

COGUMELOS: UMA FONTE PROMISSORA DE COMPOSTOS ATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOPRODUTOS FARMACÊUTICOS E NUTRACÊUTICOS

Carlos Ricardo Soccol
Francisco Menino Destéfani Vítola
Rosália Rubel
Margarete Kimie Falbo
Luiz Alberto Junior Letti
Marcelo Bellettini
Vanete Thomaz Soccol

9.1 INTRODUÇÃO

Existe grande diversidade de macromicetos no mundo, e a rica variedade de formas e cores que eles apresentam se reflete na diversidade de estruturas moleculares que os compõem. Alguns cogumelos são comestíveis, outros, ou

não apresentam características organolépticas agradáveis ou são tóxicos. Algumas espécies produzem substâncias alucinógenas e outras produzem substâncias potencialmente letais, outras ainda contêm importantes substâncias que podem ser usadas para fins medicinais, capazes de curar ou tratar as mais diversas enfermidades^{1,2}.

Alguns dos benefícios proporcionados pelos cogumelos podem ser obtidos simplesmente incluindo cogumelos comestíveis e produtos derivados na alimentação³. Outra possibilidade é a adição de extratos de cogumelos ricos em substâncias ativas como suplemento em alimentos, como massas, bebidas, cereais, gelatinas e temperos. Esses alimentos com propriedades funcionais, denominados nutracêuticos⁴, contendo cogumelos e/ou substâncias derivadas apresentam um grande potencial de mercado, ainda quase totalmente inexplorado no Brasil⁵⁻⁷.

O emprego de cogumelos medicinais para o preparo de fármacos requer a identificação e purificação de compostos ativos. Trata-se de um campo já relativamente desenvolvido na Ásia, Europa e América do Norte, que representa um potencial estratégico para o Brasil, levando-se em conta a admirável biodiversidade nacional de cogumelos^{8,9}. Em todo o país observa-se um crescimento no número de pesquisadores e de laboratórios envolvidos em variadas etapas de pesquisa, desde o levantamento da biodiversidade e isolamento de novas espécies até a avaliação de propriedades farmacológicas, identificação e caracterização molecular de princípios ativos.

Neste capítulo estão descritos alguns exemplos de atividades farmacológicas de substâncias produzidas por cogumelos, com base em relatos amplamente documentados na literatura científica, incluindo atividades antimicrobianas e antiparasitárias, imunomoduladoras e antitumorais, prevenção/tratamento de doenças cardiovasculares e como agentes antioxidante. Também incluímos uma revisão geral dos fundamentos científicos e desenvolvimentos técnicos ao longo da história, além de breves revisões acerca de três importantes espécies de cogumelos medicinais: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris* e *Agaricus subrufescens*. Como exemplo de aplicação técnica, destacamos a produção de polissacarídeos bioativos a partir de cultivos miceliais, por ser uma classe de substâncias bem estudada e por já existirem produtos no mercado mundial com base nessa tecnologia. Um protocolo para produção e recuperação, em escala laboratorial, de exopolissacarídeos a partir do cultivo micelial submerso de *G. lucidum* é apresentado, assim como um método analítico para estimar a produtividade do processo, de modo a fornecer subsídios para realizar experimentos de otimização da produção e da recuperação/purificação.

Muitas perspectivas emergem quanto ao futuro da biotecnologia de macromicetos no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos. Espera-se que o presente capítulo contribua para esse objetivo, difundindo informações que estimulem novas pesquisas, direcionadas para a geração de novos e melhores medicamentos e alimentos funcionais, com vistas à manutenção e promoção da saúde e qualidade de vida da população.

9.2 FUNGOS/COGUMELOS: ASPECTOS GERAIS E BIOLOGIA

Os fungos são um grupo de organismos distinto dos vegetais e dos animais, porém evolutivamente mais próximos dos vegetais e dos animais que de qualquer outro grupo de organismos. Os fungos apresentam quitina (comum em insetos) e glucanas (comuns em vegetais) na composição das suas paredes celulares. Em geral, crescem fixos sobre substrato nutritivo, como os vegetais, porém, diferentemente dos vegetais, os fungos não apresentam clorofila, e dessa forma não são capazes de realizar fotossíntese. Retiram a energia e o material que precisam para se desenvolver da digestão de matéria orgânica. São, portanto, heterotróficos, como os animais. Podem apresentar o papel ecológico de decompositores, parasitas, comensais ou simbioses^{8,10}.

Existem fungos unicelulares, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada há milênios pela humanidade para produzir pão, cerveja e vinho. Esses organismos são também o ponto de partida para a fabricação de bebidas destiladas e de etanol combustível. Outros fungos são multicelulares e formam redes de filamentos. Cada filamento, formado por células alongadas, é denominado hifa. Uma rede de hifas se denomina micélio. Os fungos filamentosos podem se reproduzir de maneira assexuada, pela fragmentação das hifas ou por reprodução sexuada ou assexuada, pela produção de esporos. Alguns dos fungos filamentosos produzem esporos em estruturas microscópicas. Outros são capazes de formar corpos de frutificação macroscópicos, que são tecnicamente chamados carpóforos e popularmente conhecidos como cogumelos (Figura 9.1). Tais fungos são cientificamente denominados macromicetos ou macrofungos⁸.

O ciclo de vida dos cogumelos pode ser dividido em pelo menos três fases: esporo, micélio e corpo de frutificação, também chamado carpóforo (Figura 9.2). Dadas as condições adequadas de temperatura, umidade e nutrientes, os esporos germinam, dando origem a estruturas filamentosas, multicelulares, denominadas hifas, que secretam enzimas digestivas e absorvem

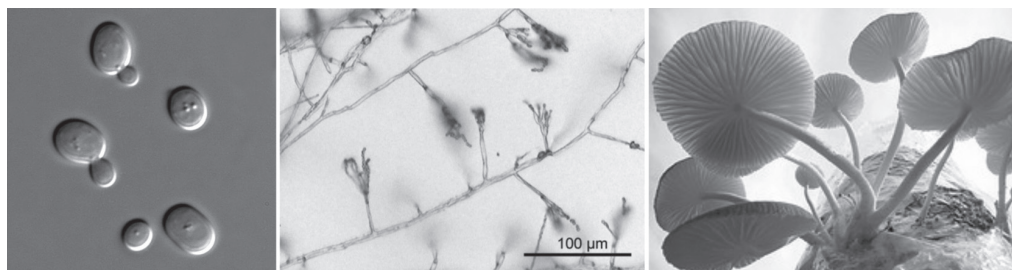


Figura 9.1 Leveduras (esquerda)¹¹, bolor (centro)¹², cogumelos (direita).

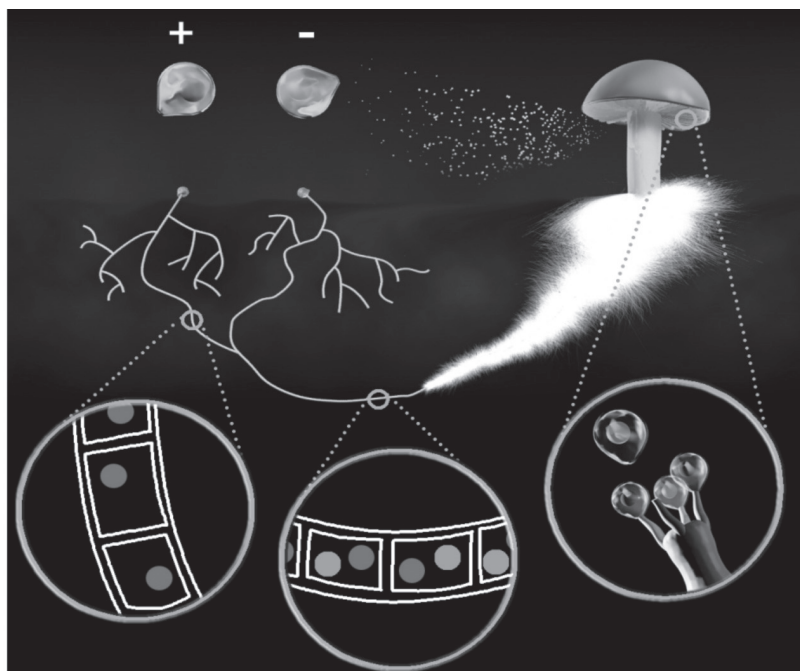


Figura 9.2 Representação esquemática do ciclo de vida dos cogumelos. Ver texto para maiores detalhes.

moléculas do substrato. Um conjunto de hifas é denominado micélio. Cada esporo dá origem ao que se denomina micélio primário (formado por células mononucleadas haploides). Quando micélios primários compatíveis se encontram, pode ocorrer plasmogamia (fusão de células), gerando micélio secundário (células binucleadas, núcleos haploides). O micélio secundário

tem o potencial de gerar corpos de frutificação sob determinadas condições. Nos carpóforos, mais especificamente na região do himênio (lamelas nos champignons, por exemplo), são formadas estruturas (ascos ou basídios) onde ocorrem fenômenos de fusão e recombinação entre os núcleos, gerando novos esporos e fechando o ciclo (Figura 9.2).

Cogumelos decompositores primários (por exemplo, *Lentinus* spp. e *Pleurotus* spp.) são capazes de degradar e assimilar uma imensa variedade de moléculas orgânicas, podendo ser cultivados em substratos que incluem: serragem, cepilho, lascas e toras de madeira, palhas, bagaços, farelos, cascas, grãos e substratos líquidos, como melaço e milhacina¹³. Já os decompositores secundários, como os *Agaricus* spp. (por exemplo, champignon de Paris e cogumelo-do-sol) necessitam substratos previamente compostados (pré-decompostos por outros micro-organismos)¹⁴. Dessa forma, os cogumelos podem ser utilizados como ferramentas para reciclar resíduos orgânicos¹⁵.

Em relação ao aspecto nutricional, os cogumelos são uma ótima fonte alimentar (Tabela 9.1), e a composição em carboidratos, gorduras, vitaminas varia segundo a espécie e também segundo o substrato utilizado no seu cultivo¹⁶.

Tabela 9.1 Composição físico-química, em peso seco, de cogumelos. Adaptado de Trione e Michaels (1977, apud Yokomizo & Bononi, 1985)¹⁷

COGUMELO	PROTEÍNA (NX4,38)	CARBOIDRATO TOTAL	GORDURA	FIBRA	VALOR ENERGÉTICO
	(%)	(%)	(%)	(%)	(KCAL/100G)
<i>Agaricus bisporus</i>	23,9 a 34,8	51,3 a 62,5	1,7 a 8,0	8,0 a 10,4	328 a 381
<i>Auricularia</i> spp.	4,2 a 7,7	79,9 a 87,6	0,8 a 9,7	11,9 a 19,8	347 a 384
<i>Flammulina velutipes</i>	17,6	73,1	1,9	3,7	378
<i>Lentinula edodes</i>	13,4 a 17,5	67,5 a 78,0	4,9 a 8,0	7,3 a 8,0	387 a 392
<i>Pleurotus ostreatus</i>	10,5 a 30,4	57,6 a 81,8	1,6 a 2,2	7,5 a 8,7	345 a 367
<i>Volvariella volvacea</i>	21,3 a 43,0	50,9 a 60,0	0,7 a 6,4	4,4 a 13,4	254 a 374

Os cogumelos são constituídos, de um modo geral, de 90% de água, elevados teores de proteína, vitaminas (B1 e C), riboflavina, biotina e niacina. Apresentam todos os 21 aminoácidos essenciais, sendo ricos em sais minerais e fibras de baixo valor calórico (30 cal/100 g de cogumelo)¹⁸. Descobriu-se também que são capazes de produzir vitamina D, quando brevemente expostos ao sol¹⁹.

Mais de duas mil espécies de cogumelos são reconhecidas como comestíveis. Sabe-se que outras dezenas produzem substâncias alucinógenas, como a psilocibina (cogumelos do gênero *Psilocybe*) e a muscarina (*Amanita muscaria*)^{20,21} (ver Figura 9.3). Além disso, existem dezenas de espécies potencialmente letais. Como exemplo, pode ser citado que alguns miligramas por quilograma de massa corpórea da substância alfa amanitina, produzida por *Amanita phalloides* (o chapéu-da-morte) e *Galerina marginata*, podem levar um indivíduo saudável a óbito²² (ver Figura 9.4). Contudo, há espécies de macromicetos que contêm importantes substâncias medicinais^{2,23}.



Figura 9.3 Exemplos de macromicetos que produzem substâncias alucinógenas. *Psilocybe cubensis* (esquerda)²⁴ e *Amanita muscaria* (direita).

