UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

BRUNA DOS SANTOS MENEZES

ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS

Vitória da Conquista, BA.
2017

BRUNA DOS SANTOS MENEZES

ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COGUMELOS COMESTÍVEIS

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

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

Vitória da Conquista, BA.
2017

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Menezes, Bruna dos Santos
Atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante de composto bioativos de cogumelos comestíveis / Bruna dos Santos Menezes.- 2017.
129 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques.
Coorientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2017.

1. Cogumelos comestíveis. 2. Pigmento 3. Macrófagos. I. Universidade Federal da Bahia. II. Marques, Lucas Miranda. III. Siqueira, Félix Gonçalves de. IV. Título.

CDU: 615

BRUNA DOS SANTOS MENEZES

"ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COGUMELOS COMESTIVEIS"

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, 11/10/2017.

PROF.ª DR. LUCAS MIRANDA MARQUES (ORIENTADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PROF. DR.ª REGIANE YATSUDA (EXAMINADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PROF. DR. GILDOMAR LIMA VALASQUES JUNIOR (EXAMINADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Dedico esse trabalho aos meus pais (Alba e Dudu) e ao meu namorado Alisson por todo amor, carinho e incentivo em todos os momentos, tornando essa conquista ainda mais especial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder essa experiência oportuna para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Lucas por ter estendido a mão em um momento difícil, me aceitando em seu grupo de pesquisa. Espero, sinceramente, ter honrado a sua confiança. Muito obrigada.

Ao professor Félix pela parceria de muitos anos e por todas as oportunidades que me foram abertas por seu intermédio. Obrigada por tudo.

À professora Patrícia por aceitar me coorientar, mesmo extraoficialmente. Obrigada pela amizade e por toda dedicação disposta para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À professora Mariluze por toda assistência concedida sempre que foi solicitada.

Ao professor Gildomar por ter nos recebido de portas abertas em seu laboratório na UESB, e pelas contribuições valiosas para elaboração dos experimentos.

Ao meu colega Lucas Solidade, companheiro de laboratório de todas as horas. Muito obrigada por sua dedicação e amizade.

Aos colegas Aparecido, Manoel e Lucas Santana pelas colaborações dispensadas a este trabalho.

Às minhas amigas Kátia, Érica, Jéssica e prima Karol por toda força e por tornar essa jornada mais agradável.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para tornar esse projeto uma realidade.

"As respostas serão sempre importantes, porém não superam as perguntas em importância e poder. Pois as respostas costumam ser limitadas e temporais e as perguntas são ilimitadas e atemporais." (Paulo Vieira).

RESUMO

MENEZES, Bruna dos Santos. **Atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante de compostos bioativos de cogumelos comestíveis**. 129 f. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Os cogumelos comestíveis têm sido historicamente utilizados na cultura oriental, por sua gastronômica e valor medicinal. Diversos estudos têm comprovado seus benefícios à saúde humana, e atualmente eles são considerados como alimentos funcionais. O objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de substâncias bioativas com propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante, de cogumelos comestíveis das espécies *Pleurotus ostreatus* CC389, *Hericium erinaceus* CC29 *e Volvariella volvacea* CC94, em cultivo submerso. A atividade antibacteriana dos extratos e filtrados de cogumelos contra cepas de *Staphyloccocus aureus* sensíveis e resistentes a meticilina foi realizada pelo método de difusão em ágar. Para as análises de anti-inflamatórios dos extratos miceliais foram utilizados macrófagos peritoneais murinos ativados por LPS, e a expressão gênica das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-17 foi determinada por RT qPCR. A atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH e ABTS. Como resultados, os extratos etanólicos de micélios e filtrados de cultivos não apresentaram capacidade de inibição do crescimento de *S aureus* e MRSA, pelo método testado. Entretanto, os extratos miceliais de todas as espécies analisadas apresentaram atividade anti-inflamatória ao reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α, IL-1β e IL-6, e promover a expressão das anti-inflamatórias, IL-10 e IL-17, em macrófagos murinos estimulados com LPS, com significância estatística ($p < 0,05$). Além disso, foi mostrado a capacidade de produção de pigmentos pelo *V. volvacea*, em condições otimizadas de cultivo. Verificou-se que a agitação a 200 rpm e a concentração de glicose inicial no meio de cultura superior a 20 g/L promoveram os melhores índices de rendimento do pigmento. Os compostos identificados no pigmento foram fusarubina, dihidrofusarubina (naftoquinonas) e bostricoidina (antraquinona). Esse pigmento apresentou atividade antioxidante contra os radicais DPPH e ABTS, e também mostrou efetiva capacidade anti-inflamatória ao reduzir a superexpressão de TNF-α, IL-1β e IL-6 e induzir a produção IL-10 e IL-17, em macrófagos ativados ($p < 0,05$). Portanto, essas espécies de cogumelos comestíveis podem ser consideradas como fontes promissoras de compostos naturais biologicamente ativos de interesse farmacológico.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus. Hericium erinaceus. Volvariella volvacea*. Pigmento. Macrófagos. Citocinas. Radicais livres.

ABSTRACT

MENEZES, Bruna dos Santos. **Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities of bioactive compounds of edible mushrooms**. 129 f. 2017. Master's Dissertation – Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Edible mushrooms have been used historically in the oriental culture for their gastronomic and medicinal value. Several studies have proven their benefits to human health, and currently they are considered as functional foods. The objective of the present work was to investigate the production of bioactive substances with antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties of edible mushrooms of the species *Pleurotus ostreatus* CC389, *Hericium erinaceus* CC29 and *Volvariella volvacea* CC94, by submerged culture. The antibacterial activity of extracts and filtrates of mushrooms against strains of methicillin resistant and sensitive *Staphyloccocus aureus* was conducted by diffusion in agar method. For the anti-inflammatory analyzes of the mycelial extracts, murine peritoneal macrophages activated by LPS were used, and the expression of the cytokines TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 and IL-17 was determined by RT qPCR. The antioxidant activity was evaluated by the ability to sequester free radicals DPPH and ABTS. As results, ethanolic extracts of mycelia and culture filtrates did not show the ability to inhibit the growth of *S. aureus* and MRSA, by the method tested. However, mycelial extracts of all species analyzed showed anti-inflammatory activity by reducing the expression of proinflammatory cytokines, TNF-α, IL-1β and IL-6, and promoting the expression of anti-inflammatory, IL-10 and IL-17, in murine macrophages stimulated with LPS, with statistical significance ($p < 0.05$). In addition, the capacity of pigment production by *V. volvacea* was shown under optimized conditions of cultivation. Stirring at 200 rpm and the initial glucose concentration in the culture medium higher than 20 g/L were found to promote the best pigment yield indices. The compounds identified in the pigment were fusarubin, dihydrofusarubin (naphthoquinones) and bostricoidin (anthraquinone). This pigment showed antioxidant activity against DPPH and ABTS radicals and also showed an effective anti-inflammatory capacity by reducing the overexpression of TNF-α, IL-1β and IL-6 and inducing IL-10 and IL-17 production in macrophages activated ($p < 0.05$). Therefore, these species of edible mushrooms may be considered as promising sources of biologically active natural compounds of pharmacological interest.

Keywords: *Pleurotus ostreatus. Hericium erinaceus. Volvariella volvacea*. Pigment. Macrophages. Cytokines. Free radicals.

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-sulfônico
AINES:	Anti-inflamatórios não esteroidais
AP-1:	Proteína ativadora-1
BHI:	Brain Heart Infusion Medium
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPH:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI	Ionização por Electrospray
IL:	Interleucina
iNOS:	Óxido nítrico sintase
JNKs:	Proteína quinase c-Jun N-terminal
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1:	Proteína quimioatraente de monócitos-1
NF-κB:	Fator nuclear Kappa B
NO:	Óxido nítrico
PBS:	Tampão fosfato-salina
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
PGs:	Prostaglandinas
pH:	Potencial hidrogeniônico
RMN:	Ressonância magnética nuclear
RNA:	Ácido ribonucleico
RPM:	Rotação por minuto
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR:	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB:	Soro fetal bovino
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alfa
UV/Vis:	Ultravioleta / visível.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1
1. REFERENCIAL TEÓRICO 3
1.1 Biologia dos Fungos 3
1.2 Cultivo de cogumelos 5
1.2.1 Cogumelos comestíveis 6
1.2.1.1 Espécie *Pleurotus ostreatus* 8
1.2.1.2 Espécie *Hericium erinaceus* 9
1.2.1.3 Espécie *Volvariella volvacea* 10
1.2.2 Cultivo submerso de fungos 11
1.3 Compostos bioativos de cogumelos 12
1.3.1 Potencial farmacológico de polissacarídeos extraídos de fungos 13
1.3.2 Propriedades biológicas de pigmentos fúngicos 15
1.3.2.1 Betalaínas: Aspectos gerais 16
1.3.2.2 Carotenóides: Aspectos gerais 17
1.3.2.3 Quinonas: Química e propriedades farmacológicas 18
1.4 Aplicações Terapêuticas de Cogumelos 20
1.4.1 Atividade antimicrobiana 20
1.4.2 Atividade anti-inflamatória 21
1.4.3 Atividade antioxidante 23
2. OBJETIVOS 26
2.1 Objetivo Geral 26
2.2 Objetivos Específicos 26
3. MATERIAIS E MÉTODOS 27
3.1 Microrganismos 27
3.2 Metodologia Geral 27
3.2.1 Obtenção de Compostos Ativos. 28
3.2.1.1 Cultivo dos Cogumelos 28
3.2.1.2 Filtração e Extração de Micélios 28
3.2.1.3 Extração de pigmentos 28
3.2.2 Otimização da Produção de Pigmentos 29
3.2.2.1 Influência da agitação e tempo de fermentação na produção de pigmento 29
3.2.2.2 Influência da concentração inicial de glicose e tempo de fermentação na produção de pigmento 30

3.2.3 Atividade antibacteriana. 31
3.2.4 Atividade anti-inflamatória. 32
3.2.4.1 Isolamento de macrófagos 32
3.2.4.2 Estimulação dos macrófagos com LPS. 32
3.2.4.3 Expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias 33
3.2.4.5 Análises estatísticas 33
3.2.5 Atividade antioxidante 33
3.2.5.1 Radical DPPH 33
3.2.5.2 Radical ABTS 34
3.2.6 Citotoxicidade do Pigmento. 34
3.2.7 Identificação do Pigmento 34
3.2.7.1 Varredura por espectrofotometria UV/Vis e Infravermelho 34
3.2.7.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 35
3.2.7.3 Cromatografia Líquida de ultraeficiência acoplada ao Espectrômetro de Massa (UPLC-MS) 35
REFERÊNCIAS 36
CAPITULO 1 54
CAPITULO 2 75
4. APÊNDICE 116
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 117

INTRODUÇÃO

Cogumelo é o nome dado à frutificação de alguns fungos superiores pertencentes às classes de ascomicetos e basidiomicetos, sendo essa frutificação, a estrutura de reprodução sexuada destes organismos (GONÇALVES, 2012). Existe uma grande biodiversidade de cogumelos no mundo, sendo representada por espécies comestíveis e também por espécies que não apresentam características organolépticas agradáveis, podendo ser inclusive tóxicas (SOCCOL et al., 2016). Os cogumelos comestíveis são apreciados em culturas orientais e europeias e sua importância no mercado cresce a cada dia devido aos avanços tecnológicos. Com a modernização da produção, os sistemas de crescimento e cultivo têm sido aprimorados, resultando em aumento da qualidade, maior produtividade e redução de custos (EIRA & BUENO, 2013).

Os cogumelos comestíveis são alimentos de alta qualidade, com alto teor de proteínas, minerais e vitaminas, que podem beneficiar diretamente a saúde humana e a aptidão física. Cogumelos como o champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), shiitake (*Lentinula edodes*) e shimeji (*Pleurotus ostreatus*), são altamente nutritivos e podem ser comparados com ovos, leite e carne (GIRMAY et al., 2016). Além do seu valor nutricional, os cogumelos também são conhecidos como produtores de substâncias com propriedades medicinais (LEAL et al., 2013). Acredita-se que os cogumelos e outros fungos possam apresentar cerca de 126 atividades farmacológicas incluindo antitumoral, imunomoduladora, antioxidante, protetora cardiovascular, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, hepatoprotetora e antidiabética (WASSER, 2011; CAO et al, 2015; WANG et al, 2014; WU et al, 2014; PUNITHA & RAJASEKARAN, 2016; ZHAO et al. 2016a; SHARMA et al, 2016; ALEXANDRE et al., 2017; GOVINDARAJ et al., 2016; ZHANG et al, 2016).

O emprego de cogumelos medicinais para o preparo de fármacos requer a identificação e purificação de seus compostos ativos. No Brasil, observa-se um crescimento no número de pesquisadores e de laboratórios envolvidos em pesquisa, desde o levantamento da biodiversidade e isolamento de novas espécies até a avaliação de propriedades farmacológicas, identificação e caracterização molecular de princípios ativos (SOCCOL *et al.,* 2016).

Os componentes ativos podem ser isolados do corpo de frutificação (basidioma) e da estrutura vegetativa (micélio) dos cogumelos. No entanto, devido ao grande tempo

e espaço necessário para desenvolvimento do basidioma durante a frutificação, aumentou-se o interesse na produção do micélio sob fermentação submersa (RUBEL, 2006). Esse processo fermentativo possui uma série de vantagens em relação ao cultivo semissólido, como um melhor controle de parâmetros fisicoquímicos, bem como o potencial de alta produção de biomassa em um espaço compacto, menor tempo de crescimento e independência da sazonalidade. Assim, a fermentação submersa se revelou uma alternativa promissora para a produção de elementos funcionais e nutricionais a nível industrial (PAPASPYRIDI, et al., 2012).

Compostos bioativos de interesse industrial isolados em cogumelos incluem polissacarídeos, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, aminoácidos, vitaminas e pigmentos antioxidantes (SHARMA & GAUTAM, 2017). Algumas espécies são produtoras pigmentos, como a *Amanita muscaria*, que produz betalaínas (STINTZINGA & SCHLIEMANN, 2007). Em *Cantharellus cibarius* foram identificados pigmentos carotenóides (BARROS et al., 2008), e em *Cortinarius purpurascens* foram encontrados pigmentos da classe das quinonas (BAI et al., 2013). Entretanto, até o momento, nenhum registro foi documentado na literatura sobre a produção de pigmentos pela espécie *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer.

Diante das perspectivas que estão emergindo da biotecnologia de macromicetos no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos, o presente trabalho propôs avaliar as espécies de cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) P. Kummer, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *e V. volvacea*, quanto à produção de substâncias bioativas, com propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, sendo esses compostos extraídos dos micélios desses fungos e dos meios de cultura fermentados. Além disso, o presente trabalho investigou a produção de pigmentos por *V. volvacea* partir do cultivo submerso, utilizando o planejamento experimental Doehlert para determinar parâmetros físico-químicos que potencializassem a produção. Foram analisadas a composição química do pigmento e sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Biologia dos Fungos

Os fungos desempenham um papel fundamental na sustentação da vida na Terra. Eles exercem diversos papéis ecológicos, dirigindo o ciclo do carbono nos solos e medeiam a nutrição mineral das plantas e de carbono para outros organismos. (TEDERSOO, et al, 2014). Os fungos verdadeiros foram agrupados em um reino a parte, o Reino *Mycetae*, também chamado Reino *Fungi*. Eles podem ser definidos como microrganismos eucariontes, aclorofilados e heterótrofos. Sua estrutura vegetativa pode ser unicelular ou filamentosa, formada por hifas, que em conjunto formam o micélio. As paredes celulares fúngicas são constituídas por quitina, quitosana ou polissacarídeos. E eles apresentam reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos. (KIRK et al. 2008; RAGHUKUMAR, 2017).

Por muito tempo, os fungos foram comparados a vegetais, no entanto, são organismos que não possuem clorofila em suas células e, portanto, não realizam fotossíntese. Assim, eles dependem de outros organismos para a sua nutrição, absorvendo materiais orgânicos no qual residem (SILVA & COELHO, 2006). A absorção é realizada através da membrana celular em solução aquosa, após a digestão enzimática dos substratos, que libera constituintes mais simples capazes de atravessar para o interior das hifas. Este processo pode ocorrer de diferentes formas: em saprobiose, por mobilização de nutrientes a partir de matéria orgânica inanimada, proveniente de organismos mortos; em simbiose, por associação benéfica com outro organismo vivo, tal como as micorrizas estabelecidas entre fungos e raízes; ou em antagonismo, sendo parasita numa relação em que apenas o fungo é privilegiado, sendo prejudicado o hospedeiro (MODESTO & FERREIRA, 2010).

Cerca de 100.000 espécies de fungos foram descritas, mas a extensão real da diversidade fúngica global é estimada em 0,8 milhões a 5,1 milhões de espécies. (BLACKWELL, 2011). Atualmente, o Reino *Mycetae* é constituído pelos filos *Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Kickxellomycota, Entomophthoromycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Ascomycota* e *Basidiomycota* (RAGHUKUMAR, 2017). Os fungos pertencentes aos filos *Ascomycota* (cerca de 65.000 espécies) e *Basidiomycota* (cerca de 30.000 espécies), são considerados fungos

superiores. Eles são economicamente importantes, podendo ser utilizados na alimentação humana e medicamentos, além de serem úteis em processos de biorremediação (GESSNER et al., 2010; BLACKWELL, 2011). A classe *Basidiomycetes* (basidiomicetos) agrupa os seres mais evoluídos do Filo *Basidiomycota*. Estes fungos são popularmente conhecidos como cogumelos. Eles desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes e manutenção dos ecossistemas, atuando na degradação da matéria orgânica. Realizam a bioconversão, transformando os resíduos lignocelulósicos em alimento com alto valor protéico e possuem compostos bioativos com propriedades medicinais reconhecidas pelas culturas orientais (GUILLAMÓN et al, 2010; JACOB et al, 2011).

O cogumelo é o nome comum dado à frutificação de fungos superiores pertencentes às classes de ascomicetos e basidiomicetos, sendo essa frutificação a estrutura de reprodução sexuada destes organismos (GONÇALVES, 2012). As estruturas básicas de um cogumelo basidiomiceto é esquematizado na Figura 1.

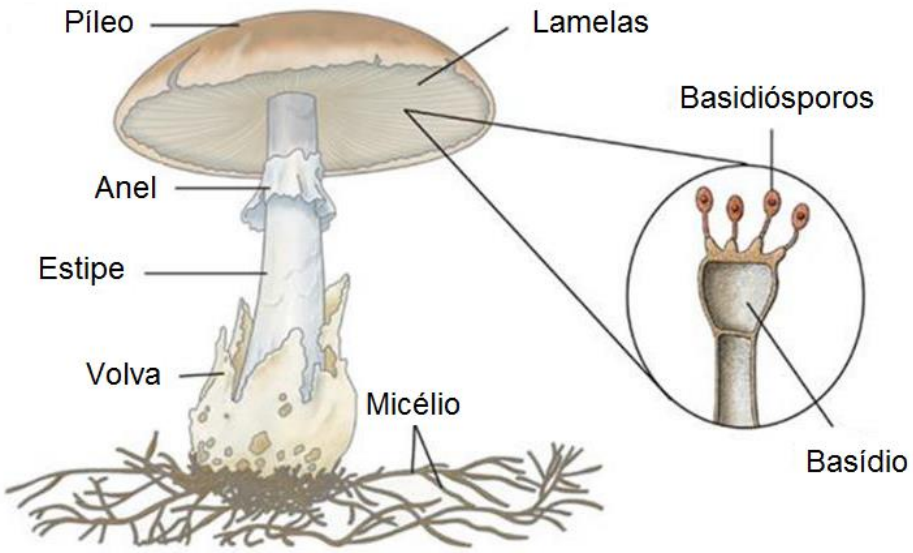

Figura 1. Figura esquemática das principais estruturas dos cogumelos. *Fonte: Adaptação de Menezes (2014).*

1.2 Cultivo de cogumelos

A produção industrial de cogumelos, na sua maioria, diz respeito a fungos saprófitas devido à facilidade da criação de condições de produção idênticas às que se encontram na natureza. Por isso, é necessária a investigação de técnicas e ferramentas de cultura e produção em ambiente controlado, de modo a permitir a colheita de cogumelos com características excelentes, em qualquer época do ano. (RAMOS et al., 2015). Na natureza, os cogumelos saprófitos necessitam de matéria orgânica para decompor, desenvolvendo-se principalmente em madeira morta. Portanto, estes podem ser cultivados num grande leque de materiais residuais que contêm lignocelulose. Esse material no qual o micélio dos cogumelos se desenvolve é chamado de substrato (OEI & NIEUWENHUIJZEN, 2006).

O preparo do substrato de cultivo tem como objetivo reproduzir, em condições artificiais, um ambiente que potencialize a transformação da biomassa vegetal em biomassa fúngica (cogumelos). Para que isso ocorra de forma eficiente, é necessário atender às demandas nutricionais do fungo a ser cultivado, e esta demanda varia entre as espécies de cogumelos (VIEIRA, 2016). De modo geral, o substrato de cultivo tem duas variações, podendo ser substrato axênico, que é estéril, ou seja, somente o fungo cultivado utilizará os nutrientes em condições assépticas; e substrato compostado, que é seletivo, ou seja, outros microrganismos crescerão no substrato de forma simbiótica e sinérgica com o cogumelo cultivado (CHANG & MILES, 2004; STAMETS, 2005).

O processo de cultivo envolve um conjunto de etapas (produção de micélio puro, produção do inóculo, preparação do substrato, inoculação, incubação e frutificação) que dependem da espécie a cultivar e devem ser realizadas com eficácia, pois influenciam a qualidade e a produtividade do cogumelo (SÁNCHEZ, 2010). Depois da inoculação do cogumelo ao substrato, inicia-se a fase de incubação em condições de umidade e temperatura controladas. Na maioria das espécies, a temperatura ótima para a colonização micelial é de, aproximadamente, 25°C. Durante o desenvolvimento do micélio no substrato, chamada de colonização micelial, o fungo utiliza os nutrientes disponíveis no meio (OEI & NIEUWENHUIJZEN, 2006). Quando alguns desses nutrientes se esgotam, ou quando há uma mudança de temperatura, o micélio atinge outra fase, a frutificação, que ocorre também em condições de umidade, temperatura e luz controladas (FERREIRA, 2014).

1.2.1 Cogumelos comestíveis

Os cogumelos comestíveis são alimentos de alta qualidade, que enriquecem a dieta com proteínas, minerais e vitaminas, que podem beneficiar diretamente a saúde humana e a aptidão física. Eles são altamente nutritivos e podem ser comparados com ovos, leite e carne. Os compostos bioativos extraídos de cogumelos medicinais aumentam o sistema imunológico humano e melhoram a qualidade de vida. Além disso, o conteúdo de aminoácidos essenciais no cogumelo é elevado e próximo da necessidade do corpo humano (GIRMAY et al, 2016).

Diversas espécies de cogumelos têm sido utilizadas há séculos na culinária e medicina oriental. São conhecidas aproximadamente 2.000 espécies de cogumelos comestíveis, mas apenas cerca de vinte e cinco destas são cultivadas comercialmente (COUTINHO, 2008). Dentre elas, se destaca o *Agaricus bisporus*, conhecido como champignon de Paris, que é o cogumelo mais cultivado no mundo. As espécies *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus spp* (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) também têm sido amplamente cultivadas em escala industrial (SANCHEZ, 2004). O comércio do champignon de Paris responde por cerca de 38% do mercado global, seguida pelas espécies do gênero *pleurotus*, como o shimeji, que responde por cerca 25% deste mercado e em terceiro lugar o Shiitake, com uma comercialização em torno dos 10%.

A produção mundial de cogumelos aumentou mais de 60% nos últimos 20 anos, sendo os maiores produtores de cogumelos comestíveis a China, Japão, Estados Unidos, Holanda, Polônia e Espanha. (FAOSTAT, 2014). De acordo com o relatório Zion Market Research (2016), o mercado mundial de cogumelos foi avaliado em mais de US $ 35,08 bilhões em 2015, deverá chegar acima de US $ 59,48 bilhões em 2021 e prevê crescimento em uma CAGR (Taxa de Crescimento Anual Composta) ligeiramente acima de 9,2% entre 2016 e 2021. A indústria chinesa de cogumelos se desenvolveu rapidamente graças à reforma econômica chinesa. De 1978 a 2013, a produção chinesa de cogumelos frescos aumentou de 400 mil toneladas para 31.697 milhões de toneladas/ano (LEE, 2016). Nos Estados Unidos, o volume de vendas da safra 2015-2016 de cogumelos totalizou 946 milhões de libras (aproximadamente 429 mil toneladas), arrecadando um valor de US $ 1,19 bilhão. O preço médio relatado foi de US $ 1,26 por libra (U$ 2,78/Kg) (USDA, 2016). O Brasil segue a mesma ordem de

cultivo e consumo mundial, e sua produção gira em torno de 15 mil toneladas/ano. O champignon de Paris é responsável pela quase totalidade da produção nacional (INPA, 2013; GONÇALVES, 2012). O cogumelo *Agaricus Blazei*, conhecido como o Cogumelo do Sol, e o *Ganoderma lucidum*, o Reishi, também tem sido amplamente cultivados no Brasil para exploração de suas propriedades medicinais, principalmente imunoterapêuticas. Normalmente eles são comercializados em forma de pó, sendo seu consumo realizado por meio de cápsulas (BETT & PERONDI, 2011). Quando se compara o consumo de cogumelos comestíveis no Brasil ao de outros países europeus e asiáticos, pode-se perceber que este é um alimento pouco consumido no País (BEZERRA, 2014). A falta de tradição e o preço relativamente elevado dos cogumelos no mercado brasileiro são os fatores determinantes nessa realidade (MARTOS, 2009).

Pesquisas que visam o aprimoramento de técnicas para proporcionar a redução dos custos da produção, e consequente aumento do consumo, são essenciais para contribuir para ascensão deste produto no mercado brasileiro. Uma estratégia para reduzir as despesas é a utilização de substratos mais baratos para o cultivo de cogumelos (CEITA et al., 2009). É sugerido o aproveitamento de resíduos da agricultura, pecuária e agroindústria. Alguns exemplos são o esterco (bovino e equino), e também a palha e resíduos do trigo, arroz, milho, algodão, madeira, dentre outros. A serragem é o componente mais comum nos substratos, pois são ricos em nitrogênio e em outros nutrientes. Palhas de capim e bagaço de cana-de-açúcar são ricos em carbono e também são materiais que podem ser utilizados (EIRA E BUENO, 2013). Adicionalmente, substratos alternativos, tais como fibras de casca de coco e bagaço de mandioca, entre outros resíduos próprios de cada região do país, têm sido avaliados. Os resultados são significativos e mostram uma alta produtividade aliada ao baixo custo. A utilização destas novas estratégias de cultivo potencializa este mercado promissor (CEITA et al, 2009). Após o cultivo e a coleta dos cogumelos, o substrato composto por resíduos agrícolas pode ser reaproveitado em ração animal e compostagem de solo, pois o resíduo permanece com alto nível nutricional. Essas possibilidades mostram a contribuição dos cogumelos na redução de impactos ambientais geradas pelos resíduos, por meio da biorremediação (GODOY, 2008).

1.2.1.1 Espécie *Pleurotus ostreatus*

O cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) P. Kummer pertence ao Reino Fungi, Divisão *Basidiomycota*, Classe *Homobasidiomycetes*, Ordem *Agaricales*, Família *Pleurotaceae* e gênero *Pleurotus* (KIRK et al., 2011). Em latim, "ostreatus" significa "ostra", referindo-se ao formato do píleo, semelhante a uma ostra. Popularmente, a espécie é conhecida como "oyster mushroom" (em inglês, derivação do nome cientifico), cogumelo ostra (em português), ping Gu (em chinês, que significa "cogumelo plano"), hiratake (em japonês significa "cogumelo plano") ou shimeji (em japonês significa "boa aparência") (VIEIRA, 2016).

P. ostreatus é um cogumelo cosmopolita, encontrado naturalmente em florestas tropicais e subtropicais. É um fungo saprófito, que degradam madeira e causam a podridão branca, por isso são conhecidos como "White-rot fungi" (WRF) (SOUZA et al., 2006). É o segundo cogumelo comestível mais consumido em todo o mundo, e pode ser facilmente cultivado em uma variedade de substratos lignocelulósicos, devido à sua capacidade de degradar celulose, lignina e hemicelulose através da ação de sistemas enzimáticos oxidativos e hidrolíticos complexos (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2016).

No Brasil, o *Pleurotus ostreatus* é comercializado como shimeji-preto, quando colhido pequeno e coloração variando do marrom ao cinza escuro, como shimeji-branco, quando colhido pequeno e coloração cinza-claro e como Hiratake, quando colhido grande, diâmetro do píleo variando entre 3-6 cm e cor cinza-claro (Figura 2). Essas variações no tamanho do píleo e da sua coloração é da soma de fatores genéticos (linhagens) e métodos de cultivo do cogumelo (baixa temperatura de cultivo e tipo de substrato) (VIEIRA, 2016).

O *Pleurotus ostreatus* possui um grande destaque comercial devido a sua gastronomia, propriedades nutricionais e medicinais. Esse cogumelo tem alto valor nutricional, sendo uma fonte importante de proteína, carboidratos, vitaminas, cálcio e ferro (DUNDAR et al., 2009). Segundo Li e colaboradores (2015), a composição do *P. ostreatus* cultivado em casca de algodão (substrato popular para produção da espécie em Shanxi, China) é de 19,73% de fibra bruta, 2,77 % de lipídeos, 38,76% de açúcares totais, 23,80% de proteína bruta e 9,59% de cinzas.

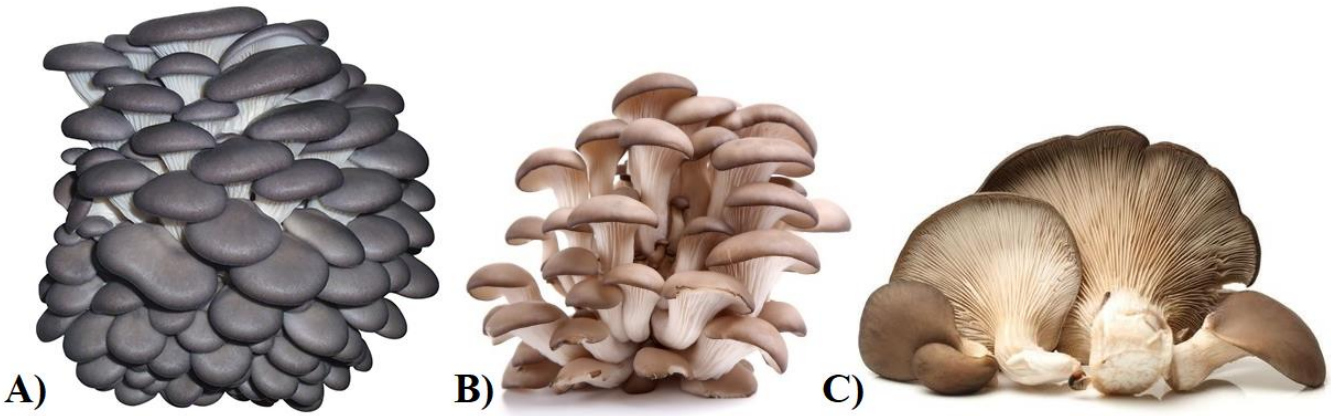

Figura 2. Variedades do cogumelo *Pleurotus ostreatus.***A)** Shimeji preto. **B)** Shimeji branco. **C)** Hiratake. *Fontes: Fungi Perfecti (2017); Henry (2010); Mushroom Nutrition (2017).*

1.2.1.2 Espécie *Hericium erinaceus*

O cogumelo *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., conhecido como "juba de leão" (Figura 3), apresenta a taxonomia descrito por Persoon em 1979: Reino *Fungi*, Divisão *Basidiomycota*, Subdivisão *Agaricomycotina*, Classe *Agaricomycetes*, Ordem *Russulales*, Família *Hericiaceae* e Gênero *Hericium* (SOKÓŁ *et al*, 2016). O cogumelo da juba do leão é predominantemente saprófito, mas, ocasionalmente, também pode ser um parasita de árvores. Este cogumelo é encontrado principalmente em países do Leste Asiático e tem uma longa história de uso na medicina tradicional chinesa, com efeitos benéficos para os rins, fígado, baço, coração e estômago (HIWATASHI, *et al.*, 2010).

O *H. erinaceus* é rico em constituintes ativos como diterpenoides, esteróides, polissacarídeos e outros elementos funcionais, que exercem uma infinidade de efeitos biológicos como agentes imunomoduladores e hipoglicêmicos e anticâncer (DILING et al., 2017; SHENG et al., 2017; KIM et al., 2014; LI et al., 2014).

Duas classes específicas de componentes químicos foram identificadas no *H. erinaceus*, hericenonas e erinacinas, e suas atividades biológicas são bem conhecidas. Essas substâncias e alguns compostos aromáticos, isolados no corpo de frutificação e micélio, são substâncias neuroativas, que podem induzir a biossíntese de NGF (Fator de Crescimento Nervoso) em células nervosas *in vitro*. Portanto, são substâncias com alto potencial para tratar doenças nervosas, como o Alzheimer. Além disso, exibem

atividade antiproliferativa contra várias linhagens celulares do câncer (ZHANG, et al., 2015).

Figura 3. Cogumelo *Hericium erinaceus. Fonte: Rainbow seed (2017).*

1.2.1.3 Espécie *Volvariella volvacea*

A espécie *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer 1951, pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Basidiomycota*, Classe *Agaricomycetes*, Ordem *Agaricales*, Família *Pluteacea* e Gênero *Volvariella* (EOL, 2013). Essa espécie é um fungo comestível, também conhecida como o cogumelo de palha, que cresce em regiões tropicais e subtropicais, pois necessita de temperaturas elevadas (28-35°C) para crescimento vegetativo e frutificação (Figura 4). O cogumelo é amplamente cultivado em escala industrial em muitas partes da Ásia, usando resíduos agrícolas (palha de arroz, resíduos de algodão) como substratos de crescimento (BAO et al., 2013). O *V. volvacea* é o fungo comestível favorito no Sudeste Asiático por seu delicioso sabor e valor nutricional, além disso, o seu ciclo de produção é curto e custo de produção é baixo. (ZHANG *et al*, 2011).

O *V. volvacea* é uma rica fonte de proteína, fibras (quitina), vitaminas (vitamina C, riboflavina, biotina e tiamina), gorduras (5,7%), carboidratos (56,8%), aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, minerais essenciais (potássio, sódio e fósforo) e tem baixos valores caloríficos. Além disso, é amplamente utilizado no sistema medicinal tradicional da Índia, e inúmeras investigações científicas tem comprovado as atividades terapêuticas deste cogumelo (ROY et al., 2014). Muitos estudos têm investigado os atributos nutracêuticos e as atividades biológicas do *V. volvacea*. Vários componentes isolados do corpo de frutificação e do micélio deste cogumelo tem sido

relatados com efeitos cardioprotetor (PUNITHA & RAJASEKARAN, 2016), antimicrobiano (SILVA et al., 2010), antitumorais e antioxidantes (MATHEW et al., 2008), e proteínas anticâncer (WU, et al., 2011).

Figura 4. Cogumelo *Volvariella volvacea. Fonte: International Society for Mushroom Science* (2017).

