



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ALEXANDRA DE SOUZA**

**MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO**  
**DE BASIDIOMICETOS**

Vitória da Conquista, BA  
2016

**ALEXANDRA DE SOUZA**

**MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DE  
BASIDIOMICETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA  
2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Souza, Alexandra de

Métodos de criopreservação para manutenção de basidiomicetos. 2016. 144 f.

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

144 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2016.

1. Basidiomicetos. 2. Fungos. 3. Criopreservantes. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Siqueira, Félix Gonçalves de. III. Título.

CDU: 582.284.3

**ALEXANDRA DE SOUZA**

**MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DE  
BASIDIOMICETOS**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
BIOCIÊNCIAS E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, 13/12/2016.

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. FELIX GONÇALVES DA SIQUEIRA (ORIENTADOR)

EMBRAPA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. RICARDO EVANGELISTA FRAGA (EXAMINADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

  
\_\_\_\_\_  
PROF.ª DR.ª PATRICIA LOPES LEAL (EXAMINADORA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

*À*

*Maria Cecília,*

*minha filha por ser o elemento essencial  
que transborda em mim a essência do amor e da esperança.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar momentos de extrema fé.

À Telma pelo companherismo durante o percurso na realização desse sonho.

À minha mãe por sempre ouvir os meus desabafos nas horas difíceis e me amparar em seu seio em todos os momentos.

À minha filha, razão da minha força e inspiração.

Ao Félix Gonçalves de Siqueira, orientador querido, amigo e um grande mestre.

À Clemente, por me influenciar e auxiliar grandemente na realização desse sonho.

À Carla, amiga e companheira, por me possibilitar experiências enriquecedoras e pelo auxílio na realização dos experimentos.

À Joice e ao Rubén, pelo auxílio nos experimentos enzimáticos, pelos conselhos e amizade.

À Marivane que me auxiliou nos últimos momentos da escrita desse trabalho.

À UFBA, pelo apoio constante, principalmente na figura de seus docentes, sempre dispostos a ajudar e encorajar.

Aos colegas do programa Biociências, pela amizade.

Aos colegas do laboratório LPB (Laboratório de Processos Bioquímicos) da Embrapa Agroenergia, pela amizade, companheirismo e ajuda mútua.

Agradeço a disponibilidade de infraestrutura, bem como a significativa credibilidade em meu trabalho por meio de suportes financeiros:



Programa de Pós-Graduação em Biociências  
Universidade Federal da Bahia



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
Embrapa Agroenergia



*Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico*

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Projeto CNPq/Embrapa FungiDetox

*Não é o mais forte que sobrevive,*

*nem o mais inteligente.*

*Quem sobrevive é o mais disposto à mudança.*

*Leon C. Megginson (1963)*

Louisiana State University

## RESUMO

SOUZA, A. Métodos de criopreservação para manutenção de basidiomicetos. 2016. 144f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

Fungos filamentosos ou basidiomicetos, são empregados com as mais diversas funções na agricultura, pecuária, na indústria alimentar e na medicina como parte da produção de enzimas, vitaminas, antibióticos, álcool, biosurfactantes, entre outros. Atualmente, existe a dificuldade da criopreservação de basidiomicetos por longos períodos. A conservação de células sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas é uma necessidade da área biotecnológica. A sub-cultura é o método com 100% de viabilidade e recuperação. Subculturas contínuas são um dos métodos mais utilizados para a preservação de alguns macrofungos. Esta técnica pode alterar as características das espécies, por isso é necessário desenvolver técnicas para a manutenção de genótipos e fenótipos por longos períodos de tempo. O objetivo deste estudo foi avaliar a manutenção e preservação de 33 basidiomicetos frente a 10 diferentes protocolos de criopreservação: repique contínuo (BDA); 2) carvão ativado 0,1%; 3) água estéril (Castellani); 4) glicerol 5%; 5) lactose 5%; 6) dimetilsulfóxido (DMSO) 1%; 7) polietilenoglicol (PEG) 6000 3%; 8) glicerol 5% acrescido de polietilenoglicol (PEG) 6000 3%; 9) lactose 5% acrescido de PEG 6000 3% e 10) DMSO 1% acrescido de PEG 6000 3%, sendo posteriormente avaliada sua viabilidade após 4 e 8 meses em  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ . O micélio cultivado em agar de batata-dextrose (BDA) foi armazenado ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) com os crioprotetores glicerol a 5%, dimetilsulfóxido (DMSO) 1%, lactose 5% e misturas destes com PEG 6000 3%, além de métodos clássicos de preservação tais como subcultura (BDA), Castellani e carvão ativado, preservados a  $8^{\circ}\text{C}$ . Após 4 meses de armazenamento, os discos do micélio provenientes de todos os diferentes métodos foram transferidos para meio de ágar com carvão ativado para avaliar a viabilidade e o diâmetro da colônia micelial. Após o crescimento, o micélio foi inoculado em meio líquido para determinar o conteúdo de biomassa e polissacarídeos de *A.subrufescens*CC414. Todos os crioprotetores utilizados asseguraram a viabilidade do fungo durante o período analisado (4 meses de armazenamento). De acordo com os resultados, os métodos 4 (glicerol) e 9 (lactose + PEG 6000) foram os métodos que estão mais próximos dos valores observados nos métodos controles 1, 2 e 3, sugerindo que esses métodos foram mais adequados para criopreservação a  $-80^{\circ}\text{C}$ , quando comparados com os resultados comumente obtidos para a preservação de microrganismos. Após 8 meses os fungos foram novamente retirados da criopreservação e avaliados quanto a viabilidade e atividades de enzimas. A criopreservação em mistura de criopreservantes glicerol 5% + PEG 6000 3% em  $-80^{\circ}\text{C}$  apresentou-se mais eficiente na manutenção da homeostase da maioria das espécies de fungos avaliados, mantendo sua porcentagem de viabilidade após sua recuperação, demonstrando que suas enzimas  $\beta$ -glicosidade, xilanase, laccase, peroxidase total e manganês peroxidase para os fungos *Lentinus strigosus*CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404 não apresentaram grandes variações de atividade quando comparadas com o controle BDA.

**Palavras-chaves:** Criopreservantes. Fungos. Viabilidade



## ABSTRACT

SOUZA, A. Cryopreservation methods for basidiomycete maintenance.2016. 144 p. Dissertation (Master). Postgraduate Program in Bioscience – Federal University of Bahia, 2016.

Filamentous fungi, or basidiomycetes, are employed with the most diverse functions in agriculture, livestock, food industry and medicine as part of the production of enzymes, vitamins, antibiotics, alcohol, biosurfactants, among others. Currently, there is the difficulty of cryopreservation of basidiomycetes for long periods. The conservation of cells without morphological, physiological or genetic changes is a necessity of the biotechnological area. Subculture is the method with 100% viability and recovery. Continuous subcultures are one of the most used methods for the preservation of some macrofungi. This technique can alter the characteristics of the species, so it is necessary to develop techniques for the maintenance of genotypes and phenotypes for long periods of time. The objective of this study was to evaluate the maintenance and preservation of 33 basidiomycetes against 10 different cryopreservation protocols: continuous peaking (BDA); 2) activated carbon 0.1%; 3) sterile water (Castellani); 4) 5% glycerol; 5) 5% lactose; 6) 1% dimethylsulfoxide (DMSO); 7) 3% polyethylene glycol (PEG) 6000; 8) 5% glycerol plus 3% polyethylene glycol (PEG) 6000; 9) 5% lactose plus 3% PEG 6000 and 10) 1% DMSO plus 3% PEG 6000, after which its viability was evaluated after 4 and 8 months at  $6 \pm 2$  ° C and  $-80$  ° C. The mycelium cultured on potato-dextrose agar (BDA) was stored ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) with the cryoprotectants 5% glycerol, 1% dimethylsulfoxide (DMSO), 5% lactose and mixtures thereof with 3% PEG 6000, in addition to methods preservation classics such as subculture (BDA), Castellani and activated charcoal, preserved at  $8^{\circ}\text{C}$ . After 4 months as storage, the mycelial discs from all different methods were transferred to activated charcoal agar medium to assess viability And the diameter of the mycelial colony. After growth, the mycelium was inoculated in liquid medium to determine the content of biomass and polysaccharides of *A. subrufescens* CC414. All the cryoprotectants used ensure the viability of the fungus during the analyzed period (4 months of storage). According to the results, methods 4 (glycerol) and 9 (lactose + PEG 6000) are methods that are closer to the values observed in control methods 1, 2 and 3, suggesting that these methods are more suitable for cryopreservation at  $-80^{\circ}\text{C}$ , when compared with results commonly obtained for the preservation of microorganisms. After 8 months the fungi were again removed from the cryopreservation and assessed the feasibility and enzyme activities. Cryopreservation in cryopreservants 5% glycerol + 3% PEG 6000 at  $-80$  ° C was more efficient in maintaining the homeostasis of most fungi species evaluated, maintaining its viability percentage after its recovery, demonstrating that Its enzymes  $\beta$ -glucosidase, xylase, laccase, total peroxidase and manganese peroxidase for the fungi *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 and *Ganoderma lucidum* CC404 do not present large variances of activity when compared to the PDA control.

**Keywords:** Cryopreservants. Fungi. Viability

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corpo de frutificação, cogumelos, presentes em alguns fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota. ....	15
<b>Figura 2.</b> Subdivisão do reino Fungi. ....	17
<b>Figura 3.</b> Características do ciclo de vida dos fungos basidiomicetos, representados por dois estágios miceliais, sexuado e assexuado.....	18
<b>Figura 4.</b> Subdivisão do filo Basidiomycota. ....	20
<b>Figura 5.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Coprinus comatus</i> . ....	23
<b>Figura 6.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Agaricus subrufescens</i> . ....	24
<b>Figura 7.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Agaricus bitorquis</i> .....	26
<b>Figura 8.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Hypsizygus marmoreus</i> . ....	27
<b>Figura 9.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Lentinula edodes</i> . ....	28
<b>Figura 10.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Flammulina velutipes</i> . Em A, forma cultivada e em B, forma selvagem.....	29
<b>Figura 11.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Oudemansiella canarii</i> .....	30
<b>Figura 12.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Pleurotus</i> spp.. ....	32
<b>Figura 13.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Volvariella volvacea</i> . ....	35
<b>Figura 14.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Fistulina hepatica</i> . ....	36
<b>Figura 15.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Schizophyllum commune</i> .....	37
<b>Figura 16.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Pholiota nameko</i> . ....	38
<b>Figura 17.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Auricularia auricula-judae</i> .....	40
<b>Figura 18.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Auricularia fuscosuccinea</i> . ....	40
<b>Figura 19.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Ganoderma lobatum</i> . ....	41
<b>Figura 20.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Ganoderma lucidum</i> . ....	42
<b>Figura 21.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Grifola frondosa</i> . ....	43
<b>Figura 22.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Lentinus strigosus</i> . ....	45
<b>Figura 23.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Lentinus sajor-caju</i> . ....	46
<b>Figura 24.</b> Aspecto geral do corpo de frutificação de <i>Trametes</i> spp. ....	47

**Figura 25.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Pycnoporus sanguineus*. .....48

**Figura 26.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Hericiium erinaceus*.....49

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Características dos principais métodos de preservação .....	55
<b>Tabela 2.</b> Macrofungos pertencentes à micoteca da Embrapa Cenargem utilizados neste trabalho. ....	62

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**ABTS** – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

**BCA** – *Bicinchoninic acid assay*

**BDA** – Batata-dextrose-ágar

**CC** – Coleção Cenargen

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DNS** – ácido 3,5 dinitrosalicílico

**GOD-POD**–sistema enzimático glicose oxidase e peroxidase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**HPLC-IR** – *High performance liquid chromatography with refractive index detector*

**MnSO<sub>4</sub>** – sulfato de manganês

**NaOH** – hidróxido de sódio

**PEG** – polietilenoglicol

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 O REINO FUNGI .....	15
2.2 Os fungos basidiomicetos em estudo.....	17
2.3 A importância biotecnológica dos fungos .....	50
2.4 Métodos de criopreservação e manutenção de micotecas .....	53
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
3.1 Objetivo geral .....	59
3.2 Objetivos específicos .....	59
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
4.1 Obtenção dos macrofungos .....	60
4.2 Métodos de preservação comuns .....	60
4.2.1 <i>Repique contínuo em meio BDA</i> .....	60
4.2.2 <i>Água destilada estéril</i> .....	60
4.2.3 <i>Carvão ativado</i> .....	61
4.3 Métodos de criopreservação propostos.....	63
4.4 Determinação da porcentagem de viabilidade micelial .....	63
4.5 Análises de polissacáridos de <i>Agaricus subrufescens</i> CC414.....	64

4.6	Análise das atividades enzimáticas em <i>Lentinus strigosus</i> CC40, <i>Volvariella volvacea</i> CC94, <i>Fistulina hepatica</i> CC102, <i>Pleurotus ostreatus</i> CC389 e <i>Ganoderma lucidum</i> CC404 .....	65
4.6.1	Determinação da atividade da $\beta$ -glicosidase .....	65
4.6.2	Determinação da atividade da xilanase .....	66
4.6.3	Determinação da atividade da lacase .....	67
4.6.4	Determinação da atividade da peroxidase totais .....	67
4.6.5	Determinação da atividade da manganês peroxidase.....	67
4.6.6	Determinação de proteínas totais pelo método de albumina de soro bovino – BCA .....	68
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 1 - Assessment of the viability and production of <math>\beta</math>-glucans by <i>Agaricus subrufescens</i> CC414 (syn. <i>A. blazei</i>, <i>A. brasiliensis</i>) after cryopreservation.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 2 - Basidiomycetes cryopreservation in different protocols and its effects on enzymatic activities.....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Existe na natureza uma homeostase na renovação dos materiais biológicos, onde há um tempo para a matéria biológica crescer e morrer. Durante esse processo, muitas funções dos organismos irão se adaptar, mudar e serão perdidas com o tempo. O intuito de parar ou mudar o relógio biológico na tentativa de conservar estas informações data de tempos remotos, sendo de extrema importância para conservação de amostras biológicas a longo prazo (COSTA et al., 2009).

Existem milhares de coleções e bancos de dados, com centenas de milhares de amostras das mais variadas origens, incluindo células humanas, animais e vegetais, além de bactérias, vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), são armazenadas a cada ano com propósitos diagnósticos e de pesquisa (COSTA et al., 2009).

Os basidiomicetos são organismos saprobióticos responsáveis pela renovação dos nutrientes, atuando no final do ciclo do carbono. Representam mais de 30000 espécies de basidiomicetos no mundo todo, estimando-se quase 6000 espécies somente no Brasil (ARORA, 1986; KIRK et al., 2008). É crescente o interesse sobre o estudo desses organismos, devido as suas aplicações biotecnológicas em diversos processos, nas áreas da agricultura, pecuária, na indústria alimentar e na medicina como parte da produção de enzimas, vitaminas, antibióticos, álcool, biosurfactantes, entre outros (CAMEOTRA, 2007; FEOFILOVA et al., 2009).

Assim, torna-se necessário a preservação *ex situ* de tais organismos em centros de pesquisa, e a manutenção de uma coleção de microrganismos envolve o estudo de diversos fatores, tais como a preservação de suas características genéticas e fenotípicas (COLAUTO; EIRA; LINDE, 2012). A manutenção e a preservação de culturas fúngicas são elementos essenciais para estudos de sistemática e também de biodiversidade. Por ser o grupo tão diverso, são necessários vários métodos de cultivo e preservação com o objetivo de garantir a viabilidade mantendo as características morfológicas, fisiológicas e a integridade genética das culturas ao longo do tempo (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

A replicagem contínua é o método de rotina para a preservação mais comumente empregado, porém apresenta inconvenientes, tais como, a necessidade de um espaço para armazenamento de um grande número de culturas. Além disso, depende de grande tempo para sua manutenção, é sujeito a contaminação, e não impede que ocorram alterações genéticas e fisiológicas. Por outro lado, esta técnica é barata, pouco exigente, e aplicável universalmente e é, atualmente, utilizada na maioria das coleções de cultura com fundos



limitados e também em muitas coleções (incluindo os mais proeminentes) como um segundo método além de criopreservação ou liofilização (EICHLEROVÁ; HOMOLKA, 2014; HOMOLKA, 2014)

No Brasil, as coleções geralmente são gerenciadas por pesquisadores de campo, sendo coleções muito pequenas, onde é comum a perda de material biológico por manipulações impróprias (COLAUTO; EIRA; LINDE, 2012; MANTOVANI et al., 2008). Dessa forma, faz-se necessário a busca por novas ou adaptações de métodos de preservação a longo prazo e que de preferência possam apresentar baixos custos, ou diminuição da manipulação e mão de obra envolvidos.

Devido à importância dos basidiomicetos no ciclo de carbono e renovação de nutrientes, atualmente existe um apelo industrial muito grande no uso de basidiomicetos para o processamento de biomassas provenientes de outras cadeias de produção, como por exemplo a cadeia do açúcar e etanol (bagaço de cana) (HOMOLKA, 2014).

Os fungos ser mantidos preservados em coleções de culturas em centros de conservação de recursos genéticos ex-situ, que tem como funções a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de micro-organismos e células autenticadas, e reagentes biológicos certificados, atuando também como provedoras de serviços especializados e centros de informação (DAY; STACEY, 2007; HUBÁLEK, 2003; MERYMAN, 2007).

Vários métodos têm sido propostos a fim de desenvolver o armazenamento adequado para basidiomicetos, que apresentem menos desvantagens, ou seja, que não dispendam de grande tempo de manutenção e maior custo. Segundo Homolka (2014), até o momento, não existe um método ideal de criopreservação, sendo necessário o seu desenvolvimento, ou a otimização de algum método já existente.

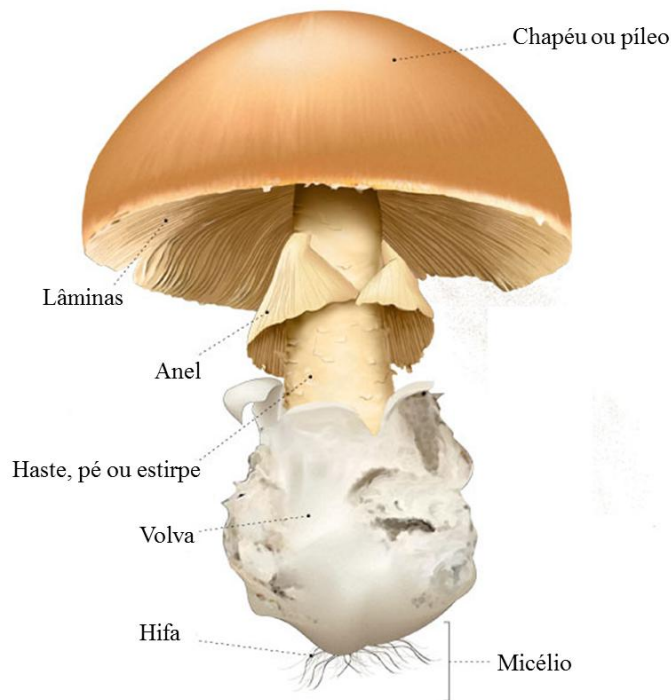
A organização de uma coleção biológica aliadas a métodos de preservação mais eficientes permitem um grau de confiabilidade nas informações adquiridas que serão posteriormente utilizadas em diversos processos de exploração da diversidade genética e metabólica.

Pensando nesses conceitos, este trabalho visa desenvolver métodos de criopreservação para diferentes fungos basidiomicetos com o uso de diferentes agentes criopreservantes em - 80 °C e comparar a atividade metabólica com a sub-cultura (repique contínuo).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O reino fungi

Fungos são organismos eucariotos que se apresentam sob a forma de leveduras e bolores, além dos característicos cogumelos, representados por corpo frutífero (**Figura 1**) observados nos fungos do filo Basidiomycota e alguns Ascomycota. Os mesmos apresentam papel fundamental na manutenção do equilíbrio ambiental, pois promovem a decomposição e reciclagem de matéria orgânica (saprobiótico), tais como madeira e folhas, alimentos ou outros seres vivos, de forma parasita ou comensal (CENCI et al., 2011; DIGHTON, 2016; RAPER, 2002; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).



**Figura 1.** Corpo de frutificação, cogumelos, presentes em alguns fungos dos filios Basidiomycota e Ascomycota.

Fonte: adaptado de <http://www.ikonet.com>

A palavra fungo deriva do latim *fungus*, que significa cogumelo. Por sua vez, *fungus* deriva da palavra grega *sphongos*, que significa esponja, em alusão as suas características morfológicas macroscópicas (SIMPSON, 1979). Através da descrição baseada na morfologia e modo de nutrição dos seres vivos, Whittaker (1969) propôs a separação dos seres vivos em cinco grandes reinos, sendo o reino Fungi composto por fungos, separado das plantas, animais e bactérias. O estudo dos fungos denomina-se Micologia, derivado do grego *mykes* (cogumelo) e *logos* (discurso, falar sobre), e é geralmente – e erroneamente – apresentada

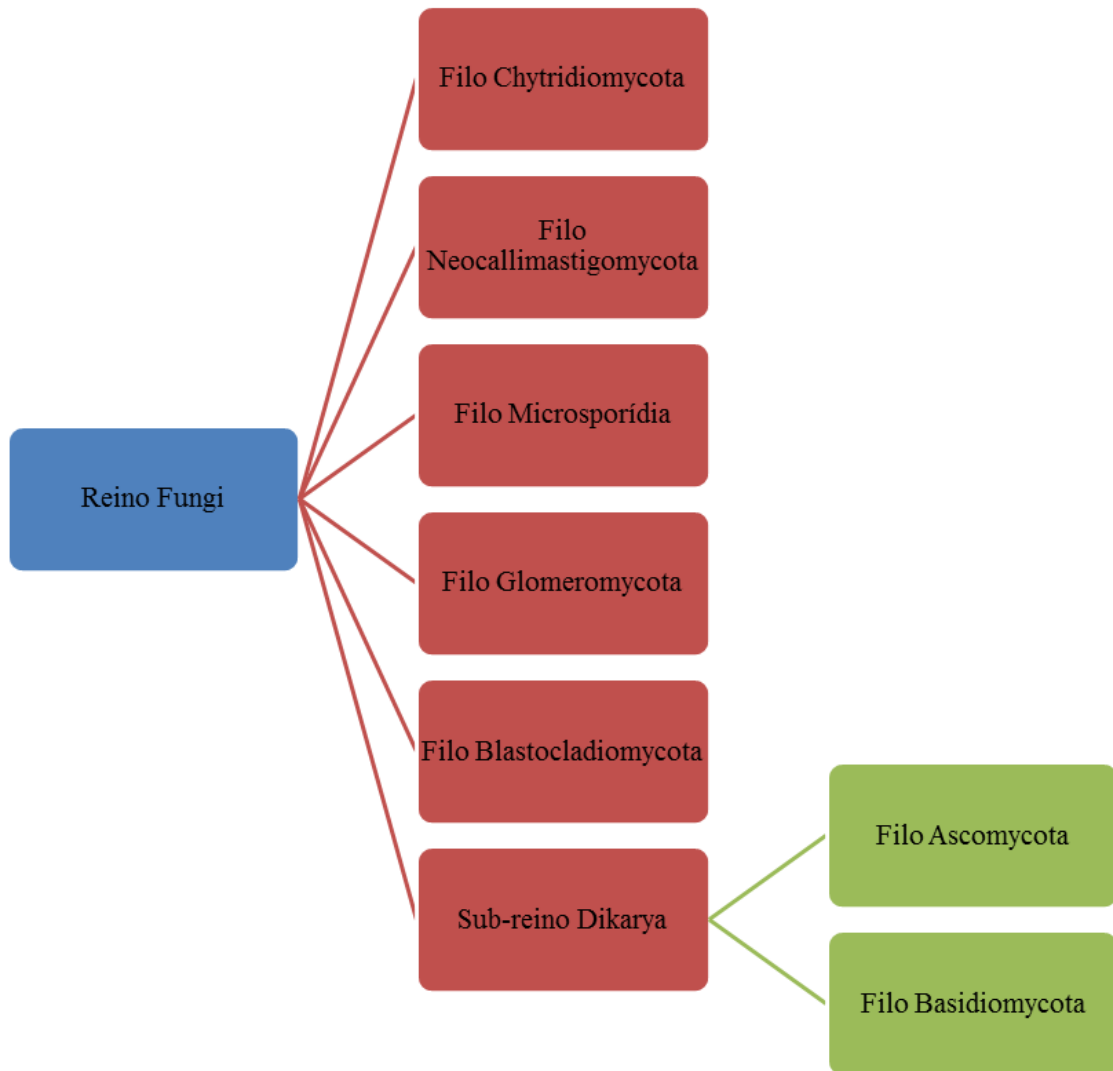
como um ramo da Botânica, apesar de estudos genéticos demonstrarem a maior semelhança dos fungos com os animais do que com os vegetais (INGOLD; HUDSON, 1993; SCHALCHIAN-TABRIZI et al., 2008; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).

Os fungos são encontrados em praticamente todos os ambientes, inclusive em suspensão no ar em forma de estruturas reprodutivas (esporos e conídios), que ao cair em um substrato adequado desenvolvem novas estruturas vegetativas e reprodutivas (DEACON, 2013; INGOLD; HUDSON, 1993).

A célula fúngica é composta pelos principais componentes e estruturas celulares encontrados nas células eucarióticas, tais como polissacarídeos, representados como fibras, fonte de proteínas, ricas nos aminoácidos arginina, glutamina e lecitina, uma pequena quantidade de lipídios, íons orgânicos como Na, K, Ca, Fe, Mg, P, Cu, Se, Zn, entre outros, além de vitaminas do complexo B, vitamina E e C. Esses nutrientes são obtidos do substrato onde o micélio encontra-se entremeadado. A extremidade da hifa é a região responsável pelo crescimento e apresenta um grande número de enzimas e ácidos orgânicos, que digerem o substrato formado por celulose, amido, açúcares, proteínas, gorduras e outros nutrientes em moléculas menores, sendo absorvidos pelo micélio e utilizados para o seu crescimento (DIGHTON, 2003; KIRK et al., 2008; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).

A principal diferença entre plantas e fungos, é que estes últimos possuem paredes celulares compostas por quitina e glicanas, enquanto que células vegetais possuem parede composta por celulose (RAVEN; EVERT; CURTIS, 2012). O reino Fungi é composto atualmente por 36 classes, 140 ordens, 560 famílias, 8283 gêneros e aproximadamente 97861 espécies, presumindo-se que possam existir até 1,5 milhão de espécies de fungos. Embora muitas espécies apresentem distribuição geográfica restrita, a maioria das espécies é cosmopolita (HAWKSWORTH, 1991; HERRERA; ULLOA, 1998; KIRK et al., 2008).

Com os avanços das técnicas bioquímicas, genéticas, e principalmente de biologia molecular, vários fungos apresentam-se polifiléticos, havendo a necessidade de que sejam novamente reclassificados. Através da reclassificação proposta em 2007 (HIBBETT et al., 2007), o reino Fungi foi dividido em sete filos: Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Neocallimastigomycota, Ascomycota e Basidiomycota, sendo os dois últimos integrantes do subreino Dikarya (KIRK et al., 2008). (**Figura 2**)



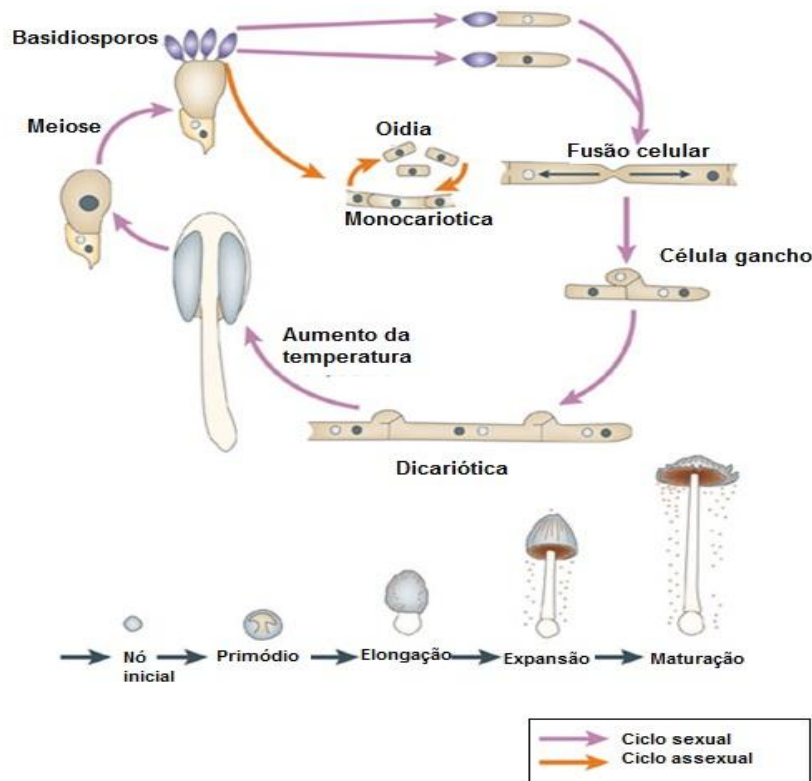
**Figura 2.** Subdivisão do reino Fungi.

Fonte: adaptado de Hibbett et al., 2007.

## 2.2 Os fungos basidiomicetos em estudo

O filo Basidiomycota, juntamente com o filo Ascomycota, correspondem ao sub-reino Dikarya, sendo os dois filios mais numerosos do reino Fungi. Apresenta cerca de 16 classes, 52 ordems, 177 famílias, 1.589 gêneros, e 31.515 espécies (KIRK et al., 2008). Geralmente, os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota são filamentosos, que podem ser encontrados tanto na forma miceliais quanto leveduriformes, sendo a primeira fase mais dominante. Os micélios são compostos por hifas (exceto leveduras) septada por poros, geralmente inflada, denominada doliporo. Lateralmente aos doliporos são observadas os parentossomos, membranas assim denominadas por lembrar a forma de parênteses (INGOLD; HUDSON, 1993; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).

O micélio na maioria das espécies apresenta duas fases distintas durante o ciclo de vida: monocariótica e dicariótica. O micélio inicial após a germinação do basidiospоро é multinucleado, sendo posteriormente que a formação dos septos o micélio é dividido em células uninucleadas (monocarióticas). Comumente pode ocorrer a formação de um micélio dicariótico ou secundário – fusão de hifas monocarióticas de diferentes linhagens, heterocariótico – dividindo-se pela formação de ansas, estruturas que asseguram a distribuição de um núcleo de cada tipo para células-filhas, e exclusiva nos Basidiomycotas (KIRK et al., 2008; RAPER, 2002). Sua reprodução pode ser de forma assexuada ou sexuada, sendo esta última com a formação de extremidade em forma de células especializadas denominadas basídios, que suportam externos meiosporos, por isso denominados basidiosporos. (Figura 3)



**Figura 3.** Características do ciclo de vida dos fungos basidiomicetos, representados por dois estágios miceliais, sexuado e assexuado.

Fonte: Adaptado de Casselton e Zolan, 2002.

O filo Basidiomycota ainda pode ser dividido em três subfilos (Figura 4):

1. Agaricomycotina: cogumelos, as orelhas-de-pau e as bolotas-da-terra

2. Pucciniomycotina: ferrugens
3. Ustilaginomycotina: carvões

Este estudo abrange os fungos pertencentes ao subfilo Agaricomycotina, que inclui fungos comestíveis e venenosos, colaroides – ou geléia, dentiformes e orelhas-de-pau. Seus basidiósporos são produzidos em uma camada fértil distinta, o himênio, que fica exposto antes da maturação dos esporos, demoninando-os de himenomicetos. Outro grupo são os gasteromicetos, não apresentam himênio visível por ocasião da liberação dos basidiósporos. Neste grupo inclui os cogumelos com aspecto fállico, as estrelas-da-terra, as bolotas-da-terra e os fungos ninhos de pássaro (HAWKSWORTH et al., 1996; INGOLD; HUDSON, 1993; RAPER, 2002).

Compreende as classes Tremellomycetes, Dacrymycetes e Agaricomycetes. Tremellomycetes é uma classe de fungos dimórficos. Algumas espécies têm corpo frutífero gelatinoso ou um parentossoma saculado. Estão divididos em 3 ordens, 11 famílias, 50 gêneros e 377 espécies em Tremellomycetes (HIBBETT et al., 2007; KIRK et al., 2008). Dacrymycetes é uma classe que consiste de apenas uma família de fungos gelatinosos com parentossomas imperfurados e basídios usualmente ramificados. Dividem-se 9 gêneros e 101 espécies na família Dacrymycetaceae (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; HIBBETT et al., 2007). Agaricomycetes é a classe mais numerosa do subfilo Agaricomycotina. Apresenta 17 ordens, 100 famílias, 1147 gêneros, e 20951 espécies. Os membros desta classe produzem basidiocarpos, que variam do tamanho de minúsculas taças até políporos gigantes de um metro de diâmetro (HIBBETT et al., 2007; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016). Este grupo inclui um organismo que é possivelmente o maior e mais antigo organismo da terra o micélio de *Armillaria gallica* – antes denominada *A. bulbosa*, que ocupa uma área de 43000 m<sup>2</sup> do parque Malheur National Forest, no estado de Oregon, USA, e apresenta a idade aproximada de 1500 anos (CASSELMAN, 2007; SMITH; BRUHN; ANDERSON, 1992).



**Figura 4.** Subdivisão do filo Basidiomycota.

Fonte: adaptado de Hibbett et al., 2007.

Os fungos utilizados neste estudo pertencem a subclasse Agaricomycetidae, com 19 espécies pertencentes à ordem Agaricales e *incertae sedis*, com 11 espécies pertencentes às ordens Auriculariales, Polyporales e Russulales.

A ordem Agaricales é uma das mais familiares, numerosas e importantes ordem de fungos. Seu corpo de frutificação é lamelado, ou euagárico, e apresentam vários cogumelos comestíveis, tais como os shimejis (*Pleurotus ostreatus*), cogumelo do sol (*Agaricus subrufescens*), ou o champignon (*Agaricus bisporus*), ou venenosos, tais como o anjo-destruidor-europeu (*Amanita virosa*), que possui diversas micotoxinas mortais, ou o agárico-das-moscas ou mata-moscas (*Amanita muscaria*) que contém muscarina, um estimulante de receptores muscarínicos, além de outras micotoxinas (muscimol e ácido ibotênico), ou ainda o cogumelo bioluminescente Jack, o lanterna (*Omphalotus olearius*), que contém a enzima luciferase (INGOLD; HUDSON, 1993; SHAFFER; SINGER, 1976; SINGER, 1986).

Foram classificados em *Systema Mycologicum* publicado entre 1821 e 1832 por Elias Fries, com base nos seus caracteres observáveis. Este sistema foi utilizado por anos devido a sua fácil utilização, sendo desafiado pela observação microscópica do basidiocarpo realizada por Fayod e Patouillard em meados de 1860, demonstrando que muitos agrupamentos propostos por Fries não eram adequados (KIRK et al., 2008). Quase cem anos Rolf Singer promove a reorganização da ordem Agaricales, baseando-se nas observações macroscópicas de Fries e nos achados microscópicos de Fayod e Patouillard (SINGER, 1986). Atualmente, com o avanço das técnicas de biologia molecular e o aprimoramento de estudos filogenéticos, a ordem passa por constantes mudanças, estando com mais de 13000 espécies descritas, distribuídos em 413 gêneros e 32 famílias (HIBBETT et al., 1997; MONCALVO; LUTZONI; REHNER, 2000; SHAFFER; SINGER, 1976; SINGER, 1986).

Os cogumelos da ordem Agaricales são cosmopolitas, sendo a maioria terrestre, com somente a *Psathyrella aquatica* o único representante de ambientes subaquáticos (FRANK; COFFAN; SOUTHWORTH, 2010). Os basidiocarpos dos agaricos são geralmente de aparência carnuda, com estirpe (chamados às vezes de haste, pé, caule ou talo), um píleo (chapéu, guarda-chuva ou tampão), e lâminas (lâminas ou brânquias), onde encontram-se os basidiosporos, e o micélio, constituído por uma trama de filamentos, onde cada filamento é chamado de hifa. O corpo de frutificação ou cogumelo é a parte visível do fungo em crescimento, sendo apoiado pelo micélio (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; ATKINSON, 2016; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016; WISITRASSAMEEWONG; KARUNARATHNA, 2012; YAMAGUCHI; HWANG; CAMPBELL, 1970).

O basidiocarpo apresenta na face inferior do píleo muitas lâminas dispostas radialmente, onde em sua superfície encontram-se os basídios, que através de meiose produzem os esporos (haploide). Em contato com um local adequado, rico em matéria orgânica, esses basidiosporos produzirão uma nova hifa, resultando em um novo micélio



(ainda haplóide). Quando a hifa de dois micélios diferentes se encontram, pode ocorrer a plasmogamia (fusão), que constitui a forma sexuada de reprodução dos basidiomicetos (dicarióticas), que futuramente irá se separar e tornar-se haploide, constituindo novo micélio e novos corpos de frutificação. A fusão de dois núcleos haploides resulta em uma célula diploide no interior dos basídios. Após, ocorre a divisão meiótica produzindo esporos, sendo a fase diploide representada pelo basidiocarpo e a fase haploide representada pelas células mononucleadas simples da hifa (**Figura 3**).