Exemplos de atividades farmacológicas experimentalmente confirmadas, exibidas por substâncias encontradas em cogumelos, são: hipolipidêmica, antiarterosclerótica^{27,28}, hipocolesterolêmica e diurética (importantes na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares), imunomoduladora (que resulta indiretamente em atividade antitumoral, aumento de resistência a infecções e amenização de reações alérgicas)²⁹, antioxidante³⁰, hepatoprotetora, antiparasitária, anti-inflamatória, antidiabética^{31,32} e moduladora da produção de hormônios^{3,33}.



Figura 9.4 Exemplos de macromicetos que produzem substâncias letais. *Amanita phalloides* (esquerda)²⁵ e *Galerina marginata* (direita)²⁶.

9.3 USO TRADICIONAL E CONFIRMAÇÕES CLÍNICAS

Indícios na literatura e história da humanidade apontam que os seres humanos vêm utilizando cogumelos com finalidades medicinais há vários milênios. Os registros formais mais antigos de propriedades medicinais de cogumelos estão em livros de medicina tradicional chinesa e datam de mais de 2 mil anos³⁴. Porém, há hipóteses de que essa história seja muito mais antiga. Foram encontrados, na fronteira entre a Itália e a Áustria, os restos mortais altamente conservados de um homem, que viveu em meados de 3300 a.C. Esse indivíduo portava uma bolsa com fragmentos de cogumelos de espécies não comestíveis, possivelmente para utilização medicinal³⁵.

Os egípcios destinavam os cogumelos para a alimentação dos nobres, e os romanos os consideravam comida dos deuses³⁶. Algumas religiões antigas, como a de povos astecas gregos, empregavam cogumelos alucinógenos em seus rituais²¹. Povos nativos do Brasil apresentam conhecimentos sobre a utilização alimentícia e medicinal de várias espécies de cogumelos. Os tupis-guaranis utilizam uma espécie de cogumelo chamada *Pycnoporus sanguineus* com finalidades medicinais. Os caingangues incluem a espécie *Pleurotus pulmonarius* na sua alimentação⁹. Os ianomâmis, da Amazônia, conhecem e utilizam várias espécies para finalidades alimentícias e medicinais³⁷.

Apesar de existirem registros antigos do conhecimento e utilização de cogumelos, o cultivo apenas foi viabilizado mais recentemente, na era cristã¹³. Os primeiros cogumelos cultivados foram do gênero *Auricularia*, na China, por volta de 400 d.C.;o domínio do cultivo do shiitake (*Lentinula edodes*), também na China, foi registrado em torno de 600d.C. O champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) apenas começou a ser cultivado em meados de 1600d.C.

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas técnicas para o cultivo de dezenas de espécies de cogumelos, inclusive algumas espécies de trufas. Porém, o cultivo de diversas espécies permanece um desafio a ser vencido. Vários fatores são bastante complexos, tais como as interações entre simbiontes (árvore/cogumelo, por exemplo) e as relações parasita/hospedeiro (cogumelo/inseto, por exemplo).

A utilização terapêutica milenar de cogumelos e as novas tecnologias de produção motivaram uma série de estudos para avaliar a bioatividade de diversas substâncias produzidas por esses organismos. Muitos artigos científicos confirmaram algumas das propriedades medicinais alegadas pela medicina tradicional¹³⁸⁻⁴⁰.

A Tabela 9.2 mostra resultados obtidos em experimentos clínicos envolvendo substâncias ativas derivadas de cogumelos.

Tabela 9.2 Atividades farmacológicas de substâncias extraídas de cogumelos, confirmadas em testes clínicos

EFEITO/DOENÇA	SUBSTÂNCIA	ESPÉCIE DE COGUMELO	MECANISMO/ DETALHES	ANO	REFERÊNCIAS
Anticâncer (gástrico)	Polissacarídeo K lentinana	<i>Lentinus edodes</i>	Prolongamento da sobrevida em pacientes com metástase	2009	41
Anticâncer (mama)	Extratos aquosos	<i>Agaricus bisporus</i>	Supressão da atividade de aromatase e da proliferação de células tumorais. Diminuição na produção de estrógeno.	2001	42
	Triterpenos hidroxilados	Diversas	Supressão da sinalização Akt/NF-κB	2008	43
	Polissacarídeo K (PSK)	<i>Coriolus versicolor CM-10</i>	Estimula as respostas imunológicas inata e adaptativa	2007 2006	44, 45
Anticâncer (colorectal)	Lectina	<i>A. bisporus</i> (ABL)	Inibe a proliferação de células tumorais humanas <i>invitro</i>	1993	46
	Extrato aquoso	<i>Inonotus obliquus</i>	Indução da expressão de proteínas pró-apoptóticas e inibição da expressão de proteínas antiapoptóticas	2009	47
	Extrato não especificado	<i>A. blazei</i> Murill <i>Kyowa</i> (AbMK)	Aumento da atividade de células NK. Alívio de efeitos colaterais da quimioterapia	2004	48
Anticâncer (cervical, ovariano, endometrial)	Lingzi Lentinana Clitocinet	<i>Ganoderma lucidium</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Leucopaxillus giganteus</i>	Efeitos antiproliferativos via indução da apoptose	2010 2008	49, 50

EFEITO/DOENÇA	SUBSTÂNCIA	ESPÉCIE DE COGUMELO	MECANISMO/ DETALHES	ANO	REFERÊNCIAS
Anticâncer (próstata)	Extrato etanólico	<i>G.lucidum</i>	Melhora o <i>international prostate symptom score</i> (IPSS) de homens com sintomas do trato urinário inferior, via inibição de 5- α -redutase	2008	51
	Extrato não especificado	<i>G. lucidum</i>	Indução da apoptose. Inibição da angiogênese	2004 2005	52, 53
Anticâncer (pancreático — sólido avançado)	Irofulven (citotóxica)	<i>Omphalotus olearius</i> (não comestível)	Atividade antitumoral e efeitos pré-clínicos positivos	2000	54
Imunomodulação	Andosan™	<i>A. blazei</i> 82%; <i>Hericiu erinaceus</i> 14,7%; <i>Grifola frondosa</i> 2,9%	Aumento na produção de citocinas <i>in vitro</i> Redução na produção de IL-1- β (97%), TNF- α (84%), IL-17 (50%) e IL-2 (46%). Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	2009	55
Imunomodulação (hipercolesterolemia)	Alfa-glucanas	<i>A. bisporus</i>	Diminuição na produção de TNF α induzida por lipopolissacarídeos em 69%. Decréscimo na produção de IL-12 e IL-10 <i>in vivo</i>	2010	56
Imunomodulação (câncer)	Glucana	<i>Trametes versicolor</i>	Aumento de sobrevida e funções imunológicas melhoradas	2010	57
Imunomodulação (doenças variadas)	Vários extratos	Várias espécies	Efeitos sobre células NK, macrófagos, células T e produção de citocinas. Ativação de vias mitogênicas por quinases (MAPK)	2007	58
Diabetes (tipo II)	Extrato AbM (com metformina e gliclazida)	<i>A. blazei</i> Murill (AbM)	Aumento da resistência à insulina, devido ao aumento na concentração de adiponectina	2007	59
Doenças cardiovasculares	Extrato não especificado	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Redução significativa na pressão sanguínea, glicose sanguínea, colesterol total e triglicérides (<i>in vivo</i>)	2007	60
	Polissacarídeos ligados a proteínas (A-BP e L-PBP)	<i>A. blazei</i> ; <i>Lentinus edodes</i>	Efeito hipolipidêmico e de controle de peso via mecanismo envolvendo absorção de colesterol	2002	61
Saúde mental e cognição	Extrato não especificado	<i>Hericiu erinaceus</i>	Aumento de pontuação em funções cognitivas de pessoas com problemas cognitivos leves	2009	62
	Dilinoleoil-fosfatidiletanolamina (DLPE)	<i>H. erinaceus</i>	Protege contra a morte celular neuronal causada pela toxicidade do peptídeo beta-amiloide (A beta) e estresse oxidativo; aumento de pontuação em funções cognitivas de pessoas com demência	2008	63
	HericenonasC — H; Erinacinas A-I	<i>Hericiu erinaceus</i>	Induz fator de crescimento de nervos (NGF) (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	2008	63
		<i>Agarius blazei</i> Murill (AbM)	Decresce concentrações de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, normalizando as funções do fígado de pacientes com hepatite B	2008	64
Hepatite B	Ganopoly®	<i>G. lucidum</i>	Atividades hipoglicêmica, antiviral e protetora do fígado em hepatite crônica	2005	65
Antiviral (HIV)	Farnesil hidroquinona, ganomicina I	<i>G. colossum</i>	Inibição da protease HIV-1	2009	66
Antiviral (poliomielite)	Polissacarídeos	<i>A. subrufescens</i> (<i>A. brasiliensis</i> , <i>A. blazei</i>)	Age no estágio inicial da replicação viral	2007	67

EFEITO/DOENÇA	SUBSTÂNCIA	ESPÉCIE DE COGUMELO	MECANISMO/ DETALHES	ANO	REFERÊNCIAS
Asma	Extrato não especificado	<i>Cordyceps</i> sp.	Inibe a proliferação e a diferenciação das células Th2 e reduz a expressão de citocinas, em células mononucleares do sangue periférico. Alivia inflamação crônica por aumentar as concentrações de IL-10 (in vivo)	2010	68
Constipação	Fibra	<i>Auricularia</i> spp.	Atenuam sintomas relacionados à constipação sem efeitos colaterais significativos (in vivo)	2004	69

Diversos laboratórios passaram a extrair substâncias bioativas a partir dos cogumelos e a elaborar uma série de produtos alimentícios, medicinais e cosméticos. Técnicas foram desenvolvidas também para produzir moléculas bioativas a partir de massas miceliais cultivadas em substratos sólidos^{70,71} e líquidos, encurtando assim o tempo de fabricação e permitindo mais fácil assepsia e controle dos processos^{5,27,72}. Alguns produtos que incorporam estas tecnologias já estão sendo fabricados e comercializados em vários países. Muitas substâncias derivadas de cogumelos estão em fase de testes clínicos de eficácia e toxicidade em todo o mundo.

A seguir, abordaremos com mais profundidade algumas das mais importantes espécies de cogumelos medicinais utilizadas como fonte de moléculas ativas para produtos farmacêuticos e nutracêuticos, ao longo da história.

9.3.1 Ganoderma lucidum

Ganoderma lucidum é um cogumelo medicinal conhecido e utilizado na China, Japão e Coreia há milênios e figura nos textos mais antigos de medicina tradicional chinesa como um medicamento superior, indicado no tratamento de uma série de enfermidades e sem efeitos colaterais (Figura 9.5). Não apenas propriedades medicinais eram atribuídas a esse cogumelo, mas até mesmo alegria e prosperidade seriam conferidas àqueles que o consumissem. Era um cogumelo relativamente raro de encontrar e, dessa forma, altamente valioso, destinado à nobreza e aos mais ricos.

Shen Nong no seu Pen Ts’ao Jing, um antigo texto medicinal chinês com 2000 anos diz que “o sabor é amargo, a sua energia neutra, não tem toxicidade. Cura a acumulação de fatores patogênicos no peito. É bom para o QI da cabeça, incluindo actividades mentais [...] O consumo em longo prazo deixa o corpo mais leve; nunca envelhecerás. Prolonga os anos”⁷⁴. Um livro médico chinês denominado de *O Bencao Gangmu*, publicado no século XVI, mostra também uma possível ligação entre a pesquisa moderna e o conhecimento popular ao descrever este cogumelo: “Afeta positivamente o QI do



Figura 9.5 *Ganoderma lucidum*⁷³.

coração, reparando a zona peitoral e beneficiando aqueles que têm um peito congestionado. Tomado ao longo de grande período de tempo mantém a agilidade do corpo, e os anos são prolongados [...]”⁷⁵.

O cultivo é atualmente dominado, o que popularizou os produtos derivados e estimulou um grande número de pesquisas ao redor do mundo sobre as diversas propriedades medicinais alegadas pela cultura popular³⁹. Contudo, o preço desse cogumelo continua elevado, o que o torna disponível para poucos. Esta é provavelmente a espécie de cogumelo medicinal mais estudada no mundo até hoje. Sabe-se que algumas substâncias produzidas por *G. lucidum* apresentam marcantes efeitos farmacológicos, com destaque para polissacarídeos e triterpenos⁷⁶.

Um grande número de atividades farmacológicas atribuídas aos polissacarídeos oriundos deste cogumelo é mediado pela atividade imunomoduladora dessas substâncias, como: atividade antitumoral⁷⁷, anti-inflamatória⁷⁸, antialérgica⁷⁹ e aumento de resistência a infecções.