1.2.2 Cultivo submerso de fungos

As fermentações submersas e em estado semissólido emergiram como as técnicas mais adequadas para a produção industrial de biomassa fúngica e seus metabólitos. No entanto, a aplicação industrial de compostos orgânicos de cogumelos pode ser difícil em alguns casos. A produção do corpo de frutificação para fins comerciais é um processo demorado e de trabalho intensivo, com resultados incertos devido à grande possibilidade de contaminação e dificuldades no controle dos parâmetros do processo (DUVNJAK et al., 2016).

Assim, o cultivo submerso de cogumelos comestíveis e medicinais tem recebido crescente atenção em todo o mundo. O processo é visto como uma alternativa promissora para a produção eficiente de biomassa e metabolitos valiosos a nível industrial, uma vez que é mais rápido, facilmente controlado, mais eficiente e de maior aplicabilidade em indústrias de alimentos e medicamento (PAPASPYRIDI, et al., 2012).

Para se obter uma alta produtividade de compostos com atividades biológicas e farmacológicas desejados, é essencial otimizar as condições de fermentação no biorreator, que precisam se adequar às necessidades específicas dos microrganismos. Parâmetros, tais como, fontes de carbono, relação C/N, pH inicial e temperatura,

intensidade de agitação e taxa de aeração, devem ser avaliados (GONCIARZ et al, 2016; VIEIRA et al., 2008).

Atli e coloboradores, em 2013, utilizaram desenhos experimentais estatísticos para otimizar produção de lovastatina, um fármaco redutor de colesterol, pelo cogumelo *Pleurotus ostreatus* sob fermentação submersa. Em condições otimizadas de cultura, a produção máxima de lovastatina foi de 114.82 mg/L, quantidade 50 vezes maior do que a produzida em condições não otimizadas em fermentação submersa pelo mesmo fungo. Essa produção foi alcançada após 6 dias de cultivo, com a concentração inicial de 30 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, pH 6, a 28° C e 200 rpm.

Em 2015, Wolters e colaboradores desenvolveram um meio de cultivo adequado para otimizar a produção do metabolito secundário erinacina C do *H. erinaceus*, que tem alto potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Eles observaram que os componentes do meio de cultura (5,0 g/L de aveia, 1,5 g/L de carbonato de cálcio e 0,5 g/L de Edamin® K) são cruciais para uma maior produção de erinacina C, que ocorre principalmente nos primeiros seis dias de cultivo. No entanto, diferentes razões de C/N não afetam a sua biossíntese. A quantidade obtida de erinacina C foi de 2,73 g/L, produção dez vezes superior aos dados previamente publicados.

Para o cogumelo *V. volvacea*, variações na relação C/N tem grande impacto na sua produção metabólica. Diamantopoulou e colaboradores (2016) mostraram que o aumento da concentração inicial de glicose no meio de cultura resulta em um acréscimo visível da biomassa e na produção de polissacarídeos intracelulares pelo cogumelo.

1.3 Compostos bioativos de cogumelos

Os cogumelos não só podem converter os resíduos de lignocelulósicos em alimentos humanos, mas também podem produzir produtos nutracêuticos notáveis, que têm muitos benefícios para a saúde (GIRMAY et al, 2016). Eles contêm muitos compostos bioativos diferentes, que apresentam propriedades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas. Os nutracêuticos analisados nesses cogumelos são polissacarídeos, fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas imunomoduladoras, aminoácidos, cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e pigmentos antioxidantes (SHARMA & GAUTAM, 2017).

1.3.1 Potencial farmacológico de polissacarídeos extraídos de fungos

Um grande número de polissacarídeos extracelulares (EPS) e polissacarídeos intracelulares (IPSs) com funções biológicas interessantes foram isolados de fungos, especialmente de cogumelos (MONTOYA et al., 2013). O processo de produção de EPS é mais simples em relação ao IPS, uma vez que sua recuperação é mais fácil e não requer múltiplas etapas de extração, sendo mais atrativa para a produção em escala industrial (RUBEL, 2006). Assim, os EPS possuem grande potencial para serem aplicados em indústrias alimentares, farmacêuticas e outras como emulsionantes, estabilizadores, aglutinantes, agentes gelificantes, lubrificantes e agentes espessantes (JAYAKUMAR et al., 2010).

Além disso, devido as suas potentes atividades biológicas e farmacológicas, incluindo efeitos antitumorais, imunoreguladoras e hipoglicêmicas, os polissacarídeos de cogumelos tornaram-se uma área de pesquisa importante na descoberta de novos medicamentos. Os polissacarídeos isolados de diferentes cogumelos possuem composição própria com propriedades específicas. As diferenças na composição química, no tipo de ligação glicosídica e no grau de ramificação influenciam as estruturas secundárias e terciárias das cadeias simples e sua montagem macromolecular, determinando as suas propriedades físicas e as suas funções fisiológicas (CAO et al. 2013). Vários registros na literatura podem ser encontrados quanto à bioatividades de polissacarídeos de cogumelos (tabela 1).

Muitas das ações farmacológicas atribuídas aos compostos bioativos extraídos de cogumelos são constituídos de polissacarídeos de ligação β-glicosídica, como os β-glucanos, que estimulam uma resposta do sistema imunológico (GUILLAMÓN *et al*, 2010). Um β-1,6-glucano extraído do cogumelo *Pleurotus citrinopileatus* estimulou os macrófagos THP-1 a secretar níveis significativos de TNF. Além disso, as expressões de mRNA de TNF e IL-1β foram significativamente aprimoradas pelo tratamento com esse polissacarídeo. Esses dados confirmam que esse glucano possui efeitos proinflamatórios nas células da imunidade inata (MINATO et al., 2017).

Tabela 1. Estudos das propriedades farmacológicas de polissacarídeos extraídos de cogumelos.

Atividade	Espécie	Referência
Antioxidante	*Agaricus blazei*	Wu et al, 2014
	Agaricus brasiliensis	Mao et al, 2014
	Entoloma lividoalbum	Maity et al, 2015
	Hohenbuehelia serotina	Li & Wang, 2016
	Macrolepiota dolichaula	Samanta et al, 2015
	Phellinus pini	Yang et al, 2015
	Pholiota nameko	Zhang et al, 2015
	Tricholoma mongolicum	Zhao et al, 2016b
	Tylopilus ballouii	Lima et al, 2016
Anti-hipercolesterolêmico	*Auricularia polytricha*	Zhao et al, 2015
Hiperglicêmico	*Phellinus linteus*	Zhao et al, 2014
Antidiabético	*Pleurotus ostreatus*	Zhang et al, 2016
Antimicrobiana	*Ganoderma lucidum*	Wan-Mohtar et al, 2016
	Lentinula edodes	Sharma et al, 2016
	Pleurotus eryngii	Li & Shah, 2014
Imunomoduladora	*Boletus edulis*	Wang et al, 2014
	Macrolepiota dolichaula	Samanta et al, 2015
Anti-inflamatória	*Pleurotus sajor-caju*	Silveira et al, 2015
	Tylopilus ballouii	Lima et al, 2016
Antitumoral	*Pleurotus ostreatus*	Cao et al, 2015
	Boletus edulis	Zhao et al, 2015
	Grifola frondosa	Mao et al, 2015
	Pholiota adiposa	Hu et al, 2012
	Pleurotus eryngii	Ma et al, 2014
Antienvelhecimento	*Lentinus edodes*	Wang et al, 2015

Embora acredita-se que os β-glucanos sejam os principais polissacarídeos bioativos de cogumelos, outros tipos de polissacarídeos (homo e heteropolissacarídeos) de cogumelos também possuem propriedades biológicas (FRIEDMAN, 2016). SU et al. (2013) extraíram e isolaram polissacarídeos caldo de fermentação do cogumelo *Morchella cônica*. A partir de análises de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), espectro infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), o EPS foi identificado como homopolissacarídeo manana (α-1→6-D-Man), com um peso molecular médio de aproximadamente 81,2 kDa. A manana extraída do *M. cônica* foi capaz de modular significativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos e promover a proliferação de esplenócitos, podendo atuar como um potente agente imunomodulador.

Um EPS produzido por *Pleurotus sajor-caju* foi purificado e caracterizado por GC-MS (cromatografia gasosa com espectrômetro de massa) e espectroscopia de RMN. As análises mostraram que se tratava de um heteropolissacarídeo manogalactano, composto por manose (37,0%), galactose (39,7%) e 3-O-metil-galactose (23,3%). Esse manogalactano foi capaz de reduzir a nocicepção, *in vivo*, nos testes de contorção e formalina. Ele também foi capaz de reduzir o edema induzido por carragenina. Os resultados indicam que o manogalactano extraído de *P. sajor-caju* pode ser um agente antinociceptivo e anti-inflamatório eficaz (SILVEIRA et al., 2015).

1.3.2 Propriedades biológicas de pigmentos fúngicos

Os cogumelos não contêm os pigmentos que são dominantes em plantas, como clorofilas. Algumas espécies são produtores de betalaínas, carotenóides e outros terpenóides. A maioria dos pigmentos presentes em fungos superiores são quinonas ou estruturas conjugadas similares, que inclui as benzoquinonas simples, terfenilquinonas, ácidos pulvínicos e derivados, benzotropolonas e compostos de origem de ácidos graxos (VELÍŠEK & CEJPEK, 2011). As naftoquinonas, que são membros importantes da família das quinonas, também têm sido encontradas em basidiomiceto (STODŮLKOVÁ et al., 2015). Estas substâncias são considerados estruturas privilegiadas em química medicinal devido às suas atividades biológicas e propriedades estruturais (CONSTANTINO & BARLOCCO, 2006).

1.3.2.1 Betalaínas: Aspectos gerais

As betalaínas são pigmentos nitrogenados, atóxicos, N-heterocíclicos, hidrosolúvel, que substituem as antocianinas em algumas famílias da ordem Caryophyllales de plantas Eudicotiledôneas, incluindo a beterraba, o espinafre, algumas espécies de cactos (VOLP et al., 2009; HATLESTAD et al., 2012). Esses pigmentos também foram identificados em espécies de fungos superiores, como *Amanita muscaria* (STINTZINGA & SCHLIEMANN, 2007).

As betalaínas naturais são divididas em duas classes, as betaxantinas e betacianinas, sendo ambas derivadas de um precursor comum, o ácido betalâmico (Figura 5). As betaxantinas são resultados da condensação de ácido betalâmico com aminoácidos ou aminas, e apresentam uma coloração quase sempre amarelada (xanthos = amarelo). As betacianinas são produtos da ligação entre o ácido betalâmico e derivados do ciclo-Dopa (3,4-dihidroxifenilalanina), e apresentam uma coloração intensa, que varia do vermelho ao violeta (kyaneos = azul) (HERBACH et al., 2006; HATLESTAD et al., 2012). Betalaínas são pigmentos importantes para a indústria de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Elas exibem atividades anti-inflamatórias, antifúngicas e anticancerígenas. Além disso, os grupos fenólico e aminos conferem esses pigmentos propriedades de redução e estabilização de radicais, tornando-os potentes antioxidantes (SÁNCHEZ et al., 2017).

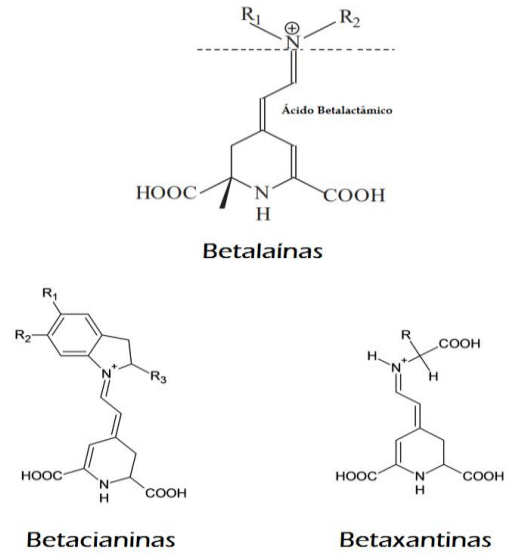

Figura 5. Estruturas química geral das betalaínas; E as estruturas genérica das duas classes, as betacianinas e betaxantinas. *Fonte: Adaptado de Volp et al. (2009).*

1.3.2.2 Carotenóides: Aspectos gerais

Carotenóides são pigmentos lipossolúveis naturais de cor amarela a vermelha, e a sua biossíntese ocorre em bactérias, fungos, algas e plantas. Sua função biológica é proteger as células contra a luz (fotoprotetores) e oxigênio (antioxidantes). Foram identificados mais de 600 carotenóides na natureza, no entanto, apenas cerca de 40 estão presentes em uma dieta humana típica. Cerca de 90% dos carotenóides encontrados na dieta e no corpo humano são β-caroteno, α-caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (RIBEIRO et al., 2011).

Os carotenoides pertencem à família dos terpenóides, e a maioria possui um esqueleto de 40 carbonos, formando uma longa cadeia linear que pode conter entre 2 a 15 duplas ligações conjugadas (Figura 6). As diferenças entre os carotenóides ocorrem por modificações na estrutura base por ciclização dos grupos terminais e por introdução de grupos funcionais contendo oxigênio, conferindo-lhe assim as suas cores caraterísticas e propriedades antioxidantes (SILVA, 2015).

Beta-caroteno é um hidrocarboneto altamente lipofílico, que apresenta onze duplas ligações conjugadas, que é responsável pela absorção de luz (cromóforo) e pela sua coloração. Trata-se do carotenoide mais abundante nos alimentos, presente em muitas plantas e frutas, como cenouras, abóboras ou batatas-doces. Além disso, por ser um pigmento vermelho-alaranjado fortemente colorido, é amplamente utilizado como corante em alimentos e bebidas. O β-caroteno apresenta a maior atividade de pró-vitamina A (percursor do retinol) em mamíferos entre os carotenoides, e apresenta uma intensa ação antioxidante (SOUZA et al., 2012; TÁTRAALJAI et al., 2014).

Existem mais de 200 espécies de fungos relatadas para a produção de carotenos, sendo encontrados em zigomicetos da ordem Mucorales e em ascomicetos como *Aspergillus, Cercospora, Penicillium*. A produção de carotenos também tem sido relatada nos gêneros basidiomicetos, como *Rhodosporidium, Sclerotium, Sclerotinia, Sporidiobolus e Ustilago* (RAO et al., 2017; AVALOS & LIMON, 2015).

Barros e coloboradores (2008) avaliaram a composição de nutrientes e nutracêuticos, incluindo o teor de carotenóides, em cogumelos selvagens e comerciais. Diversas espécies foram avaliadas, como algumas do gênero *Agaricus ssp., Boletus edulis, Calocybe gambosa, Marasmius oreades, Cantharellus cibarius e Craterellus cornucopioides*. Foram identificadas em todas as espécies estudas a presença de β-

caroteno e licopeno. No entanto, os cogumelos *C. cibarius e C. cornucopioides* se destacaram, apresentando quantidades mais elevadas de β-caroteno (13.56 e 12.77 µg/g) licopeno (5.06 e 5.13 µg/g, respectivamente).

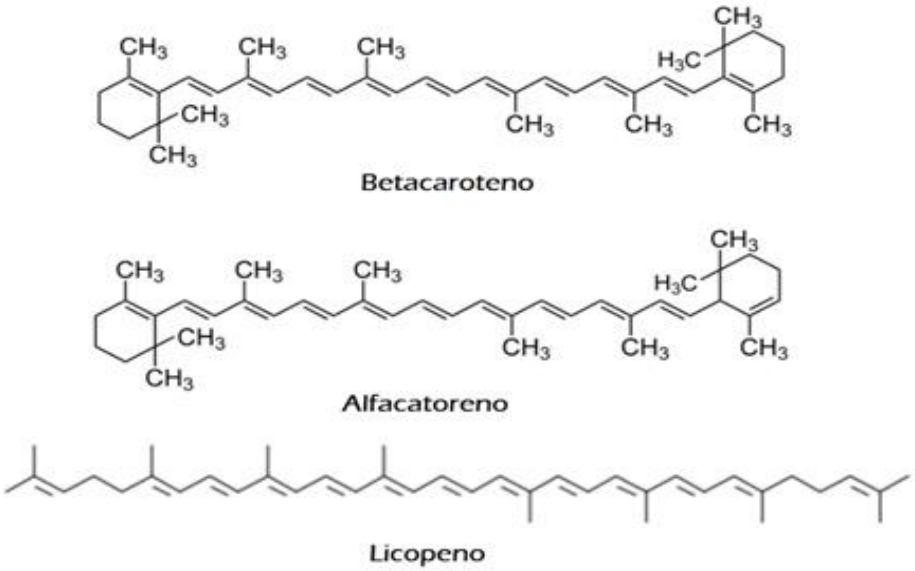

Figura 6. Estruturas moleculares dos principais catonenóides presentes na dieta humana. *Fonte: Adaptação Nascimento (2006).*

1.3.2.3 Quinonas: Química e propriedades farmacológicas

As quinonas são um grupo de substâncias orgânicas geralmente coloridas e semivoláteis, onipresentes na natureza e pertencentes à classe dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO) (Figura 7) (SOUSA et al., 2016). As quinonas possuem propriedades químicas que lhes permitem interagir com alvos biológicos formando ligações covalentes e atuando como agentes de transferência de elétrons em reações de oxidação-redução. As quinonas são altamente reativas e interagem com sistemas biológicos para promover ações inflamatórias ou anti-inflamatórias, anticancerígenas e para induzir toxicidades (KUMAGAI et al. 2012).

As quinonas são compostos fenólicos que variam desde derivados monoméricos até complexas formas poliméricas. As quinonas coloridas são encontradas nos troncos das árvores e são geralmente amargas e tóxicas. Historicamente, alguns pigmentos à base de quinona foram utilizados no tingimento de tecidos. Como exemplo, existem as naftoquinonas amarelas, vermelhas e marrons da planta *Lawsonia inermis*, que produz o

corante cosmético henna, como a lawsone (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) (SCHIOZER & BARATA, 2007).

As naftoquinonas são uma grande classe de metabólitos secundários, derivadas do naftaleno, encontrado em fungos, bactérias e plantas superiores. Elas apresentam uma variedade de estruturas químicas que exibem diversas atividades biológicas. As 1,4-naftoquinonas têm sido usadas como extratos brutos ou como compostos manipulados pela indústria farmacêutica (SOARES et al., 2017; KISHORE et al., 2014).

As propriedades farmacológicas das naftoquinonas naturais e sintéticas são diversificadas, apresentando atividades antimutagênicas e antioxidantes (KUMAR et al., 2013); citotoxicidade contra linhagens celulares cancerígenas (KISHORE, 2014); atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e antifúngica contra *Candida albicans* resistentes a fluconazol (FRCA) (SREELATHA et al., 2014); potentes inibidores da replicação de vírus, como o vírus da dengue (COSTA et al., 2013); e potencial no tratamento de pessoas com malária, infectadas pelo *Plasmodium falciparum* (ISBA et al., 2015).

Em 1999, seis derivados de naftoquinona bioativos foram isolados do fungo endoparasita de inseto *Ophiocordyceps unilateralis* (anteriormente denominado *Cordyceps unilateralis)* linhagem BCC1869 (KITTAKOOP et al., 1999). KHAOKHAJORN e colaboradores, em 2015, identificaram o gene *MFS1* codificador do transportador de membrana MFS, que medeia a produção e a secreção de naftoquinonas nesta linhagem de fungo. O gene MFS1 foi sequenciado e clonado em plasmídeo sob o controle de um forte promotor constitutivo. Em seguida, o fungo foi transformado com o plasmídeo, o que levou ao aumento da expressão do gene de 3-10 vezes comparado ao tipo selvagem. Em consequência, análises dos extratos brutos de culturas líquidas mostraram a produção 20 a 2300 vezes superior de quatro derivados de naftoquinonas pelo mutante em relação ao selvagem. Assim, as naftoquinonas produzidas por microrganismos possuem um grande potencial biotecnológico.

STODŮLKOVÁ e colaboradores (2015) isolaram e identificaram três naftoquinonas produzidas pelo basidiomiceto *Quambalaria cyanescens* em cultura submersa. Dois desses compostos apresentaram propriedades antifúngicas e exibiram atividade contra mitocôndrias em linhagens de células cancerígenas humanas. Esses mesmos autores demonstraram ainda que os pigmentos produzidos por fungos poucos explorados têm potencial no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e anticancerígenas.

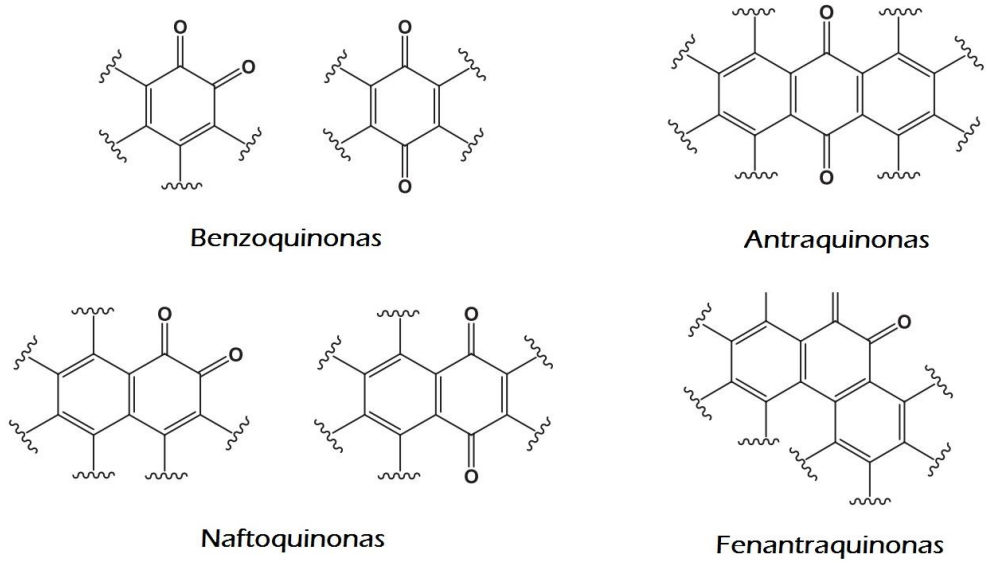

Figura 7. Estruturas químicas básicas de quatro classes de quinonas, classificadas quanto ao tipo de sistema aromático. *Fonte: Adaptação SOUSA et al. (2016).*

1.4 Aplicações Terapêuticas de Cogumelos

1.4.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana está relacionada com a capacidade de um composto reduzir, eliminar ou impedir a multiplicação de microrganismos (GOMES, 2007). Os compostos que apresentam atividade antimicrobiana podem ser naturais ou sintéticos. No entanto, em consideração à crescente importância clínica, laboratorial e terapêutica dispensada às infecções fúngicas e bacterianas, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de obter novos fármacos naturais, que sejam menos tóxicos e apresentem atividade contra cepas de microrganismos resistentes (REN et al., 2014).

Os macrofungos oferecem possibilidades interessantes para exploração de novos antibióticos, pois eles possuem estratégias de defesa naturais contra microrganismo, (LIKTOR-BUSA et al., 2016). Os cogumelos produzem antimicrobianos de baixa e alta massa molecular. Os compostos de baixo peso são principalmente metabólitos secundários, tais como, esteroides, terpenos, derivados do ácido benzóico e quinonas. Já os metabólitos de alta massa molecular incluem, principalmente, proteínas e polissacarídeos (ALVES et al., 2012; LIU et al., 2010; MA et al., 2014; BEATTIE et al., 2010; ZHENG et al., 2010; WAN-MOHTAR et al. 2016).

Diversos estudos mostraram atividade antimicrobiana dos cogumelos contra microrganismos patogênicos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus, Candida albican, Escherichia coli e Klebsiella pneumoniae* (CHANDRASEKARAN et al., 2016; ADEEYO, LATEEF & GUEGUIM-KANA, 2016). No entanto, a maioria dos relatórios descreve a ação de extratos sem identificar os compostos responsáveis pela atividade. É essencial para o desenvolvimento de novos antibióticos o conhecimento sobre a composição química, mecanismos de ação e citotoxicidade desses princípios ativos isolados de cogumelos (ALVES et al., 2012).

1.4.2 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é o processo pelo qual os leucócitos circulantes e proteínas plasmáticas são levados para os locais de infecção nos tecidos e são ativados para destruir e eliminar os agentes agressores. A inflamação também é a principal reação às células danificadas ou mortas e aos acúmulos de substâncias anormais nas células e nos tecidos (ABBAS et al., 2015)

A resposta inflamatória é caracterizada por coordenar a ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de ambos os mediadores pró e anti-inflamatórios em células residentes no tecido e recrutar leucócitos a partir do sangue (REINALDO, 2015). Esses mediadores são responsáveis pelos eventos vasculares, permitindo a vasodilatação, a estase vascular e o aumento da permeabilidade capilar; além de garantir a migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e coordenar as variadas respostas de defesa local (CASTRO, 2011).

Os mediadores químicos envolvidos podem ser de origem tissular, como as prostaglandinas (PGs), aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, e do complemento. As citocinas pró-inflamatórias IL-1β (interleucina-1β) e TNF-α (fator de necrose tumoral) são rapidamente liberadas na lesão tecidual ou infecção (RANG et al., 2007; REINALDO, 2015).

As respostas inflamatórias são caracterizadas por dor, vermelhidão, calor e edema no local da infecção. Dependendo da duração, as inflamações podem ser divididas em agudas e crônicas. Assim, inflamações agudas duram de minutos até poucos dias, enquanto as crônicas persistem por semanas a meses. (MURPHY, 2014). A inflamação aguda é caracterizada por três eventos principais: dilatação de pequenos vasos levando ao aumento no fluxo sanguíneo; aumento de permeabilidade da microvasculatura, que permite que as proteínas do plasma e os leucócitos saiam da circulação; E emigração de leucócitos da microcirculação, seu acumulo no foco da lesão e sua ativação para eliminar o agente agressor (KUMAR, 2016). A inflamação crônica ocorre quando o agente ou mecanismo de agressão não é eliminado ou controlado pelo processo inflamatório agudo. Em consequência, há persistência das células inflamatórias, ocorrendo um dano tecidual, com cicatrizes e alterações da função do órgão envolvido. Exemplo de doenças inflamatórias crônicas graves são artrite reumatoide, doença pulmonar enfisematosa crônica, colite ulcerativa, entre outras. (FRANCO et al., 2015).

Os agentes terapêuticos têm sido empregados para modificar o processo inflamatório ao interferir nas ações de mediadores químicos da inflamação, como inibir a produção de prostaglandinas. Os corticosteroides são os fármacos anti-inflamatórios mais potentes disponíveis, sendo efetivo no controle de muitos tipos e inflamação. Eles inibem a conversão dos fosfolipídios em ácido araquidônico (precursor de prostaglandinas, e outros eicosanoides). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) atuam inibindo a atividade da cicloxigenase, enzima que atua na via metabólica do ácido araquidônico. Os AINES têm sido usados no tratamento de doenças reumatoides e como analgésicos. No entanto, a frequência dos efeitos adversos descritos em seu uso continuado é alta. (GREENE & HARRIS, 2012; MOFLEH & RASHED, 2007).

Pode-se afirmar que o mercado ainda não dispõe do fármaco anti-inflamatório ideal, com efeitos indesejáveis mínimos e que seja realmente eficaz nos transtornos inflamatórios. Nos últimos anos, os esforços estão se concentrando na descoberta de produtos naturais que exibem propriedades anti-inflamatórias, com mecanismos específicos relevantes na resposta inflamatória (CABRAL, 2014).

Diversos compostos com atividades antiiflamatórias foram identificados em espécies de cogumelos comestíveis. Uma proteína ligada à um heteropolissacarídeo foi isolada do caldo de fermentação do cogumelo *Schizophyllum commune*. Esse composto exibiu atividade anti-inflamatória ao reduzir a expressão de RNAm da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), diminuindo a produção óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (lipopolissacarídeos) *in vitro* (DU et al., 2017).

Yuan e colaboradores (2017) isolaram uma proteína de *Pleurotus eryngii* com efeitos anti-inflamatórios. Essa proteína inibiu a superprodução de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, incluindo óxido nítrico, citocina IL-1β e IL-6. Esses efeitos foram associados à inibição da expressão de iNOS e a desativação de fator nuclear- κβ (NF-κβ) e da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Os autores concluíram que essa proteína isolada do *P. eriingi* pode ser útil no tratamento de inflamações no trato gastrointestinal.

1.4.3 Atividade antioxidante

A definição generalizada de atividade antioxidante baseia-se na capacidade que um composto tem para inibir a degradação oxidativa. Os compostos antioxidantes podem captar radicais livres, inativar moléculas de oxigênio eletronicamente excitadas (oxigênio singlete), inativar peróxidos e outras espécies reativas de oxigênio, quelar íons metálicos pró-oxidantes, inativar produtos oxidativos secundários e inibir enzimas pró-oxidantes (ZHONG & SHAHID, 2012).

Os radicais livres são espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pelo organismo por diversos sistemas endógenos, exposição a diferentes condições físico-químicas ou estados patológicos. É necessário um equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes para que a função fisiológica seja adequada. Se os radicais livres

dominam a capacidade do organismo para regulá-los, segue-se uma condição conhecida como estresse oxidativo (LOBO et al., 2010).

O estresse oxidativo está associado a lesões celulares como a peroxidação de lipídeos, a oxidação de proteínas, a inativação enzimática, ativação excessiva de genes pró-inflamatórios (TNF, interleucinas, FN- κβ) e danos ao DNA e aumento do risco de câncer. Além disso, as espécies reativas estão também envolvidas em várias doenças crônicas associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, síndrome metabólica, artrite reumatóide e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e Parkinson) (SILVA & FERRARI, 2011). Assim, a aplicação de fontes externas de antioxidantes pode ajudar a lidar com o estresse oxidativo e a previnir doenças. Os principais micronutrientes antioxidantes encontrados na dieta são as vitaminas E (α-tocoferol) e C (ácido ascórbico) e β-caroteno (LOBO et al., 2010).

A oxidação é um fenômeno natural que também ocorre em alimentos e bebidas, sendo responsável por uma série de alterações que levam a perda do valor nutricional, alterações das características sensoriais, e, eventualmente, formação de compostos tóxicos. Os produtos da oxidação afetam a maioria dos componentes no alimento, levando ao branqueamento dos pigmentos, a destruição de vitaminas, a formação de flavour desagradável e a alteração da sua textura (REIS, 2014). Por essa razão, os antioxidantes são usados para aumentar a estabilidade oxidativa de alimentos, e estes quando consumidos podem retardar ou prevenir o aparecimento de doenças crônicas. Contudo, os antioxidantes sintéticos amplamente utilizados na indústria alimentar e farmacêutica, como o BHA (Butil-hidroxianisole), o BHT (Butil-hidroxitolueno) têm sofrido restrições na sua utilização devido a possíveis efeitos tóxicos e carcinogênicos (GÜLÇIN, 2012).

Assim, produtos naturais com atividade antioxidante podem ser usados como fonte alternativa para garantir a estabilidade do alimento, sem trazer riscos à saúde humana. Os cogumelos são exemplos de uma boa fonte de compostos antioxidantes naturais, pois, vários estudos tem demonstrado que estes possuem na sua constituição química compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenoides. (YAHIA et al., 2017; HELENO et al., 2015; GĄSECKA, et al., 2016; SINGDEVSACHAN et al., 2017).

Diversos trabalhos descritos na literatura investigaram a atividade oxidante de extratos de cogumelo pelo método de inativação dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) e do ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$) (GREESHMA et al., 2016; TAMRAKAR et al., 2016; RANI et al., 2015; ZAN et al., 2015; TEL et al, 2015; SA-ARD, et al, 2015). O método do radical DPPH consiste em avaliar a capacidade que os compostos antioxidantes têm para reduzi-lo. O $DPPH^{\bullet}$ é um dos poucos radicais orgânicos azotados estáveis, apresentando cor púrpura. Enquanto o método ABTS baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes capturarem o cátion meta estável $ABTS^{\bullet+}$, que apresenta uma coloração intensa. Em ambos os casos, ocorre a adição de compostos antioxidantes às soluções desses radicais, e o poder antioxidante é determinado pela descoloração das soluções, que pode ser monitorizada espetrofotometricamente. Quanto menor for a absorbância maior é a quantidade de radicais que foram reduzidos pelos compostos antioxidantes (BECKER *et al*., 2004; PRIOR *et al*., 2005; MAGALHÃES *et al*., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os cogumelos comestíveis das espécies *Pleurotus ostreatus* CC389, *Hericium erinaceus* CC29 *e Volvariella volvacea* CC94 quanto à produção de substâncias bioativas com propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante, obtidos por fermentação submersa.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar atividade antibacteriana, contra *Staphyloccocus aureus* sensíveis e resistentes a meticilina, dos extratos de micélios e dos meios de cultura após a fermentação dos cogumelos *P. ostreatus, H. erinaceus e V. volvacea.*

- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos de micélios de *P. ostreatus, H. erinaceus e V. volvacea,* em macrófagos peritoneais murinos ativados por lipopolissacarídeo (LPS).

- Otimizar a produção de pigmento pelo *V. volvacea*, determinar sua composição química e avaliar sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Os cogumelos das espécies *P. ostreatus* CC389, *H. erinaceus* CC29 e *V. volvacea* CC94 foram obtidos da coleção da Embrapa Agroenergia, de Brasília – Distrito Federal. Os micélios foram mantidos sob refrigeração (7°C), em placas de petri contendo meio ágar batata dextrose. As cepas de *Staphylococus aureus* resistente e sensíveis à meticilina foram isoladas de leite materno e de crianças na cidade de Vitória da Conquista - BA. As cepas resistentes a meticilina foram caracterizadas como cepas comunidade adquiridas carreadores de cassete cromossômico do tipo SCCmec tipo VI. (ALMEIDA et al., 2014; CARVALHO et al., 2017).

