

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA,  
BIOQUÍMICA E PRODUTIVIDADE DE  
LINHAGENS DE *Agaricus brasiliensis*.**

**RÔMULO CÉSAR CLEMENTE TOLEDO**

**2008**

**RÔMULO CÉSAR CLEMENTE TOLEDO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, BIOQUÍMICA E  
PRODUTIVIDADE DE LINHAGENS DE *Agaricus brasiliensis*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de  
Doutor.

**Orientador**  
**Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Toledo, Rômulo César Clemente.

Caracterização física, química, bioquímica e produtividade de  
linhagens de *Agaricus brasiliensis* / Rômulo César Clemente Toledo.

– Lavras : UFLA, 2008.

59 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Eustáquio Souza Dias

Bibliografia.

1. *Agaricus brasiliensis*. 2. Análise centesimal. 3.  $\beta$ -glucano. 4.  
Enzimas celulolíticas. 5. Produtividade. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 635.8

**RÔMULO CÉSAR CLEMENTE TOLEDO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, BIOQUÍMICA E  
PRODUTIVIDADE DE LINHAGENS DE *Agaricus brasiliensis*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de  
Doutor.

Aprovada em 18 de dezembro de 2008

Prof. Dr Luiz Carlos de Oliveira Lima	UFLA
Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias	UNILAVRAS
Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Prof. Dr. Romildo da Silva	UFLA

**Prof. Eustáquio Souza Dias**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2008**

*A minha amada esposa, Luciana Dias Leal Toledo, pelo amor, carinho, apoio incondicional, amizade, companheirismo, incentivo, sinceridade, sem você nada seria possível meu amor,*

*ofereço*

*Aos meus pais, Reinaldo e Maria José, porque sempre se esforçaram ao máximo para que eu pudesse chegar até aqui, amo demais vocês; aos meus irmãos Reinaldo e Kelly, pelo apoio e incentivo; a minha avó "Petita", cumpri minha promessa vovó; ao meu avô José "Mestre" "in memoriam", saudades; aos meus sogros Antônio e Alzira pelo apoio, ajuda e compreensão em todos os momentos, sem vocês nós não conseguiríamos; à minha avó Conceição pelo carinho; aos meus amados irmãos em Cristo Eustáquio e Maria Aparecida, por terem me recebido com amor e carinho,*

*dedico*

*"Aquele que testifica estas coisas diz: Certamente cedo venho. Amém. Ora vem, Senhor Jesus".*

*Apocalipse 22:20*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu Salvador Jesus Cristo por Sua infinita misericórdia, amor e pelo cumprimento de Sua promessa. “Louvado seja o Seu Nome, Amém, Amém...”.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao meu orientador prof. Eustáquio, pelos ensinamentos, exortações e oportunidade e por ter acreditado em mim. Serei eternamente grato.

À minha esposa Luciana, pois sempre estive ao meu lado, sempre me apoiou e por ter aceitado lutar esta batalha comigo.

Aos professores Romildo, Rosane e Patrícia, por terem disponibilizado os laboratórios, e por me ensinarem a trilhar um novo caminho, como docente.

À estudante de iniciação científica Maiara por sua responsabilidade e por ter me ajudado neste trabalho. Aos estagiários Cíntia e Pedro, pela ajuda.

Ao Émerson e Leandro pela ajuda no laboratório e nos compostos. Ao Paulinho, pela ajuda nos trabalhos e paciência.

Aos grandes companheiros, Euziclei e Ivani, que em vários momentos desta caminhada me ajudaram.

Às queridas Zélia, Rafaela e Magda, pois sempre me trataram com carinho e sempre que precisei me ajudaram sem medir esforços.

Ao meu amigo Pr. Moacir Serafini por suas palavras de incentivo e pelo apoio em muitos momentos difíceis.

A todos que de alguma forma e em algum momento me ajudaram a alcançar este sonho, o meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Taxonomia .....	3
2.1.1 <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	3
2.2 Produtividade e mercado do cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	4
2.3 Características medicinais do <i>A. brasiliensis</i> .....	6
2.4 Determinação do teor de $\beta$ -glucano em cogumelos.....	9
2.5 Composição química.....	10
2.6 Enzimas Celulolíticas.....	12
2.6.1 Celulose, hemicelulose, e lignina.....	12
2.6.2 Lacase, Lignina-peroxidase e manganês-peroxidase.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Microrganismos.....	16
3.2 Composto de cultivo.....	17
3.3 Análises físicas e químicas.....	18
3.4 Procedimento para obtenção de $\beta$ -Glucano.....	19
3.4.1 Quantificação e cálculo do teor de $\beta$ -glucano pelo método enzimático.....	20
3.4.2 Quantificação e cálculo do teor de $\beta$ -glucano por HPLC.....	20
3.5 Determinação da atividade enzimática.....	22
3.5.1 Atividade de Lacase (benzenodiol: oxigênio oxireductase, EC 1.10.3.2).....	22
3.5.2 Atividade de manganês peroxidase (Manganês dependente de peroxidase EC 1.11.1.13).....	23
3.5.3 Atividade de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14).....	23
4.6 Avaliação do crescimento micelial das diferentes linhagens de <i>A. brasiliensis</i> .....	24
4.7 Avaliação da produtividade e medidas dos corpos de frutificação....	24
4.8 Análise estatística dos dados.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Características nutricionais de diferentes linhagens do cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	26

5.2 Determinação da concentração de $\beta$ -glucano de diferentes linhagens do cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i> em relação a outras espécies de cogumelos.....	35
5.3 Determinação da atividade de peroxidases de linhagens do cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i> em composto.....	38
5.4 Avaliação da produtividade de linhagens de <i>Agaricus brasiliensis</i> ...	42
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47



## RESUMO

TOLEDO, Rômulo César Clemente. **Caracterização física, química, bioquímica e produtividade de linhagens de *Agaricus brasiliensis***, 2008. 59 p Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* tem atraído a atenção da comunidade científica, principalmente devido às suas características medicinais. Além das propriedades medicinais, o conhecimento das características bioquímicas, como: constituição química nutricional, teor de  $\beta$ -glucano, produção de enzimas lignocelulolíticas, bem como a produtividade, são úteis na seleção de linhagens. Neste trabalho foram avaliadas as características químicas nutricionais de diferentes linhagens de *A. brasiliensis*, além do teor de  $\beta$ -glucano produzido por estas linhagens comparando-as com as produzidas por outras espécies de cogumelos. Foi também avaliada a concentração de enzimas lignocelulolíticas produzidas por este cogumelo em composto de cultivo em diferentes períodos. Linhagens caracterizadas anteriormente como geneticamente distintas foram avaliadas quanto à produtividade e características morfológicas dos cogumelos produzidos. Em relação à constituição química nutricional, foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens nas concentrações de proteína, glicose, açúcares totais, fibras totais, cinzas, umidade, fósforo, enxofre, cobre, cálcio, manganês e zinco. A linhagem CS5 foi a que apresentou as maiores concentrações de proteína, fósforo, enxofre, boro, ferro, e a segunda maior concentração de fibras totais e manganês. As linhagens de *Agaricus brasiliensis* mais produtivas foram CS10 e CS7 com 6,25 e 6,00 g.100g<sup>-1</sup> de matéria seca. Nos ensaios enzimáticos, verificou-se apenas atividade de lacase no composto colonizado por *A. brasiliensis*, confirmando dados anteriores de ensaios *in vitro*. A atividade de lacase variou de acordo com a linhagem, tempo e condição de cultivo, as linhagens CS5, CS7 e CS10 apresentaram as maiores atividades com 2,04, 2,59 e 1,55 U/g de composto com dois meses após a indução do composto.

---

\* Orientador: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

## ABSTRACT

TOLEDO, Rômulo César Clemente. **Physical, Chemical and biochemical characterization and productivity of strains of *Agaricus brasiliensis***, 2008. 59 p. Thesis (Doctor degree in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The scientific community has been paying special attention to the mushroom *Agaricus brasiliensis*, mainly due to its medicinal characteristics. Besides its medicinal properties, awareness of its biochemical characteristics, such as: nutritional chemical constitution, amount of  $\beta$ -glucan, production of lignocellulolytic enzymes, as well as its productivity are useful in strains selection. We have, through this work, evaluated the nutritional chemical characteristics of various strains of *A. brasiliensis*, and also the amount of  $\beta$ -glucan produced by such strains comparing them to the ones produced by other species of mushrooms. We have evaluated the concentration of lignocellulolytic enzymes produced by this mushroom in compost at different periods. We have evaluated strains which were previously characterized as genetically different considering the productivity and morphologic characteristics of the produced mushrooms. Regarding its nutritional chemical constitution, we have found significant differences between the concentrations - of protein, glucose, total sugars, total fibers, ashes, moist, phosphorus, sulfur, copper, calcium, manganese, and zinc – of the strains. Strain CS5 has shown the greatest concentration of protein, phosphorus, sulfur, boron, iron, and the second greatest concentration of total fibers and manganese. The most productive strains of *A. brasiliensis* were CS10 and CS7 with 6.25 and 6.00 g.100g<sup>-1</sup> of dry matter. In the enzymatic analysis we have only found laccase activity in the compost which was colonized by *A. brasiliensis*, confirming previous data of *in vitro* assay. Laccase activity has varied according to the strain, period of time and cultivation condition. CS5, CS7 and CS10 strains have shown the greatest laccase activities for 2.04, 2.59 and 1.55 U/g of compost after two months we had induced the compost.

---

\* Advisor: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

## 1 INTRODUÇÃO

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* encontrado no Brasil vêm sendo estudado por diversos grupos de pesquisa, tanto no Brasil quanto no exterior, devido às suas propriedades medicinais, principalmente no combate ao câncer, o que é atribuído ao teor de  $\beta$ -glucano nele encontrado. Por outro lado alguns grupos têm procurado estudar também as características genéticas, fisiológicas, químicas e produtivas deste cogumelo visando selecionar linhagens melhor adaptadas às diferentes condições de cultivo, bem como selecionar aquelas com características especiais de interesse, como elevado teor de  $\beta$ -glucano.

As características químicas nutricionais dos cogumelos têm demonstrado que estes representam uma fonte saudável de alimento, baixos valores de lipídeos e carboidratos, sendo uma fonte alternativa para alimentação de pessoas que necessitam fazer dietas ricas em proteínas e de baixo valor calórico. O *A. brasiliensis* é um cogumelo classificado como medicinal, mas que também apresenta um bom potencial como cogumelo comestível. Devido a isso a determinação de sua constituição química irá proporcionar, tanto à comunidade científica quanto ao consumidor, informações úteis relativas às suas características nutricionais.

O  $\beta$ -glucano tem sido relacionado às propriedades medicinais do *A. brasiliensis*. Embora possa ser encontrado em outras espécies, o grande número de estudos têm apontado este cogumelo como tendo um grande potencial no combate a diversas doenças, principalmente ao câncer, sendo seu principal atrativo. A determinação do teor de  $\beta$ -glucano possibilita selecionar linhagens cuja concentração deste polissacarídeo seja mais elevada.

O cultivo de *A. brasiliensis* é realizado em resíduos agrícolas ricos em material lignocelulolíticos, onde ele promove a degradação deste material, principalmente da lignina pré-degradada durante as fases de compostagem. No

processo de crescimento, este fungo libera enzimas que atuam sobre a matéria orgânica, liberando moléculas menores que serão posteriormente absorvidas pelo cogumelo. O estudo dessas enzimas é importante porque a produtividade pode estar associada à atividade enzimática e, por isso, pode ser utilizado como uma ferramenta para a seleção de linhagens em um programa de melhoramento genético.

A avaliação de diferentes características do cogumelo *A. brasiliensis* é útil na seleção de linhagens com características de interesse; contudo é necessário que estas características estejam ligadas também a linhagens que apresentem alta produtividade. Portanto, novas linhagens poderiam ser obtidas via cruzamentos de forma a combinar características desejáveis observadas em diferentes linhagens.