Outras propriedades encontradas em substâncias produzidas por *G. lucidum* foram: atividade antioxidante, hipolipidêmica²⁸, hipocolesterolêmica, hipoglicêmica, antidiabética³², antiangiogênica e anti-HIV^{34,38}. Foram desenvolvidas técnicas para a produção de substâncias bioativas a partir do cultivo micelial dessa espécie em meios sólidos e líquidos, encurtando o tempo de produção e facilitando a padronização do produto final⁵.

Na Tabela 9.3 são apresentadas as substâncias ativas encontradas em *G. lucidum* e suas respectivas propriedades farmacológicas.

São comercializados cogumelos secos, pulverizados, encapsulados, extratos líquidos e em pó, ricos em polissacarídeos e produtos alimentícios suplementados com *G. lucidum*, como café e chocolate. Ainda não estão regulamentadas a produção e o uso deste cogumelo e produtos derivados no Brasil. Foi concluída no ano de 2015 a Consulta Pública nº14, de 15 de maio de 2012, sobre produtos da medicina tradicional chinesa, realizada pela ANVISA⁸⁰. O projeto originalmente não contempla os cogumelos mais especificamente, porém espera-se que o texto seja modificado para incluir essas importantes fontes de substâncias medicinais e nutracêuticas. Com a pressão de grupos internacionais que visam introduzir produtos no Brasil, de cultivadores brasileiros, de médicos que prescrevem e pacientes que consomem esses cogumelos, é de se esperar que tenhamos em breve posições mais claras acerca da legislação que normatiza e regula produtos desta espécie e de outras da medicina chinesa.

Tabela 9.3 Substâncias ativas encontradas em *Ganoderma lucidum* e seus respectivos efeitos

SUBSTÂNCIA	EFEITOS	ANO	REFERÊNCIA
Micélio	Imunomodulador, antitumoral	2008	77
	Antioxidante, hipolipidêmico, hipocolesterolêmico	2011	28
Triterpenos	Anti-inflamatório	2009	78
	Inibição da produção de óxido nítrico	2013	81
	Inibição da adipogênese	2010	82
	Antitumoral	2010	83
Polissacarídeos	Antialérgico	2012	79
	Anti-hiperglicêmico, anti-hiperlipidêmico	2013	84
	Anti-HIV	2013	34
Proteoglicana	Antioxidante, antidiabético, nefroprotetor	2014	32
Peptídeo glicana	Hipoglicêmico	1986	85
Extrato hidroalcoólico (etanol 70%)	Antiangiogênico, inibição da produção de óxido nítrico	2004	86
Polissacaropeptídeos	Apoptose, supressão da fosforilação de Erk1/2 estimulada por estresse oxidativo, resultando na inibição da expressão de c-fos e de fatores de transcrição AP-1 e NF-kappaB	2008 e 2006	87, 88

9.3.2 *Cordyceps militaris*

Fungos ascomicetos do gênero *Cordyceps* também são conhecidos e utilizados pelos chineses há milênios (Figura 9.6). Trata-se, em sua maioria de cogumelos parasitos de insetos, relativamente raros e, assim, de preço elevado. *Ophiocordyceps sinensis* é uma espécie que ocorre naturalmente no platô tibetano da China e margeando os campos elevados do Nepal, Butão e Índia, usada tradicionalmente para uma série de aplicações medicinais⁹⁰. Acredita-se que a própria coleta excessiva pode estar tornando esta espécie cada vez mais rara.



Figura 9.6 Carpóforo de *Cordyceps militaris* emergindo de um inseto⁸⁹.

Atualmente se domina o cultivo micelial e de estromas de uma espécie próxima, denominada *Cordyceps militaris*, que produz princípios ativos semelhantes. Essa prática viabiliza a produção dessas substâncias em escala industrial^{91,92}.

Os compostos bioativos de *Cordyceps* geralmente são extraídos de corpo de frutificação (pó e extrato), micélio (extrato e pó) ou sobrenadante da fermentação.

Dentre tais biocompostos destacam-se: polissacarídeos extracelular e intracelular, cordicepina, adenosina, guanosina, cordimina, lovastatina, ácido Gama Aminobutírico (GABA), ergosta-4,6,8, 22-tetraen-3-ona(ergona);

5 α ,8 α -epidioxi-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol; 5 α ,8 α -epidioxi-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol; 5 α ,6 α -epoxi-5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol; 5 α ,8 α --epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 β -D-glucopiranosídio; 6-epoxi-24(R)-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol; miriocina; melanina; cordisinina A-E, sitosterol, ergosterol, e serina protease⁹³.

Para esses produtos, são citadas na literatura mais de 30 ações benéficas para o homem, quer como medicamentos quer como produtos nutracêuticos. As principais ações são: imunomoduladora, antifatiga, imunossupressora, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antiglicêmica, antioxidante, anti-asma, produção de hormônio, antidepressão, anti-isquemia cerebral⁹³.

Polissacarídeos imunomoduladores e substâncias com alto poder antioxidante são produzidas por *C. militaris* em cultivo micelial^{30,94}. Esse cogumelo apresentou efeito hipolipidêmico e normalizou níveis de testosterona de camundongos expostos a dietas com alto conteúdo de lipídeos³³.

Extratos desse cogumelo também vêm demonstrando resultados promissores no tratamento da asma: inibem a proliferação e a diferenciação das células Th2 e reduzem a expressão de citocinas, por inibir a expressão do mRNA GATA-3 e estimular a expressão do mRNA Foxp3 em células mononucleares do sangue periférico. Esses extratos aliviam inflamações crônicas, por aumentar as concentrações de IL-10⁶⁸.

9.3.3 *Agaricus subrufescens* (*A. brasiliensis*, *A. blazei*)

Espécie nativa do Brasil, de taxonomia ainda controversa, conhecida popularmente como cogumelo-do-sol (Figura 9.7). Estudos sugerem que a espécie previamente identificada como *Agaricus blazei* e posteriormente denominada *A. brasiliensis* pode ser a mesma espécie que ocorre na América do Norte com o nome de *A. subrufescens*. Independentemente da classificação proposta, uma série de propriedades farmacológicas é atribuída a esta espécie pela medicina tradicional do interior do estado de São Paulo. Por este motivo, na década de 1960, pesquisadores japoneses levaram espécimes nativos do Brasil (mais especificamente da cidade de Piedade, no interior do estado de São Paulo), para serem cultivados e estudados quanto às suas propriedades medicinais. Atividades especialmente relacionadas à imunomodulação foram detectadas, inicialmente por pesquisadores japoneses e depois por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo, como: atividade antitumoral, antialérgica, anti-inflamatória e aumento de resistência a infecções^{40,95,96}.

Em estudos clínicos com extratos deste cogumelo, foi detectado aumento de atividade de células NK e alívio de efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes com câncer de ovário, endométrio e na região cervical⁴⁸.

Polissacarídeos ligados a proteínas A-PBP apresentaram efeito hipolipidêmico e de controle de peso via mecanismo envolvendo absorção de colesterol⁶¹.

Extratos de *A. blazei* (*A. subrufescens*), em combinação com as substâncias metformina e gliclazida, resultaram em um aumento da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2, devido ao aumento na concentração de adiponectina⁵⁹.

Descobriu-se também que polissacarídeos de *A. subrufescens* apresentam atividade antiviral, agindo no estágio inicial da replicação do vírus da poliomielite⁶⁷. Além disso, extratos deste cogumelo resultam no decréscimo nas concentrações de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, normalizando as funções do fígado de pacientes com hepatite B⁶⁴.



Figura 9.7 *Agaricus subrufescens*⁹⁷.

Apesar da utilização culinária ser possível, atualmente esta espécie é cultivada apenas para utilização medicinal. É comercializada na forma de corpos de frutificação secos em pedaços ou pulverizados, cápsulas de cogumelos secos pulverizados ou de extratos ricos em polissacarídeos. Contudo, apesar dos estudos científicos acerca das propriedades terapêuticas de substâncias

derivadas deste cogumelo, a legislação brasileira atualmente o aceita apenas como cogumelo comestível. Nenhuma propriedade farmacológica pode ser atribuída em material publicitário dos produtos formulados contendo substâncias oriundas deste cogumelo no país. Tudo indica que, com o volume de estudos realizados e o mercado que essas substâncias poderão alcançar, os procedimentos para regulamentação da utilização medicinal devam ser concluídos em breve. Este caso poderá ser um dos pioneiros na área de validação e regulamentação de fármacos derivados de cogumelos no Brasil.

9.4 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS DE COGUMELOS

Com base em informações da utilização tradicional e resultados experimentais rigorosos, novos produtos estão sendo desenvolvidos. Na Tabela 9.4 são apresentadas algumas patentes de produtos formulados com metabólitos bioativos obtidos a partir de cogumelos para a prevenção de doenças humanas, prova do grande interesse industrial e farmacêutico que os cogumelos vêm despertando.

Tabela 9.4 Patentes referentes a produtos contendo substâncias ativas de cogumelos

ANO	PRODUTO	REFERÊNCIAS
2013	Proteína imunomoduladora de <i>Ganoderma microsporum</i> com atividade antitumoral	98
2013	Extratos antitumorais de <i>Cyathus striatus</i>	99
2009	Polissacarídeo de <i>Lentinus</i> spp. para aplicações em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos	100
2009	Polissacarídeos produzidos por cultivo micelial no estado sólido para aplicação em produtos nutracêuticos e farmacêuticos	70
2003	Cosméticos anidros contendo extratos de cogumelos	101
2003	Extratos do micélio de <i>Antrodia camphorata</i> , compostos principalmente por polissacarídeos, com atividade imunomoduladora, antitumoral e antiparasitária	102
2003	Extratos ricos em polissacarídeos, de diversas espécies de cogumelos, com atividades anticâncer, imunomoduladora, antioxidante, hipotensiva e hipoglicêmica, principalmente para a fabricação de medicamentos injetáveis	103
2002	Nutracêuticos contendo cogumelos ou extratos	104
2002	Proteínas de <i>Tricholoma conglobatum</i> e <i>Scutellariae barbatae</i> com atividade anticâncer	105, 106

9.4.1 Antibióticos

Os fungos são notoriamente conhecidos como fontes de substâncias com atividade antibiótica, com destaque para o primeiro antibiótico (a penicilina), descoberta por Fleming em 1928. Fleming teve suas culturas bacterianas contaminadas por fungos do gênero *Penicillium*. Percebeu que estes fungos eram capazes de combater bactérias, e que deveriam produzir algum tipo de substância com ação antimicrobiana, o que foi comprovado em testes subsequentes. Uma série de técnicas foi desenvolvida para aumentar a produtividade e a escala do processo para a obtenção de penicilina, incluindo técnicas de mutação e manipulação genética¹⁰⁷.

Em 1950, foi encontrado um antibiótico de nome pleuromutilina em cogumelos do gênero *Clitopilus*¹⁰⁸. Plectasina, um peptídeo encontrado em uma espécie de cogumelo chamada *Pseudoplectania nigrella*, apresentou forte atividade antimicrobiana. Existem técnicas para produzir plectasina recombinante em grandes escalas^{109,110}.

Os cogumelos são fonte de antibióticos naturais, de baixa e alta massa molecular. Os compostos de baixa massa molecular são principalmente metabólitos secundários, tais como terpenos, esteroides, antraquinona e derivados do ácido benzoico. Já os metabólitos de alta massa molecular incluem, principalmente, os peptídeos e proteínas.

Nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* têm demonstrado que essas substâncias apresentam atividades contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas¹¹¹⁻¹¹³ incluindo várias cepas de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos¹¹⁴. Tem sido sugerido que os efeitos antimicrobianos do extrato de cogumelo podem ser indiretos. Foi demonstrado que uma fração de polissacarídeo de *Agaricus brasiliensis* pode aumentar a resistência do hospedeiro contra alguns agentes infecciosos, pela estimulação da atividade microbicida dos macrófagos¹¹⁵.

Estudos modelos demonstraram efeitos antibacterianos de *A. blazei* contra *Streptococcus pneumoniae* em ratos com infecção sistêmica. A falta de um efeito antibiótico em pneumococos em estudo *in vitro* e o aumento dos níveis de citocinas MIP-2 e de TNF no soro de camundongos que receberam extrato do fungo levanta a hipótese de que seu efeito protetor pode estar relacionado ao sistema imunológico nato¹¹⁶. Em estudo posterior, os autores mostraram que um extrato de *A. blazei* pode proteger contra septicemia bacteriana letal em um modelo de peritonite em rato¹¹⁷.