3.2 Metodologia Geral

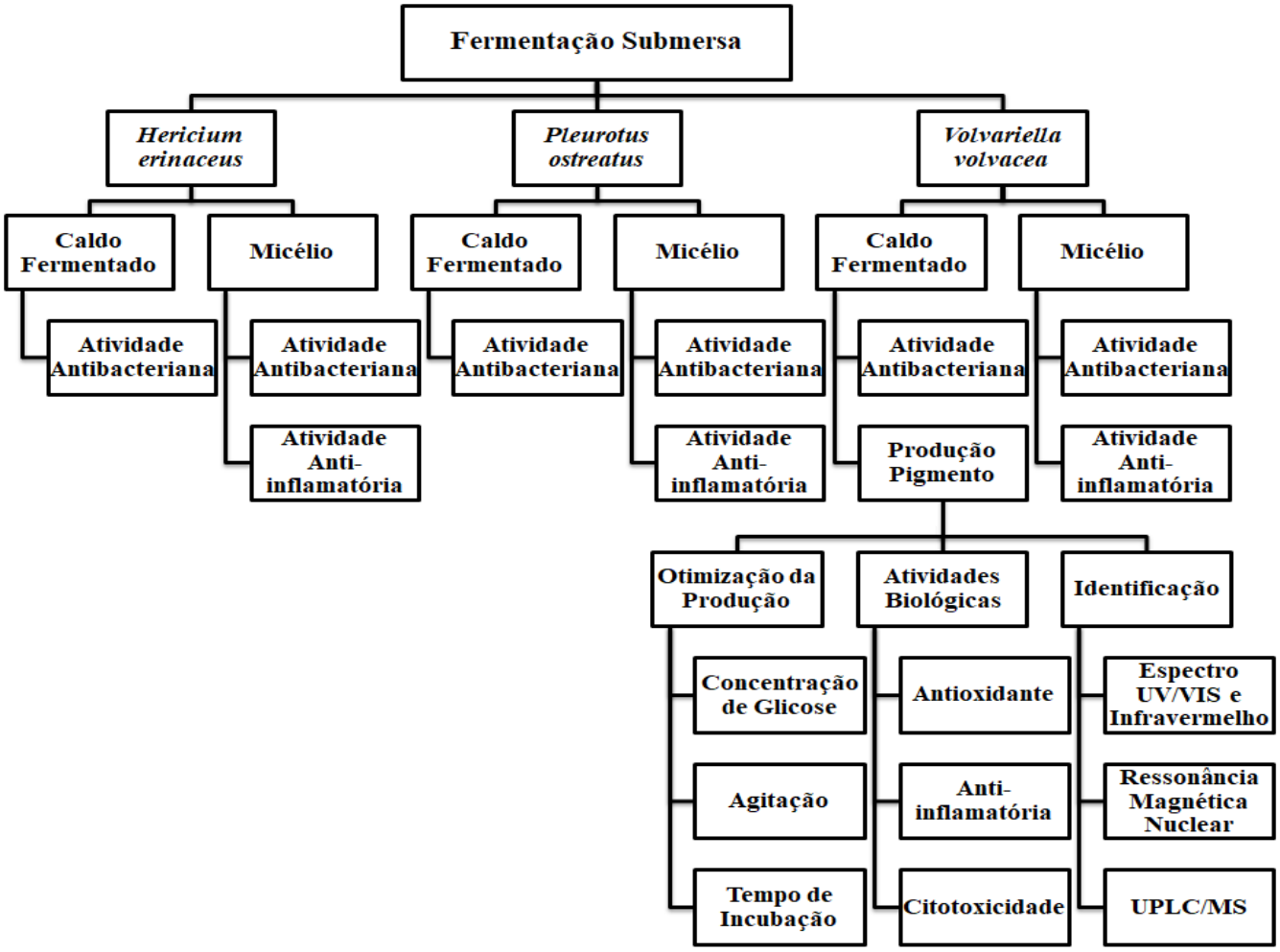

Figura 8. Fluxograma geral da fermentação submersa de cogumelos comestíveis.

3.2.1 Obtenção de Compostos Ativos.

3.2.1.1 Cultivo dos Cogumelos

Os cogumelos foram cultivados no meio POL de Cavazzoni e Adami (1992), que é tradicionalmente utilizado para produção de polissacarídeos por fungos. Os constituintes do meio POL são: 5 g.L-1 de $(NH4)_2SO_4$, 0,2 g.L-1 de $MgSO_4$.7H2O, 1,0 g.L-1 de K_2HPO_4, 2,0 g.L-1 de extrato de levedura, 1,0 g.L-1 de peptona, 20 g.L-1 de glicose, com o pH entre 6,0 a 6,5. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, para cada cogumelo (*P. ostreatus*, *H. erinaceus* e *V. volvacea)*, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio POL, esterilizados a 121ºC por 15 minutos, inoculados com três discos de ágar de 15 mm de diâmetro colonizados com o micélio fúngico. Os frascos foram agitados a 150 RPM em shaker de bancada, com a temperatura controlada em 25ºC, durante o período de 15 dias.

3.2.1.2 Filtração e Extração de Micélios

Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo em papel Whatman nº 1 e os líquidos resultantes foram congelados a - 60ºC, para posteriores analises. Os micélios coletados foram submersos em álcool etílico absoluto durante 10 dias, para a extração de compostos orgânicos. Posteriormente, filtraram-se os extratos em papel Whatman nº 1 para remoção do micélio, e o solvente foi removido por rotaevaporação. Em seguida os extratos foram pesados e resuspendidos em etanol 10% e analisados quando capacidade antibacteriana e anti-inflamatória.

3.2.1.3 Extração de pigmentos

Após a fermentação submersa, os meios de cultura dos três cogumelos apresentaram uma coloração mais intensa que o meio de cultura inicial (POL). Para averiguar o conteúdo de pigmentos nas amostras, 3 mL de filtrados foram colocados em tubos de ensaio e adicionado clorofórmio (1:1). Os tubos foram agitados em vórtex, por 30 segundos. Com agitação, os pigmentos são extraídos do meio aquoso para o clorofórmio. Assim, foi observado que apenas o filtrado do cogumelo *V. volvacea* continha pigmento, uma vez que o clorofórmio apresentava coloração alaranjada.

3.2.2 Otimização da Produção de Pigmentos

O planejamento experimental Doehlert (DOEHLERT, 1970), com representação em superfície de resposta foi utilizado para avaliar as condições ótimas de produção do pigmento pelo *V. volvacea*, usando fermentação submersa. As variáveis analisadas foram a agitação e a concentração inicial de glicose, ambas em função tempo de incubação. As equações 1 e 2 descreve o modelo de regressão do sistema, que inclui os termos de interação:

Equação 1: Influência da Agitação e Tempo de cultivo na produção de pigmento.

$$\mathbf{Y_1 = \beta_0 + \beta_1.A + \beta_2.T + \beta_{11}.A^2 + \beta_{22}.T^2 + \beta_{12}.A.T + \varepsilon_{12}}$$

Equação 2: Influência da Concentração de Glicose e Tempo de cultivo na produção de pigmento.

$$\mathbf{Y_2 = \beta_0 + \beta_1.G + \beta_2.T + \beta_{11}.G^2 + \beta_{22}.T^2 + \beta_{12}.G.T + \varepsilon_{12}}$$

Em que **Y** é a resposta prevista, isto é, a concentração de pigmento; **A**, **T e G** são as variáveis independentes: Agitação, Tempo e Glicose, respectivamente. E os coeficientes de regressão são os seguintes: β_0 é o termo de intercepção; β_1, β_2 são os coeficientes para efeitos lineares; β_{11} e β_{22} são coeficientes quadráticos; e β_{12} é o coeficiente de efeito de interação; ε_{12} representa o erro experimental.

3.2.2.1 Influência da agitação e tempo de fermentação na produção de pigmento

Uma matriz Doehlert foi aplicada para determinar as condições ótimas de agitação e tempo para produção de pigmentos por *V. volvacea*. O número de experimentos aplicados (N) é dado por $N = n^2 + n + n_0$, onde n é o número de variáveis e n_0 é o número de pontos centrais. Neste estudo, o valor n_0 foi fixado em 3; assim, com dois fatores (agitação e tempo), o total de pontos da matriz Doehlert foi igual a 9. Réplicas do ponto central das variáveis foram realizadas para validar o modelo por meio

de uma estimativa de variância experimental. O tempo (dias) foi estudado em cinco níveis (1, 4, 7, 10 e 13) e agitação (rpm) em três níveis (0, 100 e 200). Os valores reais e os valores codificados correspondentes se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Valores reais e valores codificados correspondentes para aplicação na produção de pigmentos por *V. volvacea.*

Variáveis Independentes		**Valores codificados e reais**						
		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866	1
Tempo (dias)	X1	1		4	7	10		13
Agitação (rpm)	X2		0		100		200	

O cultivo de *V. volvacea* foi realizado mediante a inoculação de três discos de 15 mm de ágar batata dextrose com micélio fúngico em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura POL [5 $g.L^{-1}$ de $(NH4)_2SO_4$, 0,2 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H2O$, 1,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 1,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 20 $g.L^{-1}$ de glicose], previamente esterilizado a 121ºC por 15 min, com pH ajustado entre 6,0 e 6,5 e incubação à 25°C. Ao final dos ensaios fermentativos, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min para separação do sobrenadante e biomassa fúngica, e os pigmentos presentes nos sobrenadantes foram extraídos com clorofórmio. Para isso, 3 mL dos sobrenadantes foram misturados, em tubos de ensaio, com o mesmo volume de clorofórmio (proporção de 1:1), utilizando um vórtex por 30 segundos. Após a divisão de fases, a porção aquosa foi eliminada, e o clorofórmio contendo o pigmento foi submetido a leitura em espectrofotômetro, a 400 nm, para a quantificação do mesmo (item 3.2.7.1). Em uma das amostras, o clorofórmio foi removido por evaporação à temperatura ambiente e o pigmento seco foi pesado e resuspendido em clorofórmio, em concentração preestabelecida, para realizar curva de calibração.

3.2.2.2 Influência da concentração inicial de glicose e tempo de fermentação na produção de pigmento

Uma segunda matriz Doehlert foi aplicada para avaliar a influência da variação da quantidade de glicose no meio de cultura na produção de pigmentos. O total de pontos da matriz Doehlert também foi de 9, utilizando duas variáveis (concentração de

glicose e tempo). A glicose (g/L) foi estudada em cinco níveis (2, 7, 12, 17 e 22), e o tempo (dias) em três (3, 6 e 9). Os valores reais e os codificados correspondentes se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Valores reais e valores codificados correspondentes para aplicação na produção de pigmentos por *V. volvacea*

Variáveis Independentes		**Valores codificados e reais**						
		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866	1
Tempo (dias)	X1		3		6		9	
Glicose (rpm)	X2	2		7	12	17		22

O cultivo de *V. volvacea* e a extração do pigmento do meio fermentado seguiram o mesmo protocolo descrito no item anterior (3.2.2.1), aplicando as variações da concentração de glicose no meio POL e tempo de fermentação conforme a matriz acima. Foi mantida a agitação que melhor induziu a mudança de coloração no meio de cultura, identificada no item 3.2.2.1.

3.2.3 Atividade antibacteriana.

As atividades antibacterianas dos meios de cultura fermentados (filtrados) e dos extratos etanólicos dos micélios foram determinadas usando o método de difusão em disco, de acordo com o método relatado por Yamac e Bilgili (2006). As bactérias foram cultivadas em caldo BHI e uma alíquota de 100 μL do inóculo bacteriano foi espalhada com uma alça de Drigalski na superfície da placa de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton. Os discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) previamente esterilizados foram colocados sobre o meio inoculado e estes foram embebidos com 10 μL de filtrados ou de soluções de extratos de cogumelos (15 mg/mL). O procedimento foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a 37º C durante 48 h. A atividade antibacteriana foi avaliada medindo o diâmetro da zona de inibição clara em torno de cada disco.

3.2.4 Atividade anti-inflamatória.

3.2.4.1 Isolamento de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos. Para isso, injetou-se 2 mL de tioglicolato 3% no peritônio dos animais para estimular a migração de macrófagos. Após 72h os camundongos foram eutanasiados, e 5 mL de meio RPMI foram injetados na cavidade peritoneal. Após uma breve massagem, o fluído foi recolhido com uma seringa. Essa suspensão celular foi centrifugada em 1500 rpm durante 8 minutos, e descartou-se o sobrenadante. O pellet (células) foi lavado com meio RPMI, e novamente foi centrifugado e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo ciprofloxacina 50 µg/mL. Foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer. A partir do número de células obtidas, foi feito cálculo para se obter uma densidade de 10^6 células por poço em placas de cultura celular de 24 poços. Tais culturas foram colocadas em estufa de CO_2, a 37°C durante 3 horas. Após o tempo de incubação, os macrófagos já se encontravam aderidos ao plástico da placa. Então, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas duas vezes para eliminar aquelas não aderidas, como hemácias e linfócitos. Após a lavagem, adicionou-se um novo meio RPMI com 10% de SFB contendo antibiótico, e as placas de cultura foram incubadas em estufa de CO_2, a 37°C, até o momento do uso.

3.2.4.2 Estimulação dos macrófagos com LPS.

As células foram tratadas com diferentes concentrações de soluções aquosas dos extratos de cogumelos (3,0; 2,0; 1,0; 0,5 mg/mL) e do pigmento do *V. volvacea* (30; 20; 10; 5,0 µg/mL). Após uma hora de incubação, foi adicionado o estimulante lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli.* Como controle positivo, as células foram tratadas apenas com o LPS, sem adição dos extratos. Para o controle negativo, as células foram tratadas com solução salina tampão fosfato (PBS). O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa de CO_2, a 37°C, por 6 h. Após o período, os meios de cultura foram coletados em eppendorfs, e em seguida, adicionou-se uma solução para estabilização e armazenamento de RNA, o RNAlater®, e os macrófagos foram raspados das placas. As suspensões celulares foram armazenadas em eppendorf, a – 80 °C, para análises da expressão gênica.

3.2.4.3 Expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias

Foi realizado RT² qPCR Primer Assay, com primers específicos para avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1 β, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF-α. A reação foi realizada no StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil), utilizando o programa recomendado pelo fabricante. Os dados foram analisados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

3.2.4.5 Análises estatísticas

Os resultados de determinação da expressão de citocinas foram expressos como valores médios ± desvio-padrão. As comparações múltiplas foram realizadas no software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA), utilizando o teste paramétrico Anova, seguido pelo pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.2.5 Atividade antioxidante

3.2.5.1 Radical DPPH

A atividade antioxidante do pigmento foi determinada pela capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2- picrilhidrazil (DPPH), conforme o método descrito por Brand-Williams et al., (1995), com modificações segundo KIM et al., (2002). Em diferentes tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de 100 µL de diferentes diluições da solução do pigmento e 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH. Os tubos foram homogeneizados cuidadosamente e deixados em repouso ao abrigo da luz por 20 minutos. Ao final, absorbância foi medida a 517 nm e a capacidade de sequestrar o radical (CSR), evidenciada pela descoloração da DPPH, foi calculada em relação ao controle (sem antioxidante), segundo a expressão abaixo:

$$CRS = \frac{Absorbância\ DPPH\ puro - Absorbância\ DPPH + Amostra}{Absorbância\ DPPH\ puro} \times 100$$

3.2.5.2 Radical ABTS

A atividade de captura de radical livre $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi medida pelo método de Arnao, Cano e Acosta (2001), com modificações. A solução estoque de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol até obter-se uma absorbância de 0,70 ± 0,05 em 734 nm. No escuro, alíquotas de 100 µl de diferentes diluições da solução do pigmento foram transferidas para tubos de ensaio com 2,9 mL da solução de radical ABTS e homogeneizadas. Após 5 min, registraram-se as absorbâncias em 734nm. A capacidade de sequestrar o radical ABTS foi calculada segundo a equação descrita acima.

3.2.6 Citotoxicidade do Pigmento.

A citotoxicidade do pigmento foi avaliada pelo teste de letalidade de *Artemia salina* de acordo com o procedimento descrito por Meyer et al. (1982). Os citos da *A. salina* foram incubados em água do mar artificial, em constante aeração, e expostos a uma lâmpada incandescente de 60 W. Após 48 h, 10 unidade de larvas de *A. salina* foram transferidas para frascos contendo o pigmento dissolvido em 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), completando o volume total de 10 mL com água salgada. O pigmento foi testado em triplicata, nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Como controle negativo, as larvas foram colocadas em uma solução contendo apenas 10% de DMSO e água salgada. Os frascos foram expostos a iluminação e após 24 h o número de sobreviventes foram contados e a porcentagem de morte foi calculada.

3.2.7 Identificação do Pigmento

3.2.7.1 Varredura por espectrofotometria UV/Vis e Infravermelho

A varredura em UV foi realizada no espectofotômetro modelo Cary50conc uv-visível, utilizando o programa CaryWinUV, com o intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. A análise de Infravermelho foi feita no equipamento Spectrum two, marca PerkinElmer FTIR Spectrometer.

3.2.7.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^{1}H e ^{13}C), uni e bidimensionais, foram realizadas em um espectrômetro Agilent DD2 (14,1 T), equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm, operando nas freqüências do ^{1}H e ^{13}C a 599,56 e 150,77 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em 0,6 mL de clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, Cambridge Isotope Laboratories) e analisadas em tubos de vidro de 5 mm. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de hidrogênio das moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado (δ_H 7,26) e pelo pico central de carbono do solvente deuterado (δ_C 77,23). As análises foram realizadas a 26ºC.

Nos experimentos unidimensionais de ^{1}H e de ^{13}C foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 16 e 252 ppm, tempo de aquisição de 1,7 s e 0,865 s, larguras de pulso de 45º de 4,15 μs e 3,20 μs (58 dB), número de transientes de 16 e 32K, e tempo de relaxação de 1 s. Os experimentos unidimensionais foram adquiridos com 32768 pontos e processados com 65356 pontos. Os espectros bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear foram adquiridos com gradiente de campo, empregando um número de transientes de 16 e 32, respectivamente. No COSY, foram utilizados 897 x 128 pontos para a matriz de dados de aquisição e 4096 x 4096 pontos para o processamento enquanto que para os experimentos HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence)* e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) foram utilizados 1142 x 256 pontos na aquisição e 4096 x 2048 pontos no processamento.

3.2.7.3 Cromatografia Líquida de ultraeficiência acoplada ao Espectrômetro de Massa (UPLC-MS)

As análises cromatográficas de ultraeficiência foram realizadas em um cromatógrafo acoplado a dois espectrômetros de massas em série (UPLC-QTOF Waters Acquity/Xevo) com uma interface de ionização por electrospray (ESI). As separações foram efetuadas em uma coluna Waters Acquity BEH C18 (150 mm × 2,1 mm, 1,7μm). A fase móvel foi composta por H2O (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo

ácido fórmico (0,1% v/v). O gradiente de eluição variou de 2 – 95%, em uma vazão de 500 μL min-1. As frações foram analisadas nos modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI) em uma faixa de 100 – 1200 Da. As condições ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão cone 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvação de 330 °C, fluxo de gás de cone de 20 L h-1, o fluxo de gás dessolvatação 600 L h-1, e MCP (microcanais tensão da placa) – detector a 1900 V. A identificação dos compostos foi feita através dos seguintes parâmetros: (1) fórmula molecular deduzida a partir da massa exata (4 casas decimais), considerando um erro de massa de 5 ppm; (2) padrão isotópico do íon (i-fit) e (3) o padrão de fragmentação do íon comparado com dados da literatura.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular.* 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2015, 536 p.

ADEEYO, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of the Production of Extracellular Polysaccharide from the Shiitake Medicinal Mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) Using Mutation and a Genetic Algorithm-Coupled Artificial Neural Network (GA-ANN). *Int J Med Mushrooms,* v. 18, n. 7, p. 571-81, 2016.

ALEXANDRE, T. R.; LIMA, M. L.; GALUPPO, M. K.; MESQUITA, J. T.; NASCIMENTO, M. A.; SANTOS, A. L.; SARTORELLI, P.; PIMENTA, D. C.; TEMPONE, A. G. Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis,* v.23, 2017.

ALMEIDA, J. B.; CARVALHO, S. P.; ALMEIDA, A. L. V.; CAMPOS, G. B.; OLIVEIRA, M. V.; TIMENETSKY, J.; MARQUES, L. M. Detection, Antibiotic Resistance, and Pathogenicity of Staphylococci in Samples from a Brazilian Human Milk Bank. *Breastfeeding Medicine,* v. 9, 2014.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Planta Med,* v. 78, p. 1707–1718, 2012.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, London, v. 73, n. 2, p. 239-244, 2001.

ATLI, B.; YAMAC, M.; YILDIZ, Z. Optimization of submerged fermentation conditions for lovastatin production by the culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms*, v. 15, n .5, p. 487-95, 2013.

AVALOS J.; LIMON C. M. Biological roles of fungal carotenoids. *Curr. Genet.*, v. 61, p. 309–324, 2015.

BAI, M. S.; WANG, C. ZONG, S. C.; LEI, M.; GAO, J. M. Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*. *Food Chemistry*, v. 141, n. 4, p. 3424-3427, 2013.

BAO, D.; GONG, M.; ZHENG, H.; CHEN, M.; ZHANG, L.; WANG, H.; JIANG, J.; WU, L.; ZHU, Y.; ZHU, G.; ZHOU, Y.; LI, C.; WANG, S.; ZHAO, Y.; ZHAO, G.; TAN, Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. *Plos One*, v. 8, n. 3, 2013.

BARROS, L., BAPTISTA, P., AND FERREIRA, I.C.F.R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem. Toxicol*, v. 45, p. 1731-1737, 2007.

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 2742–2747, 2008.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, v. 219, p. 561-571, 2004.

BETT, Celso F.; PERONDI, Miguel Angelo. Análise do mercado de cogumelos comestíveis e medicinais: Uma prospecção de alternativa de renda para a agricultura familiar na região sudoeste do paraná. *Synergismus scyentifica* UTFPR , Pato Branco, 06(1). 2011.

BEZERRA, C. Cogumelo - In natura rende mais. A Lavoura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 700, p. 14-17, 2014.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.*, v. 98, p. 426–438, 2011.

BRAND-WILLIAMS, et al. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, v.22, p.25-30, 1995.

CABRAL, D. L. V. Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatórias. 2014. 77 f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco - Recife, 2014.

CAO, C. L.; PENG, F.; CUI, B. K. Chemical Characterization and Structure of Exopolysaccharides from Submerged Culture of New Medicinal Mushroom from China, *Phellinus mori* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 15, n. 1, p. 57–69, 2013.

CAO, X.Y.; LIU, J.L.; YANG, W.; HOU, X.; LI, Q.J. Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer in vitro and in vivo. *Mol. Med. Rep*, v. 12, p. 2383–2389, 2015.

CARVALHO, S. P.; ALMEIDA, J. B.; ANDRADE, Y. M. F .S.; SILVA, L. S. C.; OLIVEIRA, A. C.; NASCIMENTO, F. S.; CAMPOS, G. B.; OLIVEIRA, M. V.; TIMENETSKY, J.; MARQUES, L. M. . Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC mec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis.*, v. 729, 2017.

CASTRO, R. A. Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a). 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2011.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible muschrooms. *Italian Journal of Food Science*, n. 1, p.9-15, 1992.

CEITA, G.O.; UETANABARO, A.P.T.; KAMIDA, H.M. Emprego de substratos convencionais e alternativos para produção de cogumelos comestíveis: Uma Breve Revisão. *Sitientibus*, Série Ciências Biológicas, v. 9, n. 1, p. 52-56, 2009.

CHANDRASEKARAN, G.; LEE, Y. C.; PARK, H.; WU, Y.; SHIN, H. J. Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, v. 18, n. 4, p. 291-9, 2016;

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Boca Raton: CRC Press, 2004. 480 p.

CONSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem*., v. 13, p. 65–85, 2006.

COSTA, E. C. B, AMORIM, R.; SILVA, F. C. et al. Synthetic 1,4-Pyran Naphthoquinones Are Potent Inhibitors of Dengue Virus Replication. *PLoS One*., v. 8, n. 12, 2013.

COUTINHO L. N. Cultivo de espécies de cogumelos comestíveis, 2008. Disponível em <http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>. Acesso em: 02 de maio de 2017.

DIAMANTOPOULOU, P.; PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G.; PHILIPPOUSSIS, A. Adaptation of Volvariella volvacea metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food Chem*. v. 196, p 272-80, 2016.

DILING, C.; TIANQIAO, Y.; JIAN, Y.; CHAOQUN, Z.; OU, S.; YIZHEN, X. Docking Studies and Biological Evaluation of a Potential β-Secretase Inhibitor of 3-Hydroxyhericenone F from Hericium erinaceus. *Front Pharmacol*, v. 12, 2017.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. *Applied Statistics*, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.

DU, B.; YANG, Y.; BIAN, Z.; XU, B. Characterization and Anti-Inflammatory Potential of an Exopolysaccharide from Submerged Mycelial Culture of Schizophyllum commune. *Front Pharmacol*., v. 8, 2017.

DUNDAR A., HILAL A.; YILDIZ A. Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) *P. Kumm*. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *Afr. J. Biotechnol*., v. 8, n. 4, p. 662–666, 2009.

DUVNJAK, D.; PANTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, V.; NEDOVIĆ, V.; LEVIĆ, S.; MATIJAŠEVIĆ, D.; SKNEPNEK, A.; NIKŠIĆ, M. Advances in batch culture fermented Coriolus versicolor medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 34, p. 1–8, 2016.

EIRA, A. F. BUENO, F.S. Curso: Cultivo do cogumelo shiitake em substratos – cultivo axênico e pasteurização severa. Universidade Online de Viçosa – UOV, 2013.

EOL Encyclopedia of life. Catalogue of Life: April 2013, Volvariella volvacea. Disponível em: <http://eol.org/pages/1009002/hierarchy_entries/52785210/ overview>. Acesso em 12 de maio de 2016.

FAOSTAT: Food and agriculture organization of the United Nations, 2014. Disponível em <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 03 de maio de 2017.

FERNÁNDEZ-FUEYO E., RUIZ-DUEÑAS F. J., LÓPEZ-LUCENDO M. F., PÉREZ-BOADA M., RENCORET J., GUTIÉRREZ A., et al. A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus. Biotechnol Biofuels*, v. 9, n. 49, 2016.

FERREIRA, I. C. F. R. & ABREU, R. M. V. *Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos*. *Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, v. 2, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, I. I. S. Avaliação do ciclo de vida de cogumelos nativos: Comparação entre sistemas de produção abertos e fechados. Coimbra. Universidade de Coimbra. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra- Portugal. 2014

FUNGI PERFECTI, 2017. Disponível em: <http://www.fungi.com/product-detail/product/blue-oyster-plug-spawn-approx-100-plugs.html>. Acesso em 07/10/2017.

FRANCO, M.; BRITO, T. BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. *Patologia: processos gerais.* 6.ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2015. 338 p.

FRIEDMAN, M. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans *Foods*, v. *5*, n. 4, 2016.

GĄSECKA, M.; MLECZEK, M.; SIWULSKI, M.; NIEDZIELSKI, P. P henolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *Eur Food Res Technol,* v. 242, p. 723-732, 2016.

GESSNER, M.O.; SWAN, C.M.; DANG, C.K.; MCKIE, B.G.; BARDGETT, R.D.; WALL, D.H.; HÄTTENSCHWILER, S. Diversity meets decomposition. *Trends Ecol.*, v. 25, p. 372–380, 2010

GIRMAY, Z.; GOREMS,W.; BIRHANU, G.; ZEWDIE, S. Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express*, v. 6, 2016.

GODOY, M.F.P. Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo in vitro de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae, Guignardia citricarpa, Colletotrichum sublineolum, Tobacco mosaic* vírus. 2008. 125 F. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP. 2008.

GOMES, R. V. Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esfera de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos. 2007. 48 f. Dissertação (Pós-Graduação de Ciência Marinha Tropicais) - Instituto de Ciência do Mar da Universidade Federal do Ceará, Ceará – Fortaleza. 2007.

GONÇALVES, J.M. Espécies comestíveis de cogumelos: Perfil mineral, bioacumulação de metais e procedimento de preparo de material de referência certificado. 2012. 109 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro- RJ. 2012.

GONCIARZ, J.; KOWALSKA, A.; BIZUKOJC, M. Application of microparticle-enhanced cultivation to increase the access of oxygen to Aspergillus terreus ATCC 20542 mycelium and intensify lovastatin biosynthesis in batch and continuous fed-batch stirred tank bioreactors, *Biochem. Eng. J.* v, 109, p. 178-188, 2016.

GOVINDARAJ, R.; PAULRAJ, M. G.; TOPPO, E.; PANDIKUMAR, P.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Hepatoprotective Effect of *Tricholoma giganteum* (Agaricomycetes) in a Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rat Model. *Int J Med Mushrooms,* v, 18, n 8, p. 661-669, 2016.

GREENE, J. R.; HARRIS, D. N. *Patologia e terapêuticas para farmacêuticos: bases para a prática da farmácia clínica.* 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012. 968 p.

GREESHMA P.; RAVIKUMAR K.S.; NEETHU, M.N.; PANDEY, M.; ZUHARA K.F.; JANARDHANAN, K.K. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antitumor Activities of Cultured Mycelia and Fruiting Bodies of the Elm Oyster Mushroom, Hypsizygus ulmarius (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, v. 18, n. 3, p. 235-44, 2016.

GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; D´ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; MARTÍNEZ, J.A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia. v.81, 715–723p, 2010.

GÜLÇIN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 86 (3), p. 345–391, 2012.

HATLESTAD, G. J.; SUNNADENIYA, R. M., AKHAVAN, N. A., GONZALEZ, A., GOLDMAN, I. L., MCGRATH, J. M.; LLOYD, A. M. The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics, v.* 44, n. 7, p. 816-820, 2012.

HELENO, S. A.; FERREIRA, R. C.; ANTONIO, A. L.; QUEIROZ, M. J. R. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*, v. 11, p. 48-55, 2015.

HENRY, S. The Mushroom Guys: A business out of UC Berkeley. Disponível em: < http://www.berkeleyside.com/2010/11/12/berkeley-bites-nikhil-arora-alex-velez-the mushroom-guys>. Acesso em 07/10/2017.

HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R., Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.*, v. 71, n. 4, p. 41-50, 2006.

HIWATASHI K, KOSAKA Y, SUZUKI N, HATA K, MUKAIYAMA T, SAKAMOTO K, et al. Yamabushitake mushroom (Hericium er naceus) improved lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 74, p. 1447–1451, 2010.

HU, Q.; WANG, H.; NG, T.B. Isolation and purification of polysaccharides with anti-tumor activity from *Pholiota adiposa* (Batsch) *P. Kumm*. (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, v. 14, p. 271–284, 2012.

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). VII Simpósio Internacional sobre cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre cogumelos comestíveis. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Manaus - AM, Out. 2013.

International Society for Mushroom Science, 2017. Disponível em: <http://www.isms.biz/edible-mushrooms>. Acesso em: 07/10/2017.

ISBA, R.; ZANI, B.; GATHU, M.; SINCLAIR, D. Artemisinin-naphthoquine for treating uncomplicated Plasmodium falciparum malária. *Cochrane Database Syst Rev.*, v. 2, p. 1-48, 2015.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes – Review, International Journal of Dairy Technology. v. 64, 1 14-33, 2011.

JAYAKUMAR, G. C., KANTH, S. V., CHANDRASEKARAN, B., RAGHAVA RAO, J., NAIR, B. U Preparation and antimicrobial activity of scleraldehyde from *Schizophyllum commune*. *Carbohydr. Res.* v. 345, p. 2213–2219, 2010.

KHAOKHAJORN, P.; SAMIPAK, S.; NITHITHANASILP, S.; TANTICHAROEN, M.; AMNUAYKANJANASIN, A. Production and secretion of naphthoquinones is mediated by

the MFS transporter MFS1 in the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps* sp. BCC1869. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 31, p. 1543-1554, 2015.

KIM, D. O. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J Agric Food Chem*, v.50, p.3713-3717, 2002.

KIM, S. P., NAM, S. H., AND FRIEDMAN, M. Correction to *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom extracts inhibit metastasis of cancer cells to the lung in CT-26 colon cancer–transplanted mice. *J. Agric. Food Chem, v.* 62, p. 528–528, 2014.

KIRK, P. M. et al. Dictionary of the Fungi. Wallingford: CABI, 2011. 771 p.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, J.C.; Stalpers, J.A. Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KISHORE, N.; BINNEMAN, B.; MAHAPATRA, A.; VAN DE VENTER, M.; PLESSIS-STOMAN, D.; BOUKES, G.; HOUGHTON, P.; MARION MEYER, J. J.; LALL, N. Cytotoxicity of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 5013–5019, 2014.

KITTAKOOP, P.; PUNYA, J.; KONGSAEREE, P.; LERTWERAWAT, Y.; JINTASIRIKUL, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Bioactive naphthoquinones from Cordyceps unilateralis. Phytochemistry, v. 52, p. 453–457, 1999.

KUMAGAI, Y.; SHINKAI, Y.; MIURA, T.; CHO, A. K. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 52, p.221-247, 2012.

KUMAR, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 755, p. 30–41, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; ASTER, J. C. *Robbins e Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças*. 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2016. 1421 p.

LEAL, A. R., BARROS, L., BARREIRA, J. C. M., SOUSA, M. J., MARTINS, A., SANTOS-BUELGA, C. & FERREIRA, I. C. F. R. Portuguese wild mushrooms at the pharma nutrition interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International*, v. 50, p. 1-9, 2013.

LEE, H. Develop the mushroom industry by industrialized idea. *Mushroom Times*, n. 06, 2016.

LI, G., YU, K., LI, F., XU, K., LI, J., HE, S., et al. (2014). Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. *J. Ethnopharmacol, v.* 153, 521–530, 2014.

LI, S.; SHAH, N.P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Food Chem*, v. 165, p. 262-70, 2014.

LI, X.; WANG, L. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol*, v. *83*, p. 270–276, 2016.

LI, H.; ZHANG, Z.; LI, M.; LI, W.; SUN, Z. Yield, size, nutritional value, and antioxidant activity of oyster mushrooms grown on perilla stalks. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015.

LIMA, A.T.; SANTOS, M.N.; SOUZA, L.A.; PINHEIRO, T.S.; PAIVA, A.A.; DORE, C.M.; COSTA, M.S.; SANTOS, N.D.; BASEIA, Y.G.; ARAÚJO, R.M.; LEITE, E.L. Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from Tylopilus ballouii mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Carbohydr Polym*, v. 144, p. 400-9, 2016.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*., v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

MA, G.; YANG, W.; MARIGA, A.M.; FANG, Y.; MA, N.; PEI, F.; HU, Q. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. *Carbohydr. Polym*, v. 114, p. 297–305, 2014.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L.F.C. Methological aspects about in vitro evaluation of antioxidante properties. *Analytica Chimica Acta*. v. 613, p. 1-19, 2008.

MAITY, P.; SEN, I.K.; MAJI, P.K.; PALOI, S.; DEVI, K.S.P.; ACHARYA, K.; MAITI, T.K.; ISLAM, S.S. Structural, immunological, and antioxidant studies of β-glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. *Carbohydr. Polym*, v. 123, p. 350–358, 2015.

MAO, G.; FENG, W.; XIAO, H.; ZHAO, T.; LI, F.; ZOU, Y.; REN, Y.; ZHU, Y.; YANG, L.; WU, X. Purification, characterization, and antioxidant activities of selenium-containing proteins and polysaccharides in royal sun mushroom, *Agaricus brasiliensis* (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, v. *16*, p. 463–475, 2014.

MAO, G.H.; REN, Y.; FENG, W.W.; LI, Q.; WU, H.Y.; JIN, D.; ZHAO, T.; XU, C.Q.; YANG, L.Q.; WU, X.Y. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Carbohydr. Polym*, v. 134, p. 406–412, 2015.

MARTOS, E.T. Aditivos microbianos no processo de compostagem e na camada de cobertura para o cultivo do cogumelo Agracius brasiliensis. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos Filamentosos), Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG 2009.

MATHEW, J.; SUDHEESH, N.P.; RONY, K.A.; SMINA T.P; JANARDHANAN, K.K. Antioxidant and antitumor activities of cultured mycelium of culinary-medicinal paddy straw mushroom Volvariella volvacea (Bull.: Fr.) Singer (Agaricomycetideae*). International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 10, p. 139- 148, 2008.

MENEZES, T. M. F. Isolamento dos polissacarídeos dos cogumelos Agaricus blazei e Lentinus edodes: caracterização estrutural, estudo reológico e potencial para uso terapêutico. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Ceará, Ceará – FORTALEZA, 2014.

MEYER B.N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-4, 1982

MINATO, K. I,; OHARA, A.; MIZUNO, M. A Proinflammatory Effect of the β-Glucan from *Pleurotus cornucopiae* Mushroom on Macrophage Action. *Mediators Inflamm.* 2017.

MODESTO, M.L; FERREIRA, J. L. B. COGUMELOS: Do campo até a mesa. Conhecer, conservar e cozinhar. Verbo. Lisboa, Abr. 2010.