Este trabalho teve como objetivos avaliar as características químicas nutricionais, analisar o teor de  $\beta$ -glucano do *A. brasiliensis* em relação a outras espécies de cogumelos e determinar a concentração de enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo durante seu crescimento em composto, além de avaliar a produtividade de diferentes linhagens deste cogumelo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

### 2.1 Taxonomia

#### 2.1 *Agaricus brasiliensis*

O *Agaricus brasiliensis* é um fungo filamentosos pertencente à família Agaricaceae, divisão Basidiomycota, reino Fungi. Sua descoberta no Brasil ocorreu na década de 1960, quando o agricultor japonês Takatoshi Furumoto descobriu em sua propriedade, na região de Piedade, SP, um cogumelo diferente que chamou sua atenção. Não tendo conseguido identificá-lo, enviou amostras do cogumelo para o Japão, para serem analisadas pelo Instituto de Cogumelos Iwade, o qual encaminhou essa mesma amostra para o Dr. Paul Heinemann, especialista em taxonomia de cogumelos na Bélgica, que identificou o fungo como *Agaricus blazei* Murrill. Esta espécie já tinha sido descrita na Flórida como sendo uma espécie de ocorrência natural na América do Norte. Ao mesmo tempo em que mandava a amostra para o Japão, o Sr. Furumoto enviou uma amostra para o Instituto Botânico de São Paulo que, imediatamente, enviou-a para o Instituto Real de Botânica, na Inglaterra, aos cuidados do Dr. Pegler, que identificou o cogumelo como sendo muito parecido com a espécie *Agaricus silvaticus*, um fungo humícola florestal, de distribuição cosmopolita. Considerando que Pegler não fez uma identificação precisa mas apenas relatou a semelhança com o *Agaricus silvaticus*, seria um erro taxonômico grosseiro utilizar esta nomenclatura para o cogumelo descoberto por Furumoto. Por isso, a partir de então passou-se a considerar aquele cogumelo como sendo a espécie *Agaricus blazei* descrita por Murrill (Amazonas, 2004).

Wasser et al. (2002) em estudos morfológicos comparativos como: tamanho e coloração de esporos, coloração e tamanho dos corpos de frutificação, demonstraram que a espécie norte-americana *A. blazei* ss. Murrill e a brasileira amplamente cultivada *A. blazei* ss. Heinemann, são na verdade, duas espécies

diferentes, sendo proposta uma re-classificação da espécie. *Agaricus blazei* ss. Heinemann foi, então, nomeada como uma nova espécie, denominada *Agaricus brasiliensis*. Entretanto, Kerrigan (2005), em estudos baseados no sequenciamento da região ITS do rDNA e em análises genéticas de progênies híbridas, verificou que todas as definições que foram atribuídas a esse cogumelo até o momento (*A. blazei* e *A. brasilienses*) são, na verdade, sinônimas de uma espécie, *Agaricus subrufescens*, identificada em 1893 por Charles Horton Peck.

Entretanto, a polêmica não se encerrou em função de pontos de vista diferentes quanto aos critérios taxonômicos defendidos por Kerrigan (2007) e Wasser (2007). Considerando que a denominação *A. brasiliensis* atualmente tem sido a mais aceita, principalmente pela comunidade científica brasileira (Dias et al., 2008; Fan et al., 2007; Neves et al., 2005), esta será utilizada neste trabalho.

## **2.2 Produtividade e mercado do cogumelo *Agaricus brasiliensis***

O cultivo de *A. brasiliensis* têm sido feito utilizando o processo de compostagem tradicional desenvolvido para *A. bisporus*, contudo por ser uma espécie diferente, com necessidades nutricionais diferentes sua produtividade tem sido baixa em tais condições de cultivo. Diferentes fatores têm sido apontados para uma menor produtividade de diferentes espécies de cogumelos comestíveis, sendo as mais comuns: formulação e processo de produção do substrato de cultivo, linhagem e qualidade do inoculante, além da camada de cobertura (Noble & Gaze, 1996; Curvetto et al., 2002; Harada et al., 2004; Neves et al., 2005; Andrade et al., 2007 e 2008; Cavalcante et al., 2008; Mamiro & Royse, 2008).

Segundo Urben (2004), o mercado de *Agaricus brasiliensis* se destina principalmente à exportação para o Japão e Estados Unidos. Embora o mercado interno ainda não tenha a expressão econômica desejável, o consumo no

mercado nacional vem crescendo a cada ano, apesar dos altos preços que vêm sendo praticados.

Segundo o setor de promoção comercial da Embaixada do Brasil em Tóquio([http://www.mackenzie.br/fileadmin/Graduacao/CCSA/Publicacoes/Jovens\\_Pesquisadores/06/4.6.04.pdf](http://www.mackenzie.br/fileadmin/Graduacao/CCSA/Publicacoes/Jovens_Pesquisadores/06/4.6.04.pdf) - atualizado em janeiro/2006), o mercado de *A. brasiliensis* teve seu pico de consumo no período de 1998 a 2000. A dimensão do mercado japonês de produtos derivados de *A. brasiliensis* é de 35 bilhões de ienes (US\$ 318 milhões), sendo que o *A. brasiliensis* desidratado representa cerca de 15 bilhões de ienes (US\$136 milhões). Em 2005, o volume de importação do cogumelo era estimado em 250 toneladas, 150 das quais da China, que é responsável por 45% do volume total, seguida do Brasil com 60 toneladas (35% do volume total). O cogumelo *A. brasiliensis* importado ocupa parcela cada vez maior no mercado japonês. Os preços médios de importação dos cogumelos provenientes da China alcançam 3.000 a 6.000 ienes/Kg (US\$30 a US\$50/Kg); e os originados do Brasil, 7.700 a 12.100 ienes/Kg (US\$70 a US\$110/Kg).

Os produtos *A. brasiliensis* são comercializados como extrato, tabletes, em pó, e em formas de chás no mercado japonês. Os preços diferenciados praticados entre os produtos originários do Brasil e da China devem-se à preferência dos japoneses pelos produtos orgânicos (provenientes do Brasil).

Segundo dados da embaixada do Brasil no Japão, atualmente o mercado se encontra reduzido a metade do seu auge, devido a problemas decorrentes da violação da Lei para assuntos farmacêuticos por algumas marcas, e da decisão de suspensão de venda, em fevereiro de 2006, pelo Ministério da Saúde, do Trabalho e do Bem-Estar (MHLW) dos produtos da empresa, “Kirin Well-Foods Co., Ltda”, de origem chinesa. Esta medida foi tomada com base na suspeita de que um dos produtos à base *A. brasiliensis* teriam propriedades capazes de causar estímulos ao surgimento de câncer. Posteriormente, foram anunciados os

resultados de testes realizados com ratos, indicando que um dos produtos, a base de *A. brasiliensis* examinados (da empresa Kirin Well-Foods), mostrava efeitos estimuladores das propriedades cancerígenas, contudo isso não foi observado em outros produtos.

Desta forma, com os problemas no mercado japonês, e queda nas importações, também houve queda nos preços, o que tornou o mercado ainda mais restritivo, levando a uma maior necessidade de aumento de produtividade e redução de custos. Antes da suspeita do produto chinês, os produtores brasileiros já enfrentavam sérios problemas de competição, porque o produto da China é mais barato e agora, além da competição com os produtos chineses, há o problema da redução do mercado japonês. Diante dessa nova realidade, a busca de novos mercados e a exploração do grande potencial do mercado interno serão essenciais para a sobrevivência dessa atividade no Brasil e, para isso, o aumento da produtividade de modo a tornar os preços mais competitivos e acessíveis será uma estratégia essencial na busca de novos rumos para o cultivo desse cogumelo no Brasil.

### **2.3 Características medicinais do *A. brasiliensis***

O grande interesse pelo cogumelo *A. brasiliensis*, evidenciado pelo grande número de trabalhos publicados, foi desencadeado pela descoberta das suas propriedades medicinais, principalmente a atividade anti-tumoral (Firenzuoli et al., 2007). Trabalhos de fracionamento e análise da atividade antitumoral revelaram que polissacarídeos de ligação  $\beta$ -(1-6), denominados  $\beta$ -D-Glucanos, complexados com proteína, correspondiam à fração com maior atividade antitumoral (Kawagishi et al., 1989).

Dong et al. (2002) e Mizuno et al. (1990), fizeram a caracterização estrutural do  $\beta$ -D-Glucano extraído dos corpos de frutificação e encontraram que as cadeias ramificadas (1 $\rightarrow$ 6)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucano e (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -glucano,



apresentam atividade imunomodulatória, sendo reconhecidos como sendo o seu princípio ativo.

A estrutura química das ligações de  $\beta$ -glucanos encontradas em *A. brasiliensis* estão representadas na figura 1.

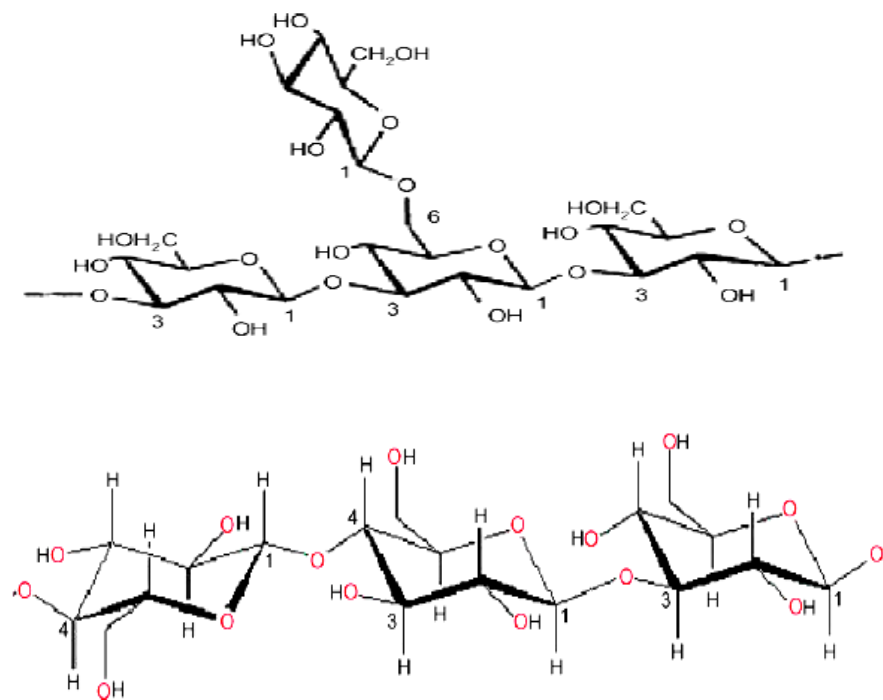


FIGURA 1 Estrutura de  $\beta$ -glucano (1 $\rightarrow$ 3) com ramificação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e com ramificações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Mantovani 2008).

O efeito no sistema imunológico de extratos aquosos de *A. blazei* foi investigado por Cooper et al. (2004), sendo relatada uma ação imune contra tumores e agentes citotóxicos em estudos *in vivo*.

Kobayashi et al. (2005) demonstraram o efeito supressivo de extratos de *A. blazei* na disseminação espontânea e peritoneal de metástase em ratos. O extrato do cogumelo também foi utilizado por Yoshimura et al. (2005), como complemento e medicamento alternativo em pacientes com câncer urológico, tendo obtido bons resultados. Kim et al. (2005), identificaram atividade anti-diabética de uma porção de oligossacarídeos de *A. blazei* hidrolisados enzimaticamente, também a partir de extratos do cogumelo.

Cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam, além das características nutricionais, propriedades medicinais, considerados como potenciais fontes para a extração de metabólitos para a indústria farmacêutica, além de poderem ser utilizados como produtos nutracêuticos (Pramanik, et al., 2007; Dias, 2003). O cogumelo *P. ostreatus* demonstrou possuir atividade contra células tumorais *in vitro*, com componentes que atuam na inativação de proteínas das células tumorais, além de apresentarem efeito preventivo (Gerasimenya, 2002; Wang & Gao 2000; Zusman et al., 1997). Sarangi et al., (2006) testaram extratos alcoólicos de *P. ostreatus in vivo* e *in vitro* em células de tecido e em ratos expostos ao Sarcoma 180, tendo observado uma redução do número de células tumorais, comprovando seu efeito imunomodulatório e anti-cancerígeno.

Jayakumar et al., (2006) verificaram que extratos alcoólicos de *P. ostreatus* apresentaram efeito antioxidante em tecidos de ratos Wistar submetidos à ação de tetracloreto de carbono CCl<sub>4</sub>.