Extratos de *A. bisporus* têm maior número de estudos antimicrobianos realizados. Seu extrato metanólico revelou atividade contra *Bacillus subtilis*,

em concentração menor do que a ampicilina (MIC = 12,5 mcg/mL)⁷. O metabólito também foi eficiente contra *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *M. flavus*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*¹¹⁸⁻¹²⁰.

9.4.2 Doenças cardiovasculares

Os cogumelos são uma fonte nutricional bastante saudável, contendo baixos níveis de lipídeos e açúcares e altas concentrações de fibras, vitaminas e proteínas. Não apenas são alimentos de baixa caloria, mas também apresentam substâncias que podem colaborar na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares.

Estatinas presentes nos cogumelos do gênero *Pleurotus* reduzem os níveis de colesterol LDL no sangue. Substâncias presentes no micélio das espécies *G. lucidum* e *A. subrufescens* reduzem as concentrações de triglicérides e de colesterol total no sangue²⁸. Foi demonstrado que lectinas, presentes em cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus*, apresentam efeito supressor do apetite¹²¹.

Várias espécies de cogumelos comestíveis, incluindo shiitake, cogumelos-ostra e maitake, apresentam altas concentrações de ergotioneína, aminoácido com alto poder antioxidante e que pode atuar na prevenção de doenças coronarianas³.

Triterpenos produzidos por *G. lucidum* inibem a adipogênese por um mecanismo que envolve a redução da expressão de um gene relacionado ao processo, chamado SREBP-1c⁸². Outras atividades farmacológicas encontradas em cogumelos e que podem contribuir para a prevenção de doenças cardiovasculares são: redução da agregação de plaquetas e diminuição da pressão arterial¹²².

9.4.3 Antiparasitários

Extratos de cogumelos têm sido avaliados na busca de medicamentos contra protozoários, pois os medicamentos disponíveis apresentam graves efeitos colaterais. Extratos obtidos a partir do produto de cultivo micelial em meio líquido de três diferentes espécies de macromicetos comestíveis nativos, isolados pelo grupo (*Pleurotus djamor*, *Lycoperdon marginatum* e *Oudemansiella canarii*) foram avaliadas quanto à sua atividade frente à *Leishmania infantum*, causadora da leishmaniose visceral^{123,124}. Foi utilizada

uma metodologia baseada na incorporação de timidina radiomarcada, em microcultivos dos parasitas. Foram obtidos os seguintes valores de CPM para cada tratamento testado: controle positivo (695 ± 20), controle negativo (1628 ± 113), *P. djamor* (1082 ± 272), *L. marginatum* (775 ± 139) e *O. canarii* (806 ± 138). Duas espécies medicinais nativas (*Ganoderma applanatum* e *G. stipitatum*) também foram testadas contra *L. infantum*, utilizando uma metodologia envolvendo a incubação dos parasitas em microcultivos contendo o reagente MTT¹²⁵. Os resultados obtidos (absorbância em 540 nm) foram: controle positivo ($0,290 \pm 0,059$), controle negativo ($0,043 \pm 0,102$), *G. applanatum* ($0,059 \pm 0,013$) e *G. stipitatum* ($0,294 \pm 0,042$).

Também os fungos têm sido relatados como inimigos naturais de nematoides parasitos de humanos, animais e plantas. São capazes de desenvolver estratégias para infectar ou capturar nematódeos, para sua alimentação ou sobrevivência. Mais de 200 espécies de fungos nematófagos estão catalogadas. São classificados em três grupos com base no mecanismo de ação: predadores, endoparasitos e parasitos de ovos¹²⁶.

As espécies de fungos pertencentes ao grupo dos predadores formam armadilhas como redes adesivas, anéis constritores ou não, botões ao longo de suas hifas, utilizando-as para capturar e penetrar no corpo do nematoide e consumi-lo rapidamente¹²⁷. Os fungos endoparasitos infectam os nematoides através de seus esporos. A infecção pode ocorrer através da aderência do esporo à cutícula do nematoide ou através da sua ingestão. Os esporos germinam rapidamente e se difundem pela cavidade corpórea, absorvendo todo o conteúdo do nematoide¹²⁸. Os fungos parasitos de ovos fixam suas hifas de modo a danificar a casca do ovo, provavelmente pela ação de enzimas, facilitando a penetração para, em seguida, provocar sua destruição¹²⁹.

Um quarto grupo foi proposto por Li et al. (2000)¹³⁰, que são os fungos produtores de toxinas, como *Pleurotus ostreatus*, que imobiliza o nematoide pela toxina produzida por suas hifas especializadas, as quais crescem quimiotropicamente em direção a boca de suas presas, digerindo-as¹²⁶. Luo et al. (2006) relataram que o fungo *Stropharia rugosoannulata* poderia representar um quinto grupo, pois age mecanicamente, danificando a cutícula do nematoide com uma estrutura redonda e espinhosa denominada “*spiny ball*”¹³¹.

Estudos envolvendo fungos nematófagos na saúde animal tiveram seu início no século XX, na França^{132,133}. Na década de 1990, vários estudos com fungos nematófagos foram realizados, impulsionados pela busca de alternativas no controle da verminose, tendo em vista o crescente aumento

da resistência anti-helmíntica, principalmente em pequenos ruminantes, relatado por diversos pesquisadores do Brasil¹³⁴⁻¹³⁸ e de outras regiões do mundo¹³⁹⁻¹⁴¹.

Estudo realizado na Holanda por Eysker et al. (2006)¹⁴² e outro na Suíça por Faessler et al. (2007)¹⁴³ administraram por via oral em cordeiros a dose diária de 5×10^5 e 10^6 clamidosporos de *D. flagrans* por quilograma, respectivamente, por um período de quatro meses. Não encontraram nenhum efeito significativo em parâmetros parasitológicos como contagem de ovos por grama de fezes, contagem de larvas de terceiro estágio (L3) na pastagem e ganho de peso, embora a atividade do fungo tenha sido claramente visível nas coproculturas.

Os principais gargalos para o desenvolvimento de formulações comerciais de fármacos e nutracêuticos antiparasitários usando cogumelos são a produção em larga escala, armazenamento e a forma de administração¹⁴⁴.

9.4.4 Imunomoduladores

Sabe-se que os cogumelos produzem substâncias capazes de modular o sistema imunológico^{29,96}. Não apenas são capazes de estimulá-lo, mantendo as defesas altas, mas também podem amenizar as reações imunológicas exacerbadas das alergias.

O aumento da resistência a infecções, conferido pelo consumo de cogumelos, está associado à ativação do sistema imunológico. Também a atividade antitumoral dos cogumelos está em grande parte associada a essa ativação⁷⁷.

As células “*natural killer*” (NK) são células diretamente relacionadas ao combate a células estranhas, como células tumorais ou micro-organismos patogênicos. Os cogumelos contêm substâncias capazes de estimular as células NK, bem como outras populações de células de defesa, como alguns tipos de linfócitos T e B¹⁴⁵.

Polissacarídeos ricos em cadeias de β -glucanas foram identificados como responsáveis por alterações na contagem de diferentes tipos de células do sistema imunológico e na produção de moléculas sinalizadoras, como citocinas e óxido nítrico^{40,146}. Polissacarídeos de *Antrodia camphorata*, por exemplo, estimulam a produção da citocina IL-2 por células Th1, enquanto inibem a produção de IL-4 por células Th2¹⁰². Outras classes de compostos imunomoduladores são: lectinas, terpenoides e proteínas²⁹. Triterpenos e o extrato etanólico de *G. lucidum* inibem a produção de óxido nítrico por macrófagos^{81,86}.

9.4.5 Antitumorais

Diversos são os mecanismos de ação antitumoral de substâncias derivadas de cogumelos. Algumas dessas moléculas são capazes de combater células tumorais, de maneira indireta, através da ativação do sistema imunológico⁷⁷. Dentre essas substâncias indiretamente antitumorais se destacam polissacarídeos, frequentemente glucanas⁷². Glucanas nada mais são que cadeias de moléculas de glicose. Contudo, dadas as diferentes possibilidades de ligação entre as subunidades, existem diferentes tipos de glucanas. Foram identificadas em cogumelos glucanas especialmente ativas, cuja estrutura principal consiste em cadeias de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), com ramificações do tipo β -(1 \rightarrow 6) (Figura 9.8). Essas glucanas ativam linfócitos T, linfócitos B, células NK, neutrófilos, pela interação com receptores celulares específicos. A massa, o padrão de ramificações, a conformação espacial e modificações químicas podem influenciar a atividade dessas moléculas. Também já foram encontrados em cogumelos alguns polissacarídeos ativos formados por diferentes unidades monossacarídicas (heteropolissacarídeos) e complexados com unidades proteicas (proteoglucanas)³⁴. Existe uma série de produtos comerciais cujos compostos ativos são esses polissacarídeos. Lentinana é o nome de um polissacarídeo extraído da espécie *Lentinula edodes* (o shiitake)¹⁰⁰. A esquizofilana é extraída de *Schizophyllum commune*. O PSK, também denominado Krestin comercialmente, é extraído de *Trametes versicolor*. Grifolana é extraída do cogumelo comestível *Grifola frondosa*¹⁴⁷. Diversas outras espécies produzem polissacarídeos imunomoduladores, como *G.lucidum*⁷⁷, *C.militaris*⁹⁴ e *A.subrufescens*⁹⁶.

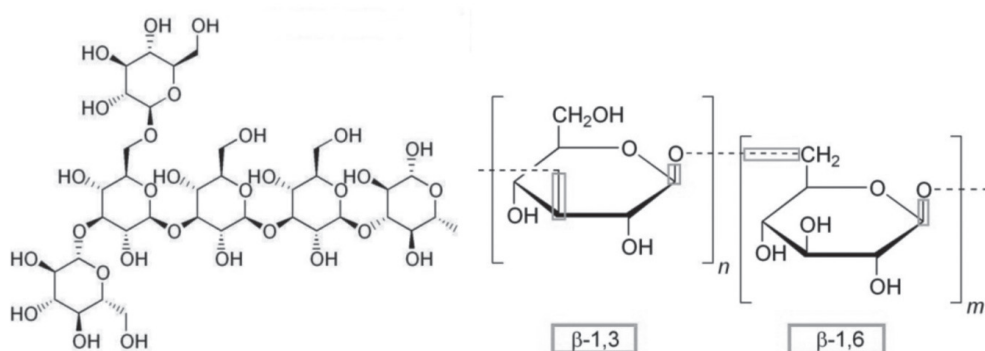


Figura 9.8 Cadeia de glucana β (1 \rightarrow 3) com ramificações β (1 \rightarrow 6) (esquerda). Diagrama destacando posições das ligações (direita).

Outras substâncias derivadas de cogumelos apresentam atividade antitumoral por outros mecanismos, como substâncias de baixa massa molecular encontradas na espécie *Cyathus striatus*, que inibem a multiplicação das células tumorais pela redução da síntese de DNA e indução da apoptose⁹⁹. Proteínas derivadas de *Tricholoma conglobatum* e *Scutellariae barbatae* apresentam atividade antitumoral por inibir o crescimento de células endoteliais e a vascularização de tecidos^{105,106}.

Os mecanismos de atividade antitumoral de triterpenos de *G. lucidum* sobre células HeLa foram estudados seguindo uma abordagem proteômica. Foram observados efeitos de modulação sobre a expressão de proteínas envolvidas na proliferação e morte celular, carcinogênese, estresse oxidativo e sinalização de cálcio⁸³.

9.4.6 Antioxidantes

O cultivo micelial submerso de macromicetos está sendo estudado como via para a produção de substâncias antioxidantes a partir de resíduos agroindustriais, atualmente descartados em grande quantidade em nosso país²⁸.

O resíduo líquido obtido pela prensagem do bagaço de pupunha e a água residual de hidratação desse substrato depois de seco e reidratado foram testados, com sucesso, como meio de cultivo para diferentes cepas de macromicetos do gênero *Pleurotus*. Foram testadas águas residuais de hidratação de duas diferentes frações da planta (interna e externa) e cepas de duas diferentes espécies (*P. ostreatus* e *P. djamor*). Os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos com *P. djamor* cultivado na fração interna, apresentando atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ¹⁴⁸.

Um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman de 12 fatores foi aplicado para avaliar o efeito de cinco diferentes fatores (razão volume/superfície e adição de sulfato de cobre, sulfonato de lignina, peróxido de hidrogênio e anilina aos meios de cultivo) como indutores de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no produto do cultivo micelial submerso de uma cepa de *Pleurotus ostreatus*. A adição de sulfonato de lignina aos meios de cultivo praticamente triplicou os níveis de atividade enzimática dos produtos¹⁴⁹.