MOFLEH, I. A. AL; RASHED, R. S. AL. Nonsteroidal, Antiinflammatory drug-induced gastrointestinal injuries and related adverse reactions: Epidemiology, pathogenesis and management. The Saudi Journal of Gastroenterology, v. 13, n. 3, p. 107–113, 2007.

MONTOYA, S.; SANCHEZ, O. J.; LEVIN, L. Produção de polissacarídeos por culturas submersas e de estado sólido de vários basidiomicetos superiores medicinais. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 15, n. 1, 2013.

MUSHROOM NUTRITION, 2017. Disponível em: <https://www.mushroomnutrition.com/collections/oyster-mushroom>. Acesso em 07/10/2017.

MURPHY, K. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2014. 868 p.

NASCIMENTO, P. AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE CAROTENÓIDES DE ABÓBORA, MANDIOCA E BATATA DOCE. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM Engenharia e Ciência de Alimentos). 67f. 2006. Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto, SP. 2006.

OEI, P.; NIEUWENHUIJZEN, B.V. O cultivo de cogumelos em pequena escala pleuroto, shiitake e orelha-de-pau. *Série Agrodok*, n. 40, 2006.

PAPASPYRIDI, L. M.; ALIGIANNIS, N.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; FOKIALAKIS, N. Submerged Fermentation of the Edible Mushroom Pleurotus ostreatus in a Batch Stirred Tank Bioreactor as a Promising Alternative for the Effective Production of Bioactive Metabolites. *Molecules*, v. 17, p. 2714-2724, 2012.

PRIOR, R. I.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplemnts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PUNITHA, S. C.; RAJASEKARAN, M. Cardioprotective effect of *Volvariella volvacea* in streptozotocin administered rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 11, n. 4, 2016.

RAGHUKUMAR, S. Fungi: Characteristics and Classification. In: *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi.* Springer International Publishing. 2017. p. 1-15.

RAINBOW SEED, 2017. Disponível em: <http://www.rainbowseedcompany.com/Lions-Mane-Mushroom-Plug-Spawn_p_220.html>. Acesso em 07/10/2017.

RAMOS, A. C. M.; MACHADO, M. H. N.; SAPATA, M. M. R. L.; QUINTANILLA, M. J. B. Cogumelos - Produção, Transformação e Comercialização. Publindústria, 2015. 150p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE. P.K. Farmacologia. 6ª Ed. Editora Elsevier, 2007.

RANI, P.; LAL, M.R.; MAHESHWARI U.; KRISHNAN, S. Antioxidant Potential of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, Ganoderma lucidum (Higher Basidiomycetes) Cultivated on Artocarpus heterophyllus Sawdust Substrate in India. *Int J Med Mushrooms*, v. 17, n.12, p. 1171-7, 2015.

RAO, M. P. N; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Front Microbiol*., v. 8, 2017.

REINALDO, M. P. O. S. Efeito da olmesartana na resposta inflamatória em modelo de mucosite intestinal em ratos. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Estrutural e Funcional). Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN. 2015.

REIS, G. C. L. Aminas bioativas e atividade antioxidante em cogumelos. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG. 2014.

REN, L. et al. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 3, n. 2, p. 41-51, 2014.

RIBEIRO, B.; PINHO, P. G.; ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA C.; FERREIRA, A. C. S.; BAPTISTA, P.; VALENTÃO, P. Do Bioactive Carotenoids Contribute to the Color of Edible Mushrooms? *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, v. 4, p. 14-18, 2011.

ROY, A.; PRASAD, P.; GUPTA, N. Volvariella volvacea: a macrofungus having nutritional and health potential. *Asian J Pharm Tech*, v. 4, n. 2, p. 110–113, 2014.

RUBEL, R. Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica, 2006. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

SA-ARD, P.; SARNTHIMA R.; KHAMMUANG, S.; KANCHANARACH, W. Antioxidant, antibacterial and DNA protective activities of protein extracts from Ganoderma lucidum. *J Food Sci Technol*. v. 52, n. 5, p. 2966-73, 2015.

SAMANTA, S.; NANDI, A.K.; SEN, I.K.; MAITY, P.; PATTANAYAK, M.; DEVI, K.S.P.; KHATUA, S.; MAITI, T.K.; ACHARYA, K.; ISLAM, S.S. Studies on antioxidative and immunostimulating fucogalactan of the edible mushroom *Macrolepiota dolichaula*. *Carbohydr. Res*, v. 413, p. 22–29, 2015.

SANCHEZ C. Mini review: modern aspects of mushroom culture technology. *Appl Microbiol Biot*., v. 64, p. 756-62, 2004.

SÁNCHEZ, R. J. A; CRUZ, Y, V. M. T.; BARRAGÁN, H. B. E. Betaxanthins and antioxidant capacity in Stenocereus pruinosus: Stability and use in food. *Food Res Int*, v.91, p. 63-71, 2017.

SÁNCHEZ, C. – Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p 1321-1337, 2010.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. *Revista Fitos*, v. 3, n. 2, 2007.

SHARMA, S. K.; GAUTAM N. Chemical and Bioactive Profiling, and Biological Activities of Coral Fungi from Northwestern Himalayas. *Nature Scientific Reports*, v. 19, n. 7, 2017.

SHARMA, S.; KHANNA, P.K.; KAPOOR, S. Optimised isolation of polysaccharides from *Lentinula edodes* strain NCBI JX915793 using response surface methodology and their antibacterial activities. *Nat Prod Res*. v. 30, n. 5, p. 616-621, 2016.

SHENG, X.; YAN, J.; MENG, Y.; KANG, Y.; HAN, Z.; TAI, G.; ZHOU, Y.; CHENG, H. Immunomodulatory effects of *Hericium erinaceus* derived polysaccharides are mediated by intestinal immunology. *Food Funct*, v. 8,n. 3, 2017.

SILVA, N. G. Estudo da Capacidade Antioxidante de Cogumelos Comestíveis. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar). 2015. 74f. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal. 2015.

SILVA, R.F., BARROS, A. C. A.; PLETSCH,M. ARGOLO, A.C.C.M.; ARAÚJO, B. S Study on the scavenging and anti-Staphylococcus activities of the extracts, fractions and subfractions of two *Volvariella volvacea* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 10, p. 1761-1767, 2010.

SILVA, R.R; COELHO, G.D. Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Curso de Capacitação de monitores e educadores. *Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente*. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. 2006.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol*., v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SILVEIRA, M. L.; SMIDERLE, F. R.; AGOSTINI, F.; PEREIRA, E. M.; BONATTI-CHAVES, M.; WISBECK, E.; RUTHES, A. C.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; FURLAN, S. A.; IACOMINI, M. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju:* its chemical structure and anti-inflammatory activity. *Int J Biol Macromol*. v. 75, p.90-6, 2015.

SINGDEVSACHAN, S.K., PATRA, J.K., TAYUNG, K.; THATOI, H. Chemical Constituents, Antioxidative and Antibacterial Properties of Medicinal Mushrooms Collected

from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. B Biol. Sci.*, v. 87, p. 559–570, 2017.

SOARES, A. S.; BARBOSA, F. L.; RÜDIGER, A.; HUGHES, D. L.; SALVADOR, M. J.; ZAMPRONIO, A. R.; STEFANELLO, M. É. A. Naphthoquinones of *Sinningia reitzii* and Anti-inflammatory/ Antinociceptive Activities of 8-Hydroxydehydrodunnione. *J. Nat. Prod.*, v. 80, p. 1837−1843, 2017.

EIRA SOKÓŁ, S.; GOLAK-SIWULSKA, I.; SOBIERALSKI, K.; SIWULSKI, M.; GÓRKA, K. Biology, cultivation, and medicinal functions of the mushroom *Hericium erinaceum. Polish Botanical Society*. Acta Mycol, v. 50, n. 2, p. 1069, 2016.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A. ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Quim. Nova*, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SOUZA, C. O.; MENEZES, J. D. S.; RAMOS NETO, D. C. ASSIS, J. G. A.; SILVA, S. R. DRUZIAN, J. I. Carotenoides totais e vitamina A de cucurbitáceas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. *Ciência Rural*, v. 42, n. 5, 2012.

SOUZA, D. F.; TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. Journal Basic Microbiology, v. 46, n. 2, p. 126-134, 2006.

SREELATHA, T.; KANDHASAMY, S.; DINESH, R.; SHRUTHY, S.; SHWETA, S.; MUKESH, D.; KARUNAGARAN, D.; BALAJI, R.; MATHIVANAN, N.; PERUMAL, P. T. Synthesis and SAR study of novel anticancer and antimicrobial naphthoquinone amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 15, p. 3647-3651, 2014.

STAMETS, P. Mycelium running: how mushrooms can help save the world. *Berkeley: Ten speed press*, 2005. 330 p.

STINTZINGA, C.; SCHLIEMANNB, W. Pigments of Fly Agaric (Amanita muscaria). *Z. Naturforsch*, v. 62, p. 779 -785, 2007.

STODŮLKOVÁ, E.; CÍSAŘOVÁ, I.; KOLAŘÍK, M.; CHUDÍČKOVÁ, M.; NOVÁK, P.; MAN, P. et al. (2015) Biologically Active Metabolites Produced by the Basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. PLoS One, v. 10, n. 2, 2015.

SU, C.; XU, X.; LIU, D.; WU, M.; ZENG, F.; ZENG, M., WEI, W.; JIANG, N.; LUO, X. Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from

fermentation broth of *Morchella cônica. DARU Journal and Pharmaceutical Science.* v. 21, n. 1, 2013.

TAMRAKAR, S.; TRAN H. B.; NISHIDA, M.; KAIFUCHI, S.; SUHARA, H.; DOI K.; FUKAMI, K.; PARAJULI G. P.; SHIMIZU, K. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species. *J Nat Med*, v. 70, n. 4, p. 769-79, 2016.

TÁTRAALJAI, D.; MAJOR, L.; FÖLDES, E.; PUKÁNSZKY, B. Study of the effect of natural antioxidants in polyethylene: Performance of beta-carotene. *Polymer Degradation and Stability*, v. 102, p. 33-40, 2014.

TEDERSOO, L.; BAHRAM, M.; PÕLME, S.; et al. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, v. 346, p. 1078, 2014.

TEL, G.; OZTURK M.; DURU, M.E.; TURKOGLU A. Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharm Biol*, v. 53, n. 6, p. 824-30, 2015.

USDA - United States Department of Agriculture. National Agricultural Statistics Service (NASS). Agricultural Statistics Board. *Mushrooms.* Aug 2016.

VELÍŠEK, J.; CEJPEK, K. Pigments of higher fungi – a review. *Czech J. Food Sci.*, v. 29, p. 87–102. 2011.

VIEIRA, F. R. Substrato de cultivo para os cogumelos *pleurotus ostreatus* e *agaricus bisporus*: composição físico-química e metagenômica microbiana. 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Campus de Botucatu, BOTUCATU – SP. 2016.

VIEIRA, G. R. T.; LIEBL M.; TAVARES, L. B. B.; PAULERT, R.; SMÂNIA JR., A. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by Polyporus tricholoma Mont. *Braz J Microbiol*., v. 39, n. 3, p. 561–568, 2008.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e nutrição*, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, D.; SUN, S.Q.; WU, W.Z.; YANG, S.L.; TAN, J.M. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice. *Carbohydr. Polym*, v. 105, p. 127–134, 2014.

WANG, L.; WANG, C.; GAO, X.; XU, N.; LIN, L.; ZHAO, H.; JIA, S.; JIA, L. Purification, characterization and anti-aging capacity of mycelia zinc polysaccharide by *Lentinus edodes* SD-08. *BMC Complement. Altern. Med*, v. 15, p. 111, 2015.

WAN-MOHTAR, W.A; YOUNG, L.; ABBOTT, G.M.; CLEMENTS, C.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Antimicrobial Properties and Cytotoxicity of Sulfated (1,3)-β-D-Glucan from the Mycelium of the Mushroom *Ganoderma lucidum. J Microbiol Biotechnol*, v. 26, n. 6, p. 999-1010, 2016.

WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 89, p. 1323-32, 2011.

WOLTERS, N.; SCHEMBECKER, G.; MERZ, J. Erinacine C: A novel approach to produce the secondary metabolite by submerged cultivation of *Hericium erinaceus. Fungal Biol*. v. 119, n. 12, 2015.

WU, J.Y.; CHEN, C.H.; CHANG, W.H.; CHUNG, K.T; LIU Y.W.; LU, F.J. CHEN, C.H. Anticancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* & *Volvariella volvacea. Evid Based Complement Alternat Med,* 2011.

WU, S.; LI, F.; JIA, S.; REN, H.; GONG, G.; WANG, Y.; LV, Z.; LIU, Y. Drying effects on the antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Agaricus blazei* Murrill. *Carbohydr. Polym*, v. *103*, p. 414–417, 2014.

YAHIA, E. M.; GUTIÉRREZ-OROZCO, FABIOLA, MORENO-PÉREZ, M. A. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. *Food Chemistry*, v. 1, p. 14-22, 2017.

YANG, K.; JIN, Y.; XING, C.; HU, J.; WANG, R.; SUN, P. Chemical characterization and in vitro antioxidant activity evaluation of polysaccharides from the fruiting bodies of the red heart mushroom *Phellinus pini* (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, v. 17, p. 297–307, 2015.

YAMAC, M. & BILGILI, F. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharm. Biol*, v. 44, p. 660–7, 2006.

YUAN, B.; ZHAO, L.; RAKARIYATHAM, K.; HAN, Y.; GAO, Z.; MUINDE, B. K.; HU, Q.; XIAO, H. Isolation of a novel bioactive protein from an edible mushroom *Pleurotus eryngii* and its anti-inflammatory potential. *Food Funct.* v. 8, n. 6, 2017.

ZAN, L.F.; BAO H.Y.; BAU T.; LI, Y. A new antioxidant pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione derivative from the medicinal mushroom *Fomitiporia ellipsoidea. Nat Prod Commun*, v. 10, n. 2, p. 315-6, 2015.

ZHANG, C.C.; YIN, X.; CAO, C.Y.; WEI, J.; ZHANG, Q.; GAO, J.M. Chemical constituents from *Hericium erinaceus* and their ability to stimulate NGF-mediated neurite outgrowth on PC12 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* v. 25, n. 22, 2015.

ZHANG, J.; XU, N.; WANG, G.; ZHAO, H.; LIN, L.; JIA, M.; JIA, L. In vitro and in vivo antioxidant effects of polysaccharides from Nameko medicinal mushroom, *Pholiota nameko* SW-01 (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, v. 17, p. 671–680, 2015.

ZHANG, L., PEI, Y., XING, Z., T., DING, S., J., BUSWELL, J., A. Comparison of endoglucanase-1 (EG1) induction in the edible straw mushroom *Volvariella volvacea* by lactose and/or cellobiose with or without added sorbose. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 89, p. 1939-1946, 2011.

ZHANG, Y.; HU, T.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; JIN, G.; YANG, Y. Antidiabetic effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 83, p. 126–132, 2016.

ZHAO, C.; LIAO, Z.; WU, X.; LIU, Y.; LIU, X.; LIN, Z.; HUANG, Y.; LIU, B. Isolation, purification, and structural features of a polysaccharide from *Phellinus linteus* and its hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic mice. *J. Food Sci.* v. *79*, 2014.

ZHAO, S.; RONG, C.; LIU, Y.; XU, F.; WANG, S.; DUAN, C.; CHEN, J.; WU, X. Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats. *Carbohydr. Polym,* v. 122, p. 39–45, 2015.

ZHAO, C.; GAO, L.; WANG, C.; LIU, B.; JIN, Y.; XING, Z. Structural characterization and antiviral activity of a novel heteropolysaccharide isolated from *Grifola frondosa* against enterovirus 71. *Carbohydr Polym,* v. 144, p. 382-389, 2016a.

ZHAO, Y.M.; SONG, J.H.; WANG, J.; YANG, J.M.; WANG, Z.B.; LIU, Y.H. Optimization of cellulase-assisted extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *J. Sci. Food Agric*, v. 96, n. 13, p. 4484-91, 2016b.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F. Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory. *Jounal of Agricutural and Food Chemistry*, v. 60, p. 4–6, 2012.

ZION MARKET RESEARCH. Global Mushroom Market Is Expected To Reach Above USD 59.48 billion in 2021. Oct 2016. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/news/global-mushroom-market>. Acesso em: 18/06/2017.

CAPITULO 1

Atividade antibacteriana e anti-inflamatória de produtos da fermentação submersa de cogumelos comestíveis

Atividade antibacteriana e anti-inflamatória de produtos da fermentação submersa de cogumelos comestíveis

Bruna S. Menezes[1]; Manoel N. Santos Junior[1]; Lucas S. C. Silva[1]; Lucas S. Solidade[1]; Patrícia L. Leal[1]; Felix G. Siqueira[2]; Lucas M. Marques[1].

1. Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia.

2. Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal.

RESUMO

Os cogumelos comestíveis estão atraindo cada vez mais atenção como alimentos funcionais, uma vez que são ricos em compostos bioativos, com propriedades interessantes para serem exploradas pela indústria farmacêutica e alimentícia. No presente estudo, foram investigados os extratos etanólicos de micélios e os meios de cultura após a fermentação submersa (filtrados) das espécies *Hericium erinaceus* CC29, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Volvariella volvacea* CC94 quanto as propriedades antibacteriana e anti-inflamatória. A atividade antibacteriana dos extratos e dos filtrados de cultivo contra cepas de *Staphyloccocus aureus* sensíveis e resistentes a meticilina foi realizada pelo método de difusão em ágar. Para as análises de anti-inflamatórios dos extratos miceliais foram utilizados macrófagos peritoneais murinos ativados por LPS, e a expressão gênica das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-17 foi determinada por RT qPCR. Os resultados mostraram que os extratos e filtrados não apresentaram capacidade de inibição do crescimento de *S aureus* e MRSA, pelo método testado. Entretanto, os extratos miceliais de todas as espécies analisadas apresentaram atividade anti-inflamatória ao reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α, IL-1β e IL-6, e promover a expressão das anti-inflamatórias, IL-10 e IL-17, em macrófagos murinos estimulados com LPS, com significância estatística ($p < 0,05$). A capacidade anti-inflamatória, *in vitro*, de componentes extraídos dos micélios foi comprovada no presente estudo, o que sugere que essas espécies cogumelos podem ser consideradas como uma fonte potencial de agentes anti-inflamatórios de origem natural.

Palavras-chave: Basidiomicetos. Antibacterianos. Anti-inflamatórios. *Staphyloccocus aureus*. MRSA. Macrófagos. Citocinas.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica para eliminar agentes agressores, como patógenos, células danificadas, lesões e irritação. Esta resposta é caracterizada por sintomas físicos como febre, dor e edema, que estão associados aos eventos de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma (ELSAYED et al., 2014). A persistência de um processo inflamatório no organismo pode causar danos teciduais, com ocorrência de cicatrizes e alterações da função do órgão envolvido. Artrite reumatoide, doença pulmonar enfisematosa crônica e colite ulcerativa são exemplos de doenças inflamatórias crônicas graves (FRANCO et al., 2015). Os macrófagos desempenham um papel crucial na resposta inflamatória através da libertação de uma variedade de fatores, tais como o óxido nítrico (NO), mediadores de prostaglandina e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6), em resposta a um estímulo de ativação. E a inibição de algumas funções de macrófagos está associada à redução desses mediadores inflamatórios (MORO *et al*., 2012).

Os medicamentos mais comumente administrados para reduzir a inflamação são anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). Eles atuam inibindo a atividade da cicloxigenase, enzima da via metabólica do ácido araquidônico (precursor de prostaglaninas). A administração de AINEs, a longo prazo, promove efeitos colaterais comprovados (GREENE & HARRIS, 2012; ELSAYED et al., 2014). Os efeitos adversos mais conhecidos desses agentes são os que ocorrem no trato gastrointestinal (GI) e incluem principalmente a úlcera péptica e a hemorragia digestiva. Além disso, também são frequentes os relatados de efeitos adversos em outros sistemas, incluindo insuficiência renal aguda e doenças cardiovasculares (CASTIER et al., 2013; MELCARNE et al., 2016; CONSTANCE et al., 2017; VARGA, et al., 2017). Assim, pode-se afirmar que o mercado ainda não dispõe do fármaco anti-inflamatório ideal, com efeitos indesejáveis mínimos e que seja realmente seguro para o tratamento de transtornos inflamatórios. Nos últimos anos, os esforços estão se concentrando na descoberta de produtos de origem natural que exibam propriedades anti-inflamatórias, com mecanismos específicos relevantes na resposta inflamatória (CABRAL, 2014).

Outro grande desafio clínico é a gradual ineficácia de agentes terapêuticos na erradicação de doenças infecciosas. A taxa de eficiência dos antibióticos vem diminuindo devido ao aumento progressivo de infecções por microrganismos

multirresistentes, tornando-se uma grave ameaça à saúde da comunidade (FERNANDES, et al., 2016). A bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) está entre os patógenos clinicamente relevantes. *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, comensal frequente da pele humana e das áreas da mucosa, mas comumente está associada a infecções cutâneas, de tecidos moles e endovasculares, bem como pneumonia, artrite séptica, endocardite, osteomielite e sepse (ALEGRE et al., 2016; BARNECHE et al., 2017; XIONG et al., 2015; BARBER et al., 2017; RASHED & YOUNIS, 2017; LI et al., 2017; LALIKIAN et al., 2017; HARDGRIB et al., 2016).

Em consideração à crescente importância clínica, laboratorial e terapêutica dispensada às infecções bacterianas por cepas resistentes, inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de obter novos fármacos antimicrobianos (REN et al., 2014). Os macrofungos oferecem possibilidades interessantes para exploração de novos antibióticos, pois eles possuem estratégias de defesa naturais contra microrganismo, (LIKTOR-BUSA et al., 2016). Os cogumelos produzem antimicrobianos de baixa e alta massa molecular. Os compostos de baixo peso são principalmente metabólitos secundários, tais como, esteroides, terpenos, derivados do ácido benzóico e quinonas. Já os metabólitos de alta massa molecular incluem, principalmente, proteínas e polissacarídeos (ALVES et al., 2012; LIU et al., 2010; MA et al., 2014; BEATTIE et al., 2010; ZHENG et al., 2010; WAN-MOHTAR et al. 2016).

Além disso, diversas substâncias com atividades antiiflamatórias foram identificadas em espécies de cogumelos. Esses compostos suprimem a liberação de mediadores pró-inflamatórios, através de modulação da sinalização intracelular em células imunes (JEDINAK et al., 2011). DU e colaboradores (2017) isolaram uma proteína ligada a um polissacarídeo do meio de cultivo do cogumelo *Schizophyllum commune*. Esse composto exibiu atividade anti-inflamatória ao reduzir a expressão de RNAm da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), diminuindo a produção óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (lipopolissacarídeo) *in vitro*. Outros trabalhos mostraram que extratos de cogumelos podem ser redutores da produção de mediadores inflamatórios, como de *Pleurotus giganteus*, que reduziu a produção de NO e de *Imleria badia*, que diminuiu a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) e da prostaglandina E2 sintase, quando comparados com os macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS (BASKARAN et al., 2017; GRZYWACZ et al., 2016).

Neste contexto, o presente trabalho investigou a capacidade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à meticilina de extratos do micélio e do filtrado de cultivo de cogumelos comestíveis das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Hericium erinaceus* e *Volvariella volvacea*. Além disso, a atividade anti-inflamatória desses extratos etanólicos foi investigada por analises de expressões de mediadores pró e anti-inflamatórios em macrófagos ativados por LPS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Os cogumelos das espécies *P. ostreatus* CC389, *H. erinaceus* CC29 e *V. volvacea* CC94 foram obtidos da coleção da Embrapa Agroenergia, de Brasília – Distrito Federal. Os micélios foram mantidos sob refrigeração (7°C), em placas de petri contendo meio ágar batata dextrose. As cepas de *Staphylococus aureus* resistente e sensíveis à meticilina foram isoladas de leite materno e de crianças na cidade de Vitória da Conquista - BA. As cepas resistentes a meticilina foram caracterizadas como cepas comunidade adquiridas carreadores de cassete cromossômico do tipo SCCmec tipo VI. (ALMEIDA et al., 2014; CARVALHO et al., 2017).

2.2 Cultivo de cogumelos

Os cogumelos foram cultivados no meio POL de Cavazzoni & Adami (1992), que é tradicionalmente utilizado para produção de polissacarídeos por fungos. Os constituintes do meio POL são: 5 g/L de $(NH4)_2SO_4$, 0,2 g/L de $MgSO_4$.7H2O, 1,0 g/L de K_2HPO_4, 2,0 g/L de extrato de levedura, 1,0 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, com o pH entre 6,0 a 6,5. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, para cada cogumelo (*P. ostreatus*, *H. erinaceus* e *V. volvacea)*, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio POL, esterilizados a 121ºC por 15 minutos, inoculados com três discos de ágar de 15 mm de diâmetro colonizados com o micélio fúngico. Os frascos foram agitados a 150 rpm em shaker de bancada, com a temperatura controlada em 25ºC, durante o período de 15 dias. Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo em papel Whatman nº 1 e os líquidos resultantes foram congelados a - 60ºC, para posteriores analises de atividade antibacteriana. Os micélios coletados foram submersos

em álcool etílico absoluto durante 10 dias, para a extração de compostos orgânicos. Posteriormente, filtraram-se os extratos em papel Whatman nº 1 para remoção do micélio, e o solvente foi removido por rotaevaporação. Em seguida os extratos secos foram pesados e resuspendidos em etanol 10% e analisados quando capacidade antibacteriana e anti-inflamatória.

2.3 Atividade antibacteriana.

A sensibilidade das cepas de *S. aureus* frente aos extratos do micélio e filtrados foi determinada usando o método de difusão em ágar, de acordo com o método relatado por Yamac e Bilgili (2006). As bactérias foram cultivadas em caldo BHI e uma alíquota de 100 µL do inóculo bacteriano foi espalhada com uma alça de Drigalski na superfície da placa de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton. Os discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) previamente esterilizados foram colocados sobre o meio inoculado e estes foram embebidos com 10 µL de filtrados ou de soluções de extratos de cogumelos (15 mg/mL). O procedimento foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a 37º C durante 48 h. A atividade antibacteriana foi avaliada medindo o diâmetro da zona de inibição clara em torno de cada disco.

2.4 Atividade anti-inflamatória.

2.4.1 Isolamento de macrófagos e estimulação com LPS.

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados intraperitonealmente com tioglicolato 3%. Depois de 3 dias da estimulação, o animal foi sacrificado e obteve-se o lavado peritoneal inoculando 5 mL de meio RPMI completo. As células foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo ciprofloxacina 50µg/mL. Os macrófagos foram incubados por 24h em estufa de CO_2, a 37° C, e m placas de cultura celular de 24 poços, com a densidade celular de 10^6 por poço. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações de soluções dos extratos de cogumelos (3,0; 2,0; 1,0; 0,5 mg/mL), 1 h antes da adição do estimulante LPS (100 µg/mL). Como controle positivo, as células foram tratadas apenas com o LPS, e para o controle negativo, as células foram tratadas apenas com solução salina tampão fosfato (PBS). O experimento foi realizado em

triplicata. As placas foram incubadas em estufa de CO_2, a 37°C, por 6 h. Após o período, os meios de cultura e os macrófagos foram coletados em eppendorfs, separadamente, e armazenados a - 80° C, para posteriores análises da expressão gênica.

2.4.2 Expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias

Foi realizado RT² qPCR Primer Assay, com primers específicos para avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1 β, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF-α. A reação foi realizada no StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil), utilizando o programa recomendado pelo fabricante. Os dados foram analisados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

2.4.3 Analises estatísticas

Os resultados foram expressos como valores médios ± desvio-padrão. As comparações múltiplas foram realizadas no software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA), utilizando o teste paramétrico Anova, seguido pelo pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Atividade antibacteriana.

O teste de difusão em disco foi utilizado para determinar a atividade antibacteriana dos filtrados de cultivo e dos extratos dos micélios de cogumelos contra cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina. Os resultados mostraram que nenhum extrato/filtrado foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, pois não houve a formação de halo em torno dos discos.

3.2 Expressão de citocinas

Os extratos de micélios dos cogumelos foram usados para avaliar o potencial de atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos ativados por LPS. Sob condições basais, os macrófagos produzem baixos níveis dessas citocinas, enquanto que a estimulação com LPS induz uma alta produção de TNF-α, IL-1β, IL-6. A expressão de citocinas foi alterada nos grupos tratados (Figuras 1, 2 e 3). As expressões de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α, IL-1β e IL-6, foram drasticamente reduzidas em macrófagos estimulados por LPS, previamente tratados com os extratos do cogumelo *H. erinaceus* CC29, quando comparadas com o controle positivo ($p < 0,05$). Nenhuma diferença estatística foi apresentada entre o controle negativo (PBS) e os tratamentos, em todas as concentrações ($p > 0,05$). No entanto, para a citocina anti-inflamatória IL-10, as concentrações que estimularam sua produção foram de 2,0 e 3,0 mg/mL ($p < 0,05$). Para a IL-17, a única concentração que apresentou diferença estatística do controle positivo foi a de 3,0 mg/mL ($p < 0,05$) (Figura 1).

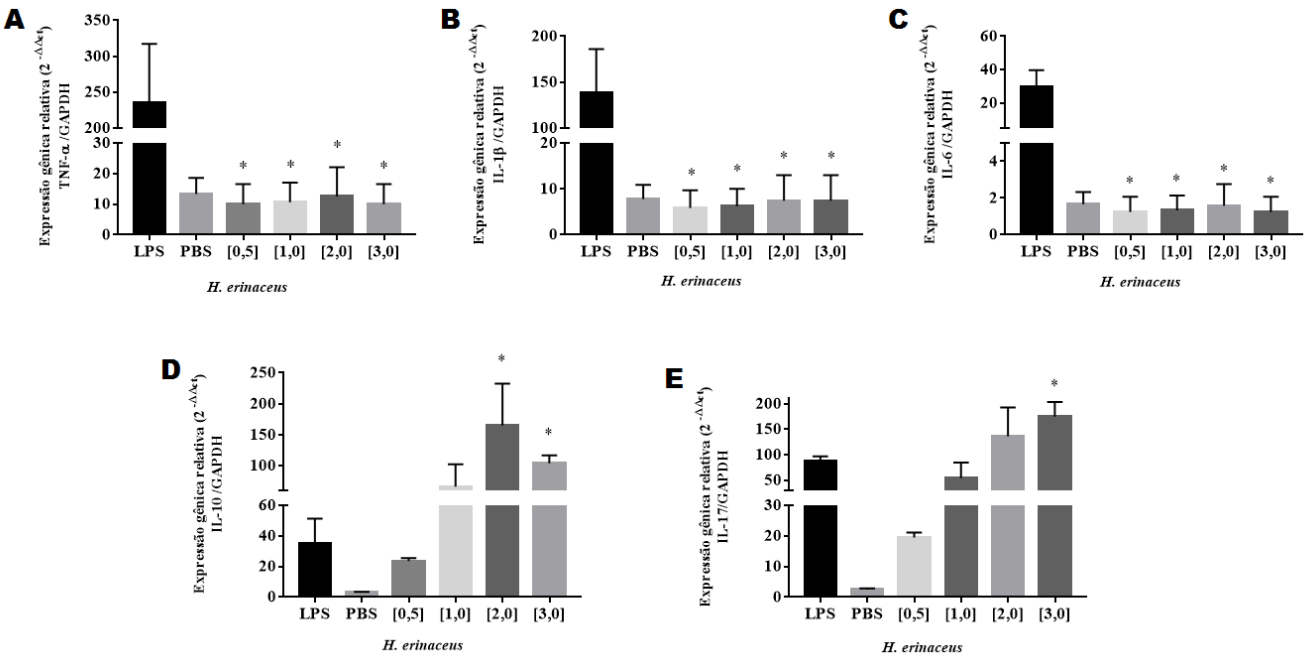

Figura 1. **Expressão gênica relativa em macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com extratos do micélio de *Hericium erinaceus* CC29, em diferentes concentrações (0,5, 1, 2 e 3 mg/mL). (A)** Expressão de TNF-α. **(B)** Expressão de IL-1β. **(C)** Expressão de IL-6. **(D)** Expressão de IL-10. **(E)** Expressão de IL-17. Os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico *Anova-one way* e pós teste de Bonferroni (software GraphPad Prism® versão 7.0). Como controle positivo utilizou-se o LPS e como controle negativo, o PBS.

Foi considerado como nível de significância estatística o valor de p <0,05, representada pelo símbolo *, comparado ao controle positivo (LPS).

A concentração de 3,0 mg/mL do extrato do cogumelo *P. ostreatus* CC389 foi capaz de reduzir a produção das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6, em macrófagos estimulados por LPS (p <0,05). As demais concentrações não diferiram estatisticamente do controle positivo (p >0,05). No entanto, as concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL apresentaram melhores resultados na indução da produção de citocinas anti-inflamatórias, IL- 10 e IL-16 (p <0,05). As concentrações de 1,0 e 3,0 mg/mL se igualaram estatisticamente aos controles positivos (p >0,05) (Figura 2).

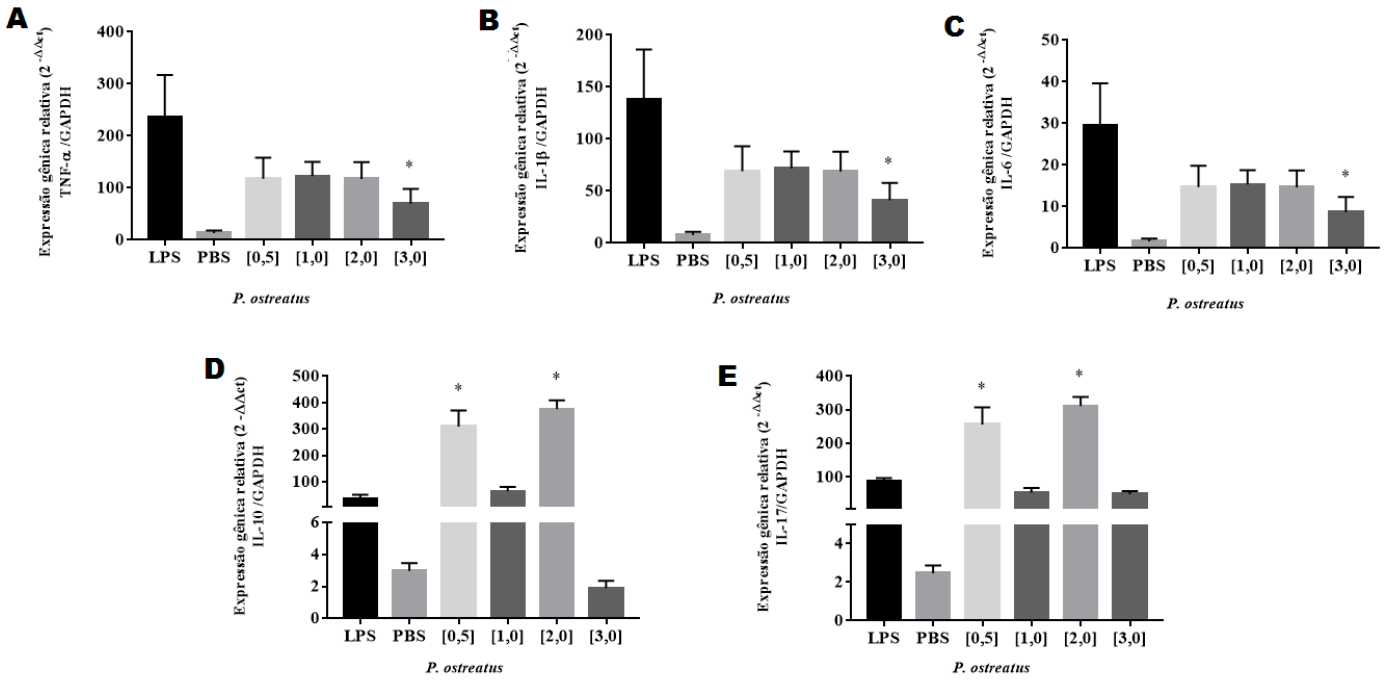

Figura 2. Expressão gênica relativa em macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com extratos do micélio de *Pleurotus ostreatus* CC389, em diferentes concentrações (0,5, 1, 2 e 3 mg/mL). (A) Expressão de TNF-α. **(B)** Expressão de IL-1β. **(C)** Expressão de IL-6. **(D)** Expressão de IL-10. **(E)** Expressão de IL-17. Os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico *Anova-one way* e pós teste de Bonferroni (software GraphPad Prism® versão 7.0). Como controle positivo utilizou-se o LPS e como controle negativo, o PBS. Foi considerado como nível de significância estatística o valor de p <0,05, representada pelo símbolo *, comparado ao controle positivo (LPS).