Os fungos pertencentes a ordem Agaricales aqui estudados foram os da família Agaricaceae, *Coprinus comatus*, *Agaricus subrufescens* e *Agaricus bitorquis*; *Hypsizygus marmoreus* da família Lyophyllaceae; *Lentinula edodes*, pertencente à família Marasmiaceae; *Flammulina velutipes* e *Oudemansiella canarii*, da família Physalacriaceae; *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus columbinus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus citrinopileatus*, pertencentes à família Pleurotaceae; *Volvariella volvacea*, da família Pluteaceae; *Fistulina hepatica*, da família Fistulinaceae, *Schizophyllum commune*, membro da família Schizophyllaceae e *Pholiota nameko*, espécie pertencente à Strophariaceae.

A família Agaricaceae foi assim nomeada em função do seu gênero *Agaricus* spp., e atualmente apresenta cerca de 85 gêneros e 1340 espécies (KIRK et al., 2008). Com relação ao corpo de frutificação apresentam ampla variabilidade morfológica, normalmente sendo gasteroides ou secotioides, com lâminas finas e livres do estirpe. Seus esporos apresentam uma ampla gama de cores, que vão do branco ao esverdeado, além do rosa ou sépia. Espécies da família Lycoperdaceae se apresentam sob a forma de bolas, com corpos frutíferos redondos (*puffballs*), sendo basidiomas globosos a subglobosos (CANNON; KIRK, 2007).

A espécie *Coprinus comatus*, também encontrado sob as sinonímias de *Agaricus cylindricus*, *Agaricus comatus* e *Agaricus vaillantii*, é conhecido popularmente como “tampa de tinta desgrenhado”, “peruca de advogado” ou “juba desgrenhada” (**Figura 5**). É comum em campos, beira de estradas e áreas com resíduos, frutificando geralmente no outono. É um excelente cogumelo comestível quando jovem, desde que seu consumo seja imediatamente após a colheita, pois promove auto digestão de suas lâminas e píleo, liquefazendo-se em 6 horas. Para armazenamento a longo prazo se faz necessário cozimento prévio antes do congelamento (CHAIYAMA; PETCHARAT; KRITSANEPAIBOON, 2007).

Apresenta píleo em forma ovoide quando jovem, depois campanulado de cor branca, coberto por escamas da mesma cor ou levemente castanhas. No ápice apresenta uma espécie de pequeno chapéu de cor ocre, parecido com uma pequena folha. Carne branca e bastante

frágil, de odor suave e sabor agradável. Seu tamanho aproximado é de 5 a 15 cm de altura, com 3 a 4 cm de comprimento. Possui margem estria e lâminas inicialmente brancas quando jovem, depois rosas, sendo substituída posteriormente pela coloração preta quando velhos, exsudando líquido preto no final da vida, responsável pelo nome de tampa de tinta. Estirpe dura e fibrosa, oca e com um pequeno anel branco, terminando em forma de bulbo e separável do píleo (JANG et al., 2009).

A espécie é cultivada na China como alimento, sendo por vezes confundido com *Coprinopsis atramentaria*, que contém coprinina, cicloamino-propanona com efeitos similares ao dissulfiram e responsável pela síndrome coprínica, interferindo no metabolismo do etanol e apresentando toxicidade quando ingeridos concomitantemente (KÖPPEL, 1993; LAMPE, 1979; MICHELOT, 1992).



**Figura 5.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Coprinus comatus*.

Fonte: <http://www.mykoweb.com>

O interesse comercial sobre o *Coprinus comatus* é crescente, pois há relatos na literatura indicando efeitos sobre a saúde humana, tais como atividades hipoglicemiante (BAILEY et al., 1984; DING et al., 2010; HAN et al., 2006; HAN; CUI; WANG, 2008; YAMAC et al., 2009), nematicida (LUO et al., 2004, 2007), antitumoral e regulador hormonal (ASATIANI et al., 2011; DOTAN; WASSER; MAHAJNA, 2011; ZAIDMAN et al., 2008), além de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (ASAHI et al., 2015; LI et al., 2010; POPOVIĆ et al., 2010; TSAI; TSAI; MAU, 2009; YU et al., 2009). Do ponto de vista ambiental, o *Coprinus comatus* é um bioremediador, podendo ser utilizado na recuperação de áreas condenadas pela poluição (FALANDYSZ, 2016).

O *Agaricus subrufescens* é um cogumelo comestível e medicinal que possui grande interesse econômico (**Figura 6**). É conhecido como Cogumelo Era Dourada, Cogumelo do

Sol, Himematsutake, Royal Sun Agaricus, Cogumelo Amêndoa, Cogumelo da Vida, Cogumelo de Deus, Jisongrong, entre outros. Também é conhecido erroneamente sob as sinônimas científicas de *A. blazei*, *A. brasiliensis*, *A. rufotegulis*, *Fungus subrufescens* ou *Psalliota subrufescens* (KERRIGAN, 2005; WISITRASSAMEEWONG; KARUNARATHNA, 2012).

Possui sabor adocicado que lembra nozes e aroma de amêndoas, devido a presença de benzaldeído, álcool benzílico, benzonitrila e benzoato de metila (CHEN; WU, 1984). O píleo inicialmente é hemisférico, tornando-se convexo e apresentando um diâmetro variável de 5 a 18 cm. A superfície é coberta com fibras que parecem seda ao toque, que com o passar do tempo torna-seesquamuloso (pequenas escamas agregadas). A sua cor varia do branco, levemente cinza ou marrom avermelhado e geralmente altera-se com a idade. A carne é branca, e suas lâminas, dispostas radialmente não estão ligadas à estirpe, que apresenta 6 a 15 cm de comprimento, com 1 a 1,5 cm de espessura, sendo bulboso na base. É inicialmente lisa, tornando-se oca e flocosa, sendo escamosa à base. As lâminas possuem cor esbranquiçada quando jovem, passando ao rosa e finalmente ao preto-marrom quando os esporos amadurecem. O anel é liso e esbranquiçado, dobrado para baixo em direção à estirpe e coberto de escamas que parece algodão (KERRIGAN, 2005; MURRILL, 1922; WISITRASSAMEEWONG et al., 2012; WISITRASSAMEEWONG; KARUNARATHNA, 2012).



**Figura 6.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Agaricus subrufescens*.

Fonte: <http://www.herbarium.iastate.edu>

O *A. subrufescens* contém altos níveis de  $\beta$ -glucanas, substâncias com atividades imunomodulatórias e é amplamente utilizado como adjuvante no tratamento oncológico, principalmente no Brasil e Japão (BERTÉLI et al., 2014; BORCHERS et al., 2008; DA

COSTA et al., 2015; FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2008; HETLAND et al., 2008; HYODO et al., 2005; MORIKAWA et al., 1985; TAKAKU; KIMURA; OKUDA, 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam atividades antiangiogênicas e apoptóticas sobre o câncer coloretal (FORTES et al., 2009), fibrosarcoma (FUJIMIYA et al., 1998), sarcoma (AHN et al., 2004; GONZAGA et al., 2009; LIU et al., 1994), câncer de ovário (KOBAYASHI et al., 2005) e de próstata (ITOH; ITO; HIBASAMI, 1994; YU et al., 2009), leucemia (GAO et al., 2007; JIN et al., 2007), mieloma (MURAKAWA et al., 2007), hepatocarcinoma (ANGELI et al., 2009; PINHEIRO et al., 2003; SORIMACHI; AKIMOTO; KOGE, 2008), câncer gástrico (ITOH; ITO; HIBASAMI, 1994; JIN et al., 2006) e câncer de pele (KOZUKA et al., 2005).

Outros possíveis efeitos do *A. subrufescens* são anti-hipercolesterolêmicos (LIU et al., 2008) e diminuir a resistência à insulina (FORTES et al., 2009; HSU et al., 2007; KIM et al., 2005; LIU et al., 2008), resultando na melhora no controle da diabetes e auxiliando no controle de peso. Também apresentam propriedades antivirais *in vitro* e *in vivo* (CARDOZO et al., 2013; FACCIN et al., 2007; SORIMACHI et al., 2001), e podem estimular o sistema imunológico, modulando a produção de citocinas e interferons (HETLAND et al., 2008), além de atividades antioxidantes (UMEO et al., 2015).

Outro integrante deste gênero estudado é o *Agaricus bitorquis* também conhecido pelas sinonímias de *Agaricus rodmani*, *Psalliota bitorquis*, *Pratella campestris* var. *bitorquis*, *Pratella bitorquis*, *Fungus bitorquis*, *Agaricus campestris* subsp. *bitorquis*, *Agaricus campestris* var. *edulis* ou *Psalliota edulis* var. *valida* (**Figura 7**). É um cogumelo comestível muito também chamado de cogumelo botão ou champignon (tais como o *Agaricus bisporus* ou *A. campestris*), sendo comercialmente importante. Também é conhecido pelos nomes comuns de cogumelo botão, agárico de faixas, agárico primavera ou cogumelo pavimento, uma vez que desloca as lajes com o crescimento do seu corpo frutífero (ARORA, 1986; CENCI et al., 2011; ZAKHARY et al., 1983).

Seu nome deriva do termo latino *bitorquis* que significa dois colares, em referência aos dois anéis resultantes do seu desprendimento na parte superior e inferior da estirpe. Seu píleo possui aspecto seco, suave e branco, tornando-se amarelado com a idade. Possui de 4 a 15 cm de diâmetro, sendo convexo para plano. Suas lâminas são livres da estirpe, estreitas e de coloração rosa quando jovens e marrom-avermelhadas quando os esporos amadurecem. A estirpe possui de 3 a 11 cm de comprimento e 2 a 4 cm de espessura, sendo cilíndrico e clavado, possuindo um véu membranoso e revestimento micelial próxima a base grossa. Sua carne é sólida e firme, com odor suave sendo por vezes confundido com o *A. bernardii*,

diferenciando-se apenas pelo odor levemente salgado (INGOLD; HUDSON, 1993; MONCALVO; LUTZONI; REHNER, 2000).



**Figura 7.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Agaricus bitorquis*.

Fonte: <http://www.freenatureimages.eu>

Assim como as atividades já descritas para o cogumelo de mesmo gênero, o *A. subrufescens*, embora o *A. bitorquis* não apresente tantos estudos publicados na literatura, ele também compartilha de efeitos imunomodulatórios em infecções virais (VAN ZAAYEN, 1976), propriedades antioxidantes e antimicrobianas (ÖZTÜRK et al., 2011), além de atividades antitumorais *in vitro* (BEATTIE et al., 2011). O *A. bitorquis* ainda possui atividades biorremediadoras, removendo metais pesados do solo (DEMIRBAŞ, 2000).

Neste estudo somente um integrante da família Lyophyllaceae foi incluído: o *Hypsizygus marmoreus*, que é conhecido pelas sinônimas científicas de *Hypsizygus tessellatus*, *Agaricus marmoreus*, *Clitocybe marmorea* ou *Clitocybe submarmorea* (**Figura 8**). Pelo nome comum é conhecido como buna-shimeji, sendo muito apreciado na culinária da Ásia Oriental, de onde é nativo. Também é conhecido como faia branca ou cogumelo de faia (*beech mushroom*) devido às árvores do gênero *Fagus*, as faias, onde comumente cresce (*beech tree*) (QIU et al., 2014; YAMANAKA, 1997).

Quando cru possui sabor amargo, que desaparece ao cozinhar. Após cozimento possui textura firme, ligeiramente crocante com sabor de nozes. Possui píleo convexo, ligeiramente enrolado para o interior, quase liso com um centro ligeiramente afundado. Possui coloração branca, tornando-se creme e com pequenas escamas quando velho. A carne é firme e branca. As lâminas são unidas ao caule, também brancas tornando-se creme com o passar do tempo. A estirpe possui de 5 a 10 cm de comprimento por 1 a 2,5 cm de espessura, sendo seca, geralmente lisa, porém pubérea, sendo às vezes bulbosa na base (AKAVIA et al., 2006; QIU et al., 2014; YAMANAKA, 1997).



**Figura 8.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Hypsizygus marmoreus*.

Fonte: <http://www.rogersmushrooms.com>

Possui como atividades biológicas já descritas a atividade antioxidante (BIN, 2005; BOLORMAA et al., 2011; LEE et al., 2008; LEE; YEN; MAU, 2007; MATSUZAWA, 2006; XIE QIU-JU; PEI-SHENG; ZHEN-MING, 2012), antiaterosclerótico (MORI et al., 2008), contra leucemia (TSAI; MA; WU, 2013), fotoprotetor (CHUN-MEI et al., 2011), anti-hipertensivo (KANG et al., 2013), antialérgico sobre reações de hipersensibilidade do tipo IV (SANO et al., 2002), imunomodulador (IKEKAWA, 2001), antiproliferativo *in vitro* (LI et al., 2012), atividade antitumoral associada a presença de 1,3- $\beta$ -glucana (MOTOI; GOTO; OHNO, 2003).

A família Marasmiaceae é uma família de fungos basidiomicetos que possui como característica os esporos brancos. Possui 54 gêneros com cerca de 1590 espécies, dentro destas o mais destacado é o *Lentinula edodes*, conhecido popularmente como Shiitake (KIRK et al., 2008). Possui as sinonímias científicas de *Cortinellus edodes*, *Agaricus edodes*, *Armillaria edodes*, *Mastoleucomyces edodes*, *Lentinus edodes*, *Collybia shiitake*, *Lentinus tonkinensis*, *Lentinus mellianus* e *Cortinellus berkeleyanus* (**Figura 9**).

O cogumelo *Lentinula edodes* é cultivado na China e Japão há aproximadamente 2000 anos, sendo muito saboroso em diversos pratos da culinária oriental. Possui sabor doce e textura leve. O píleo é de cor marrom escuro, convexa, circular ou remiforme, arredondada no topo quando jovens, com cerca de 5 cm de diâmetro e bordas onduladas quando maduros. A medida que envelhecem, o marrom torna-se mais claro e o píleo abre-se, tornando-se mais plano. As lâminas geralmente são brancas, mas se expostos a lesão tornam-se marrons, aderidas à estirpe, que possui cor creme, sendo cilíndrica, com aproximadamente 3 a 7 cm de comprimento e de 8 a 9 mm de diâmetro. Não possui volva (SHIMOMURA; HASEBE, 2006; WATANABE, 2002).



**Figura 9.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Lentinula edodes*.

Fonte: <http://my-immunity.com>

É de fácil cultivo, não necessitando de adubos, apenas água e madeira. No Japão é associado à longevidade. Pesquisas recentes demonstram alto valor nutritivo, com proteínas de alta qualidade, fibra dietética, vitaminas e sais minerais (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005). Possui propriedades nutraceuticas sob quadros hipertensivos e hipercolesterolêmicos (KABIR; KIMURA, 1989; KABIR; YAMAGUCHI; KIMURA, 1987; LEE et al., 2007). Também possui atividades imunomodulatórias (ZHENG et al., 2005), possuindo propriedades quimioterápicas, atuando em processos antimicrobianos (HEARST et al., 2009; KITZBERGER et al., 2007; RAO; MILLAR; MOORE, 2009) e cancerígenos (BOHN; BEMILLER, 1995; NG; YAP, 2002).

As espécies *Flammulina velutipes* e *Oudemansiella canarii* são pertencentes à família Physalacriaceae. O gênero *Flammulina* spp. era anteriormente classificado na família Agaricaceae. Porém, estudos genéticos o aproximaram do gênero *Physalacria* spp., único gênero anteriormente descrito para esta família. Além deste, *Oudemansiella* e vários outros gêneros foram reclassificados a partir de 2007, fazendo parte da família Physalacriaceae (DENTINGER; MCLAUGHLIN, 2006; HAO; QIN; YANG, 2014; HIBBETT et al., 2007; KIRK et al., 2008; MONCALVO et al., 2002; WILSON; DESJARDIN, 2005).

O cogumelo *Flammulina velutipes* é conhecido popularmente com os nomes de enokitake, enokidake ou enoki, muito apreciado na culinária do leste asiático (China, Japão, Coreia e Vietnã) (**Figura 10**). Difere na cor e textura quando cultivado ou colhido, sendo branco na forma doméstica e levemente salmão na forma selvagem. Também chamado de cogumelo agulha de ouro, cogumelo lírio, cogumelo fruto do mar, cogumelo de inverno ou fungo de inverno, pé, caule ou haste peludo (CASSELTON; ZOLAN, 2002; INGOLD;

HUDSON, 1993; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016). Também pode ser encontrado na literatura sob os nomes científicos de *Agaricus velutipes*, *Gymnopus velutipes*, *Collybia velutipes*, *Pleurotus velutipes*, *Myxocollybia velutipes*, *Myxocollybia velutipes*, *Agaricus nigripes*, *Agaricus veluticeps* *Panaeolus veluticeps*.

Como muitos cogumelos que decompõem a madeira, o corpo de frutificação de *Flammulina velutipes* dobra sua estirpe perto da base, crescendo então para cima, e resultando em um píleo quase paralelo ao chão. Possui píleo com diâmetro de 1 a 3 cm, convexo quando jovem e plano quando maduro, de superfície lisa, pegajosa quando úmida, de cor branca e castanho-amarelado quando jovem e cultivado, a castanho-alaranjado a castanho-avermelhado quando colhido selvagem, sombreado por uma margem creme, que escurece com a idade para avermelhado. As diferenças de coloração causam pequena confusão na identificação botânica. Sua carne é macia, branca ou creme e delicada, com odor e sabor suave. Possui lâminas anexadas à estirpe, de coloração que varia do branco quando jovem, ao creme e marrom quando maduro. Sua estirpe possui 1,5 a 7 cm de comprimento e de 2 a 7 mm de espessura, sendo cartilaginosa e resistente, finamente púbere, com coloração variada de branco à creme abaixo ao píleo e castanho enferrujado na base, que é levemente bulbosa. Volva ausente (METHVEN; HUGHES; PETERSEN, 2000; MOORE et al., 1996).



**Figura 10.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Flammulina velutipes*. Em **A**, forma cultivada e em **B**, forma selvagem.

Fonte: <http://www.alohaculturebank.com> e <http://www.midwestmycology.org>

O fungo *Flammulina velutipes* apresenta diversas atividades biológicas importantes, tais como antioxidantes, imunomodulatórios e anti-inflamatórios (BADALYAN, 2003; BAO; OCHIAI; OHSHIMA, 2010; BAO; USHIO; OHSHIMA, 2008; JEURINK et al., 2008; KANG, 2012; WANG et al., 2004, 2013; XIANG-HUI et al., 2006), hepatoprotetor (LI et al.,



2010; PANG et al., 2007), antitumoral e antiproliferativos (IKEKAWA et al., 1973; YANG et al., 2011; YI et al., 2013), inibidor da tirosinase – enzima catalisa a oxidação de fenóis (JANG et al., 2009), inibidor da acetilcolinesterase (YANG et al., 2011), anti-hipercolesterolêmico (FUKUSHIMA et al., 2001), antiprotozoário (BADALYAN; SISAKYAN, 2005) e efeitos sobre a memória e aprendizado (XUEMING, 2010).

A espécie *Oudemansiella canarii*, também conhecido comumente por cogumelo guelra ou cogumelo canário é uma espécie selvagem pouco estudada (**Figura 11**). É comestível mas pouco conhecida gastronomicamente. Apresenta consistência macia e sabor suave. Apresenta píleo com diâmetro de 1,6 a 2,7 cm, convexo, branco com o centro bege, liso e com umbo depresso central. As lâminas são muito bem demarcadas, de coloração branca, adnatas à subdecurrentes. A estirpe apresenta de 1,5 a 3 cm de comprimento, sendo alongada, fina, cilíndrica, branca com pequenas escamas e levemente bulbosa na base. Himênio lacunoso e gelatinoso (SILVEIRA RUEGGER et al., 2001; WRIGHT; ALBERTÓ, 2005; XU et al., 2016).



**Figura 11.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Oudemansiella canarii*.

Fonte: <http://farm8.static.flickr.com/>

Existem poucos estudos sobre o fungo *Oudemansiella canarii*. Apresenta as atividades leishmanicida, tripanocida, antimicrobianas, antifúngicas e citotóxicas (ALVES et al., 2013; HENRIQUE ROSA et al., 2003; ROSA et al., 2005, 2010).

O gênero *Pleurotus*, pertencente à família Pleurotaceae, que inclui os cogumelos mais amplamente consumidos, tais como o shimeji-preto (*P. ostreatus*). A palavra *Pleurotus* deriva do grego que significa “orelha de lado” (*pleure*: lado; *otos*: orelha). Seu píleo lembra o formato de uma orelha ou concha. Por esse motivo são chamados de cogumelos ostra, abalone, cogumelo-do-cardo, tamogitake ou cogumelos de árvores, com cores que variam do

branco, amarelo, rosa, salmão e marrom, até o azul-escuro e cinza-escuro (AUTENRIETH, 1889; LIDDELL; SCOTT, 1894; MILES; CHANG, 2004).

O corpo frutífero da maioria dos fungos do gênero *Pleurotus* possui píleo e estirpe bem definidos. Possui diâmetros e cores variáveis, porém o formato de concha lisa e brilhante se mantém em todos os exemplares. As lâminas são altas e desiguais, acompanhando a extensão do píleo, que podem ser unidos lateralmente (sem estirpe) (BON; WILKINSON; OVENDEN, 1987; PACIONI, 1982). Em geral os *Pleurotus* não são fungos com grande suporte, apresentando-se muito delicados (KNUDSEN; VESTERHOLD, 2008). Neste estudo foram empregadas as espécies *P. sapidus*, *P. eryngii* var. *ferulae*, *P. pulmonarius*, *P. florida*, *P. eryngii*, *P. columbinus*, *P. ostreatus* e *P. citrinopileatus* (**Figura 12**).



*P. sapidus*

Fonte: <http://calphotos.berkeley.edu>



*P. eryngii* var. *ferulae*

Fonte: <http://www.sanabriacarballeda.com>



*P. pulmonarius*

Fonte: <http://www.mushroomexpert.com>



*P. florida*

Fonte: <https://openi.nlm.nih.gov>



*P. eryngii*

Fonte: <http://www.mycelia.be>



*P. columbinus*

Fonte: <https://img0.etsystatic.com>



*P. ostreatus*

Fonte: <http://www.mykoweb.com>



*P. citrinopileatus*

Fonte: Fonte: <http://www.mykoweb.com>

**Figura 12.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Pleurotus* spp..

A composição nutricional dos cogumelos *Pleurotus* permite enriquecer a alimentação, pois é uma boa fonte de proteínas, fibras solúveis, com baixo teor de gordura. Possuem também vitaminas do complexo B (principalmente niacina), vitamina A e minerais como o potássio e selênio, variando sua composição de região para região de cultivo, ou substrato (SYNYTSYA et al., 2008). Como benefícios reduzem o colesterol e suas frações, triglicerídeos, além de produzir metabólitos da classe das estatinas, tais como a lovastatina (ALARCÓN et al., 2003; CHEN et al., 2016; GUNDE-CIMERMAN; CIMERMAN, 1995; HUANG et al., 2016; MANZONI; ROLLINI, 2002).

As substâncias bioativas presentes nos cogumelos *Pleurotus* spp. apresentam efeitos sobre leucócitos, ou seja, são imunomodulatórios, aumentando as defesas do próprio organismo (LLAURADÓ et al., 2016; SUN; LIU, 2009; TANAKA et al., 2015; XIAO; ZHANG; LIU, 2006; XU et al., 2016). Também apresentam alcaloides, flavonoides com efeitos antineoplásicos, substâncias ativas responsáveis por efeitos em células cancerígenas. Estes efeitos não estão descritos em grandes ensaios clínicos mas já há muita investigação que mostra inibição da proliferação de células tumorais, sem prejuízo do normal crescimento de células saudáveis (GU; SIVAM, 2006; HUANG et al., 2016; PANTHONG; BOONSATHORN; CHUCHAWANKU, 2016; REN et al., 2016; ZHANG et al., 1994, 2007).

O conjunto nutricional composto por metabólitos primários e secundários faz destes cogumelos bons auxiliares para manutenção do nível de proteção antioxidante do organismo (ABIDIN; ABDULLAH; ABIDIN, 2016; GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016; LI; SHAH, 2016; PANTHONG; BOONSATHORN; CHUCHAWANKU, 2016; RONCERO-RAMOS et al., 2016; TAOFIQ et al., 2016; ZHANG et al., 2016), aumentando os níveis de glutathione e diminuindo a formação de produtos tóxicos resultantes da peroxidação (DOGAN; COTELI; KARATAS, 2016).

Também são encontrados na literatura atividades contra dor e inflamação (GANESHPURKAR; RAI, 2013; SMIDERLE et al., 2008; SUSEEM et al., 2011; TAOFIQ et al., 2016), efeitos benéficos no controle da diabetes (BADOLE et al., 2008; CHEN et al., 2016), efeitos anti-hipertensivos (MIYAZAWA; OKAZAKI; OHGA, 2008), efeitos pré-bióticos (AIDA et al., 2009; SYNYTSYA et al., 2009), efeitos hepatoprotetores (ZHANG et al., 2016), atividades antimicrobianas, inclusive frente à cepas multi-resistentes à antibióticos (GANESHPURKAR et al., 2016; PAUKNER; RIEDL, 2016; SKARIYACHAN et al., 2016; TAOFIQ et al., 2016), adjuvante no tratamento de osteoporose, pois diminui a reabsorção e aumenta a densidade óssea (ERJAVEC et al., 2016) e melhora a capacidade cognitiva na doença de Alzheimer (ZHANG et al., 2016).

Além disso, possuem propriedades biorremediadoras sobre o ambiente, principalmente em contaminações por petróleo e hidrocarbonetos (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002; DREVINSKAS et al., 2016; KOGBARA et al., 2016; STAMETS, 2005).

A *Volvariella volvacea* (**Figura 13**), cogumelo pertencente à família Pluteaceae, conhecido comumente como cogumelo de palha ou cogumelo palha de arroz, também é muito apreciado na culinária do leste e sudeste da Ásia. São conhecidos também pelas sinônimas científicas de *Agaricus volvaceus*, *Volvaria volvacea*, *Volvariopsis volvacea*, *Amanita virgata*, *Vaginata virgata* e *Agaricus virgatus*. São cultivados na palha de arroz e colhidos ainda jovens, na fase de botão (antes que o véu se rompa) (WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).

São cogumelos que crescem gregariamente ou em *clusters* o ano todo, preferindo climas mais amenos e geralmente encontrados ao ar livre no verão. Amplamente distribuídos, são comuns nos jardins da América do Norte e Ásia. Seu píleo apresenta de 5 a 10 cm de diâmetro, ovoide quando jovem, expandindo para convexo ou amplamente cônico, quase plano quando maduro, de aparência seca e pubescente e coloração cinza, castanho-cinza, castanho-acinzentado ou quase preto quando jovem, suavizando com a idade. Sua carne é branca, suave no odor e paladar. Possui margem pálida e suave, que geralmente se divide com a idade. Suas lâminas são estriadas, livres da estirpe, de coloração branca ou rosa. A estirpe apresenta 4 a 14 cm de comprimento, com até 2 cm de espessura, fina no ápice e bulbosa na base, de coloração esbranquiçada ou acastanhada de aparência sedosa. A base é envolta por uma espessa volva, de coloração esbranquiçada ou cinza-acastanhado. A estirpe não possui anel, sendo facilmente confundidos com o tampão da morte (*Amanita phalloides*), diferenciando-se apenas pela coloração dos esporos, onde no *Volvariella volvacea* são de coloração salmão e no *Amanita phalloides* são brancos (KIRK et al., 2008; MONCALVO et al., 2002) e pela presença da volva no *Volvariella volvacea*. Esta estrutura se quebra como o cogumelo se expande, deixando as partes que podem ser encontradas na base da estirpe como uma estrutura tipo xícara.



**Figura 13.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Volvariella volvacea*.

Fonte: <http://www.velutipes.com>

Segundo estudos, a *Volvariella volvacea* apresenta propriedades antioxidantes, atuando sobre a expressão de enzimas ligadas ao processo (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003; FU; SHIEH; HO, 2002; GUO et al., 2012; PARK; KWON; LEE, 2015; YAN et al., 2016), efeitos anti-hipertensivos (CHIU; LAM; PANG, 1995), hipocolesteromiantes (CHEUNG, 1998, 1996), fotoprotetor e regenerador frente à lesão promovida por radiação UV (MUKHERJEE; SENGUPTA, 1986), imunomodulatório (DAS et al., 2010; HSU et al., 1997; JEURINK et al., 2008; MAITY et al., 2013; SARKAR et al., 2012; SHE; NG; LIU, 1998; WANG et al., 2013), além de atividades antitumoral e antiproliferativa (CHEN et al., 2011; KISHIDA et al., 1992; MAITI et al., 2008).

O fungo *Fistulina hepatica*, membro da família *Fistulinaceae*, único do seu gênero, também conhecido como língua-de-vaca, língua-de-boi, gasalho ou cogumelo bife. Seu nome deriva de sua semelhança com um pedaço de carne crua, sendo utilizado como sua substituta. É comestível, crescendo principalmente em carvalhos e castanheiras, causando a podridão castanha, e bastante comum nas Ilhas Britânicas, sendo encontrado também no restante da Europa e na América do Norte, sendo encontrado principalmente em mercados franceses (KIRK et al., 2008). Suas sinônimas científicas são *Boletus hepaticus*, *Fistulina buglossoides*, *Boletus hepaticus*, *Hypodryas hepaticus*, *Boletus buglossum*, *Boletus esculentus*, *Boletus bulliardii*, *Agarico-carnis lingua-bovis*, *Fistulina sarcoides*, *Buglossus quercinis* e *Fistulina endoxantha*.

Possui sabor amargo e ligeiramente ácido, sem odor, de consistência rígida, necessitando de maior tempo para cozimento. Sua forma lembra os cogumelos orelha de pau, ou uma língua grande, sendo áspera de coloração rosa-vermelho quando jovem e predominantemente marrom-avermelhada quando maduro. Quando cortado, secreta um suco

vermelho, semelhante como carne sendo cortada. A parte inferior do corpo de frutificação é uma massa de túbulos, característica que originou o nome do gênero – *fistulina* em latim significa pequeno tubo. Já *hepatica* é em alusão à sua consistência, semelhante ao bife de fígado (KNUDSEN; VESTERHOLD, 2008).

Seu píleo pode alcançar até 30 cm de diâmetro, possuindo forma irregular, tipo leque, e por vezes fundido lateralmente com outros corpos frutíferos. De textura aveludada à áspera, raramente liso, com margem lobada. As lâminas possuem superfície do poro esbranquiçada ou levemente rosado, tornando-se marrom-avermelhado com o amadurecimento. Não possui estirpe, ou quando possui apresenta-se lateralmente e muito rudimentar, bastante grosso e de coloração amarelo ocre. Sua carne é branca com áreas avermelhadas, brilhante de consistência viscosa, grossa e fibrosa, muito nutritiva (KIRK et al., 2008; PALAZZOLO; LETIZIA GARGANO; VENTURELLA, 2012).



**Figura 14.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Fistulina hepatica*.  
Fonte: <http://images.mushroomobserver.org>

Embora utilizado como alimento por longa data pelos humanos, na literatura não há muitos estudos sobre as atividades biológicas da *Fistulina hepatica*. Este apresenta atividades antimicrobianas e antinematocidas (ALVES et al., 2014 a, 2014 b; DONG et al., 2006; LIKTOR-BUSA et al., 2016; TSUGE et al., 1999) e atividades antioxidantes associadas a presença de compostos fenólicos (RIBEIRO et al., 2007).

A família Schizophyllaceae contém apenas dois gêneros e sete espécies. Neste estudo, apresentamos a espécie *Schizophyllum commune* (**Figura 15**). Seu nome refere-se a sua distribuição, *commune* deriva do latim *comuna*, que representa comum, ou seja, distribuída por todo o planeta (KIRK et al., 2008). Conhecido popularmente como fungo da podridão

branca, possui as seguintes sinonímias botânicas: *Schizonia vulgaris*, *Daedalea commune*, *Merulius communis*, *Agaricus alneus*, *Scaphophoeum agaricoides* e *Schizophyllum alneus*.

Há pouco interesse culinário devido à sua palatabilidade (gosto e textura resistente), embora seu consumo seja comum no México e nordeste da Índia (RUÁN-SOTO; GARIBAY-ORIJEL; CIFUENTES, 2006). É um cogumelo de fácil reconhecimento, com seus pequenos corpos frutíferos que carecem de caules, aderidos sobre a madeira morta, ou ocasionalmente pode parasitar a madeira viva. Seu corpo de frutificação mede de 1 a 5 cm de largura, sendo em forma de leque ou concha conectado diretamente à madeira, de forma irregular. Superfície superior pubescente, seca, de cor branca, podendo ser acizentado ou levemente marrom. Lâminas aparentam ser dobras, sendo divididas, de coloração branca ou cinza. Sem estirpe. Carne dura, coriácea e pálida (INGOLD; HUDSON, 1993; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).



**Figura 15.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Schizophyllum commune*.  
Fonte: <http://www.biopix.com>

Devido à sua ampla distribuição é um dos fungos mais estudados do ponto de vista genético e ambiental, porém apresenta poucos estudos do ponto de vista biológico. Em estudos relatados, o cogumelo *Schizophyllum commune* combate e previne os tumores devido a presença de  $\beta$ -glucanas (BORCHERS et al., 1999, 2008; MANTOVANI et al., 2008; MIZUNO, 1995; OKUDA et al., 1972; ZHONG et al., 2015), é antioxidante (ABDULLAH et al., 2012; CHANG; BUSWELL, 1996; KLAUS et al., 2011), hipocolesteremiante (TANIMOTO et al., 1996), imunoregulador, também associado a presença das  $\beta$ -glucanas (CHANG et al., 2000; ZHONG et al., 2015) e anti-hipertensivo, provavelmente por interagir com a enzima conversora de angiotensina (ABDULLAH et al., 2012; ABIDIN; ABDULLAH; ABIDIN, 2016).



O cogumelo *Pholiota nameko* (**Figura 16**), espécie pertencente à Strophariaceae, é conhecido popularmente pelo nome de nameko, é um cogumelo pequeno muito utilizado como ingrediente em missoshiru e nabemono, ambas da culinária japonesa. Ainda é conhecido pelos nomes de *huázǐ mó* na China, *mas-lyo-nok*, na Rússia ou cogumelo caramelo nas Américas (CANNON; KIRK, 2007; DEACON, 2013). Possui as sinonímias científicas de *Collybia nameko*, *Kuehneromyces nameko* e *Agaricus microsporus*.

É um cogumelo pequeno, com píleo de 3 a 6 cm de diâmetro, convexo, tornando-se quase plano, de revestimento gelatinoso, viscoso e pegajoso quando fresco. Sua coloração varia de amarelo-escuro ao marrom âmbar, liso, com pequenas fibras ou escamas próximas à margem. Lâminas ligadas à estirpe, de coloração esbraquiçada ou levemente amarela quando jovens, tornando-se acastanhado com a maturidade. A estirpe possui de 4 a 8 cm de comprimento com até 1 cm de espessura, de cor amarelo pálido no ápice e acastanhada na base, que apresenta um pequeno anel, resultante da presença de volva parcial. Outro anel pode se encontrado na parte superior da estirpe (KIRK et al., 2008).



**Figura 16.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Pholiota nameko*.  
Fonte: <https://sp.yimg.com>

Existem na literatura relatos de pneumonite de hipersensibilidade causada pela aspiração de partículas de *Pholiota nameko*. Esta pneumonite é uma síndrome com apresentação clínica variável, cuja inflamação no parênquima pulmonar é causada pela inalação de antígenos específicos em indivíduos previamente sensibilizados (INAGE et al., 1996; KURUP; ZACHARISEN; FINK, 2000). Estes relatos sugerem que hajam efeitos sobre a cascata inflamatória e ativam fatores imunológicos, reforçando as atividades anti-inflamatória, imunomodulatória, antitumoral e pré-biótica descritas (LI et al., 2008; MIZUNO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2017). O cogumelo *Pholiota nameko* atua também como

inibidor de ribonuclease – podendo atuar como antiangiogênico, correlacionando com a atividade antitumoral (LI; WANG, 2007). Também favorece processos de reconstrução e reconhecimento de células dentríticas através de receptores *toll like* (LI et al., 2015) através de receptores NFκB (LI et al., 2015), diminui a maturação de linfócitos CD4 e CD8 (LI et al., 2015), além de modificar citocinas, favorecendo a resolução de processos ligados a imunidade adaptativa e hematopoiese (LI et al., 2012).

