malte apresentou o maior halo de inibição, com diâmetro de 54 mm.

Turkoglu et al. (2007), obteve halos de inibição do *Staphylococcus aureus* de aproximadamente 9 mm, utilizando como solvente o álcool etílico, com a técnica de difusão em ágar com Ágar Nutriente, sendo que com a extração a quente realizada pelo presente trabalho, alcançou-se halos 75% maiores.

Os extratos testados por Hearst et al. (2009) demonstraram halos de inibição de 12 mm contra as cepas *S. aureus* (MSSA) 25923 e *S. aureus* (MRSA) 43300, utilizando-se como solvente a água.

Utilizando amostras de cogumelo *Morchella esculeta* (L.)Pers provenientes de dois países distintos (Portugal e Sérvia) e metanol como solvente a temperatura de 25°C, Heleno et al. (2013) obtiveram halos de inibição para *Staphylococcus aureus* de aproximadamente 7,22 mm (amostras de Portugal) e 7,34mm (amostras da Sérvia) no teste de difusão em disco com concentração de 2 mg/disco. Foi realizado também o teste de mínima concentração inibitória sendo necessários 0,30 mg/mL e 0,02 mg/mL dos extratos obtidos das amostras de Portugal e Sérvia respectivamente. Os halos encontrados utilizando-se tanto cogumelos como solventes diferentes ficaram dentro da faixa encontrada para a extração em temperatura ambiente.

6.4 Capacidade inibitória sobre *Escherichia coli* dos extratos obtidos de *Agaricus subrufescens*

Os extratos de *Agaricus subrufescens* obtidos com os três solventes em ambas temperaturas não apresentaram ação inibitória frente ao *Escherichia coli*.

Mazzutti et al. (2012) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos de *Agaricus subrufescens* obtido com diferentes solventes. Para a metodologia de Soxhlet a concentração

mínima inibitória para *Escherichia coli* utilizando como solvente água, etanol e acetato de etila foram superiores a 2000 µg/mL., sendo assim a falta de inibição, tanto na extração com temperatura ambiente quanto à 60°C, pode ter sido ocasionada pela baixa concentração do agente antimicrobiano.

Heleno et al. (2013) também realizaram o teste de inibição para *Escherichia coli*, aplicando a mesma metodologia já citada anteriormente, obtendo halos de inibição de aproximadamente 6,31 mm (amostras de Portugal) e 6,44 mm (amostras da Sérvia) no teste de difusão em disco com concentração de 2 mg/disco. No teste de mínima concentração inibitória foram necessárias concentrações superiores a 10 mg/mL para os extratos obtidos das amostras de Portugal e 0,60 mg/mL para extratos das amostras provenientes da Sérvia.

Extratos de *Agaricus bisporus* obtidos através de extração com metanol a 60°C por 4 horas, foram testados por Abah & Abah (2010) contra um grupo de micro-organismos que incluía a cepa *E. coli* ATCC 25922. Os testes de inibição foram realizados pelo método de difusão em ágar, com concentrações de extrato de 100, 200 e 300 mg/mL. Os halos obtidos foram aproximadamente 7,30 mm para 100 mg/mL, 8,33 mm para 200mg/mL e 8,67 mm para 300 mg/mL.

6.5 Capacidade inibitória sobre *Staphylococcus aureus* dos extratos obtidos de *Agaricus subrufescens*

Os extratos de *Agaricus subrufescens* obtidos com os três solventes em temperatura ambiente não apresentaram ação inibitória frente ao *Staphylococcus aureus*. Enquanto que entre os extratos obtidos à temperatura de 60°C, foi observado halo inibitório apenas no que utilizou como solvente o acetato de etila, obtendo um halo inibitório médio de 11,97±1,43 mm.

Mazzutti et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de *Agaricus subrufescens* obtido com diferentes solventes. Para a metodologia de Soxhlet a concentração mínima inibitória (CMI) para *Staphylococcus aureus* utilizando como solvente água e etanol foram superiores a 2000 µg/mL, enquanto que para acetato de etila a CMI foi de 250 µg/mL.

A ausência de capacidade inibitória da maioria dos extratos obtidos da amostra comercial de *Agaricus subrufescens*, sobre os dois micro-organismos padrões, pode ter sido ocasionada por dois fatores. O primeiro está no fato da amostra comercial ser em pó, o que

leva a crer que foi submetida a algum tipo de tratamento térmico, do qual não se tem nenhum conhecimento, o que poderia acarretar perda do composto com caráter antimicrobiano.

