



UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

EFEITO DE COGUMELOS DESIDRATADOS SOBRE O CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

ELOISE SCHOTT
REGINA MARIA MIRANGA GERN

JOINVILLE, 2012

ELOISE SCHOTT

**EFEITO DE COGUMELOS DESIDRATADOS SOBRE O CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS PROBIÓTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, na
Universidade da Região de Joinville /UNIVILLE.
Área de concentração: Biotecnologia. Orientadora:
Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern.

JOINVILLE, 2012

TERMO DE APROVAÇÃO

Efeito de cogumelos desidratados sobre o crescimento de bactérias probióticas

por
Eloise Schott

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração (Biotecnologia) e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville.

Profª Drª Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)

Profª Drª Gilmar Sidnei Erzinger
Coordenadora do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

Banca examinadora:

Profª Drª Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)

Profª Drª Sandra Aparecida Furlan
(UNIVILLE)

Profº Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
(Membro externo)

Joinville____, de_____de 2012

“Que sejamos livres de preconceitos. Que nenhum de nós se esqueça da força que possui. Que não nos falte fé e amor.”

(Caio Fernando Abreu)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me ensinaram o verdadeiro significado das palavras família e amor.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sei que se a vontade Dele não coincidissem com a minha, nada disso teria acontecido, fui muito abençoada em todos os momentos.

À minha orientadora, prof^a Regina Gern, que dia após dia me fez perceber que fiz a escolha certa. Agradeço pela paciência e pela forma tão tranquila e carinhosa de conduzir as orientações, muito obrigada por tudo, de coração!

À Prof^a Carmen Heyder, uma pessoa maravilhosa e muito especial, a qual agradeço não somente pela ajuda técnica, mas também pelos bons momentos compartilhados.

Agradeço com muito carinho ao prof^o Eduardo Manoel, sempre muito prestativo, foi parte fundamental em todo processo.

Aos bolsistas Michele Ouriques e Henrique Herbst por toda dedicação na realização do trabalho.

Às técnicas de laboratório, sempre prestativas, pelo auxílio nas atividades práticas.

Aos professores do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, pela contribuição na minha formação.

Também agradeço à minha cunhada Luciane Scheuer por sua ajuda essencial.

Agradeço também aos amigos da IX turma de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Univille, por tudo que aprendemos e vivemos uns com os outros.

De maneira especial agradeço aos amigos, família e ao meu namorado André, que compreenderam minha ausência e falta de tempo em muitos momentos, e nunca deixaram de me apoiar.