Jose et al. (2002) demonstraram que extratos alcoólicos de *P. pulmonarius* apresentaram efeito antiinflamatório, em ratos, equivalente ao apresentado pelo diclofenaco. Carbonero et al. (2006) isolaram e caracterizaram molecularmente  $\beta$ -glucanos de extratos aquosos de *P. ostreatus* e *P. eryngii*, que apresentam potencial atividade anti-cancerígena e antiinflamatória. Kim et al. (2006) demonstraram em experimentos com ratos, que extratos de *P. eryngii* aumentaram a atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos e da expressão do

mRNA da osteocalcina de osteoblastos primários, promovendo uma redução na perda de minerais na estrutura óssea. Pramanik et al. (2007) isolaram e determinaram a estrutura química dos  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanos do cogumelo *P. saju-caju* que apresentam efeito imunomodulatório e anticancerígeno.

Segundo Gu & Belury (2005) extratos alcoólicos de *Lentinula edodes* têm demonstrado efeito inibidor no crescimento e proliferação de células de carcinoma (CH72) em ratos. Adams et al. (2008) testaram extratos de *Agaricus bisporus* em ratos e verificaram que eles promoveram a regressão dos tumores anteriormente induzidos assim como das células tumorais DU145 e PC3.

#### **2.4 Determinação do teor de $\beta$ -glucano em cogumelos**

A obtenção de  $\beta$ -glucano pode ser feita utilizando métodos químicos, enzimáticos, ou a combinação de ambos. Métodos químicos para a obtenção das fibras insolúveis são muito severos, podendo causar sérios danos à estrutura original dos polímeros, assim como impedir uma perfeita separação das fibras de outras estruturas constituintes da parede celular, o que não acontece quando a amostra é tratada com enzimas (Dallies et al., 1998).

Prosk et al. (1988) desenvolveram uma metodologia para extração enzimática de fibras insolúveis em alimentos. As amostras são submetidas a uma seqüência de digestões enzimáticas e as fibras insolúveis são posteriormente precipitadas em etanol.

A concentração de fibras totais solúveis em álcalis em cogumelos do gênero *Pleurotus* pode variar de 126 a 293g/kg de cogumelo, sendo que estas fibras são constituídas basicamente de  $\beta$ -glucano (Cheung & Lee, 2000).

McClear & Glennie-Holmes (1985) utilizaram um método cromatográfico, utilizando o complexo enzimático oxidase/peroxidase para determinar  $\beta$ -glucano de cevada e malte. Esta é uma técnica simples e de fácil aplicação.

Dallies et al. (1998) extraíram e determinaram a concentração de  $\beta$ -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* através de uma combinação de métodos químicos e enzimáticos. As células foram hidrolisadas com ácido sulfúrico e o teor de  $\beta$ -glucano presente, na forma de glicose, foi determinado através do complexo enzimático oxidase/peroxidase. Park et al. (2003) utilizando método similar determinaram a concentração de  $\beta$ -glucano em *Agaricus blazei* Murrill encontrando elevados níveis deste polissacarídeo.

Liu et al. (2008) desenvolveram um método utilizando etapas suaves de extração de  $\beta$ -glucano em *Saccharomyces cerevisiae*, tendo sido a extração feita através de água quente, homogenização, solventes orgânicos (acetona) e proteases.

Rhee et al. (2008) comparam dois métodos de extração: enzimático e alcalino, na determinação do teor de  $\beta$ -glucano no cogumelo *Inonotus obliquus*, não encontrado diferença significativa entre os teores de  $\beta$ -glucano encontrados pelos dois métodos.

Manzi & Pizzoferrato (2000) determinaram o teor de  $\beta$ -glucano em cogumelos utilizando um método enzimático de detecção, sem a digestão ácida das fibras. Encontraram baixos teores de  $\beta$ -glucano em *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*. Estes baixos níveis encontrados se devem ao fato de as enzimas utilizadas não terem tido acesso ao substrato.

## **2.5 Composição química**

O cultivo e consumo de cogumelos têm se expandido por todo o mundo, sendo que *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* são as espécies mais cultivadas no mundo (Ragunathan & Swaminathan, 2003). Os cogumelos constituem parte importante em várias dietas, principalmente por suas características nutricionais e organolépticas; são mais ricos em proteína quando comparados a alimentos vegetais, com composição de aminoácidos

comparada a proteínas animais, porém, considerados mais saudáveis do que a carne animal (Barros et al., 2007; 2008). São também ricos em carboidratos, minerais (cálcio, fósforo, ferro), vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina), além de possuir baixa quantidade de lipídeos (Bonatti, et al., 2004; Mattila et al. 2001; Demirbas, 2001).

A qualidade nutricional dos cogumelos pode variar em função da espécie (Furlani & Godoi, 2007), dos substratos de cultivo e condições ambientais (Fan et al., 2007; Silva et al., 2007; Liu et al., 2005; Bonatti et al., 2004; Ragunathan & Swaminathan, 2003) e ainda em função de linhagens diferentes de uma mesma espécie (Toro et al., 2006).

Yang et al., (2001) observaram variações nutricionais entre diferentes espécies de cogumelos, sendo que os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

TABELA 1 Constituição química nutricional de diferentes espécies de cogumelos (Yang et al., 2001).

<b>ESPÉCIES DE COGUMELOS</b>			
	<i>Flamulina velutipes</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<b>UMIDADE</b>	<b>89,06</b>	<b>81,79</b>	<b>88,60</b>
<b>MATÉRIA SECA</b>	<b>10,94</b>	<b>18,21</b>	<b>11,40</b>
<b>CINZAS</b>	<b>6,93</b>	<b>5,27</b>	<b>7,59</b>
<b>CARBOIDRATOS</b>	<b>48,20</b>	<b>62,30</b>	<b>61,10</b>
<b>LIPÍDIOS</b>	<b>8,89</b>	<b>6,34</b>	<b>2,16</b>
<b>FIBRAS</b>	<b>15,99</b>	<b>5,63</b>	<b>5,33</b>
<b>PROTEÍNAS</b>	<b>20,00</b>	<b>20,50</b>	<b>23,90</b>

Na determinação da análise centesimal de cogumelos um cuidado especial deve ser tomado no momento de determinar o teor de proteínas, visto que o fator de correção de nitrogênio deve ser de 4,38 (Tsai et al., 2008; Silva et al., 2007; Crisan & Sands, 1978), e não 6,25 que é adotado comumente para outros alimentos.

A pectina é um importante componente da parede celular dos vegetais, sendo uma fibra dietética que pode ser encontradas na forma de protopectina, insolúvel em água, ou na forma solúvel (Fietz & Salgado, 1999). Por isso, a análise de pectina é geralmente feita em alimentos, contudo não existem relatos na literatura sobre sua presença em fungos, sendo que estes possuem parede celular geralmente constituída por quitina, proteína, lipídios e glucanas, podendo ser encontrados também em algumas espécies polímeros de galactosamina, ácido glucurônico e melanina derivada de compostos aromáticos (Carlile, 1994).

O cogumelo *A. brasiliensis* é conhecido também por apresentar propriedades antioxidantes (Huang & Mau, 2006); esta característica em cogumelos vem sendo relacionada à presença de compostos fenólicos (Barros et al., 2008; Elmastas et al., 2007).

Barros et al. (2007) e Cheung et al. (2003) encontraram concentrações de compostos fenólicos em cogumelos *Agaricus arvensis* (2,83%), *Lentinula edodes* (4,79%), *Volvariella volvacea* (15,0%), *Leucopaxillus giganteus* (6,29%) e *Sarcodon imbricatus* (3,76%).

## **2.6 Enzimas Celulolíticas**

### **2.6.1 Celulose, hemicelulose, e lignina**

Segundo Rajarathan & Bano (1989) a celulose é um polímero formado por unidades de anidro-glicose através de ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-4), sendo a substância orgânica mais abundante da terra.

A degradação da celulose até glicose é realizada por três etapas de quebra enzimática, feita pelas enzimas endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase e 1,4- $\beta$ -glucanase. Estas enzimas tendem a aumentar a atividade na presença de cádmio (Baldrian 2003).

As hemiceluloses podem constituir 20% da matéria lignocelulósica. São facilmente hidrolisadas e são constituídas de pentoses e hexoses. As pentoses mais comuns em sua constituição são xilose e arabinose e as hexoses mais comuns são glicose, manose e galactose (Rajarithan & Bano 1989).

A lignina é um polímero amorfo complexo composto de unidades fenil propano unidas por diferentes tipos de ligações (Fengel e Wegener, 1984). Ela é obtida de todos os tipos de madeira (Corradini et al., 1999; Rohella et al., 1996), constituindo o segundo mais abundante grupo de biopolímeros da biosfera (Eggert et al., 1996). Dentre as enzimas que degradam a lignina estão as peroxidases, como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (Duran & Espósito, 2000).

Fungos decompositores primários, de podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* e *Phlebia radiata* são considerados grandes produtores de lacase (Leonowicz et al., 1999). A capacidade de degradação da lignina pelos decompositores primários está relacionada à secreção de peróxido de hidrogênio e enzimas peroxidases e fenoloxidasas (Kirk, 1985).

### **2.6.2 Lacase, Lignina-peroxidase e manganês-peroxidase**

As lacases são cuproproteínas, que fazem parte de um pequeno grupo de enzimas denominadas oxidases azuis (Messerschmidt, 1993; Duran et al., 2002). Essas enzimas catalisam a oxidação de uma série de compostos aromáticos e substâncias inorgânicas por extração de um elétron de substrato fenólico, gerando radicais fenoxilos (Mayer & Staples, 2002; Duran & Espósito,

2000; Xu, 1996). Em fungos, as lacases podem ser intra e extracelulares (Duran et al., 2002), estando associadas a algumas funções como: a formação de pigmento; degradação da lignina; detoxicação (Solomon et al., 1996).

A produção de lacase em meio sólido, geralmente resíduos agrícolas e materiais ricos em lignina, como farelo de trigo e algodão, tem sido obtida por cogumelos como *Pleurotus pulmonaris*, *P. saju-caju* e *Lentinula tigrinus* (Lechner & Papinutti, 2006; Souza et al., 2002; Tan & Wahab, 1997).

A produção de lacase pode variar de acordo com a linhagem, este fato foi comprovado por Savoie et al. (1996), que ao avaliar seis isolados de *Agaricus bisporus* cultivados em composto tradicional, encontraram diferentes teores de lacase e manganês peroxidase.

Ullrich et al. (2005) conseguiu extrair grandes quantidades de lacase, 5000U/L, de *Agaricus blazei*, em meio líquido a base de suco de tomate, sendo expressa como uma proteína de massa molecular de 66 kDa e ponto isoelétrico 4.0.

Lignina peroxidases são heme-proteínas que contém o grupo heme (ferro protoporfirina IX) em sua estrutura, catalisando a oxidação de compostos fenólicos, grupos não fenólicos e similares, promovendo a transformação dos fragmentos de lignina, inicialmente liberados pela ação da manganês peroxidase (Wesemberg et al., 2003; Duran & Espósito, 2000). Essas enzimas foram isoladas de muitos fungos que promovem a degradação branca (podridão branca ou clara) e alguns de degradação parda (podridão parda) (Duran et al., 1998).

Segundo Hofrichter (1999) a manganês peroxidase é uma enzima do grupo das peroxidases muito parecida com a lignina peroxidase, pois também é extracelular, glicosilada e possui um grupo heme, mas difere de outras peroxidases, devido ao fato de depender tanto do peróxido de hidrogênio quanto do  $Mn^{2+}$  como cofator (doador de elétrons), que está geralmente presente nos materiais lignocelulolíticos. Baldrian & Gabriel (2003) verificaram que o



cádmio afeta negativamente a atividade da manganês peroxidase produzida pelo cogumelo *Pleurotus ostreatus*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos

Foram utilizadas cinco linhagens de *Agaricus brasiliensis* (CS1, CS5, CS7, CS9, CS10) pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, obtidas de diferentes localidade, Tabela 2, as quais foram caracterizadas como linhagens geneticamente distintas (Tomizawa et al., 2007).