Outra opção, para essa ausência pode ser devido à baixa concentração do composto antimicrobiano nesses extratos, visto que extratos submetidos à concentração tem seu efeito antimicrobiano potencializado, provavelmente por aumentar a quantidade da substância inibidora no volume de amostra (SOUZA, 2009). Sendo assim, não se deve descartar totalmente a capacidade inibidora dos extratos que não apresentaram halos, visto que existe a possibilidade destes estarem muito diluídos.

Utilizando *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis* e *Agaricus essettei*, foram obtidos extratos com hexano a temperatura ambiente, que depois de evaporados foram submetidos a nova extração empregando acetato de etila e solução aquosa de metanol. Os extratos de *A. bitorquis* e *A. assettei* apresentaram halos de inibição de 12 e 11 mm respectivamente quando testados contra *S. aureus* ATCC 25923. Para *S. aureus* ATCC 12598 os halos de inibição foram de 7 mm para *A. bitorquis* e 9 mm para *A. essettei* (ÖZTÜRK et al., 2011). Deve-se então, levar em consideração o diferente grau de sensibilidade ao agente antimicrobiano de diferentes cepas do micro-organismo testado, sendo necessário um futuro estudo sobre a ação dos extratos obtidos sobre diferentes cepas de *S. aureus*.

SOUZA, (2009) realizou a separação dos compostos com ação antimicrobiana por sulfato de amônio, testando a capacidade de inibição do sobrenadante e do precipitado. Somente o precipitado apresentou atividade antimicrobiana o que representa um forte indício de que a substância inibidora possui caráter proteico.

Patrick & Ngai (2004), isolaram e purificaram uma ribonuclease de *Pleurotus sajor-caju*, testando sua atividade antimicrobiana por difusão em discos contra diversos micro-organismos entre eles *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria *Escherichia coli* não apresentou sensibilidade a substância purificada, enquanto o *Staphylococcus aureus* demonstrou sensibilidade para uma concentração de $34 \pm 4 \mu\text{M}$ (para $n=3$).

No quadro 5 está apresentado um resumo dos resultados descritos anteriormente.

Quadro 5 – Halos Inibitórios obtidos nas diferentes extrações.

Cogumelo	Temperatura de Extração	Micro-organismo	Água	Etanol	Acetato
<i>Lentinula edodes</i>	Ambiente	<i>Escherichia coli</i>	10,02±1,02mm	9,88±0,43mm	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	10,98±0,99mm	9,79±0,70mm	-
	60°C	<i>Escherichia coli</i>	10,68±0,95mm	15,73±2,69mm	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	10,45±1,47mm	-	-
<i>Agaricus subrufescens</i>	Ambiente	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
	60°C	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	11,97±1,43mm

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível comprovar a existência de compostos com ação antimicrobiana, tanto sobre bactérias Gram positivas como Gram negativas, extraídos de *Lentinula edodes*, cogumelo bastante utilizado na alimentação humana e *Agaricus subrufescens* cogumelo com características medicinais. O estudo do melhor solvente para a extração dos compostos apresentou, no geral, resultados satisfatórios tanto para água quanto para etanol.

Levando em consideração os fatores micro-organismo, e cogumelo pode-se perceber que, a inibição de *Escherichia coli* por extrato de *Lentinula edodes* obtido a temperatura ambiente não apresentou variação entre as médias dos solventes, permitindo que se opte por aquele que apresentar-se como maiores vantagens econômicas. Para extração em temperatura de 60°C, a comparação entre os solventes apresentou diferença estatística, sendo que o melhor solvente foi o etanol, com halo inibitório médio de $15,73 \pm 2,69$ mm.

Para o mesmo micro-organismo, porém com extratos de *Agaricus subrufescens* não houve ação inibitória de nenhum extrato, possivelmente ocasionado pela degradação do composto antimicrobiano durante o processamento desse cogumelo.

Para o Gram positivo *Staphylococcus aureus*, os extratos de *Lentinula edodes* extraídos em temperatura ambiente apresentaram resultados com diferença estatística para o uso de água ou etanol como solvente, sendo que a água apresentou melhor desempenho com halo inibitório médio de $10,98 \pm 0,99$ mm, permitindo assim a eliminação do risco de inibição pelo solvente ao invés do agente antimicrobiano, em caso de má evaporação, além de reduzir os custos da extração. Para a extração com temperatura de 60°C o extrato de *Lentinula edodes* obtido com água apresentou halo médio de inibição de $10,45 \pm 1,47$ mm..

Os extratos obtidos de *Agaricus subrufescens* com os três solventes, em temperatura ambiente não apresentaram efeito inibidor sobre *Staphylococcus aureus*, já para a extração realizada a 60°C o solvente acetato de etila apresentou halo inibitório médio de $11,97 \pm 1,43$ mm.