Além disso, é antioxidante (KAWAMURA-KONISHI et al., 2007; QIAN; ZHANG; LIU, 2016; RODRIGUES et al., 2017; ZHANG et al., 2015), atua contra o processo de envelhecimento (*anti-aging*) (ZHENG et al., 2015), antilipêmico (LI; ZHANG; MA, 2010; ZHENG et al., 2014) e hepatoprotetor (ZHENG et al., 2014).

Os membros denominados *incertae sedis* são assim classificados por apresentarem uma relação, porém ainda não bem esclarecida. Dentro dessa “*classe*” incluem-se as ordens, Auriculariales, Cantharellales, Corticiales, Gloeophyllales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales, Sebaciniales, Stereopsidales, Thelephorales, e Trechisporales, que juntas correspondem cerca 50 famílias compostas por aproximadamente 450 gêneros (HIBBETT et al., 2007; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).

As espécies da ordem Auriculariales utilizadas neste estudo são a *Auricularia auricula-judae* e *Auricularia fuscossuccinea*, pertencentes à família Auriculariaceae. São conhecidos como “fungos geléia”, uma vez que seus basidiocarpos são gelatinosos. Apresentam cerca de 100 espécies conhecidas em todo o mundo, sendo cultivadas para o alimento em escala comercial, especialmente na China (KIRK et al., 2008; WEIß; OBERWINKLER, 2001).

Os cogumelos *Auricularia auricula-judae* (**Figura 17**) e *Auricularia fuscossuccinea* (**Figura 18**) são conhecidos como orelha de Judas, orelha do judeu ou orelha de geléia. Ainda pode ser conhecido como fungo de orelha, fungo chinês, orelha de porco, orelha de pau ou árvore, Kikurage e Sambuca, sendo encontrado no mundo todo. O seu nome deriva da crença de que Judas Iscariotes enforcou-se em uma árvore velha depois da sua traição. O folclore sugere que as orelhas são o espírito de Judas que voltou, e são todos que são deixados para lembrar-nos de seu suicídio. Com o tempo, o nome modificou-se para orelha de judeu (KIRK et al., 2008). A espécie *A. auricula-judae* apresenta as seguintes sinônimas científicas: *Tremella auricula-judae*, *Peziza auricula-judae*, *Exidia auricula-judae*, *Hirneola auricula-judae*, *Tremella auricula* e *Tremella auricula-judae*, além de diversas variantes descritas para a espécie. Já a *A. fuscossuccinea* apresenta-se como *Exidia fuscossuccinea*, *Hirneola fuscossuccinea* e *Auricularia fusco-succinea*.



**Figura 17.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Auricularia auricula-judae*.

Fonte: <https://upload.wikimedia.org>

O corpo de frutificação se distingue pela sua forma de orelha flexível, podendo variar para formato de taça que cresce em cima de madeira, especialmente quando velha. O píleo – mais precisamente o corpo de frutificação todo – apresenta cerca de 3 a 8 cm, com um diâmetro de 3 a 8 cm, podendo crescer até 12 cm. É diretamente ligado ao substrato, com uma estirpe muito curta. Possui textura dura, gelatinosa, elástica quando fresca, mas dura, seca e quebradiça quando morta. A superfície é brilhante, variando do avermelhado ao marrom com um toque arroxeadado, variando com a idade, coberto por pequena e fina pubescência de cor cinza. Suave e liso quando jovem, e ondulado com diversas pregas e rugas quando maduros. A superfície interna apresenta coloração cinza ou marron suave, podendo conter pregas ou rugas que se assemelham a veias, fazendo com que se pareçam ainda mais com uma orelha (DIGHTON, 2016; STAMETS, 2005).



**Figura 18.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Auricularia fuscusuccinea*.

Fonte: <http://www.naturezabrasileira.com.br>

É utilizado na medicina popular para dores de garganta, nos olhos, icterícia e como adstringente. Em Gana é utilizado como tônico sanguíneo e na culinária chinesa em diversos pratos, principalmente sopas. Diversas pesquisas apontam que *A. auricula-judae* possui atividades antitumoral (LEE et al., 1981; MISAKI et al., 1981; REZA; JO; PARK, 2012; UKAI et al., 1983), hipoglicemiante (HAN et al., 2006; TAKEUCHI; HE; MOOI, 2004), anticoagulante (FRANCIA et al., 1999), hipolipemiante (JEONG et al., 2007; REZA et al., 2015), previne esteatose (REZA et al., 2015), antioxidante (CAI et al., 2015; KHO et al., 2009), antimicrobiano (CAI et al., 2015), antiviral (NGUYEN et al., 2012) e anti-inflamatório (DAMTE et al., 2011). São escassos na literatura estudos sobre a *A.fuscosuccinea* (HELENO et al., 2010; LIN et al., 2013). Ainda possui atividade celulolítica, que favorece a aplicação para o desenvolvimento de biomateriais, nutrição animal ou a produção de etanol de segunda geração (JO et al., 2010).

As famílias da ordem Polyporales utilizadas neste estudo são a Ganodermataceae, Meripilaceae, Polyporaceae e Russulales. A família Ganodermataceae é composta por 6 gêneros com aproximadamente 70 espécies (KIRK et al., 2008). As espécies *Ganoderma lobatum* (**Figura 19**) e *Ganoderma lucidum* (**Figura 20**) estão presentes na coleção, sendo utilizadas neste estudo.

São fungos patógenos de plantas, parasitas que preferem árvores ainda vivas. São cogumelos medicinais utilizados na medicina tradicional chinesa há mais de 4000 anos (ARORA, 1986).



**Figura 19.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Ganoderma lobatum*.

Fonte: <http://static.inaturalist.org>

O nome *Ganoderma* deriva do grego *ganos* que significa brilho, e *derma*, pele (LIDDELL; SCOTT, 1894). Trata-se cogumelo tenro (quando fresco), suberoso e achatado, com píleo de cor laranja, avermelhada ou acastanhada, e em forma de rim e, dependendo da idade do espécime, com poros brancos a acastanhados na sua parte inferior. Não apresentam lâminas na face inferior e libertam os seus esporos através de finos poros, sendo classificado como um poliporo (ARORA, 1986).



**Figura 20.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum*.

Fonte: <http://www.dbriers.com>

Estão descritos triterpenos, chamados ácidos ganodéricos (de estrutura molecular semelhante aos hormônios esteroides). Contém também outras substâncias, incluindo polissacarídeos como  $\beta$ -glucans, cumarinas e alcaloides (PATERSON, 2006).

Estas substâncias estão associadas com o aumento da imunidade inata através da interação com o receptor NF $\kappa$ B (KUO et al., 2006), ou seja, ações imunomodulatórias (BAO et al., 2002; GUO et al., 2009; LIU et al., 2010; SHIAO, 2003; TANAKA et al., 1989; ZHAO et al., 2010), atividade antiandrogênico (FUJITA et al., 2005; LIU et al., 2007), atividade anti-hipertensiva (MORIGIWA et al., 1986), ações antitumorais e antiangiogênicas (SLIVA, 2003; SLIVA et al., 2002; STANLEY et al., 2005; ZHAO et al., 2010), atividade antifúngica (SMANIA et al., 2003), antioxidantes e hepatoprotetoras (CHEN et al., 2008; JIA et al., 2009; KIM et al., 1999; LIN et al., 1995; SMINA et al., 2011), atividade anti-histamínica (KOHDA et al., 1985) e atividade hipoglicemiante (BROADHURST; POLANSKY; ANDERSON, 2000; JIA et al., 2009).

A família Meripilaceae atualmente faz parte da ordem Polyporales, sendo estimada que inclui cerca de 7 gêneros e aproximadamente 57 espécies. Neste estudo utilizamos somente o fungo *Grifola frondosa* (**Figura 21**).

O cogumelo *Grifola frondosa* é um cogumelo comestível originário do Japão, onde a sua comercialização é crescente, sendo que atualmente está entre os de maior consumo juntamente com o shiitake. No Japão é conhecido pelo nome de maitake (*mai*: dança; *take*: cogumelo) ou kumotake (*kumo*: nuvem), sendo que em outras partes do mundo possui diversos nomes, tais como galinha do mato, galinha-das-florestas, cabeça de carneiro e signorina. Também é tido como cogumelo medicinal na fitoterapia tradicional chinesa (KIRK et al., 2008). É conhecido pelas sinonímias científicas de *Agaricus frondosus*, *Boletus frondosus*, *Caloporus frondosus*, *Cladodendron frondosum*, *Cladodendron frondosus*, *Cladomeris frondosa*, *Merisma frondosum*, *Polypilus frondosus* e *Polyporus frondosus*.

Possui sabor delicado e textura crocante, sendo bem diferenciado do shiitake. Seu aroma é amadeirado, semelhante ao de algas marinhas utilizadas na culinária japonesa. É ingrediente fundamental no nabemono, ou pode ser consumido somente refogado com manteiga. É um fungo perene, que cresce no mesmo local por diversos anos consecutivos. Seu micélio se organiza em forma de uma estrutura subterrânea chamada de *sclerotium*, um tubérculo que lembra uma batata. Cresce gregariamente, em múltiplas camadas que podem alcançar 100 cm de diâmetro, com margens onduladas de 2 a 7 cm de largura. Alguns exemplares no Japão já chegaram a pesar 45 kg, rendendo-lhes o título de “*King of Mushrooms*”. Sua coloração varia do cinza ao marrom. A face inferior não apresenta lâminas, sendo poliporo. Sua estirpe possui estrutura ramificada, de coloração branco-leitosa (ARORA, 1986; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).



**Figura 21.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Grifola frondosa*.

Fonte: <http://www.dbriers.com>

São utilizados popularmente para auxílio no controle de pressão arterial, diabetes, propriedades hepáticas, prevenção do câncer, e no combate de infecções causadas por vírus e bactérias. Pesquisas recentes demonstram que a sua atividade antitumoral está correlacionada

com o estímulo de células *natural killer* – NK (DENG et al., 2009; KODAMA et al., 2002; KODAMA; KOMUTA; NANBA, 2003; MASUDA et al., 2008), estimulando também outras células do sistema imunológico (KODAMA; MURATA; NANBA, 2004), promovendo a apoptose e inibindo o crescimento de células tumorais (KODAMA; KOMUTA; NANBA, 2002; NANBA; KUBO, 1997), inclusive diminuindo a metástase (MASUDA et al., 2008) e a angiogênese (MATSUURA et al., 2002; ZHANG; MILLS; NAIR, 2002).

Possui atividades hipoglicemiantes por conter  $\alpha$ -glicosidase (MATSUURA et al., 2002), anti-hipertensivas, antioxidantes e anti-inflamatórias (LEE et al., 2008; ZHANG; MILLS; NAIR, 2002).

A família Polyporaceae é uma família de fungos poroides, ou seja, com basidiomas com himenóforo tubular na parte inferior do píleo. Alguns poucos exemplares (gênero *Panus* spp.) possuem lâminas, outros (gênero *Daedaleopsis* spp.) possuem poros alongados em formato de labirinto. É uma família grande, com cerca de 84 gêneros e mais de 1100 espécies, onde a maioria das espécies são únicas (KIRK et al., 2008).

O fungo *Lentinus strigosus* (**Figura 22**) é um cogumelo comestível pouco conhecido. Cresce preferencialmente em madeira morta recente. Não possui nomes comuns, porém apresenta muitas sinonímias científicas: *Agaricus strigosus*, *Pocillaria frieseana*, *Agaricus crinitus*, *Agaricus strigopus*, *Agaricus hirtus*, *Agaricus macrosporus*, *Panus rudis*, *Lentinus capronatus*, *Agaricus sainsonii*, *Lentinus chaetophorus*, *Panus lamyanus*, *Panus hoffmannii*, *Lentinus sparsibarbis*, *Lentinus substrigosus*, *Panus lecomtei* e *Panus fragilis*.

Seu píleo apresenta de 2 a 10 cm de comprimento, crescendo sozinho ou em grupos com poucos exemplares, sendo côncavo com relação à base, e margens enroladas e contorno irregular. Sua aparência é uma taça, sendo a parte superior densamente pubescente, e a parte inferior com lâminas brancas, em aparência de guelras que acompanham todo o comprimento da base, de 1 a 4 cm, com até 1 cm de largura, tendo em vista que a estirpe às vezes é ausente. Sua coloração varia de levemente rosa, ao roxo, acompanhado do marrom, geralmente pálida. A coloração muda, escurecendo com a maturidade. A carne é esbranquiçada, suave, porém resistente. É comestível, sem odor, mas com sabor amargo. Muitas vezes é confundido com espécimes do gênero *Phyllotopsis* spp., diferenciando-se na coloração, sendo este último em tons de laranja brilhante (ARORA, 1986; KIRK et al., 2008).



**Figura 22.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Lentinus strigosus*.  
 Fonte: <http://www.dbriers.com>

Atualmente existem poucos estudos na literatura acerca de *L. strigosus*. As atividades relatadas são quimioterápicas (citotóxica e antimicrobiana) (AL-FATIMI et al., 2005), antioxidante (AL-FATIMI et al., 2005; VÁNYOLÓS; ORBÁN-GYAPAI; HOHMANN, 2014), hipoglicemiante (YAMAC et al., 2008) e tripanocida (COTA et al., 2008; SOUZA-FAGUNDES et al., 2010).

Outro fungo do mesmo gênero incluído neste estudo é o *Lentinus sajor-caju* (**Figura 23**), anteriormente conhecido como *Pleurotus sajor-caju*, termo erroneamente aplicado desde sua devolução ao gênero *Lentinus* em 1975. Ocorre certa confusão também devido à sua semelhança com o *Pleurotus pulmonarius*, sendo os dois vendidos como cogumelo ostra. Na culinária asiática como houbitake. Também é conhecido pelas sinonímias científicas de *Agaricus sajor-caju*, *Pocillaria sajor-caju*, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinus exilis*, *Lentinus dactylophorus*, *Lentinus tanghiniae*, *Lentinus stenophyllus*, *Lentinus nicobarensis*, *Lentinus irregularis*, *Lentinus glandulosus*, *Lentinus murrayi*, *Lentinus woodii*, *Lentinus tenuipes*, *Pocillaria dactylophora*, *Lentinus bonii*, *Lentinus bukobensis* e *Lentinus annulifer*.

É um fungo saprobiótico, associado à decomposição de madeira e também referido como fungo de podridão branca. É encontrado crescendo em madeira morta. O corpo de frutificação é extremamente resistente, com estirpe central bem desenvolvida e definida, e assim como o *L.strigosus*, com lâminas que se estendem até a base. Pode haver um colar carnudo próximo ao substrato, que desaparece com a idade. O píleo apresenta de 6 a 14 cm de diâmetro, de coloração branca ao amarelo claro, que escurece com a maturidade, sendo côncavo com relação à base, e margens enroladas e contorno irregular (ARORA, 1986; KIRK et al., 2008; WATKINSON; MONEY; BODDY, 2016).





**Figura 23.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Lentinus sajor-caju*.

Fonte: <https://c1.staticflickr.com>

Apesar do extensivo uso culinário de *L. sajor-caju*, existem poucos relatos na literatura a respeito de suas atividades biológicas. As atividades mais relatadas são a atividade antioxidante (FERREIRA; BARROS; ABREU, 2009; KANAGASABAPATHY et al., 2011; PUTTARAJU et al., 2006), Antimicrobiana (NGAI; NG, 2004), antitumoral, anti-inflamatório e imunomodulatório (CARBONERO et al., 2012; FINIMUNDY et al., 2013; NGAI; NG, 2004; OOI; LIU, 2000), além da atividade lignocelulítica (BUSWELL et al., 1996), que pode ser útil no desenvolvimento de biomateriais.

O gênero *Trametes* spp. (**Figura 24**) é um cogumelo medicinal utilizado pela medicina chinesa sobre o nome de *yun zhi*. Em outros locais é conhecido como cauda de Peru. Também é associado à podridão branca. Contém uma substância denominada de polissacarídeo-K, identificado no *T. versicolor* que é adjuvante imunitário no tratamento do câncer (CANNON; KIRK, 2007; KIRK et al., 2008; ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009; WASSER, 2003). Possui como sinônimas científicas os nomes de *Cellularia* spp., *Hansenia* spp., *Coriolus* spp., *Sclerodepsis* spp., *Funalia* spp., *Cyclomyces* spp., *Cubamyces* spp., *Whitfordia* spp., *Artolenzites* spp. e *Pseudotrametes* spp..

Sua coloração é extremamente variável, tipicamente com zonas concêntricas de diferentes cores, entre branco, cinza, vermelho, marrom, castanho ou negro, sendo as mais comuns, podendo apresentar até azul e laranja. Em indivíduos velhos há crescimento de algas, apresentando áreas verdes. Sua textura é aveludada, finamente pubescente e coriácea, com contrastes de textura nas alternâncias de cores. A face superior do seu píleo é plana, com até 10 mm de espessura, e 10 cm de diâmetro e formato de rim, triangular ou redondo. Flexível quando fresco, e muitas vezes fundidos com outros píleos. Não apresentam lâminas, sendo

poliporo, com cor esbranquiçada a castanho-claro ou cinza pálido. Sua carne é resistente e coriácea, de coloração esbranquiçada (ARORA, 1986; KIRK et al., 2008).



**Figura 24.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Trametes* spp.

Fonte: <http://www.dbriers.com>

Possui potencial no campo da biorremediação, principalmente o *T. versicolor* que biodegrada vários poluentes, principalmente efluentes da indústria têxtil (AURIOL et al., 2008; LEŠTAN et al., 1996; ROBINSON et al., 2001), eliminando substâncias tóxicas ou metal pesados do solo (DODOR; HWANG; EKUNWE, 2004; JAROSZ-WILKOŁAZKA et al., 2002). Também possui enzimas efetivas na deslignificação e biotransformação de substâncias (ARCHIBALD, 1992; COLLINS et al., 1996; MANZANARES; FAJARDO; MARTIN, 1995; NICOTRA et al., 2004; PURI et al., 2006).

Os cogumelos do gênero *Trametes* spp. possuem grande potencial para estudos no descobrimento de moléculas farmacologicamente ativas (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006), tais como atividades antioxidante (SANTOS ARTEIRO et al., 2012; WANG; LIU; HU, 2014), antimicrobiana (SHEENA et al., 2003), antitumoral (ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009; WASSER, 2003) e imunomodulatória (LI et al., 2011; WASSER, 2003).

A espécie *Pycnoporus sanguineus* (**Figura 25**) é conhecido comumente como orelha de pau ou urupé. Cresce em madeira já morta, ocasionalmente parasitando árvores vivas, geralmente velhas indicando a idade da planta. Apresenta ligação lateral ao seu substrato com textura dura, coriácea quando jovem e extremamente dura quando maduro, com sabor intragável e provavelmente tóxico. O píleo varia entre 3 a 14 cm de diâmetro, com 1 a 5 mm de espessura, poliporo e totalmente alaranjado brilhante em todas as superfícies, inclusive na face inferior. A estirpe, quando presente, possui de 2 a 7 cm de comprimento (CANNON; KIRK, 2007; HAWKSWORTH et al., 1996; KIRK et al., 2008). Também é conhecido

cientificamente como *Boletus sanguineus*, *Boletus nitens*, *Polyporus sanguineus*, *Polystictus sanguineus*, *Microporus sanguineus*, *Trametes sanguinea*, *Trametes cinnabarinavar.sanguinea*, *Trametes sanguinea*, *Coriolus sanguineus*, *Fabisporus sanguineus*, *Boletus ruber* e *Polyporus cristula*.

Pode ser confundido com outras espécies do gênero *Pycnoporus*, como *P. coccineus* e *P. cinnabarinus*, onde se diferencia deles por detalhes do píleo. A espécie *P. coccineus* apresenta a superfície inferior semelhante à cortiça e a *P. cinnabarinus* varia de 5 a 15mm espessura e adquire uma cor esbranquiçada quando envelhece. Além disso, o *P. sanguineus* é o único que apresenta bordas rígidas mesmo quando jovem, característica que os demais só adquirem quando maduros (ARORA, 1986; KIRK et al., 2008).



**Figura 25.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Pycnoporus sanguineus*.  
Fonte: <https://cogumelosdosul.files.wordpress.com>

Utilizado pelos índios guaranis para o tratamento de hemorragias, sendo conhecido como *urupé nungá-takuapi*, que significa sangue de madeira. Também é utilizado popularmente para o tratamento de artite, gota, dor-de-garganta, úlceras, dor-de-dente, febres e hemorragias (MURRILL, 1922).

Possui atividade antimicrobiana e a propriedade de absorver metais pesados do ambiente e da corrente sanguínea (FONSECA et al., 2010; MASHITAH; ZULFADHLY; BHATIA, 1999). É biorremediador, eliminando o ambiente de herbicidas (CHAN-CUPUL et al., 2014), compostos fenólicos, hormônios e bifenol A (GARCIA-MORALES et al., 2015), antraquinonas (LU et al., 2007), antracenos e pirenos (LI et al., 2014). Atua como antioxidante (GAMBATO et al., 2016) e leshimanicida (CORREA et al., 2006).

Além disso, possui alta capacidade de deslignificação (CHAN-CUPUL et al., 2014; DJARWANTO; TACHIBANA, 2009; EUGENIO et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2016;

QUIROZ-CASTAÑEDA et al., 2011), promovendo o aumento da sacarificação de biomassa (LARRAN et al., 2015; MIYAUCHI et al., 2016) e sendo promissor para o desenvolvimento de biocombustíveis (FOKINA et al., 2015).

O cogumelo *Hericium erinaceus* (**Figura 26**), da família Hericiaceae, é a única espécie da ordem Russulales aqui estudada, e também o último cogumelo da coleção. Seus nomes comuns são cogumelo juba de leão, cogumelo de barba, cogumelo barbudo, barba de sátiro, hedgehog, cogumelo pom pom, cogumelo ouriço ou fungo dente farpado. Na China e no Vietnã é conhecido como cogumelo cabeça de macaco (*Hou tou gū* ou *nám đầu khỉ*, respectivamente), no Japão é conhecido como cogumelo montanha de padre (*yamabushitake*) (FRIEDMAN, 2015). Suas sinonímias científicas são *Hydnum erinaceus*, *Clavaria erinaceus*, *Hericium erinaceum*, *Steccherinum quercinum*, *Hericium commune*, *Dryodon erinaceus*, *Martella echinus*, *Manina cordiformis*, *Hydnum hystricinum*, *Clavaria caput-medusae*, *Clavaria conferta*, *Hericiumhystrix*, *Hericium grande*, *Hericium strictum*, *Hericium unguiculatum*, *Hydnum omasum*, *Hydnum notarisii* e *Dryodon juranus*.

É um cogumelo comestível e medicinal, nativo da América do Norte, Europa e Ásia, sendo muito fácil de identificar: é o único com um corpo de frutificação que possui estrutura em forma de espinhas extremamente flexíveis, ramificada, pendurada e que balança. Cada espinha apresenta cerca de 1 cm de comprimento, de 8 a 16 cm de comprimento total do corpo de frutificação. Possui uma estirpe rígida e dura, que fica escondida anexada ao substrato. Sua carne é macia, suave e branca, sem odor ou sabor característico. Outra característica é que prefere madeiras vivas e com fendas recentemente cortadas. Sua coloração é branca, variando do amarelado ao castanho quando envelhece. Geralmente crescem sozinhos, no máximo em pares (FRIEDMAN, 2015; KIRK et al., 2008).



**Figura 26.** Aspecto geral do corpo de frutificação de *Hericium erinaceus*.

Fonte: <http://farm3.static.flickr.com>

O cogumelo *Hericium erinaceus* contém altas concentrações de  $\beta$ -glucans, heteroglucanas, heteroxilanas, além de triterpenos, que são responsáveis por atividades neuroregenerativas (FRIEDMAN, 2015; MORI et al., 2008; WONG et al., 2012), sendo promissor para terapia frente ao Alzheimer (JIANG et al., 2014) e melhorando a capacidade cognitiva, promovendo a mielinização *in vitro* e restabelecendo a conexão de nervos lesionados (WONG et al., 2014, 2011). Além disso, possui efeitos antioxidantes, hipoglicemiante, antitumoral, antiangiogênico, anti-inflamatório, imunomodulador, gastroprotetor, anti-*Helicobacter pylori*, cicatrizante e hepatoprotetor (ABDULLA et al., 2011; CHANG et al., 2016; CUI et al., 2016; WANG et al., 2005).

### 2.3 A importância biotecnológica dos fungos

O estudo de fungos permite perceber o quão importante é sua função na manutenção da homeostase do planeta, pois são eles os responsáveis pela última etapa do ciclo do carbono, tornando disponível, através de sua ação enzimática, nutrientes provenientes do material orgânico que anteriormente não estariam disponíveis. A lignina, celulose e hemicelulose são macromoléculas de tecidos vegetais que possuem função estrutural, e são extremamente recalcitrantes. Sem a ação enzimática dos basidiomicetos saprobióticos, basicamente seria impossível reciclar essa matéria orgânica (BUSWELL et al., 1996; EUGENIO et al., 2008; JO et al., 2010; XU et al., 2016; ZHAO et al., 2010).

A importância biotecnológica dos fungos reside nos seus benefícios e nos danos causados. Por exemplo, o fato de serem organismos saprobióticos favorece sua aplicação na indústria de biocombustíveis de enzimas para degradação da celulose e lignina, porém é ruim quando pensamos que este fungo pode degradar um alimento que poderia ser utilizado para nutrição animal (BUSWELL et al., 1996; HUANG et al., 2016; MIYAUCHI et al., 2016).

A maioria dos basidiomicetos encontra-se sob a forma micelial no substrato ou hospedeiro, geralmente junto ao solo. Ainda, podem aguardar dormentes na forma de esporos, somente esperando o substrato adequado. São os responsáveis pela decomposição de alimentos, tecidos, couro, e qualquer outro objeto proveniente de material orgânico, causando prejuízos econômicos. Também são responsáveis por enfermidades em plantas e animais, além do homem (ARORA, 1986; LAMPE, 1979).

Mas também são responsáveis por benefícios à saúde e à economia, pois são utilizados como alimentos nutracêuticos e constituem a base de diversos processos industriais. Por exemplo, processos fermentativos são a base para a produção de pão, vinho, vinagre, cerveja, fermentação da semente de cacau e o preparo de queijos *gourmet* de alto valor comercial, tais como o Roquefort e Gorgonzola (geralmente sob a ação do *Penicillium roquefortii*), Camembert (*P. camembertii*) ou na maturação de embutidos de carne (*Penicillium nalgiovense*). São responsáveis pela produção de diversos ácidos orgânicos, vitaminas e outros metabólitos empregados na medicina moderna, tais como a penicilina (*P. chrysogenum* ou *P. notatum*) ou em cerimônias religiosas, como no caso o *Stropharia cubensis*, que possui os alcaloides psilocibina e a psilocina, de ação alucinógena empregado em cerimônias no México (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006).

Na agricultura existe uma dualidade de ações, pois podem ser tanto prejudiciais como benéficos. São os responsáveis pela perda de safras inteiras, causado por fungos ferrugem ou carvão (fungos das classes Pucciniomycetes e Ustilaginomycetes), mas por outro lado, a formação de micorrizas aumenta a produtividade agrícola, enriquecendo o solo, pois essa ação mutualística entre planta-fungo promove o aumento da disponibilidade de nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo para plantas, aumentando também a absorção de água e a tolerância a condições desfavoráveis do solo ou a presença de patógenos (HERRERA; ULLOA, 1998).

Como alimento direto estão implicados em uma série de benefícios para saúde, atuando como modificadores de resposta biológica. Os fungos dos gêneros *Agaricus* spp. e *Pleurotus* spp. são amplamente utilizados como fonte de proteínas e vitaminas. Devido à sua maior capacidade de produzir enzimas extracelulares, os fungos podem ser verificados em solos, como patogênicos (animais e plantas), sobre plantas, suas raízes e resíduos, decompondo substâncias lignocelulósicas, exercendo um forte papel na ciclagem de nutrientes (BUSWELL et al., 1996; DJARWANTO; TACHIBANA, 2009; KANAGASABAPATHY et al., 2011; PINHEIRO et al., 2003).

Estes organismos vêm sendo estudados com relação a sua capacidade em produzir produtos de interesse biotecnológico, que podem ser úteis em diferentes processos, obtendo-se diversas substâncias ou misturas destas que são biologicamente ativas, as quais são utilizadas na agricultura, pecuária, na indústria alimentar e na medicina como parte da produção de enzimas, vitaminas, antibióticos, álcool, biosurfactantes, entre outros (CAMEOTRA, 2007; FEOFILOVA et al., 2009).

A fermentação de alimentos tem por objetivo acentuar o aroma e sabor dos alimentos, além de aumentar sua durabilidade. É muito apreciado pelos povos orientais, que dominam

técnicas de fermentação do arroz, trigo, soja, entre outros cereais. A fermentação promove a liberação de enzimas e polissacarídeos que apresentam efeitos nutracêuticos para o organismo (BIN, 2005; LEE et al., 2007; LI; SHAH, 2016; ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

Pensando-se sobre esta ótica, o acúmulo de resíduos agrícolas tais como a palha de arroz, trigo e outros cereais, e também dos resíduos agroindustriais dentre eles, tortas de algodão, dendê, pinhão-manso, soja e bagaço de cana-de-açúcar, além de serragem de madeira, são resíduos de difícil descarte, representando um problema ambiental devido à complexidade de sua matriz e sua difícil degradação (BUSWELL et al., 1996; JO et al., 2010; XU et al., 2016).

Os basidiomicetos representam uma fonte promissora na resolução desta problemática, pois devido à capacidade de converter lignina, celulose e hemicelulose em monômeros, e posteriormente em CO<sub>2</sub> e água, são muito utilizados em processos biotecnológicos a fim de degradar substratos recalcitrantes, aumentando a eficiência da cadeia de produção tanto da produção de cogumelos comestíveis ou ainda para produção de biomassa fúngica a ser empregada em processos industriais (HAN; CUI; WANG, 2008; LARRAN et al., 2015; MIYAUCHI et al., 2016). O corpo de frutificação e a biomassa impregnada de micélio podem possuir até cinco vezes mais proteína que a carne bovina ou suína, sendo isento de gorduras saturadas. Esse substrato ainda pode ser empregado como fertilizante em plantações, ou utilizados na nutrição animal, ou como agentes biorremediadores, eliminando substâncias contaminantes tais como agrodefensivos, e metais pesados do ambiente (FONSECA et al., 2010; HAN; CUI; WANG, 2008; MASHITAH; ZULFADHLY; BHATIA, 1999).

Além disso, possuem vitaminas A, C, D e do complexo B, além de altas concentrações dos íons de ferro, magnésio, cálcio e selênio. Essa fonte de vitaminas é explorada pela indústria farmacêutica, que utiliza os fungos *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus* e *Choanephora cucurbitarum* para produção de vitamina A e biotina, com alto grau de pureza. Os ácidos orgânicos linolêico e linolênico são isolados a partir de fungos do gênero *Mortierella*. Outros ácidos isolados e comercializados são o ácido cítrico, lático, fumárico e succínico, além de outras substâncias, tais como enzimas (amilases e proteases) e anti-inflamatórios corticoesteroides cortisona e hidroxiprogesterona (COTA et al., 2008; PATERSON, 2006; PUTTARAJU et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; ZHENG et al., 2014).

Os polissacarídeos, juntamente com a quitina, são os compostos presentes na parede celular fúngica e apresentam atividades biológicas interessantes. Estas estão sendo utilizadas principalmente como agentes preventivos e adjuvantes no tratamento do câncer, devido às suas atividades imunomodulatórias, antioxidantes e anti-inflamatórias. Além destes, há

presença de compostos de menor polaridade, tais como triterpenos que estão sendo associados às atividades antitumorais, hipolipêmiante, anti-hipertensiva, hipoglicemiante, gastroprotetora, anti-*Helicobacter pylori*, entre outras atividades biológicas relatadas (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009; ZHONG et al., 2015).

## 2.4 Métodos de criopreservação e manutenção de micotecas

A compilação de organismos em coleções biológicas acompanha a história da sistemática, reiniciando no ano de 1750, porém somente no século XIX que foram compiladas as primeiras coleções de microrganismos, proveniente de coleções particulares de pesquisadores. O termo conservação deriva do latim *conservatione*, que significa manter intacto, não deixar deteriorar, preservar. Ao longo dos anos, diversos estudos são aplicados investigando-se diversos métodos de conservação de microrganismos, células e tecidos. O objetivo das coleções de tecidos ou células é a preservação de dados genéticos *ex situ*. Sua principal função é a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de microrganismos e células autenticadas e certificadas, atuando como centros de informação especializada, onde o material biológico das coleções é matéria-prima para a obtenção de produtos biotecnológicos (HOLT; PICKARD, 1999; RYAN; SMITH, 2004).

Durante as pesquisas é comum que o acesso a espécimes seja limitado devido as mudanças, inviabilizando definitivamente a obtenção destes, sendo imprescindível que estes espécimes sejam manipulados e estocados cuidadosamente, empregando-se técnicas de preservação previamente testadas e validadas. A preservação dos bancos de amostras de células de microrganismos é um elemento central em estudos longitudinais, garantindo sua qualidade em pesquisas futuras (EICHLEROVÁ; HOMOLKA, 2014; HOLLAND et al., 2003; HOMOLKA, 2014).

Para tanto, se faz necessário o desenvolvimento de métodos de conservação de microrganismos e culturas, garantindo que estes permaneçam inalteráveis ao longo do tempo e viáveis. De acordo com Passador et al. (2010), uma boa técnica de preservação deve garantir que a linhagem celular esteja livre de mutações e alcançar a máxima viabilidade celular, proporcionando estabilidade genética.

Este é um processo complexo que requer conhecimento sobre a fisiologia do material biológico a ser preservado, prevenindo que ocorram reações, alterações morfofisiológicas e até mesmo a morte celular decorrentes das condições de armazenamento e preservação.



Assim, a conservação a longo prazo de microrganismos, células ou tecido de uma variedade de espécies, tanto procariontes quanto eucariontes ainda é um desafio (GIRÃO et al., 2004; HASEGAWA, 1996; PIETROWSKI et al., 2015).

A conservação de microrganismos depende de vários fatores, sendo eles ligados ao meio de cultivo ou substrato, que visam retardar o crescimento, a saber: método de cultivo, composição temperatura, pH e oxigenação do meio. A acidez do meio de cultivo influencia na propagação celular, inibindo o crescimento celular se este não for adequado. Temperaturas baixas de armazenamento são empregadas para retardar reações químicas, diminuir a ação enzimática e inibir o crescimento. A oxigenação do meio permite tornar as células mais resistentes ao choques hipo e hipertônico (ARORA, 2003; DAY; PENNINGTON, 1995).

A composição do meio de cultura também afeta a resistência celular. Em geral recomenda-se o uso de um meio pobre em nutrientes, sinalizando para a célula que é hora de desacelerar o metabolismo para acumular energia e evitar o crescimento acelerado e resultar em gerações alteradas geneticamente (mutantes). No entanto, em alguns casos, o meio de cultura altamente nutritivo é recomendável para aumentar a porcentagem de viabilidade celular, pois o acúmulo de proteínas, carboidratos e lipídios podem favorecer a resistência das células à liofilização ou criopreservação. Fatores ligados ao material biológico a ser preservado como idade, condição fisiológica e concentração da cultura no momento da conservação também interferem (HOMOLKA, 2014; HUBÁLEK, 2003)

A viabilidade durante a recuperação também está diretamente ligada à idade da cultura celular. Dados sugerem que a fase estacionária ao final do crescimento exponencial é a fase de escolha para a preservação, onde as células tornam-se ideais, tornado-se mais resistentes ao congelamento ou a desidratação (ARORA, 2003).

O sucesso da conservação depende do método utilizado, das características da célula e também do tempo de conservação. Estas diferenças refletem nos resultados obtidos durante a reativação de células e impede a implantação de um procedimento padrão, aplicável a todos os tipos de células (MANTOVANI et al., 2008; PIETROWSKI et al., 2015).

Dentro da ampla gama de métodos descritos para a preservação de culturas não existe um método considerado trivial e infalível. Embora existem dados que demonstram que haja variabilidade entre indivíduos da mesma espécie, os métodos mais generalizados são aqueles que permitem uma maior taxa de sobrevivência, garantindo a uniformidade das características genótípicas e fenotípicas, permitindo longos tempos de armazenamento. A **Tabela 1** resume as vantagens e desvantagens dos métodos de preservação (RYAN; SMITH, 2004).