As linhagens foram cultivadas e mantidas em placas com meio BDA. O inoculante foi produzido em substrato à base de arroz com casca, suplementado com 10% de farelo de trigo, 2% de gesso e 2% de calcário. O arroz foi cozido previamente por 30 minutos, escorrido e deixado à parte. O farelo de trigo foi misturado ao calcário e gesso, umedecido para 65% e autoclavado por 30 minutos a 121° C. O arroz pre-cozido foi então misturado ao farelo pre-autoclavado e a mistura resultante foi acondicionada em frascos (200g/frasco) e autoclavada duas vezes a 121° C por 1 hora, com intervalo de 24 horas entre as autoclavagens. Após o resfriamento a temperatura ambiente, os frascos foram inoculados com fragmentos de BDA colonizado com as diferentes linhagens do cogumelo. Os frascos inoculados foram incubados em sala com temperatura ambiente até que os frascos estivessem completamente colonizados.

TABELA 2 Relação das linhagens de *Agaricus brasiliensis* utilizadas no estudo e sua procedência.

<b>LINHAGENS</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
<b>CS1</b>	<b>Vitória, ES (Produtor)</b>
<b>CS5</b>	<b>Araçatuba, SP (Produtor)</b>
<b>CS7</b>	<b>Porto Alegre, RS</b>
<b>CS9</b>	<b>Eloi Mendes, Produtor</b>
<b>CS10</b>	<b>Belo Horizonte, MG</b>

Na determinação de  $\beta$ -glucano também foram analisados os cogumelos *Pleurotus ostratus* (PO), *P. eryngii* (PE), *P. saju-caju* (PC), *Lentinula edodes* (LE) e *A. bisporus* (AB). Todos os isolados são pertencentes à coleção do Laboratório de Cogumelos comestíveis da Universidade Federal de Lavras, com exceção do *L. edodes* que foi obtido no mercado local.

Os cogumelos foram cultivados em vasos separados de tal forma que de cada espécie e/ou linhagem fossem obtidas quatro repetições. Os corpos de frutificação foram colhidos e secados por 24 horas aproximadamente a 60°C e posteriormente triturados em moinho Wiley e homogeneizados.

### **3.2 Composto de cultivo**

Os cogumelos foram cultivados em composto à base de capim Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) - 45%, bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) - 45% e farelo de trigo - 10%, suplementado com superfosfato simples - 1%, calcário - 2%, gesso agrícola - 2% e uréia - 2%. A porcentagem dos suplementos foi definida em função do total do substrato base. O composto foi preparado de acordo com tecnologia convencional descrita para

este cogumelo, assim como as etapas de indução da frutificação, cultivo e colheita (Eira, 2003).

### **3.3 Análises físicas e químicas**

As amostras provenientes das diferentes linhagens de cogumelo foram desidratadas a 60°C por 48 horas, trituradas em moinho Wiley e homogeneizadas, sendo devidamente acondicionadas em frascos de vidro, fechados e armazenados, sob refrigeração, a aproximadamente 5 °C. As análises químicas nutricionais foram feitas em quatro repetições para cada tratamento.

Os seguintes procedimentos foram feitos para a análise dos basidiocarpos, seguindo a metodologia adotada pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985): umidade em estufa a 105 °C por 6 horas; extrato etéreo por gravimetria em extrator “soxhlet”; cinzas após incineração das amostras e fibra bruta após digestão com ácido. A fração protéica foi determinada pelo método “Micro Kjeldahl”, sendo a proteína bruta do cogumelo determinada a partir do teor de nitrogênio, utilizando-se o fator de conversão N x 4,38 (Miles & Chang, 1997; Silva et al., 2007; Tsai et al., 2008).

Os açúcares redutores foram determinados segundo método desenvolvido por Somogyi e adaptado por Nelson (1944) e os açúcares não redutores pelo método de Antrona (Trevelyan & Harrison, 1952). Na determinação dos minerais, utilizou-se 0,5 g da amostra de cada linhagem e a análise foi feita em triplicata, sendo que o cálcio, magnésio, cobre, manganês, zinco e ferro, foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Silva, 1998). Os elementos fósforo e enxofre foram determinados por colorimetria em espectrofotometria a 420 nm e o boro a 540 nm; o potássio foi determinado em espectrofotômetro de chama (Malavolta, 1997). Na determinação dos compostos fenólicos foi utilizado 1 g da amostra pelo método Folin-Denis (Swain & Hillis, 1959).

### 3.4 Procedimento para obtenção de $\beta$ -Glucano

As fibras insolúveis, as quais, segundo Park et al. (2003) e Manzi & Pizzoferrato (2000), contém basicamente  $\beta$ -glucano, foram obtidas conforme a metodologia modificada utilizada por Prosky et al. (1988). Para isso, 1g da amostra, constituída de cogumelo moído, foi adicionado em Erlenmeyer (500 mL), juntamente com 50 mL de tampão fosfato 80mM, pH 6,0. Seguiram-se então três etapas de tratamento enzimático da amostra: 1- 100 $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -amilase termoestável Termamyl 120L (Novo Nordisk) foram adicionados à solução de pH 6,0, incubando-a por 30 minutos em banho-maria em ebulição. 2- 100 $\mu$ L da protease neutra bacteriana (Novo Nordisk) foram adicionados à solução com o pH ajustado para 7,5, com NaOH 25mM, incubando-a por 30 minutos a 60°C. 3- 300  $\mu$ L de amiloglicosidase AMG 300 (Novo Nordisk) foram adicionados à solução com pH ajustado para 4,0-4,5, incubando-a por mais 30 minutos a 60°C. Após as três etapas 200 mL de álcool etílico 95% foram adicionados à solução, incubando-a a 60°C por 60 minutos e deixando-a em repouso “overnight”. As fibras insolúveis precipitadas no etanol foram então filtradas em filtro Whatman n° 5B e lavadas três vezes em solução de 80% de álcool etílico e 20% de acetona, sendo secadas à temperatura ambiente e cuidadosamente removidas do papel de filtro.

Para a determinação da concentração de  $\beta$ -glucano nas fibras insolúveis, estas foram transferidas para Erlenmeyer de 300 mL sendo então hidrolisadas pela adição de 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% e incubadas à temperatura ambiente overnight. Foram adicionados então, 140mL de água destilada e a solução incubada por 2 horas em banho-maria em ebulição. O pH da solução foi então ajustado para 7,0 utilizando-se NaOH 5N, e o volume final ajustado para 250 mL. A solução foi filtrada primeiramente em papel de filtro Whatman n° 5B e

em seguida em membrana ultrafiltrante GV (Durapore) de porosidade 0,20µm, da marca Millipore.

#### **3.4.1 Quantificação e cálculo do teor de β-glucano pelo método enzimático**

A quantificação do β-glucano, a partir da glicose, foi feita de acordo com McClear & Glennie-Holmes (1985), sendo utilizado um kit enzimático (LaborLab Ltda., Guarulhos/SP) que contém 4-aminofenazona (0,025 mol.L<sup>-1</sup>), fenol (0,055 mol.L<sup>-1</sup>), glicose oxidase (1 U.mL<sup>-1</sup>) e peroxidase (0,15 U.mL<sup>-1</sup>). A absorbância (505 nm) foi mensurada em espectrofotômetro UV-VISIBLE modelo UV-1601PC marca SHIMADZU. Os resultados foram usados na seguinte fórmula:

$$\beta\text{-glucano (g/100g)} = A * f * 0,9 * 0,25$$

A → absorbância da reação de cada amostra, após tratamento ácido;

f = 463 → 100mg/dL/P. Em que P é a leitura da absorbância do padrão (20uL de reativo padrão + 2mL de reativo de trabalho);

162/180 → Fator de conversão da glicose livre que foi determinada, para glicose anidra que ocorre em β-glucano (McCclear & Glennie-Holmes (1985).

0,25 → fator de conversão das unidades de mg/dL para g/100g uma vez que o volume final da extração é de 250 mL;

#### **3.4.2 Quantificação e cálculo do teor de β-glucano por HPLC**

Para realização das análises cromatográficas, foram utilizadas as amostras obtidas conforme procedimento descrito no item 3.4. As amostras foram transferidas do freezer (-20°C) para refrigerador (10°C), permanecendo neste por aproximadamente 12h. Em seguida, foram deixadas à temperatura ambiente por aproximadamente 4h, antes de serem analisadas. Após estabilização da temperatura, 25µL das amostras foram diluídas 20 vezes em

água ultra pura filtrada em membrana ultrafiltrante GV (Durapore) de porosidade 0,20µm, da marca Millipore. Foram injetados 20µL da amostra para a corrida cromatográfica.

Os valores foram determinados usando metodologia de acordo com as técnicas da AOAC (1992), modificada por Schwan et al., (2001), e Shimadzu (1998). Foi utilizado cromatógrafo de fase líquida Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A. Para determinação da glicose foi utilizada coluna de troca catiônica (Shim-Pack) SCR-101H (7,9mm de diâmetro x 30 cm). Para a determinação de carboidratos, a coluna operou a temperatura ambiente, tendo como fase móvel água ultra pura com pH ajustado para 2,1, a um fluxo de 0,6 mL/min. A quantificação foi feita a partir de comparação com a curva de calibração de glicose, determinada utilizando padrão certificado da marca Supelco. Os resultados de leitura no HPLC foram usados na seguinte fórmula:

$$\mathbf{B\text{-}glucano (g/100g) = G*25*0,9}$$

Em que:

G é a concentração de glicose em mg/mL determinada por meio da curva padrão;

0,9 é o fator que leva em consideração a glicose vinda somente do B-glucano;

25 é o fator de conversão das unidades de mg/mL para g/100g uma vez que o volume final da extração é de 250 mL

Curva padrão:  $Y=0,000004x + 0,036622$

Y é a concentração de glicose em mg/mL (G);

X é a área do pico de cada amostra

### **3.5 Determinação da atividade enzimática**

As atividades enzimáticas da lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase foram determinadas nos cinco isolados de *A. brasiliensis* (CS1, CS5, CS7, CS9 e CS10) em diferentes momentos de crescimento micelial no composto de cultivo do cogumelo. A primeira amostra T1 foi a amostra controle, qual o composto foi autoclavado duas vezes a 121° C por 1 hora, com intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, o composto foi inoculado e incubado a 26° C 30 dias, quando as amostras de composto colonizado foram então retiradas para a análise de atividade enzimática. Os demais tratamentos consistiram de composto obtido segundo procedimento convencional descrito na literatura (fases I e II da compostagem). A segunda amostra (T2) foi obtida a partir de composto convencional inoculado e incubado a 26° C também 30 dias (composto totalmente colonizado). A terceira amostra (T3) foi obtida durante o cultivo do cogumelo, 30 dias após a indução da frutificação e a quarta amostra (T4), 60 dias após a indução da frutificação, ambos mantidos em ambiente com temperatura variando de 26 a 28° C e umidade relativa do ar acima de 80%.

#### **3.5.1 Atividade de Lacase (benzenodiol : oxigênio oxiredutase, EC 1.10.3.2)**

A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto utilizando-se 2,2'-azino-bis-etilbentiazoline (ABST) em mistura de reação de 1 mL contendo 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,1 mL de ABST 1mM (em água) e 0,6 mL da fonte enzimática. Utilizando o protocolo modificado de Buswell et al. (1995), a oxidação do ABST foi medida pelo aumento da absorbância a 420nm a 30°C, contra um tubo branco contendo todos os reagentes e substituindo o ABST por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABST por minuto ( $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Para cada amostra foram realizadas quatro repetições.



### **3.5.2 Atividade de manganês peroxidase (Manganês dependente de peroxidase EC 1.11.1.13)**

A atividade de manganês peroxidase foi medida usando o vermelho de fenol ( $1\text{ g. L}^{-1}$ ) como substrato ( $\epsilon = 4.460\text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) de acordo com a metodologia modificada descrita por Kuwahara et al. (1984). A mistura de reação de 1 mL continha 500 $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, 100  $\mu\text{L}$  de solução de vermelho de fenol ( $1,0\text{ g.L}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  de lactato de sódio pH 4,5 ( $250\text{ mmol.L}^{-1}$ ), 200 $\mu\text{L}$  de albumina bovina (0,5%), 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganês ( $2\text{ mmol. L}^{-1}$ ) e 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2\text{ mmol.L}^{-1}$ ) em tampão succinato de sódio ( $20\text{ mmol.L}^{-1}$ ) pH 4,5. A solução resultante foi incubada por 5 minutos a  $30^\circ\text{C}$  e a reação foi interrompida pela adição de NaOH ( $2\text{ mol.L}^{-1}$ ). A absorbância foi medida a 610 nm contra um tubo branco contendo todos os reagentes, exceto o sulfato de magnésio que foi substituído por lactato de sódio. Uma unidade de manganês peroxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 $\mu\text{mol}$  de vermelho de fenol por minuto. Para cada amostra foram realizadas quatro repetições.