A observação da capacidade inibitória desses extratos vai ao encontro dos resultados de outros estudos já publicados, fortalecendo a necessidade de se continuar a pesquisar tanto a ação antimicrobiana quanto outras características funcionais, aplicáveis na indústria de alimentos, desses organismos, para que assim, seja possível no futuro tornar a aplicação desses agentes antimicrobianos de origem natural viável em escala industrial.

8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

-Estudo dos fatores interferentes na etapa de frutificação de cogumelos *Agaricus subrufescens* e *Lentinula edodes*.

-Estudo da eficiência do uso de dimetil sulfoxido, metanol e soluções tampão para a extração de agentes antimicrobianos proveniente de cogumelos na etapa micelial.

Interferência da aplicação de temperaturas mais baixas sobre a extração dos compostos antimicrobianos.

-Extração de compostos com ação antimicrobiana de cogumelos *Agaricus bisporus* e do gênero *Pleurotus*.

-Estudo da produção de cogumelos com cultivo *out door* por fermentação em estado sólido.

-Cultivo de cogumelos por fermentação em estado sólido utilizando como substrato palha de milho e sorgo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAH, S. E.; ABAH, B. Antimicrobial and antioxidant potentials of *Agaricus bisporus*. **Advances in Biological Research** 4(5): 277-282, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), **Portaria nº 540 – 27 de outubro de 1997**;

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; COSTA, E. L. G.; NASCIMENTO, J. S. Entomofauna associada ao cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer (Agaricales: agaricales) no município do Capão do Leão, RS, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n.3, p. 465-469, jul./set., 2010.

BETT, C. F.; PERONDI, M. A. Análise do mercado de cogumelos comestíveis e medicinais: uma prospecção de alternativa de renda para a agricultura familiar na região sudoeste do Paraná. **Synergismus scyentifica** UTFPR, Pato Branco, 06(1), 2011.

CARVALHO, M. P. de **Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauriderma sp* e *Pycnoporus sanguineus***. 2007. 102p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

CHANG, S. T.; GANTULGA, G. ADHIKARY, S. K. CHOE, K. J.; CHANG, P. **Training Manual on Mushroom Cultivation Technology**; United Nations – Economic and Social Commission for Asia and the Pacific – Asian and Pacific Centre for Agricultural Engineering and Machinery (APCAEM). Disponível em: http://www.unapcaem.org/publication/pub_TrMuCu.htm

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology** 71 (2001) 1-20

CONFORTIN, F. G. **Produção de biomassa fúngica da linhagem PS-2011 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa**. 2006. Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

DEMAJORIVIC, J., Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. **Revista de Adm. de Empresas**, 35 (3), p. 88-93, 1995.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 4, p.795-803, jul./ago.,2010

DIAS, E. S.; ABE, C. SCHWAN, R. F. Truths and Myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v. 65, n. 5, p.545-549, sept./oct. 2004.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p.185-193, 2006.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª edição revisada e ampliada. Caxias do Sul: Educs, 2010.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Editora Atheneu: São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2ª edição, p. 451-452, 2000.

FANTUZE, E. **Avaliação do efeito imunomodulatório do extrato aquoso de *Agaricus blazei* e sua relação com a translocação bacteriana em modelo animal**. 2007. 90p. Tese Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Viçosa, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT – Acessado em: 09/09/12

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murril: Review of Literature and Pharmaco – Toxicological Problems. **Advance Access Publication** 27 March 2007.

FURLANI, R. P. Z; GODOY, H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão**. **Rev. Inst. Adolfo. Lutz**, 64(2).149-154, 2005

FURLANI, R. P. Z; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**, 27(1): 154-157, jan-mar. 2007.

GYÖRFI, J.; GEÖSEL, A.; VETTER, J. Mineral Composition of Different Strains of Edible Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens* Peck. **Journal of Medicinal Food** 13 (6) 2010, 1510-1514.

GODOY, M. de F. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*,**

Colletotrichum sublineolum e *Tobacco misauec vírus*. 2008. 126p. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

HADAR, Y.; KEREM, Z.; GORODECKI, B. Biodegradation of lignocellulosic agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**, 30 (1993) 133-139.

HASSEGAWA, R. H.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. **Electronic Journal of Biotechnology** Vol. 8, n8, August 15, 2005.

HEARST, R.; NELSON, D.; McCOLLUM, G.; MILLAR, B. C.; MAEDA, Y.; GOLDSHIMIT, C. E.; ROONEY, P. J.; LOUGHREY, A.; RAO, J. R.; MOORE, J. E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice** 15 (2009) 5-7.