A TODOS VOCÊS, MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Aliado ao valor nutricional atribui-se aos fungos da classe dos Basidiomicetos atividade medicinal proporcionada por inúmeras moléculas bioativas, principalmente polissacarídeos, presentes na biomassa fúngica, que podem tanto estimular o crescimento de micro-organismos como atuar como antimicrobianos. A pesquisa avaliou o efeito de cogumelos desidratados e seus polissacarídeos sobre o crescimento de bactérias probióticas *in vitro* e *in vivo*. Em uma primeira etapa, a influência da adição de diferentes concentrações (0,5;1,0 e 2,0 g/l) de basidiomas desidratados e moídos de *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* e de polissacarídeos extraídos dos basidiomas desidratados após extração aquosa a quente e precipitação com etanol, sobre o crescimento de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium lactis* *in vitro* foi avaliada. Na segunda etapa, os basidiomas desidratados e seus respectivos polissacarídeos foram administrados por gavagem, por 14 dias, a camundongos Swiss macho nas concentrações de 1; 10 e 30 mg/kg e a influência sobre a microbiota intestinal presente no ceco (*Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp) desses animais foi avaliada. Os resultados mostraram que, embora os basidiomas desidratados de *P. ostreatus* tenham produzido aumento no crescimento (em média 7,76%) de *L. casei* *in vitro*, nenhum estímulo do crescimento de *Lactobacillus* spp presentes na microbiota de camundongos foi percebido. As bactérias do gênero *Lactobacillus* presentes na microbiota intestinal de camundongos apresentaram crescimento de 628% na maior dosagem dos polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* avaliada (30mg/kg), *L. casei* teve o seu crescimento estimulado em 6,10% na presença dessa substância *in vitro*. Os basidiomas de *A. blazei* não apresentaram nenhum efeito sobre *Lactobacillus* spp presentes na microbiota de camundongos. No entanto, esta substância mostrou-se levemente bioativa estimulando o crescimento de *L. casei* *in vitro* (5,39%) quando 0,5 g/l foi utilizado e inibindo o crescimento desse micro-organismo (14,64%) quando 1 g/l foi utilizado. Os polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* mostraram forte atividade biológica estimulando em 772% o crescimento dos *Lactobacillus* spp da microbiota dos camundongos. No entanto, nenhum efeito foi percebido quando essa substância foi utilizada no cultivo de *L. casei* *in vitro*. O basidioma desidratado de *P. ostreatus* ativou o crescimento de *B.lactis* *in vitro* (6,83%) na concentração de 0,5 g/l. No entanto, o aumento da concentração para 1 g/l proporcionou inibição (4,60%) do crescimento deste micro-organismo. Nenhuma atividade significativa desta substância foi observada nos experimentos *in vivo*. Embora os polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* tenham estimulado em 378% o crescimento de *Bifidobacterium* spp da microbiota de camundongos, o mesmo inibiu o crescimento de *B. lactis* (14,78%) quando testado na concentração 0,5 g/l *in vitro*. Os basidiomas de *A. blazei* apresentaram efeito sobre o crescimento de *B. lactis* somente nos testes *in vitro* (13,05%), na concentração de 0,5 g/l. Os polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* proporcionaram pequena inibição do crescimento de *B. lactis* *in vitro* com 0,5 g/l, e estimularam o crescimento deste micro-organismo em 11,48% quando a concentração aumentou para 1 g/l. Entretanto, nenhum efeito foi observado nos testes *in vivo*. A partir dos testes *in vitro*, sugere-se que PPO apresentam potencial prebiótico e Po podem atuar tanto como prebióticos e como antimicrobianos. O uso de Ab e PAb tem potencial tanto prebiótico como antimicrobiano quando avaliados nos testes *in vitro*. Os resultados apontam para um possível potencial prebiótico de PAb, bem como, demonstram potencial prebiótico de PPO nos testes *in vivo*.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus*; *Agaricus blazei*, microbiota intestinal; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