### **3.5.3 Atividade de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14)**

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pelo monitoramento da absorção em 310 nm da formação de veratraldeído ( $\epsilon = 9.300\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), através da oxidação de álcool veratrílico de acordo com a metodologia modificada descrita por Tien & Kirk (1984). A mistura de reação de 2 mL, constou de 0,5 mL da fonte enzimática, 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2mM, 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM e 1 mL de tartarato de sódio 0,125 M pH 3,0 a  $37^\circ\text{C}$ . A absorbância foi medida em 310 nm contra um tubo branco contendo todos os reagentes, exceto o álcool veratrílico que foi substituído por tartarato de sódio. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de

oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de álcool veratrílico a veratraldeído por minuto. Para cada amostra foram realizadas quatro repetições.

#### **4.6 Avaliação do crescimento micelial das diferentes linhagens de *A. brasiliensis***

O crescimento micelial de *A. brasiliensis* foi avaliado nas diferentes condições que representam todas as etapas para o cultivo do cogumelo, desde a produção das matrizes em laboratório até a colonização dos substratos de cultivo. Para o cultivo em meio de cultura, foi utilizado o meio BDA em placas de *Petri*, as quais foram inoculadas com discos de 6 mm contendo micélio de culturas jovens (14 dias) de cada uma das linhagens do fungo, e incubadas a 25°C. O raio das colônias foi medido a partir dos discos inoculados nas placas, sendo medidos quatro raios por placa, cuja média consistiu em uma repetição, transformando-se os resultados em mm/dia.

As mesmas linhagens foram também inoculadas no substrato utilizado para produção do inoculante, nas mesmas condições descritas anteriormente, bem como no composto de cultivo do cogumelo, produzido da mesma forma descrita no item 3.2, porém, acondicionado em frascos de vidro em vez de sacolas plásticas. Todos os frascos, tanto de inoculante como de composto, foram inoculados apenas na superfície, para permitir que o crescimento micelial pudesse ser medido. As medições foram feitas a cada 7 dias, até que os substratos fossem completamente colonizados, tomando-se 4 medidas de cada frasco, cujas médias constituíram em uma repetição. Os resultados foram transformados em mm/dia, como citado anteriormente.

#### **4.7 Avaliação da produtividade e medidas dos corpos de frutificação**

Para os experimento de cultivo, foram utilizados vasos contendo 5 kg de composto colonizado. Após ser acondicionado nos vasos, o composto recebeu

uma camada de 5 cm de cobertura, a qual foi constituída de Latossolo Vermelho Distroférico, sem correção de pH. Durante todo o cultivo, os vasos foram mantidos em ambiente com a umidade mantida acima de 80% e temperatura oscilando entre 22 e 28° C. . A produtividade (%) das linhagens de *A. brasiliensis* foi calculada em função da relação entre o peso de cogumelos frescos e a massa de composto úmido.

Foram avaliados todos os cogumelos colhidos quanto ao comprimento do píleo, diâmetro do estipe e tamanho total dos cogumelos. As medidas foram tomadas com auxílio de paquímetro, cuja média foi expressa em milímetros.

#### **4.8 Análise estatística dos dados**

Os experimentos de crescimento micelial em placa, inoculante e composto foram realizados com 4 repetições para cada linhagem. O experimento de produtividade foi montado em blocos casualizados com 4 repetições, sendo cada repetição composta por 3 unidades (vasos).

A avaliação das medidas dos corpos de frutificação foi feita com base no mesmo delineamento experimental descrito para o experimento de produtividade.

Os dados foram analisados com o auxílio do Software Sisvar 4.3, sendo aplicado o teste de média Tukey, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características nutricionais de diferentes linhagens do cogumelo *Agaricus brasiliensis*

Os resultados da composição química nutricional dos cogumelos desidratados das diferentes linhagens de *Agaricus brasiliensis* estão apresentados na Tabela 3, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para todos os demais parâmetros avaliados, com exceção de extrato etéreo.

A linhagem CS5 destacou-se dentre as demais, apresentando uma maior composição protéica (27,07%) e de cinzas (7,17%). Com relação a fibras brutas, a linhagem CS9 apresentou a maior composição (18,3%), seguida pela linhagem CS5 (17,5%). Estes dados estão muito próximos dos obtidos por Tsai et al. (2008) para amostras de uma linhagem de *A. brasiliensis* adquirida em pontos comerciais de Taiwan. Diferentes polissacarídeos compõem o grupo de fibras brutas, contando-se entre eles as  $\beta$ -glucanas, as quais são o principal alvo de estudos acerca da atividade antitumoral (Firenzuoli et al., 2007; Bellini et al., 2006; Machado et al., 2005; Park et al., 2003). Não houve diferença significativa na porcentagem de extrato etéreo, sendo que todas as linhagens apresentaram valores inferiores a 2%. De modo geral os cogumelos são conhecidos por apresentar baixa composição de lipídios (Furlani & Godoy, 2007; Liu et al., 2005), o que os torna uma excelente fonte de alimento em dietas nutricionais. A análise de açúcares detectou concentrações mínimas de glicose para todas as linhagens, as quais também apresentaram baixa concentração de açúcares totais, sendo que o isolado CS7 apresentou a maior concentração (0,76%).

TABELA 3 Composição química nutricional dos cogumelos desidratados das diferentes linhagens de *Agaricus brasiliensis* em g/100g de matéria seca.

LINHAGENS	% PROTEÍNA	% EXTRATO ETÉRIO	% EXTRATO NÃO NITROGENADO	% FIBRAS BRUTA	% CINZAS	% UMIDADE COGUMELO DESIDRATADO	% UMIDADE
CS1	24,50 <sup>B</sup> ± 2,01	1,86 <sup>A</sup> ± 0,08	48,45 <sup>B</sup> ± 1,6	16,5 <sup>C B</sup> ± 0,17	6,36 <sup>C</sup> ± 0,25	83, 25 <sup>B</sup> ± 2,60	12,41 <sup>A</sup> ± 0,28
CS5	27,07 <sup>A</sup> ± 0,50	1,70 <sup>A</sup> ± 0,10	44,99 <sup>C</sup> ± 1,5	17,5 <sup>B A</sup> ± 0,17	7,17 <sup>A</sup> ± 0,11	85, 75 <sup>B</sup> ± 2,50	11,65 <sup>A</sup> ± 0,92
CS7	22,08 <sup>C</sup> ± 0,46	1,70 <sup>A</sup> ± 0,10	53,49 <sup>A</sup> ± 0,49	17,0 <sup>C B</sup> ± 0,15	6,37 <sup>C</sup> ± 0,19	90, 25 <sup>A</sup> ± 2,26	9,70 <sup>B</sup> ± 0,43
CS9	23,37 <sup>C B</sup> ± 0,46	1,84 <sup>A</sup> ± 0,09	50,86 <sup>B</sup> ± 0,96	18,3 <sup>A</sup> ± 0,66	6,72 <sup>B</sup> ± 0,07	91, 25 <sup>A</sup> ± 2,10	9,29 <sup>B</sup> ± 0,09
CS10	24,84 <sup>B A</sup> ± 1,11	1,79 <sup>A</sup> ± 0,09	51,57 <sup>A</sup> ± 1,25	16,3 <sup>C</sup> ± 0,19	6,75 <sup>B</sup> ± 0,06	91, 75 <sup>A</sup> ± 1,24	8,71 <sup>B</sup> ± 0,15

Os valores precedidos pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescritos representam o desvio padrão da média.

O cogumelo *A. brasiliensis* é conhecido também por apresentar propriedades antioxidantes (Huang & Mau, 2006), sendo que esta característica em cogumelos têm sido relacionada à presença de compostos fenólicos (Barros et al., 2008; Elmastas et al., 2007). As concentrações de compostos fenólicos no cogumelo *A. brasiliensis* observadas neste trabalho (Tabela 4) são próximas àquelas observadas em *Agaricus arvensis* (2,83%) e inferiores às relatadas para espécies pertencentes a outros gêneros de cogumelos como *Lentinula edodes* (4,79%), *Volvariella volvacea* (15,0%), *Leucopaxillus giganteus* (6,29%) e *Sarcodon imbricatus* (3,76%) (Barros et al., 2007; Cheung et al., 2003).

TABELA 4 Valores médios de compostos fenólicos nos cogumelos de *A. brasiliensis* em g/100g de matéria seca.

LINHAGENS	% AÇÚCARES REDUTORES		% AÇÚCARES NÃO REDUTORES		POLIFENÓIS g/100g	
CS1	0,054	A ± 0,01	0,61	B ± 0,05	1,82	B ± 0,42
CS5	0,045	C ± 0,01	0,45	C ± 0,01	2,20	A ± 0,11
CS7	0,048	B ± 0,02	0,76	A ± 0,10	1,96	B ± 0,26
CS9	0,044	C ± 0,02	0,63	B ± 0,02	1,78	B ± 0,08
CS10	0,039	D ± 0,01	0,52	C B ± 0,01	1,65	B ± 0,12

Os valores precedidos pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescritos representam o desvio padrão da média.

A composição mineral do cogumelo *A. brasiliensis* está representada na Tabela 5, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens para os minerais potássio, magnésio, boro e ferro. A linhagem CS5 apresentou a maior concentração de fósforo, enxofre e cobre, enquanto que a maior concentração de

manganês foi encontrada na linhagem CS9 e a de zinco na linhagem CS1. A linhagem CS7 apresentou uma porcentagem significativamente menor de cálcio, manganês e zinco, além de estar entre as linhagens com menor concentração de fósforo, enxofre e ferro.

Todos os resultados obtidos neste trabalho referem-se ao cogumelo desidratado, o que significa que no cogumelo fresco deve-se considerar apenas 10%, aproximadamente, dos valores aqui relatados. Portanto, considerando o cogumelo fresco, o teor de proteína é menor do que 3%, o qual não pode ser considerado um valor elevado em comparação com alimentos considerados protéicos, como a carne e a soja, e pode ser também mais pobre em proteína do que alimentos mais comuns como o leite, por exemplo, cujo teor varia de 3,0% a 4,5%. Entretanto, comparando com vegetais de modo geral, mesmo o cogumelo fresco pode ser considerado um alimento mais rico em proteína, além de ser uma importante fonte de vitaminas e sais minerais.

Os resultados encontrados demonstraram também que as diferenças genéticas entre as linhagens de *A. brasiliensis* observadas por Tomizawa et al. (2007) resultaram em diferenças nas concentrações químicas nutricionais, corroborando também os resultados encontrados em outros trabalhos com diferentes linhagens de *Pleurotus* ssp, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* e *Agaricus bisporus*, que também apresentaram diferenças em sua constituição química (Toro et al., 2006; Yang et al., 2001; Calonje et al., 1995). Entretanto, para a seleção de linhagens, as características nutricionais devem ser consideradas em conjunto com outros parâmetros. Dentre esses, a produtividade, é um dos mais importantes na seleção da melhor linhagem comercial ou na escolha das melhores linhagens para um programa de melhoramento genético. Além disso, as diferenças observadas na composição química podem ser também um reflexo direto de diferenças de produtividade uma vez que linhagens mais produtivas tendem a drenar maior quantidade de nutrientes do composto,

levando a uma diminuição da concentração desses nutrientes nos cogumelos oriundos de colheitas subsequentes. Portanto, ainda que a linhagem CS5 tenha apresentado maior concentração de proteína, fibras totais e de alguns minerais, características agronômicas como produtividade e precocidade deverão ser também consideradas para a escolha da melhor linhagem.



TABELA 5 Composição mineral média dos cogumelos das diferentes linhagens de *A. brasiliensis* em g/100g de matéria seca.