HELENO, S. A.; STOJKOVIC, D.; BARROS, L.; GLAMOCLJIA, J.; SOKOVIC, M.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. From Portugal and Serbia. **Food Research International** 51 (2013) 236-243.

INTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ – **Dados de área, produção e produtividade do arroz**. Disponível em:
http://www.irga.rs.gov.br/uploads/anexos/1329418135Area_Producao_e_Produtividade.pdf
 Acessado em 16/10/2012

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Artmed: Porto Alegre, 2005.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, 97 (1), 2005, pp. 12-24.

KITZBERGER, C. S. G. **Obtenção de extrato de cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a alta pressão**. Dissertação de Mestrado. 2005. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

LARGETEAU, M. L.; HERNÁNDEZ, R. C. L.; ROGER, C. R.; SAVOIE, J. M. The medicinal *Agaricus* mushroom cultivation in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (2011) 92: 897-907.

LEMOS, F. M. da R. **Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

LIMA, U. de A. (Coord.); **Biotecnologia industrial**; São Paulo: Blucher, P. 101-102, 2001.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. Prentice Hall, 2004.

MAIO, C. S, da S. **Influência da composição do substrato sobre o valor nutricional do cogumelo *Pleurotus ostreatus* e seu potencial na redução de hipercolesterolemia experimental**. 2003. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2003.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n.1, p.28-36, jan./mar., 2008.

MARSHALL, E.; NAIR, N. G. Diversification booklet number 7: Make money by growing mushrooms. **Rural Infrastructure and Agro-Industries Division Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 2009.

MATOS, A. T. **Tratamento de Resíduos Agroindustriais**. Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais – Fundação Estadual do Meio Ambiente. Maio-2005, 34p.

MAZZUTTI, S.; FERREIRA, S. R. S.; RUEHL, C. A. A.; JÚNIOR SMANIA, A.; SMANIA, F. A.; MARTÍNEZ, J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: antioxidante and antimicrobial activities. **Journal of Supercritical Fluids** 70 (2012) 48-56.

MONTEIRO, C. S. **Desenvolvimento de molho de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill formulado com cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 2008. 176p. Tese Pós-Graduação. Universidade Federal do Paraná. 2008.

MOREIRA, L. B.; Princípios para uso racional de antibióticos: simpósio de atualização em antibióticos. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, n 48, p 118-120, 2004. Disponível em: <http://www.amrigs.com.br/revista/48-02/s1.pdf> Acessado em 25/05/12

MOURÃO, F.; UMEO, S. H.; TAKEMURA, O. S.; LINDE, G. A. COLAUTO, N. B. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology** (2011) 42: 197-202.

NCCLS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada** – Oitava Edição, v. 23, n.1, 2003.

OLIVEIRA, E. C. M.; DE OLIVEIRA, E. R.; LIMA, L. C. de O.; VILLAS BOAS, E.V.de B. Composição centesimal do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*). **R. Uni. Alfenas**, Alfenas, 5:169-172, 1999.

OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Tibtech** august 2000 (vol. 18) p.356-360.

OYETAYO, V.O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild. **Brazilian Journal of Microbiology** (2009) 40: 380-386.

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAK, S.; MERCAN-DOGAN, N.; TÜRKÖGLÜ, A.; ÖZLER, M. A. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology** 49, (2001) 1353-1360.

PACCOLA, E. A. S.; BOMFETI, C. A.; FÁVARO, L. C. L.; FONSECA, I. C. B.; MEIRELLES, L. D. P. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. **Brazilian Journal of Microbiology** (2004) 35: 311-315.

PACCOLA, E. A. S.; MAKI, C. S.; DE NÓBREGA, G. M. A.; MEIRELLES, L. D. P. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *CANDIDA ALBICANS* growth. **Brazilian Journal of Microbiology** (2001) 32: 176-178.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 13 (2003) 81-84.

PANDEY A.; ASHAKUMARY, L.; SELVAKUMAR, P. Copra-caste – a novel substrate for solid-state fermentation. **Bioresour Technol** 51 (1995) 217-220.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L. Performance of a Column Bioreactor for Glucoamylase Synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. **Process Biochemistry** Vol. 31, N°1, p.43-46, 1996

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Determinação da concentração de β -GLUCANO em cogumelo *Agaricus blazei* Murril por método enzimático. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 23(3): 312-316, set-dez. 2003

PATRICK, H. K.; NGAI, T. B.. Ng. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferation activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides** 25 (2004) 11-17.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **J. Technol. Manag. Innov.** 2007, Volume 2, Issue 1, p.118-127.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. EMBRAPA – Comunicado técnico online 102. Agosto, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, E. S. **Biologia Vegetal**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996.