Os extratos do cogumelo *V. volvacea* CC94, em todas as concentrações, foram capazes de reduzir expressões das citocinas TNF α, IL-1β e IL-6 em comparação com o controle positivo LPS (p <0,05), não apresentando nenhuma diferença estatística em comparação com controle negativo PBS (p >0,05). A concentração que estimulou a produção de IL-10 e IL-17 foi 2,0 mg/mL, pois essa diferiu estatisticamente dos controles e dos demais tratamentos (p <0,05) (Figura 3).

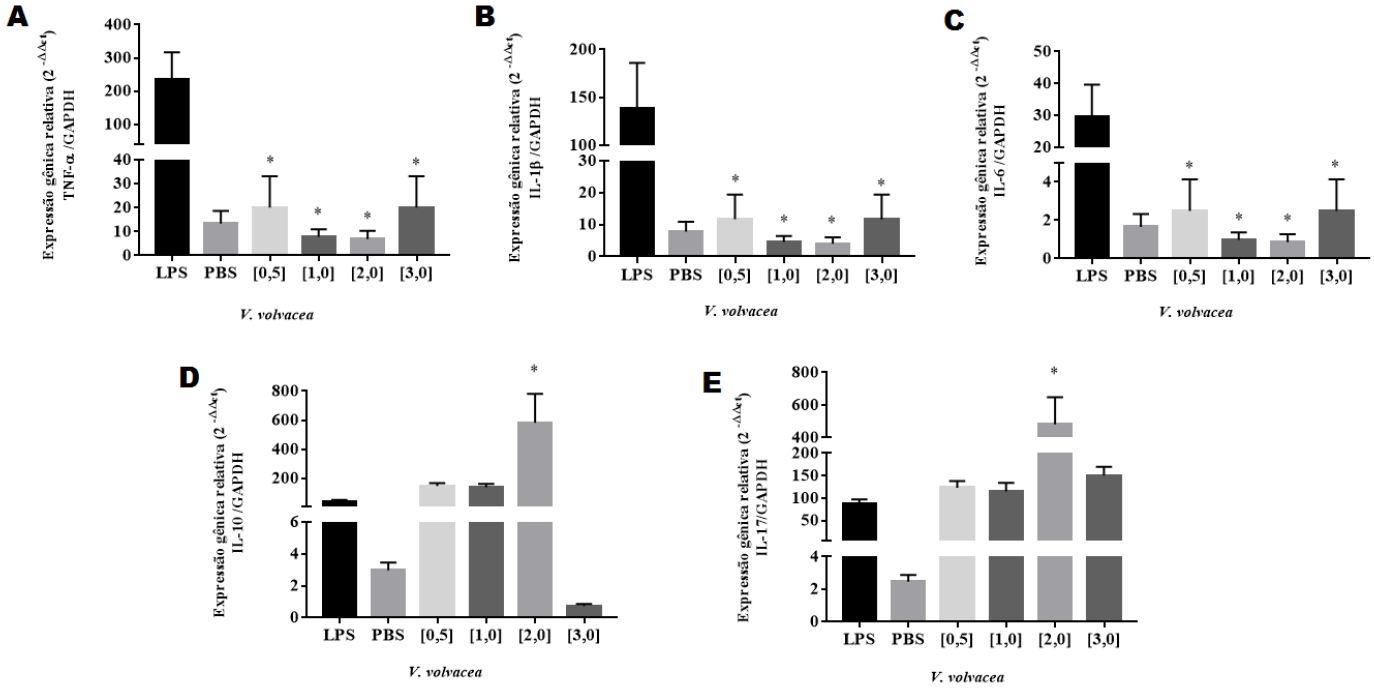

Figura 3. Expressão gênica relativa em macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com extratos do micélio de *Volvariella volvacea* CC94, em diferentes concentrações (0,5, 1, 2 e 3 mg/mL). (A) Expressão de TNF-α. **(B)** Expressão de IL-1β. **(C)** Expressão de IL-6. **(D)** Expressão de IL-10. **(E)** Expressão de IL-17. Os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico *Anova-one way* e pós teste de Bonferroni (software GraphPad Prism® versão 7.0). Como controle positivo utilizou-se o LPS e como controle negativo, o PBS. Foi considerado como nível de significância estatística o valor de p <0,05, representada pelo símbolo *, comparado ao controle positivo (LPS).

4. DISCUSSÃO

Os fungos são bem conhecidos pela capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, que apresentam grande aplicabilidade farmacológica (WIEMANN & KELLER, 2014). A descoberta da penicilina, por Alexandre Fleming em 1928, foi considerada um dos maiores marcos da medicina

moderna. A purificação e caracterização da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum* lançou os alicerces da era dos antibióticos, que posteriormente levou à descoberta de outras classes mais potentes (LOBANOVSKA & PILLA, 2017). Estudos recentes têm mostrado a capacidade de produção de antibióticos naturais por cogumelos. Extratos de diversas espécies apresentam atividade contra microrganismos patogênicos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa, S. aureus, Candida albicans, Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (CHANDRASEKARAN et al., 2016; ADEEYO, LATEEF & GUEGUIM-KANA, 2016). Outros compostos bioativos extraídos de cogumelos foram relatados com propriedades imunomodulatórias ao inibir a superprodução de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos ativados. (CHUNG et al., 2015; YUAN et al., 2017). As citocinas IL-1β e TNF-α são importantes mediadores da resposta inflamatória e estão envolvidas em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. IL-1β ativa de liberação de TNF-α e IL-6, e promove a fase aguda da inflamação. A IL-6 está envolvida na maturação, ativação, diferenciação e manutenção de células imunes. Contudo, também exerce ação anti-inflamatória indireta, por estimular a síntese de IL-10 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). A IL-10 inibe as citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, IL-1 e IL-6. (TERRA et al., 2012; RAMAKRISHNAN et al., 2017). A IL-17 estimula a produção de IL-10 e potencializa a resposta dos macrófagos a essa citocina. A coexistência de IL-17 e IL-10 dispõe as células imunes inatas a restaurar condições anti-inflamatórias (ZIZZO & COHEN, 2013).

O presente estudo, sensibilidades das cepas de *S. aureus* e MRSA aos extratos e filtrados de cogumelos foram testadas usando o método de difusão de disco (DDM). Os resultados mostraram a incapacidade de inibição de crescimento bacteriano dos compostos testados. Surekha et al., (2011) também investigaram os extratos da frutificação de cogumelos comestíveis, em acetato de etila. *Agaricus bisporus* e *P. ostreatus* exibiram um amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo para *S. aureus*, enquanto que os extratos de *V. volvacea* e *Pleurotus sajor-caju* não tiveram o mesmo êxito. No entanto, Ren e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos de oito espécies de cogumelos, incluindo o *H. erinaceus* e nenhum extrato demonstrou atividade pelo método de difusão de disco, nas duas concentrações testadas (3 e 15 mg/mL). Entretanto, ao usar o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), o cogumelo *Cordyceps sinensis* foi capaz de

inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* em 938 μg/mL, e *S. epidermidis* em 469 μg/mL. Além disso, o cogumelo *P. australis* também inibiu o crescimento de *S. epidermidis* em 469 μg/mL. Esses resultados mostram que o método de microdiluição é mais sensível que o DDM na detecção de antibacterianos. Utilizando CIM e CBM também foi demostrada a capacidade antibacteriana contra *S. aureus* e MRSA de extratos de cogumelos comestíveis como *Russula delica, Fistulina hepática* (ALVES, et al., 2012), *Phellinus baumii* (HONG et al., 2016) e *Coriolus versicolor* (MATIJAŠEVIĆ et al., 2016).

Os efeitos dos extratos etanólicos de micélios de cogumelos na expressão de mediadores inflamatórios também foram estudadas neste trabalho. Os resultados indicaram que compostos das três espécies analisadas inibiram significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentaram a expressão de citocinas anti-inflamatórias, em macrófagos estimulados por LPS. Para o *H. erinaceus,* a concentração de extrato que melhor promoveu efeitos anti-inflamatórios foi de 3,0 mg/mL, pois essa foi capaz de reduzir a expressão de TNF-α, IL-1β e IL-6 e aumentar a produção de IL-10 e IL-17, em comparação com o controle positivo ($p < 0,05$). Diversos estudos mostraram efeitos anti-inflamatórios, em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS, de compostos obtidos do corpo de frutificação do *H. erinaceus.* Kim et al. (2012) investigaram compostos de *H. erinaceus* fracionados em diversos solventes orgânicos. Eles observaram que a fração em clorofórmio apresentou uma potente atividade na redução de óxido nítrico (NO), prostaglandina E (2) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses efeitos foram associados a supressão de genes pró-inflamatórios das enzimas óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), através da inibição da atividade das proteínas inflamatórias c-jun N-terminal quinase (JNK) e Fator Nuclear-κB (FN-κB). Da mesma maneira, Mori et al. (2015) verificaram que um extrato solúvel em acetato de etila suprimiu significativamente a produção de TNF-α e IL-6, inibindo a ativação da proteína JNK. Diling et al. (2017) isolaram uma proteína (HEP3) do *H. erinaceus* que exibiu atividade imunomoduladora ao diminuir a superprodução de TNF-α, IL-1β e IL-6, e reduzir a síntese de NO, através da supressão da atividade do FN-κB e da iNOS. Desse modo, pode-se verificar que muitos agentes anti-inflamatórios atuam suprimindo a sinalização do fator de transcrição NF-kB. Esse fator regula a expressão de enzimas associadas à inflamação e genes de citocinas, tais como iNOS,

COX-2, TNF-α e IL-1β, que contêm sítios de ligação NF-κB dentro de seus respectivos promotores (AKESSON et al., 2003).

A redução da produção das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6 pelo extrato do *P. ostreatus* CC389, foi obtida apenas na maior concentração testada (3,0 mg/mL, p <0,05). Moro et al., (2012) estudaram a atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de diversas espécies de cogumelos comestíveis em concentrações de 0,5 mg/mL, incluindo *P. ostreatus*. O pré-tratamento de macrófagos RAW 264.7, ativados por LPS, com os extratos de *Agaricus bisporus, Cantharellus cibarius* e *Lactarius deliciosus* resultou na inibição da produção de NO, IL-1β e IL-6, e reduziu os níveis da expressão de RNAm de iNOS e inibiu a produção. Em contraste, extratos de *Boletus edulis e P. ostreatus* não apresentaram nenhum desses efeitos na concentração testada (0,5 mg/mL). Apesar disso, Jedinak e colaboradores (2011) demonstrou atividade anti-inflamatória de um extrato aquoso concentrado do *P. ostreatus* liofilizado nas concentrações de 12,5 a 100 μg/mL. Tal extrato foi capaz de suprimir a secreção de TNF-α e IL-6 induzida por LPS em macrófagos RAW264.7, e inibiu a produção de prostaglandina E2 e óxido nítrico através da regulação negativa da expressão de COX-2 e iNOS, respectivamente. Além disso, também foi comprovado que atividade anti-inflamatória desse extrato foi mediada pela inibição da sinalização do Fator Nuclear-κB e da proteína ativadora-1 (AP-1). A estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-17, pelo *P. ostreatus* CC389 no presente estudo, foi obtida nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL (p <0,05), o que não foi observado nas concentrações de 1,0 e 3,0 mg/mL (p >0,05). Por tratar-se de um extrato micelial e não de compostos isolados, sugere-se a hipótese da presença de mais de uma substância com capacidade promover a expressão de tais citocinas pelos macrófagos ativados, podendo cada uma delas apresentar essa atividade em diferentes concentrações, em que se encontram no extrato.

O extrato do micélio de *V. volvacea* CC94, a 2,0 mg/mL, apresentou uma capacidade anti-inflamatória efetiva, pois reduziu significativamente as expressões das citocinas TNF- α, IL-1β e IL-6 e estimulou a produção de IL-10 e IL-17 (p <0,05). Apesar disso, a maioria dos estudos descrevem que componentes extraídos do *V. volvacea* apresentam resultados de estimulação do sistema imune. Proteínas imunomoduladoras produzidas por fungos (FIPs) são componentes bioativos bem documentados em cogumelos comestíveis e medicinais. Em 1997, um proteína

imunomoduladora do *V. volvacea* foi purificada, identificada e designada por FIP-vvo. Essa proteína apresentou a capacidade de hemaglutinação e estimulou a proliferação máxima de linfócitos de sangue periférico humano numa concentração de 5,0 μg/mL. A administração repetida de FIP-vvo em camundongos reforçou a expressão de citocinas pro-inflamatórias IL-2, IFN-γ e TNF-α (HSU et al., 1997). Outra proteína foi purificada, em 1998, do corpo frutífero e micélio *V. volvacea* (VVL). Essa proteína demonstrou as mesmas propriedades da FIP-vvo, apesar de possuírem estruturas moleculares distintas (SHE et al., 1998). Em 2014, Sun et al., clonaram o gene que codifica o FIP-vvo, a partir do micélio de *V. volvacea*, na levedura *Pichia pastoris*. A FIP-vvo recombinante exibiu capacidade imunomoduladora semelhante à forma nativa. O reFIP-vvo estimulou significativamente a proliferação de linfócitos no baço de camundongos e aumentou o nível de expressão de IFN-γ em esplenócitos murinos. Mais estudos são necessários para compreender esse efeito contrário observado no presente estudo, principalmente se há a presença dessas substâncias na cepa testada.

Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF-α, IL-1β e IL-6, estão envolvidas no processo de dor patológica e febre (ZHANG & NA, 2007), e muitos estudos indicam que doenças crônicas estão fortemente associadas à níveis elevados dessas citocinas, como artrite reumatoide (MOELANTS et al., 2013), diabetes (MIRZA et al., 2012) e alzheimer (SWARDFAGER et al., 2010). Além disso, o ambiente pró-inflamatório nessas doenças é parcialmente sustentada pela baixa expressão de genes de citocinas anti-inflamatória (RIBIZZI et al., 2010). A citocina IL-10 reprime as respostas pró-inflamatórias e limita os danos desnecessários dos tecidos causados pela inflamação, sendo indispensável no tratamento de doenças auto-imunes (OUYANG et al., 2010). Assim, aplicação clínica de supressores/antagonistas de citocinas pró-inflamatória e promotores de citocinas anti-inflamatória pode ser efetiva no tratamento de muitas doenças causadas por distúrbios inflamatórios. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que alguns componentes presentes nos extratos de cogumelos podem minimizar a cascata de eventos que ocorrem na inflamação, sendo este o primeiro relatório que descreve a capacidade de produção de compostos anti-inflamatórios por *V. volvacea*. Os extratos etanólicos de cogumelos das espécies analisadas foram eficientes na supressão dos principais mediadores pró-inflamatórios, além de promover a expressão dos anti-inflamatórios.

Diante disso, pode-se concluir que é possível obter substâncias de grande interesse farmacológico, com atividade imunomoduladora, por meio do cultivo micelial de cogumelos comestíveis e medicinais. E a identificação e caracterização desses compostos bioativos é a chave para a conquista de novos agentes terapêuticos para o tratamento de inúmeras doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS

ADEEYO, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of the Production of Extracellular Polysaccharide from the Shiitake Medicinal Mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) Using Mutation and a Genetic Algorithm-Coupled Artificial Neural Network (GA-ANN). *Int J Med Mushrooms,* v. 18, n. 7, p. 571-81, 2016.

AKESSON, L. H.; PERO R. W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. An extract of Uncaria tomentosa inhibiting cell division and NF-kappaB activity without inducing cell death. *International Immunopharmacology*, v. 3, p. 1889–1900, 2003.

ALEGRE, M. L.; CHEN,L.; DAVID, M. Z.; BARTMAN, C. VAVRA, S. B. KUMAR, N.; CHONG, N. S.; DAUM, R.S. Impact of *Staphylococcus aureus* USA300 Colonization and Skin Infections on Systemic Immune Responses in Humans. *J. Immunol.*, v. 197, p. 1118-1126, 2016.

ALMEIDA, J. B.; CARVALHO, S. P.; ALMEIDA, A. L. V.; CAMPOS, G. B.; OLIVEIRA, M. V.; TIMENETSKY, J.; MARQUES, L. M. Detection, Antibiotic Resistance, and Pathogenicity of Staphylococci in Samples from a Brazilian Human Milk Bank. *Breastfeeding Medicine,* v. 9, 2014.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Planta Med,* v. 78, p. 1707–1718, 2012.

BARBER, K. E.; TIRMIZI, A.; FINLEY, R.; STOVER, K. R. Dalbavancin Use for the Treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *J. Pharmacol. Pharmacother.*, v. 8, n. 2, p. 77-79, 2017.

BARNECHE, S.; ALBORÉS, S.; BORTHAGARAY, G.; CERDEIRAS, M.P.; VÁZQUEZ, A. Anti-MRSA Activity of Fruiting Body Extracts of Spectacular Rustgill Mushroom, Gymnopilus junonius (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms, v. 19, n. 3, p. 243-248, 2017.

BASKARAN, A.; CHUA, K. H.; SABARATNAM, V.; RAVISHANKAR RAM, M.; KUPPUSAMY, U. R. *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H2O2 stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. *BMC Complement Altern Med,* v. 17, n. 1, 2017.

BEATTIE, K. D.; ROUF, R.; GANDER, L.; MAY, T. W.; RATKOWSKY, D.; DONNER, C. D.; GILL, M.; GRICE, I. D.; TIRALONGO, E. Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus Cortinarius. *Phytochemistry,*v. 71, p. 948-55, 2010.

CABRAL, D. L. V. Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatórias. 2014. 77 f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco - Recife, 2014.

CARVALHO, S. P.; ALMEIDA, J. B.; ANDRADE, Y. M. F .S.; SILVA, L. S. C.; OLIVEIRA, A. C.; NASCIMENTO, F. S.; CAMPOS, G. B.; OLIVEIRA, M. V.; TIMENETSKY, J.; MARQUES, L. M. . Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC mec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis.*, v. 729, 2017.

CASTIER, M. B.; KLUMB, E. M.; ALBUQUERQUE, E. M. N. O tratamento das doenças sistêmicas reumatológicas: uma análise crítica do uso dos AINHs, considerando o risco cardiovascular. *Revista HUPE,* v. 12, n. 1, p. 74-80.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible muschrooms. *Italian Journal of Food Science*, n. 1, p.9-15, 1992.

CHANDRASEKARAN, G.; LEE, Y. C.; PARK, H.; WU, Y.; SHIN, H. J. Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (agaricomycetes). *int j med mushrooms*, v. 18, n. 4, p. 291-9, 2016;

CHUNG, M. Y.; JUNG, S. K.; LEE, H. J.; SHON, D. H.; KIM, H. K. O extrato de etanol de Sarcodon asparatus atenua as respostas inflamatórias em ratos com dificuldade de lipopolisacarídeos e macrófagos murinos. J Med Food, v. 18, n. 11, p. 1198-206, 2015.

CONSTANCE, J. E.; REITH, D.; WARD, R. M. ; BALCH, A.; STOCKMANN, C.; KORGENSKI, E. K.; THORELL, E. A.; SHERWIN, C. M. T. Risk of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated renal dysfunction among neonates diagnosed with patent ductus arteriosus and treated with gentamicin. *J Perinatol*, p. 1-10, 2017.

DILING, C.; CHAOQUN, Z.; JIAN, Y.; JIAN, L.; JIYAN, S.; YIZHEN, X.; GUOXIAO, L. Immunomodulatory Activities of a Fungal Protein Extracted from *Hericium erinaceus* through Regulating the Gut Microbiota. *Front Immunol.*, v. 8, 2017.

DU, B.; YANG, Y.; BIAN, Z.; XU, B. Characterization and Anti-Inflammatory Potential of an Exopolysaccharide from Submerged Mycelial Culture of *Schizophyllum commune*. *Front Pharmacol*., v. 8, 2017.

ELSAYED, A. E; ENSHASY, H. E.; WADAAN, M. A. M.; AZIZ, R. Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, 2014.

FERNANDES, P. A.; SILVA, M. G.; CRUZ, A. P.; PAIVA, J. A. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos. DSG - Direção Geral da Saúde, LISBOA. 2016.

FRANCO, M.; BRITO, T. BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. *Patologia: processos gerais.* 6.ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2015. 338 p.

GREENE, J. R.; HARRIS, D. N. *Patologia e terapêuticas para farmacêuticos: bases para a prática da farmácia clínica.* 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012. 968 p.

GRZYWACZ, A.; ARGASINSKA, J. G.; KALA, K.; OPOKA, W.; MUSZYNSKA, B. Anti-Inflammatory Activity of Biomass Extracts of the Bay Mushroom, *Imleria badia* (Agaricomycetes), in RAW 264.7 Cells. *Int J Med Mushrooms*, v. 18, n. 9, p. 769-779, 2017.

HARDGRIB, N.; WANG, M.; JURIK, A. G.; PETERSEN, K. K. Life-threatening MRSA sepsis with bilateral pneumonia, osteomyelitis, and septic arthritis of the knee in a previously healthy 13-year-old boy: a case report. *Acta Radiologica Open*, v. 5, n. 10, p 1–7, 2016.

HONG, S. B.; RHEE, M. H.; YUN, B. S.; LIM, Y. H.; SONG, H. G.; SHIN, K. S. Synergistic Anti-bacterial Effects of *Phellinus baumii* Ethyl Acetate Extracts and β-Lactam Antimicrobial Agents Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Lab Med*., v. 36, n. 2, p.111-6, 2016.

HSU, H. C.; HSU, C.I.; LIN, R. H.; KAO, C. L.; LIN, J. Y. FIP-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochem J*., v. 323, n. 2, p. 557-65, 1997.

JEDINAK, A.; DUDHGAONKAR, S.; WU, Q.; SIMON, J.; SLIVA, D. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-κB and AP-1 signaling. *Nutrition Journal*, v. 10, 2011.

KIM, Y. O.; LEE, S. W. OH, C. H.; RHEE, Y. H. *Hericium erinaceus* suppresses LPS-induced pro-inflammation gene activation in RAW264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v. 34, n. 3, p. 504-12, 2012.

LALIKIAN, K.; PARSIANI, R.; WON, R.; CHANG, E.; TURNER, R. B. Ceftaroline for the treatment of osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus:* a case series. *J Chemother*, p. 1-5, 2017.

LI, N.; ZHU, L.; XU, G.; GE, T.; QI, F.; LI, M. Optimal teicoplanin dosage regimens for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in endocarditis patients and renal failure patients. *J Chemother*, p. 1-7, 2017.

LIKTOR-BUSA, E.; KOVACS, B.; URBAN, E.; HOHMANN, J.; VANYOL, A. Investigation of Hungarian mushrooms for antibacterial activity and synergistic effects with standard antibiotics against resistant bacterial strains. Letters in *Applied Microbiology*, v. 62, p. 437—443, 2016.

LIU, X. T.; WINKLER, A. L.; SCHWAN, W. R.; VOLK, T. J.; ROTT, M.; MONTE, A. Antibacterial Compounds from Mushrooms II: Lanostane Triterpenoids and an Ergostane Steroid with Activity Against Bacillus cereus Isolated from *Fomitopsis pinicola*. *Planta Med*, v. 76, n. 5, p. 464-466, 2010.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med.*, v. 90, n 1, p. 135–145, 2017.

MA, K.; BAO, L.; HAN, J.; JIN, T.; YANG, X.; ZHAO, F.; LI, S.; SONG, F.; LIU, M.; LIU, H. New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom. *Stereum hirsutum. Food Chem*, v. 143, p. 239-45, 2014.

MATIJAŠEVIĆ, D.; PANTIĆ, M.; RAŠKOVIĆ, B.; PAVLOVIĆ, V.; DUVNJAK, D.; SKNEPNEK, A.; NIKŠIĆ, M. The Antibacterial Activity of *Coriolus versicolor* Methanol Extract and Its Effect on Ultrastructural Changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. *Front Microbiol*, v. 7, 2016.

MELCARNE, L.; GARCÍA-IGLESIAS, P.; CALVET, X. Management of NSAID-associated peptic ulcer disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 10, n. 6, p. 723-733, 2016.

MIRZA, S.; HOSSAIN, M.; MATHEWS, C.; MARTINEZ, P.; PINO, P.; GAY, J. L.; RENTFRO, N. MCCORMICK, J. B. FISHER-HOCHA, S. P. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: A cross-sectional study. *Cytokine*, v. 57, n. 1, p. 136-142, 2012.

MOELANTS, E. A. V.; MORTIER, A.; VAN DAMME, J.; PROOST, P. Regulation of TNF-α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology*, v. 91, p. 393-401, 2013

MORI, K.; OUCHI, K.; HIRASAWA, N. The Anti-Inflammatory Effects of Lion's Mane Culinary-Medicinal Mushroom, Hericium erinaceus(Higher Basidiomycetes) in a Coculture System of 3T3-L1 Adipocytes and RAW264 Macrophages. *Int J Med Mushrooms.*, v. 7, p. 609-18, 2015.

MORO, C.; PALACIOS, I.; LOZANO, M.; D'ARRIGO, M.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; MARTÍNEZ, J. A.; LAFUENTE, A. G. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, v. 130, p. 350–355, 2012.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.*, v. 29, p. 71-109, 2011.

RAMAKRISHNAN, V.; AKRAM HUSAIN, R. S.; AHMED, S. S. Genetic predisposition of IL-10 promoter polymorphisms with risk of multiple sclerosis: A meta-analysis. *J Neuroimmunol*., v. 306, p. 11-18, 2017.

RASHED, R.; YOUNIS, F. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Sacroiliac Joint Septic Arthritis in an Adult Patient Treated with Daptomycin. *J Bone Jt Infect*., v. 2, n. 3, p. 143-148, 2017.

REN, L. et al. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 3, n. 2, p. 41-51, 2014.

RIBIZZI, G.; FIORDORO, S.; BAROCCI, S.; FERRARI, E.; MEGNA, M. Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. *Neurol Sci.*, v. 31, n. 3, p. 321-5, 2010.

SHE, Q. B.; NG, T. B.; LIU, W. K. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochem Biophys Res Commun*., v. 247, n. 1, p. 106-11, 1998

SUN, X.; HUANG, W.; XIAO, S.; LIANG, C.; ZHANG, S.; LIU, Z.; SUN, F. Extracellular expression and efficient purification of a functional recombinant *Volvariella volvacea* immunomodulatory protein (FIP-vvo) using Pichia pastoris system. *Protein Expr Purif*., v. 9, p.95-100, 2014.

SUREKHA, CH.; KALADHAR, D. S. V. G. K.; RAJU, SRIKAKARLAPUDI, J. R. HASEENA Evaluation of antioxidant and antimicrobial potentiality of some edible mushrooms. *Int J Adv Biotechnol Res.*, v. 2, n. 1, p.130-134, 2011.

SWARDFAGER, W.; LANCTÔT, K.; ROTHENBURG, L.; WONG, A.; CAPPELL, J.; HERRMANN, N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, v. 68, n. 10, p. 930-41, 2010.

TERRA, T.; SILVA, S. A. G.; PINTO, V. S.; DUTRA, P. M. L. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. *Rev Bras Med Esporte*, v.18, n. 3, 2012.

VARGA, Z.; SABZWARI, S. R. A.; VARGOVA, V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. *Cureus*, v. 9, n. 4, 2017.

WAN-MOHTAR, W.A; YOUNG, L.; ABBOTT, G. M.; CLEMENTS, C.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Antimicrobial Properties and Cytotoxicity of Sulfated (1,3)-β-D-Glucan from the Mycelium of the Mushroom *Ganoderma lucidum. J Microbiol Biotechnol*, v. 26, n. 6, p. 999-1010, 2016.

WIEMANN, P.; KELLER, N. P. Strategies for mining fungal natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*., v. 41, p. 301–313, 2014.

XIONG, Y.Q.; SHARMA-KUINKEL, B.K.; CASILLAS-ITUARTE, N.N.; FOWLER, V.G. JR.; RUDE, T. DIBARTOLA, A.C.; LINS, R.D.; ABDEL-HADY, W.; LOWER, S.K.; BAYER, A.S. Endovascular infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are linked to clonal complex-specific alterations in binding and invasion domains of fibronectin-binding protein A as well as the occurrence of fnbB. *Infect Immun.*, v. 83, n.12, p. 4772-80, 2015.

YAMAC, M. & BILGILI, F. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharm. Biol*, v. 44, p. 660–7, 2006.

YUAN, B.; ZHAO, L.; RAKARIYATHAM, K.; HAN, Y.; GAO, Z.; MUINDE, B. K.; HU, Q.; XIAO, H. Isolation of a novel bioactive protein from an edible mushroom Pleurotus eryngii and its anti-inflammatory potential. *Food Funct.* v. 8, n. 6, 2017.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHENG, S.; LIU, Q.; ZHANG, G.; WANG, H.; NG, T. B. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Clitocybe sinopica*. *Acta Biochim Pol.*, v. 57, n. 1, p. 43-8, 2010.

ZIZZO, G.; COHEN, P. L. IL-17 Stimulates Differentiation of Human Anti-inflammatory Macrophages and Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils in Response to IL-10 and Glucocorticoids. *J Immunol.*, v. 190, n. 10, p. 5237–5246, 2013.

CAPITULO 2

Volvariella volvacea produz naftoquinonas e antraquinona com potencial antioxidante e anti-inflamatório

Volvariella volvacea produz naftoquinonas e antraquinona com potencial antioxidante e anti-inflamatório

Bruna S. Menezes[1]; Lucas S. Solidade[1]; Aparecido A. Conceição[1]; Manoel N. Santos Junior[1]; Romário A. Santana[2]; Gildomar L. Valasques Júnior[2]; Patrícia L. Leal[1]; Felix G. Siqueira[3]; Lucas M. Marques[1].

1. Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista, Bahia.

2. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Bahia.

3. Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal.

RESUMO

Os cogumelos comestíveis têm sido amplamente estudados como fontes de compostos bioativos de interesse para indústria farmacêutica e alimentícia. O objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de pigmentos com atividades biológicas pelo cogumelo *Volvariella volvacea* CC94, a partir da cultura em fermentação submersa. O planejamento experimental Doehlert foi utilizado para determinar as condições ótimas de agitação, concentração inicial de glicose e tempo de cultivo para produção de pigmentos. A composição química do pigmento foi determinada por análises de espectroscopias no IV e RMN, juntamente com a UPLC-MS. Sua atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH e ABTS. E para as análises de atividade anti-inflamatória foram utilizados macrófagos peritoneais murinos ativados por LPS, e a expressão gênica das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-17 foi determinada por RT qPCR. Como resultados, verificou-se que a agitação a 200 rpm e a concentração de glicose ≥ 20 g/L promoveram os melhores rendimentos do pigmento. Os compostos químicos identificados foram duas naftoquinonas, fusarubina e dihidrofusarubina, e uma antraquinona, a bostricoidina sendo o primeiro seu composto majoritário. O pigmento apresentou atividade antioxidante ao capturar 66% do radical $DPPH^{\bullet+}$, na concentração de 7,0 µg/mL, e 45% do $ABTS^{\bullet+}$ na concentração de 9,2 µg/mL. O pigmento também mostrou efetiva capacidade anti-inflamatória ao reduzir a superexpressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 e promover a produção das anti-inflamatórias IL-10 e IL-17, em macrófagos murinos ativados por LPS ($p < 0,05$). Assim, o *V. volvacea*, em condições otimizadas de cultivo, mostrou-se uma fonte promissora de pigmentos naturais biologicamente ativos.

Palavras-chave: Cogumelo. Pigmento. Fusarubina. Dihidrofusarubina. Bostricoidina. Radicais Livres. Citocinas.

1. INTRODUÇÃO

O *Volvariella volvacea* (Bull.), também conhecido como cogumelo de palha é uma espécie de fungo comestível. Esse cogumelo é cultivado em escala industrial em muitas partes da Ásia, usando resíduos agrícolas, principalmente a palha de arroz, como substratos de crescimento (BAO et al., 2013). O *V. volvacea* é muito apreciado no Sudeste Asiático por seu sabor e valor nutricional (ZHANG *et al*, 2011). Além disso, é amplamente utilizado no sistema medicinal tradicional da Índia, e inúmeras investigações científicas têm comprovado as atividades terapêuticas deste cogumelo (ROY et al., 2014). Muitos estudos têm explorado os atributos nutracêuticos e as atividades biológicas do *V. volvacea*. Componentes isolados do corpo de frutificação e do micélio deste cogumelo tem sido relatados com efeitos cardioprotetor (PUNITHA & RAJASEKARAN, 2016), antimicrobiano (SILVA et al., 2010), antitumoral e antioxidante (MATHEW et al., 2008), e anticâncer (WU et al., 2011). Entretanto, nenhum trabalho identificou a capacidade produção de pigmentos por esse fungo.

Algumas espécies de cogumelos são produtores de pigmentos naturais, como betalaínas, carotenóides e outros terpenóides. Mas a maioria dos pigmentos presentes em fungos superiores são quinonas (VELÍŠEK & CEJPEK, 2011; STINTZINGA & SCHLIEMANN, 2007; BARROS et al., 2008; BAI et al., 2013). As quinonas pertencem à classe dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO) e são classificadas de acordo com o tipo de sistema aromático, em benzoquinonas (anel benzênico), naftoquinonas (anel naftalênico), antraquinonas (anel antracênico) e fenantraquinonas (anel fenantrênico) (SOUSA et al., 2016). As naftoquinonas são membros importantes da família das quinonas. São metabolitos secundários derivados do naftaleno, encontrados em plantas superiores, bactérias e fungos, como o basidiomiceto *Quambalaria cyanescens.* Estas substâncias apresentam uma variedade de estruturas químicas que exibem diversas atividades biológicas (SOARES et al., 2017; STODŮLKOVÁ et al., 2015;).