**Tabela 1.** Características dos principais métodos de preservação

<b>Método de preservação</b>	<b>Organismos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Tempo de armazenamento</b>
Sub-cultura (repicagem contínua)	Bactérias Fungos filamentosos Leveduras Protozoários	Rentável a curto prazo Método simples	Curto período de tempo Risco de contaminação Alterações genéticas	2 semanas a 1 ano
Preservação em água (Castellani)	Fungos filamentosos Leveduras	Rentável a curto prazo Método simples	Deterioração da cultura Risco de contaminação Alterações genéticas	Até 2 anos
Preservação em óleo	Fungos filamentosos Leveduras	Rentável a curto prazo Método simples	Deterioração da cultura Risco de contaminação Alterações genéticas	Até 10 anos
Preservação em areia ou solo	Actinomicetos Fungos filamentosos	Rentável a curto prazo Método simples	Deterioração da cultura com aumento da umidade Alterações genéticas	Até 10 anos
Preservação em sílica gel	Fungos filamentosos Leveduras	Rentável a curto prazo Método simples	Efeitos tóxicos da sílica gel	Até 25 anos
Liofilização	Bactérias Fungos filamentosos Leveduras Protozoários	Facilidade e longo tempo de armazenamento Ambiente estéril de preservação (ampolas)	Método complexo, demorado e caro Não adequado à fungos que não esporulam	Até 50 anos
Secagem líquida ( <i>Liquid drying</i> )	Bactérias	Não há congelamento	Equipamento caro	Até 10 anos
Criopreservação em congelador mecânico	Bactérias Fungos filamentosos Leveduras Protozoários	Método simples com pouca deterioração das células	Equipamento caro com fornecimento ininterrupto de energia Efeitos tóxicos dos criopreservantes	Até 40 anos
Criopreservação em nitrogênio líquido	Bactérias Fungos filamentosos Leveduras Protozoários	Optimização do método para diferentes microrganismos com deterioração reduzida	Equipamento caro sendo necessário o controle da temperatura e níveis de nitrogênio Efeitos tóxicos dos criopreservantes	Potencialmente ilimitado

Fonte: adaptado de Ryan e Smith (2004).

A sub-cultura ou repicagem contínua consiste apenas em transferir periodicamente alíquotas do microrganismo para uma placa contendo substrato, geralmente ágar novo. A preservação em água, ou método de Castellani consiste em transferir pequenos blocos da cultura para água estéril ou salina (no caso de microrganismos sensíveis à pressão osmótica de soluções hipotônicas), podendo ser conservados em temperatura ambiente ou à  $6\pm 2^\circ\text{C}$ . A preservação em óleo (geralmente óleo mineral estéril) consiste na aplicação de uma camada de óleo sobre a cultura em meio sólido ou líquido, diminuindo a troca gasosa com o ambiente, e limitando a quantidade de oxigênio, resultando na diminuição do crescimento do microrganismo. Já a preservação em areia, solo ou sílica gel consiste basicamente na aplicação do microrganismos sob esse material com posterior secagem. Estes métodos são

indicados quando não há alternativas, sendo que, apesar de apresentarem-se simples e rentáveis a curto prazo, apresentam riscos, tais como a contaminação e alterações genéticas a longo prazo (ARORA, 2003).

A técnica de refrigeração promove significativo retardo na deterioração, favorecendo a estocagem de organismos vivos em estado suspenso por extensos períodos de tempo. A remoção da água de material biológico vivo através da sublimação do gelo (liofilização) proporciona retardo do metabolismo, sendo que a criopreservação e a liofilização são largamente empregadas para a conservação de coleções de culturas, garantindo assim o armazenamento de informações sobre a biodiversidade (DAY; PENNINGTON, 1995; DAY; STACEY, 2007; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005).

A liofilização envolve o congelamento rápido da cultura, seguido da secagem por sublimação do gelo à pressão reduzida, permanecendo a cultura em um estado inativo com atmosfera úmida menor que 5%, sendo necessária a adição de um agente crioprotetor. Após liofilização, as ampolas são guardadas à temperatura ambiente ou à  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Este é um dos métodos de escolha para fungos conidogênicos, porém não é ideal para fungos não esporulantes, permitindo tempos de armazenamento entre 20 e 50 anos, podendo ser transportadas sem reativação prévia (KURTZMAN, 2006; RYAN; SMITH, 2004).

A secagem líquida (*liquid drying*) é um processo semelhante à liofilização, porém sem a etapa de congelamento, onde as células e a solução de criopreservante são apenas secas, servindo somente para alguns tipos de bactérias (ARORA, 2003; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2006; MORGAN et al., 2006). Apesar da eficácia das técnicas de liofilização e secagem líquida, estas possuem baixa viabilidade quando aplicadas a fungos filamentosos.

Como alternativa, a criopreservação permite longos tempos de conservação, sendo aplicável a quase todos os tipos de células, com pequenos ajustes nos protocolos. Seu objetivo é minimizar os danos aos materiais biológicos durante o processo de estocagem a frio. Existem métodos de preservação à baixas temperaturas, geralmente entre  $- 80$  e  $- 150^{\circ}\text{C}$ , mas a grande maioria utiliza-se de nitrogênio líquido (ultra-baixas temperaturas), pois existem dados que demonstram que fungos filamentosos diminuem sua viabilidade em temperaturas superiores a  $- 170^{\circ}\text{C}$ . As técnicas de criopreservação em nitrogênio apresentam a vantagem da temperatura constante, sendo que a criopreservação em freezers está sujeita as variações de temperatura que podem comprometer a qualidade das amostras estocadas. De qualquer forma, independente da temperatura e se a criopreservação é em congelador mecânico ou nitrogênio,

é necessário a adição de solução criopreservante, geralmente o glicerol (KURTZMAN, 2006; PAOLI, 2005; SMITH; RYAN, 2012).

Altas taxas de sobrevivência são alcançadas através dos métodos criopreservantes, sendo prático em viabilizar populações íntegras, livres de mutações genéticas. Porém, estes protocolos requerem a adequação do método para cada tipo de célula (DUMONT; MARECHAL; GERVAIS, 2004, 2003). É um conceito errado atribuir a prerrogativa de sucesso à criopreservação de uma cepa ou espécie a todas as células ou organismos similares. Apesar desta ser por vezes verdadeira, está longe de ser uma regra, pois existem diferenças biológicas em resposta ao congelamento e uso de criopreservantes, havendo a necessidade de estudos para avaliar os critérios de preservação de cada material em estudo (DAY; PENNINGTON, 1995).

Outro fator de extrema importância nas técnicas de conservação é a atividade da água no meio extracelular, que pode afetar diretamente o crescimento dos microrganismos. O congelamento da água resulta na formação de cristais, que se expandem, e podem romper as membranas, resultando em dano à estrutura celular e comprometendo a viabilidade por danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos (CARNEIRO; CAL-VIDAL, 2000; CARVALHO, 2007).

Para tanto são utilizados agentes crioprotetores que previnem a formação destes cristais de água intracelular, e métodos que empregam diferentes taxas de resfriamento. O material biológico é submetido ao declínio gradativo da temperatura, obedecendo uma curva, permitindo um grau de desidratação capaz de evitar a formação de gelo intracelular (PEGG, 2002).

Outros danos decorrentes do processo de criopreservação são provenientes do emprego de criopreservante, pois geralmente estes são tóxicos, com efeitos deletérios especialmente sobre as membranas. Porém o uso de tais substâncias torna-se necessário para garantir maior taxa de viabilidade (FAHY et al., 1990; HUBÁLEK, 2003; PEGG, 2002).

O uso de agentes protetivos na criopreservação data de 1949, onde Polge e colaboradores demonstraram que o glicerol atua como criopreservante, sendo que gradativamente outros agentes como o DMSO, o metano e o etilenoglicol foram adicionados, permitindo o avanço na área da criobiologia (DAY; PENNINGTON, 1995).

Os agentes crioprotetores podem ser classificados de várias formas, mas a classificação com relação a capacidade de penetração no material biológico é a mais aceita, onde eles podem ser classificados como crioprotetores intra celulares ou penetrantes ou crioprotetores não penetrantes (MERYMAN, 1971, 2007).

Os crioprotetores não penetrantes são capazes de induzir o acréscimo da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular e prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular. Neste grupo destacam-se os mono, oligo polissacarídeos, metil celulose, albumina, gelatina, polivinilpirolidona, polietilenoglicol, óxido de polietileno, entre outros. Fixam-se a superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes e membranas (HUBÁLEK, 2003).

Os crioprotetores penetrantes apresentam a propriedade de realizar ligações com moléculas de água, diminuindo a formação o tamanho dos cristais de gelo, bem como reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Apresentam baixo peso molecular e alta solubilidade em meio. Alguns exemplos são o metanol, etnal. Etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformamida, metilacetamida, o glicerol e o DMSO (HUBÁLEK, 2003; MULLEN; CRITSER, 2007; NASH, 1962).

Dentre estes os agentes crioprotetores mais utilizados são DMSO, glicerol, soro sanguíneo, soro albumina, leite, sacarose, extrato de levedura, glicose, PVP, metanol, sorbitol, extrato de malte, dextrana e etilenoglicol. O uso destes pode ser limitado por efeitos tóxicos, em especial o estresse osmótico, que aumenta a probabilidade de induzir alterações morfo-genéticas, além de induzir a morte celular (FULLER, 2004; HUBÁLEK, 2003).

Pode-se destacar que a estocagem de cepas fúngicas pode ser feita em ágar de batata, com ou sem a adição de crioprotetores, mantendo a temperaturas de - 20 °C e - 70 ° C, que apesar das dificuldades, observa-se certa taxa de sobrevivência dos fungos submetidos ao congelamento sem o agente criopreservante, embora com a adição deste agente apropriado, as taxas de viabilidade fúngica aumentem consideravelmente (BRILHANTE et al., 2004; HUBÁLEK, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade de macrofungos pertencentes à coleção Embrapa Cenargem através de diferentes técnicas de criopreservação, observando-se alterações de metabolismo, principalmente sobre a concentração de polissacarídeos e atividades enzimáticas.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a viabilidade dos fungos em 4 e 8 meses sob diferentes métodos de criopreservação: 1) sub-cultura ou repique contínuo (BDA); 2) carvão ativado 0,1 %; 3) água estéril (Castellani); 4) glicerol 5%; 5) lactose 5%; 6) dimetilsulfóxido (DMSO) 1%; 7) polietilenoglicol (PEG) 6000 3%; 8) glicerol 5% acrescido de polietilenoglicol (PEG) 6000 3%; 9) lactose 5% acrescido de PEG 6000 3% e 10) DMSO 1% acrescido de PEG 6000 3%.
2. Determinar o crescimento micelial, quantidade de biomassa, concentração de polissacarídeos intracelulares e no meio de cultivo (extracelular), e concentração de  $\beta$ -glucanas de *Agaricus subrufescens* CC414 reativado a partir dos 10 diferentes métodos de criopreservação testados.
3. Determinar as atividades das enzimas  $\beta$ -glicosidase, xilanase, lacase, peroxidase totais, Manganês peroxidase e proteínas totais de *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404 reativados a partir do método 1 (BDA), 2 (Carvão ativado 0,1%) e 8 (glicerol 5% acrescido de PEG 6000 3%).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos macrofungos

As espécies de macrofungos utilizados na realização desse trabalho foram fornecidas pela Embrapa Cenargem, mantidas em coleção pela Embrapa Agroenergia. As cepas foram enviadas a Embrapa Agroenergia em placas de petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar – BDA (PDA –*Potato Dextrose Ágar*, em inglês), sendo sua manutenção efetuada através de repicagens contínuas, a cada três meses, com o objetivo de manter a viabilidade e espécimes considerados como padrões para a realização do trabalho. A coleção foi mantida em placas de petri em meio BDA e armazenadas em refrigeração (câmara fria) à  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ . O micélio fúngico utilizado nos experimentos foi repicado a partir destas matrizes para os agentes criopreservantes e posteriormente para BDA, previamente autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 min e mantidos em estufa incubadora à  $28^{\circ}\text{C}$ , por 10 dias. A **Tabela 2** apresenta os macrofungos da coleção.

### 4.2 Métodos de preservação comuns

#### 4.2.1 Repique contínuo em meio BDA

Os fungos viáveis da coleção foram selecionados e mantidos em placas de em placas de petri em meio BDA sob refrigeração à  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$  (câmara fria). Este tratamento foi considerado como padrão para a manutenção dos fungos e para comparação com a manutenção por agentes criopreservantes.

#### 4.2.2 Água destilada estéril

Os criotubos de 5 mL foram preenchidos com 4,5 mL de água destilada e esterilizados em autoclave durante 20 min a  $121^{\circ}\text{C}$ . Após a autoclavagem foi realizada a repicagem dos macrofungos em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de perfurador de rolhas e palitos estéreis. Foram realizadas 8 repetições para cada macrofungo, onde em cada criotubo foram

armazenados 5 discos de 5 mm cada. Após a repicagem as caixas de estocagem foram armazenadas em câmara fria a  $6\pm 2$  °C.

#### 4.2.3 Carvão ativado

Inicialmente, foi adicionado 0,1% de carvão ativo em pó ao meio BDA em microndas. Após homogenização, em criotubos de 5 mL foram adicionados 2,5 mL deste meio, sendo esterilizados em autoclave durante 20 min a 121 °C.

Após a autoclavagem, os criotubos foram inclinados em um anteparo de 10 mm, utilizando uma mangueira de silicone esterilizada como suporte, até a solidificação. Sequencialmente, foi realizada a repicagem dos macrofungos em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de furador de rolhas e palitos de dente estéreis. Foram realizadas 8 repetições para cada macrofungo, sendo que em cada criotubo foi inserido um disco micelial de 5 mm. Os criotubos foram armazenados em estufa incubadora por um período de 10 dias até o crescimento do micélio. Após o crescimento as caixas de estocagem foram armazenadas em câmara fria a  $6\pm 2$  °C.



**Tabela 2.** Macrofungos pertencentes à micoteca da Embrapa Cenargem utilizados neste trabalho.

<b>n.</b>	<b>Cód. Micoteca</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Família</b>	<b>Ordem</b>
1	CC 24	<i>Ganoderma lobatum</i>	Ganodermataceae	Polyporales
2	CC 27	<i>Flammulina velutipes</i>	Physalacriaceae	Agaricales
3	CC 28	<i>Grifola frondosa</i>	Meripilaceae	Polyporales
4	CC 29	<i>Hericium erinaceus</i>	Hericiaceae	Russulales
5	CC 37	<i>Oudemansiella canarii</i>	Physalacriaceae	Agaricales
6	CC 40	<i>Lentinus strigosus</i>	Polyporaceae	Polyporales
7	CC 89	<i>Pholiota nameko</i>	Strophariaceae	Agaricales
8	CC 94	<i>Volvariella volvacea</i>	Pluteaceae	Agaricales
9	CC 102	<i>Fistulina hepatica</i>	Fistulinaceae	Agaricales
10	CC 110	<i>Pleurotus sapidus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
11	CC 111	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	Pleurotaceae	Agaricales
12	CC 154	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Pleurotaceae	Agaricales
13	CC 159	<i>Coprinus comatus</i>	Agaricaceae	Agaricales
14	CC 247	<i>Trametes</i> spp.	Polyporaceae	Polyporales
15	CC 328	<i>Schizophyllum commune</i>	Schizophyllaceae	Agaricales
16	CC 335	<i>Pleurotus florida</i>	Pleurotaceae	Agaricales
17	CC 348	<i>Auricularia auricula-judae</i>	Auriculariaceae	Auriculariales
18	CC 351	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganodermataceae	Polyporales
19	CC 353	<i>Pleurotus eryngii</i>	Pleurotaceae	Agaricales
20	CC 380	<i>Pleurotus columbinus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
21	CC 389	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
22	CC 390	<i>Lentinula edodes</i>	Marasmiaceae	Agaricales
23	CC 400	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Polyporaceae	Polyporales
24	CC 403	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
25	CC 404	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganodermataceae	Polyporales
26	CC 412	<i>Lentinus sajor-caju</i>	Polyporaceae	Polyporales
27	CC 414	<i>Agaricus subrufescens</i>	Agaricaceae	Agaricales
28	CC 416	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
29	CC 418	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	Lyophyllaceae	Agaricales
30	CC 420	<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	Auriculariaceae	Auriculariales
31	CC 421	<i>Agaricus bitorquis</i>	Agaricaceae	Agaricales
32	CC 425	<i>Coprinus comatus</i>	Agaricaceae	Agaricales
33	CC 427	<i>Trametes</i> spp.	Polyporaceae	Polyporales

### 4.3 Métodos de criopreservação propostos

Na busca do melhor agente criopreservante, a longo prazo, foram utilizadas sete diferentes soluções (em água):

1. glicerol 5%,
2. lactose 5%;
3. dimetilsulfóxido (DMSO) 1%;
4. PEG 6000 3%;
5. DMSO 1% acrescido de PEG 6000 3%;
6. glicerol 5% acrescido de polietilenoglicol (PEG) 6000 3%; e
7. lactose 5% acrescido de PEG 6000 3%.

Com exceção das soluções que contém DMSO, todas as demais soluções foram esterilizadas durante 20 min a 121°C. O DMSO foi previamente filtrado antes da confecção das soluções. As soluções foram mantidas em refrigerador ( $6\pm 2^\circ\text{C}$ ) até o momento do uso (HUBÁLEK, 2003; MANTOVANI et al., 2008).

Foram utilizados criotubos de 2 mL com 800  $\mu\text{L}$  da solução crioprotetora, sendo inseridos 5 discos miceliais de 5 mm em cada criotubo. Consistiu-se em 8 repetições para cada macrofungo em cada uma das soluções utilizadas.

Os criotubos foram armazenados em caixa de estocagem e armazenados em ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 4.4 Determinação da porcentagem de viabilidade micelial

Após o período de 4 e 8 meses foram retirados 3 criotubos de cada tratamento sendo os tubos retirados da câmara fria foram mantidos na temperatura ambiente por 15 min e os criotubos retirados do ultrafreezer ( $-80^\circ\text{C}$ ) foram mantidos em refrigerador por um período de 6 h. Em seguida foram transportados para a capela de fluxo laminar, sendo retirados os discos/frações de 5 mm de micélio contidos nos criotubos, com o auxílio de palitos previamente autoclavados e transferidos para placas de petri com meio BDA e carvão ativado (0,1%). As placas foram armazenadas em estufa incubadora por 10 dias, observando diariamente a viabilidade dos discos miceliais.

Todos os fungos foram avaliados com relação à porcentagem de reativação. Para o macrofungo *Agaricus subrufescens* CC41 foi determinado o crescimento micelial, quantidade de biomassa, concentração de polissacarídeos presentes na células e no meio de cultivo

(extracelular), e concentração de  $\beta$ -glucanas de 4 reativado a partir dos 10 diferentes métodos testados. Para os macrofungos *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404) reativados a partir do método 1, 2 e 5 foram determinadas as atividades das enzimas  $\beta$ -glicosidase, xilanase, lacase, peroxidase totais, Manganês peroxidase e proteínas totais.

#### **4.5 Análises de polissacarídeos de *Agaricus subrufescens* CC414**

A biomassa foi centrifugada e as extrações de polissacarídeos foram realizadas de acordo com Camelini et al., (2014). Foram utilizados 10 mL de água destilada para fragmentar a biomassa utilizando ultra-turrax a 121°C durante 30 min. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante recolhido. Este processo foi repetido por 3 vezes. Um volume igual de etanol a 96°GL foi adicionado aos sobrenadantes recolhidos para precipitação de polissacarídeos totais (IPS) e para a precipitação de polissacarídeos extracelulares (EPS). Estes polissacarídeos foram evaporados utilizando Speed-Vac à temperatura ambiente e pesados.

As  $\beta$ -glucanas foram analisadas utilizando kit para determinação de  $\beta$ -glucanas (Megazyme, Wicklow, Irlanda), a partir de 5 mg de IPS e EPS dissolvidos em tampão de acetato de sódio 200 mM, pH 5, colocados em banho de ultrassom a 65 ° C por 1,5 h. As amostras foram analisadas em microplaca contendo uma mistura de exo-1,3- $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -glicosidase, sendo incubadas a 40 ° C durante 60 min em termociclador. Os hidrolisados polissacarídeos foram analisados com glicose oxidase/peroxidase a 40 ° C durante 20 min, a 510 nm. A curva de calibração de glucose foi preparada de 0,025 a 0,5 mg / mL.

A massa molar dos polissacarídeos nas amostras foi estimada por HPLC-IR (Shimadzu) utilizando uma coluna TSK gel 5000 PW (7,8 x 300 mm, Tosoh Corporation). As análises foram realizadas num cromatógrafo Perkin Elmer série 200 com um detector de índice de refração, com uma fase móvel de NaOCH<sub>3</sub> 0,003 M e fluxo de 1,2 mL/min. Uma curva padrão foi realizada com dextranas de peso molecular padrão (12-2000 KDa, Sigma, EUA) com concentração de 3 mg/mL e injeção de 20  $\mu$ L. As amostras foram analisadas a uma concentração de 1 m /mL, dissolvidas na fase móvel.

#### 4.6 Análise das atividades enzimáticas em *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404

Com base nos resultados de criopreservação de 4 e 8 meses e com o interesse econômico, foram selecionados cinco macrofungos: *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404, que foram armazenados nos seguintes métodos de preservação: Batata-dextrose-ágar (BDA), Carvão ativado a 0,1% e a mistura de crioprotetores: glicerol 5% + PEG 6000 3%.

Alíquotas de cada método foram incubadas em estufa a 28°C por um período de 10 dias, e posteriormente foram feitas repicagens desses macrofungos em frascos contendo 10% de substrato composto por biomassa de fibra de dendê (8g) e de torta do caroço de algodão (2g), previamente esterilizados. Os frascos foram armazenados em estufa a 28°C por 15 dias. Ao final deste período, foi adicionado o detergente PEG6000 20% aos frascos, que foram submetidos a homogeneização em Ultraturrax durante 10 minutos. Com o auxílio de gazes e funis, o conteúdo dos frascos foi filtrado em tubos falcons de 50mL e centrifugados à 9000rpm, durante 9 minutos. A fração líquida foi reservada para ensaios de determinação das atividades enzimáticas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e em tampão citrato de sódio ácido cítrico 0,1 M pH 5 a 50°C.

##### 4.6.1 Determinação da atividade da $\beta$ -glicosidase

A determinação da atividade da  $\beta$ -glicosidase foi realizada pela quantificação da glicose liberada na reação, utilizando-se celobiose como substrato, sendo a análise realizada em duas etapas (ADNEY; BAKER, 1996; GHOSE, 1987). Inicialmente foi realizado o ensaio enzimático, o qual consistiu na incubação, em microplaca para PCR, de 100  $\mu$ L dos extratos enzimáticos, com um 100  $\mu$ L de uma solução de celobiose a 15 mM (citrato de sódio ácido cítrico 0,1 M pH 5) em termociclador a 50°C, durante 30 minutos, com passo final à 95 °C por 10 mn. O branco da enzima (para cada extrato) foi feito substituindo a solução de celobiose por 100 $\mu$ L de tampão citrato de sódio-ácido cítrico 0,1M, pH5, e o branco do substrato substituindo o extrato pelo mesmo tampão. Ambos foram incubados junto com os ensaios. Foi ainda preparada uma curva de glicose, nas concentrações 0 - 250 $\mu$ g/mL, em tampão citrato de sódio-ácido cítrico 0,1M pH 5.

A segunda etapa consistiu na determinação da concentração de glicose formada no ensaio enzimático, utilizando-se glicose monoreagente, o qual contém o reagente GOD-POD composto por um sistema enzimático (glicose oxidase e peroxidase), responsável pela reação com as moléculas de glicose e formação de compostos decor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração do carboidrato presente. Dessa forma, 2,5 µL das amostras resultantes do ensaio enzimático foram incubados com 250 µL do reagente GOD-POD (Glicose oxidase, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), por 10 minutos a 37°C, sendo a absorvância determinada a 505 nm. O equipamento foi zerado no tempo 0.

A concentração da glicose liberada foi estimada pela **Equação 1**:

$$Glicose = \left( \frac{ABS_a}{ABS_p} \right) \times 100$$

**Equação 1.** Fórmula para determinação da glicose liberada. **ABS<sub>t</sub>**: absorvância a amostra; **ABS<sub>p</sub>**: absorvância do padrão.

Os dados foram expressos em curva-padrão com diferentes concentrações de glicose. A atividade da β-glicosidase foi expressa em como U/mL.

#### 4.6.2 Determinação da atividade da xilanase

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo método de Miller (1959), com algumas modificações (GHOSE, 1987; ZHANG et al., 2009), através da reação de uma mistura contendo 1,0 mL do extrato enzimático filtrado e 3 mL da solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Utilizar o branco do extrato e o branco do substrato como controle. A mistura foi incubada à 100°C por 10 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata de 3 replicatas. As leituras das absorvâncias de cada ensaio foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os dados foram expressos em curva-padrão com diferentes concentrações de glicose (0,5 a 5,0 µg/mL). A atividade da xilanase foi expressa em U/mL.

#### 4.6.3 Determinação da atividade da lacase

Para determinar a atividade de lacases foi utilizada a mistura reacional para ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), segundo descrito por Wolfenden e Willson(1982). Em placa de 96 poços foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5 com 180  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. Foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de solução de ABTS 5 mM, e imediatamente realizada a leitura da cinética de reação a cada 30 segundos durante 90 segundos à 25 °C, no comprimento de 420 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata de 3 replicatas. A atividade enzimática foi calculada com base na absorvidade molar dos substratos oxidados ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{Mol}$  de ABTS por minuto.

#### 4.6.4 Determinação da atividade da peroxidase totais

A atividade das peroxidases totais foi realizada segundo o método descrito por Heinzkill et al. (1998). Em placa de 96 poços foram adicionados 140  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5, 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM com 180  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. Foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de solução de ABTS 5 mM, e imediatamente realizada a leitura da cinética de reação a cada 30 segundos durante 90 segundos à 25°C, no comprimento de 420 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata de 3 replicatas. A atividade enzimática foi calculada com base na absorvidade molar dos substratos oxidados ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{Mol}$  de ABTS por minuto.

#### 4.6.5 Determinação da atividade da manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase (MnPx) foi determinada pelo método proposto por Kuwahara et al., 1984. A enzima manganês peroxidase foi determinada através da oxidação de solução reagente contendo 100 $\mu\text{L}$  de vermelho de fenol 0,1%, 100 $\mu\text{L}$  de lactato de sódio 250mM, 200 $\mu\text{L}$  de albumina bovina 0,5%, 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  2mM e 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2mM por 0,5mL do extrato enzimático, diluído em 1mL de tampão succinato de sódio 20mM pH 4,5, em banho-maria à 30°C por 5 minutos. Após 5 minutos de reação foi interrompida

adicionando 40  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 mM, sendo que o branco da enzima recebeu o NaOH antes da incubação, afim de evitar a reação. A leitura foi realizada no comprimento de 610 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando o branco da enzima como controle. A atividade enzimática da MnPox foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ( $\epsilon_{610} = 44600 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{Mol}$  de vermelho de fenol por minuto.

#### 4.6.6 Determinação de proteínas totais pelo método de albumina de soro bovino – BCA

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Smith et al., 1985 e especificações do fabricante do kit Thermo Scientific - Pierce® *BCA Protein Assay Kit*. A partir de uma solução de albumina de soro bovino 2 mg/mL, foi preparada a curva em diferentes concentrações (0,05 – 2,0 mg/mL) em solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M, pH 5, utilizando água destilada como branco. Foram transferidos 25  $\mu\text{L}$  de cada ponto da curva e de cada replicata dos extratos enzimáticos para uma microplaca de 96 poços. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de reagente de trabalho, composto por 50 partes de reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em 0,1 M de sódio) e 1 parte de reagente B (sulfato cúprico 4 %), disponível no kit. A placa foi agitada por 30 segundos e incubada à 37 °C por 30 minutos.. A leitura foi realizada em até 10 minutos em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), sendo a absorvância determinada a 562 nm. Os dados foram expressos em curva-padrão com diferentes concentrações de BSA. A concentração de proteínas totais foi expressa em mg/mL.

## 5 **CAPÍTULO 1 - Assessment of the viability and production of $\beta$ -glucans by *Agaricus subrufescens*CC414 (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) after cryopreservation**

### 5.1 **Título em português**

Avaliação da viabilidade e produção de  $\beta$ -glucanas por *Agaricus subrufescens*CC414 (sin. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) após criopreservação

Submetido para: Journal of Microbiological Methods – Elsevier (ISSN: 0167-7012)

Fator de impacto: 1,857

### 5.2 **Resumo**

O fungo *Agaricus subrufescens* (sin. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) é um fungo basidiomiceto comestível, que está ganhando recentemente notoriedade, de acordo com resultados de pesquisas que indicam os valores nutricionais e nutracêuticos das espécies, especialmente na busca de princípios ativos que possam ser usados no desenvolvimento de biofármacos que podem combater alguns tipos de câncer, por exemplo. Uma das etapas fundamentais no processo de busca desses princípios bioativos é impedir que os microrganismos sofram modificações genéticas sobre seu uso e preservação. Subculturas contínuas são um dos métodos mais utilizados para a preservação de alguns macrofungos. Esta técnica pode alterar as características das espécies, por isso é necessário desenvolver técnicas para a manutenção de genótipos e fenótipos por longos períodos de tempo. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de produção de *A. subrufescens*CC414 para extração de biomassa e polissacarídeos após criopreservação em diferentes crioprotetores, comparando os resultados com aqueles comumente obtidos para a preservação de microrganismos. O micélio cultivado em agar de batata-dextrose (BDA) foi armazenado (-80°C) com os crioprotetores glicerol a 5%, dimetilsulfóxido (DMSO) 1%, lactose 5% e misturas destes com PEG 6000 3%, além de métodos clássicos de preservação tais como subcultura (BDA), Castellani e carvão ativado, preservados a 8°C. Após 4 meses de armazenamento, os discos do micélio provenientes de todos os diferentes métodos foram transferidos para meio de ágar com carvão ativado para avaliar a viabilidade e o diâmetro da colônia micelial. Após o crescimento, o micélio foi inoculado em meio líquido para determinar o conteúdo de biomassa e polissacarídeos. Todos os crioprotetores utilizados asseguraram a viabilidade do fungo durante o período analisado (4 meses de armazenamento). De acordo com os resultados, os métodos 4 (glicerol) e 9 (lactose + PEG 6000) foram métodos que estão mais próximos dos valores observados nos métodos controles 1, 2 e 3, sugerindo que esses métodos são mais adequados para criopreservação a -80 ° C.



**Assessment of the viability and production of  $\beta$ -glucans by *Agaricus subrufescens* CC414 (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) after cryopreservation**

Alexandra de Souza<sup>1,2</sup>, Carla Maisa Camelini<sup>1,3</sup>, Marivane Lemos<sup>1,3</sup>, Marli Camasola<sup>3</sup>, Joice Raisa Barbosa Cunha<sup>1,4</sup>, Arailde Fontes Urban<sup>5</sup>, Thais Demarchi Mendes<sup>1</sup>, Simone Mendonça<sup>1\*</sup> e Félix Gonçalves de Siqueira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemical Processes (LPB), Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica – PqEB s/n Asa Norte, Brasília, 70002-904, DF, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Multidisciplinar em Saúde, Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Rua Rio de Contas, Qd 17, 58, Candeias, Vitória da Conquista 45029-094, BA, Brazil.

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Bairro Petrópolis, Caxias do Sul, 95070-560, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001, Kennedy, Lavras, 37200-000, MG, Brazil.

<sup>5</sup> Laboratory of Edible Mushroom, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica – PqEB s/n Asa Norte, Brasília, 70901-904, DF, Brazil.

**\* Corresponding author**

Simone Mendonça

simone.mendonca@embrapa.br

Félix Gonçalves de Siqueira

felix.siqueira@embrapa.br

Laboratory of Biochemical Processes (LPB), Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica – PqEB s/n Asa Norte, Brasília, 70002-904, DF, Brazil.

Telephone: 55-61-3448-2322 Fax: 55-61-3448-1589

## HIGHLIGHTS

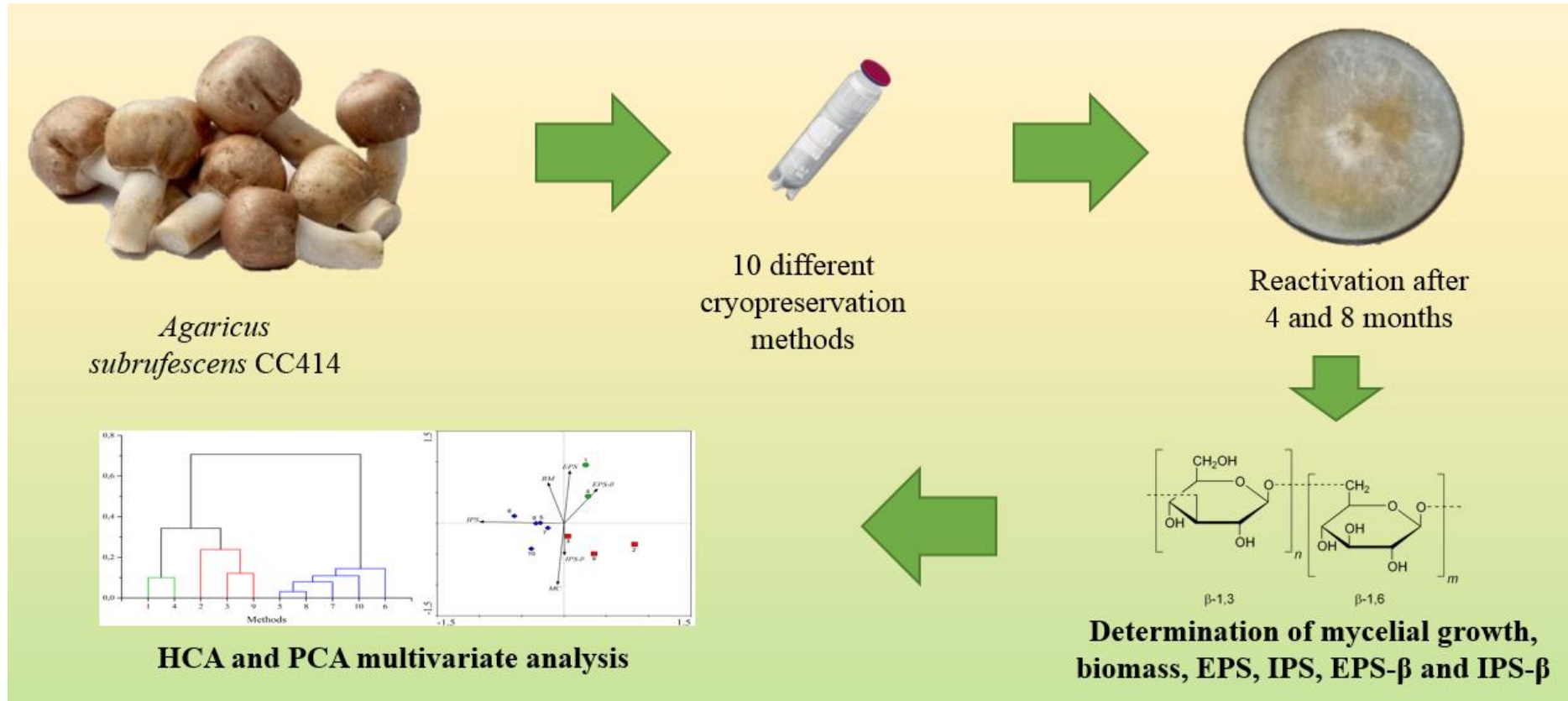
- *A. subrufescens* CC414 is viable after cryopreservation in all different cryopreservant tested.
- *A. subrufescens* CC414 does not present biomass production difference after reactivation.
- The mycelial growth of *A. subrufescens* CC414 is inversely proportional to the concentration of the total polysaccharides from extracellular matrix (EPS).
- The cryopreservation of *A. subrufescens* CC414 conditions are best observed in 5% glycerol and 5% lactose + PEG 6000 3%.

## ABSTRACT

The fungus *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) is an edible basidiomycete, which is gaining notoriety recently according to research results that indicate the nutritional and nutraceutical values of the species, especially in the search for active ingredients that can be used in the development of biopharmaceuticals that can fight some types of cancer, for example. One of the key steps in the search process for these bioactive principles is that organisms do not suffer genetic modifications over their use and preservation. Continuous subcultures are one of the most used methods for preservation for some macrofungi. This technique can change characteristics of the species, so it is necessary to develop technologies for the maintenance of genotypes and phenotypes over time. The aim of this study was to evaluate the viability of producing *A. subrufescens* CC414 for biomass and polysaccharides extraction after cryopreservation in different cryoprotectants, comparing the results with those commonly obtained for preservation of microorganisms. The mycelium grown on potato-dextrose-agar (PDA) was stored (-80 °C) with the cryoprotectants glycerol 5%, dimethylsulfoxide (DMSO) 1%, lactose 5%, and mixtures of these with PEG 6000 3%, and compared with typical methods of subculturing, such as Castellani, activated charcoal at 8 °C and PDA. After 4 months as storage, the mycelium from all different methods was transferred to agar medium with activated charcoal to assess the viability and diameter of the mycelial colony. After growth, the mycelium was inoculated in liquid medium to determine the biomass and polysaccharides contents. All cryoprotectants used ensured the viability of the fungus during the analyzed period (4 months of storage). According to the results, methods 4 (glycerol) and 9 (lactose + PEG 6000) are methods that are closer to the values observed in the methods controls 1, 2 and 3, suggesting that these methods are most suitable for cryopreservation at -80 °C.