LINHAGENS	%	%	%	%	%	mg.Kg <sup>-1</sup>	mg.Kg <sup>-1</sup>	mg.Kg <sup>-1</sup>	mg.Kg <sup>-1</sup>	mg.Kg <sup>-1</sup>
	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Zn	Fe
CS1	1,12 <sup>C B</sup> ± 0,03	1,94 <sup>A ± 0,05</sup>	0,38 <sup>A ± 0,02</sup>	0,13 <sup>A ± 0,01</sup>	0,37 <sup>B ± 0,01</sup>	3,20 <sup>A ± 2,11</sup>	28,6 <sup>C B</sup> ± 0,38	8,47 <sup>B</sup> ± 0,55	62,0 <sup>A ± 4,70</sup>	70,3 <sup>B ± 7,77</sup>
CS5	1,23 <sup>A ± 0,07</sup>	1,95 <sup>A ± 0,02</sup>	0,34 <sup>A ± 0,02</sup>	0,13 <sup>A ± 0,01</sup>	0,41 <sup>A ± 0,01</sup>	4,00 <sup>A ± 1,50</sup>	53,9 <sup>A ± 0,65</sup>	8,17 <sup>B</sup> ± 0,29	51,5 <sup>C B</sup> ± 0,57	91,2 <sup>A ± 6,53</sup>
CS7	1,08 <sup>C</sup> ± 0,01	1,94 <sup>A ± 0,03</sup>	0,18 <sup>B ± 0,01</sup>	0,13 <sup>A ± 0,01</sup>	0,35 <sup>B ± 0,01</sup>	3,40 <sup>A ± 1,76</sup>	30,6 <sup>C</sup> ± 0,15	7,20 <sup>C</sup> ± 0,10	46,3 <sup>C</sup> ± 0,87	67,8 <sup>B ± 0,49</sup>
CS9	1,08 <sup>C</sup> ± 0,02	1,95 <sup>A ± 0,02</sup>	0,36 <sup>A ± 0,03</sup>	0,14 <sup>A ± 0,01</sup>	0,34 <sup>B ± 0,01</sup>	2,17 <sup>A ± 0,06</sup>	23,7 <sup>D</sup> ± 0,25	9,43 <sup>A ± 0,40</sup>	56,0 <sup>B</sup> ± 0,68	67,0 <sup>B ± 0,83</sup>
CS10	1,16 <sup>B</sup> ± 0,02	1,94 <sup>A ± 0,01</sup>	0,37 <sup>A ± 0,01</sup>	0,15 <sup>A ± 0,01</sup>	0,37 <sup>B ± 0,01</sup>	2,00 <sup>A ± 0,60</sup>	27,4 <sup>C</sup> ± 0,93	8,03 <sup>C B</sup> ± 0,12	67,9 <sup>A ± 0,84</sup>	69,0 <sup>B ± 0,60</sup>

Os valores precedidos pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescrito representam o desvio padrão da média.

## **5.2 Determinação da concentração de $\beta$ -glucano de diferentes linhagens do cogumelo *Agaricus brasiliensis* em relação a outras espécies de cogumelos**

A extração de  $\beta$ -glucano foi feita segundo metodologia descrita por Prosky et al. (1988) e a determinação da sua concentração foi feita utilizando dois métodos diferentes. O primeiro método foi baseado na determinação enzimática, através do complexo enzimático oxidase/peroxidase, específico para determinação da glicose proveniente de  $\beta$ -glucano (McClear & Glennie-Holme, 1985; Dallies et al. 1998). No segundo método a concentração de glicose proveniente da hidrólise de  $\beta$ -glucano foi determinada em HPLC utilizando 0,20 $\mu$ m da mesma amostra que foi utilizada na determinação do método enzimático.

Os resultados obtidos na determinação do teor de  $\beta$ -glucano das diferentes amostras de cogumelos estão demonstrados na Tabela 6.

TABELA 6 Concentração de  $\beta$ -glucano das amostras de cogumelos comestíveis e medicinais (g/100g de cogumelo seco) determinadas pelo método enzimático e por HPLC.

Amostras *	HPLC	Método Enzimático																		
CS2	3,05	F	E									$\pm 0,50$	4,10	E	D	C				$\pm 1,10$
CS9	3,17	F	E	D	C							$\pm 0,29$	4,27	E	D	C				$\pm 0,71$
CS1	2,70	F										$\pm 1,25$	3,36	E	D					$\pm 1,02$
CS5	3,84	F	E	D								$\pm 0,38$	3,26	E	D					$\pm 1,22$
AB	2,99	F	E									$\pm 0,84$	2,11	E						$\pm 0,67$
CS7	4,20	F	E	D	C							$\pm 0,65$	5,00	E	D	C				$\pm 1,00$
CS10	4,35				D	C	B					$\pm 0,81$	6,03		D	C	B			$\pm 0,83$
PE	5,39					C	B					$\pm 0,29$	6,72			C	B	A		$\pm 0,43$
PC	4,87		E	D	C							$\pm 0,85$	7,03			C	B	A		$\pm 1,95$
PO	7,62						B	A				$\pm 0,68$	9,63					A		$\pm 2,04$
LE	8,12							A				$\pm 1,29$	9,00					A		$\pm 1,43$

Os valores precedidos pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescritos representam o desvio padrão da média.

\* CS1 a CS10: linhagens de *A. brasiliensis*; AB: *A. bisporus*; LE: *L. edodes*; PE: *P. eryngii*; PC: *P. sajor-caju*; PO: *P. ostreatus*.

As amostras quantificadas pelo método enzimático revelaram que os cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, possuem a maior concentração total de  $\beta$ -glucano, com 9,63 e 9,00g/100g de cogumelos secos, respectivamente. Em relação às amostras de *Agaricus brasiliensis*, duas linhagens, CS7 e CS10, apresentaram teores mais elevados de  $\beta$ -glucano, com 5,00 e 6,30g/100g de matéria seca, respectivamente. Estes valores foram semelhantes aos encontrados em *P. eryngii* (6,72g/100g) e *P. saju-caju* (7,03 g/100g). Os menores valores foram encontrados para as demais linhagens de *A. brasiliensis* e para o cogumelo *A. bisporus*. Vários estudos apontam o alto potencial medicinal do cogumelo *A. brasiliensis* (Bellini et al., 2006; Machado et al., 2005; Oliveira et al., 2002; Menoli et al., 2001), o qual está normalmente relacionado ao teor de  $\beta$ -glucano (Firenzuoli et al., 2007). Entretanto, neste trabalho, as amostras de *P. ostratus* e *L. edodes*, foram as que apresentaram maior teor deste polissacarídeo. Por outro lado, hoje sabe-se também que as propriedades medicinais estão também relacionadas com o tipo de ligação das ramificações desse polissacarídeo e não simplesmente com a sua quantidade no cogumelo (Kawagishi et al., 1989).

Não foram encontradas diferenças significativas ao se comparar os resultados obtidos pelas diferentes metodologias (método enzimático e análise por HPLC). Na quantificação das amostras utilizando HPLC foram encontradas as mesmas diferenças significativas entre as linhagens obtidas pelo método enzimático de quantificação. Estes resultados contrariam aqueles obtidos por Rhee et al., (2008) que, ao utilizarem as mesmas técnicas de quantificação de  $\beta$ -glucano de *Inonotus obliquus*, encontraram diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos. É provável que as diferenças observadas por Rhee et al. (2008) tenham ocorrido devido ao fato dos autores não terem submetido as amostras a uma filtração adequada após a hidrólise enzimática, antes da quantificação pelo método enzimático.

A concentração de fibras totais solúveis em álcalis em cogumelos do gênero *Pleurotus* pode ser de 126 a 293g/kg de cogumelo seco, sendo que estas fibras são constituídas basicamente de  $\beta$ -glucano (Cheung & Lee, 2000).

Empregando a mesma metodologia utilizada neste trabalho Park (2003) encontrou concentrações próximas de  $\beta$ -glucano na faixa de 7,6 a 10,1g/100g de cogumelo seco em *A. brasiliensis*. Da mesma forma Rhee et al. (2008), utilizando as mesmas técnicas de detecção de  $\beta$ -glucano encontrou concentrações de  $\beta$ -glucano de 13,7-15,3g/100g de matéria seca em *Inonotus obliquus*.

Os resultados obtidos no presente também revelaram que, além das diferenças normalmente encontradas entre as espécies, é possível encontrar também diferenças entre linhagens de uma mesma espécie, como foi observado para as linhagens CS7 e CS10 de *A. brasiliensis*, as quais apresentaram maiores concentrações de  $\beta$ -glucano do que as demais. Estes resultados indicam que estas duas linhagens possuem bons atributos para o cultivo comercial, pelo fato de apresentarem a melhor produtividade e os maiores valores de  $\beta$ -glucano. Com isso, as duas linhagens tornam-se também interessantes para futuros estudos de melhoramento genético.

### **5.3 Determinação da atividade de peroxidases de linhagens do cogumelo *Agaricus brasiliensis* em composto.**

Os resultados obtidos neste trabalho estão demonstrados na Tabela 7, onde foi avaliada a atividade de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase em composto de cultivo com diferentes intervalos de cultivo e em diferentes condições.

TABELA 7 Atividade de lacase de diferentes isolados de *A. brasiliensis* no composto de cultivo.

Atividade enzimática média (U/g)												
Isolado	T1			T2			T3			T4		
CS1	0,49	A b	±0,24	0,75	A a	±0,13	0,70	A a	±0,17	0,58	C	a ±0,16
CS5	0,71	A b	±0,03	0,95	A b	±0,23	0,56	A b	±0,14	2,04	A	a ±0,73
CS7	0,47	A b	±0,02	0,88	A b	±0,14	0,85	A b	±0,33	2,59	A	a ±0,25
CS9	0,75	A b a	±0,13	0,92	A a	±0,01	0,56	A b	±0,07	0,74	C	b a ±0,06
CS10	0,71	A b	±0,10	0,75	A b	±0,13	0,80	A b	±0,02	1,55	B A	a ±0,21

T1 – Controle. Amostra utilizando composto esterilizado com 30 dias de inoculação.

T2 – Amostra contendo composto sem esterilização com 30 dias de inoculação.

T3 – Amostra obtida durante o cultivo, 30 dias após a indução da frutificação.

T4 – Amostra obtida durante o cultivo, 60 dias após a indução da frutificação.

Os valores precedidos pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescritos representam o desvio padrão da média.

Das três enzimas avaliadas neste trabalho, foi detectada apenas atividade de lacase, ou seja, as enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase não foram detectadas em nenhuma das linhagens de *A. brasiliensis* nas condições testadas neste trabalho. A atividade dessas enzimas já foi relatada em outras espécies de cogumelos como *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* (Boer et al., 2006; Baldrian et al., 2003; Bonnen et al., 1994). , Entretanto, Ullrich et al. (2005) não encontraram atividade de manganês peroxidase quando *A. blazei* foi cultivado em meio líquido. Segundo Hofrichter (1999), enzimas ligninolíticas podem ser produzidas de forma constitutiva, porém, a sua produção por basidiomicetos pode ser influenciada pelas condições de cultivo. A atividade de manganês peroxidase, por exemplo, é sensível à presença de alguns metais como o cádmio (Boer et al., 2006). Diante disso, apesar dos resultados negativos obtidos por Ullrich et al. (2005), seria importante avaliar a atividade dessas enzimas nas condições de cultivo, nas quais a atividade enzimática poderia ser induzida.

O tratamento controle (T1), cujo composto foi esterilizado antes de ser inoculado, apresentou a mesma atividade de lacase que o tratamento T2, ou seja, a atividade enzimática ocorreu exclusivamente em função da ação do *A. brasiliensis*. A utilização desse controle era importante, uma vez que o cultivo do cogumelo se dá em composto fermentado e pasteurizado, o qual conta com a presença de grande número de microrganismos que continuam presentes durante a colonização e frutificação do cogumelo, os quais poderiam de alguma forma estar contribuindo para a produção dessas enzimas. Por outro lado, foi possível inferir também que o tratamento de esterilização do composto não comprometeu a produção e atividade da lacase.

A atividade de lacase variou entre as linhagens apenas nas amostras retiradas 60 dias após a indução da frutificação (tabela 7), ou seja, a diferença entre algumas linhagens ocorreu somente quando o ciclo de produção do

cogumelo estava próximo do fim. Para as linhagens CS1 e CS9 a atividade da enzima permaneceu estável durante todo o ciclo de produção, mas para as linhagens CS5, CS7 e CS10, houve um aumento significativo da atividade enzimática 60 dias após a indução da frutificação (T4). Nesse tratamento, essas linhagens apresentaram atividade de lacase superior às linhagens CS1 e CS9.