As propriedades farmacológicas das naftoquinonas naturais e sintéticas são diversificadas, apresentando atividades antimutagênicas e antioxidantes (KUMAR et al., 2013); citotoxicidade contra linhagens celulares cancerígenas (KISHORE, 2014); atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e antifúngica contra *Candida albicans* resistentes a fluconazol (FRCA) (SREELATHA et

al., 2014); potentes inibidores da replicação de vírus, como o vírus da dengue (COSTA et al., 2013); e potencial no tratamento de pessoas com malária, infectadas pelo *Plasmodium falciparum* (ISBA et al., 2015). Extratos brutos e compostos manipulados contendo 1,4-naftoquinonas estão sendo usados pela indústria farmacêutica (KISHORE et al., 2014). Além disso, as naftoquinonas, historicamente, têm sido utilizadas como fortes corantes naturais em alimentos, cosméticos e em tingimento de tecidos (CSEKE et al., 2006; SCHIOZER & BARATA, 2007). Exemplo disso são as naftoquinonas e seus derivados extraídos de plantas, como shikonin e alkannin, encontrados em espécies do gênero *Alkanna ssp.* (TAPPEINER et al., 2014); Lawsone (2- hidroxi-1,4-naftoquinona) extraído de folhas da planta de henna (*Lawsonia inermis*) e o juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) encontrado em plantas da família das nogueiras (família Juglandaceae) (BECHTOLD, 2009).

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de pigmentos da classe das naftoquinonas pelo cogumelo comestível *Volvariella volvacea* CC94, a partir da cultura em fermentação submersa. O planejamento experimental Doehlert, com representação em superfície de resposta, foi utilizado para determinar as condições ótimas de agitação, concentração inicial de glicose e tempo de cultivo para produção de pigmentos. Além disso, foram analisadas a composição química do pigmento e seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e citotóxico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O cogumelo *Volvariella volvacea* CC94 foi obtido da coleção da Embrapa Agroenergia, de Brasília – Distrito Federal. O micélio foi mantido sob refrigeração (7°C), em placas de petri contendo meio ágar batata dextrose.

2.2 Planejamento Experimental para produção de Pigmento.

Foi utilizado o planejamento experimental Doehlert (DOEHLERT, 1970), com representação em superfície de resposta para avaliar as condições ótimas de produção do pigmento pelo *V. volvacea*, usando fermentação submersa. As variáveis analisadas

foram a agitação e a concentração inicial de glicose, ambas em função tempo de incubação. As equações 1 e 2 descrevem o modelo de regressão do sistema, que inclui os termos de interação:

Equação 1: Influência da Agitação e Tempo de cultivo na produção de pigmento.

$$\mathbf{Y_1 = \beta_0 + \beta_1.A + \beta_2.T + \beta_{11}.A^2 + \beta_{22}.T^2 + \beta_{12}.A.T + \varepsilon_{12}}$$

Equação 2: Influência da Concentração de Glicose e Tempo de cultivo na produção de pigmento.

$$\mathbf{Y_2 = \beta_0 + \beta_1.G + \beta_2.T + \beta_{11}.G^2 + \beta_{22}.T^2 + \beta_{12}.G.T + \varepsilon_{12}}$$

Em que **Y** é a resposta prevista, isto é, a concentração de pigmento; **A**, **T e G** são as variáveis independentes: Agitação, Tempo e Glicose, respectivamente. E os coeficientes de regressão são os seguintes: β_0 é o termo de intercepção; β_1, β_2 são os coeficientes para efeitos lineares; β_{11} e β_{22} são coeficientes quadráticos; e β_{12} é o coeficiente de efeito de interação; ε_{12} representa o erro experimental.

2.2.1 Influência da agitação e tempo de fermentação na produção de pigmento

Uma matriz Doehlert foi aplicada para determinar as condições ótimas de agitação e tempo para produção de pigmentos por *V. volvacea*. O número de experimentos aplicados (N) é dado por $N = n^2 + n + n_0$, onde n é o número de variáveis e n_0 é o número de pontos centrais. Neste estudo, o valor n_0 foi fixado em 3; assim, com dois fatores (agitação e tempo), o total de pontos da matriz Doehlert foi igual a 9. Réplicas do ponto central das variáveis foram realizadas para validar o modelo por meio de uma estimativa de variância experimental. O tempo (dias) foi estudado em cinco níveis (1, 4, 7, 10 e 13) e agitação (rpm) em três níveis (0, 100 e 200). Os valores reais e os valores codificados correspondentes se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Valores reais e valores codificados correspondentes para aplicação na produção de pigmentos por *V. volvacea.*

Variáveis Independentes		**Valores codificados e reais**						
		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866	1
Tempo (dias)	X1	1		4	7	10		13
Agitação (rpm)	X2		0		100		200	

O cultivo de *V. volvacea* foi realizado mediante a inoculação de três discos de 15 mm de ágar batata dextrose com micélio fúngico em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura POL [5 $g.L^{-1}$ de $(NH4)_2SO_4$, 0,2 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H2O$, 1,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 1,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 20 $g.L^{-1}$ de glicose], previamente esterilizado a 121ºC por 15 min, com pH ajustado entre 6,0 e 6,5 e incubação à 25°C. Ao final dos ensaios fermentativos, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min para separação do sobrenadante e biomassa fúngica, e os pigmentos presentes nos sobrenadantes foram extraídos com clorofórmio. Para isso, 3 mL dos sobrenadantes foram misturados, em tubos de ensaio, com o mesmo volume de clorofórmio (proporção de 1:1), utilizando um vórtex por 30 segundos. Após a divisão de fases, a porção aquosa foi eliminada, e o clorofórmio contendo o pigmento foi submetido a leitura em espectrofotômetro, a 400 nm, para a quantificação do mesmo (item 2.3.1). Em uma das amostras, o clorofórmio foi removido por evaporação à temperatura ambiente e o pigmento seco foi pesado e resuspendido em clorofórmio, em concentração preestabelecida, para realizar curva de calibração.

2.2.2 Influência da concentração inicial de glicose e tempo de fermentação

Uma segunda matriz Doehlert foi aplicada para avaliar a influência da variação da quantidade de glicose no meio de cultura na produção de pigmentos. O total de pontos da matriz Doehlert também foi de 9, utilizando duas variáveis (concentração de glicose e tempo). A glicose (g/L) foi estudada em cinco níveis (2, 7, 12, 17 e 22), e o tempo (dias) em três (3, 6 e 9). Os valores reais e os codificados correspondentes se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Valores reais e valores codificados correspondentes para aplicação na produção de pigmentos por *V. volvacea*

Variáveis Independentes		Valores codificados e reais						
		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866	1
Tempo (dias)	X1		3		6		9	
Glicose (rpm)	X2	2		7	12	17		22

O cultivo de *V. volvacea* e a extração do pigmento do meio fermentado seguiram o mesmo protocolo descrito no item anterior (2.2.1), aplicando as variações da concentração de glicose no meio POL e tempo de fermentação conforme a matriz acima. Foi mantida a agitação que melhor induziu a mudança de coloração no meio de cultura, identificada no item 2.2.1.

2.3 Identificação do Pigmento

2.3.1 Varredura por espectrofotometria UV/Vis e Infravermelho

A varredura em UV foi realizada no espectrofotômetro modelo Cary50conc uv-visível, utilizando o programa CaryWinUV, com o intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. A análise de Infravermelho foi feita no equipamento Spectrum two, marca PerkinElmer FTIR Spectrometer.

2.3.2 Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massa

As análises cromatográficas de ultraeficiência foram realizadas em um cromatógrafo acoplado a dois espectrômetros de massas em série (UPLC-QTOF Waters Acquity/Xevo) com uma interface de ionização por electrospray (ESI). As separações foram efetuadas em uma coluna Waters Acquity BEH C18 (150 mm × 2,1 mm, 1,7μm). A fase móvel foi composta por H2O (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico (0,1% v/v). O gradiente de eluição variou de 2 – 95%, em uma vazão de 500 μL min-1. As frações foram analisadas nos modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI) em uma faixa de 100 – 1200 Da. As condições ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão cone 40 V, temperatura da fonte 120 °C,

temperatura de dessolvação de 330 °C, fluxo de gás de cone de 20 L h-1, o fluxo de gás dessolvatação 600 L h-1, e MCP (microcanais tensão da placa) – detector a 1900 V. A identificação dos compostos foi feita através dos seguintes parâmetros: (1) fórmula molecular deduzida a partir da massa exata (4 casas decimais), considerando um erro de massa de 5 ppm; (2) padrão isotópico do íon (i-fit) e (3) o padrão de fragmentação do íon comparado com dados da literatura.

2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear – RMN

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^{1}H e ^{13}C), uni e bidimensionais, foram realizadas em um espectrômetro Agilent DD2 (14,1 T), equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm, operando nas frequências do ^{1}H e ^{13}C a 599,56 e 150,77 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em 0,6 mL de clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, Cambridge Isotope Laboratories) e analisadas em tubos de vidro de 5 mm. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de hidrogênio das moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado (δ_H 7,26) e pelo pico central de carbono do solvente deuterado (δ_C 77,23). As análises foram realizadas a 26ºC.

2.4 Atividade antioxidante

2.4.1 Radical DPPH

A atividade antioxidante do pigmento foi determinada pela capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2- picrilhidrazil (DPPH), conforme o método descrito por Brand-Williams et al., (1995), com modificações segundo KIM et al., (2002). Em diferentes tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de 100 μL de diferentes diluições da solução do pigmento e 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH. Os tubos foram homogeneizados cuidadosamente e deixados em repouso ao abrigo da luz por 20 minutos. Ao final, absorbância foi medida a 517 nm e a capacidade de sequestrar o radical (CSR), evidenciada pela descoloração da DPPH, foi calculada em relação ao controle (sem antioxidante), conforme a seguinte:

$$CRS = \frac{Absorbância\ DPPH\ puro - Absorbância\ DPPH + Amostra}{Absorbância\ DPPH\ puro} \times 100$$

2.4.2 Radical ABTS

A atividade de captura de radical livre $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi medida pelo método de Arnao, Cano e Acosta (2001), com modificações. A solução estoque de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol até obter-se uma absorbância de 0,70 ± 0,05 em 734 nm. No escuro, alíquotas de 100 µl de diferentes diluições da solução do pigmento foram transferidas para tubos de ensaio com 2,9 mL da solução de radical ABTS e homogeneizadas. Após 5 min, registraram-se as absorbâncias em 734nm. A capacidade de sequestrar o radical ABTS foi calculada segundo a equação descrita acima.

2.5 Atividade anti-inflamatória

2.5.1 Isolamento de macrófagos e estimulação com LPS.

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados intraperitonealmente com tioglicolato 3%. Depois de 3 dias da estimulação, o animal foi sacrificado e obteve-se o lavado peritoneal inoculando 5 mL de meio RPMI completo. As células foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo ciprofloxacina 50µg/mL. Os macrófagos foram incubados por 24h em estufa de CO2, a 37° C, em placas de cultura celular de 24 poços, com a densidade celular de 10^6 por poço. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações do pigmento (30, 20, 10 e 5 µg/mL), 1 h antes da adição do estimulante LPS. Como controle positivo, as células foram tratadas apenas com o LPS, e para o controle negativo, as células foram tratadas apenas com solução salina tampão fosfato (PBS). O experimento foi realizado em triplicata. A placa de cultura foi incubada em estufa de CO_2, a 37°C, por 6 h. Após o período, os meios de cultura e os macrófagos foram coletados em eppendorfs, separadamente, e armazenados a - 80° C, para posteriores análises da expressão gênica.

2.5.2 Expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias

Foi realizado RT² qPCR Primer Assay, com primers específicos para avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1 β, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF-α. A reação foi realizada no StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil), utilizando o programa recomendado pelo fabricante. Os dados foram analisados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

2.5.3 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como valores médios ± desvio-padrão. As comparações múltiplas foram realizadas no software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA), utilizando o teste paramétrico Anova, seguido pelo pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

2.6 Citotoxicidade

A citotoxicidade do pigmento foi avaliada pelo teste de letalidade de *Artemia salina* de acordo com o procedimento descrito por Meyer et al. (1982). Os citos da *A. salina* foram incubados em água do mar artificial, em constante aeração, e expostos a uma lâmpada incandescente de 60 W. Após 48 h, 10 unidade de larvas de *A. salina foram* transferidas para frascos contendo o pigmento dissolvido em 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), completando o volume total de 10 mL com água salgada. O pigmento foi testado em triplicata, nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Como controle negativo, as larvas foram colocadas em uma solução contendo apenas 10% de DMSO e água salgada. Os frascos foram expostos a iluminação e após 24 h o número de sobreviventes foram contados e a porcentagem de morte foi calculada.

2 RESULTADOS

3.1 Influência da agitação, concentração de glicose e tempo de incubação na produção de pigmentos por *V. volvacea.*

A influência da variáveis independentes sobre a produção de pigmentos por *V. volvacea* sob fermentação submersa podem ser observadas nas Tabelas 3 e 4. As condições ideais, que permitiram produção máxima de pigmento, foram registradas para agitação a 200 rpm, após o período de 10 dias de fermentação (Tabela 3). Por outro lado, ao avaliar o efeito da concentração de glicose em relação ao tempo de fermentação, foi observada que a produção máxima de pigmento ocorreu em menores tempos de cultivo e com concentração de glicose igual a 22 g/L (Tabela 4).

Tabela 3. Matriz experimental aplicada na otimização da produção de pigmentos por *V. volvacea.*

Ensaios	Rotação (RPM)	Tempo (dias)	Pigmentos (µg/mL)
1	200	4	**192,22**
2	200	10	**276**
3	100	1	**0**
4C	100	7	**140,67**
4C	100	7	**147,52**
4C	100	7	**153,34**
5	100	13	**93,78**
6	0	4	**34,06**
7	0	10	**134,12**

Tabela 4. Matriz experimental aplicada na otimização da produção de pigmentos por *V. volvacea.*

Ensaios	Glicose (g/L)	Tempo (dias)	Pigmentos (µg/mL)
1	7	9	**9,34**
2	17	9	**51,12**
3	2	6	**3,12**
4C	12	6	**58,17**
4C	12	6	**23,39**
4C	12	6	**30,33**
5	22	6	**100,78**
6	7	3	**14,61**
7	17	3	**97,06**

A partir dos resultados obtidos, presente nas Tabelas 3 e 4, pôde-se calcular os efeitos linear e quadrático de cada fator e da interação linear entre os (Tabelas 5 e 6). Tanto a agitação quanto a concentração de glicose apresentou ($p<0,05$) efeitos lineares e positivo na produção de pigmento. O tempo de fermentação apresentou significância estatística para os efeitos lineares e quadráticos no experimento de agitação, o que não

ocorreu no experimento de variação de glicose. Esses efeitos podem ter ocorrido devido sua maior extensão do tempo de cultivo, que variou de 1 a 13 dias. Nas primeiras 24 horas, o cogumelo ainda está em fase de adaptação ao meio, e portanto não apresenta sinais de crescimento e de produção do pigmento (fase lag).

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da influência da agitação (RPM) e tempo (dias) na produção de pigmento por *V. volvacea*.

Fatores	SS	df	MS	F	p-valor
Agitação (L)	22506,00	1	22506,00	47,14148	0,006326*
Agitação (Q)	2919,74	1	2919,74	6,11575	0,089825
Tempo (L)	11494,83	1	11494,83	24,07728	0,016205*
Tempo (Q)	12068,90	1	12068,90	25,27974	0,015159*
Interação AxT	66,26	1	66,26	0,13879	0,734251
Erro Puro	1432,24	3	477,41		
Total SS	53585,90	8			

SS = Soma dos Quadrados; df = Graus de Liberdade; MS = Médias Quadradas; F: Estatística de Teste. L= Termos Lineares. Q = Termos Quadráticos. R^2 = 0,97327. Significância Estatística: p-valor < 0,05.

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da influência da concentração de glicose (g/L) e tempo (dias) na produção de pigmento por *V. volvacea.*

Fatores	SS	df	MS	F	p-valor
Glicose (L)	8509,35	1	8509,350	112,4485	0,001792*
Glicose (Q)	545,45	1	545,451	7,2080	0,074746
Tempo (L)	655,62	1	655,616	8,6638	0,060343
Tempo (Q)	106,71	1	106,710	1,4101	0,320488
Interação AxT	413,51	1	413,512	5,4644	0,101442
Erro Puro	227,02	3	75,673		
Total SS	10384,31	8			

SS = Soma dos Quadrados; df = Graus de Liberdade; MS = Médias Quadradas; F: Estatística de Teste. L= Termos Lineares. Q = Termos Quadráticos. R^2 = 0,97814. Significância Estatística: p-valor < 0,05.

Os coeficientes da equação de regressão foram obtidos a partir da análise de variâncias (ANOVA). A produção de pigmento (Y) por *V. Volvacea* pode ser expressa em termos das seguintes equações:

Equação de regressão para efeito da Agitação:

$$\mathbf{Y_1 = -109{,}053 + 0{,}105166 * A + 50{,}6737 * T + 0{,}00369 * A^2 - 2{,}78574 * T^2 - 0{,}013566 * A * T + 0}$$

Equação de regressão para efeito da concentração de Glicose:

$$\mathbf{Y_2 = 2{,}5118 + 4{,}27603 * G - 5{,}5635 * T + 0{,}2132 * G^2 + 0{,}78583 * T^2 - 0{,}67783 * G * T + 0}$$

Em que **Y** é a resposta prevista, a concentração de pigmento; **A**, **T e G** são as variáveis independentes: Agitação, Tempo e Glicose, respectivamente.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram de 0,973 e 0,978, para agitação e glicose, respectivamente. Isso significa que os modelos estatísticos têm bom ajuste, sendo capaz de explicar mais de 97% dos valores observados. Além disso, os valores dos coeficientes de determinação ajustados (Adj R^2) foram de 0,928 para agitação e 0,941 para glicose, o que também defende uma alta significância dos modelos. Uma representação gráfica da qualidade dos modelos pode ser vista nas Figuras 1A e 1B. Os valores preditos (ŷ) em relação valores experimentais (y) encontrados mostraram que os modelos se adaptam bem aos dados.

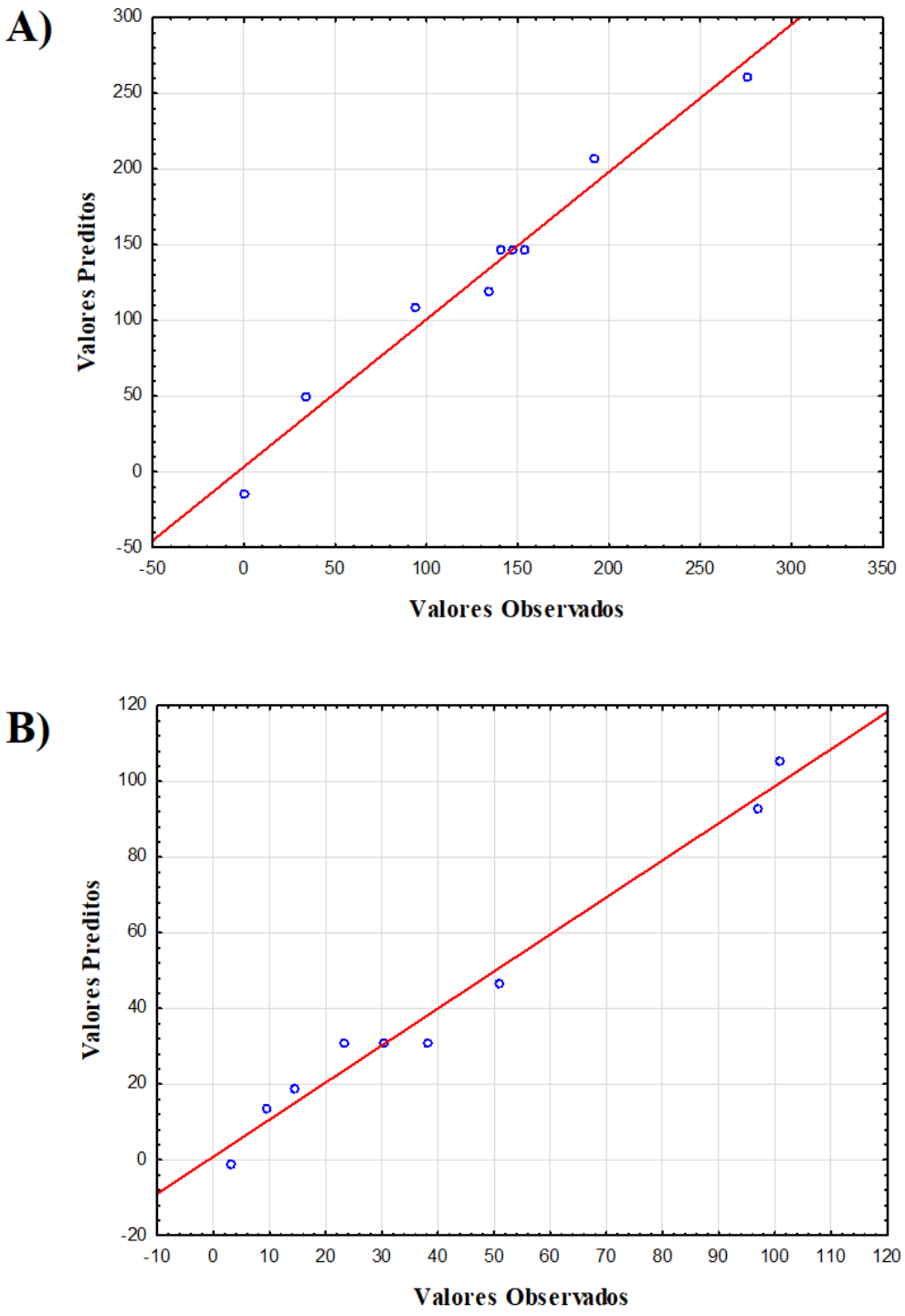

Figura 1. Os valores observados (%) correlacionados aos valores previstos (%) derivados dos modelos de Agitação **(A)** e Glicose **(B)** em valores não codificados da concentração de pigmento (µg/mL). O traço longo do gráfico representa a linha de regressão com coeficiente de regressão R^2 = 0,973 **(A)** e 0,978 **(B).** Cada ponto refere-se valores experimentais (observados).

Os resultados obtidos a partir dos planejamentos experimentais foram apresentados em gráficos de superfície de resposta, nos quais foi possível determinar a região ótima para a máxima produção de pigmento por *V. volvacea* (Figura 2). Avaliando o efeito da agitação x tempo de fermentação, a região ótima foi de 150 a 200 rpm, dependente do tempo de incubação (Figura 2A). Por outro lado, ao avaliar o efeito da concentração de glicose x tempo de fermentação, notou-se que que a região de máxima produção de pigmento ocorreu nos seis primeiros dias de incubação com concentração de glicose entre 20 e 24 g/L (Figura 2B).

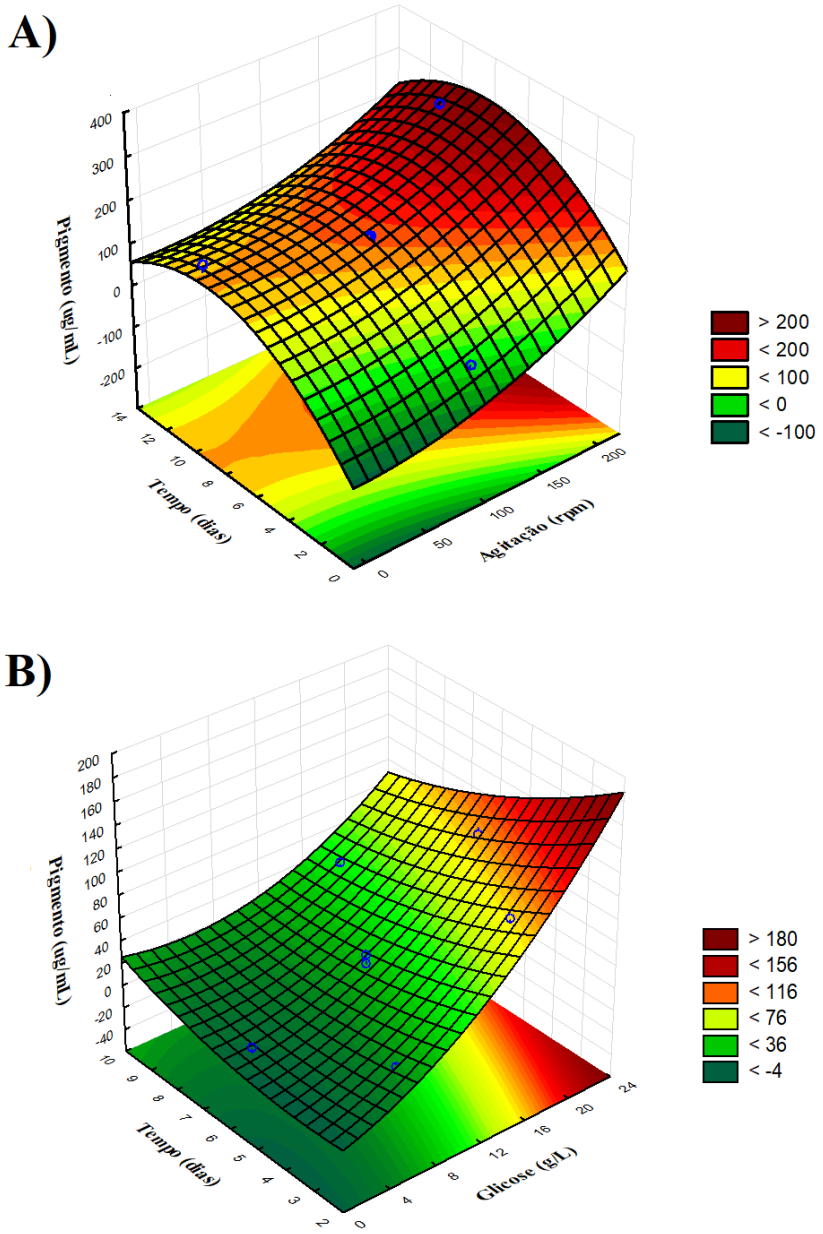

Figura 2. Superfície de resposta dos efeitos da agitação x tempo de fermentação **(A)** e da concentração inicial de glicose x tempo de fermentação **(B)** na produção de pigmento por *V. volvacea*, cultivado em meio POL, a 25°C.

Os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis independentes sobre a produção de pigmento foram também apresentados pelos gráficos de Pareto (Figura 3). As variáveis que interfiram na produção de pigmento ($p < 0,05$) foi a agitação (linear) e tempo (linear e quadrático) de fermentação (Figura 3A), e concentração de glicose (linear) (Figura 3B). Não foram observados efeitos significativos para as interação das variáveis, ao nível de 5% de significância.

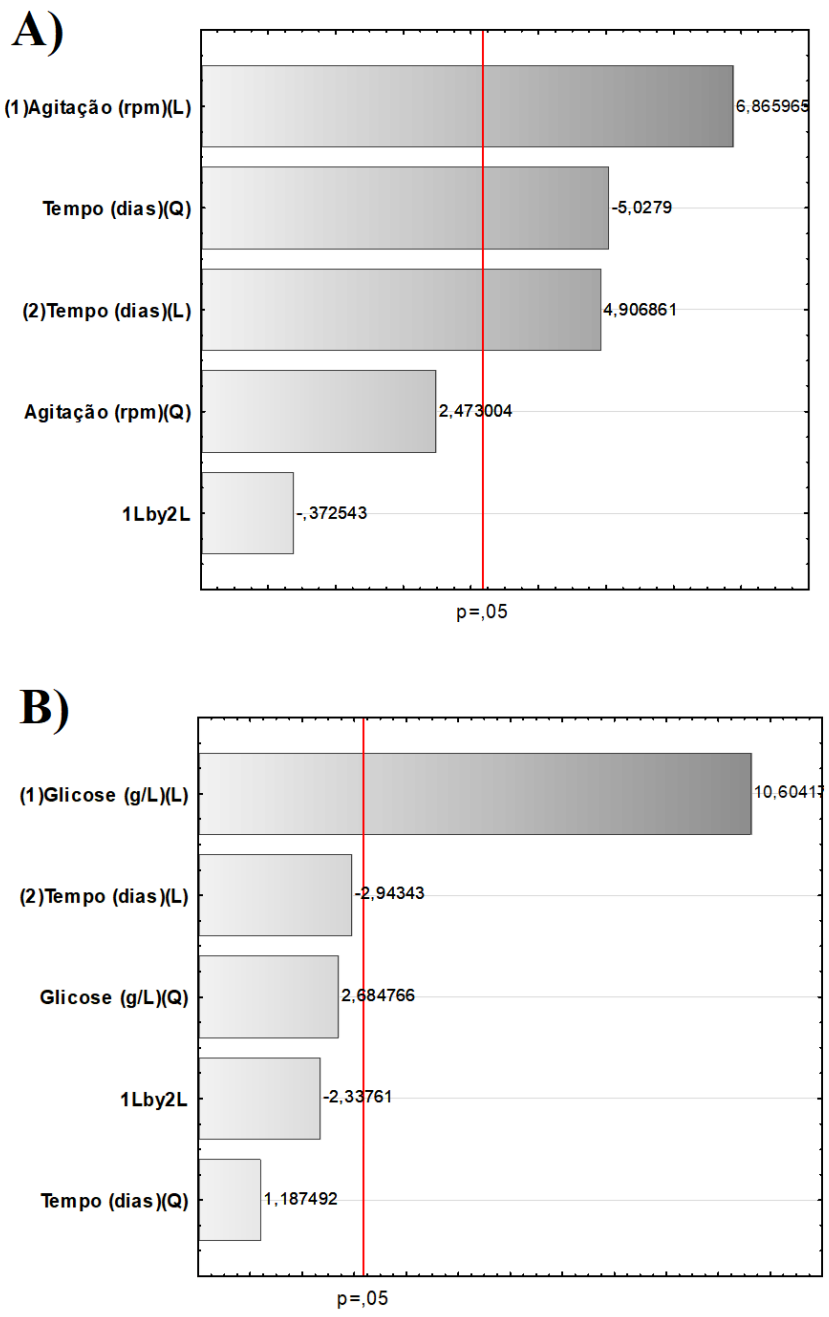

Figura 3. Gráficos de Pareto apresentando os efeitos estimados da agitação (RPM) x tempo (dias) **(A)** concentração de glicose (g/L) x tempo (dias) **(B).**

3.2 Identificação do pigmento.

O espectro de Infravermelho do pigmento apresentou absorção associada às vibrações de deformações axiais nas regiões de 3.019, 1.217,9 e 772 cm^{-1}, indicando a presença de ligações duplas entre carbonos (C=C, alcenos), e a presença de fenóis e anéis aromáticos, respectivamente (Figura 4). Os cromatogramas de UPLC-ESI-qTOF do pigmento apresentaram o pico principal em 6,70 min, no modo de ionização negativo (ESI-) (Figura 5), e o pico mais intenso em 8,60 min no modo positivo (ESI+) (Figura 6). O primeiro pico exibiu um íon precursor [M-H]- com m/z 305,0625 correspondente à fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_7$, enquanto o segundo pico foi o íon precursor [M+H]+ com m/z 286,0715, cuja fórmula molecular foi consistente com $C_{15}H_{12}NO_5$. Essas fórmulas moleculares foram compatíveis com a naftoquinona fusarubina (oxijavanicina) e aza-antraquinona bostricoidina. Suas estruturas químicas foram corroboradas por ressonância magnética nuclear.

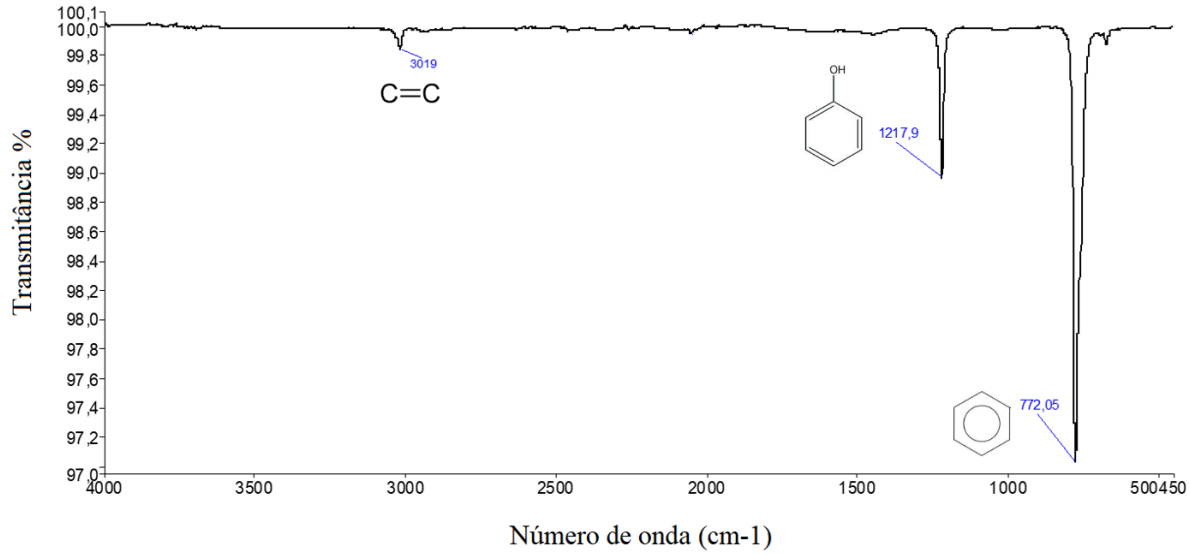

Figura 4. Espectro de infravermelho do pigmento de *V. volvacea* solubilizado em clorofórmio.