**Keywords:** *Agaricus subrufescens* CC414. Cryopreservation. Polysaccharides.  $\beta$ -glucans.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## 1 Introduction

*Agaricus subrufescens* CC414 is an edible mushroom, basidiomycete taxonomically belongs to Agaricaceae family. Commonly known as almond mushroom, mushroom of the sun, God's mushroom, mushroom of life, royal sun agaricus, *jisongrong* or *himematsutake* (Firenzuoli et al., 2008; Souza Dias et al., 2008). This species has also been described with the synonymy of *A. blazei* and *A. brasiliensis* was first observed in the northeastern United States of America and Canada, subsequently observed in California, Hawaii, Great Britain, Netherlands, Taiwan, Philippines and Brazil (Kerrigan, 2005; Wisitrassameewong et al., 2012).

Currently is observed an increasing number of published studies investigating the biological activities of *A. subrufescens* CC414, especially as biological response modifiers (BRM) (Firenzuoli et al., 2008; Tzianabos, 2000), associated to the presence of polysaccharides, such as  $\beta$ -glucans (Chang and Buswell, 1996; Leung et al., 2006; Oliveira et al., 2015; Wasser, 2003).  $\beta$ -glucans are considered nutrients from the fungal cell wall, consisting of glucose polymers appear to modulate immune responses, often exerting activity on leukocytes and contributing to the increased resistance during infections and cancer (Lakhanpal and Rana, 2005; Mantovani et al., 2008; Volman et al., 2008). These compounds are present both in fruiting bodies as the mycelium and culture medium (Cheung, 1996; Rop et al., 2009).

Samples of these macrofungi must be stored in appropriate conditions of stock, such as mycology collections and germplasm banks, ensuring their viability and genetic, physiologic and metabolic stability (Homolka, 2013; Sato et al., 2012), and due to the high economic value, relative to its products that can give rise (Camelini et al., 2014; Palacio et al., 2014).

The most common methods for maintenance and preservation in the management of basidiomycetes are still continuous subculturing on agar slants (Onions, 1971), preservation under mineral oil (Perrin, 1979), storage in sterile water (Castellani, 1939), drying (Smith and Onions, 1983), freeze-drying and cryopreservation (Homolka, 2014).

Addition of activated charcoal to culture medium is an alternative that can increase fungal viability stored under refrigeration over time since it slows the fungal metabolism, acting as a neutralizer of substances or adverse metabolites that may be produced during preservation (Camelini et al., 2014; Stielow et al., 2011).

Cryopreservation act in the microorganism metabolism so as to minimize the probability of genetic mutations from freezing at temperatures between -4 and -80

°C(Homolka, 2014; Homolka et al., 2010). The reduction on the physical and chemical stresses generated in the cells by freezing and its subsequent thawing is mediated by the use of cryoprotectants, which have the capability of penetrating the cell or preserving the microorganism by altering the surrounding media(Homolka et al., 2001; Palacio et al., 2014). The use of cryoprotectants prevents the formation of crystal water with consequent damage and cellular death. However, some cryoprotectants can act as growth inhibitors upon recovery from the mycelium. Macrofungi in general have loss of cell viability after rapid freezing processes, even in the presence of good cryoprotectants agents and specific care (Camelini et al., 2014; Homolka, 2014; Tedeschi and Paoli, 2011).

Thus, this study aimed to compare the viability, biomass and polysaccharides contents of *A. subrufescens* CC414 after preservation in activated charcoal and Castellani, in comparison with cryopreservation in different cryoprotectants such as glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), polyethyleneglycol 6000 (PEG 6000), lactose, and combinations of glycerol, DMSO and lactose with PEG 6000, and the production of total polysaccharides and  $\beta$ -glucan in the supernatant and the extracellular medium after the reactivation of the *A. subrufescens* CC414.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Reagents and solvents**

Activated charcoal, glycerol, lactose, dimethylsulfoxide, Polyethylene glycol (PEG) 6000, ammonium phosphate monobasic, calcium chloride, FeNaEDTA, magnesium sulfate, potassium phosphate monobasic, sodium chloride, malt extract, sucrose, thiamine, ethanol, sodium acetate, sodium methoxide and potato-dextrose-agar were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).  $\beta$ -glucan Assay Kit for determining the  $\beta$ -glucans concentration was purchased from Megazyme (Kit (Wicklow, Ireland). Deionized water was purified using Milli-Q system (Millipore, Massachusetts, USA). All other reagents and solvents were of analytical grade.

### **2.2 Microorganism**

The isolate *A. subrufescens* CC414 used in this study is deposited in the collection of Microorganisms of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology and Embrapa Agroenergy (Brasilia, Distrito Federal), kept refrigerated with monthly subculturing into Petri dishes

containing PDA medium (control). The collection of the fungus was made under the authorization for bioprospecting SISBIO/IBAMA n. 41346-1.

### 2.3 Preservation

For cryopreservation, we used 2 mL cryotubes with the addition of 800  $\mu$ L of different cryoprotectant solutions: 1. potato-dextrose-agar (PDA); 2. Activated charcoal 0.1%; 3. Castellani (sterile ultrapure water); 4. Glycerol 5%; 5. Lactose 5%; 6. Dimethylsulfoxide (DMSO) 1%; 7. Polyethyleneglycol (PEG) 6000 3%; 8. Glycerol 5% + PEG 6000 3%; 9. Lactose 5% + PEG 6000 3%; and 10. DMSO 1% + PEG 6000 3%. Method 1 (PDA) is a subcultivation method for continuous maintenance, and methods 2 (activated charcoal) and 3 (Castellani) are the most commonly used preservation methods. By default, these three methods are considered as controls. In each cryovial it was added 5 mycelial disks with 5 mm diameter extracted from the PDA cultivation medium (Petri dish).

The discs immersed in the solutions 1 to 3 were stored in a fridge, under refrigeration between 4 and 8 °C (cold room). The discs immersed in the solutions 4 to 10 were kept in an Ultrafreezer at -80 °C. After four-month storage, two tubes of each cryopreservative solution were subjected to reactivation of macrofungi. Those removed from the Ultrafreezer were stored in a refrigerator for 2 h before transferring the mycelium into the culture medium for viability assessment. The discs/mycelium (preserved) were incubated at 28 °C for 10 days in Petri dishes containing PDA culture medium with activated charcoal (0.1%). Viable discs were transferred to another plate in PDA culture medium and the colony radius was measured on the 10th day of growth.

### 2.4 Liquid medium cultivation

After growing on plates, 5 mycelial discs were inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of modified Melin-Norkrans (MNM, constituted by ammonium phosphate monobasic (0.184 g/L), calcium chloride (0.05 g/L), FeNaEDTA (0.02 g/L), magnesium sulfate (0.0358 g/L), potassium phosphate monobasic (0.50 g/L), sodium chloride (0.025 g/L), malt extract (3.00 g/L), sucrose (16.0 g/L) and thiamine (0.0001 g/L) liquid medium (Marx, 1969), and incubated at 28 °C for 15 days (5 repetitions). The biomass obtained in three flasks was measured after being dried in an oven at 65 °C for 24 h.

## 2.5 Polysaccharide analyses

The biomass was centrifuged and polysaccharide extractions performed according to Camelini et al. (2014). 10 mL of distilled water was used to fragment the biomass using an ultra-turrax at 121 °C for 30 min. The extract was centrifuged and the supernatant collected. This process was repeated 3 times. An equal volume of 96 °GL ethanol was added to the collected supernatants for precipitation of total polysaccharides (IPS), and for the precipitation of extracellular polysaccharides (EPS). These polysaccharides were evaporated in a Speed-Vac at room temperature and weighed.

The  $\beta$ -glucans were analyzed using an  $\beta$ -Glucan Assay Kit (Megazyme, Wicklow, Ireland), starting from 5 mg of IPS and EPS dissolved in a 200 mM (pH 5) sodium acetate buffer, placed in an ultrasonic bath at 65 °C for 1.5 h. Samples were analyzed in a microplate containing a mixture of exo-1,3- $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase incubated at 40 °C for 60 min in a thermocycler. The polysaccharide hydrolysates were analyzed with glucose oxidase/peroxidase at 40 °C for 20 min, at 510 nm. The glucose calibration curve was prepared from 0.025 to 0.5 mg/mL.

The molar mass polysaccharide on the samples were determined by HPLC-IR (Shimadzu) using a TSK gel 5000 PW column (7.8  $\times$  300 mm, Tosoh Corporation). Analyses were done in a Perkin Elmer Series 200 chromatograph with a refractive index detector, with a mobile phase of NaOCH<sub>3</sub> 0.003 M, and flux of 1,2 mL/min. A standard curve was performed with standard molecular weight dextrans (12-2000 KDa, Sigma, USA) with concentration of 3 mg/mL and injection of 20  $\mu$ L. Samples were analyzed at a concentration of 1 mg/mL, dissolved in the mobile phase.

## 2.6 Statistical analysis

The data were expressed as the mean $\pm$ S.E.M, and the groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ), using the Statistica version 12 statistical software (Statsoft, Tulsa, USA) for all statistical analyses. The correlation between the different cryopreservation methods and production of polysaccharides, such as data mycelial growth (mm/day), biomass (g/L), EPS (mg/L), IPS (mg/g de biomassa), beta-glucan from EPS (mg/mg; EPS- $\beta$ ) and beta-glucan from IPS (mg/mg; IPS- $\beta$ ) were correlated by Spearman correlation coefficients. The  $p$  values less than 0.05 were considered significant.



These same parameters were subjected to a pretreatment prior to statistical analysis and were converted by equation 1, were  $\hat{x} = \log_{10}(x + 1)$ . The transformed data were subjected to multivariate statistics by methods unsupervised, as the Hierarchical Cluster Analysis (HCA) by Ward(1963) method and Principal Component Analysis (PCA), performed in OriginPro version 9.6 (OriginLab, Wellesley Hills, USA) and Canoco version 4.5 (Biometris-Plant Research International, Wageningen, NLD), respectively. The relationship between the different methods evaluated in order to propose clusters according to similarity between the evaluated parameters was obtained by HCA analysis and the relationship between the parameters evaluated and methods were determined by exploratory analysis by PCA.

### 3 Results and Discussion

All conservation methods were effective in maintaining the fungus viability after four months of storage. Mycelial growth rates showed differences between the method 1 and methods 2, 9 and 10 (**Table 1**). In the other groups, there were no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ).

The greatest mycelial growth rates were observed in cryoprotective agent associations, such as the method 9 (lactose 5% + PEG 6000 3%), with a mycelial growth of  $1.478 \pm 0.110$  mm/day, and method 10 (1% DMSO + 3% PEG 6000) with a mycelial growth of  $1.463 \pm 0.070$  mm/day. Compared to the methods used as controls, these values do not differ significantly from the amounts presented in the methods 2 and 3 (**Table 1**), which was statistically significant when compared to the method 1, both an increase of about 266% in the mycelial growth.

These results demonstrate the maintenance of subcultures can result in reduction of mycelial growth, suggesting that basal metabolism is decreased or even genetic and physiological changes (Homolka, 2014, 2013; Sato et al., 2012; Stoychev et al., 1998).

As contrasted, although not statistically significant from other methods, the biomass produced by the fungus from cryopreservation method 1 is higher, such as more dense mycelial mass (**Table 1**). The best results, in absolute values, were seen for method 1 (control), with an average yield of 0.263 g/L, followed by methods 6 and 10 (in the presence of DMSO), both with averages of 0.223 and 0.219 g/L, respectively, representing approximately 83-84% compared to control (PDA). The smaller biomass values were seen for method 2, with average of 0.187 g/L (71%).

It is believed that this result is associated with the practice of subculture, which can be noted that no lateral growth of mycelial mass, but an extent in depth, focusing more centrally, which can be associated with the effect of temperature, presence of water and absence of cryoprotectant agent (Whiting et al., 2001).

High concentrations of cryoprotectants agents, mainly surfactants such as DMSO or glycerol also result in the mycelial growth inhibitions. Colauto et al. (2012) observed that there is a lower mycelial growth in cultures of *A. subrufescens* CC414 cryopreserved for one to four years with DMSO 5% and glycerol 30%. Highest growth of colonies was obtained from cryopreserved cultures with 5% sucrose. In this study, DMSO 1% and glycerol 5% were chosen in order to reduce the toxic effects associated.

Furthermore, the fungus *A. subrufescens* CC414 is difficult to maintain, and susceptible to low temperatures (Kerrigan and Ross, 1987; Maia et al., 2012). However, when using cryoprotectants, as the case for this work, cooling favors the maintenance of the species in culture, and the mixture of internal and external cryoprotectants is the best option for protecting the fungus from freezing.

In this study showed that *A. subrufescens* CC414 produced two different polysaccharides with approximate molecular weights, one with molar mass approximately 17 kDa, and a second with molar mass of 2 kDa, which were found both in EPS and in IPS. In contrast, data in the literature point to the presence of polysaccharides of higher molecular weight. Camelini et al. (2012) identified higher molar mass polysaccharides from *A. subrufescens* CC414, with molecular weights approximately of 620 and 310 kDa in the IPS, and 20 and 200 kDa in the EPS.

In order to verify the effects on fungi metabolism, in this study the concentrations of polysaccharides and  $\beta$ -glucan in the supernatant and the extracellular medium was investigated. Considering the total polysaccharide concentration, there is no significant difference between the methods of cryopreservation, both the concentration of EPS as IPS (**Table 1**). There is a greater production of EPS was observed in method 1 (0.604 mg/mL), and whereas an increased production of IPS was observed in method 6 (89.11 mg/g biomass), this latest represents 85% increase compared to control (PDA). This EPS production was lower than the reported by Camelini et al. (2013), who obtained values close to 2.24 mg/mL when using the same culture medium. However, in that study, the cultivations were performed under optimized conditions in an airlift bioreactor, with increasing supplies of oxygen and under agitation by turbulence, unlike the case used in the current experiment (static state).

The total production of  $\beta$ -glucans observed in the IPS was higher when compared with EPS (**Table 1**). The methods of cryopreservation 8 and 9, e.g., glycerol or lactose + PEG 6000, showed higher yields of  $\beta$ -glucans, even if not statistically significant (**Table 1**). Palacio et al. (2014) also mention that there was an increase in the production of IPS after cryopreservation, which can be attributed to an anti-freeze function of glycoproteins, which would protect the mycelium from lesions, therefore accumulating larger amounts of IPS.

Nevertheless, the results of  $\beta$ -glucans in the EPS showed significant differences between methods (**Table 1**), and the methods that used refrigeration without the addition of activated charcoal were the best. This result was possibly obtained due to carbon adsorption in relation to substances present in the liquid medium, which may include adsorption of polysaccharides (Camelini et al., 2014). However, the method was safe to preserve the species for up to 12 months without changes in its genetic and morphological characteristics (Camelini et al., 2012).

Spearman correlation analysis (**Table 2**) showed that only the parameters mycelial growth (CM) and EPS showed a significant correlation ( $\rho = -0.72$ ), so that for such parameters there is an inverse relationship. Thus, the cryopreservation conditions in which the *A.subrufescens* CC414 has a higher CM index is observed concomitantly lower EPS values, indicating that these different conditions interfere proportionally on both tested parameters for the fungus.

Based on the HCA analysis, cryopreservation methods were divided into three groups: group 1 composed of the methods 1 and 4; group 2 by methods 2, 3 and 9; and group 3 for methods 5, 6, 7, 8 and 10 (**Figure 1A**). This grouping pattern could also be observed by PCA analysis which showed eigenvalues equal to 0.73 (PC-1) and 0.48 (PC-2) for the first two principal components, which showed together accumulated variance equal to 97.8%.

The methods 1, 2 and 3 are the most adopted methods for fungi preservation (control methods), so, based on the results of HCA and PCA, the methods of cryopreservation 4 and 9 are the more similar to the control methods, considering the evaluated parameters. The method 4 showed higher similarity with the control method 1, so that both of which methods are mainly characterized, according to the PCA, for high values of EPS and EPS- $\beta$ , while the method 9 is more related to the control methods 2 and 3, which are characterized by high values of CM (**Figure 1B**).

Studies showed that there is no direct relationship between mycelial growth and biomass production, noting that the most significant growth does not necessarily correlate

with higher biomass (Guimarães et al., 2014; Ritz and Young, 2004; Setälä et al., 1997), or production of others products, such as polysaccharides or enzymes (Eichlerová et al., 2015).

#### **4 Conclusions**

The strategies tested in this work for the preservation of *A. subrufescens* CC414 were efficient for mycelial recovery and growth after four months of storage. Long-term cryopreservation methods reduce the maintenance costs of the fungal collections. However, further evaluations are necessary to attest the effectiveness of the procedure for longer periods, such as 24 months. For the period tested, cryopreservation at -80 °C using glycerol or a mixture of the cryoprotectants, lactose + PEG 6000 demonstrated to be far similar to traditional methods of maintenance, keeping the physiology of the *A. subrufescens* CC414 considered as control (PDA).

#### **5 Abbreviations**

BRM: biological response modifiers; DMSO: dimethylsulfoxide; EPS: total polysaccharides from extracellular; EPS- $\beta$ : beta-glucan from EPS; HCA: Hierarchical Cluster Analysis; IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; IPS: total polysaccharides from supernatants; IPS- $\beta$ : beta-glucan from IPS; MNM modified Melin-Norkrans liquid medium; PCA: Principal Component Analysis; PDA: potato-dextrose-agar; PEG 6000: polyethyleneglycol 6000; SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

#### **6 Acknowledgements**

We are grateful to CNPq (National Council of Scientific and Technological Development) for financial support (CNPq-404786/2013-8); CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for PhD scholarship to Carla M. Camellini and Marivane Lemos (Biotechnology Institute, Caxias do Sul University, Brazil), Postgraduate programs of the federal universities of Bahia (UFBA) and Lavras (UFLA) for the support and assistance students, and all technical support staff of laboratories of Embrapa Agroenergy (Brasília, Federal District, Brazil).

## 7 Conflicts of Interests

The authors declare that they have no conflicts of interests.

## 8 Authors' Contributions

AS, CMC, ML, JRBC, SM and FGS was responsible for the conception and design, carried the microbiological studies, performed data analysis and drafted the manuscript. CMC, ML, MC, SM and FGS made contribution to conception and revised of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## 9 References

- Camelini, C.M., Pena, D.A., Gomes, A., Steindel, M., Rossi, M.J., Giachini, A.J., De Mendonça, M.M., 2012. An efficient technique for *in vitro* preservation of *Agaricus subrufescens* (= *A. brasiliensis*). *Ann. Microbiol.* 62, 1279–1285.
- Camelini, C.M., Rezzadori, K., Benedetti, S., Proner, M.C., Fogaça, L., Azambuja, A.A., Giachini, A.J., Rossi, M.J., Petrus, J.C.C., 2013. Nanofiltration of polysaccharides from *Agaricus subrufescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9993–10002.
- Camelini, C.M., Rossi, M.J., Cardozo, F.T.G.S., Gomes, A., Sales-Campos, C., Giachini, A.J., 2014. Fungal cultivation and production of polysaccharides, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–33.
- Castellani, A., 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42, 65–72.
- Chang, S.T., Buswell, J. a, 1996. Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 473–6.
- Cheung, P.C.K., 1996. Dietary Fiber Content and Composition of Some Cultivated Edible Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. *J. Agric. Food Chem.* 44, 468–471.
- Colauto, N.B., Cordeiro, F.A., Geromini, K.V.N., De Lima, T.G., Lopes, A.D., Nunes, R.A.R., De Brito Roratto, F., Tanaka, H.S., Zaghi, L.L., Linde, G.A., 2012. Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. *Ann. Microbiol.* 62, 871–876.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Tomšovský, M., Lisá, L., 2015. Long term storage of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* isolates using different cryopreservation techniques and its impact on laccase activity. *Fungal Biol.* 119, 1345–1353.
- Firenzuoli, F., Gori, L., Lombardo, G., 2008. The medicinal mushroom *Agaricus*

- blazei*Murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. Evidence-based Complement. Altern. Med. 5, 3–15.
- Guimarães, J.B., dos Santos, É.C., Dias, E.S., Bertechini, A.G., da Silva Ávila, C.L., Dias, F.S., 2014. Performance and meat quality of broiler chickens that are fed diets supplemented with *Agaricus brasiliensis* mushrooms. Trop. Anim. Health Prod. 46, 1509–1514.
- Homolka, L., 2014. Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. Fungal Biol. 118, 107–125.
- Homolka, L., 2013. Methods of cryopreservation in Fungi, in: Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Ayyachamy, M., Turner, K.M., O'Donovan, A. (Eds.), Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 9–17.
- Homolka, L., Lisá, L., Eichlerová, I., Nerud, F., 2001. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. J. Microbiol. Methods 47, 307–313.
- Homolka, L., Lisá, L., Eichlerová, I., Valášková, V., Baldrian, P., 2010. Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. Fungal Biol. 114, 929–935.
- Kerrigan, R.W., 2005. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. Mycologia 97, 12–24.
- Kerrigan, R.W., Ross, I.K., 1987. Dynamic aspects of basidiospore number in *Agaricus*. Mycologia 79, 204.
- Lakhanpal, T.N., Rana, M., 2005. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. Plant Genet. Resour. Charact. Util. 3, 288–303.
- Leung, M.Y.K., Liu, C., Koon, J.C.M., Fung, K.P., 2006. Polysaccharide biological response modifiers. Immunol. Lett. 105, 101–114.
- Maia, S.C., Toledo, R.C.C., Almeida, A.P.M.M., da Silva, R., Rinker, D.L., Dias, E.S., 2012. Low-cost and low maintenance preservation of *Agaricus brasiliensis* cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 2411–2416.
- Mantovani, M.S., Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Oliveira, R.J., Silva, A.F., Ribeiro, L.R., 2008.  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 658, 154–161.
- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59, 153–163.

- Oliveira, K.S.M., Di Bastiani, M., Cordeiro, L.M.C., Costa, M.F., Toledo, K.A., Iacomini, M., Babosa, A.M., Dekker, R.F.H., Nascimento, V.M.G., 2015. (1→6)- and (1→3)(1→6)- $\beta$ -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. *Carbohydr. Polym.* 133, 539–546.
- Onions, A.H.S., 1971. Preservation of Fungi, in: Booth, C. (Ed.), *Methods in Microbiology*. Academic Press Inc. Published by Elsevier Ltd., London, pp. 113–151.
- Palacio, A., Gutiérrez, Y., Rojas, D., Atehortúa, L., Zapata, P., 2014. Viability of Basidiomycete fungal strains under different conservation methods: cryopreservation vs. freeze-drying processes. *Actual. Biológicas* 36, 13–21.
- Perrin, P.W., 1979. Long-term storage of cultures of wood-inhabiting Fungi under mineral oil. *Mycologia* 71, 867–869.
- Ritz, K., Young, I.M., 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist* 18, 52–59.
- Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* 67, 624–631.
- Sato, M., Sukenobe, J., Nakagiri, A., 2012. Cryopreservation of cryosensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. *Cryo-Letters* 33, 86–95.
- Setälä, H., Rissanen, J., Markkola, A.M., Setälä, H., 1997. Conditional outcomes in the relationship between pine and ectomycorrhizal fungi in relation to biotic and abiotic environment. *Oikos* 80, 112.
- Smith, D., Onions, A.H.S., 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81, 535–540.
- Souza Dias, E., Labory, C.R.G., Herrera, K.M.S., Alves, A.A., Torres, G.A., Rinker, D.L., 2008. Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2473–2479.
- Stielow, J.B., Vaas, L. a I., Göker, M., Hoffmann, P., Klenk, H.-P., 2011. Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. *Mycologia* 104, 324–30.
- Stoychev, I., Homolka, L., Nerud, F., Lisá, L., 1998. Activities of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 211–214.
- Tedeschi, R., Paoli, P. de, 2011. Collection and preservation of frozen microorganisms, in: Dillner, J. (Ed.), *Methods in Biobanking*. Humana Press. Springer Science+Business Media, LLC, Berlin, pp. 313–326.

- Tzianabos, A.O., 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 523–533.
- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. *Physiol. Behav.* 94, 276–284.
- Ward, J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236-244.
- Wasser, S., 2003. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 258–274.
- Whiting, E.C., Khan, A., Gubler, W.D., 2001. Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Dis.* 85, 195–201.
- Wisitrassameewong, K., Karunaratna, S.C., Thongklang, N., Zhao, R., Callac, P., Moukha, S., Férandon, C., Chukeatirote, E., Hyde, K.D., 2012. *Agaricus subrufescens*: A review. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 131–146.



## 10 Tables

**Table 1.** Effects of cryopreservation methods of *A. subrufescens* CCC414 on mycelial growth, biomass, EPS, IPS, EPS- $\beta$  and IPS- $\beta$ .

Method number	Cryopreservant	Mycelial growth (MC) (mm/day)	Biomass (BM) (g/L)	EPS (mg/L of supernatant)	IPS (mg/g of biomass)	EPS- $\beta$ (mg/mg)	IPS- $\beta$ (mg/mg)
1	PDA*	0.400 $\pm$ 0.036*	0.263 $\pm$ 0.029	0.604 $\pm$ 0.070*	48.072 $\pm$ 0.416	0.185 $\pm$ 0.035	0.198 $\pm$ 0.026
2	Activated charcoal 0.1%	1.303 $\pm$ 0.121*	0.187 $\pm$ 0.001	0.324 $\pm$ 0.080*	30.128 $\pm$ 1.291	0.163 $\pm$ 0.025	0.246 $\pm$ 0.008
3	Castellani	1.212 $\pm$ 0.318	0.204 $\pm$ 0.013	0.302 $\pm$ 0.092	55.008 $\pm$ 12.096	0.132 $\pm$ 0.007	0.268 $\pm$ 0.012
4	Glycerol 5%	0.704 $\pm$ 0.099	0.200 $\pm$ 0.000	0.504 $\pm$ 0.028	46.486 $\pm$ 12.988	0.110 $\pm$ 0.043	0.264 $\pm$ 0.006
5	Lactose 5%	1.120 $\pm$ 0.093	0.205 $\pm$ 0.020	0.485 $\pm$ 0.064	70.466 $\pm$ 22.257	0.074 $\pm$ 0.004	0.216 $\pm$ 0.018
6	DMSO 1%	0.962 $\pm$ 0.182	0.223 $\pm$ 0.018	0.339 $\pm$ 0.031	89.114 $\pm$ 3.036	0.102 $\pm$ 0.017	0.261 $\pm$ 0.001
7	PEG 6000 3%	1.091 $\pm$ 0.177	0.187 $\pm$ 0.025	0.311 $\pm$ 0.068	65.833 $\pm$ 11.187	0.074 $\pm$ 0.009	0.219 $\pm$ 0.040
8	Glycerol 5% + PEG 6000 3%	1.120 $\pm$ 0.100	0.210 $\pm$ 0.012	0.462 $\pm$ 0.027	73.398 $\pm$ 19.423	0.107 $\pm$ 0.015	0.277 $\pm$ 0.005
9	Lactose 5% + PEG 6000 3%	1.478 $\pm$ 0.110*	0.206 $\pm$ 0.006	0.318 $\pm$ 0.117*	43.099 $\pm$ 3.114	0.036 $\pm$ 0.001	0.280 $\pm$ 0.002
10	DMSO 1% + PEG 6000 3%	1.463 $\pm$ 0.070*	0.219 $\pm$ 0.031	0.297 $\pm$ 0.016	75.776 $\pm$ 6.097	0.084 $\pm$ 0.000	0.246 $\pm$ 0.006

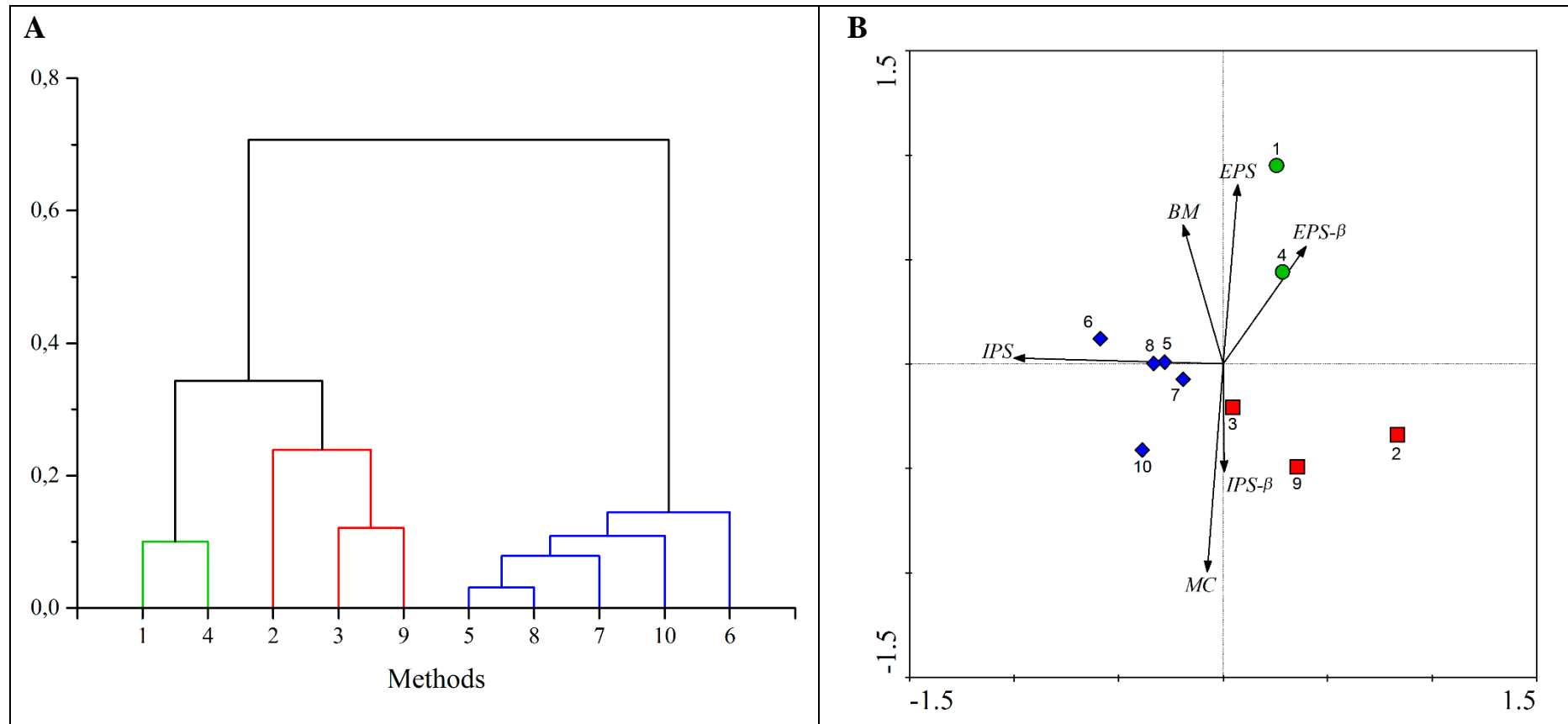
The data represent the mean  $\pm$  E.P.M. The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for comparisons, where \*p<0.05 was considered statistically significant.

**Table 2.** Spearman correlation coefficients between effects of cryopreservation methods of *A. subrufescens* CCC414 on mycelial growth, biomass, EPS, IPS, EPS- $\beta$  and IPS- $\beta$ .

<i>Spearman's correlations</i>	<b>Mycelial growth (MC) (mm/day)</b>	<b>Biomass (BM) (g/L)</b>	<b>EPS (mg/L of supernatant)</b>	<b>IPS (mg/g of biomass)</b>	<b>EPS-<math>\beta</math> (mg/mg)</b>	<b>IPS-<math>\beta</math> (mg/mg)</b>
<b>Mycelial growth (CM) (mm/day)</b>	-					
<b>Biomass (BM) (g/L)</b>	-0,2	-				
<b>EPS (mg/L of supernatant)</b>	-0,72121*	0,22424	-			
<b>IPS (mg/g of biomass)</b>	-0,13939	0,53939	-0,16364	-		
<b>EPS-<math>\beta</math> (mg/mg)</b>	0,46667	-0,11515	-0,24848	-0,15152	-	
<b>IPS-<math>\beta</math> (mg/mg)</b>	-0,3697	0,04242	0,38182	-0,28485	-0,15152	-

The experimental results of the different treatments were analyzed using Spearman correlation coefficients, where  $*p < 0,05$  was considered statistically significant.

## 11 Figures



**Figure 1. A.** Dendrogram of Hierarchical cluster analysis (HCA) of the methods correlated with mycelial growth, biomass, EPS, IPS, EPS- $\beta$  and IPS- $\beta$ . **B.** First principal component analysis (PCA) scores plot of methods correlated with mycelial growth, biomass, EPS, IPS, EPS- $\beta$  and IPS- $\beta$ .

## **6 CAPÍTULO 2 - Basidiomycetes cryopreservation in different protocols and its effects on enzymatic activities**

### **6.1 Título em português**

Criopreservação de basidiomicetos em diferentes protocolos e seus efeitos sobre as atividades enzimáticas

Submetido para: Cryobiology – The Official Journal of the Society for Cryobiology – Elsevier (ISSN: 0011-2240)

Fator de impacto: 1,979

### **6.2 Resumo**

Fungos filamentosos, ou basidiomicetos são empregados com as mais diversas funções na agricultura, pecuária, na indústria alimentar e na medicina como parte da produção de enzimas, vitaminas, antibióticos, álcool, biosurfactantes, entre outros. Atualmente, existe a dificuldade da criopreservação de basidiomicetos por longos períodos. A conservação de células sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas é uma necessidade da área biotecnológica. O objetivo deste estudo foi avaliar a manutenção e preservação de 33 basidiomicetos frente a 10 diferentes protocolos de criopreservação, avaliando sua viabilidade após 4 e 8 meses em  $6\pm 2$  °C e - 80 °C. A sub-cultura é o método com 100 % de viabilidade e recuperação, sendo que a criopreservação em mistura de criopreservantes glicerol 5% + PEG 6000 3% em -80 °C apresentou-se mais eficiente na manutenção da homeostase do fungo após sua recuperação, demonstrando que suas enzimas  $\beta$ -glicosidade, xilase, laccase, peroxidase total e manganes peroxidase não apresentam grandes variações de atividade quando comparadas com o controle PDA.

## **Basidiomycetes cryopreservation in different protocols and its effects on enzymatic activities**

Alexandra de Souza<sup>1,2</sup>, Carla Maisa Camelini<sup>1,3</sup>, Marivane Lemos<sup>1,3</sup>, Marli Camasola<sup>3</sup>, Joice Raisa Barbosa Cunha<sup>1,4</sup>, Arailde Fontes Urban<sup>5</sup>, Thais Demarchi Mendes<sup>1</sup>, Simone Mendonça<sup>1\*</sup> and Félix Gonçalves de Siqueira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemical Processes (LPB), Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica – PqEB s/n Asa Norte, Brasília, 70002-904, DF, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Multidisciplinar em Saúde, Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Rua Rio de Contas, Qd 17, 58, Candeias, Vitória da Conquista 45029-094, BA, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Bairro Petrópolis, Caxias do Sul, 95070-560, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001, Kennedy, Lavras, 37200-000, MG, Brazil.

<sup>5</sup> Laboratory of Edible Mushroom, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica – PqEB s/n Asa Norte, Brasília, 70901-904, DF, Brazil.

### **\* Corresponding author**

Simone Mendonça

simone.mendonca@embrapa.br

Félix Gonçalves de Siqueira

felix.siqueira@embrapa.br

Laboratory of Biochemical Processes (LPB), Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica – PqEB s/n Asa Norte, Brasília, 70002-904, DF, Brazil.