Da mesma forma, um planejamento experimental multivariado foi utilizado para avaliar a influência de seis variáveis: concentração de substrato, tempo de cultivo, adição de extrato de levedura, glicose, sulfato de cobre e

sulfato de zinco, sobre a atividade antioxidante do produto do cultivo de *P. djamor*, utilizando como substrato o resíduo líquido obtido pela prensagem do bagaço de pupunha¹⁵⁰. Os fatores mais significativos para o aumento da atividade antioxidante testados foram: a concentração de substrato e a adição de extrato de levedura.

9.4.7 Antidiabéticos

O diabetes *mellitus* é a doença endócrina mais comumente encontrada na população, com variadas causas na sua etiologia e patogenesia. Atividades antidiabéticas do extrato etanólico da matéria seca do caldo de *Coriolus versicolor*, obtido por fermentação submersa, foi estudado³¹. Nesse estudo, os autores observaram melhora nos quadros de hiperglicemia, hiperlipidemia, estresse oxidativo e atividade protetora contra as células pancreáticas β em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina.

9.5 PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS A PARTIR DO CULTIVO MICIAL SUBMERSO DE *GANODERMA LUCIDUM*

O ciclo de produção da espécie *G. lucidum* pode levar de quatro a seis meses para desenvolvimento completo dos corpos de frutificação. Porém, algumas substâncias podem ser produzidas a partir do cultivo micelial em meios sólidos ou líquidos, em menos de um mês, se a incubação for realizada nas condições ótimas de temperatura e aeração^{28,70,151}. Biorreatores usuais para o cultivo em meios líquidos incluem frascos Erlenmeyer, agitados ou não, garrafões, biorreatores de bancada (Figura 9.9) ou fermentadores em escala industrial.

Vários tipos de sensores podem ser adaptados para o monitoramento e o controle dos processos, como sondas de CO_2 e O_2 , turbidímetros, e refratômetros. Os parâmetros passíveis de controle incluem a temperatura, a taxa de aeração, a velocidade de agitação, o pH, a remoção de produtos e realimentação de nutrientes.

O protocolo aqui sugerido foi adaptado de técnicas correntemente utilizadas na pesquisa e na produção industrial^{34,76,151}, para realização em pequena escala. O processo consiste na obtenção de linhagens, formulação de meios líquidos, distribuição em recipientes de cultivo, autoclavagem, inoculação

com culturas miceliais puras, incubação e operações de recuperação e purificação de exopolissacarídeos (Figura 9.10).

Cada uma das etapas será mais detalhadamente descrita a seguir.



Figura 9.9 Biorreator de bancada.

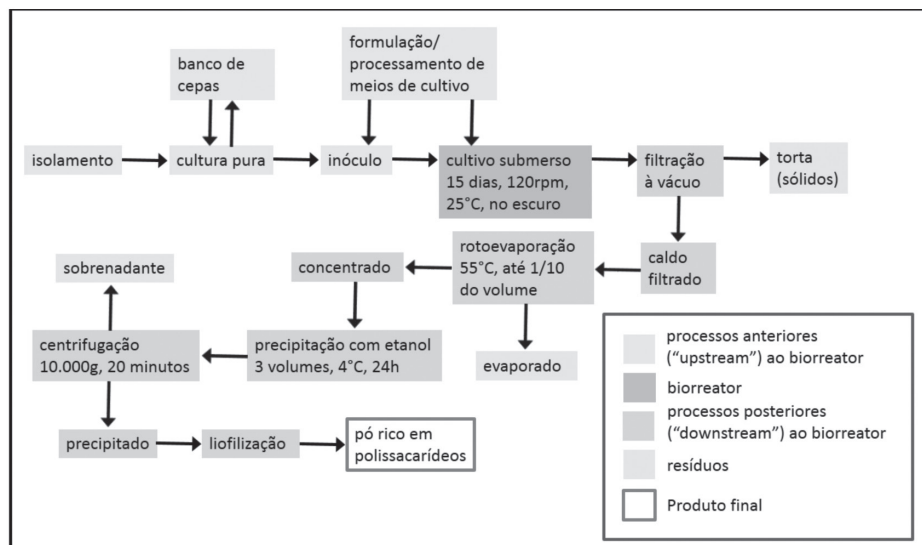


Figura 9.10 Fluxograma da produção de exopolissacarídeos a partir do cultivo micelial submerso.

9.5.1 Obtenção de cultura pura

O processo de isolamento de novas estirpes depende de maneira fundamental da obtenção e da seleção de linhagens com boa produtividade de exopolissacarídeos ativos, nos meios e nas condições de cultivo mais adequados à localidade em que será implantada a produção. Existem culturas de linhagens puras de diversas espécies de cogumelos disponíveis em bancos de cepas nacionais e internacionais, como a ATCC¹⁵², além de existirem empresas especializadas na produção e no comércio de matrizes e sementes.

Um novo isolado também pode ser obtido utilizando esporos ou tecidos de corpos de frutificação como ponto de partida. Quando esporos são utilizados, ocorrem processos de recombinação genética, gerando novas linhagens. No caso de realizar isolamento a partir de tecidos de corpos de frutificação, são obtidos clones do cogumelo original. Em ambos os casos, o material deve ser transferido, da maneira mais asséptica possível, para meios de cultivo adequados.

Exemplos de meios de cultivo usualmente empregados para cogumelos saprofíticos incluem ágar batata dextrosado (BDA) e ágar extrato de malte (MEA). Para cogumelos micorrízicos existem meios mais enriquecidos, como o Melin Norkrans modificado (MMN). *Ganoderma lucidum* é um cogumelo necrosaprofítico no sentido de que parasita árvores até a sua morte e, após, continua a decompor seus tecidos. Este cogumelo é facilmente cultivado nos meios BDA e MEA.

Para se coletar esporos, podem ser empregadas campânulas de vidro e superfícies de papel-alumínio autoclavadas. O píleo é posicionado com o himênio para baixo.

Quando possível, deve-se cortar o estipe, de forma que faça uma base para apoiar o cogumelo, evitando tocar as lamelas no papel-alumínio. Também pode ser utilizado arame para confeccionar um suporte, para posicionar o cogumelo. O conjunto todo pode ser coberto com uma campânula, para evitar que correntes de ar dispersem os esporos ou que tragam contaminações. Se o cogumelo já estiver relativamente seco, um pedaço de papel encharcado com água esterilizada pode ser colocado no interior da campânula, para manter a umidade alta. Se estiver no ponto de desenvolvimento correto, o cogumelo liberará esporos, fazendo uma impressão sobre o papel-alumínio (Figura 9.11).

O sistema pode ser então desmontado e o cogumelo descartado como lixo orgânico comum. A campânula e o suporte podem ser lavados e utilizados novamente. O papel-alumínio, contendo esporos, pode ser armazenado

conforme descrito na Seção 9.5.2. Para reativá-los basta transferi-los para placas de Petri (esterilizadas) contendo meios de cultivo adequados e incubá-los no escuro. Para *G. lucidum* o meio de cultivo pode ser BDA ou MEA e a temperatura de incubação, 25 °C.

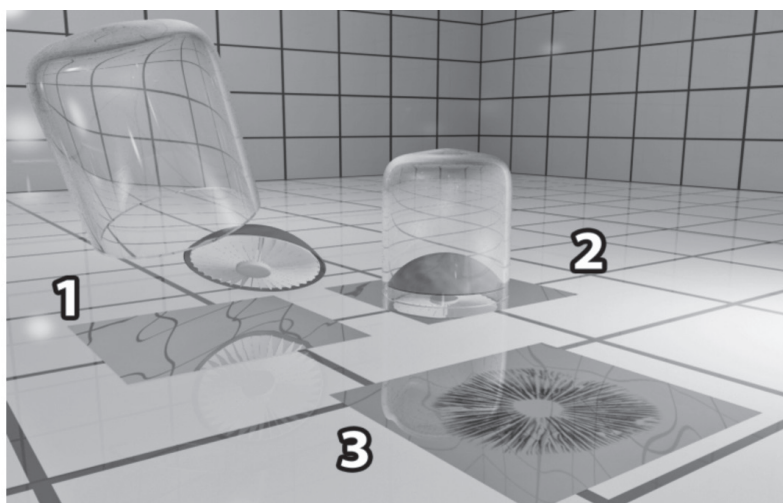


Figura 9.11 Representação esquemática de técnica para coleta de esporos: (1) Campânula de vidro e papel-alumínio autoclavados; pílão com himênio voltado para baixo, estipe cortado. (2) Sistema montado para coleta de esporos. (3) Impressão de esporos.

A esporada de *G. lucidum* apresenta coloração de ferrugem, entre laranja e marrom. Quando maduros, os corpos de frutificação de *G. lucidum* produzem esporos por vários dias ou até meses. Porém, quando colhidos, a produção de esporos cessa, de maneira que é interessante para esta espécie adaptar a técnica para coletar os esporos com o cogumelo ainda crescendo no substrato. Para tanto, basta posicionar folhas de papel-alumínio sob o himênio, no próprio local de frutificação. Dessa forma, maior quantidade de contaminantes irá se misturar aos esporos, contudo, devido à abundante esporulação desta espécie, uma espessa camada será depositada. Posteriormente, técnicas de isolamento poderão ser utilizadas para eliminar as contaminações.

Pelo menos duas técnicas podem ser utilizadas para distribuir os esporos:

- 1) Lavar a superfície do alumínio com água esterilizada e distribuir gotas da suspensão obtida sobre o meio de cultivo fresco, previamente esterilizado

e distribuído em placas de Petri, com o auxílio de uma pipeta, também esterilizada.

- 2) Utilizar uma alça de platina previamente flambada e resfriar em meio semissólido de cultivo. Antes do completo resfriamento (<42 °C, aproximadamente), passar a alça, com um pouco de gel aderido, sobre a superfície repleta de esporos do papel-alumínio; um grande número de esporos fica aderido ao gel. Os esporos são depositados sobre meio de cultivo fresco, podendo-se utilizar a técnica de estriamento para espalhar os esporos e distanciar os focos de contaminação de áreas com micélio saudável.

Para isolamento, a partir de tecidos dos corpos de frutificação, devem-se selecionar os indivíduos mais saudáveis e com características mais desejáveis (no caso deste exemplo, alta produção de exopolissacarídeos), visto que o isolamento gerará clones deste cogumelo inicial.

Uma assepsia superficial deve ser realizada a seco, removendo partes contaminadas e sujidades. Se necessário, cortar e eliminar porções do cogumelo. Com o cogumelo superficialmente limpo, se faz uma incisão superficial com o auxílio de um bisturi flambado, e o corpo de frutificação é então cortado ao meio com as mãos. Isto é feito para evitar carregar contaminações da superfície para o interior do cogumelo. Ainda, com o auxílio do bisturi flambado, corta-se um pedaço pequeno descontaminado de uma região interna do píleo ou do estipe, e transfere-se para meio de cultivo fresco adequado. A extremidade mais jovem do píleo é a região mais fácil de cortar e com mais probabilidade de sucesso no isolamento de *G. lucidum*.

Independentemente da técnica de isolamento, podem ser necessários repiques sucessivos para eliminar completamente qualquer foco de contaminação e para selecionar os isolados mais vigorosos.

9.5.2 Manutenção da cultura pura

Esporos coletados sobre papel-alumínio podem ser armazenados em tubos de ensaio ou placas de Petri previamente autoclavados. Mesmo à temperatura ambiente, esporos podem ser mantidos viáveis na ausência de luz e baixa umidade, por vários anos.

Culturas miceliais puras em placas de Petri ou tubos de ensaio com meio semissólido inclinado normalmente podem ser mantidas por semanas até meses à temperatura ambiente e por meses na geladeira (4 °C). Micélio de *G.*

lucidum pode sobreviver nessas condições por mais de seis meses, mas usualmente não é possível conservar cepas nessas condições por anos. Consequentemente, para manter culturas puras dessa forma, se fazem necessários repiques periódicos. Algumas cepas não suportam refrigeração e precisam ser mantidas em temperatura ambiente. A manutenção prolongada de micélios por repique pode levar à seleção de mutações indesejadas e a consequente degeneração das linhagens.

Para períodos de conservação mais longos existem outras técnicas, como a submersão em água estéril ou óleo mineral e técnicas de criopreservação em *ultrafreezer* ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). São necessárias substâncias crioprotetoras (como, por exemplo, glicerol) e/ ou suportes adequados (como, por exemplo, perlita ou vermiculita) à criopreservação. Com essas técnicas de conservação a baixas temperaturas, podem-se conservar culturas miceliais de diversas espécies viáveis por muitos anos, e imagina-se que até mesmo por séculos, mantendo características genéticas estáveis.