RAVEN, P.H.; JONHSON, G. B; et al. **Biology**. 9ed. New York: Mc Graw Hill. 2011.

RIBAS, L. C. C.; MENDONÇA, M. M.; CAMELINI, C. M.; SOARES, C. H. L. Use of spent mushroom substrate from *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediation. **Bioresource Technology** 100 (2009) 1750-4757.

ROSA, L. H. **DOSSIÊ TÉCNICO: Cultivo de cogumelos comestíveis**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) – Minas Gerais: Maio/2007.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O.; ANDRIOLI, J. L.; BARBOSA, J. C. Shiitake *Lentinula edodes* production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sucarcane molasses. **Brazilian Journal of Microbiology** (2003) 34:66-71.

SAMPAIO, S. M.; QUEIROZ, M. R. de. Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo Shiitake. **Eng. Agríc. Jaboticabal**, v.26, n.2, p.570-577, maio/ago. 2006.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001.

SHIBATA, C. K. R.; DEMIATE, I. M. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril). **Publ. UEPG CI. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, 9 (2): 21-32, jun. 2003.

SILVA, L. M. da C. **Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus* como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol.** 2009. 134p. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, M. M. **Cultivo de cogumelos comestíveis pela técnica de Jun-cao.** 2011. 41p. Monografia – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. **Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal.** **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.34, n.2, p. 137-144, 2008.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução da Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatol. Bras.** 32(3), p.189-196, maio-junho, 2007.

SOUZA, C. M. C. de O. **Produção de metabólitos com atividade antimicrobiana e antioxidante de *Lentinula edodes* em cultivo submerso.** 2009. 86p. Dissertação Mestrado – Universidade Federal do Paraná, 2009.

SOUZA, V. C. de; SILVA, R. A. da; CARDOSO, G.D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.3, p.612-618, 2006.

TEIXEIRA, E. M. & MACHADO, J. O. **O cultivo do cogumelo Shiitake em cepos.** p. 1-5, 2ª edição – Jaboticabal: Funep, 2004

TERÇARIOLI, G. R.; PALEARI, L. M.; BAGAGLI, E. **O incrível mundo dos fungos** – São Paulo: Ed. UNESP, 2010.

TURKOGLU, A.; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I. GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murril. **Food Chemistry** 101 (2007) 267-273.

TUTIDA, A. C. G. F.; ESTRADA, K. R. F. S.; STANCARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bispolaris sorokiniana* e *Puccinia recôndita* f. sp. *tritici*, *in vitro*. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.33, n.3, p. 113-118, 2007.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio da tecnologia chinesa modificada**. 2ª edição revista e ampliada. Cap. 1 e 4. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

VALENCE, F. P.; HERNANDEZ, C. L.; LARGETEAU, M.; SAVOIE, J. M.; RAUAUDEL, F.; ZIARELLI, F.; FERRÉ, E.; FARNET, A. M. Chemical Characterization of the Biomass of an Edible Medicinal Mushroom, *Agaricus subrufescens*, via Solid-State ¹³C NMR. **J. Agric. Food chem.** 2011, 59, 8939-8943.

VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã. **Revista Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. N.14, maio/junho 2000.

WISBECK, E.; ROBERT, A. P.; FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente**, v.3, n.2, dezembro 2002.

WISITRASSAMEEWONG, K.; KARUNARATHNA, S. C.; THONGKLANG, N. ZHAO, R.; CALLAC, P.; MOUKHA, S.; FERANDON, C.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Agaricus subrufescens*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2012) 19, 131-146.

ZDRADEK, C. P. **Otimização do crescimento dos fungos comestíveis *P. ostreatus* e *P. sajor caju* utilizando resíduos agroindustriais**. 2001. 139p. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2001.

ZIED, D. C.; GIMÉNEZ, A. P.; MINHONI, M. T. de A.; VILLAS BOAS, R. L.; ORTI, M. A.; GONZÁLEZ, J. E. P. Characterization, feasibility and optimization of *Agaricus subrufescens* growth based on chemical elements on casing layer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2012.

ZIED, D. C.; GIMÉNEZ, A. P.; SAVOIE, J. M.; GONZÁLEZ, J. E. P; CALLAC, P. “Indoor” method of composting and genetic breeding of the strains to improve yield and quality of the Almond mushroom *Agaricus subrufescens*. **Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Product 2011**.