Telephone: 55-61-3448-2322 Fax: 55-61-3448-1589

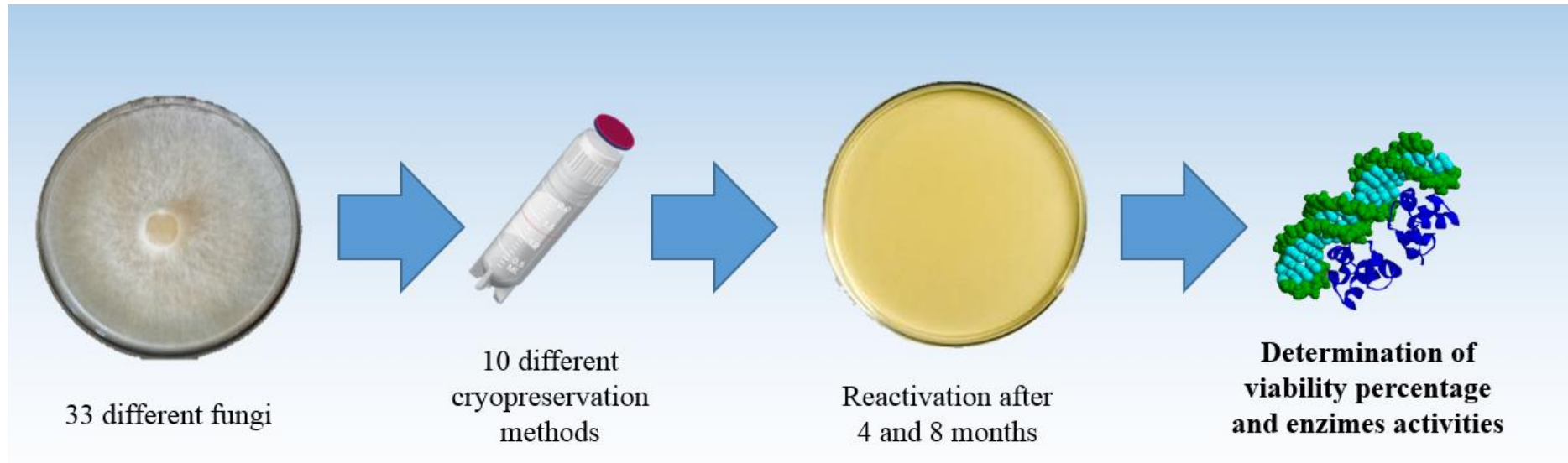
## HIGHLIGHTS

- Fungi are a good source of enzymes for biotechnological production processes.
- *Pycnoporus sanguineus* CC400 and *Agaricus subrufescens* CC414 are recovered from all 10 cryopreservation methods.
- The best mix of cryopreservants for fungi observed in 5% glycerol + PEG 6000 3%.
- Cryopreservation at -80 °C for 8 months does not seem to affect the enzymatic activity of fungi.

**ABSTRACT**

Filamentous fungi, or basidiomycetes, are employed with the most diverse functions in agriculture, livestock, food industry and medicine as part of the production of enzymes, vitamins, antibiotics, alcohol, biosurfactants, among others. Currently, there is the difficulty of cryopreservation of basidiomycetes for long periods. The conservation of cells without morphological, physiological or genetic changes is a necessity of the biotechnological area. The objective of this study was to evaluate the maintenance and preservation of 33 basidiomycetes against 10 different cryopreservation protocols, evaluating their viability after 4 and 8 months at  $6 \pm 2$  ° C and - 80 ° C. The subculture is the method with 100% viability and recovery, and the cryopreservation in cryopreservation of cryopreservants glycerol 5% + 3% PEG 6000 at -80 ° C was more efficient in the maintenance of fungal homeostasis after its recovery, demonstrating that their enzymes  $\beta$ -glycosity, xylase, laccase, total peroxidase and manganese peroxidase do not present great variances of activity when compared with the PDA control.

**Keywords:** Cryopreservation. Cryopreservative mixture. Basidiomycetes.

**Graphical abstract**



## 1. INTRODUCTION

Fungi are eukaryotic organisms that present in the form of yeasts and molds, in addition to the characteristic mushrooms, this last fruit body of some fungi of the phyla Basidiomycota and Ascomycota. They play a fundamental role in maintaining environmental equilibrium by promoting the decomposition and recycling of organic matter (saprobiotic), such as wood and leaves, food or other living things, in a parasitic or commensal manner [1–4].

The study of fungi allows us to understand how important their function is in maintaining the homeostasis of the planet, since they are responsible for the last stage of the carbon cycle, making available, through its enzymatic action, nutrients from the organic material that would not previously be Available. Lignin, cellulose and hemicellulose are macromolecules of plant tissues that have structural function, and are extremely recalcitrant. Without the enzymatic action of the saprobiotic basidiomycetes, it would basically be impossible to recycle this organic matter [5–9].

The biotechnological importance of fungi lies in their benefits and the damage caused. For example, the fact that they are saprobiotic organisms favors their application in the biofuels industry of enzymes for degradation of cellulose and lignin, but it is bad when this fungus can degrade a food that could be used for animal nutrition [6,10,11].

These organisms have been studied in relation to their ability to produce products of biotechnological interest, which can be useful in different processes, obtaining several substances or mixtures of these that are biologically active, which are used in agriculture, livestock, food industry And in medicine as part of the production of enzymes, vitamins, antibiotics, alcohol, biosurfactants, among others [12,13].

Basidiomycetes represent a promising source in solving this problem because, due to the ability to convert lignin, cellulose and hemicellulose into monomers, and later into CO<sub>2</sub> and water, they are widely used in biotechnological processes to degrade recalcitrant substrates, increasing chain efficiency Of production of either edible mushroom production or for the production of fungal biomass to be used in industrial processes [11,14,15]. The fruiting body and the mycelium-impregnated biomass can have up to five times more protein than beef or pork, being free of saturated fats. This substrate can still be used as fertilizer in plantations, or used in animal nutrition, or as bioremediation agents, eliminating contaminants such as agrodefensivos, and heavy metals from the environment [14,16,17].

During the research, it is common for access to specimens to be limited due to the changes, making it permanently impossible to obtain, and it is imperative that these specimens are handled and stored carefully, using preservation techniques previously tested and validated. The preservation of the banks of microorganism cell samples is a central element in longitudinal studies, guaranteeing their quality in future research [18,19]

In many research situations it is common that the opportunities of access to the specimens are limited and susceptible to changes in conditions capable of permanently making it impossible to obtain them. It is therefore imperative that these samples are carefully handled and stored using techniques and protocols that have been validated in pre-tests. The storage or composition of sample banks is in itself a central element especially for longitudinal studies (wide chronological interval) or for use in future research. The storage process can affect the quality of the samples and determine their possibility of later use [20].

Therefore, it is necessary to develop conservation methods of microorganisms and cultures, ensuring that these remain unchanged over time and viable. According Passador and contributors [21], a good preservation technique should ensure that the cell line is free of mutations and achieve maximum cell viability, providing genetic stability.

Within the wide range of methods described for the preservation of cultures there is no method considered trivial and infallible. Although there is evidence that there is variability among individuals of the same species, the most generalized methods are those that allow a higher survival rate, guaranteeing the uniformity of genotypic and phenotypic characteristics, allowing long storage times [22].

Thus, this work aims to investigate the effects of cryopreservation using different cryopreservants solutions at - 80 °C, on several basidiomycetes fungi, and investigating the enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidases, Manganese peroxidase and total proteins of five fungi (*Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404) after 8 months of cryopreservation.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Reagents and solvents**

Activated charcoal, glycerol, lactose, dimethylsulfoxide, Polyethylene glycol (PEG) 6000, ammonium phosphate monobasic, calcium chloride, FeNaEDTA, magnesium sulfate, potassium phosphate monobasic, sodium chloride, malt extract, sucrose, thiamine, ethanol,

sodium acetate, sodium methoxide and potato-dextrose-agar were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deionized water was purified using Milli-Q system (Millipore, Massachusetts, USA). The enzymatic methods and all other reagents and solvents were of analytical grade.

## 2.2 Microorganisms

The fungi species used in this work were provided by Embrapa Cenargem, also kept by Embrapa Agroenergia. The strains were sent to Embrapa Agroenergia in petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) culture medium (PDA), and their maintenance was carried out through continuous repackaging every three months, with the objective of Maintain viability and specimens considered as standards for the performance of the work. The collection is kept in petri dishes in BDA medium and stored in refrigeration (cold room) at  $6 \pm 2$  ° C. The fungal mycelium used in the experiments was peeled from these matrices for the cryopreserving agents and later for BDA, previously autoclaved at 121 ° C for 20 min and kept in an incubator at 28 ° C for 10 days. Table 1 presents the fungi of the collection.

Isolated fungi *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404 used in this study are deposited in the collection of Microorganisms of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology and Embrapa Agroenergy (Brasilia, Distrito Federal), kept refrigerated with monthly subculturing into Petri dishes containing PDA medium (control). The collection of the fungus was made under the authorization for bioprospecting SISBIO/IBAMA n. 41346-1.

## 2.3 Preservation

For cryopreservation, we used 2 mL cryotubes with the addition of 800 µL of different cryoprotectant solution: 1. potato-dextrose-agar (PDA); 2. Activated charcoal 0.1%; 3. Castellani (sterile ultrapure water); 4. Glycerol 5%; 5. Lactose 5%; 6. Dimethylsulfoxide (DMSO) 1%; 7. Polyethyleneglycol (PEG) 6000 3%; 8. Glycerol 5% + PEG 6000 3%; 9. Lactose 5% + PEG 6000 3%; and 10. DMSO 1% + PEG 6000 3%. Method 1 (PDA) is subcultivation method for continuous maintenance, and methods 2 (activated charcoal) and 3 (Castellani) are the most commonly used preservation methods. By default, these three methods are considered as controls. In each cryovial it was added 5 mycelial disks with 5 mm diameter extracted from the PDA cultivation medium (Petri dish).

The discs immersed in the solutions 1 to 3 were stored in a fridge, under refrigeration between 4 and 8 ° C (cold room). The discs immersed in the solutions 4 to 10 were kept in

Ultrafreezer at -80 °C. After four-month storage, two tubes of each cryopreservative solution was subjected to reactivation of macrofungi. Those removed from the Ultrafreezer were stored in a refrigerator for 2 h before transferring the mycelium into the culture medium for viability assessment. The discs/mycelium (preserved) were incubated at 28 °C for 10 days in Petri dishes containing PDA culture medium with activated charcoal (0.1%). Viable discs were transferred to another plate in PDA culture medium and the colony radius was measured on the 10th day of growth.

## 2.4 Enzymatic activities

After the 8-month period, five (5) macrofungoids were selected: *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Ganoderma lucidum* CC404 which were stored in the following preservation methods: 1. Dextrose-agar (BDA), 2. 0.1% activated charcoal and cryoprotective mixture: 5% Glycerol + 3% PEG 6000.

Ten days after reactivation on a plate containing BDA agar with 0.1% activated charcoal, the fungi were harvested in flasks medium containing 10% biomass, a mixture of 8 g of palm fiber and 2 g of cotton seed fiber previously sterilized. The flasks were stored in an incubator at 28 °C for 15 days. At the end of this period, 20% PEG6000 detergent was added to the flasks, which were homogenized in Ultraturrax for 10 minutes. With the aid of gasses and funnels, the contents of the vials were filtered in 50 ml falcon tubes and centrifuged at 9000 rpm for 9 minutes. The net fraction was reserved for enzyme activity assays. All assays were performed in triplicate, and in buffer sodium citrate 0.1 M citric acid pH 5 at 50 °C.

### a) Determination of $\beta$ -glucosidase activity

The determination of  $\beta$ -glucosidase activity was performed by quantifying the glucose released in the reaction, using cellobiose as a substrate, and the analysis was performed in two steps [23,24]. Initially, the enzymatic assay was performed, which consisted of 100  $\mu$ L of enzyme extracts with 100  $\mu$ L of a solution of 15 mM cellobiose (sodium citrate 0.1 M citric acid pH 5 ) In a thermocycler at 50 °C for 30 minutes, final step at 95 °C for 10 min. The white of the enzyme (for each extract) was made by replacing the cellobiose solution with 100  $\mu$ L of sodium citrate buffer 0.1M with citric acid, pH5, and the white of the substrate replacing the extract with the same buffer. Both were incubated together with the assays. A glucose curve, at concentrations of 0-250 $\mu$ g / mL, was prepared in sodium citrate buffer-0.1M citric acid pH 5.

The second step consisted in determining the glucose concentration formed in the enzymatic assay using monoreagent glucose, which contains the GOD-POD reagent composed of an enzymatic system (glucose oxidase and peroxidase), responsible for the reaction with the glucose molecules and Formation of red compounds whose intensity is proportional to the concentration of the carbohydrate present. Thus, 2.5  $\mu\text{L}$  of the samples resulting from the enzymatic assay were incubated with 250  $\mu\text{L}$  of the GOD-POD reagent (Glucose oxidase, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) in a SpectraMax M3 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) for 10 minutes At 37 ° C, the absorbance being determined at 505 nm. The equipment has been reset to 0. The glucose concentration released was calculated using the formula  $\text{Glucose} = (\text{ABS sample} / \text{ABS standard}) \times 100$ . The data were expressed in standard curve with different concentrations of glucose.  $\beta$ -glucosidase activity was expressed as U/mL.

b) Determination of xylanase activity

The activity of the xylanase enzyme was determined according to the method of Miller [25], with some modifications [24,26], by reaction of a mixture containing 1.0 mL of the filtered enzyme extract and 3 mL of the 3.5 dinitroxylic acid solution (DNS). Use the extract white and substrate white as a control. The mixture was incubated at 100 ° C for 10 minutes. The assays were performed in triplicate of 3 replicates. Absorbance readings from each assay were run at 540 nm in SpectraMax M3 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The data were expressed in standard curve with different concentrations of glucose (0.5 to 5.0  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). The xylanase activity was expressed as U/mL.

c) Determination of laccase activity

The reaction mixture for 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was used as described by Wolfenden and Wilson [27]. In a 96-well plate were added 180  $\mu\text{l}$  of 0.2 M sodium acetate buffer pH 5 with 180  $\mu\text{L}$  of the enzyme extract. 40  $\mu\text{l}$  of 5 mM ABTS solution was added, and immediately read the reaction kinetics every 30 seconds for 90 seconds at 25 ° C, at the length of 420 nm in SpectraMax M3 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The assays were performed in triplicate of 3 replicates. The enzymatic activity was calculated based on the molar absorptivity of the oxidized substrates ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). One enzyme unit corresponded to the amount of enzyme capable of oxidizing 1  $\mu\text{Mol}$  of ABTS per minute.

d) Determination of total peroxidase activity

The activity of the total peroxidases was performed according to the method described by Heinzkill [28]. The activity of the total peroxidases was performed according to the described method. In a 96-well plate were added 140  $\mu\text{L}$  of 0.2 M sodium acetate buffer pH 5, 40  $\mu\text{L}$  of 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  with 180  $\mu\text{L}$  of the enzyme extract. 40  $\mu\text{L}$  of 5 mM ABTS solution was added, and immediately read the reaction kinetics every 30 seconds for 90 seconds at 25 ° C, at the length of 420 nm in SpectraMax M3 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The assays were performed in triplicate of 3 replicates. The enzymatic activity was calculated based on the molar absorptivity of the oxidized substrates ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ L}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). One enzyme unit corresponded to the amount of enzyme capable of oxidizing 1  $\mu\text{Mol}$  of ABTS per minute.

e) Determination of manganese peroxidase activity

The activity of manganese peroxidase (MnPx) was determined by the method proposed by Kuwahara [29]. The enzyme manganese peroxidase was determined by oxidation of reagent solution containing 100 $\mu\text{L}$  of 0.1% phenol red, 100 $\mu\text{L}$  of sodium lactate 250mM, 200 $\mu\text{L}$  of bovine albumin 0.5%, 50 $\mu\text{L}$  of 2mM  $\text{MnSO}_4$  and 50 $\mu\text{L}$  of 2mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  per 0, 5mL of the enzyme extract, diluted in 1mL of 20mM sodium succinate buffer pH 4.5, in a water bath at 30 ° C for 5 minutes. After 5 minutes of reaction it was interrupted by adding 40  $\mu\text{L}$  of 2 mM NaOH, and the blank of the enzyme was given NaOH before incubation in order to avoid the reaction. The reading was performed at the length of 610 nm in SpectraMax M3 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The assays were performed in triplicate using the enzyme blank as a control. The enzymatic activity of MnPox was calculated based on the molar absorptivity of oxidized phenol red ( $\epsilon_{610} = 44600 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). One enzyme unit corresponded to the amount of enzyme capable of oxidizing 1  $\mu\text{Mol}$  of phenol red per minute.

f) Determination of total protein by BCA method

The determination of total protein concentration was performed according to the method of Smith [30] and specifications of the manufacturer of the Thermo Scientific-Pierce® BCA Protein Assay Kit. From a bovine serum albumin solution 2 mg / mL (BSA), the curve was prepared at different concentrations (0.05-2.0 mg / ML) in buffer solution sodium citrate / 0.1 M citric acid, pH 5, using distilled white water. 25  $\mu\text{L}$  of each curve point and each replicate of the enzyme extracts were transferred to a 96-well microplate. 200  $\mu\text{L}$  of working

reagent, composed of 50 parts reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1 M sodium) and 1 part reagent B (4% cupric sulfate), available in the kit. The plate was shaken for 30 seconds and incubated at 37 ° C for 30 minutes. The reading was performed within 10 minutes on SpectraMax M3 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), the absorbance being determined at 562 nm. Data were expressed as standard curve with different concentrations of BSA. Total protein concentration was expressed as mg / mL.

### 2.5 Statistical analysis

The data were expressed as the mean±S.E.M, and the groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Bonferroni's test ( $p < 0.05$ ), using the Statistic version 6 statistical software (Statsoft, Tulsa, USA) for all statistical analyses.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

During the research, it is common for access to specimens to be limited due to the changes, making it permanently impossible to obtain, and it is imperative that these specimens are handled and stored carefully, using preservation techniques previously tested and validated. The preservation of the banks of microorganism cell samples is a central element in longitudinal studies, guaranteeing their quality in future research [20]

Viability during recovery is also directly linked to the age of the cell culture. Data suggest that the stationary phase at the end of exponential growth is the school phase for preservation, where cells become ideal, becoming more resistant to freezing or dehydration [31].

The success of the conservation depends on the method used, the characteristics of the cell and also the shelf life. These differences reflect on the results obtained during the reactivation of cells and prevent the implantation of a standard procedure, applicable to all cell types [32,33].

The viability results were observed after 4 and 8 months of preservation at  $6 \pm 2$  ° C and -80 ° C of 33 filamentous fungi species in 10 different cryopreservation methods and are presented in **Table 2**.

For most fungi, there was a good percentage of viability after cryopreservation, with some fungi such as *Pycnoporus sanguineus* CC400 and *Agaricus subrufescens* CC414

recovering 100% after four and eight months of treatment for all cryopreservation methods tested.

The choice of a technique for conservation depends on the characteristics of the agent, the characteristics of the method, the maintenance costs, the importance of the collection, and especially the availability of equipment [19,34,35]. Thus, the greatest concern with preservation methods lies in the effects on the stability of specimens. Among the known factors that influence this stability can be highlighted: (a) the use and types of preservatives; (b) the temperature variations between the collection and processing of the material, as well as, during the storage process; (c) the time spent between primary processing and storage; (d) absence of contamination at the time of collection and processing; (e) the activity of endogenous degradation agents or inhibitory substances in the sample itself [20,35].

Method 8, which contains the cryopreservants mix Glycerol 5% + PEG 6000 3% was the method that allowed recovery of most of the fungi present in the collection. Cryoprotectants reduce physical and chemical stress from freezing and thawing of cells. The ideal physicochemical characteristics for a cryoprotectant should include: low molecular weight, high solubility in water and low cellular toxicity [36,37].

The presence of a penetrating cryoprotective agent, glycerol and other non-penetrating polyethylene glycol, provided the appropriate conditions in the composition of the medium used for freezing, permitting an increase in the survival rate of the fungi maintained at cryopreservation at -80 °C [35]

In view of this, the fungi, of greater commercial interest, *Lentinus strigosus* CC40, *Volvariella volvacea* CC94, *Fistulina hepatica* CC102, *Pleurotus ostreatus* CC389 and *Ganoderma lucidum* CC404 were chosen for the evaluation of their metabolism, in order to compare the activities of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total protein of fungi submitted to method 1, method 2 and method 8.

Cryopreservation methods showed different behavior among fungi species evaluated, especially for cryopreserved activated carbon treatments (**Tables 3, 4, 5, 6 and 7; Figures 1, 2, 3, 4 and 5**).

In general, the enzymatic profile of the fungi submitted to the proposed cryopreservation method (method 8) remains practically equal to the enzymatic activity of the fungi submitted to the subculture (method 1). It is also observed that fungi stored in activated charcoal show a decrease in their enzymatic activities (method 2).



In the biodegradation of lignin, essential in carbon cycling, several enzymes are involved. The major ligninolytic enzymes include the manganese peroxidases that react by oxidation of aromatic phenols and other aromatic derivatives that depend on hydrogen peroxide and divalent manganese. The lignin peroxidases react in the presence of hydrogen peroxide, and the laccases oxidize phenolic compounds and reduce molecular oxygen to water [38–40].

These lignin-degrading enzymes are mainly produced by basidiomycetes that are the main lignin degradation agents, called white rot fungi (WRF), which are endowed with a ligninolytic system composed of peroxidases and laccase and can mineralize the lignin In CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O in pure cultures [40,41].

#### **4. CONCLUSIONS**

In conclusion the results obtained show that the adopted cryopreservation procedures ensure basidiomycetes strains preservation for 8 months. This methods are rapid, with no need of expensive equipment and partially affect the viability of fungal strains tested, an essential factor for their use in biological control. Therefore, these assays are being optimized. Further studies based on the evaluation of the factors involved in the mutagenic or genetic expression have to be performed to confirm our preliminary data.

#### **5. ABBREVIATIONS**

DMSO: dimethylsulfoxide; IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; PDA: potato-dextrose-agar; PEG 6000: polyethyleneglycol 6000; SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

#### **6. ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to CNPq (National Council of Scientific and Technological Development) for financial support (CNPq-404786/2013-8); CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for PhD scholarship to Carla M. Camellini and Marivane Lemos (Biotechnology Institute, Caxias do Sul University, Brazil), Postgraduate programs of the federal universities of Bahia (UFBA) and Lavras (UFLA) for the support and

assistance students, and all technical support staff of laboratories of Embrapa Agroenergy (Brasília, Federal District, Brazil).

## 7. CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflicts of interests.

## 8. AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AS, CMC, ML, JRBC, SM and FGS was responsible for the conception and design, carried the microbiological studies, performed data analysis and drafted the manuscript. CMC, ML, MC, SM and FGS made contribution to conception and revised of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## 9. REFERENCES

- [1] J.R. Raper, Growth and reproduction of fungi, in: F.C. Steward (Ed.), *Plant Physiol.*, Academic Press, New York, 2002: pp. 473–479.
- [2] J. Dighton, *Fungi in Ecosystem Processes*, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2016. doi:10.1201/9780203911440.
- [3] S.C. Watkinson, N. Money, L. Boddy, *The Fungi*, 3rd ed., Academic Press, Elsevier, Waltham, 2016. doi:10.1016/B978-0-12-382034.
- [4] R. Cenci, L. Cocchi, O. Petrini, F. Sena, C. Siniscalco, L. Vescovi, Chemical elements in Ascomycetes and Basidiomycetes. The reference mushrooms as instruments for investigating bioindication and biodiversity, Publications Office of the European Union, Luxembourg:, 2011. doi:10.2788/22228.
- [5] F. Xu, Z. Li, Y. Liu, C. Rong, S. Wang, Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates, *Saudi J. Biol. Sci.* 23 (2016) 607–613. doi:10.1016/j.sjbs.2015.07.001.
- [6] J.A. Buswell, Y.J. Cai, S.T. Chang, J.F. Peberdy, S.Y. Fu, H.-S. Yu, Lignocellulolytic enzyme mushroom fungi profiles of edible, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12 (1996) 537–542. doi:10.1007/BF00419469.
- [7] M.E. Eugenio, J.M. Carbajo, M.C. Terrón, A.E. González, J.C. Villar, Bioremediation of lignosulphonates by lignin-degrading basidiomycetous fungi, *Bioresour. Technol.*

- 99 (2008) 4929–4934. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.018.
- [8] W.-S. Jo, S.-H. Bae, S.-Y. Choi, S.-D. Park, Y.-B. Yoo, S.-C. Park, Development of detection methods for cellulolytic activity of *Auricularia auricula-judae*, *Mycobiology*. 38 (2010) 74. doi:10.4489/MYCO.2010.38.1.074.
- [9] L. Zhao, Y. Dong, G. Chen, Q. Hu, Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 783–789. doi:10.1016/j.carbpol.2009.12.029.
- [10] J.F. Huang, T. Zhan, X.L. Yu, Q.A. He, W.J. Huang, L.Z. Lin, Y.T. Du, Y.T. Pan, Therapeutic effect of *Pleurotus eryngii* cellulose on experimental fatty liver in rats, *Genet. Mol. Res.* 15 (2016) 1–8. doi:10.4238/gmr.15017805.
- [11] S. Miyauchi, D. Navarro, I. V. Grigoriev, A. Lipzen, R. Riley, D. Chevret, S. Grisel, J.-G. Berrin, B. Henrissat, M.-N. Rosso, Visual comparative omics of Fungi for plant biomass deconstruction, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1335. doi:10.3389/fmicb.2016.01335.
- [12] S.S. Cameotra, Preservation of microorganisms as deposits for patent application, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 849–850. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.069.
- [13] E.P. Feofilova, L.S. Kuznetsova, Y.E. Sergeeva, L.A. Galanina, Species composition of food-spoiling mycelial fungi, *Microbiology*. 78 (2009) 112–116. doi:10.1134/S0026261709010147.
- [14] C. Han, B. Cui, Y. Wang, Vanadium uptake by biomass of *Coprinus comatus* and their effect on hyperglycemic mice, *Biol. Trace Elem. Res.* 124 (2008) 35–39. doi:10.1007/s12011-008-8120-0.
- [15] A. Larran, E. Jozami, L. Vicario, S.R. Feldman, F.E. Podestá, H.R. Permingeat, Evaluation of biological pretreatments to increase the efficiency of the saccharification process using *Spartina argentinensis* as a biomass resource, *Bioresour. Technol.* 194 (2015) 320–325. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.150.
- [16] Mashitah, Z. Zulfadhly, S. Bhatia, Binding mechanism of heavy metals biosorption by *Pycnoporus sanguineus*, *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 27 (1999) 441–445. doi:10.3109/10731199909117717.
- [17] M.I. Fonseca, E. Shimizu, P.D. Zapata, L.L. Villalba, Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina), *Enzyme Microb. Technol.* 46 (2010) 534–539. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.12.017.
- [18] I. Eichlerová, L. Homolka, Preservation of basidiomycete strains on perlite using

- different protocols, *Mycoscience*. 5 (2014) 1–10. doi:10.1016/j.myc.2014.01.006.
- [19] L. Homolka, Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods, *Fungal Biol.* 118 (2014) 107–125. doi:10.1016/j.funbio.2013.12.002.
- [20] N.T. Holland, M.T. Smith, B. Eskenazi, M. Bastaki, Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies, *Mutat. Res. Mutat. Res.* 543 (2003) 217–234. doi:10.1016/S1383-5742(02)00090-X.
- [21] M.M. Passador, G.C.C. Pires, D. Finatti, C.C. Aparecido, M.B. Figueiredo, Manutenção da viabilidade E patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo,” (2010) 51–55.
- [22] M.J. Ryan, D. Smith, Fungal genetic resource centres and the genomic challenge, *Mycol. Res.* 108 (2004) 1351–1362. doi:10.1017/S0953756204001650.
- [23] B. Adney, J. Baker, Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure, *Natl. Renew. Energy Lab. - NREL.* 6 (1996) 1–8. doi:10.1016/j.biortech.2006.01.007.
- [24] T.K. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 257–268. doi:10.1351/pac198759020257.
- [25] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. doi:10.1021/ac60147a030.
- [26] Y.M. Zhang, X. Bin Lu, H. Bin Dan, Y.K. Sun, Screening and enzymatic study of a composite microbial system FH3, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 52 (2009) 35–43. doi:10.1590/S1516-89132009000100005.
- [27] B.S. Wolfenden, R.L. Willson, Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (1982) 805–812. doi:10.1039/P29820000805.
- [28] M. Heinzkill, L. Bech, T. Halkier, P. Schneider, T. Anke, Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae), *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1601–1606.
- [29] M. Kuwahara, J.K. Glenn, M.A. Morgan, M.H. Gold, Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.* 169 (1984) 247–250. doi:10.1016/0014-5793(84)80327-0.
- [30] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of

- protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [31] D. Arora, *Handbook of fungal biotechnology*, CRC Press. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2003. doi:10.1201/9780203027356.
- [32] T.R.D. Mantovani, L.K. Macarini, S.A.F. Glowacki, M.N. Haurani, F.C. Takakua, E.C. D’Agostini, H.S. Tanaka, J.S. do Valle, L. doretto Paccola-Meirelles, G.A. Linde, N.B. Colauto, Criopreservação do gênero *Pleurotus* a -20 °C e a -70 °C, *Arq. Ciências Veterinárias E Zool. Da UNIPAR.* 11 (2008) 107–112.
- [33] G. de A.M. Pietrowski, M. Grochoski, G.F. Sartori, T.A. Gomes, G. Wosiacki, A. Nogueira, Viability of *Hanseniaspora uvarum* yeast preserved by lyophilization and cryopreservation, *Yeast.* 32 (2015) 559–565. doi:10.1002/yea.3079.
- [34] J.G. Day, G.N. Stacey, *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, Humana Press. Springer, Totowa, 2007. doi:10.1007/978-1-59745-362-2.
- [35] Z. Hubálek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology.* 46 (2003) 205–229. doi:10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
- [36] G.M. Fahy, T.H. Lilley, H. Linsdell, M.S.J. Douglas, H.T. Meryman, Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms, *Cryobiology.* 27 (1990) 247–268. doi:10.1016/0011-2240(90)90025-Y.
- [37] H.T. Meryman, Cryoprotective agents, *Cryobiology.* 8 (1971) 173–183. doi:10.1016/0011-2240(71)90024-1.
- [38] N. Durán, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review, *Appl. Catal. B Environ.* 28 (2000) 83–99. doi:10.1016/S0926-3373(00)00168-5.
- [39] K. Gill, S. Arora, Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2003) 28–33. doi:10.1007/s10295-002-0002-4.
- [40] N. Aro, T. Pakula, M. Penttilä, Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi, *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (2005) 719–739. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.006.
- [41] W.R. de Souza, Microbial degradation of lignocellulosic biomass, in: A.K. Chandel, S.S. da Silva (Eds.), *Sustain. Degrad. Lignocellul. Biomass - Tech. Appl. Commer.*, InTech, Rijeka, 2013: p. 275. doi:10.5772/54325.

## 10. TABLES

**Table 3.** Fungi belonging to the collection of Embrapa Cenargen used in this work.

<b>n.</b>	<b>Code</b>	<b>Cientific name</b>	<b>Family</b>	<b>Order</b>
1	CC 24	<i>Ganoderma lobatum</i>	Ganodermataceae	Polyporales
2	CC 27	<i>Flammulina velutipes</i>	Physalacriaceae	Agaricales
3	CC 28	<i>Grifola frondosa</i>	Meripilaceae	Polyporales
4	CC 29	<i>Hericium erinaceus</i>	Hericiaceae	Russulales
5	CC 37	<i>Oudemansiella canarii</i>	Physalacriaceae	Agaricales
6	CC 40	<i>Lentinus strigosus</i>	Polyporaceae	Polyporales
7	CC 89	<i>Pholiota nameko</i>	Strophariaceae	Agaricales
8	CC 94	<i>Volvariella volvacea</i>	Pluteaceae	Agaricales
9	CC 102	<i>Fistulina hepatica</i>	Fistulinaceae	Agaricales
10	CC 110	<i>Pleurotus sapidus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
11	CC 111	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	Pleurotaceae	Agaricales
12	CC 154	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Pleurotaceae	Agaricales
13	CC 159	<i>Coprinus comatus</i>	Agaricaceae	Agaricales
14	CC 247	<i>Trametes</i> spp.	Polyporaceae	Polyporales
15	CC 328	<i>Schizophyllum commune</i>	Schizophyllaceae	Agaricales
16	CC 335	<i>Pleurotus florida</i>	Pleurotaceae	Agaricales
17	CC 348	<i>Auricularia auricula-judae</i>	Auriculariaceae	Auriculariales
18	CC 351	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganodermataceae	Polyporales
19	CC 353	<i>Pleurotus eryngii</i>	Pleurotaceae	Agaricales
20	CC 380	<i>Pleurotus columbinus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
21	CC 389	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
22	CC 390	<i>Lentinula edodes</i>	Marasmiaceae	Agaricales
23	CC 400	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Polyporaceae	Polyporales
24	CC 403	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
25	CC 404	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganodermataceae	Polyporales
26	CC 412	<i>Lentinus sajor-caju</i>	Polyporaceae	Polyporales
27	CC 414	<i>Agaricus subrufescens</i>	Agaricaceae	Agaricales
28	CC 416	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales
29	CC 418	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	Lyophyllaceae	Agaricales
30	CC 420	<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	Auriculariaceae	Auriculariales
31	CC 421	<i>Agaricus bitorquis</i>	Agaricaceae	Agaricales
32	CC 425	<i>Coprinus comatus</i>	Agaricaceae	Agaricales
33	CC 427	<i>Trametes</i> spp.	Polyporaceae	Polyporales



**Table 2.** Percentage of viability of the 33 different fungi submitted to different cryopreservation techniques at 4 and 8 months (continuation).

n.	Code	Scientific name	Months	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5	Method 6	Method 7	Method 8	Method 9	Method 10
13	CC159	<i>Coprinus comatus</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
14	CC247	<i>Trametes</i> spp.	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	38%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
15	CC328	<i>Schizophyllum commune</i>	4	100%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
16	CC335	<i>Pleurotus florida</i>	4	100%	100%	100%	100%	75%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
17	CC348	<i>Auricularia auricula-judae</i>	4	100%	100%	100%	100%	0%	63%	0%	13%	38%	50%
			8	100%	100%	50%	50%	0%	100%	0%	0%	0%	0%
18	CC351	<i>Ganoderma lucidum</i>	4	100%	100%	100%	0%	17%	0%	38%	50%	0%	50%
			8	100%	100%	100%	0%	50%	0%	0%	50%	0%	0%
19	CC353	<i>Pleurotus eryngii</i>	4	100%	100%	100%	25%	100%	25%	100%	100%	100%	50%
			8	100%	100%	100%	0%	50%	0%	100%	100%	100%	100%
20	CC380	<i>Pleurotus colombinus</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	25%	88%	50%	38%
			8	100%	100%	100%	100%	50%	100%	0%	0%	0%	100%
21	CC389	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4	100%	100%	100%	75%	100%	100%	75%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
22	CC390	<i>Lentinula edodes</i>	4	100%	100%	100%	38%	13%	100%	38%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	0%	50%	100%	100%	100%	100%	50%
23	CC400	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
24	CC403	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4	100%	75%	100%	100%	75%	50%	0%	100%	25%	100%
			8	100%	100%	100%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%
25	CC404	<i>Ganoderma lucidum</i>	4	100%	100%	100%	13%	100%	63%	100%	63%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	0%	100%	50%	100%	100%	100%	100%



**Table 2.** Percentage of viability of the 33 different fungi submitted to different cryopreservation techniques at 4 and 8 months (continuation).

n.	Code	Cientific name	Months	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5	Method 6	Method 7	Method 8	Method 9	Method 10
26	CC412	<i>Lentinus sajor-caju</i>	4	100%	100%	100%	100%	0%	100%	50%	100%	75%	13%
			8	100%	100%	38%	100%	0%	100%	0%	50%	50%	50%
27	CC414	<i>Agaricus subrufescens</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
28	CC416	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	4	100%	100%	75%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
29	CC418	<i>Hypsizigue marmoreus</i>	4	100%	100%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	0%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	90%
30	CC420	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	4	100%	100%	100%	0%	13%	13%	100%	25%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
31	CC421	<i>Agaricus bitorquis</i>	4	100%	100%	100%	63%	63%	88%	100%	50%	0%	0%
			8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
32	CC425	<i>Coprinus comatus</i>	4	100%	100%	100%	38%	88%	100%	100%	100%	100%	100%
			8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	100%	100%
33	CC427	<i>Trametes spp.</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	88%	100%	75%
			8	100%	100%	100%	100%	50%	100%	50%	100%	100%	100%

**Table 5.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Lentinus strigosus* CC40 after 8 months in three different methods.

Method	Cryopreservative	$\beta$ -glucosidase (U/mL)	xylanase (U/mL)	laccase (U/mL)	Total peroxidase (U/mL)	manganese peroxidase (U/mL)	Total protein (mg/mL)
1	PDA	0.031 $\pm$ 0.006	0.185 $\pm$ 0.013 <sup>ab</sup>	210.750 $\pm$ 19.628 <sup>ab</sup>	134.095 $\pm$ 5.240 <sup>ab</sup>	14.120 $\pm$ 0.780 <sup>ab</sup>	5.972 $\pm$ 0.504 <sup>a</sup>
2	Activated charcoal 1%	0.023 $\pm$ 0.005	0.061 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>	110.278 $\pm$ 6.556 <sup>a</sup>	29.281 $\pm$ 1.684 <sup>a</sup>	23.521 $\pm$ 2.125 <sup>a</sup>	3.974 $\pm$ 0.178 <sup>a</sup>
8	Glycerol 5% + PEG 6000 3%	0.016 $\pm$ 0.004	0.119 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	517.991 $\pm$ 6.992 <sup>b</sup>	748.182 $\pm$ 26.052 <sup>b</sup>	36.178 $\pm$ 0.696 <sup>b</sup>	4.125 $\pm$ 0.091

The data represent as means  $\pm$  E.P.M..The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup> p<0.05 was considered statistically significant.