9.5.3 Cultivo micelial submerso

Para a elaboração de um inóculo líquido, utilizar frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo, fechados com tampões de algodão e recoberto com papel pardo preso com elástico. Os recipientes devem ser apenas parcialmente cheios. O espaço deixado deve permitir a agitação e a formação de espumas, durante a incubação, sem transbordamento. O tempo de autoclavagem deve ser adequado ao tamanho dos recipientes de cultivo. Recipientes maiores levam tempo maior para atingirem a temperatura de autoclavagem até o centro do seu volume. É importante lembrar que tempo insuficiente na autoclavagem pode resultar na sobrevivência de contaminantes, mas, por outro lado, a autoclavagem por tempo excessivo pode resultar em reações indesejáveis, como a caramelização de açúcares e a formação de compostos tóxicos a partir da reação entre compostos orgânicos, como açúcares e proteínas.

O protocolo adequado a cada situação deve ser validado mediante experimentação criteriosa. Para os frascos de 500 mL, de 15 a 20 min. a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ é um tempo suficiente de tratamento térmico.

Após o resfriamento dos recipientes contendo os meios de cultivo à temperatura ambiente, realiza-se a inoculação com culturas miceliais puras, previamente desenvolvidas sobre meio semissólido distribuído em placas de Petri. A transferência de pedaços de meio semissólido coberto de massa

micelial é feita, preferencialmente, em câmara de fluxo, com o auxílio de uma alça microbiológica e bico de Bunsen para flambá-la, ou utilizando materiais adequadamente embalados e esterilizados. De três a seis pedaços de aproximadamente 0,5 cm² de BDA cobertos de micélio são suficientes para uma boa inoculação de 250 mL de meio líquido. Após a transferência, os frascos devem ser novamente fechados com tampão de algodão e com o papel. Os frascos são incubados em agitador orbital, a 25 °C, 120 rpm, por duas semanas. Deve ser observado crescimento micelial, pela formação e multiplicação de “*pellets*” em suspensão. O líquido não deve turvar durante o cultivo, pelo contrário, o meio pode até mesmo ter sua turbidez reduzida durante o processo. Turvação do meio em cultivo micelial submerso de macromicetos usualmente significa contaminação.

O pré-inóculo, preparado conforme descrito, pode ser utilizado para inocular volumes até dez vezes maiores de meio de cultivo. Para o presente protocolo, sugerimos a inoculação de cinco frascos Erlenmeyer de 1.000 mL, contendo 450 mL de meio de cultivo fresco e autoclavado, com 50 mL do inóculo, cada. Os frascos inoculados devem ser incubados em agitador orbital, a 25 °C, 120 rpm, por duas semanas, para concluir o crescimento micelial e a produção de exopolissacarídeos.

9.5.4 Recuperação dos exopolissacarídeos

Após um crescimento abundante de micélio, livre de contaminações, o meio líquido estará repleto de exopolissacarídeos. A biomassa pode ser separada do caldo por filtração. Esse caldo rico em exopolissacarídeos pode, teoricamente, ser consumido diretamente. Porém, devido à baixa concentração dos princípios ativos e às características organolépticas indesejáveis, processos de recuperação e purificação se fazem necessários. A simples secagem do produto, utilizando equipamentos como *spray-dryer* ou liofilizador, reduz bastante o volume, aumentando drasticamente a concentração de princípios ativos. Para maior grau de purificação, pode ser empregada uma precipitação de polissacarídeos com etanol previamente à secagem. Esse procedimento apresenta duas vantagens: são eliminadas impurezas solúveis em uma mistura de água e álcool e se gasta menos energia e tempo com processos de secagem. A desvantagem é a utilização de grandes quantidades de solvente. Para reduzir a quantidade de solvente utilizada recomenda-se o seguinte protocolo:

- 1) Reduzir o volume do caldo por rotoevaporação, até 1/10 do volume original.
- 2) Adicionar 3 volumes de etanol gelado e deixar a 4 °C precipitando, por 24 horas.
- 3) Recuperar o precipitado por centrifugação a 10.000 xg por 20 min., a 4 °C.
- 4) Secar o precipitado por liofilização.

Etapas adicionais podem ser aplicadas antes da precipitação com etanol para aumentar o grau de purificação, tais como: eliminação de proteínas pelo método Sevag e eliminação de sais e compostos com baixa massa molecular por diálise. Após a precipitação, técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para a obtenção de polissacarídeos altamente purificados. As colunas mais utilizadas para essa finalidade são de troca iônica e de gel-filtração³⁴.

Novas técnicas de extração, mais práticas, eficientes, econômicas, seguras e sustentáveis continuam sendo desenvolvidas, como, por exemplo, a utilização de fluidos supercríticos. O processo de extração de polissacarídeos e ácidos ganodéricos de *G. lucidum* utilizando fluidos supercríticos foi patenteado recentemente⁷⁶.

9.5.5 Técnica analítica para avaliar o rendimento da produção de exopolissacarídeos e estimar o grau de pureza do produto final

A massa do extrato rico em polissacarídeos obtido conforme descrito na Seção 9.5.4 dividida pelo volume de meio de cultivo empregado para a extração representa uma medida de rendimento da produção desse tipo de material.

Contudo, outros tipos de biomoléculas podem estar sendo recuperados em conjunto com os polissacarídeos. Para avaliar o grau de pureza dos polissacarídeos, diversos testes podem ser feitos. Dois testes colorimétricos simples estão descritos a seguir e podem ser utilizados tanto para avaliar a proporção de polissacarídeos no material purificado, depois da liofilização do precipitado, como também podem ser empregados para estimar a concentração de EPS diretamente no caldo de cultivo, permitindo otimizar o processo de produção, evitando a realização de etapas de extração e purificação para os testes.

Além disso, essa técnica permite acompanhar a produção de EPS ao longo do tempo em um processo de cultivo. Basta retirar alíquotas do caldo, de maneira asséptica, em intervalos definidos, para realizar as análises sem interromper o cultivo. Esse tipo de estudo se denomina cinética, neste caso específico, cinética da produção de EPS.

Para estimar a concentração de polissacarídeos produzidos, pode-se combinar resultados de um método de dosagem de açúcares redutores (DNS) com um método de dosagem de açúcares totais (fenol-sulfúrico). Uma relação simples pode ser utilizada:

$$\text{(Equação 9.1)} \quad A_t = A_r + \text{EPS}$$

em que A_t = açúcares totais, A_r = açúcares redutores e EPS = exopolissacarídeos.

Rearranjando:

$$\text{(Equação 9.2)} \quad \text{EPS} = A_t - A_r$$

Essa relação permite estimar a concentração de EPS no caldo de cultivo, a partir da determinação analítica da concentração de açúcares totais e açúcares redutores.

O método de dosagem de açúcares redutores (o A_r da Equação 9.2) utilizando o reagente DNS pode ser realizado conforme descrito por Miller (1959)¹⁵³.

Material

- Reagente ácido dinitrossalicílico (DNS): dissolver sob agitação 1 g de DNS, 200 mg de fenol cristalino e 50 mg de sulfito de sódio em 100 mL de NaOH 1%. Armazenar a 4 °C. Para estocagem, adicionar o sulfito apenas logo antes de usar.
- Solução 40% de sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio).

Método

- 1) Em tubos de ensaio, adicionar iguais volumes da amostra e do reagente DNS. Exemplo: 3 mL de amostra + 3 mL de reagente DNS. Obs.: Pode ser necessário diluir a amostra com água destilada se a concentração de açúcares for muito alta para a faixa de sensibilidade do método.

- 2) Ferver em banho-maria por 5 minutos.
- 3) Com o material quente, adicionar 1 mL da solução de sal de Rochelle 40%.
- 4) Deixar esfriar e ler a absorbância em 510 nm, em um espectrofotômetro.
- 5) Interpretar os resultados utilizando uma curva padrão, elaborada fazendo-se experimentos com soluções de glicose a várias concentrações (pelo menos 5) de 0 até 150 µg/mL.

O método de dosagem de açúcares totais, utilizando os reagentes fenol e ácido sulfúrico, pode ser realizado conforme descrito por Du Bois et al. (1956)¹⁵⁴

Material

- Solução de fenol 80% (m/v), ácido sulfúrico concentrado

Método

- 1) Em tubos de ensaio, adicionar 100µL de amostra, adequadamente diluída.
- 2) Adicionar 50 µL da solução de 80% de fenol.
- 3) Homogeneizar com um vórtex.
- 4) Adicionar 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, em câmara de exaustão.
- 5) Aguardar 10 min.
- 6) Ler a absorbância a 490 nm em um espectrofotômetro.
- 7) Analisar os resultados com base em uma curva padrão, elaborada com soluções de glicose a várias concentrações (pelo menos 5) entre 0 µg/mL e 800 µg/mL.

Este método apresenta o inconveniente da manipulação de substâncias perigosas como o fenol e o ácido sulfúrico, além de não permitir uma análise detalhada da composição e das estruturas dos polissacarídeos. Porém, é relativamente de fácil execução e pode ser útil para realizar experimentos que necessitem da simples quantificação de polissacarídeos em caldos de cultivo.

Existem técnicas desenvolvidas para a determinação da composição monossacarídica, massa molecular e estrutura tridimensional dos polissacarídeos. Todavia, fogem às limitações do escopo deste capítulo.

9.6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diversas substâncias derivadas de muitas espécies de cogumelos vêm demonstrando atividades medicinais importantes em estudos científicos. Porém, por enquanto, nenhum cogumelo ou substância derivada é reconhecido ou normatizado no Brasil pela ANVISA como medicinal. Sugere-se uma colaboração mais intensa entre universidades, poder público e setor privado para que o conhecimento produzido nas universidades seja efetivamente transferido ao setor produtivo, beneficiando a população.

O melhor conhecimento das espécies de cogumelos da biodiversidade brasileira e suas propriedades medicinais permitirão o desenvolvimento de novos medicamentos ou nutracêuticos para a prevenção e tratamento de enfermidades que afligem a população, como câncer, infecções e doenças cardiovasculares.

Mais estudos também devem ser conduzidos para avaliar potenciais atividades medicinais da inclusão de cogumelos na alimentação, estimulando o consumo e a produção, contribuindo para o esclarecimento popular e alterando uma cultura de medo e aversão em relação aos cogumelos. Diversas instituições de pesquisa, espalhadas pelo país, estão dando passos nessa direção, listando e descrevendo as espécies de cada região, buscando tecnologias para a propagação de micélios e cultivo de cogumelos, testando aplicações tecnológicas de materiais e substâncias derivadas desses organismos na prevenção e tratamento de um grande número de enfermidades. Com as tecnologias existentes nos laboratórios de pesquisa brasileiros hoje é possível identificar e isolar os princípios ativos, descrever sua estrutura molecular e aplicar técnicas de DNA recombinante para aumentar a sua produtividade e atividade.

Espera-se que novos produtos biotecnológicos sejam desenvolvidos em decorrência dos avanços tecnológicos recentes nas áreas de produção e purificação de substâncias medicinais a partir de cogumelos ou cultivos miceliais, refletindo em benefícios econômicos e ecológicos e contribuindo para uma vida mais saudável.

REFERÊNCIAS

1. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 2007;111(5):509-47.
2. Soccol CR, Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FM, Leifa F, Pandey A, et al. Mushrooms: a promising source to produce nutraceutical and pharmaceutical bioproducts. In: Koutinas A, Pandey A, Larroche C, editors. *Current topics on bioprocessing in food industry*. 2. 1 ed: New Delhi: Asitech Publishers; 2007. p. 435-48.
3. Dubost NJ, Ou B, Beelman RB. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2007;105(2):727-35.
4. Arango CS, Nieto IJ. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestíveis: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013;30(1):1-8.
5. Arango CS, Nieto IJ. Biotechnological cultivation of edible macrofungi: an alternative for obtaining nutraceutics. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013;30(1):1-8.
6. Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;55(4):758-74.
7. Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(8):2742-7.
8. Putzke J, Putzke MTL. *Os Reinos dos Fungos*. 1 ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC; 2002.
9. Meijer AARD. *Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-paraná*. Colombo: Embrapa; 2008.
10. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia – conceitos e aplicações*. 2 ed. São Paulo: Makron Books; 1996.
11. Masur. *Saccharomyces cerevisiae* under DIC microscopy 2010 [Internet]. [Cited 2016 Nov 4]. Available from: pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg.
12. Y_Tambe. Microscopic image of *Penicillium* sp. (environmental isolate). Magnification:200 2005 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium.jpg.
13. Robinson RF, Davidson RS. The Large-Scale Growth of Higher Fungi. *Advances in Applied Microbiology*. 1959;1:261-78.
14. Ross RC, Harris PJ. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. *Scientia Horticulturae*. 21(1):61-70.
15. Chang ST. Mushrooms from waste. *Food Policy*. 1980;5(1):64-5.