Portanto, as maiores atividades de lacase foram observadas 60 dias após a indução da frutificação, para as linhagens CS10 (1,55 U/g), CS5 (2,5 U/g) e CS7 (2,59 U/g), as quais foram estatisticamente semelhantes.

Ullrich et al. (2005) trabalharam na extração e caracterização de lacase, produzida por *A. brasiliensis* (*Agaricus blazei*) em meio líquido à base de suco de tomate e obtiveram uma atividade 5U/mL. Esse valor está compatível com o obtido no presente trabalho, entretanto, indica que a produção da enzima nas condições de cultivo do cogumelo não foi estimulada, como se pensava a princípio que poderia ocorrer. Além disso, o fungo não produziu as outras enzimas (manganês peroxidase e lignina peroxidase) como ocorre com outras espécies, inclusive o *A. bisporus* que produz a três enzimas (Bonnen et al., 1994) e é um cogumelo de estilo de vida muito parecido com o *A. brasiliensis*.

Essas diferenças de atividade enzimática podem ajudar a explicar porque o ciclo de produção do cogumelo *A. brasiliensis* é tão longo quando comparado com o *A. bisporus*, cujo cultivo comercial em condições controladas pode ter o ciclo fechado em menos de um mês após a indução da frutificação, ao passo que o *A. brasiliensis* precisa de cerca de três meses após a indução da frutificação para alcançar uma produção economicamente viável.



#### 5.4 Avaliação da produtividade de linhagens de *Agaricus brasiliensis*

Os resultados de crescimento micelial nos diferentes meios ou substratos estão descritas na tabela 8, sendo que foram observada diferenças significativas apenas para o crescimento em composto de cultivo. As linhagens de *A. brasiliensis* apresentaram o mesmo desempenho em BDA e no arroz em casca + farelo de trigo. Apenas no composto de cultivo foi observado um menor crescimento micelial para a linhagem CS5, enquanto que as demais apresentaram os mesmos resultados de crescimento micelial.

TABELA 8 Avaliação crescimento micelial das linhagens de *A. brasiliensis* em BDA, arroz em casca + farelo de trigo e composto de cultivo

Tratamentos	BDA		Arroz em casca		Composto	
CS1	5,28	<sup>A</sup> ± 1,28	8,21	<sup>A</sup> ± 0,04	5,00	<sup>A</sup> ± 0,34
CS5	5,28	<sup>A</sup> ± 1,33	7,29	<sup>A</sup> ± 0,37	3,35	<sup>B</sup> ± 0,36
CS7	5,53	<sup>A</sup> ± 0,41	7,91	<sup>A</sup> ± 0,84	5,04	<sup>A</sup> ± 0,56
CS9	6,83	<sup>A</sup> ± 0,67	7,06	<sup>A</sup> ± 0,87	4,72	<sup>A</sup> ± 0,51
CS10	6,96	<sup>A</sup> ± 0,61	7,66	<sup>A</sup> ± 0,68	5,00	<sup>A</sup> ± 0,14

\* As médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescritos representam o desvio padrão da média.

Quanto a avaliação da produtividade, cujos resultados estão descritos na tabela 9, os dados obtidos demonstraram diferenças significativas entre as linhagens, confirmando que as mesmas são, de fato, geneticamente distintas. As linhagens CS7 e CS10 foram as mais produtivas, com 9,51 e 8,92% de produtividade, respectivamente. Por outro lado, a linhagem CS5 foi a que apresentou menor produtividade (3,66%), seguida pelas linhagens CS1 (6,35%)

e CS9 (5,40%). É interessante observar que a linhagem CS5 apresentou, juntamente com CS7 e CS10, as maiores atividades de lacase após 60 dias de indução da frutificação, entretanto, ao contrário das duas últimas linhagens, que foram as mais produtivas, a atividade enzimática mais elevada não resultou em boa produtividade. Esses resultados demonstram que outros fatores estão envolvidos no processo de frutificação e, provavelmente, outras diferenças genéticas estão contribuindo para que essa linhagem seja tão pouco produtiva.

TABELA 9 Produtividade das linhagens do cogumelo *Agaricus brasiliensis* [(massa de cogumelos frescos/massa de composto úmido) x 100].

<b>Tratamentos</b>	<b>Produtividade (%)</b>		
<b>CS1</b>	<b>6,35</b>	<b>B</b>	$\pm 0,36$
<b>CS5</b>	<b>3,66</b> <sup>C</sup>		$\pm 1,23$
<b>CS7</b>	<b>9,51</b>		<b>A</b> $\pm 0,86$
<b>CS9</b>	<b>5,40</b> <sup>C</sup>	<b>B</b>	$\pm 0,77$
<b>CS10</b>	<b>8,92</b>		<b>A</b> $\pm 0,83$

\* As médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescrito representam o desvio padrão da média.

Embora existam relatos de que diferentes linhagens apresentem diferenças quanto ao tamanho e número dos cogumelos (Mamiro, 2008), essas diferenças não foram observadas no presente trabalho. Portanto, não foi observada variação entre as linhagens quanto ao tamanho médio dos cogumelos e nem nas suas dimensões de píleo, estipe e no peso unitário (Tabela 10). A única diferença observada foi no número de cogumelos colhidos, sendo este o fator preponderante para que houvesse diferença na produtividade entre as linhagens.

TABELA 10 Avaliação do número, do tamanho do píleo, diâmetro do estipe dos corpos de frutificação do *Agaricus brasiliensis* em composto de cultivo

Tratamentos	Estipe (mm)	Pileos (mm)	Tamanho (mm)	Peso Unitário (g)	Número Cogumelos
CS1	62,70 <sup>A</sup> ± 5,21	40,60 <sup>A</sup> ± 6,40	67,59 <sup>A</sup> ± 5,10	47,89 <sup>A</sup> ± 10,33	20,50 <sup>C B</sup> ± 4,04
CS5	57,27 <sup>A</sup> ± 9,00	49,90 <sup>A</sup> ± 2,50	62,02 <sup>A</sup> ± 8,71	62,14 <sup>A</sup> ± 2,71	08,75 <sup>C</sup> ± 2,63
CS7	62,40 <sup>A</sup> ± 7,14	45,71 <sup>A</sup> ± 6,10	67,42 <sup>A</sup> ± 7,14	55,56 <sup>A</sup> ± 9,68	26,00 <sup>A</sup> ± 2,83
CS9	62,28 <sup>A</sup> ± 6,06	46,50 <sup>A</sup> ± 5,98	67,28 <sup>A</sup> ± 6,06	60,16 <sup>A</sup> ± 15,60	14,00 <sup>C B</sup> ± 3,16
CS10	66,99 <sup>A</sup> ± 4,36	45,77 <sup>A</sup> ± 4,00	71,99 <sup>A</sup> ± 4,36	52,78 <sup>A</sup> ± 10,16	25,75 <sup>A</sup> ± 3,10

\* As médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). Os valores sobrescrito representam o desvio padrão da média.

## 6 CONCLUSÕES

Os cogumelos frescos de *Agaricus brasiliensis* não podem ser considerados um alimento protéico. Constituem uma importante fonte de fibras e sais minerais, além de apresentar baixos teores de lipídios. Podendo ser considerados uma fonte alternativa de alimento em dietas e na alimentação em geral.

O cogumelo *A. brasiliensis* produz lacase, mas não manganês peroxidase e nem lignina peroxidase no composto de cultivo.

As linhagens CS5, CS7 e CS10 apresentaram aumento da atividade de lacase 60 dias após a indução da frutificação.

As linhagens CS7 e CS10 se mostraram as mais adaptadas às condições de cultivo utilizadas neste experimento, apresentando bom crescimento micelial e maior produtividade e ainda resultando em cogumelos com, maiores concentrações de  $\beta$ -glucano.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L.S.; PHUNG, S.; WU, X.; KI, L.; CHEN, S. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) exhibits antiproliferative and proapoptotic properties and inhibits prostate tumor growth in athymic mice. **Nutrition And Cancer**, Abingdon, v.60, n.6, p.744-756, Nov. 2008.

AMAZONAS, M.A.L. de A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identificação taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2004. p.78-80. (Documentos, 116).

ANDRADE, M.C.N.; FILHO, KOPYTOWSKI, J.; MINHONI, M.T.A.; COUTINHO, L.N.; FIGUEIREDO, M.B. Productivity, biological, efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, n.2, p.243-247, Apr./June 2007.

ANDRADE, M.C.N.; ZIED, D.C.; MINHONI, M.T.A. Yield of four *Agaricus bisporus* strains in three compost formulations and chemical composition analyses of the mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.3, p.593-598, July/Sept. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Agricultural Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC., 1992. v.2.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, n.1, p.78-91, Jan. 2003.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; CORREIA, D.M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, I.C.F.R. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. **Food Chemistry**, London, v.105, n.1, p. 140-145, 2007.

BARROS, L.; FALCÃO, S.; BAPTISTA, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I.C.F.R. Antioxidante activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, London, v. 111, n.1, p. 61-66, Nov. 2008.

BARROS, L.; FERREIRA, M.; QUEIRÓS, B.; FERREIRA, I.C.F.R.; BAPTISTA, P. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, London, v. 103, n.2, p.413-419, 2007.

BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; MATUO, R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-K1 and HTC cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.20, n.3, p. 355-360, Apr. 2006.

BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinus edodes*. **Process Biochemistry**, London, v.41, n.3, p. 1203-1207, May 2006.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, London, v.88, n.3, p. 425-428, Dec. 2004.

BONNEN, A.M.; ANTON, L.H.; ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom *Agaricus bisporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.60, n.3, p.960-965, Mar. 1994.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.128, n.1, p. 81-88, Apr. 1995.

CALONJE, M.; MENDONZA, C.G.; CABO, A.P.; NOVAES-LEDIEU, M. Some significant differences in wall chemistry among four commercial *Agaricus bisporus* strains. **Current Microbiology**, New York, v.30, n.2, p. 111-115, Feb. 1995.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; SMIDERLE, F.R.; ROSADO, F.R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.66, n.2, p.252-257, Oct. 2006.

CAVALCANTE, J.L.R.; GOMES, V.F.F.; MINHONI, M.T.A.; ANDRADE, M.C.N. Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Science Agronomy**, Maringa, PR, v.30, n.4, p.513-517, 2008.

CARLILE, J.M. **The Fungi**. 1.ed. San Diego: Academic Press INC, 1994. 482p.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, London, v.81, n.2, p. 249-255, May, 2003.

CHEUNG, P.C.K.; LEE, M.Y. Fractionation and characterization of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) as potential nutraceuticals from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa , v.48, n.8, p.3148-3151, 2000.

COOPER, E.L. Commentary on CAM and NK Cells by Kazuyoshi Takeda and Ko Okumura. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, Oxford, v.1, p. 29-34, Jun. 2004 .

CORRADINI, E.; PINEDA, E.A.G.; HECHENLEITNER, A.A.W. Lignin-poly (vinyl alcohol) blends studied by thermal analysis. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v.66, n.2, p.199-208, Nov. 1999.

CRISAN, E.V.; SANDS, A. Nutritional value. In the biology and cultivation of edible mushrooms. In: CHANG, S.T.; HAYES, W.A. (Eds). **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1978, p. 137-168.

CURVETTO, N.R.; FIGLAS, D.; DEVALIS, R.; DELMASTRO, S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and/or Mn (II). **Bioresource Technology**, Essex, Inglaterra , v.84, n.2, p. 171-176, Sept. 2002.

DALLIES, N.; FRANÇOIS, J.; PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application on the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, Inglaterra, v.14, n.14, p.1297-1306, 1998.

DERMIBAS, A. Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. **Food Chemistry**, London, v.75, n.4, p.453-457, Dec. 2001.

DIAS, E.S.; KOSHIKUMO, E.M.S.; SCHWAN, R.F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v.27, n.6, p.1363-1369, nov. 2003.

DIAS, E.S.; LABORY, C.R.G.; HERRERA, K.M.S.; ALVES, A.A.; TORRES, G.A.; RINKER, L.D. Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. **World Journal of Microbiology of Biotechnology**, v.24, n.11, p.2473-2479, Nov. 2008.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.; FANG, J. Structural characterization of water-soluble of  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.337, n.15, p. 1417-1421, Sept. 2002.

DURÁN N., ESPOSITO E., Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review., **Applied catalysis B: Environmental**, Amsterdam, v.28, n.2, p.83-99, Nov. 2000.

DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P.; ESPOSITO, E.; PELEGRINI, R.; GROTO, R.; REYES, J. Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilized horseredish peroxidase. **Environmental Technology**, London, v.19, n.1, p.55-63, Jan. 1998.

DURAN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, n.7, p.907-931, Dec. 2002.

EGGERT, C.; TEP, U.; ERIKSSON, K. E. Laccase-producing white-rot fungus lacking ligninperoxidase, and manganese peroxidase. In: JEFFRIES, T.; VIKARI, L. (Ed.). **Enzyme for pulp and paper processing**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 130-150.

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



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**, San Diego, v.20, n.3-4, p. 337-345, May 2007.

EMBAIXADA do Brasil em Tóquio: setor de promoção comercial. **Boletim de Mercado**. Disponível em: <[http://www.mackenzie.br/fileadmin/Graduacao/CCSA/Publicacoes/Jovens\\_Pesquisadores/06/4.6.04.pdf](http://www.mackenzie.br/fileadmin/Graduacao/CCSA/Publicacoes/Jovens_Pesquisadores/06/4.6.04.pdf)>. Acesso em: 23 jun. 2006.

FAN, L.; SOCCOL, A.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT-Food Science and Technology**, London, v.40, n.1, p. 30-35, Jan. 2007.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Waster & Grugter, 1984. 613p.

FIETZ, V.R.; SALGADO, J.M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicérides em ratos hiperlipidêmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p. 318-321, set. 1999.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, Oxford, v.5, n.1, p. 3-15, Mar. 2007.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p. 154-157, mar. 2007.

GERASIMENYA, V.P.; EFREMENKOVA, O.V.; KAMZOLINA, O.V.; BOGUSH, T.A.; TOLSTYCH, I.V.; ZENKOVA. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.;Fr.) Kumm. extracts. **International Journal of Medical Mushrooms**, Redding, CT, v.4, p.127-132, 2002.

GU, L.; BELURY, M. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.220, n.1, p.21-28, Mar. 2005.

HARADA, A.; GISUSI, S.; YONEYAMA, S.; AOYAMA, M. Effects of strain and cultivation medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypsizygus marmoreus*. **Food Chemistry**, London, v.84, n.2, p.265-270, Feb. 2004.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.30, n.4, p.454-466, Apr. 1999.

HUANG, S.; MAU, J.; Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of  $\gamma$ -irradiation. **Food Science and Technology**, London, v.39, n.7, p. 707-716, Sept. 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. 533p.

JAYAKUMAR, T.; RAMESH, E.; GERALDINE, P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.44, n.12, p.1989-1996, Dec. 2006.

JOSE, N.; AJITH, T.A.; JANANRDHANAN, K.K. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, CT, v.4, p.329-335, 2002.

KAWAGISHI, H., INAGAKI, R., KANAOKA, T. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.186, n.2, p. 267-273, Mar. 1989.

KERRIGAN, R.W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**. New York, v.97, n.1, p.12-24, Jan./Feb. 2005.

KERRIGAN, R.W. Inclusive and exclusive concepts of *Agaricus subrufescens* peck: a reply to Wasser et al. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, CT, v.9, p.79-84, 2007.

KIM, S.; KIM, H.; LEE, B.; HWANG, H.; BAEK, D.; KO, S. Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. **Clinical Nutrition**, Kidlington, Inglaterra, v.25, n.1, p.166-170, Feb. 2006.

KIM, Y.W.; KIM, K.H.; CHOI, H.J.; LEE, D.S. Anti-diabetic activity and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, Holanda, v.27, n.7, p. 483-487, Apr. 2005.

KIRK, T. K., SHIMADA, M. Lignin Biodegradation: the microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. In: Higuchi, T. (Ed.). **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. San Diego: Academic Press, 1985. cap. 21. p.579-605.

KOBAYASHI, H.; YOSHIDA, R.; KANADA, Y.; FUKUDA Y.; YAGYU, T.; INAGAKI K. et al. Suppressing effect of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murrill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.131, n.8, p. 527-538, 2005.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS letters**, Amsterdam, v.169, n.2, p. 247-250. Apr. 1984.

LECHNER, B.E.; PAPINUTTI, V.L. Production of lignocellulosic enzyme during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, London, v.41, n.3, p. 594-598, Mar. 2006.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WAJTAS-WASLEWSKA, M.; CHO, N.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.27, n.2-3, p.175-185, July 1999.

LIU, J.; VIJAYAKUMAR, C.; HALL III, C.A.; HADLEY, M.; WOLF-HALL, C.E. Sensory and chemical analyses of oyster mushrooms (*Pleurotus sajor-caju*) harvested from different substrates. **Journal of food science and technology**, Chicago, v.70, n.9, p.586-592, Nov. 2005.

LIU, X.; WANG, Q.; CUI, S.W.; LIU, H. A new isolation method of  $\beta$ -glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.22,2, p.239-247, Mar. 2008.

MACHADO, M.P.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI M.S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/ HGPRT gene mutation assay. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.19, n.4, p. 533-39, June 2005.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e Aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MAMIRO, D.P.; ROYSE, D.J. The influence of spawn type and strain on yield, size and mushrooms solids content of *Agaricus bisporus* produced on non-composted and spent mushroom compost. **Bioresource Technology**, Essex, Inglaterra, v.99, n.8, p.3205-3212, May 2008.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R.  $\beta$ -glucans in promoting health: Prevention against mutation and câncer. **Mutation Research**, v.658, p.154-161, 2008.

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

MATTILA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, PA, v.49, p.2343-2348, Apr. 2001.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C., Lacase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v.60, n.6, p.551-565, July 2002.

MCCLEARY, B.V.; GLENNIE-HOLMES, M. Enzymic quantification of (1-3) (14) -  $\beta$ -D-glucan in barley and malt. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.91, n.5, p.285-295, 1985.

MENOLI, R.C.N.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; GUNTER, S.; JORDÃO, B.Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, USA, v.496, n.1-2, p. 5-13, Sept. 2001.

MESSERSCHIMIDT, A. Bleu copper oxidases. **Advances in Inorganic Chemistry**, Orlando, v.40, p.121-185, 1993.

MILES, P.G.; CHANG, S.T. **Biologia de lass etas**: fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Hong Kong: Word Scientific, 1997. 133p.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. **Agric Biol Chem**, v. 54 p.2889–2896, 1990.

NELSON, N.A. A photometric adaptation of Somog method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.135, p. 136-175, 1944.

NEVES, M.A.; KASUYA, M.C.M.; ARAÚJO, E.F.; LEITE, C.L.; CARMELINI, C.M.; RIBAS, L.C.C.; MENDONÇA, M.M. Physiological and genetic variability of commercial isolates of culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetidae) cultivated in Brazil. **International Journal of Medical Mushrooms**, Redding, CT, v.7, n.4, p.553-563, 2005.

NOBLE, R.; GAZE, R.H. Preparation of mushroom (*Agaricus bisporus*) composts in controlled environments: Factors influencing compost bulk density and productivity. **International biodeterioration biodegradation**, Barking, Inglaterra, v.37, n.1-2, p.93-100, 1996.

OLIVEIRA, J.M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA A.F.; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.40, n.1-2, p.15-20, Dec. 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, A.L. Determinação da concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n. 3, p. 312-316, mar. 2003.

PRAMANIK, M.; CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ISLAM, S.S. Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr. I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.342, n.17, p.2670-2675, Dec. 2007.

- PROSKY, L.; ASP, N.; 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 Chemists**, Arlington, Va, v.71, n.5, p.1017-1023, Sept./Oct. 1988.
- RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus spp.* Grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, Oxford, v.80, n.3, p. 371-375, Mar. 2003.
- RAJARATHAN, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. **Critical Reviews in food Science and nutrition**, Boca Raton, Fla., v.28, n.1, p.31-113, 1989.
- RHEE, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, K.M.; CHA, D.; PARK, H. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble  $\beta$ -glucan in medical mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). **Food Science And Technology**, London, v.41, n. 3, p.545-549, Apr.2008.
- ROHELLA, R.S., SAHOO, N., PAUL, S.C., CHOUDHURY, S., CHAKRAVORTTY, V. Thermal studies on isolated and purified lignin. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v.287, n.1, p.131-138, Sept.1996.
- SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S.K.; MALLICK, S.K.; MAITI, T.K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.6, n.8, p.1287-1297, Aug. 2006.
- SAVOIE, J. M.; BRUNEAU, D.; MAMOUN, M. Resource allocation ability of wild isolated of *Agaricus bisporus* on conventional mushroom compost. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.21, n.4, p. 285-289, Dec. 1996.
- SCHWAN, R. F. ; MENDONÇA, A. T. ; SILVA JÚNIOR, J. J. ; RODRIGUES, V. ; WHEALS, A. E. . Microbiology and Physiology of cachaça (aguardente ) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.79, n.1, p. 89-96, Jan. 2001.
- SILVA, D.J. **Análise de Alimentos**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 1998. 165p.

SILVA, E.G.; DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G.; SCHWAN, R.F. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.72-75, mar. 2007.

SHIMADZU. **Application data book**. Japan: Shimadzu, 1998?. 104p. (Catálogo C190-E001).

SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M.; MACHONKIN, T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical reviews**, Washington, v.96, n.7, p.2563-2606, Nov. 1996.

SOUZA, C. G.M.; ZILLY, A.; PERALTA, R.M. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.42. p. 83-90. 2002.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolics constituents of *Prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the science of food and agriculture**, London, v.10, n.1, p. 63-68, Mar.1959.

TAN, Y.H.; WAHAB, M.N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible ushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World journal of microbiology & biotechnology**, Oxford, v.13, n.6, p. 613-617, Nov. 1997.

TIEN, M.; KIRK, K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.81. n.8, p. 2280-2284, Apr. 1984.

TOMIZAWA, M.M.; DIAS, E.S.; ASSIS, L.J.; GOMIDE, P.H.O.; SANTOS, J.B. Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using markers RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v.31, n.4, p. 1242-1249, July 2007.

TORO, G.V.; VAGA, R.C.; GARÍN-AGUIAR, M.E.; LARA, H.L. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus spp.* **Food Chemistry**, London, v.94, n.4, p. 494-497, Mar. 2006.

TREVELYAN, W.E.; HARRISON, T.S. Dosagem de glicídeos totais pelo método de antrona. **The Journal of biochemistry**, Tokyo, JP, v.50, p. 292, 1952.

TSAI, S.; TSAI, H.; MAU, J.; Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Food Chemistry**, London, v.107, n.3, p. 977-983, Apr. 2008.

TUOR, U., WINTERHALTER, K., e FIECHER, A., Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.4, n.1, p.11-17, July 1995.

ULLRICH, R.; HUONG, L.M.; DUNG, N.L.; HOFRICHTER, M. Laccase from the medical mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v.67, n.3, p.357-363, May 2005.

URBEN, A.F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2.ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 187p.

WANG, H.X.; GAO, J. A new lectina with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and biophysical research communications**, Orlando, v.275, n.3, p.810-816, Sept.. 2000.

WASSER, S.P. Molecular identification of species of the genus *Agaricus*. Why should we look at morphology? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, CT, v.9, n.1, p.85-88, 2007.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M.A.L.A.; NEVO, E.; STAMES, P.; EIRA, A.F. IS a widely cultivated culinary-medicinal mushroom indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, CT, v.4, n.4, p.267-290, 2002.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology advances**, New York, v.22, n.1-2, p. 161-187, Dec. 2003.



YANG, J.; LIN, H.; MAU, J. Non-Volatile taste components of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, London, v.72, n.4, p.465-471, Mar. 2001.

YOSHIMURA, K.; UEDA, N.; ICHIOKA, K.; MATSUI, Y.; TERAJ, A.; ARAI, Y. Use of complementary and alternative medicine by patients with urologic cancer: a prospective study at a single Japanese institution. **Supportive care in cancer**, Berlin, v.13, n.9, p.685-690, Sept. 2005.

XU F. Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, Washington, v.35, n.23, p.7608-7614, June 1996.

ZUSMAN, I.; REIFEN, R.; LIVNI, O.; SMIRNOFF, P.; GUREVICH, P.; SANDLER, B. Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed comcob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*. **Anticancer Research**. v.17, p.105-113, May/Jun.1997.