**Table 6.** Concentration of  $\beta$ -gluconidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Volvarella volvacea* CC94 after 8 months in three different methods.

Method	Cryopreservative	$\beta$ -glucosidase (U/mL)	xylanase (U/mL)	laccase (U/mL)	Total peroxidase (U/mL)	manganese peroxidase (U/mL)	Total protein (mg/mL)
1	PDA	0,032 $\pm$ 0,003	0,284 $\pm$ 0,005	118,083 $\pm$ 9,277 <sup>a</sup>	277,602 $\pm$ 8,879 <sup>a</sup>	0,869 $\pm$ 0,084 <sup>ab</sup>	12,913 $\pm$ 0,550
2	Activated charcoal 1%	0,036 $\pm$ 0,004	0,298 $\pm$ 0,006	563,019 $\pm$ 8,735 <sup>a</sup>	46,084 $\pm$ 6,863 <sup>ab</sup>	1,684 $\pm$ 0,144 <sup>a</sup>	12,631 $\pm$ 0,135
8	Glycerol 5% + PEG 6000 3%	0,026 $\pm$ 0,003	0,293 $\pm$ 0,003	595,213 $\pm$ 56,638	242,580 $\pm$ 15,358 <sup>b</sup>	2,014 $\pm$ 0,209 <sup>b</sup>	11,938 $\pm$ 0,772

The data represent as means  $\pm$  E.P.M..The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup> p<0.05 was considered statistically significant.

**Table 7.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Fistulina hepatica* CC94 after 8 months in three different methods.

Method	Cryopreservative	$\beta$ -glucosidase (U/mL)	xylanase (U/mL)	laccase (U/mL)	Total peroxidase (U/mL)	manganese peroxidase (U/mL)	Total protein (mg/mL)
1	PDA	0.032 $\pm$ 0.005	0.218 $\pm$ 0.008	145.294 $\pm$ 10.906	63.645 $\pm$ 3.769	2.413 $\pm$ 0.224	0.735 $\pm$ 0.116
2	Activated charcoal 1%	0.039 $\pm$ 0.005	0.207 $\pm$ 0.019	532.093 $\pm$ 33.498	216.660 $\pm$ 11.428	4.755 $\pm$ 1.165	0.532 $\pm$ 0.020
8	Glycerol 5% + PEG 6000 3%	0.032 $\pm$ 0.002	0.255 $\pm$ 0.007	126.364 $\pm$ 5.835	125.395 $\pm$ 3.407	31.201 $\pm$ 1.934	0.988 $\pm$ 0.124

The data represent as means  $\pm$  E.P.M..The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup> p<0.05 was considered statistically significant.

**Table 8.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Pleurotus ostreatus* CC389 after 8 months in three different methods.

Method	Cryopreservative	$\beta$ -glucosidase (U/mL)	xylanase (U/mL)	laccase (U/mL)	Total peroxidase (U/mL)	manganese peroxidase (U/mL)	Total protein (mg/mL)
1	PDA	0,043 $\pm$ 0,006 <sup>ab</sup>	0,050 $\pm$ 0,002	437,056 $\pm$ 25,177 <sup>a</sup>	292,278 $\pm$ 6,365 <sup>ab</sup>	83,643 $\pm$ 2,439	3,558 $\pm$ 0,234
2	Activated charcoal 1%	0,017 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,050 $\pm$ 0,003	403,142 $\pm$ 16,497 <sup>b</sup>	229,781 $\pm$ 14,972 <sup>a</sup>	74,845 $\pm$ 5,067	3,622 $\pm$ 0,256
8	Glycerol 5% + PEG 6000 3%	0,020 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	0,060 $\pm$ 0,003	561,340 $\pm$ 29,038 <sup>ab</sup>	66,784 $\pm$ 6,706 <sup>b</sup>	77,059 $\pm$ 7,920	3,724 $\pm$ 0,259

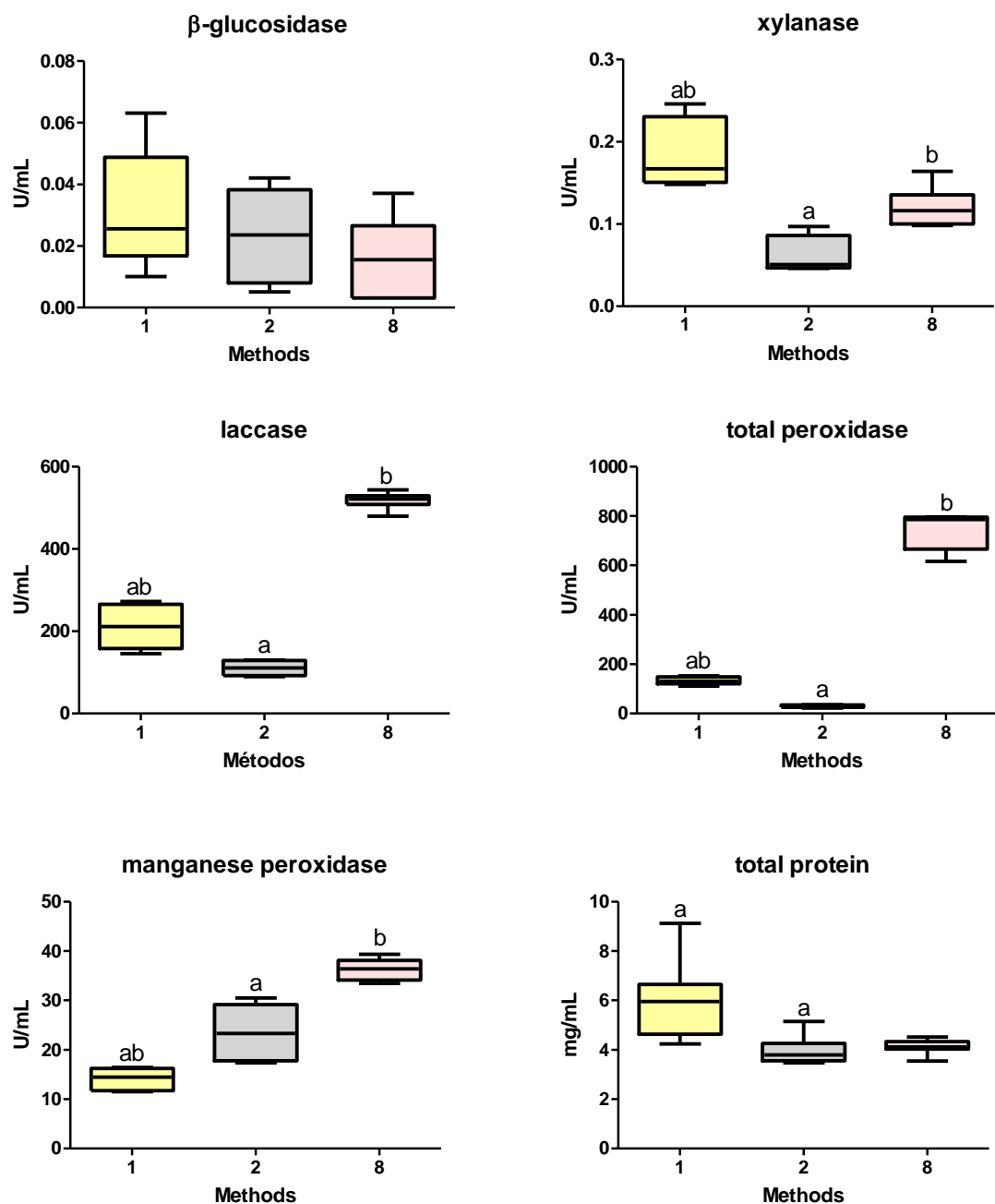
The data represent as means  $\pm$  E.P.M..The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup> p<0.05 was considered statistically significant.

**Table 9.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Ganoderma lucidum* CC404 after 8 months in three different methods.

Method	Cryopreservative	$\beta$ -glucosidase (U/mL)	xylanase (U/mL)	laccase (U/mL)	Total peroxidase (U/mL)	manganese peroxidase (U/mL)	Total protein (mg/mL)
1	PDA	0,023±0,002	27,481±0,498	0,304±0,010 <sup>a</sup>	3,772±0,111 <sup>ab</sup>	33,074±0,604 <sup>a</sup>	7,719±0,451 <sup>a</sup>
2	Activated charcoal 1%	0,035±0,004	36,079±2,444 <sup>a</sup>	0,268±0,012 <sup>ab</sup>	4,735±0,139 <sup>a</sup>	47,667±1,555 <sup>ab</sup>	15,625±0,578 <sup>ab</sup>
8	Glycerol 5% + PEG 6000 3%	0,025±0,006	20,037±0,488 <sup>a</sup>	0,346±0,014 <sup>b</sup>	4,774±0,616 <sup>b</sup>	33,259±1,178 <sup>b</sup>	5,969±0,488 <sup>b</sup>

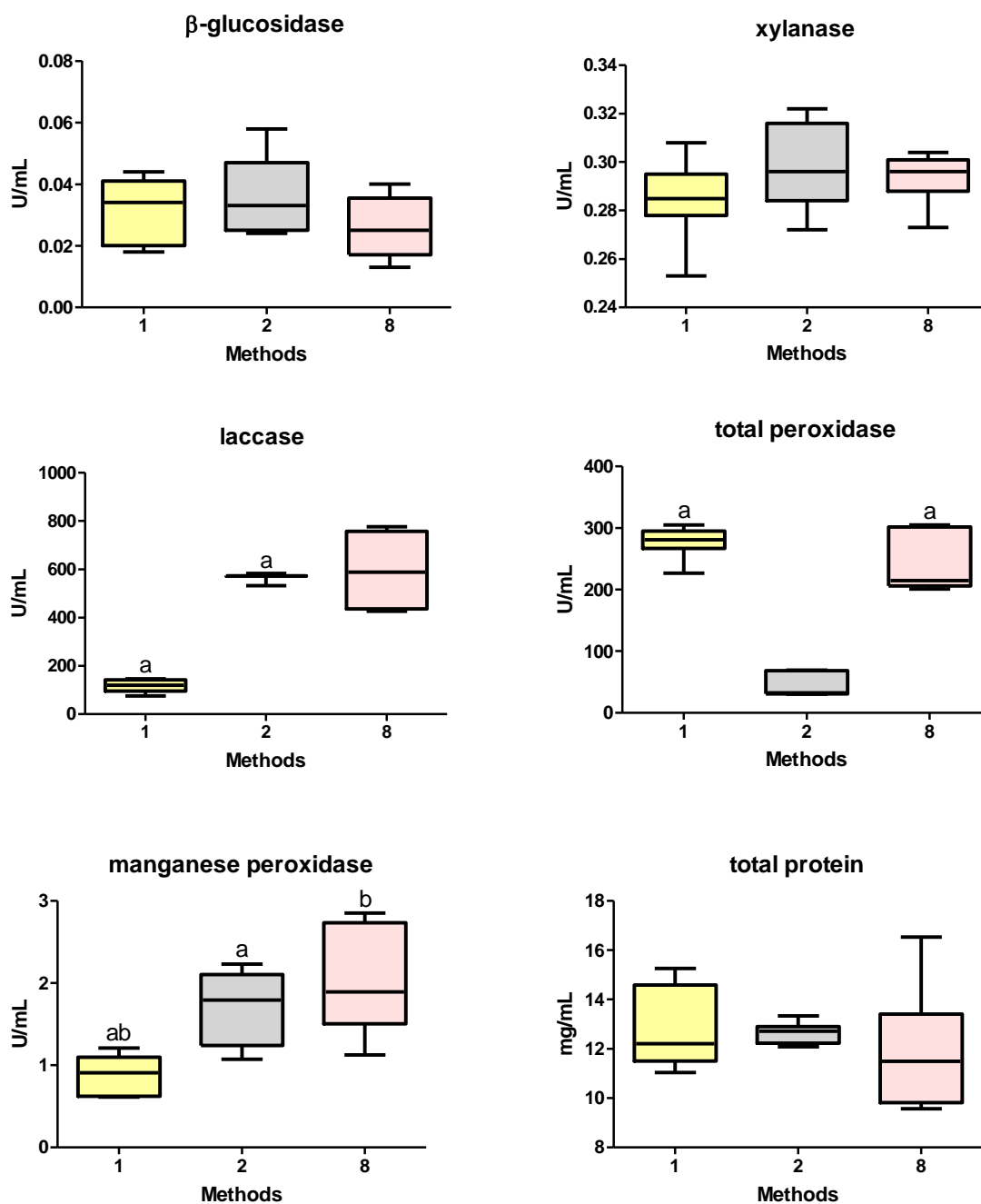
The data represent as means  $\pm$  E.P.M..The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup> p<0.05 was considered statistically significant.

## 11. FIGURES



**Figure 2.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Lentinus strigosus* CC40 after 8 months in three different methods.

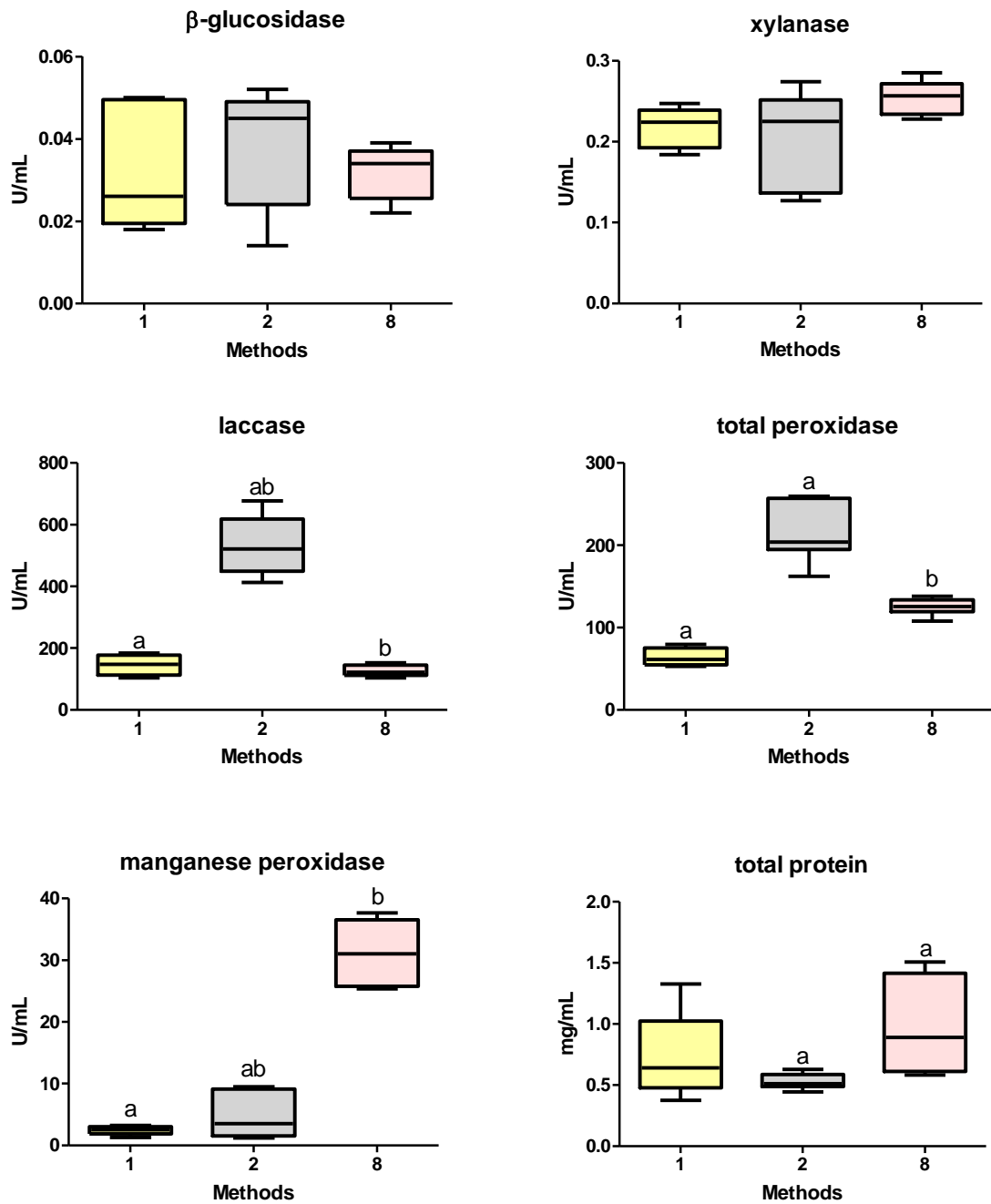
The data represent as means  $\pm$  E.P.M.. The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup>  $p < 0.05$  was considered statistically significant.



**Figure 3.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Volvariella volvacea* CC94 after 8 months in three different methods.

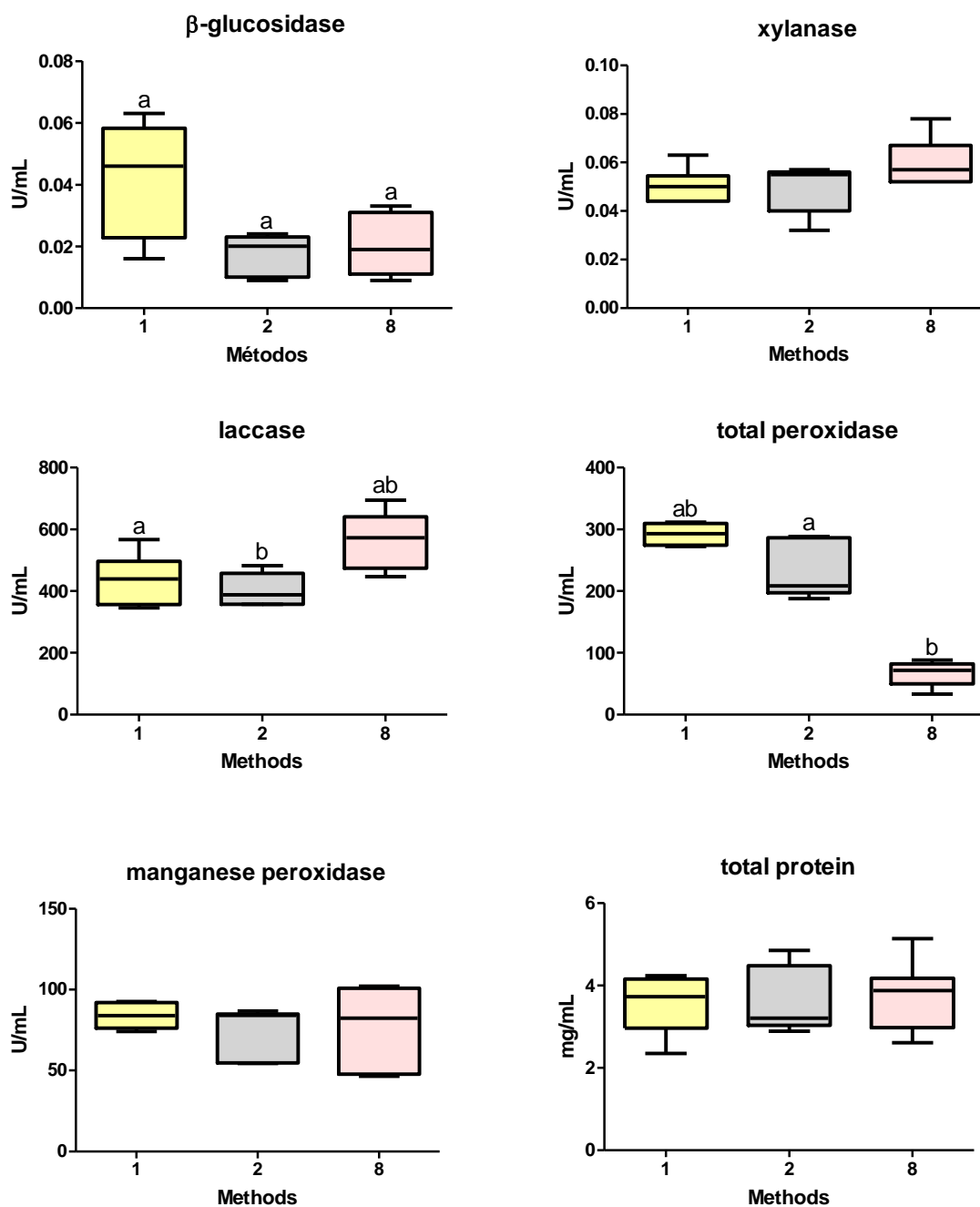
The data represent as means  $\pm$  E.P.M.. The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup>  $p < 0.05$  was considered statistically significant.





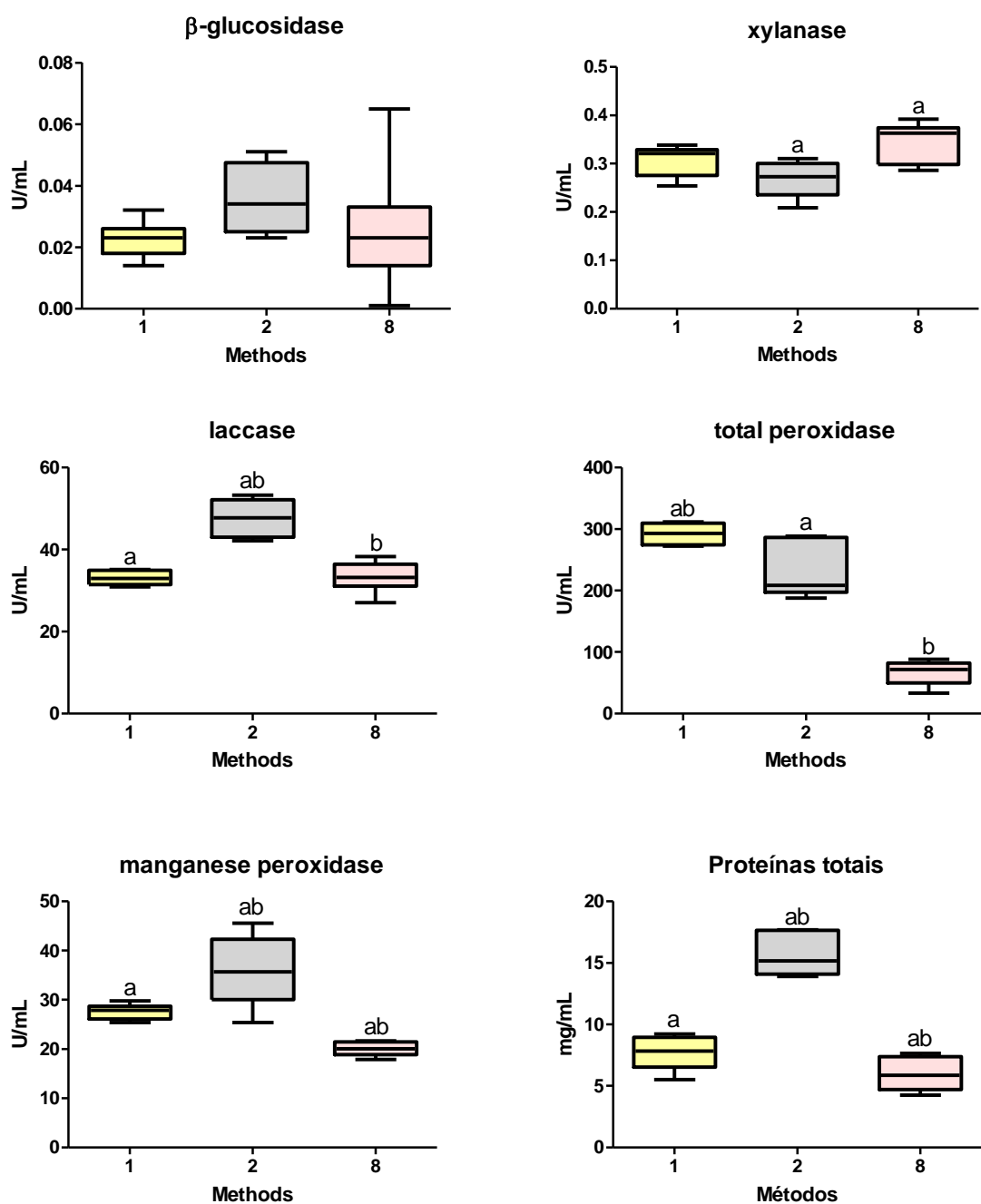
**Figure 4.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Fistulina hepatica* CC94 after 8 months in three different methods.

The data represent as means  $\pm$  E.P.M.. The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup>  $p < 0.05$  was considered statistically significant.



**Figure 5.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Pleurotus ostreatus* CC389 after 8 months in three different methods.

The data represent as means  $\pm$  E.P.M.. The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup>  $p < 0.05$  was considered statistically significant.



**Figure 6.** Concentration of  $\beta$ -glucosidase, xylanase, laccase, total peroxidase, manganese peroxidase and total proteins of *Ganoderma lucidum* CC404 after 8 months in three different methods.

The data represent as means  $\pm$  E.P.M.. The experimental results of the different methods were analyzed using analysis of variance (ANOVA) by the Tukey test for comparisons, where <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup>  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLA, M. A. et al. Potential activity of aqueous extract of culinary- medicinal Lion's Mane mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphylophoromycetideae) in accelerating wound healing in rats. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 1, p. 33–39, 2011.
- ABDULLAH, N. et al. Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- ABIDIN, M. H. Z.; ABDULLAH, N.; ABIDIN, N. Z. Protective Effect of Antioxidant Extracts from Grey Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Agaricomycetes), Against Human Low-Density Lipoprotein Oxidation and Aortic Endothelial Cell Damage. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 2, p. 109–121, 2016.
- ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure National Renewable Energy Laboratory - NREL**, 1996.
- AHN, W.-S. et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. **International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 14, n. 4, p. 589–94, 2004.
- AIDA, F. M. N. A. et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 11–12, p. 567–575, 2009.
- AKAVIA, E. et al. Study of *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. and *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray: Cultural-Morphological Peculiarities, Growth Characteristics, Qualitative Enzymatic Activity, and Resistance to Fungal Pest Contamination. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 8, n. 4, p. 361–376, 2006.
- ALARCÓN, J. et al. Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 58, n. 1–2, p. 62–64, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. M. **Introductory micology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- AL-FATIMI, M. et al. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of selected basidiomycetes from Yemen. **Pharmazie**, v. 60, n. 10, p. 776–780, 2005.
- ALVES, M. et al. Wild mushroom extracts as inhibitors of bacterial biofilm formation. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 667–679, 2014.
- ALVES, M. J. et al. A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 2648–59, 2013.
- ALVES, M. J. et al. Wild mushroom extracts potentiate the action of standard antibiotics against multiresistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 32–38, 2014.
- ANGELI, J. P. F. et al. Beta-glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. **Archives of toxicology**, v. 83, n. 1, p. 81–6, 2009.

ARCHIBALD, F. S. Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 3101–3109, 1992.

ARORA, D. **Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi**. Berkeley: Ten Speed Press., 1986.

ARORA, D. **Handbook of fungal biotechnology**. Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group, 2003.

ASAHI, T. et al. A mushroom-derived amino acid, ergothioneine, is a potential inhibitor of inflammation-related DNA halogenation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 8451, n. June, p. 1–5, 2015.

ASATIANI, M. D. et al. The Shaggy Inc Cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (O.F.Mull.: Fr.) Pers. (Agaricomycetidae) substances interfere with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction of the NF- $\kappa$ B pathway through inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation in MCF7 breast cancer cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 1, p. 19–25, 2011.

ATKINSON, G. F. Morphology and development of *Agaricus rodmani*. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 54, n. 219, p. 309–343, 2016.

AURIOL, M. et al. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 70, n. 3, p. 445–452, 2008.

AUTENRIETH, G. **A Homeric Dictionary for Schools and Colleges**. New York: Harper & brothers, 1889.

BADALYAN, S. M. Antioxidant activity of culinary-medicinal mushroom *Flammulina velutipes* (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 3, p. 10, 2003.

BADALYAN, S. M.; SISAKYAN, S. H. Study of antiprotozoal activity and mitogenic effects within some medicinal mushrooms. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, n. 3, p. 382–383, 2005.

BADOLE, S. L. et al. Interaction of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel-Champ. with glyburide in alloxan induced diabetic mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 2, p. 159–164, 2008.

BAILEY, C. J. et al. Effect of *Coprinus comatus* on plasma glucose concentrations in mice. **Planta medica**, v. 50, p. 525–526, 1984.

BAO, H. N. D.; OCHIAI, Y.; OHSHIMA, T. Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6248–6255, 2010.

BAO, H. N. D.; USHIO, H.; OHSHIMA, T. Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10032–10040, 12 nov. 2008.

BAO, X. F. et al. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 2, p. 175–181, 2002.

BEATTIE, K. D. et al. Ethanolic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer

- cell growth *in vitro*. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 458–465, 2011.
- BERTÉLI, M. B. D. et al. Mycelial antineoplastic activity of *Agaricus blazei*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2307–2313, 2014.
- BIN, M. X. L. Hydroxyl radical scavenging activities of several kinds of edible fungi. **Food and Fermentation Industries**, v. 10, 2005.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)- $\beta$ -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3–14, 1995.
- BOLORMAA, Z. et al. Screening and physiological functionality of *Hypsizygus marmoreus* (White Cultivar) fruiting body. **The Korean Journal of Mycology**, v. 39, n. 3, p. 185–188, 2011.
- BON, M.; WILKINSON, J.; OVENDEN, D. **The mushrooms and toadstools of Britain and North-western Europe**. London: Hodder & Stoughton Ltd, 1987.
- BORCHERS, A. T. et al. Mushrooms, Tumors, and Immunity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, n. 4, p. 281–293, ago. 1999.
- BORCHERS, A. T. et al. The immunobiology of mushrooms. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, n. 3, p. 259–276, 2008.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Evaluation of *Microsporium canis* in different methods of storage. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 42, n. 6, p. 499–504, 2004.
- BROADHURST, C. L.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 849–852, 2000.
- BUSWELL, J. A. et al. Lignocellulolytic enzyme mushroom fungi profiles of edible. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, n. 5, p. 537–542, 1996.
- CAI, M. et al. Extraction, antimicrobial, and antioxidant activities of crude polysaccharides from the wood ear medicinal mushroom *Auricularia auricula-judae* (higher basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 6, p. 591–600, 2015.
- CAMELINI, C. M. et al. Fungal cultivation and production of polysaccharides. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**. New York: Springer International Publishing, 2014. p. 1–33.
- CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 4, p. 849–850, 2007.
- CANNON, P. F.; KIRK, P. M. **Fungal families of the world**. London: CABI Europe, 2007.
- CARBONERO, E. R. et al. Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 814–819, 2012.
- CARDOZO, F. T. G. S. et al. *In vivo* anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2541–2549, 2013.
- CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 423–432, fev. 2000.

CARVALHO, F. DE. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 814–820, jun. 2007.

CASSELMAN, A. **Strange but true: The largest organism on Earth is a fungus**. Disponível em: <<https://www.scientificamerican.com/article/strange-but-true-largest-organism-is-fungus/>>.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 683–697, 2002.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 225, p. 225–226, 1939.

CENCI, R. et al. **Chemical elements in Ascomycetes and Basidiomycetes. The reference mushrooms as instruments for investigating bioindication and biodiversity**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011.

CHAIYAMA, V.; PETCHARAT, V.; KRITSANEEPAIBOON, P. Some morphological and physiological aspects and cultivation of *Coprinus comatus* (O. F. Mull.) Gray. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 261–274, 2007.

CHAN-CUPUL, W. et al. Response of ligninolytic macrofungi to the herbicide atrazine: dose-response bioassays. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 4, p. 348–357, out. 2014.

CHANG, C.-F. et al. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, n. 6, p. 505–514, ago. 2000.

CHANG, H. C. et al. *Hericium erinaceus* inhibits TNF- $\alpha$ -induced angiogenesis and ROS generation through suppression of MMP-9/NF- $\kappa$ B signaling and activation of Nrf2-mediated antioxidant genes in human EA.hy926 endothelial cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. ID 8257238, p. 1–15, 2016.

CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 473–6, 1996.

CHEN, C. C.; WU, C. M. Volatile components of mushroom (*Agaricus subrufecens*). **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1208–1209, 1984.

CHEN, C. H. et al. Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. ID 982368, p. 1–10, 2011.

CHEN, L. et al. Hypolipidaemic and hypoglycaemic activities of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* in Kunming mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1206–1209, 2016.

CHEN, Y. et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 231–241, 2008.

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

CHEUNG, P. C. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 9, p. 1512–6, set. 1998.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutrition Research**, v. 16, n. 11–12, p. 1953–1957, 1996.

- CHIU, K. W.; LAM, A. H. W.; PANG, P. K. T. Cardiovascular active substances from the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 2, p. 93–99, mar. 1995.
- CHUN-MEI, Z. et al. The effect of UV-C irradiation duration on shelf-life quality of postharvest White *Hypsizygus marmoreus* during passive MAP. **Food and Fermentation Industries**, v. 3, 2011.
- COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582–594, 2002.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. DA; LINDE, G. A. Criopreservação de *Agarius blazei* in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotectant. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 1034–1037, 2012.
- COLLINS, P. J. et al. Oxidation of anthracene and benzo[ $\alpha$ ]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4563–4567, 1996.
- CORREA, E. et al. Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 6, p. 497–499, jun. 2006.
- COSTA, E. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. v. 19, n. n. 2, p. 111-122 , 2009.
- COTA, B. B. et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 263–270, 2008.
- CUI, F. et al. Protective effects of extracellular and intracellular polysaccharides on hepatotoxicity by *Hericium erinaceus* SG-02. **Current Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 379–385, 2016.
- DA COSTA, M. C. D. et al. Photoprotective and antimutagenic activity of *Agaricus subrufescens* basidiocarp extracts. **Current Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 476–482, 2015.
- DAMTE, D. et al. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae* in RAW264.7 cells. **Toxicological Research**, v. 27, n. 1, p. 11–14, 2011.
- DAS, D. et al. A (1 - 6) - $\beta$ -glucan from a somatic hybrid of *Pleurotus florida* and *Volvariella volvacea*: isolation , characterization , and study of immunoenhancing properties. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 7, p. 974–978, 2010.
- DAY, J. G.; PENNINGTON, M. W. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa: Humana Press. Springer, 1995.
- DAY, J. G.; STACEY, G. N. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa: Humana Press. Springer, 2007. v. 368
- DEACON, J. W. **Fungal biology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2013.
- DEMIRBAŞ, A. Accumulation of heavy metals in some edible mushrooms from Turkey. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 415–419, mar. 2000.
- DENG, G. et al. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 9, p. 1215–1221, 1 set. 2009.
- DENTINGER, B. T. M.; MCLAUGHLIN, D. J. Reconstructing the Clavariaceae using nuclear large subunit rDNA sequences and a new genus segregated from Clavaria. **Mycologia**, v. 98, n. 5, p. 746–



762, 2006.

DIGHTON, J. **Fungi in Ecosystem Processes**. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2003. v. 31

DIGHTON, J. **Fungi in Ecosystem Processes**. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2016. v. 31

DING, Z. et al. Hypoglycaemic effect of comatin, an antidiabetic substance separated from *Coprinus comatus* broth, on alloxan-induced-diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 39–43, 2010.

DJARWANTO; TACHIBANA, S. Screening of fungi capable of degrading lignocellulose from plantation forests. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 12, n. 9, p. 669–75, 1 maio. 2009.

DODOR, D. E.; HWANG, H.-M.; EKUNWE, S. I. . Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 210–217, ago. 2004.

DOGAN, H.; COTELI, E.; KARATAS, F. Determination of glutathione, selenium, and malondialdehyde in different edible Mushroom species. **Biological Trace Element Research**, v. 174, n. 2, p. 459–463, 26 dez. 2016.

DONG, J. Y. et al. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae). **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 163–166, 2006.

DOTAN, N.; WASSER, S. P.; MAHAJNA, J. The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator. **Integrative Cancer Therapies**, v. 10, n. May, p. 148–159, 2011.

DREVINSKAS, T. et al. Downscaling the *in vitro* test of fungal bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: methodological approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 4, p. 1043–1053, 11 fev. 2016.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.-A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 268–272, 1 jan. 2004.

DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: Unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. **Cryobiology**, v. 46, n. 1, p. 33–42, 2003.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L. Preservation of basidiomycete strains on perlite using different protocols. **Mycoscience**, v. 5, p. 1–10, 2014.

ERJAVEC, I. et al. Mushroom extracts decrease bone resorption and improve bone formation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 7, p. 559–569, 2016.

EUGENIO, M. E. et al. Bioremediation of lignosulphonates by lignin-degrading basidiomycetous fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4929–4934, 2008.

FACCIN, L. C. et al. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 24–28, 2007.