16. Bononi VL, Capelari M, Maziero R, Trufem SFB. Cultivo de Cogumelos Comestíveis. São Paulo: Ícone; 1999.
17. Yokomizo NKS, Bononi VLR, editors. Cogumelos comestíveis: perspectivas de introdução de outras espécies no mercado brasileiro. I Encontro Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis. Mogi da Cruzes: Secretaria de Agricultura e Abastecimento; 1980.
18. Vázquez JES. Producción de hongos comestibles. San Cristóbal de las Casas: Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste; 1994. 107 p.
19. Simon RR, Phillips KM, Horst RL, Munro IC. Vitamin D Mushrooms: comparison of the composition of button mushrooms (*agaricus bisporus*) treated postharvest with UVB light or sunlight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(16):8724-32.
20. Satora L, Pach D, Butryn B, Hydzik P, Balicka-Ślusarczyk B. Fly agaric (*Amanita muscaria*) poisoning, case report and review. *Toxicon*. 2006;45(7):941-3.
21. Stamets P. Psilocybin Mushrooms of the World. Berkeley: Ten Speed Press; 1996.
22. Kaya E, Yilmaz I, Sinirlioglu ZA, Karahana S, Bayramd R, Yaykaslie KO, et al. Amanitin and phalloxin concentration in *Amanita phalloides* var. alba mushroom. *Toxicon*. 2013;76:225-33.
23. Asatiani MD, Kachlishvili ET, Khardziani TS, Metreveli EM, Mikiashvili NA, Songulashvili GG, et al. Basidiomycetes as a source of antioxidants, lectins, polysaccharides and enzymes. *Journal of Biotechnology*. 2008;136:717.
24. Dr. Brainfish. *Psilocybe cubensis* Thai cultivadas en arroz integral, Tailandesas [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Psilocybe_Cubensis_Thai.jpg.
25. Archenzo. *Amanita phalloides*. Piacenza's mountains [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/99/Amanita_phalloides_1.JPG.
26. Lebrac. Gifhäublinge (*Galerina marginata*) 2006 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a3/Gifh%C3%A4ublinge.jpg.
27. Santos LF, Zanatta AL, Thomaz-Soccol V, Torres MF, Rubel R, Bonatto SJR, et al. Hypolipdemic and antiatherosclerotic potential of *Pleurotus ostreatus* cultivated by submerged fermentation in the high-fat diet fed rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (Seoul Print). 2013;18:201-8.
28. Rubel R, Dalla Santa HS, Fernandes LC, Bonatto SJR, Bello S, Figueiredo BC, et al. Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2011; 27:1083-9.
29. Enshasy HAE, Hatti-Kaul R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*. 2013 Dec;31(12):668-77.

30. Zhang Z, Guoying LV, Pan H, Leifa F, Soccol CR, Pandey A. Production of Powerful Antioxidant Supplements via Solid-State Fermentation of Wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. Food Technology and Biotechnology. 2012;50:32-9.
31. Zhang Z, Guoying LV, Pan H, Santos LFD, Fan M, Soccol CR, et al. Antidiabetic activities of ethanol extract of dry matters of culture broth of *Coriolus versicolor* in submerged culture. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2011;54:701-8.
32. Pana D, Zhangb D, Wuc J, Chena C, Xua Z, Yangb H, et al. A novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. Food and Chemical Toxicology. 2014;63:111-8.
33. Santos LFD, Rubel R, Bonatto SJR, Zanatta AL, Aikawa J, Yamaguchi AA, et al. *Cordyceps sinensis* biomass produced by submerged fermentation in high-fat diet feed rats normalizes the blood lipid and the low testosterone induced by diet. EXCLI Journal. 2012;11:767-75.
34. Nie S, Zhang H, Li W, Xie M. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2013;1(1):10-20.
35. Kutschera W, Rom W. Otzi. The prehistoric Iceman. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 2000 Apr;164-165:12-22.
36. Rajarathnam S, Shashirekha MN. Mushrooms and truffles. Use of Wild Mushrooms. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition; 2003. p. 4048-54.
37. Vargas-Isla R, Ishikawa NK, Py-Daniel V. Contribuições etnomicológicas dos povos indígenas da Amazônia. Biota Amazônia. 2013;3(1):58-65.
38. Paterson RRM. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry. 2006;67:1985-2001.
39. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. Biotechnology Annual Review. 2007;13:265-301.
40. Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence. Journal of Functional Foods. 2012;4(4):687-709.
41. Oba K, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamoto J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. Anticancer Research. 2009;29(7):2739-45.
42. Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. The Journal of Nutrition. 2001;131(12):3288-93.
43. Jiang J, Grieb B, Thyagarajan A, Sliva D. Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling. International Journal of Molecular Medicine. 2008;21(5):577-84.

44. Oba K, Teramukai S, Kobayashi M, Matsui T, Koderá Y, Sakamoto J. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curative resections of gastric cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. 2007;56(6):905-11.
45. Sakamoto J, Morita S, Oba K, Matsui T, Kobayashi M, Nakazato H, et al. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. 2006;55(4):404-11.
46. Yu L, Fernig DG, Smith JA, Milton JD, Rhodes JM. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Research*. 1993;53(19):4627-32.
47. Lee SH, Hwang HS, Yun JW. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytotherapy research: PTR*. 2009;23(12):1784-9.
48. Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JI, et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2004;14(4):589-94.
49. Chen X, Wang W, Li S, Xue J, Fan L, Sheng Z, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80(3):944-8.
50. Ren G, Zhao Y-P, Yang L, Fu C-X. Anti-proliferative effect of clitocine from the mushroom *Leucopaxillus giganteus* on human cervical cancer HeLa cells by inducing apoptosis. *Cancer Letters*. 2008;262(2):190-200.
51. Noguchi M, Kakuma T, Tomiyasu K, Kurita Y, Kuki-hara H, Konishi F, et al. Effect of an extract of *Ganoderma lucidum* in men with lower urinary tract symptoms: a double-blind, placebo-controlled randomized and dose-ranging study. *Asian Journal of Andrology*. 2008;10(4):651-8.
52. Jiang J, Slivova V, Valachovicova T, Harvey K, Sliva D. *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. *International Journal of Oncology*. 2004;24(5):1093-9.
53. Stanley G, Harvey K, Slivova V, Jiang J, Sliva D. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;330(1):46-52.
54. Eckhardt SG, Baker SD, Britten CD, Hidalgo M, Siu L, Hammond LA, et al. Phase I and pharmacokinetic study of irofulven, a novel mushroom-derived cytotoxin, administered for five consecutive days every four weeks in patients with advanced solid

malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(24):4086-97.

55. Johnson E, Førland DT, Saetre L, Bernardshaw SV, Lyberg T, Hetland G. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* murill on release of cytokines, chemokines and leukocyte growth factors in human blood ex vivo and in vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009;69(3):242-50.

56. Volman JJ, Mensink RP, Van Griensven LJLD, Plat J. Effects of alpha-glucans from *Agaricus bisporus* on ex vivo cytokine production by LPS and PHA-stimulated PBMCs; a placebo-controlled study in slightly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010;64(7):720-6.

57. Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*. 2010 Nov;9:54.

58. Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, et al. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-kappaB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;114(3):307-15.

59. Hsu C-H, Liao Y-L, Lin S-C, Hwang K-C, Chou P. The mushroom *Agaricus blazei* Murill in combination with metformin and gliclazide improves insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2007;13(1):97-102.

60. Khatun K, Mahtab H, Khanam PA, Sayeed MA, Khan KA. Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subjects. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*. 2007;16(1):94-9.

61. Mee-Hyang K, Kwon S-T, Kwon S-H, Ma M-S, Park YI. Lowering effects in plasma cholesterol and body weight by mycelial extracts of two mushrooms: *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *San'oeb Misaengmul Haghoeji*. 30(4):402-9.

62. Mori K, Inatomi S, Ouchi K, Azumi Y, Tuchida T. Improving effects of the mushroom Yamabushitake (*Hericium erinaceus*) on mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research: PTR*. 2009;23(3):367-72.

63. Kawagishi H, Zhuang C. Compounds for dementia from *Hericium erinaceum*. *Drugs of the Future*. 2008;33(2).

64. Hsu C-H, Hwang K-C, Chiang Y-H, Chou P. The mushroom *Agaricus blazei* Murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2008;14(3):299-301.

65. Zhou S, Gao Y, Chan E. Clinical Trials for Medicinal Mushrooms: Experience with *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Lingzhi Mushroom). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2005;7(1-2):111-8.

66. El Dine RS, El Halawany AM, Ma C-M, Hattori M. Inhibition of the dimerization and active site of HIV-1 protease by secondary metabolites from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(11):2019-23.
67. Faccin LC, Benati F, Rincão VP, Mantovani MS, Soares SA, Gonzaga ML, et al. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;45(1):24-8.
68. Sun W, Yu J, Shi Y-M, Zhang H, Wang Y, Wu B-B. [Effects of *Cordyceps* extract on cytokines and transcription factors in peripheral blood mononuclear cells of asthmatic children during remission stage]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao (Journal of Chinese Integrative Medicine)*. 2010;8(4):341-6.
69. Kim TI, Park SJ, Choi CH, Lee SK, Kim WH. [Effect of ear mushroom (*Auricularia*) on functional constipation]. *Taehan Sohwagi Hakhoe chi (The Korean Journal of Gastroenterology)*. 2004;44(1):34-41.
70. Chen SN, inventor. Production method for solid cultured active mushroom mycelium and fruit-body metabolites (AMFM). United States patent 2009/0098620; 2009 Apr 16.
71. Dalla-Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Rodrigues-Leon JA, Dalla-Santa OR, Brand D, et al. Growth Parameters of *Agaricus brasiliensis* Mycelium on Wheat Grains in Solid-state Fermentation. *Biotechnology (Faisalabad Print)*. 2012;11:144-53.
72. Chimilovski JS, Habu S, Teixeira RFB, Thomaz-Soccol V, Nosedá MD, Pandey A, et al. Antitumoral activities of exopolysaccharide of *Grifola frondosa* produced by submerged fermentation using sugarcane and soybean molasses as carbon source. *Food Technology and Biotechnology*. 2011;49:359-63.
73. Steinert E. *Ganoderma lucidum* 2013 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Ganoderma_lucidum_01.jpg.
74. Yang S. The Divine Farmer's Materia Medica: A Translation of the Shen Nong Ben Cao Jing. Boulder: Blue Poppy Enterprises; 1998. 236 p.
75. Shizen L. Compendium of materia medica: bencao gangmu. Beijing: Foreign Languages Press; 2003.
76. Yu Z-R, Wang B-J. Inventors. Method and system for continuous separation and purification of ganoderic acids and polysaccharides. United States patent US20130075336A1; 2013 Mar 28.
77. Rubel R, Santa HSD, Fernandes LC, Filho JHCL, Figueiredo BC, Di Bernardi R, et al. High Immunomodulatory and Preventive Effects Against Sarcoma 180 in Mice Fed with Ling Zhi or Reishi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae) Mycelium. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008;10:37-48.