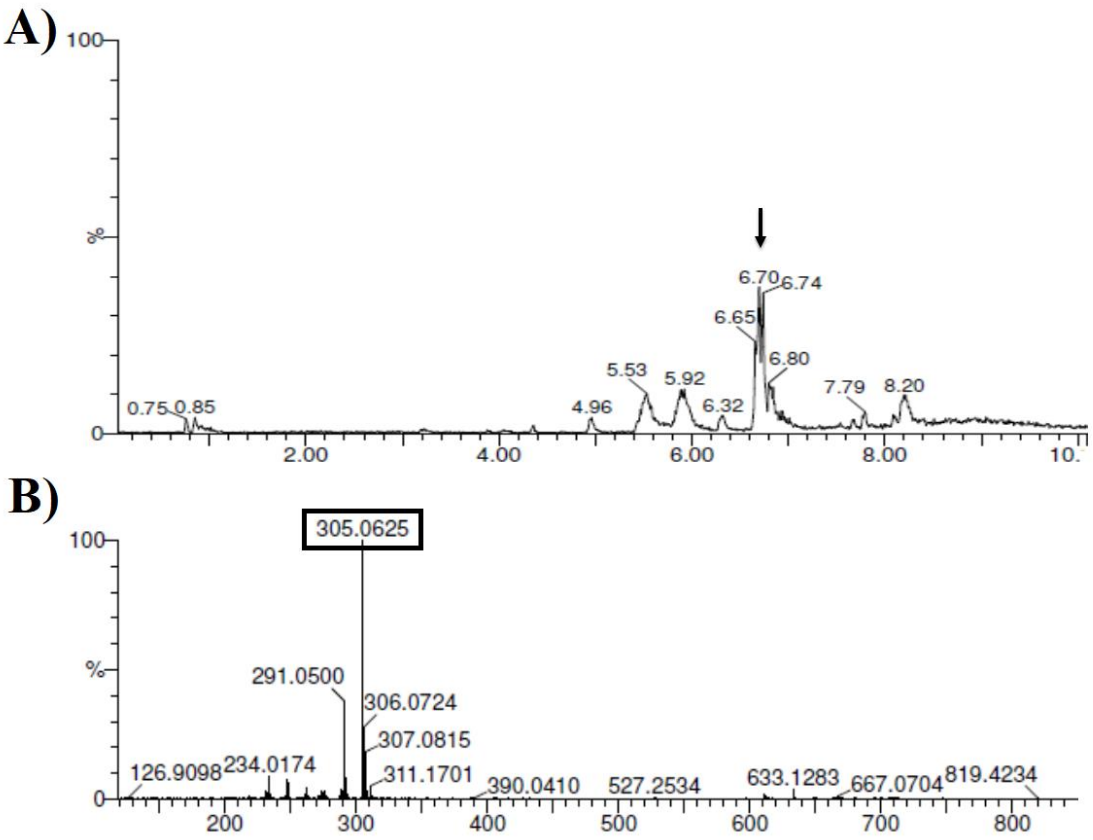

Figura 5. Cromatograma de UPLC-ESI-qTOF do pigmento de *V. volvacea* obtido modo de ionização negativo (ESI-) **(A)**. Espectro de massas do pico no tempo de retenção (TR) de 6,70 min **(B).**

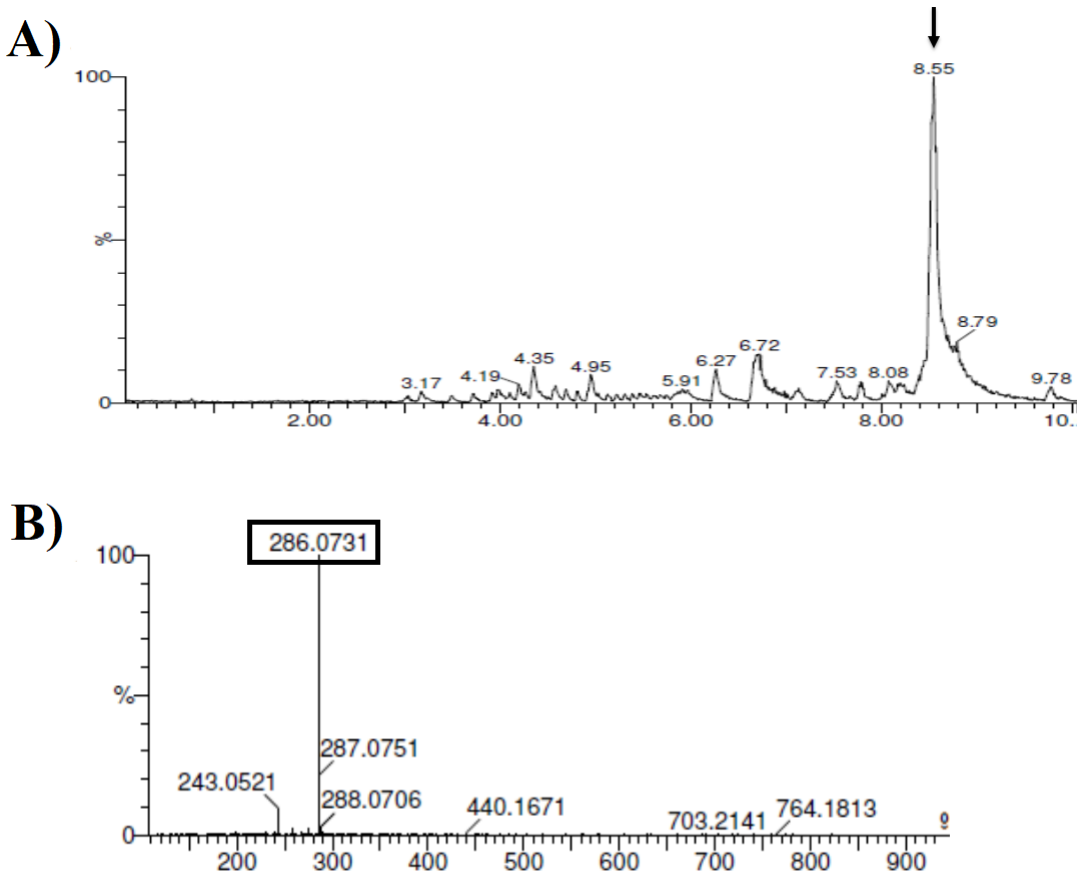

Figura 6. Cromatograma de UPLC-ESI-qTOF do pigmento de *V. volvacea* obtido modo de ionização positivo (ESI+) **(A)**. Espectro de massas do pico no tempo de retenção (TR) de 8.60 min **(B).**

A análise de RMN do pigmento de *V. volvacea* mostrou um perfil químico complexo, e os valores de descolamento químico foram arranjados de acordo as informações extraídas dos espectros uni e bidimensionais (Tabela 7), contudo foi possível caracterizar ressonâncias compatíveis com os compostos fusarubrina, dihidrofusarubrina e botriscoidina.

Tabela 7. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C do pigmento de *V. volvacea* arranjados conforme as correlações observadas nos espectros de HSQC e HMBC.

#C	**δC**	**δH (int.,multipl., *J* em Hz)**	**HMBC**
C=O	206.2		
C=O	203.8		
C=O	184.9		6.18
C=O	178.5		6.18
=C-O	160.9		12.65; 6.18; 3.94; 3.03
=C-O	157.8		12.20
=C-O	157.6		12.01
=C-O	157.5		12.93
=C-O	156.9		12.01; 6.67; 3.96
=C	137.3		12.93; 4.89; 3.04
=C	136.5		1.38
=C=	133.0		12.65; 3.04; 2.71; 1.65
=C=	114.1		12.01
=C=	110.0		
=CH	109.9	6.18 (1H, s)	12.65
=C=	107.8		12.93; 6.18
=C=	107.3		6.67
=CH	106.7	6.67	
-O-C-O	95.5		4.22; 1.54
-O-C-O	94.5		3.04; 1.65
OCH2	59.5	4.24; 4.17	
OCH2	58.8	4.89 (2H, s)	
OCH3	56.9	3.94 (3H, s)	
OCH3	56.5	3.96 (3H, s)	
CH	46.2	2.96	
CH	43.6	3.40	4.22; 1.68
CH2	41.4	3.91	
CH2	34.4	2.44; 1.68	
CH2	40.3	3.08	
CH2	32.4	3.04; 2.71 (1H, d, 18 Hz)	1.65
CH3	30.1	1.54	
CH3	29.6	1.65 (3H, s)	
5,10-OH			12.93; 12.65 (1H, s)
OH			12.20; 12.01

δC: Sinais do espectro de carbono. **δH:** Sinais do espectro de hidrogênio**.**

No espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7), os sinais da fusarubina foram observados em δ 6,18 (1H, s), δ 4,89 (2H, s), δ 3,94 (1H, s), os quais foram relacionados a hidrogênios olefínico, oximetilênicos e de metoxila, respectivamente. Os dupletos em δ 3,04 e 2,71 (1H, d) e o simpleto em δ 1,65 (3H, s) foram associados a hidrogênios alicíclicos e à metila, respectivamente. Ademais, sinais em δ 12,93 e 12,65 (3H, s) foram característicos de hidroxilas queladas com carbonila. No espectro de RMN ^{13}C-CPD (150 MHz, $CDCl_3$) (Figura 8), as quinze linhas espectrais da fusarubina foram identificadas, sendo duas delas atribuídas à carbonilas cetônicas (*δ* 184,9 e 178,5), oito associadas a carbonos aromáticos e olefínicos (*δ* 160,9; 160,9; 157,5; 137,3; 133,0; 110,0; 109,9 e 107,8), além de cinco relacionadas a carbonos alquílicos (*δ* 94,5; 58,8; 56,9; 32,4 e 29,6), caracterizando o esqueleto naftoquinônico.

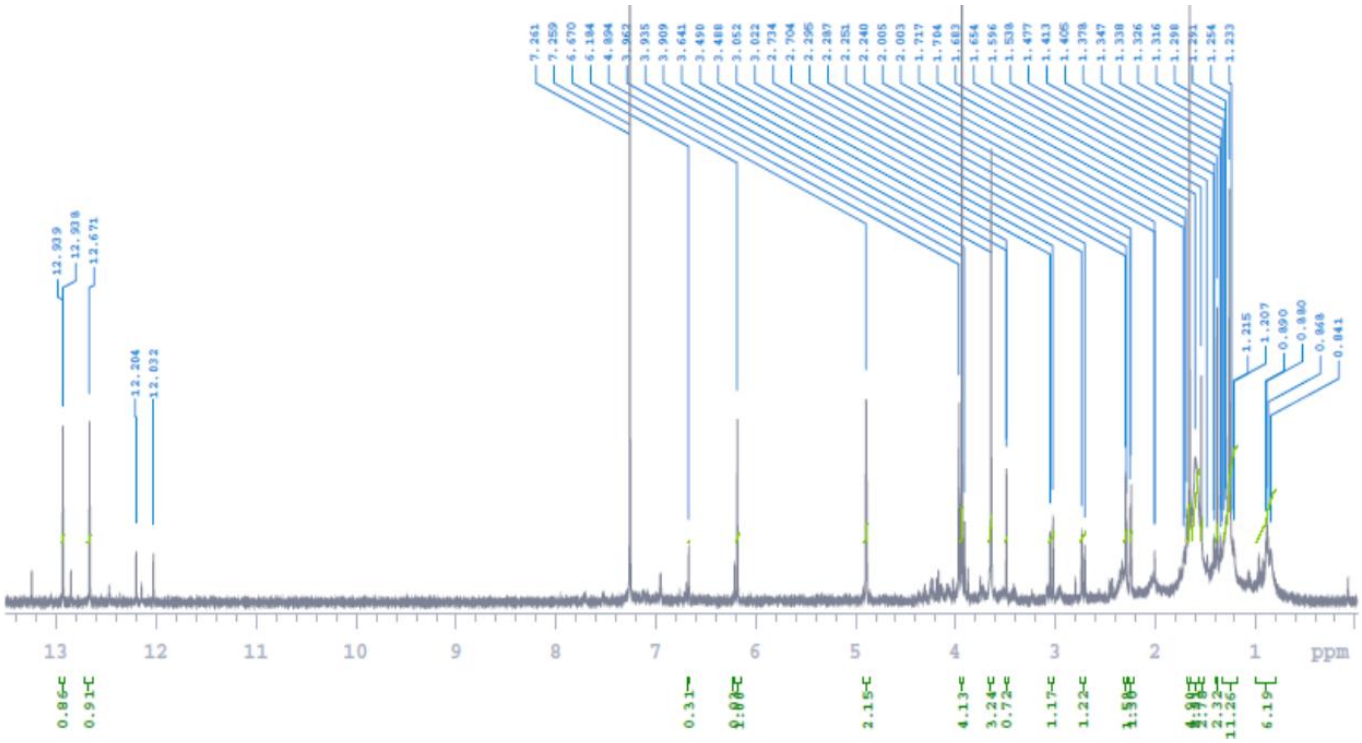

Figura 7. Espectro de RMN ^{1}H do pigmento de *V. volvacea* (600 MHz, $CDCl_3$).

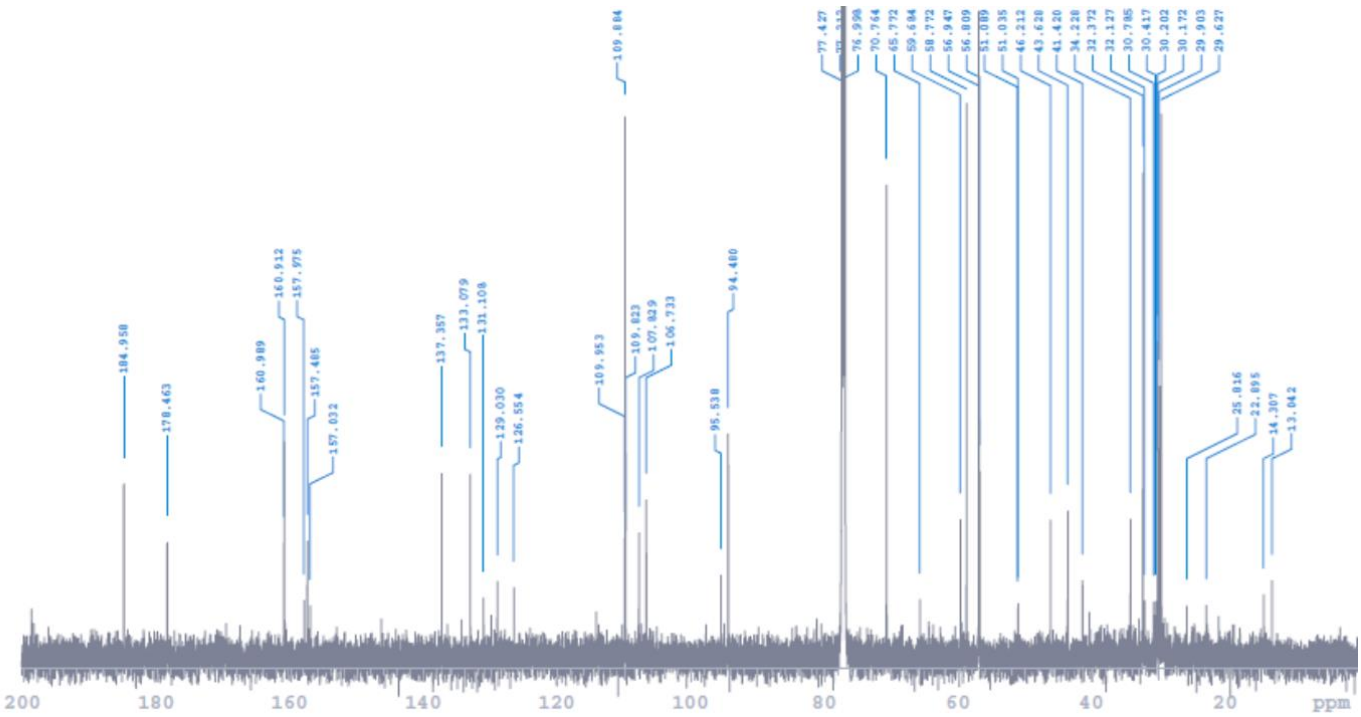

Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C do pigmento de *V. volvacea* (150 MHz, $CDCl_3$).

O espectro de RMN-HSQC revelou as ressonâncias dos carbonos hidrogenados e permitiu diferenciar os sinais de CH e CH_3 de CH_2 (Figura 9).

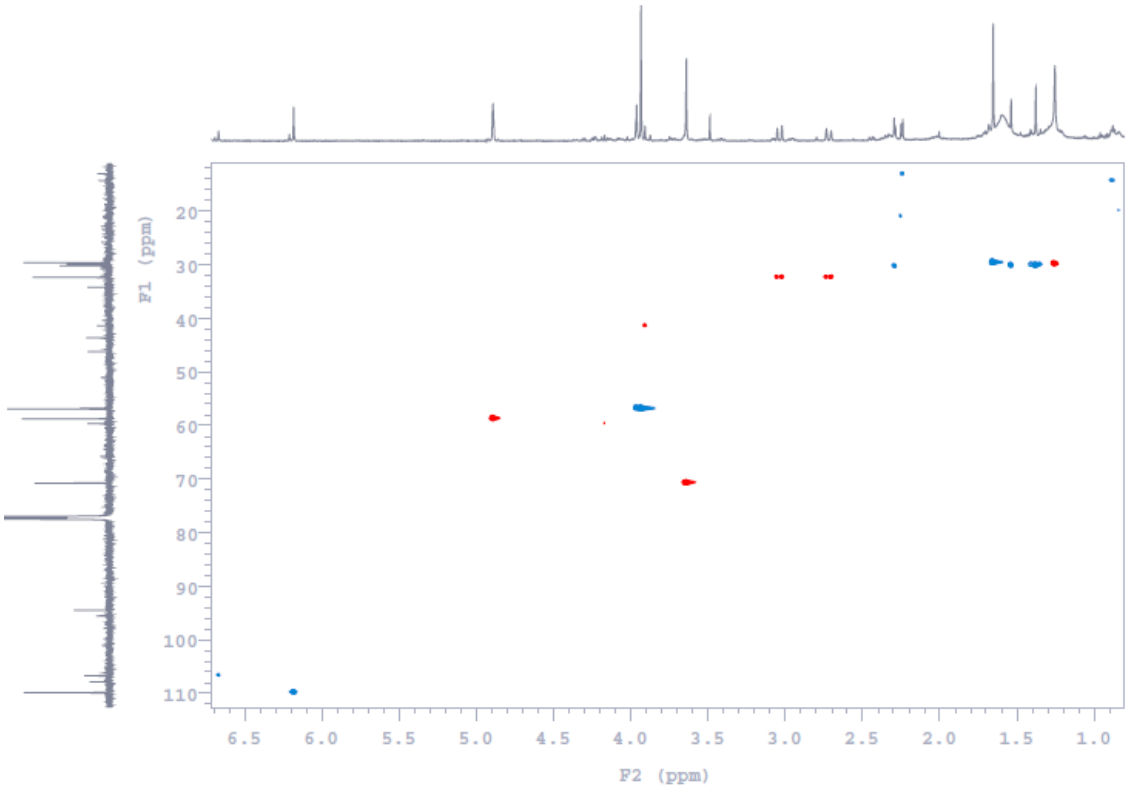

Figura 9. Espectro de RMN-^{1}H,^{13}C HSQC do pigmento de *V. volvacea* ($CDCl_3$, 150 x 600 MHz).

Por fim, o espectro RMN-HMBC mostrou correlações $^{1}H,^{13}C$ a duas e a três ligações permitindo identificar de forma inequívoca o esqueleto da naftaquinona e a posição dos seus substituintes através dos seguintes acoplamentos: hidrogênio olefínico em δ 6,18 com os carbonilas em δ 184,9; e 178,5 e o carbono olefínico em δ 107,8; hidroxilas em δ 12,93 e 12,65 com os carbonos aromáticos em δ 157,5 e 160,5; metoxila em δ 3,94 com o carbono olefínico em δ 160,9; hidrogênios oximetilênico em δ 4,89 com o carbono aromático em δ 137,0; hidrogênios oximetilênicos e metilênicos em δ 4,89 e 3,04 com o sinal de carbono aromático em δ 137,0, além sinais de hidrogênio metílico e metilênico em δ 1,65 e 3,04 com o sinal de carbono hemicetálico em δ 94,5. Ademais, os dados de RMN foram compilados e estão em consonância com os da literatura (KUROBANE et al., 1985) (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação dos parâmetros de RMN de ^{13}C e ^{1}H do pigmento de *V. volvacea*.com dados da literatura de Fusarubina.

Espectro ^{13}C		**Espectro ^{1}H**	
δ Exp.	**δ Ref. Fusarubina[#]**	**δ Exp.**	**δ Ref. Fusarubina***
184.9	184.0		
178.5	178.1		
160.9	160.6		
160.9	160.3		
157.9	159.7		
137.3	119.7		
133.0	121.9		
110.9	110.0		
109.9	109.7	6.18 (1H, s)	6.17 (1H, s)
107.8	106.7		
94.5	97.4		
58.8	58.8	4.89 (2H, s)	5.01; 4.76 (1H, dm)
56.9	56.8	3.94 (3H, s)	3.93 (3H, s)
32.4	35.7	3.04; 2.71 (1H, d, 18 Hz)	3.06; 2.68 (1H, d, 18 Hz)
29.6	22.6	1.65 (3H, s)	1.65 (3H, s)
		12.93; 12.65 (1H, s)	12.91; 12.65 (1H, s)

δ Exp = Sinais Experimentais; δ Ref = Sinais Referenciais.
Valores reportados pelo software ACDLabs ACD/Labs (#) e por Kurobane et al., 1985 (*)

Os sinais da bostricoidina foram observados no espectro de RMN ^{1}H, através das ressonâncias em δ 13,49; 13,20; 9,50; 7,96; 6,76, 4,02 e 2,80. Em razão da baixa concentração da bostricoidina no pigmento do *V. volvacea*, apenas os sinais mais intensos referentes à metoxila (δ 56,8) e à metila (δ 25,3) foram observados e ainda assim indiretamente através de correlações no HSQC. Esses deslocamentos químicos estão de acordo com os dados da literatura (YAMAMOTO et al., 2002) (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação dos parâmetros de RMN de ^{13}C e ^{1}H do pigmento de *V. volvacea*.com dados da literatura de Bostricoidina.

Espectro ^{13}C		**Espectro ^{1}H**	
δC Exp.	**δC Ref. Bostricoidina***	**δH Exp.**	**δH Ref. Bostricoidina***
-	186.4	13.49 (1H, s)	13.49 (1H, s)
-	183.9	13.20(1H, s)	13.20(1H, s)
-	165.4		
-	161.3		
-	157.9	6.76 (1H, s)	6.76 (1H, s)
-	151.2		
-	143.3	9.50 (1H, s)	9.50 (1H, s)
-	138.7		
-	124.6		
-	118.0	7.96 (1H, s)	7.96 (1H, s)
-	107.9		
56.8	56.8	4.02 (3H, s)	4.02 (3H, s)
25.3	25.3	2.80 (3H, s)	2.80 (3H, s)

δ Exp = Sinais Experimentais; δ Ref = Sinais Referenciais.
* Valores reportados por Yamamoto et al., 2002

Após a identificação da fusarubina, foi possível caracterizar a presença de uma outra naftoquinona: dihidrofusarubina. No cromatograma de UPLC-ESI-qTOF, a dihidrofusarubina foi detectada como íon precursor [M-H]- com m/z 307,0820 ($C_{15}H_{13}O_7$) com mesmo tempo de retenção da fusarubina (TR=6,70 min). No espectro de RMN, seus sinais são menos intensos do que os da fusarubina, entretanto é possível caracterizá-los nos espectros de RMN 1H e bidimensionais. Além disso, seus deslocamentos químicos são similares aos relatados na literatura (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação dos parâmetros de RMN de ^{13}C e ^{1}H do pigmento de *V. volvacea*.com dados da literatura de Dihidrofusarubina.

Espectro ^{13}C		**Espectro ^{1}H**	
δC Exp.	**δC Ref. Dihidrofusarubina#**	**δC Exp.**	**δC Ref. Dihidrofusarubina***
206,2	198,4		
203,8	197,9		
160,5	164,3		
157,8	155,9		
156,9	151,0		
146,3	119,8		
114,1	116,4		
107,3	106,7	6,67	6,68
95,5	96,3		
59,5	59,4	4,24; 4,17	4,22; 4,22
56,9	56,6	3,96	3,97
46,2	53,1	2,96	2,97
43,6	52,1	3,40	3,43
34,4	40,9	2,44; 1,68	2,42; 1,69
30,1	29,2	1,54	1,54
		12,20; 12,01 (OH)	12,22; 12,05

δ Exp = Sinais Experimentais; δ Ref = Sinais Referenciais.
Valores reportados pelo software ACDLabs ACD/Labs (#) e por Tatum & Baker,1983 (*)

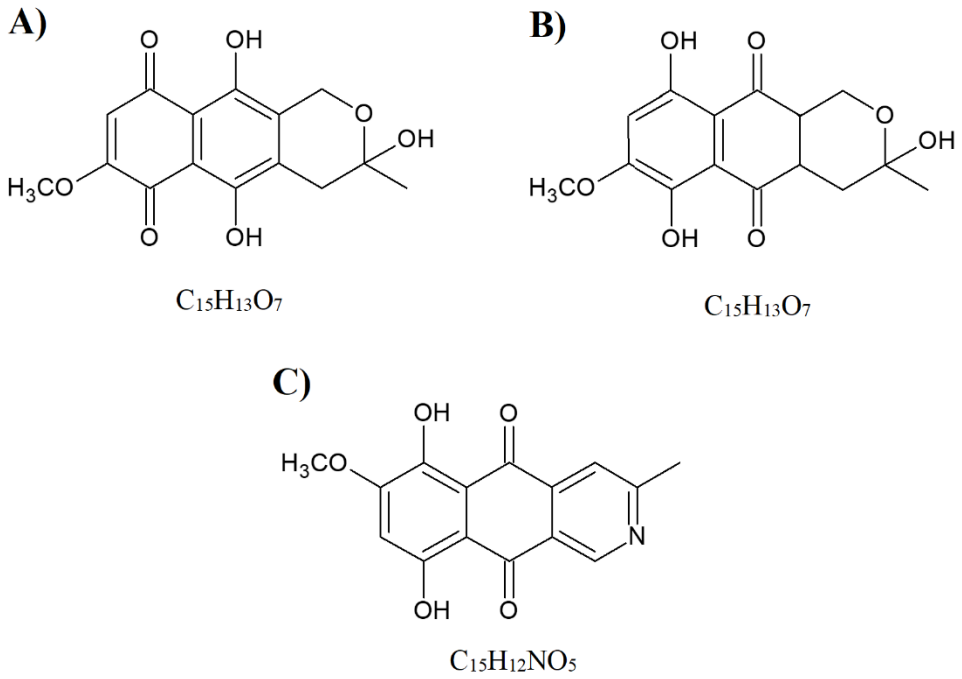

Figura 10. Estruturas e fórmulas moleculares das substâncias identificadas no pigmento de *V. volvacea*. **A)** Fusarubina; **B)** Dihidrofusarubina e **C)** Bostricoidina.

2.3 Atividade Antioxidante

O pigmento apresentou capacidade antioxidante ao eliminar 66% do radical $DPPH^{\bullet+}$, em uma concentração de 7,0 µg/mL (Figura 11). Além disso, com uma concentração de 9,2 µg/mL, o pigmento eliminou 45% do $ABTS^{\bullet+}$, mostrando também uma atividade antioxidante efetiva para este radical (Figura 12).

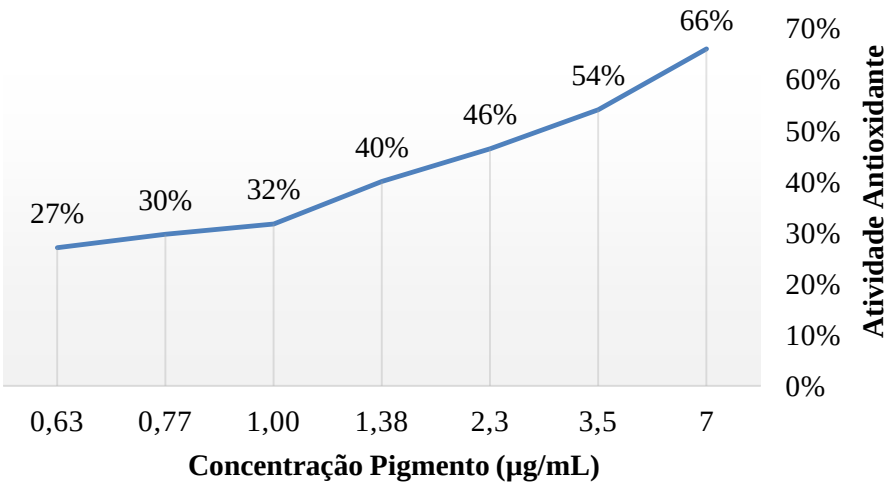

Figura 11. Capacidade do pigmento produzido pelo *V. volvacea* sequestrar o radical $DPPH^{\bullet}$

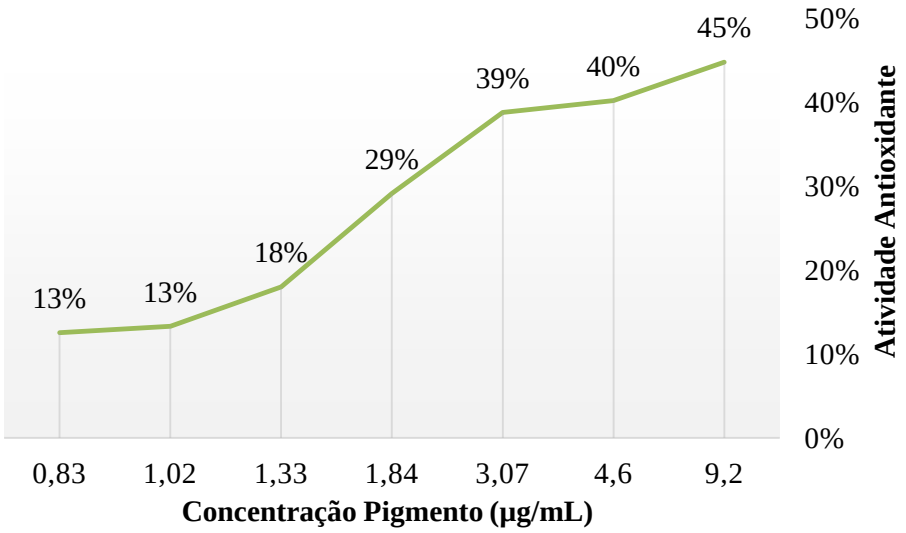

Figura 12. Capacidade do pigmento produzido pelo *V. volvacea* sequestrar o radical ABTS·

2.4 Atividade Anti-inflamatória

Foi avaliado o potencial anti-inflamatório *in vitro* do pigmento produzido pelo cogumelo *V. volvacea*, em macrófagos murinos ativados por LPS. Sob condições basais, os macrófagos produzem baixos níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6, enquanto que a estimulação com LPS induzir uma alta produção dessas citocinas pró-inflamatórias. A expressão de citocinas foi alterada nos grupos tratados (Figura 13). As expressões de TNF-α, IL-1β e IL-6, foram drasticamente reduzidas em macrófagos estimulados por LPS, previamente tratados com todas das concentrações testadas do pigmento, quando comparadas com o controle positivo (LPS) ($p < 0,05$). Para a citocina anti-inflamatória IL-10, as concentrações que estimularam sua produção foram de 5 e 30 µg/mL ($p < 0,05$). Para a IL-17, todas as concentrações a partir de 10 µg/mL foram efetivas na indução da sua expressão ($p < 0,05$).

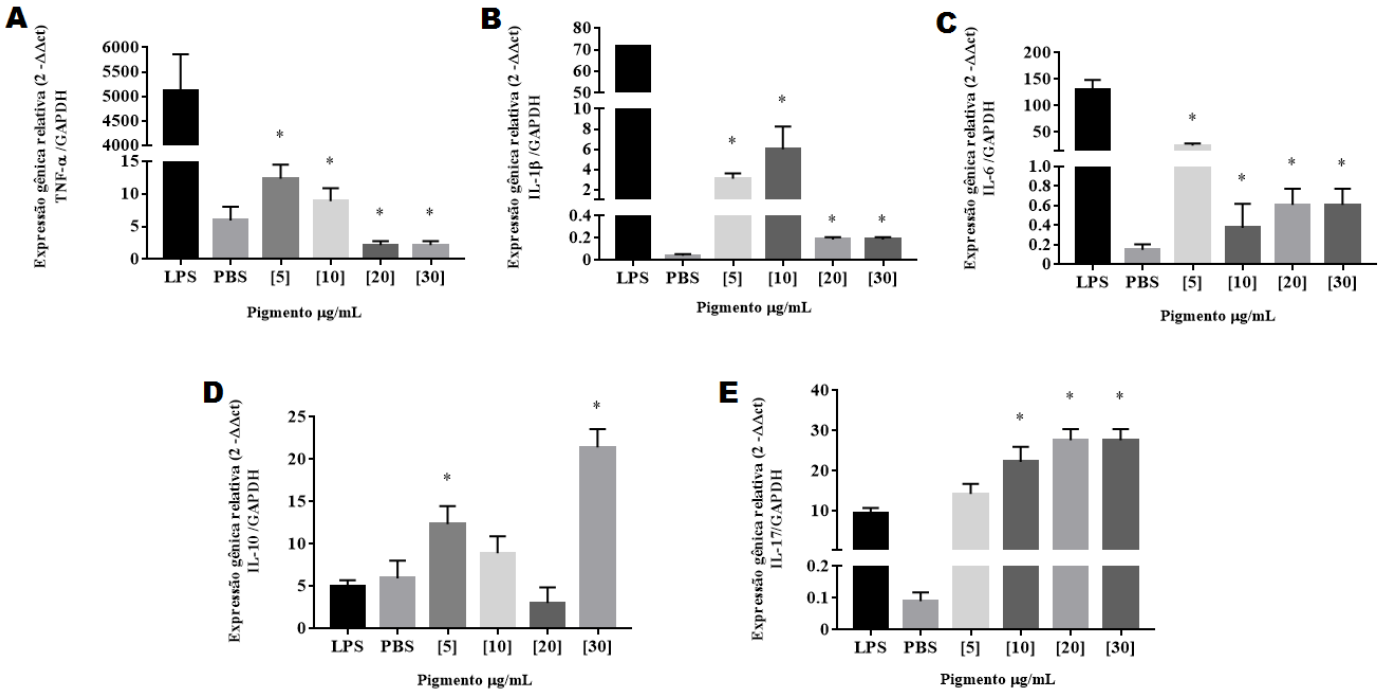

Figura 13. **Expressão gênica relativa em macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com o pigmento produzido pelo *V. volvacea*, em diferentes concentrações. (A)** Expressão de TNF-α. **(B)** Expressão de IL-1β. **(C)** Expressão de IL-6. **(D)** Expressão de IL-10. **(E)** Expressão de IL-17. Os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico *Anova-one way* e pós teste de Bonferroni (software GraphPad Prism® versão 7.0). Como controle positivo utilizou-se o LPS e como controle negativo, o PBS. Foi considerado como nível de significância estatística o valor de p <0,05, representada pelo símbolo *, comparado ao controle positivo (LPS).

2.5 Citotoxicidade

O pigmento produzido pelo *V. volvacea* apresentou 100% de citotoxicidade contra a *Artemia salina* a 200 µg/mL. A concentração de 12,5 µg/mL não apresentou toxidade contra as larvas (Figura 14). Entretanto, essas informações foram pouco conclusivas, uma vez que a exposição dos tratamentos à iluminação, durante 24h, provocou a degradação do pigmento nas concentrações mais baixas. Uma nova metodologia de cultura de células deve ser aplicada para análise da toxicidade desse pigmento.

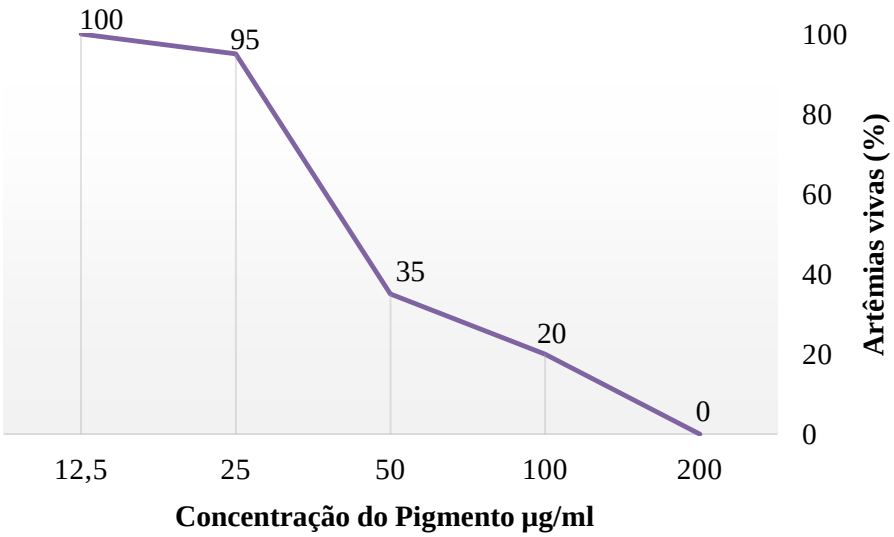

Figura 14. Teste de letalidade de *Artemia salina* ao manter-se por 24h em contato com diferentes concentrações do pigmento de *V. volvacea* (200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL).