FAHY, G. M. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v. 27, n. 3, p. 247–268, jun. 1990.

- FALANDYSZ, J. Mercury bio-extraction by fungus *Coprinus comatus*: a possible bioindicator and mycoremediator of polluted soils? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7444–7451, 2016.
- FEOFILOVA, E. P. et al. Species composition of food-spoiling mycelial fungi. **Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 112–116, 2009.
- FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; ABREU, R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1543–1560, 2009.
- FINIMUNDY, T. C. et al. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. **Nutrition Research**, v. 33, n. 1, p. 76–84, 2013.
- 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**, v. 5, n. 1, p. 3–15, 2008.
- FOKINA, O. et al. Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 445–453, 2015.
- FONSECA, M. I. et al. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 534–539, 2010.
- FORTES, R. C. et al. Immunological, hematological, and glycemia effects of dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus* on patients' colorectal cancer. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 234, n. 1, p. 53–62, 2009.
- FRANCIA, C. et al. Current research findings on the effects of selected mushrooms on cardiovascular diseases. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, n. 2, p. 169–172, 1999.
- FRANK, J. L.; COFFAN, R. A.; SOUTHWORTH, D. Aquatic gilled mushrooms: *Psathyrella fruiting* in the Rogue River in southern Oregon. **Mycologia**, v. 102, n. 1, p. 93–107, 2010.
- FRIEDMAN, M. Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 32, p. 7108–7123, 19 ago. 2015.
- FU, H.-Y.; SHIEH, D.-E.; HO, C.-T. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. **Journal of Food Lipids**, v. 9, n. 1, p. 35–43, mar. 2002.
- FUJIMIYA, Y. et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 46, n. 3, p. 147–159, 1998.
- FUJITA, R. et al. Anti-androgenic activities of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 107–112, 2005.
- FUKUSHIMA, M. et al. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 226, n. 8, p. 758–65, 2001.
- FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004.
- GAMBATO, G. et al. Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated

macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 46–51, 2016.

GANESHPURKAR, A. et al. Study of antimicrobial and cytotoxic potential of the Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* cv. *florida* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 4, p. 321–325, 2016.

GANESHPURKAR, A.; RAI, G. Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of Oyster Mushroom *Pleurotus florida*. **Indian journal of pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 66–70, 2013.

GAO, L. et al. Primary mechanism of apoptosis induction in a leukemia cell line by fraction FA-2-b- $\beta$  prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 11, p. 1545–1555, nov. 2007.

GARCIA-MORALES, R. et al. Biotransformation of endocrine-disrupting compounds in groundwater: bisphenol A, nonylphenol, ethynylestradiol and triclosan by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43. **Water, air, and soil pollution**, v. 226, n. 8, p. 251, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GIRÃO, M. DUTRA et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229–233, 2004.

GONZAGA, M. L. C. et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an  $\alpha$ -(1 - 4)-glucan- $\beta$ -(1 - 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 1, p. 32–40, 2009.

GONZÁLEZ-PALMA, I. et al. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–9, 12 jul. 2016.

GU, Y.-H.; SIVAM, G. Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 2, p. 196–204, 2006.

GUNDE-CIMERMAN, N.; CIMERMAN, A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. **Experimental Mycology**, 1995.

GUO, L. et al. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 10, p. 1175–1182, 2009.

GUO, Y.-J. et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. **Food & Function**, v. 3, n. 11, p. 1195, 2012.

HAN, C. et al. Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, n. 3, p. 191–196, 2006.

HAN, C.; CUI, B.; WANG, Y. Vanadium uptake by biomass of *Coprinus comatus* and their effect on hyperglycemic mice. **Biological Trace Element Research**, v. 124, n. 1, p. 35–39, 2008.

HAO, Y. J.; QIN, J.; YANG, Z. L. *Cibaomyces*, a new genus of Physalacriaceae from East Asia. **Phytotaxa**, v. 162, n. 4, p. 198–210, 2014.

HASEGAWA, T. History and evolution of culture maintenance and preservation techniques. In:

HUNTER-CEVERA, J. C.; BELT, A. (Eds.). . **Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry**. New York: Academic Press, Elsevier, 1996. p. 15–27.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641–655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. et al. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. [s.l.: s.n.]. v. 38

HEARST, R. et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, n. 1, p. 5–7, 2009.

HEINZKILL, M. et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1601–1606, 1998.

HELENO, S. A. et al. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1443–1450, 2010.

HENRIQUE ROSA, L. et al. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 967–974, 2003.

HERNÁNDEZ, C. et al. Laccase induction by synthetic dyes in *Pycnoporus sanguineus* and their possible use for sugar cane bagasse delignification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos: micología básica y aplicada**. 2. ed. Madri: S.L. Fondo de Cultura Economica de España, 1998.

HETLAND, G. et al. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 4, p. 363–370, 2008.

HIBBETT, D. S. et al. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. October, p. 12002–12006, 1997.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007.

HOLLAND, N. T. et al. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 217–234, 2003.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of reproduction**, v. 4, n. 3, p. 143–150, 1999.

HOMOLKA, L. Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. **Fungal Biology**, v. 118, n. 2, p. 107–125, 2014.

HSU, C.-H. et al. The mushroom *Agaricus blazei* Murill in combination with metformin and gliclazide improves insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 1, p. 97–102, 2007.

HSU, H. C. et al. Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. **The Biochemical journal**, v. 323, p. 557–65, 15 abr. 1997.

HUANG, J. F. et al. Therapeutic effect of *Pleurotus eryngii* cellulose on experimental fatty liver in rats. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.

- HUANG, W. et al. Facile one-pot synthesis of T tellurium nanorods as antioxidant and anticancer agents. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 11, n. 16, p. 2301–2311, 19 ago. 2016.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205–229, 2003.
- HYODO, I. et al. Nationwide survey on complementary and alternative medicine in cancer patients in Japan. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 12, p. 2645–2654, 2005.
- IKEKAWA, T. et al. Studies on the antitumor activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 57, n. 1, p. 85–6, fev. 1973.
- IKEKAWA, T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, n. 4, p. 2, 2001.
- INAGE, M. et al. Hypersensitivity pneumonitis induced by spores of *Pholiota nameko*. **Internal Medicine**, v. 35, n. 4, p. 301–304, 1996.
- INGOLD, C. T.; HUDSON, H. J. **The biology of fungi**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993.
- INGOLD, C. T.; HUDSON, H. J. **The biology of fungi**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993.
- ITOH, H.; ITO, H.; HIBASAMI, H. Blazein of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. **Oncology Reports**, v. 25, p. 223–230, jan. 1994.
- ITOH, H.; ITO, H.; HIBASAMI, H. Blazein of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. **Oncology Reports**, v. 25, p. 223–230, 1 jan. 1994.
- JANG, M.-J. et al. Optimal conditions for the mycelial growth of *Coprinus comatus* Strains. **Mycobiology**, v. 37, n. 2, p. 103–8, 2009.
- JANG, S.-G. et al. Isolation of 1',3'-dilinenoyl'-2'-linoleoylglycerol with tyrosinase inhibitory activity from *Flammulina velutipes*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 681–684, 2009.
- JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. et al. Uptake of Cadmium ions in white-rot fungus *Trametes versicolor*: effect of Cd (II) ions on the activity of laccase. **Cell Biology International**, v. 26, n. 7, p. 605–613, jul. 2002.
- JEONG, H. et al. Hypolipidemic effects of biopolymers extracted from culture broth, mycelia, and fruiting bodies of *Auricularia auricula-judae* in dietary-induced hyperlipidemic rats. **Mycobiology**, v. 35, n. 1, p. 16, 2007.
- JEURINK, P. V. et al. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 8, p. 1124–1133, 2008.
- JIA, J. et al. Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 32–36, 2009.
- JIANG, S. et al. Medicinal properties of *Hericium erinaceus* and its potential to formulate novel mushroom-based pharmaceuticals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 18, p. 7661–

7670, 29 set. 2014.

JIN, C. Y. et al. Induction of G2/M arrest and apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of *Agaricus blazei*. **Oncology Reports**, v. 16, n. 6, p. 1349–1355, 2006.

JIN, C.-Y. et al. Bcl-2 and caspase-3 are major regulators in *Agaricus blazei*-induced human leukemic U937 cell apoptosis through dephosphorylation of Akt. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1432–7, ago. 2007.

JO, W.-S. et al. Development of detection methods for cellulolytic activity of *Auricularia auricula-judae*. **Mycobiology**, v. 38, n. 1, p. 74, 2010.

KABIR, Y.; KIMURA, S. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats after feeding of Shiitake (*Lentinus edodes*) Maitake (*Grifola frondosa*) mushroom diets. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 35, n. 1, p. 91–94, 1989.

KABIR, Y.; YAMAGUCHI, M.; KIMURA, S. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 33, n. 5, p. 341–6, 1987.

KANAGASABAPATHY, G. et al. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2618–2626, 2011.

KANG, H.-W. Antioxidant and anti-inflammatory Effect of Extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 8, p. 1072–1078, 31 ago. 2012.

KANG, M. G. et al. Characterization of an antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **BioMed Research International**, v. 2013, n. ID 283964, p. 1–6, 2013.

KAWAMURA-KONISHI, Y. et al. Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, n. 7, p. 1752–1760, 2007.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 12–24, 2005.

KHO, Y. S. et al. Antioxidant capacity of fresh and processed fruit bodies and mycelium of *Auricularia auricula-judae* (Fr.) Qué. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 1, p. 167–174, 2009.

KIM, D. H. et al. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 22, n. 2, p. 162–4, fev. 1999.

KIM, Y. W. et al. Anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 7, p. 483–487, 2005.

KIRK, P. M. et al. **Ainsworth & Bisby's - Dictionary of The Fungi**. 10. ed. Wallingford: CABI Europe, 2008.

KISHIDA, E. et al. Structures and antitumor activities of polysaccharides isolated from mycelium of *Volvariella volvacea*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1308–9, ago. 1992.

KITZBERGER, C. S. G. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n.

2, p. 631–638, 2007.

KLAUS, A. et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2005–2011, 2011.

KNUDSEN, H.; VESTERHOLD, J. **Funga Nordica**. 2. ed. Copenhagen: Nordsvamp, 2008.

KOBAYASHI, H. et al. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, n. 8, p. 527–538, 2005.

KODAMA, N. et al. Effects of D-fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1647–1650, 2002.

KODAMA, N.; KOMUTA, K.; NANBA, H. Can maitake MD-fraction aid cancer patients? **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 3, p. 236–239, 2002.

KODAMA, N.; KOMUTA, K.; NANBA, H. Activation of NK cells in cancer patients. v. 6, n. 4, p. 371–377, 2003.

KODAMA, N.; MURATA, Y.; NANBA, H. Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 2, p. 141–145, 1 jun. 2004.

KOGBARA, R. B. et al. Treatment of petroleum drill cuttings using bioaugmentation and biostimulation supplemented with phytoremediation. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 51, n. 9, 2016.

KOHDA, H. et al. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1367–74, abr. 1985.

KÖPPEL, C. Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. **Toxicon**, v. 31, n. 12, p. 1513–1540, dez. 1993.

KOZUKA, M. et al. Cancer preventive agents 3. Antitumor promoting effects of *Agaricus blazei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 6, p. 568–572, 7 jan. 2005.

KUO, M.-C. et al. *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- $\kappa$ B. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 217–222, jan. 2006.

KURTZMAN, C. P. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. **Mycoscience**, v. 47, n. 2, p. 65–71, abr. 2006.

KURUP, V. P.; ZACHARISEN, M. C.; FINK, J. N. Hypersensitivity pneumonitis. **The Indian journal of chest diseases & allied sciences**, v. 48, n. 2, p. 115–28, 2000.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, 1984.

LAMPE, K. F. Toxic fungi. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 19, p. 85–104, 1979.

- LARRAN, A. et al. Evaluation of biological pretreatments to increase the efficiency of the saccharification process using *Spartina argentinensis* as a biomass resource. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 320–325, 2015.
- LEE, J.-S. et al. *Grifola frondosa* (Maitake Mushroom) water extract inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis through inhibition of Reactive Oxygen Species and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 643–651, dez. 2008.
- LEE, S.-A. et al. Studies on the antitumor components of Korean Basidiomycetes(II) -Antitumor components of *Schizophyllum commune* and *Auricularia auricula-judae*. **The Korean Journal of Mycology**, v. 9, n. 1, p. 25–29, 1981.
- LEE, S. H. et al. Dietary phytic acid improves serum and hepatic lipid levels in aged ICR mice fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research**, v. 27, n. 8, p. 505–510, 2007.
- LEE, Y. L. et al. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p. 116–124, 2008.
- LEE, Y. L.; YEN, M. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 1–9, 2007.
- LEŠTAN, D. et al. Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 286–294, maio. 1996.
- LI, B. et al. Antioxidant properties of cap and stipe from *Coprinus comatus*. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1473–1486, 2010.
- LI, F. et al. Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor*. **Science China Life Sciences**, v. 54, n. 4, p. 379–385, 2011.
- LI, H. et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Pholiota nameko*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 6, p. 669–675, 2008.
- LI, H. et al. Effects of the polysaccharide from *Pholiota nameko* on human cytokine network in serum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 164–170, 2012.
- LI, H. et al. Recognition of receptors on bone marrow-derived dendritic cells bound with *Pholiota nameko* polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 649–657, 2015.
- LI, H. et al. Effects of *Pholiota nameko* polysaccharide on NF- $\kappa$ B pathway of murine bone marrow-derived dendritic cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 120–130, 2015.
- LI, H.; WANG, S. Kinetics of inhibition of ribonuclease A by *Pholiota Nameko* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 2, p. 134–138, 2007.
- LI, H.; ZHANG, M.; MA, G. Hypolipidemic effect of the polysaccharide from *Pholiota nameko*. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 556–562, 2010.
- LI, S.; SHAH, N. P. Characterization, antioxidative and bifidogenic effects of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* after heat treatments. **Food Chemistry**, v. 197, p. 240–249, 2016.
- LI, X. et al. *In vitro* antioxidant and anti-proliferation activities of polysaccharides from various extracts of different mushrooms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5801–



5817, 2012.

LI, X. et al. Peculiarities of metabolism of anthracene and pyrene by laccase-producing fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 549–554, 2014.

LI, Y. et al. The protective effects of polysaccharides of *Flammulina velutipes* on acute liver injury in mice. **Journal of Guangdong Pharmaceutical College**, v. 2, 2010.

LIDDELL, H. G.; SCOTT, R. **A Greek-English Lexicon**. New York: Harper & brothers, 1894.

LIKTOR-BUSA, E. et al. Investigation of Hungarian mushrooms for antibacterial activity and synergistic effects with standard antibiotics against resistant bacterial strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 437–443, 2016.

LIN, J. M. et al. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 33–41, 1995.

LIN, W. et al. Antioxidant properties of methanol extract of a new commercial gelatinous mushrooms (white variety of *Auricularia fuscusuccinea*) of Taiwan. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 43, p. 6210–6221, 2013.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005.

LIU, J. et al. Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1691–1696, 2007.

LIU, W. et al. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 451–457, 2010.

LIU, Y. et al. Immunomodulating activity of *Agaricus brasiliensis* KA21 in mice and in human volunteers. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 2, p. 205–219, 2008.

LIU, Y. C. et al. A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* suppresses tumor growth and angiogenesis in vivo. **Oncology Reports**, v. 25, p. 223–230, 1994.

LLAURADÓ, G. et al. Oral administration of an aqueous extract from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* enhances the immunonutritional recovery of malnourished mice. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 83, p. 1456–1463, 2016.

LU, L. et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1232–1239, 2007.

LUO, H. et al. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematode. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1218–1224, 2004.

LUO, H. et al. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3916–3923, 2007.

MAITI, S. et al. Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms.

**Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 187–191, 2008.

MAITY, K. K. et al. A  $\beta$ -glucan from the alkaline extract of a somatic hybrid (PfloVv5FB) of *Pleurotus florida* and *Volvariella volvacea*: Structural characterization and study of immunoactivation. **Carbohydrate Research**, v. 370, p. 13–18, 2013.

MANTOVANI, M. S. et al.  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154–161, 2008.

MANTOVANI, T. R. D. et al. Criopreservação do gênero *Pleurotus* a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 11, n. 2, p. 107–112, 2008.

MANZANARES, P.; FAJARDO, S.; MARTIN, C. Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 125–132, 1995.

MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 555–564, 2002.

MASHITAH; ZULFADHLY, Z.; BHATIA, S. Binding mechanism of heavy metals biosorption by *Pycnoporus sanguineus*. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, v. 27, n. 5–6, p. 441–445, 1999.

MASUDA, Y. et al. Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1104–1108, 2008.

MATSUURA, H. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1576–1578, jan. 2002.

MATSUURA, H. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1576–1578, 22 jan. 2002.

MATSUZAWA, T. Studies on antioxidant effects of culinary-medicinal Bunashimeji mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 8, n. 3, p. 245–250, 2006.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 8, n. 2, p. 173–183, 1971.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. **Transfusion**, v. 47, n. 5, p. 935–945, 2007.

METHVEN, A.; HUGHES, K. W.; PETERSEN, R. H. *Flammulina* RFLP patterns identify species and show biogeographical patterns within species. **Mycologia**, v. 92, n. 6, p. 1064, nov. 2000.

MICHELOT, D. Poisoning by *Coprinus atramentarius*. **Natural Toxins**, v. 1, n. 2, p. 73–80, 1992.

MILES, P. G.; CHANG, S.-T. **Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MISAKI, A. et al. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides:

Antitumor action of periodate-modified, branched (1 → 3)-β-d-glucan of *auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 → 3)-glycosidic linkages. **Carbohydrate Research**, v. 92, n. 1, p. 115–129, 1981.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, v. 41, n. 3, p. 251–5, 2000.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. et al. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 27–32, 2006.

MIYAUCHI, S. et al. Visual comparative omics of Fungi for plant biomass deconstruction. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. August, p. 1335, 2016.

MIYAZAWA, N.; OKAZAKI, M.; OHGA, S. Antihypertensive effect of *Pleurotus nebrodensis* in spontaneously hypertensive rats. **Journal of oleo science**, v. 57, n. 12, p. 675–81, 2008.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Reviews International**, v. 11, n. 1, p. 5–21, 1995.

MIZUNO, T. et al. Antitumor active substances from mushrooms. **Food Reviews International**, v. 11, n. 1, p. 23–61, 1995.

MONCALVO, J.; LUTZONI, F. M.; REHNER, S. A. Phylogenetic relationships of Agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. v. 49, n. 2, p. 278–305, 2000.

MONCALVO, J. M. et al. One hundred and seventeen clades of euagarics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 3, p. 357–400, 2002.

MOORE, D. et al. Centenary review: Gravimorphogenesis in agarics. **Mycological Research**, v. 100, n. 3, p. 257–273, 1996.

MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 183–193, 2006.

MORI, K. et al. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. **Nutrition Research**, v. 28, n. 5, p. 335–342, 2008.

MORI, K. et al. Nerve growth factor-inducing activity of *Hericium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 9, p. 1727–1732, 2008.

MORIGIWA, A. et al. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 34, n. 7, p. 3025–8, jul. 1986.

MORIKAWA, K. et al. Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear β-1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. **Cancer Research**, v. 45, n. 4, p. 1496–1501, 1985.

MOTOI, M.; GOTO, S.; OHNO, N. Structure and antitumor activity of 1,3-β-glucan from cultivated fruit bodies of culinary-medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 3, p. 14, 2003.

MUKHERJEE, M.; SENGUPTA, S. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Volvariella volvacea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1412–4, dez. 1986.

- MULLEN, S. F.; CRITSER, J. K. **The science of cryobiology**. Berlin: Springer-Verlag US, 2007. v. 138
- MURAKAWA, K. et al. Therapy of myeloma *in vivo* using marine phospholipid in combination with *Agaricus blazei* Murill as an immune respond activator. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 4, p. 179–88, 2007.
- MURRILL, W. A. Dark-Spored Agarics - III. **Mycologia**, v. 14, n. 4, p. 200–221, 1922.
- NAKASONE, K. K.; PETERSON, S. W.; JONG, S.-C. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (Eds.). . **Biodiversity of Fungi**. New York: Academic Press, Elsevier, 2004. p. 37–47.
- NANBA, H.; KUBO, K. Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 833, p. 204–207, 1997.
- NASH, T. The chemical constitution of compounds which protect erythrocytes against freezing damage. **The Journal of General Physiology**, v. 46, n. 1, p. 167–175, 1962.
- NG, M.-L.; YAP, A.-T. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 5, p. 581–589, 2002.
- NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 11–17, 2004.
- NGUYEN, T. L. et al. *In vitro* antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 3, p. 1254–1258, 2012.
- NICOTRA, S. et al. Biotransformation of resveratrol: Synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 595–600, 2004.
- OKUDA, T. et al. Anticomplementary activity of antitumour polysaccharides. **Nature New Biology**, v. 238, n. 80, p. 59–60, 12 jul. 1972.
- OOI, V. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 715–729, 2000.
- ÖZTÜRK, M. et al. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1353–1360, jun. 2011.
- PACIONI, G. **Guía de hongos/Funghi**. 2. ed. Barcelona: Grijalbo, 1982.
- PALAZZOLO, E.; LETIZIA GARGANO, M.; VENTURELLA, G. The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 79–83, 13 fev. 2012.
- PANG, X. et al. Purification, characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 3, p. 291–297, 2007.
- PANTHONG, S.; BOONSATHORN, N.; CHUCHAWANKU, S. Antioxidant activity, anti-proliferative activity, and amino acid profiles of ethanolic extracts of edible mushrooms. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1–14, 2016.

- PAOLI, P. DE. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 897–910, 2005.
- PARK, K. M.; KWON, K. M.; LEE, S. H. Evaluation of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory property from mycelium culture extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. ID 61629, p. 1–7, 2015.
- PASSADOR, M. M. et al. Manutenção da viabilidade E patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. p. 51–55, 2010.
- PATERSON, R. R. M. *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 1985–2001, 2006.
- PAUKNER, S.; RIEDL, R. Pleuromutilins: potent drugs for resistant bugs - Mode of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. a027110, 14 out. 2016.
- PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 05–14, 2002.
- PIETROWSKI, G. DE A. M. et al. Viability of *Hanseniaspora uvarum* yeast preserved by lyophilization and cryopreservation. **Yeast**, v. 32, n. 8, p. 559–565, ago. 2015.
- PINHEIRO, F. et al. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 11, p. 1543–1550, 2003.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666–666, 15 out. 1949.
- POPOVIĆ, M. et al. Anti-oxidative activity of an aqueous suspension of commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus*. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4564–4571, 24 jun. 2010.
- POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher Fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311–333, 2006.
- POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher Fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311–333, 2006.
- PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 494–510, 2006.
- PUTTARAJU, N. G. et al. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9764–9772, dez. 2006.
- QIAN, L.; ZHANG, Y.; LIU, F. Purification and characterization of a ~43 kDa antioxidant protein with antitumor activity from *Pholiota nameko*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 1044–1052, 2016.
- QIU, C. et al. Genetic diversity analysis of *Hypsizygus marmoreus* with target region amplification polymorphism. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. et al. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 565–572, 2011.
- RAO, J. R.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms

(*Lentinula edodes*). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 6, p. 591–592, 2009.

RAPER, J. R. Growth and reproduction of fungi. In: STEWARD, F. C. (Ed.). . **Plant Physiology**. New York: Academic Press, 2002. v. VIA-Physp. 473–479.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CURTIS, H. **Biology of Plants**. 8. ed. Gordonsville: W. H. Freeman, Macmillan Learning, 2012.

REN, D. et al. Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 123–133, 2016.

REZA, M. A. et al. Hypolipidemic and hepatic steatosis preventing activities of the wood ear medicinal mushroom *Auricularia auricula-judae* (Higher Basidiomycetes) ethanol extract *in vivo* and *in vitro*. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 8, p. 723–734, 2015.

REZA, M. A.; JO, W.-S.; PARK, S.-C. Comparative antitumor activity of jelly ear culinary-medicinal mushroom, *Auricularia auricula-judae* (Bull.) J. Schrot. (Higher Basidiomycetes) extracts against tumor cells *in vitro*. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 4, p. 403–409, 2012.

RIBEIRO, B. et al. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1805–1813, 2007.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 247–255, maio. 2001.

RODRIGUES, D. et al. Chemical and structural characterization of *Pholiota nameko* extracts with biological properties. **Food Chemistry**, v. 216, p. 176–185, 2017.

RONCERO-RAMOS, I. et al. Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2016.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 11, p. 624–631, 2009.

ROSA, L. H. et al. Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella canarii* (Basidiomycota). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6–7, p. 983–987, 2005.

ROSA, L. H. et al. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 420–430, 2010.

RUÁN-SOTO, F.; GARIBAY-ORIJEL, R.; CIFUENTES, J. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 3, 2006.

RYAN, M. J.; SMITH, D. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. **Mycological Research**, v. 108, n. 12, p. 1351–1362, 2004.

SANO, M. et al. Inhibitory effects of edible higher Basidiomycetes mushroom extracts on Mmouse Type IV allergy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 1, p. 5, 2002.

- SANTOS ARTEIRO, J. M. et al. Protein-polysaccharides of *Trametes versicolor*: Production and biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 6, p. 937–943, 2012.
- SARKAR, R. et al. Glucans from alkaline extract of a hybrid mushroom (backcross mating between Pfl0Vv12 and *Volvariella volvacea*): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties. **Carbohydrate Research**, v. 347, n. 1, p. 107–113, jan. 2012.
- SCHALCHIAN-TABRIZI, K. et al. Multigene phylogeny of Choanozoa and the origin of animals. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2098; 1-7, 2008.
- SHAFFER, R. L.; SINGER, R. The Agaricales in modern taxonomy. **Mycologia**, v. 68, n. 2, p. 447, mar. 1976.
- SHAFFER, R. L.; SINGER, R. The Agaricales in modern taxonomy. **Mycologia**, v. 68, n. 2, p. 447, mar. 1976.
- SHE, Q.; NG, T.; LIU, W. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 1, p. 106–111, jun. 1998.
- SHEENA, N. et al. Antibacterial Activity of Three Macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* Occurring in South India. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 8, p. 564–567, 2003.
- SHIAO, M. S. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. **Chemical Record**, v. 3, n. 3, p. 172–180, 2003.
- SHIMOMURA, N.; HASEBE, K. Morphological mutation of *Lentinula edodes* mycelium, particularly detectable in the dikaryotic state. **Mycoscience**, v. 47, n. 4, p. 224–227, 2006.
- SILVEIRA RUEGGER, M. J. et al. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Höhn. in lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 211–214, 2001.
- SIMPSON, &#32;D. P. **Cassell's Latin Dictionary**. London: Webster's New World, Cassel Ltd, 1979.
- SINGER, R. **The Agaricales in Modern Taxonomy**. 4. ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986.
- SKARIYACHAN, S. et al. Exploring the medicinal potential of the fruit bodies of Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), against multidrug-resistant bacterial isolates. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 3, p. 245–252, 2016.
- SLIVA, D. et al. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 298, n. 4, p. 603–12, 8 nov. 2002.
- SLIVA, D. *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, n. 4, p. 358–64, 2003.
- SMANIA, E. F. A. et al. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 375–377, 2003.
- SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1-3),(1-6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 597, n. 1–3, p. 86–91, 2008.

SMINA, T. P. et al. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 438–446, 2011.

SMITH, D.; RYAN, M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. 1, p. 1–9, 2012.

SMITH, M. L.; BRUHN, J. N.; ANDERSON, J. B. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. **Nature**, v. 356, p. 428–431, 1992.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SORIMACHI, K. et al. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO cells in vitro. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 7, p. 1645–1647, 22 jan. 2001.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; KOGE, T. Inhibitory effect of *Agaricus blazei* Murill components on abnormal collagen fiber formation in human hepatocarcinoma cells. **Bioscience biotechnology and biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 621–623, 2008.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. *In vitro* activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: A potential prototype for chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 11, p. 1054–1061, 2010.

STAMETS, P. **Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World**. Berkeley: Ten Speed Press., 2005.

STANLEY, G. et al. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- $\beta$ 1 from prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, n. 1, p. 46–52, abr. 2005.

SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 983–986, 2009.

SUSEEM, S. R. et al. Evaluation of the analgesic activity of ethyl acetate, methanol and aqueous extracts of *Pleurotus eous* mushroom. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 2, p. 117–120, fev. 2011.

SYNYTSYA, A. et al. Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 6, p. 441–446, 2008.

SYNYTSYA, A. et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 548–556, maio. 2009.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1409, 2001.

TAKEUCHI, H.; HE, P.; MOOI, L. Y. Reductive effect off hot-water extracts from woody ear (*Auricularia auricula-judae* Quel.) on food intake and blood glucose concentration in genetically diabetic KK-Ay mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 50, n. 4, p. 300–304, 2004.

TANAKA, A. et al. Enhancement of the Th1-phenotype immune system by the intake of Oyster



mushroom (Tamogitake) extract in a double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 1–7, 2015.

TANAKA, S. et al. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16372–7, 5 out. 1989.

TANIMOTO, T. et al. Schizostatin, a novel squalene synthase inhibitor produced by the mushroom, *Schizophyllum commune*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 7, p. 617–23, jul. 1996.

TAOFIQ, O. et al. Development of Mushroom-based cosmeceutical formulations with anti-inflammatory, anti-tyrosinase, antioxidant, and antibacterial properties. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1372, 2016.

TENG, W. L. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platyserium bifurcatum*. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 2, p. 77–83, 1997.

TSAI, P.-F.; MA, C.-Y.; WU, J. S.-B. A novel glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow with growth inhibitory effect against human leukaemic U937 cells. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1252–1258, 2013.

TSAI, S.-Y.; TSAI, H.-L.; MAU, J.-L. Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 368–389, jun. 2009.

TSUGE, N. et al. Cinnatriacetins A and B, new antibacterial triacetylene derivatives from the fruiting bodies of *Fistulina hepatica*. **The Journal of Antibiotics**, v. 52, n. 6, p. 578–581, 1999.

UKAI, S. et al. Antitumor activity of various polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae*, and *Auricularia* species. **Chem Pharm Bull**, v. 31, p. 741–4, 1983.

UMEO, S. H. et al. Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9907–9914, 2015.

VAN ZAAYEN, A. Immunity of strains of *Agaricus bitorquis* to mushroom virus disease. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 82, n. 4, p. 121–131, 1976.

VÁNYOLÓS, A.; ORBÁN-GYAPAI, O.; HOHMANN, J. Xanthine oxidase inhibitory activity of hungarian wild-growing mushrooms. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 8, p. 1204–1210, 2014.

WANG, J. C. et al. Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 4, p. 641–646, 2005.

WANG, P. H. et al. Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon- $\gamma$  production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2721–2725, 2004.

WANG, X.-F. et al. *In vitro* rapid evolution of fungal immunomodulatory proteins by DNA family shuffling. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2455–2465, 22 mar. 2013.

WANG, Y.; LIU, Y.; HU, Y. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 324–332, 2014.

WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides.

**Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258–274, 2003.

WATANABE, T. **Soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species**. Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group, 2002.

WATKINSON, S. C.; MONEY, N.; BODDY, L. **The Fungi**. 3. ed. Waltham: Academic Press, Elsevier, 2016.

WATKINSON, S. C.; MONEY, N.; BODDY, L. **The Fungi**. 3. ed. Waltham: Academic Press, Elsevier, 2016.

WEIS, M.; OBERWINKLER, F. Phylogenetic relationships in Auriculariales and related group - hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, v. 105, n. 4, p. 403–415, abr. 2001.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of Organisms. **Science**, v. 163, n. 3863, p. 150–160, 1969.

WILSON, A. W.; DESJARDIN, D. E. Phylogenetic relationships in the gymnopoid and marasmioid fungi (Basidiomycetes, euagarics clade). **Mycologia**, v. 97, n. 3, p. 667–679, 2005.

WISITRASSAMEEWONG, K. et al. *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 2, p. 131–146, 2012.

WISITRASSAMEEWONG, K.; KARUNARATHNA, S. C. *Agaricus subrufescens*: new to Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 39, n. 2, p. 281–291, 2012.

WOLFENDEN, B. S.; WILLSON, R. L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 7, p. 805–812, 1982.

WONG, K. H. et al. *Heridium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., a medicinal mushroom, activates peripheral nerve regeneration. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 22, n. 10, p. 759–767, 2014.

WONG, K.-H. et al. Peripheral nerve regeneration following crush injury to rat peroneal nerve by aqueous extract of medicinal mushroom *Heridium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllorphomycetidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

WONG, K.-H. et al. Neuroregenerative potential of Lion's Mane mushroom, *Heridium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Higher Basidiomycetes), in the treatment of peripheral nerve injury. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 5, p. 427–446, 2012.

WRIGHT, J. E.; ALBERTÓ, E. **Hongos. Guia de la region Pampeana. I. hongos com laminillas**. Buenos Aires: L.O.L.A., 2005.

XIANG-HUI, K. et al. Application and research on immunomodulatory proteins of *Flammulina velutipes*. **Biotechnology**, v. 4, 2006.

XIAO, H.; ZHANG, Y.; LIU, Y. The modulation effects and primary mechanism of *Pleurotus ferulae* on the immune function of hydrocortisone model rats. **Preventive Medicine Tribune**, v. 2, 2006.

XIE QIU-JU, Y.; PEI-SHENG; ZHEN-MING, C. Antioxidant activity of exopolysaccharide from fermented kelp waste by *Hypsizigus marmoreus*. **Journal of Food Science and Biotechnology**, v. 4, 2012.

- XU, D. et al. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharide isolated from *Pleurotus eryngii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. 1478, p. 30–36, 2016.
- XU, F. et al. Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 607–613, 2016.
- XU, F. et al. Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 607–613, 2016.
- XUEMING, Z. Y. L. S. W. Y. L. The effects of the *Flammulina velutipes* polysaccharide extract on learning and memory ability of scopolamine hydrobromid induced model mice and rats. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, v. 1, 2010.
- YAMAC, M. et al. Hypoglycemic effect of *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. crude exopolysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 3, p. 513–7, 2008.
- YAMAC, M. et al. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by *Cerrena unicolor*, *Coprinus comatus*, and *Lenzites betulina* isolates in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 2, p. 168–174, 2009.
- YAMAGUCHI, M.; HWANG, P. M.; CAMPBELL, J. D. Latent *o*-diphenol oxidase in mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 198–202, 1970.
- YAMANAKA, K. I. Production of cultivated edible mushrooms. **Food Reviews International**, v. 13, n. 3, p. 327–333, 1997.
- YAN, J. J. et al. The sequence characteristics and expression models reveal superoxide dismutase involved in cold response and fruiting body development in *Volvariella volvacea*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 34, p. 1–13, 2016.
- YANG, W. et al. Optimization of ultrasonic extraction of *Flammulina velutipes* polysaccharides and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1269–1275, 2011.
- YI, C. et al. Enhanced oral bioavailability and tissue distribution of a new potential anticancer agent, *Flammulina velutipes* sterols, through liposomal encapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 25, p. 5961–5971, 2013.
- YU, C.-H. et al. Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murill on the growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 10, p. 753–764, 2009.
- YU, J. et al. Protective effect of selenium-polysaccharides from the mycelia of *Coprinus comatus* on alloxan-induced oxidative stress in mice. **Food Chemistry**, v. 117, n. 1, p. 42–47, 2009.
- ZAIDMAN, B.-Z. et al. *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function in LNCaP prostate cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 35, n. 2, p. 107–117, 2008.
- ZAKHARY, J. W. et al. Chemical composition of wild mushrooms collected from Alexandria, Egypt. **Food Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 31–41, 1983.
- ZHANG, C. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus eryngii* SI-04. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 568–577, 2016.
- ZHANG, J. et al. Antitumor polysaccharides from a Chinese Mushroom, “Yuhuangmo” the fruiting

body of *Pleurotus citrinopileatus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 7, p. 1195–1201, 12 jan. 1994.

ZHANG, J. et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant effects of polysaccharides from Nameko medicinal mushroom, *Pholiota nameko* SW-01 (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 7, p. 671–680, 2015.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 4–19, 2007.

ZHANG, Y. et al. Polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* alleviate cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 935–941, 2016.

ZHANG, Y. M. et al. Screening and enzymatic study of a composite microbial system FH3. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 35–43, 2009.

ZHANG, Y.; MILLS, G. L.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7581–7585, 2002.

ZHAO, L. et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 783–789, 2010.

ZHENG, L. et al. Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of mycelia zinc polysaccharide from *Pholiota nameko* SW-02. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 523–529, 2014.

ZHENG, L. et al. Antioxidant and anti-ageing activities of mycelia zinc polysaccharide from *Pholiota nameko* SW-03. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 15, p. 3117–3126, 2015.

ZHENG, R. et al. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 5, p. 811–820, 2005.

ZHONG, K. et al. Immunoregulatory and antitumor activity of schizophyllan under ultrasonic treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 302–308, 2015.