78. Dudhgaonkar S, Thyagarajan A, Sliva D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *International Immunopharmacology*. 2009;9(11):1272-80.
79. Jesenak M, Banovcin P, Rennerov Z, Majtan J. β -Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. *Allergologia et Immunopathologia*. 2012;in press.
80. ANVISA. Consulta Pública nº 15, 14 May 2012 [Internet]. [Cited 2016 Nov 2]. Available from: portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/61f704004fa210b897f0f79a71dcc661/consulta+p%c3%bablica+n%c2%b0+15+secol.pdf?mod=ajperes.
81. Tung NT, Cuong TD, Hung TM, Lee JH, Woo MH, Choi JS, et al. Inhibitory effect on NO production of triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(5):1428-32.
82. Lee I, Kim J, Ryoo I, Kim Y, Choo S, Yoo I, et al. Lanostane triterpenes from *Ganoderma lucidum* suppress the adipogenesis in 3T3-L1 cells through down-regulation of SREBP-1c. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010;20(18):5577-81.
83. Yue Q-X, Song X-Y, Ma C, Feng L-X, Guan S-H, Wu W-Y, et al. Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine*. 2010;17(8-9):606-13.
84. Zhu K, Nie S, Li C, Lin S, Xing M, Li W, et al. A newly identified polysaccharide from *Ganoderma atrum* attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;57:142-50.
85. Tomoda M, Gonda R, Kasahara Y, Hikino H. Glycan structures of ganoderans b and c, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry*. 1986;25(12):2817-20.
86. Song YS, Kim S-H, Sa J-H, Jin C, Lim C-J, Park E-H. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90(1):17-20.
87. Thyagarajan A, Jiang J, Hopf A, Adamec J, Sliva D. Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by *Ganoderma lucidum* is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006;18(4):657-64.
88. Wan JM-F, Sit W-H, Louie JC-Y. Polysaccharopeptide enhances the anticancer activity of doxorubicin and etoposide on human breast cancer cells ZR-75-30. *International Journal of Oncology*. 2008;32(3):689-99.
89. Deutsche Gesellschaft Für Mykologie. *Cordyceps militaris* 2000 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: dgfm-ev.de/index.php?id=pdj_2007.
90. Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*. 2010;1(4):228-36.

91. Das SK, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*. 2010;81(8):961-8.
92. Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological Progress*. 2012;11(3):599-614.
93. Lo H-C, Hsieh C, Lin F-Y, Hsu T-H. A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao (Dōng Chóng Xià Cǎo) and Related Bioactive Ingredients. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2013;3(1):16-32.
94. Zhong S, Pan H, Leifa F, Wu Y, Binod P, Pandey A, et al. Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* species. *Food Technology and Biotechnology*. 2009;47:304-12.
95. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacological Problems. *Advance Access Publication*. 2007;5(1):3-15.
96. Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Buchi D, Di Bernardi R, Moreno AN, et al. *Agaricus brasiliensis* mycelium supplementation in Sarcoma 180 tumor-bearing mice reverses the immune response induced by the tumor. *Food and Agricultural Immunology*. 2012;212:1-14.
97. Wilson N. *Agaricus subrufescens*. 2002 [Internet] [Cited 2016 Nov 3]. Available from: <http://mushroomobserver.org/549>.
98. Ko J-L, inventor. Uses of an Immunomodulatory Protein (GMI) from *Ganoderma microsporum*. Mycomagic Biotechnology Co., assignee. United States patent US8476238B2; 2013 Jul 13.
99. Fares F, Sharvit L, Wasser SP, inventors. Extracts of *Cyathus striatus* mushrooms, pharmaceutical compositions comprising them and a new *Cyathus striatus* strain. WO2011151831A1; 2011 Dec 8.
100. Ales P, Escut A, Choulot J-C, inventors. Polysaccharide Extract of *Lentinus* and Pharmaceutical, Cosmetic or Nutraceutical Compositions Comprising Such an Extract. US8383127B2; 2013 Feb 26.
101. Sandewicz IM, Russ JG, Zhu VX, inventors. Anhydrous cosmetic compositions containing mushroom extract. US6645502B2; 2003 Nov 11.
102. Chen J-C, Chen C-N, Sheu S-J, inventors. Preparation and compositions for *Antrodia camphorata* mycelium biologically active material. US20030148517A1. 2003 Aug 7.
103. Ikekawa T, Ikekawa A, Shimada F, inventors. Physiologically active substance originating in mushrooms, process for producing the same and drugs. US6783771 B2; 2004 Aug 31.
104. Donatini B, inventor. Novel pharmaceutical or dietetic mushroom-based compositions. US20020164352A1; 2002 Nov 7.

105. Wong K-P, inventor. Compositions containing an active fraction isolated from *Tricholoma conglobatum* and methods of use. Compositions containing an active fraction isolated from *Tricholoma conglobatum* and methods of use. WO2002047705 A2; 2002 Jun 20.
106. Wong K-P, inventor. Compositions containing an active fraction isolated from *Scutellariae barbatae* and methods of use. Patent 20020094350; 2002.
107. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology. 1929;10:226-36.
108. Novak R, Shlaes DM. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. Current Opinion in Investigational Drugs. 2010;11(2).
109. Kilaru S, Collins CM, Hartley AJ, Bailey AM, Foster GD. Establishing Molecular Tools for Genetic Manipulation of the Pleuromutilin-Producing Fungus *Clitopilus passeckerianus*. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(22):7196-204.
110. Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature. 2005;437:975-80.
111. Jagadish LK, Krishnan VV, Shenbhagaraman R, Kaviyarasan V. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology. 2009;8(4).
112. Soboleva AI, Krasnopol'skaia LM, Fedorova GB, Katrukha GS. [Antibiotic properties of the strains of the basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) sing]. Antibiotiki i khimioterapii (Antibiotics and Chemotherapy). Ministerstvo meditsinskoï i mikrobiologicheskoi promyshlennosti SSSR. 2006;51(7):3-8.
113. Hearst R, Nelson D, Mccollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2009;15(1):5-7.
114. Venturini ME, Rivera CS, Gonzalez C, Blanco D. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. Journal of Food Protection. 2008;71(8):1701-6.
115. Martins PR, Gameiro MC, Castoldi L, Romagnoli GG, Lopes FC, Pinto AVFDS, et al. Polysaccharide-rich fraction of *Agaricus brasiliensis* enhances the candidacidal activity of murine macrophages. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008;103(3):244-50.
116. Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AMA, Johnson E. An Extract of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill Differentially Stimulates Production of Pro-inflammatory Cytokines in Human Monocytes and Human Vein Endothelial Cells in vitro. Inflammation. 2005;29(4-6):147-53.

117. Bernardshaw S, Hetland G, Grinde B, Johnson E. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill protects against lethal septicemia in a mouse model of fecal peritonitis. *Shock* (Augusta, Ga). 2006;25(4):420-5.
118. Ozen T, Darcan C, Aktop O, Turkekul I. Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the black sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2011;14(2):72-84.
119. Öztürk M, Duru ME, Kivrak S, Mercan-Doğan N, Türkoglu A, Özler MA. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2011;49(6):1353-60.
120. Tambekar DH, Sonar TP, Khodke MV, Khante BS. The Novel Antibacterials from Two Edible Mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju*. *International Journal of Pharmacology*. 2006;2(5):584-7.
121. Kawagishi H, Suzuki H, Watanabe H, Nakamura H, Sekiguchi T, Murata T, et al. A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1474(3):299-308.
122. Francia C, Rapior S, Courtecuisse R, Siroux Y. Current Research Findings on the Effects of Selected Mushrooms on Cardiovascular Diseases. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999;1(2):169-72.
123. Vítola FMD, Adjam E, Fernandes MBA, Fernandes LC, Meijer AAR, Thomaz-Soccol V, et al. In vitro antiparasitic activity of quinones extracts, obtained from the submerged mycelial cultivation broths of three edible macromycete species, against *Leishmania (L.) infantum*. IV Simpósio Internacional Sobre Cogumelos No Brasil (IV SICOG) e III Simpósio Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis; Caxias do Sul. Brasília: EMBRAPA; 2008. p. 128.
124. Fendrich RC, Vítola FMD, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. Produção e caracterização de compostos com atividade anti-*Leishmania* produzidos por macromicetos. XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul. Foz do Iguaçu; 2009. p. 986.
125. Vítola FMD, Adjam E, Fernandes MBA, Meijer AAR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. In vitro antiparasitic activity of quinones extracts, obtained from the submerged mycelial cultivation broths of three macromycete species of the genus *Ganoderma*, against *Leishmania (L.) infantum*. IV Simpósio Internacional Sobre Cogumelos No Brasil (IV SICOG) e III Simpósio Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis; Caxias do Sul: EMBRAPA; 2008. p. 193.
126. Nordbring-Hertz B, Jansson H-B, Tunlid A. *Nematophagous Fungi*. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.

127. Barron GL. The nematode-destroying fungi. Guelph: Canadian Biological Publ.; 1977. 140 p.
128. Gray GD. Genetic resistance to haemonchosis in sheep. *Parasitology Today* (Personal ed). 1987;3(8):253-5.
129. Padilha T. Estratégia para o controle da verminose gastrointestinal de bovinos de leite na região sudeste do Brasil. Simpósio Sobre Controle de Parasitos 1; Campinas/São Paulo: CATI; 1996. p. 50-6.
130. Li T, Zhang K, Liu X. Taxonomy of nematophagous fungi. Beijing: Chinese Scientific & Technological Publication; 2000.
131. Luo H, Li X, Li G, Pan Y, Zhang K. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a Nematode-Attacking Device. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(4):2982-7.
132. Descazeaux J, Capelle R. Contribution à l'étude des champignons prédateurs des larves de nématodes parasites des animaux domestiques. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 1939;12:284-8.
133. Roubaud É, Deschiens R. Action des Hyphomycetes Prédateurs Sur Les Larves de Synthétocauls et de Bunostomes. Masson; 1941.
134. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Maia AS, Magalhães ACM. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium elyptosporum* em condições de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 1992;44(6):521-6.
135. Araújo JV, Stephano MA, Sampaio WM. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*, a nematode trapping fungus. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2000;9:55-60.
136. Falbo MK, Soccol VT, Sandini IE, Vicente VA, Robl D, Soccol CR. Isolation and characterization of the nematophagous fungus *Arthrobotrys conoides*. *Parasitology Research*. 2013;112(1):177-85.
137. Thomaz-Soccol V, Souza FPD, Sotomaior C, Castro EA, Milczewski V, Mocelin G, et al. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004;47(1):41-7.
138. Thomaz-Soccol V, Sotomaior C, Castro EA, Souza FP. Situação da resistência dos helmintos gastrintestinais de ovinos aos anti-helmínticos, no Estado do Paraná. 1º Simpósio Sobre Controle de Parasitos. Campinas/São Paulo; CATI; 1996. p. 79-89.
139. Chartier C, Soubirac F, Pors I, Silvestre A, Hubert J, Couquet C, et al. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of Helminthology*. 2001;75(4):325-30.

140. Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 1999;29(1):115-24.
141. Van Wyk JA, Stenson MO, Van Der Merwe JS, Vorster RJ, Viljoen PG. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J Vet Res*. 1999 Dec;66(4):273-84.
142. Eysker M, Bakker N, Van Der Hall YA, Van Hecke I, Kooyman FNJ, Van Der Linden D, et al. The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematode infections in their lambs in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*. 2006;141(1-2):91-100.
143. Faessler H, Torgerson PR, Hertzberg H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. *Veterinary Parasitology*. 2007;147(1-2):96-102.
144. Mota MDA, Campos AK, Araújo JVD. Biological control of helminth parasites of animals: current stage and future outlook. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2003;23(3):93-100.
145. Dalla Santa HS, Rubelb R, Fernandes LC, Bonatto SJR, Bello SR, Monteiro MC, Khalil NM, Dalla Santa OR, Gern JC, Soccol CR. *Agaricus brasiliensis* enriched functional product promotes in mice increase in HDL levels and immunomodulate to Th1 CD4+T subsets. *A. brasiliensis* functional product and biological benefics. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2010;4(4):957-70.
146. Rubel R, Dalla Santa HS, Bonatto SJR, Bello S, Fernandes LC, Di Bernardi R, et al. Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst. Triggers Immunomodulatory Effects and Reduces Nitric Oxide Synthesis in Mice. *Journal of Medicinal Food*. 2010;13:142-8.
147. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(1):4-19.
148. Bellettini MB, Vitola FMD, Santos LF, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, editors. Produção de biomassa e atividade antioxidante em cultivo micelial submerso de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus djamor* utilizando o caldo de hidratação de estirpe de pupunha seco como substrato. VII International Symposium on Mushrooms in Brazil. Manaus/Brasília: Embrapa; 2013.
149. Vitola FMD, Faraco V, Bellettini MB, Santos LF, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, editors. Screening of superoxide dismutase activity inducers in the submerged mycelial cultivation of *Pleurotus ostreatus*. In: VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, 2013, Manaus. Anais do VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013. v. 7. p. 385.

150. Bellettini MB, Vitola FMD, F. SL, Santos LF, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, editors. Fatores significativos para o desenvolvimento de *Pleurotus djamor* no suco de pupunha em relação a atividade antioxidantes, concentração proteica e de biomassa em fermentação micelial submersa. In: VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, 2013, Manaus. Anais do VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013. v. 7. p. 399.
151. Berovič M, Habijanič J, Zore I, Wraber B, Hodžar D, Boh B, Pohleven F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*. 2003;103(1):77-86.
152. ATCC. The Global Bioresource Center, c. 2013 [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: atcc.org.
153. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-8.
154. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28(3):350-6.