4. DISCUSSÃO

Os corantes derivados de fontes naturais estão em crescente demanda, como alternativa importante para substituição de corantes sintéticos potencialmente nocivos, em especialmente para aplicações em áreas sensíveis à saúde, tais como nas indústrias alimentícias, cosméticas e têxteis (SIVAKUMAR et al., 2009). Os cogumelos são produtores de uma grande variedade de compostos orgânicos contendo cromóforos, o que confere sua capacidade de síntese de pigmentos de várias classes químicas. Essas substâncias podem proteger o organismo contra danos causados por radiação UV e ataque bacteriano ou desempenham um papel como atrativos de insetos. A estrutura de pigmentos produzidos por macrofungos e suas atividades biológicas tem sido amplamente estudadas (ZHOU & LIU, 2010; VELÍŠEK & CEJPEK, 2011). Entretanto, a utilização desses pigmentos tem sido limitada devido as dificuldades de produção de cogumelos em condições laboratoriais e em grande escala industrial (MAPARI et al., 2010) A ferramenta biotecnológica de fermentação submersa surge como uma rota alternativa para a produção de corantes naturais, a partir do cultivo micelial fúngico. Por meio dessa metodologia é possível obter altos rendimentos de produção, em um curto período de tempo e espaço, promovendo seu avanço para aplicabilidade industrial (MANAN, MOHAMAD & ARIFF, 2017).

A produtividade de pigmentos por microrganismos em fermentação submersa é influenciada pela composição do meio de cultura e as condições físicas em que estão submetidos. As fontes de carbono fornecidas no meio desempenham um papel importante tanto no crescimento quanto na produção de metabolitos primários e secundários (SINGH et al., 2016). A glicose tem sido relatada como o melhor substrato para produção de pigmentos por fungos, especialmente das espécies de *Monascus* (MOSTAFA & ABBADY, 2014). Além disso, a concentração de glicose no meio de cultivo afeta diretamente a quantidade de pigmento produzido. Quando a concentração de glicose é muito alta, inibe a formação de metabolitos secundários, desfavorecendo a produção de pigmento. Recomenda-se que a glicose seja mantida abaixo de 20 g/L no meio de cultura (MANAN, MOHAMAD & ARIFF, 2017). Mukherjee & Singh (2011) utilizaram variações da concentrações de glicose no meio de cultura, entre 10 e 40 g/L, para a produção de pigmento vermelho, por *Monascus purpureus.* Verificou-se no estudo que a glicose a 18 g/L otimizou a produção de pigmento. A redução da produção foi observada nos níveis de glicose acima dessa concentração, talvez devido à predominância do metabolismo fermentativo, em que ocorre o aumento da produção de etanol e as enzimas da cadeia respiratória são inibidas (Efeito Crabtree). Apesar disso, no presente trabalho, os melhores resultados da produção de pigmento pelo *V. volvacea* foram encontradas em concentrações de glicose acima de 20 g/L. Além da composição do meio de cultura, a produção de pigmentos é fortemente influenciada pelo fornecimento de oxigênio (YANG et al., 2015). O objetivo central de um sistema de agitação é promover a transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio de cultivo e consequentemente para o microrganismo, além de evitar a sedimentação da biomassa e manter sólidos em suspensão (CINBIZ et al., 2010). A taxa de agitação em 200 rpm dos erlenmeyers de 250ml, utilizada no presente trabalho, aumentou o rendimento do pigmento de *V. volvacea*, quando comparado com a agitação em 100 rpm e sem agitação. A produção de pigmentos em um fermentador à altas taxas de agitação foi relatada. Vendruscolo et al. (2016) investigaram os efeitos da frequência de agitação na produção de pigmento monascorubrina e rubropunctatina por *Monascus Ruber*, em biorreator de 6 litros. Foi observado que a agitação em 300 rpm foi bastante favorável à produção, enquanto que altas frequências de 600 rpm e 900 rpm mostraram efeitos negativos na produção de biomassa micelial e de pigmentos. Pode-se concluir que a alta velocidade de agitação proporciona altas taxas de cisalhamento, provocando ruptura micelial e, consequentemente, reduzindo a produção de pigmentos. Portanto, em uma

fermentação submersa de fungos ideal, é necessário haver equilíbrio entre a promoção de alta transferência de oxigênio e a manutenção de um baixo estresse hidrodinâmico no ambiente da cultura (OCHOA & GOMEZ, 2009).

O pigmento produzido pelo *V. volvacea* foi submetido a analises de espectroscopias no Infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear, e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. Foram identificaram duas naftoquinonas com estruturas conhecidas, a fusarubina (composto majoritário) e dihidrofusarubina, e uma aza-antraquinona, a bostricoidina. Tais substâncias são comumente encontradas em *Fusarium sp*, que são fungos pertencentes a divisão *Ascomycota*, reconhecidos como agentes patogênicos das plantas (MEDENTSEV et al., 2005). Considera-se que a fusarubina e a bostricoidina são biossintetizadas através da formação de um aldeído heptacetídeo C14, como intermediário comum. Os policétideos são produzidos pela enzima policétideo sintase multidomínio (PKS). Esse intermediário linear sofre uma ciclização catalisada pela enzima NhPKS1, indicando o envolvimento da enzima na biossíntese de fusarubina e bostricoidina (STUDT et al., 2012; AWAKAWA et al., 2012). A identificação dos genes que codificam as enzimas PKS e NhPKS1 na cepa *V. volvacea* CC94, usada do presente estudo, pode ser a chave para elucidar sua capacidade de produção dessas substâncias. A fusarubina e bostricoidina, e muitos dos intermediários da via de biossíntese, demonstraram ter uma ampla gama de atividades biológicas, que incluem atividades antimicrobiana e antitubercular (SHAH et al., 2017), antifúngica (FRANDSEN et al., 2016) e anticâncer (CHOWDHURY et al., 2017). A fusarubina apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro contra *Staphylococcus aureus, S. epidermis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Candida albicans e C. rugosa*. Além de inibir a viabilidade celular contra seis linhagem celulares de câncer (KUMAR et al., 2017). Derivados da bostricoidina e outros composto foram identificados no extrato da actinobactéria *Streptomyces sp*. Tal extrato apresentou atividade antibiótica, contra bactérias e algas, e citotoxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*, causando 100% de mortalidade a uma dose de 100 μg/mL. (DAME & RUANPANUN, 2017). No extrato do fungo *Fusarium proliferatum*, sete metabólitos coloridos foram caracterizados, incluindo bostricoidina e derivados de fusarubina. Esse extrato também apresentou 100% de citotoxicidade contra a *A. salina* a 100 μg/mL. (DAME et al., 2015). O pigmento produzido por *V. volvacea*, no presente estudo, nessa

mesma concentração levou a mortalidade de 80% das larvas, e 100% foi atingido na concentração de 200 µg/mL. Apesar de exibir capacidade citotóxica contra a *A. salina* em concentrações mais elevadas, o pigmento do *V. volvacea* apresentou potencial antioxidante e anti-inflamatório *in vitro,* em concentrações mais baixas.

As atividades antioxidantes de compostos naturais em alimentos ou sistemas biológicos podem ser determinadas utilizando inúmeros métodos, obtendo resultados variáveis, sendo os radicais livres DPPH e ABTS os mais comumente usados para avaliar essa capacidade *in vitro* (SHALABY & SHANAB, 2013). Kumar et al. (2013) mostraram que as naftoquinonas plumbagina e menadiona apresentaram capacidade antioxidantes pelo sequestro dos radicais hidroxila ($^{\bullet}OH$) e superóxido ($O_2^{\bullet-}$). No entanto, a atividade de eliminação de radicais DPPH e o potencial de redução férrica desses compostos foi muito baixa (5-9%), mesmo em concentrações elevadas. Para as naftoquinonas shikonina e acetilshikonina, a atividade antioxidante em relação captação de DPPH foi estimada 28% e 32%, respectivamente, em uma concentração de 10 µg/mL (SKRZYPCZAK et al., 2015). Zhou et al., (2011) purificaram e identificaram oito 1,4-naftoquinonas do pigmento extraído das espinhas do ouriço-do-mar roxo. A capacidade antioxidante contra o radical DPPH foi avaliada. Descobriu-se que pigmento foi capaz de sequestrar o radical de uma maneira dose-dependente a uma concentração de 8 a 125 µg/mL, depois disso, a atividade chegou ao platô (aproximadamente 95%). A relação entre a estrutura e as funções biológicas das naftoquinonas tem sido estudada, e o grupo funcional hidroxila (OH) presentes em algumas moléculas tem demonstrado desempenhar papéis fundamentais na eliminação de radicais livres (ORDOUDI et al., 2011; KUMAR et al., 2013). RATHNA et al., (2016) mostraram que o extrato bruto de acetato de etila do fungo *Fusarium solani* PSC-R exibiu capacidade de eliminação de 88% do radical DPPH a uma concentração de 100 µl/mL. Análises de cromatografias líquida e gasosa acopladas ao massa revelaram que naftoquinonas, incluindo a fusarubina, e compostos fenólicos eram os constituintes principais responsáveis por essa atividade. As naftoquinonas e a antraquinona identificadas no pigmento de *V. volvacea*, no presente estudo, apresentam hidroxilas na composição. Atribuindo a atividade antioxidante a essa estrutura, pode-se entender a capacidade de eliminação dos radicais livres pelo pigmento. A taxa de sequestro do radical DPPH pelo pigmento de *V. volvacea* foi de 54% em uma concentração de 3,5 µg/mL, podendo ser comparada com o padrão vitamina C, que apresenta uma concentração necessária para reduzir 50% do

radical (IC_{50}) de, aproximadamente, 2,16 µg/mL. Já para o ABTS, os resultados mostram que o pigmento tem menor potência para capturar esse radical (45% na concentração de 9,2 µg/mL), uma vez que a vitamina C apresenta um IC_{50} de ± 0,78 µg/mL (KHATUN et al., 2017).

A capacidade anti-inflamatória dos compostos presentes no pigmento do *V. volvacea* também foi avaliada. O pré-tratamento dos macrófagos ativados por LPS com pigmento na concentração de 30 µg/mL foi capaz de reduzir significativamente a superexpressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 e induzir a produção das anti-inflamatórias IL-10 e IL-17. Kumar et al. (2017) isolaram e identificaram três naftoquinonas (fusarubina, 3- *O*-metil-fusarubina e javanicina) extraídas em acetato de etila do fungo *Fusarium sp*. Tais compostos, nas concentrações de 5, 10 e 20 µM, foram rastreados para atividade anti-inflamatória em monócitos THP-1 ativados por PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), medindo os níveis de TNF-α, IL-8 e MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1). Verificou-se que nenhuma dessas naftoquinonas apresentou atividade anti-inflamatória, por esse método. Apesar disso, dezenas de outras naftoquinonas, extraídas principalmente de plantas, tem sido investigadas quanto a potencial anti-inflamatório. Muitas delas tem apresentado essa propriedade ao inibir da produção de mediadores pró-inflamatórios, principalmente o óxido nítrico, em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS (YOSHIDA et al., 2010; PINHO et al., 2011; CHECKER et al., 2014; DONG et al., 2017). Uma naftoquinona, conhecida como NSC95397, inibidora da enzima fosfatase Cdc25, foi analisada por Yang et al. (2014) quando a sua capacidade de modular o processo inflamatório induzido por LPS e por um lipopeptídeo triacilado sintético (pam3CSK), em macrófagos peritoneais e RAW264.7. Foi observado que a NSC95397 suprimiu a produção de óxido nítrico (NO), TNF-α e prostaglandina E2 (PGE2) e diminuiu a expressão de genes da inflamação como a NO sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), interferon-β (IFN-β) e bloqueou a ativação de Fator Nuclear-κB (p65), da proteína ativadora 1(c-Fos/c-Jun) e do Fator Regulador de Interferon-3 (IRF-3). Além disso, foi constatado que esse composto se direcionava à proteínas quinases B (AKT), IKKα/β, ativada por mitógenos (MKK7) e serina/treonina (TBK1). Esses resultados sugerem que a função anti-inflamatória de NSC95397 pode ser atribuída à inibição de múltiplos alvos, como tais proteínas quinases envolvidas na sinalização da inflamação. A Biflorina, uma naftoquinona isolada de *Syzygium aromaticum*, também suprimiu a

expressão de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos ativados por LPS. Além disso, o composto apresentou um efeito anti-inflamatório significativo no edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Os resultados indicaram que o mecanismo para a atividade anti-inflamatória foi através da inibição proteína quinase ativada por mitógenos p38 e da inativação do ativador de transcrição 1 (STAT1) (LEE et al., 2016).

Os pigmentos obtidos de fontes naturais apresentam potencial para serem aplicados em vários setores industriais (YUSUF et al., 2017). A utilização do pigmento do *V. volvacea* como aditivo alimentar parece bastante promissor, pois além melhorar as características sensoriais de alimentos e bebidas, seus componentes podem trazer benefícios à saúde humana. A associação de seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório lhe confere propriedade protetora de constituintes celulares contra stress oxidativos e contra o danos teciduais provocado por distúrbios inflamatórios, podendo assim, ser efetivo na prevenção de muitas doenças. Estas características poderão ser relevantes tanto para o consumidor final como para a indústria alimentícia. O consumidor poderá se beneficiar de uma melhoria das suas funções biológicas, auxiliando na prevenção ou retardamento de doenças crônicas. E a indústria, por sua vez, poderá agregar valor aos seus produtos ao associá-los com todas essas benfeitorias, obtidas pelo uso de um aditivo natural. Além disso, a aplicação desse pigmento em cosméticos e no desenvolvimento de fármacos também parece bastante promissor, devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, identificadas no presente estudo, e ação antibióticas e anticancerígenas de seus componentes, identificadas em relatórios anteriores (CHOWDHURY et al., 2017; KUMAR et al., 2017). Entretanto, são necessários mais estudos para avaliar os efeitos fisiológicos e farmacológicos desse pigmento no organismo humano. Inúmeros fatores deverão ser considerados, incluindo a sua segurança e toxicidade, a biodisponibilidade, a absorção e a distribuição, transformações estruturais e eliminação (YORDI et al., 2012).

Devido ao aumento da conscientização dos efeitos adversos associados aos compostos sintéticos, a busca por novas tecnologias para obtenção eficiente de compostos naturais está em constante desenvolvimento. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, o cogumelo comestível *V. volvacea*, em condições otimizadas de cultivo, mostrou-se uma nova fonte promissora de pigmentos naturais biologicamente ativos, com ampla aplicabilidade industrial.

REFERÊNCIAS

ACD/Labs. Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, Canadá. Disponível em <http://www.acdlabs.com>. Acesso em 2017.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, London, v. 73, n. 2, p. 239-244, 2001.

AWAKAWA, T.; KAJI, T.; WAKIMOTO, T.; ABE, I. A heptaketide naphthaldehyde produced by a polyketide synthase from Nectria haematococca. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 22, n. 13, p. 4338-40, 2012.

BAI, M. S.; WANG, C. ZONG, S. C.; LEI, M.; GAO, J. M. Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*. *Food Chemistry*, v. 141, n. 4, p. 3424-3427, 2013.

BAO, D.; GONG, M.; ZHENG, H.; CHEN, M.; ZHANG, L.; WANG, H.; JIANG, J.; WU, L.; ZHU, Y.; ZHU, G.; ZHOU, Y.; LI, C.; WANG, S.; ZHAO, Y.; ZHAO, G.; TAN, Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (Volvariella volvacea) genome. *Plos One*, v. 8, n. 3, 2013.

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 2742–2747, 2008.

BECHTOLD, T. Natural Colorants – Quinoid, Naphthoquinoid and Anthraquinoid Dyes. In*: Handbook of Natural Colorants.* United Kingdom: Wiley, 2009. p. 151-182.

BRAND-WILLIAMS, et al. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, v.22, p.25-30, 1995.

CHECKER, R.; PATWARDHAN, R. S.; SHARMA, D.; MENON, J.; THOH. M.; SANDUR, S. K.; SAINIS, K. B; PODUVAL, T. B Plumbagin, a vitamin K3 analogue, abrogates lipopolysaccharide-induced oxidative stress, inflammation and endotoxic shock via NF-κB suppression. *Inflammation*, v 37, n. 2, p. 542-54, 2014.

CHOWDHURY, N. S.; SOHRAB, M. H.; RANA, M. S.; HASAN, C. M.; JAMSHIDI, S.; RAHMAN, K. M. Cytotoxic Naphthoquinone and Azaanthraquinone Derivatives from an Endophytic Fusarium solani. J Nat Prod., v. 80, n. 4, p. 1173-77, 2017.

CINBIZ, M. N.; TIGLI, R. S.; BESKARDES, I. G.; GÜMÜSDERELIOGLU, M.; ÇOLAK, Ü. Computational fluid dynamics modeling of momentum transport in rotating wall perfused bioreactor for cartilage tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, v. 150, p. 389–395, 2010.

COSTA, E. C. B, AMORIM, R.; SILVA, F. C. et al. Synthetic 1,4-Pyran Naphthoquinones Are Potent Inhibitors of Dengue Virus Replication. *PLoS One.*, v. 8, n. 12, 2013.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMAN, H. L. Phytochemicals: The Chemical Components of Pants. In: *Natural Products from Plants.* Boca Raton: CRC Press. 2006. p 1-42.

DAME, Z. T.; RUANPANUN, P. Production of macrolide antibiotics from a cytotoxic soil Streptomyces sp. strain ZDB. World J Microbiol Biotechnol, v. 33, 2017.

DAME, Z.T.; SILIMA, B.; GRYZENHOUT, M.; VAN REE, T. Bioactive compounds from the endophytic fungus *Fusarium proliferatum*. *Nat Prod Res*., v. 30, n. 11, p. 1301-4, 2015.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. *Applied Statistics*, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.

DONG, M.; LIU, D.; LI, Y. H.; CHEN, X. Q.; LUO, K.; ZHANG, Y. M.; LI, R. T. Naphthoquinones from Onosma paniculatum with Potential Anti-inflammatory Activity. *Planta Med.*, v. 83, n. 7, p. 631-635, 2017.

FRANDSEN, R. J.; RASMUSSEN, S. A.; KNUDSEN, P. B.; UHLIG, S.; PETERSEN, D.; LYSØE, E.; GOTFREDSEN, C. H.; GIESE, H.; LARSEN, T. O. Black perithecial pigmentation in *Fusarium species* is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin. *Sci Rep.*, 2016.

KHATUN, M.; HABIB, M. R.; RABBI, M. A.; AMIN, R.; ISLAM, M. F.; NURUJJAMAN, M.; KARIM, M. R.; RAHMAN, M. H. Antioxidant, cytotoxic and antineoplastic effects of *Carissa carandas* Linn. leaves. *Exp Toxicol Pathol.*, v. 69, n. 7, p. 469-476, 2017.

KIM, D. O. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J Agric Food Chem*, v.50, p.3713-3717, 2002.

KISHORE, N.; BINNEMAN, B.; MAHAPATRA, A.; VAN DE VENTER, M.; PLESSIS-STOMAN, D.; BOUKES, G.; HOUGHTON, P.; MARION MEYER, J. J.; LALL, N. Cytotoxicity of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 5013–5019, 2014.

KUMAR, K. P.; JAVVAJI, K.; POORNACHANDRA,Y. DEVI ALLANKI, A. D.; MISRA, S. Antimicrobial, Anti-plasmodial and Cytotoxicity Properties of Bioactive Compounds from *Fusarium* sp. USNPF102. *J Microbiol Res.*, v. 7, n. 2, p. 23-30. 2017.

KUMAR, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 755, p. 30–41, 2013.

KUROBANE, I.; ZAITA, N.; FUKUDA, A. New metabolites of *Fusarium martii* related to dihydrofusarium. J. Antibiotics, v. 29, p. 205-214, 1985.

LEE, H. H.; SHIN, J. S.; LEE, W. S.; RYU, B.; JANG, D. S.; LEE, K. T. Biflorin, Isolated from the Flower Buds of Syzygium aromaticum L., Suppresses LPS-Induced Inflammatory Mediators via STAT1 Inactivation in Macrophages and Protects Mice from Endotoxin Shock. *J Nat Prod*., v. 79, n. 4, p.711-20, 2016.

MANAN, M. A.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. Monascus spp.: A source of Natural Microbial Color through Fungal Biofermentation *J Microbiol Exp.*, v. 5, n. 3, 2017.

MAPARI, S. A. S.; THRANE, U. L. F.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 6, p. 300–307, 2010.

MATHEW, J.; SUDHEESH, N.P.; RONY, K.A.; SMINA T.P; JANARDHANAN, K.K. Antioxidant and antitumor activities of cultured mycelium of culinary-medicinal paddy straw mushroom Volvariella volvacea (Bull.: Fr.) Singer (Agaricomycetideae*). International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 10, p. 139- 148, 2008.

MEDENTSEV, A. G.; ARINBASAROVA A. Y.; AKIMENKO, V. K. Biosynthesis of Naphthoquinone Pigments by Fungi of the Genus *Fusarium*. *Appl Biochem Microbiol*., v. 41, n. 5, p. 503–507, 2005

MEYER B.N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-4, 1982

MOSTAFA M. E.; ABBADY, M. S.Secondary Metabolites and Bioactivity of the Monascus Pigments Review Article *Global J. Biotech. & Biochem*., v. 9, n. 1, p. 1-13, 2014.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 188–192, 2011.

OCHOA, F. G.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, 153–176, 2009.

ORDOUDI, S. A.; TSERMENTSELI, S. K.; NENADIS, N.; ASSIMOPOULOU, A. N.; TSIMIDOU, M. Z.; PAPAGEORGIOU, V. P. Structure–radical scavenging activity relationship of alkannin/shikonin derivatives. *Food Chem.*, v. 124, p. 171–176, 2011.

PINHO, B. R.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One*, v. 6, n. 8, 2011.

PUNITHA, S. C.; RAJASEKARAN, M. Cardioprotective effect of *Volvariella volvacea* in streptozotocin administered rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 11, n. 4, 2016.

RATHNA, J., YAZHINI, B., KENNEDY, A.A.A., PRABU, G.M., PANDIAN, S.K., Production of napthoquinones and phenolics by a novel isolate *Fusarium solani* PSC-R of Palk Bay and their industrial applications, Bioresource Technology (2016)

ROY, A.; PRASAD, P.; GUPTA, N. Volvariella volvacea: a macrofungus having nutritional and health potential. *Asian J Pharm Tech*, v. 4, n. 2, p. 110–113, 2014.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. *Revista Fitos*, v. 3, n. 2, 2007.

SHAH, A.; RATHER, M. A.; HASSAN, Q. P.; AGA. M. A.; MUSHTAQ, S.; SHAH, A. M.; HUSSAIN, A.; BABA, S, A.; AHMAD, Z. Discovery of anti-microbial and anti-tubercular molecules from Fusarium solani: an endophyte of Glycyrrhiza glabra. *J Appl Microbiol.*, v. 122, n. 5, p. 1168-76, 2017.

SHALABY, E. A; SHANAB, S. M. M.Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Mar Sci.*, v. 42, n. 5, p. 556-564, 2013

SILVA, R.F., BARROS, A. C. A.; PLETSCH,M. ARGOLO, A.C.C.M.; ARAÚJO, B. S Study on the scavenging and anti-Staphylococcus activities of the extracts, fractions and subfractions of two *Volvariella volvacea* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 10, p. 1761-1767, 2010.

SINGH, V.; HAQUE, S. NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front Microbiol*., v. 7, 2016;

SIVAKUMAR, V., LAKSHMI, A. J., VIJAYEESWAREE, J., & SWAMINATHAN, G. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 16, p. 782–789, 2009.

SKRZYPCZAK, A.; PRZYSTUPA, N.; ZGADZAJ, A.; PARZONKO, A.; SYKŁOWSKA-BARANEK, K.; PARADOWSKA, K.; NAŁĘCZ-JAWECKI, G. Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant activities of natural naphthoquinone shikonin and acetylshikonin and Arnebia euchroma callus extracts evaluated by the umu-test and EPR method. *Toxicol In Vitro,* 2015.

SOARES, A. S.; BARBOSA, F. L.; RÜDIGER, A.; HUGHES, D. L.; SALVADOR, M. J.; ZAMPRONIO, A. R.; STEFANELLO, M. É. A. Naphthoquinones of Sinningia reitzii and Anti-inflammatory/ Antinociceptive Activities of 8-Hydroxydehydrodunnione. *J. Nat. Prod.,* v. 80, p. 1837−1843, 2017.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A. ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Quim. Nova*, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SREELATHA, T.; KANDHASAMY, S.; DINESH, R.; SHRUTHY, S.; SHWETA, S.; MUKESH, D.; KARUNAGARAN, D.; BALAJI, R.; MATHIVANAN, N.; PERUMAL, P. T. Synthesis and SAR study of novel anticancer and antimicrobial naphthoquinone amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 15, p. 3647-3651, 2014.

STINTZINGA, C.; SCHLIEMANNB, W. Pigments of Fly Agaric (Amanita muscaria). *Z. Naturforsch,* v. 62, p. 779 -785, 2007.

STODŮLKOVÁ, E.; CÍSAŘOVÁ, I.; KOLAŘÍK, M.; CHUDÍČKOVÁ, M.; NOVÁK, P.; MAN, P. et al. (2015) Biologically Active Metabolites Produced by the Basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. PLoS One, v. 10, n. 2, 2015.

STUDT, L.; TUDZYNSKI, B. Gibberellins and the Red Pigments Bikaverin and Fusarubin. In: Martín JF., García-Estrada C., Zeilinger S. (eds) Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites. Fungal Biology. Springer, New York, NY, 2014, p. 209-238.

STUDT, L.; WIEMANN, P. KLEIGREWE, K.; HUMPF, H. U.; TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of Fusarium fujikuroi perithecia. *Appl Environ Microbiol.*, v.78, n. 12, p. 4468-80, 2012.

TAPPEINER, J. VASILIOU, A.; GANZERA, M.; FESSAS, D.; STUPPNER, H.; PAPAGEORGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N. Quantitative determination of alkannins and shikonins in endemic Mediterranean Alkanna species. *Biomedical chromatography*, v. 28, n. 7, p. 923–933, 2014.

TATUM, J.H; BAKER, R.A. Naphtoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from Citrus. *Phyochemistry*, v.22, p. 543-547, 1983.

VELÍŠEK J.; CEJPEK K. Pigments of higher fungi – a review. *Czech J. Food Sci.*, v. 29, p. 87–102, 2011.

VENDRUSCOLO, F.; SCHMIDELL, W.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L. Kinetic of orange pigment production from *Monascus ruber* on submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2016.

WU, J.Y.; CHEN, C.H.; CHANG, W.H.; CHUNG, K.T; LIU Y.W.; LU, F.J. CHEN, C.H. Anticancer effects of protein extracts from Calvatia lilacina, *Pleurotus ostreatus* & *Volvariella volvacea. Evid Based Complement Alternat Med*, 2011.

YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; THOR, G.R.; HASUMI, M.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMURA. I. Isofuranonaphthoquinone derivatives from cultures of the lichen *Arthonia cinnabarina* (DC.) Wallr. *Phytochemistry*, v. 60, p. 741-745, 2002.

YANG, J.; CHEN, Q. WANG, W.; HU, J.; HU, C. Effect of oxygen supply on Monascus pigments and citrine production in submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 119, n. 5, p. 564-569, 2015.

YANG, Y.; YANG, W. S.; YU, T.; YI, Y. S.; PARK, J. G.; JEONG, D.; KIM, J. H.; OH, J. S.; YOON, K.; KIM, J. H.; CHO, J. Y. Novel anti-inflammatory function of NSC95397 by the suppression of multiple kinases. *Biochem Pharmacol., v*. 88, n. 2, p. 201-15, 2014.

YORDI, E. G.; PÉREZ, E. M.; MATOS, M. J.; VILLARES, E. U. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: BOUAYED J.; BOHN, T. (Ed). *Nutrition, Well-Being and Health*. InTech, 2012 p. 23-48.

YOSHIDA, L. S.; KAWADA, T.; IRIE, K.; YUDA, Y.; HIMI, T; IKEMOTO, F.; TAKANO-OHMURO, H. Shikonin directly inhibits nitric oxide synthases: possible targets that affect thoracic aorta relaxation response and nitric oxide release from RAW 264.7 macrophages. *J Pharmacol Sci.*, v. 112, n. 3, p. 343-51, 2010.

YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Colorantes naturais: histórico, processamento e perspectivas sustentáveis. *Nat Prod Bioprospect*., v. 7, n. 1, p. 123–145, 2017.

ZHANG, L., PEI, Y., XING, Z., T., DING, S., J., BUSWELL, J., A. Comparison of endoglucanase-1 (EG1) induction in the edible straw mushroom Volvariella volvacea by lactose and/or cellobiose with or without added sorbose. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 89, p. 1939-1946, 2011.

ZHOU, D. Y.; QIN, L.; ZHU, B. W.; WANG, X. D.; TAN, H.; YANG, J. F.; LI, D. M.; DONG, X. P.; WU, H. T.; SUN, L. M., et al. Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Food Chem*., v. 129, p. 1591–1597, 2011.

ZHOU, Z. Y.; LIU, J. K. Pigments of fungi (macromycetes). *Nat Prod Rep.*, v. 27, p. 1531–1570 2010.

4. APÊNDICE

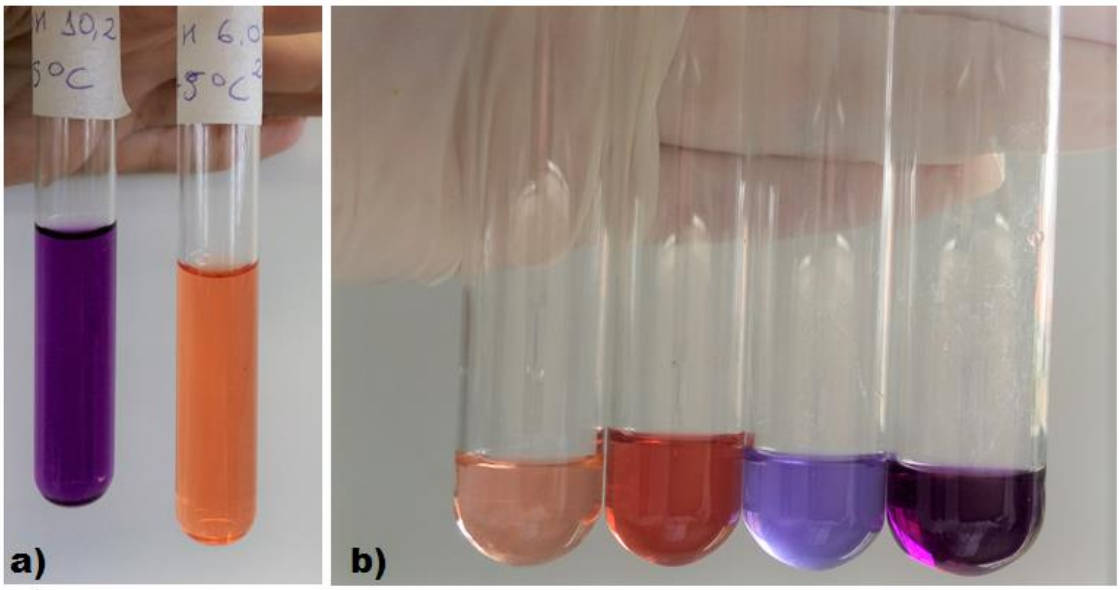

Figura 1. Interferência do pH na coloração do pigmento de *V. volvacea*. **a)** Pigmento em solução tampão com pH 10,2 (roxo) e pH 6,0 (laranja). **b)** Espectro de cores do pigmento em soluções com pH diferentes, do meio ácido ao básico.

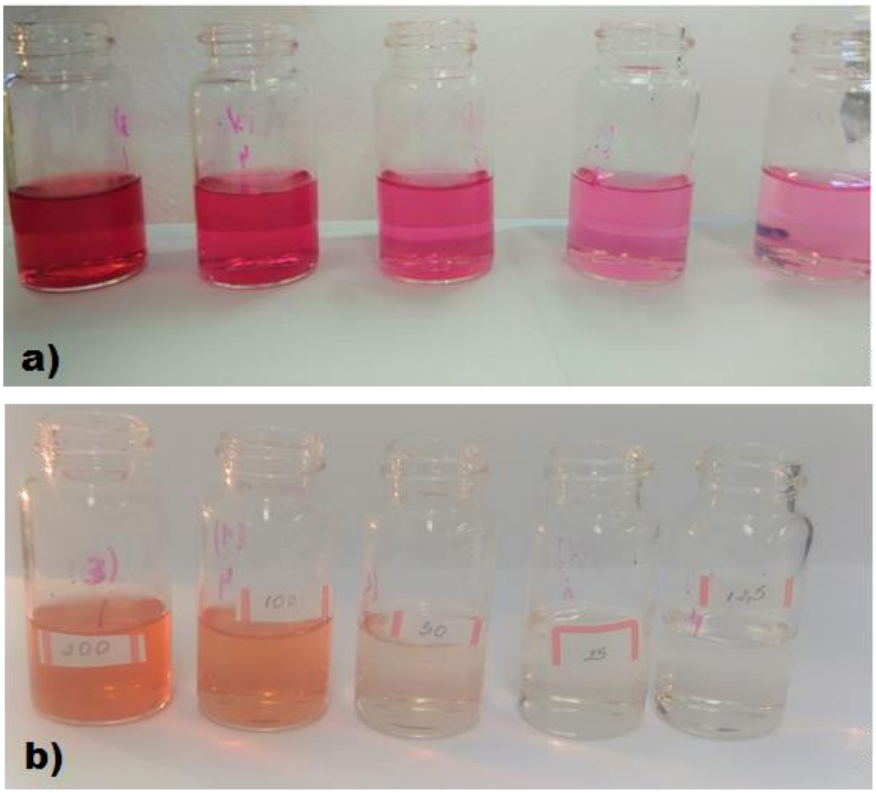

Figura 2. Degradação do pigmento na presença de luz. **a)** Diluição seriada do pigmento em DMSO, pH neutro. **b)** Perda da coloração após a exposição à lâmpada incandescente, por 24h.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os extratos etanólicos dos micélios e filtrados de cultivos dos cogumelos *Hericum erinaceus* CC29, *Pleurotus ostreatus* CC389 e *Volvariella volvacea* CC94 mostraram incapacidade inibir o crescimento de *S. aureus* e MRSA pelo método de difusão em disco.

- Os extratos etanólicos das três espécies analisadas inibiram significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 e aumentaram a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-17, em macrófagos estimulados por LPS, ($p < 0,05$).

- O cogumelo *V. volvacea* apresentou capacidade de produção de pigmentos das classes das quinonas. Os compostos identificados foram fusarubina, dihidrofusarubina (naftoquinonas) e bostricoidina (antraquinona).

- O pigmento do *V. volvacea* apresentou atividade antioxidante contra os radicais DPPH e ABTS, com índices de redução de 66% do DPPH na concentração de 7,0 µg/mL, e 45% do ABTS na concentração de 9,2 µg/mL.

- O pigmento do *V. volvacea* mostrou efetiva capacidade anti-inflamatória ao reduzir a superexpressão de TNF-α, IL-1β e IL-6 e induzir a produção IL-10 e IL-17, em macrófagos ativados, ($p < 0,05$).

- Pode-se concluir que é possível obter substâncias biologicamente ativas, de grande interesse industrial e farmacológico, por meio do cultivo micelial dessas espécies de cogumelos comestíveis.