ABSTRACT

Allied to the nutritional value is assigned to the fungi of Basidiomycetes class medicinal activity provided by many bioactive molecules, especially polysaccharides present in fungal biomass which can either stimulate the growth of micro-organisms as act as antimicrobials. This study evaluated the effect of dehydrated mushrooms and their polysaccharides on the growth of probiotic bacteria in vitro and in vivo. In a first step, the influence of the addition of different concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 g / l) of dehydrated and milled basidiomata of *Agaricus blazei* and *Pleurotus ostreatus* and of polysaccharides extracted from dehydrated basidiomata after hot aqueous extraction and ethanol precipitation, on the growth of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in vitro was evaluated. The micro-organisms were incubated in a culture in the absence (control) and in the presence of tested substances and the difference in the absorbances of the control and test tubes were used to calculate the percentage of inhibition/activation provided by the substances. In the second phase, the dehydrated basidiomata and their respective polysaccharides were administered by gavage for 14 days, to male Swiss mice at concentrations of 1, 10 and 30 mg / kg and the influence on intestinal microbiota present in the cecum (*Lactobacillus* spp and spp *Bifidobacterium*) of these animals was evaluated. The results showed that, although the dehydrated basidiomata *P. ostreatus* have produced a small increase in the growth (average 7.76%) of *L. casei* in vitro, no stimulation of growth of *Lactobacillus* spp present in the microbiota of mice was noticed. Despite of *Lactobacillus* bacteria present in the intestinal microbiota of mice have been highly stimulated their growth (628%) in the highest dosage of polysaccharides extracted from basidiomata *P. ostreatus* evaluated (30mg/kg), *L. casei* had its growth slightly stimulated (6.10%) in the presence of this substance in vitro. The basidiomata *A. blazei* showed no effect on *Lactobacillus* spp present in the mice microbiota. However, this substance was slightly bioactive stimulating the growth of *L. casei* in vitro (5.39%) when 0.5 g / l was used and inhibiting the growth of this micro-organism (14.64%) when 1 g / l was used. The polysaccharides extracted from fruit bodies *A. blazei* showed strong biological activity stimulating in 772% the growth of *Lactobacillus* spp of the mice microbiota. However, no effect was seen when this substance was used in the cultivation of *L. casei* in vitro. The dehydrated fruit bodies *P. ostreatus* activated the growth of *B.lactis* in vitro (6.83%) in concentration of 0.5 g/l. However, the increase of the concentration to 1 g/l provided inhibition (4.60%) of growth of this micro-organism. No significant activity of this substance was observed in in vivo experiments. Although the polysaccharides extracted from fruit bodies *P. ostreatus* have encouraged in 378% the growth of *Bifidobacterium* spp of the mice microbiota, the same polysaccharides inhibited the growth of *B. lactis* (14.78%) when tested in the concentration 0.5 g / l in vitro. The fruit bodies *A. blazei* showed an effect on the growth of *B. lactis* only in vitro tests (13.05%) in a concentration of 0.5 g/l. The polysaccharides extracted from fruit bodies *A. blazei* provided little inhibition of *B. lactis* growth in vitro with 0.5 g/l, and stimulated the growth of this micro-organism in 11.48% when the concentration was increased to 1 g/l. However, no effect was observed in in vivo tests.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus*; *Agaricus blazei*, microbiota intestinal; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos Basidiomicetos	19
Figura 2: Imagem de <i>Agaricus blazei</i>	22
Figura 3: Imagem de <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
Figura 4 - (a) Estabelecimento de consórcios sintróficos no ecossistema presente no cólon humano. Os polissacarídeos complexos insolúveis são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta e em oligossacarídeos solúveis pelas bactérias decompositoras primárias, que são caracterizadas pela presença de enzima específica não compartilhada com outras bactérias comensais. (b) Exemplo de vias metabólicas bacterianas utilizadas na fermentação dos oligossacarídeos e dos produtos da fermentação primária.	38
Figura 5: Percentual de ativação/inibição do crescimento celular de <i>Lactobacillus casei</i> pelas substâncias Ab, Po e Ppo nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l.....	46
Figura 6: Percentual de ativação/inibição do crescimento celular de <i>Bifidobacterium lactis</i> pelas substâncias Ab, PAb, Po e Ppo, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l.....	49
Figura 7: Percentual de ativação do crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>A. blazei</i> (PAb) na concentração de 30mg/kg	53
Figura 8: Percentual de ativação do crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>P. ostreatus</i> (PPo) na concentração de 30mg/kg.....	56
Figura 9: Percentual de ativação do crescimento celular de <i>Bifidobacterium</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>P. ostreatus</i> (PPo) na concentração de 10mg/kg.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos animais de acordo com as concentrações e as substâncias avaliadas	42
Tabela 2: Absorbâncias obtidas com o crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> nos meios de cultivo na ausência (controle) e na presença das substâncias Ab, PAb, Po e PPO nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l. Os valores representam a média de quintuplicatas $\pm$ o erro padrão	45
Tabela 3: Absorbâncias obtidas com o crescimento de <i>Bifidobacterium lactis</i> nos meios de cultivo na ausência (controle) e na presença das substâncias Ab, PAb, Po e PPO nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l. Os valores representam a média de quintuplicatas $\pm$ o erro padrão	48
Tabela 4: Crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de <i>A. blazei</i> (Ab) e polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>A. blazei</i> (PAb) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão	52
Tabela 5: Crescimento celular de <i>Bifidobacterium</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de <i>A. blazei</i> (Ab) e polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>A. blazei</i> (PAb) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão	54
Tabela 6: Crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de <i>P. ostreatus</i> (Po) e polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>P. ostreatus</i> (PPo) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão	55
Tabela 7: Crescimento celular de <i>Bifidobacterium</i> spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de <i>P. ostreatus</i> (Po) e polissacarídeos extraídos do basidioma de <i>P. ostreatus</i> (PPo) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão	56
Tabela 8: Síntese dos resultados do efeito de ativação/inibição das substâncias testadas nesse trabalho sobre o crescimento de Lactobacilos e Bifidobactérias obtidos nos experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

FOS – Fruto-oligossacarídeo

UFC – Unidade Formadora de Colônias

SOS – Oligossacarídeo de Soja

Ab – Corpo frutífero de *Agaricus blazei*

PAb – Polissacarídeo extraído do corpo frutífero de *Agaricus blazei*

Po – Corpo frutífero de *Pleurotus ostreatus*

PPo – Polissacarídeo extraído do corpo frutífero de *Pleurotus ostreatus*

mg – Miligrama

ml – Mililitro

g – Grama

l – Litro

μL - Microlitro

nm – Nanômetro

MRS – Main-Rogosa-Sharp

ABS – Absorbância

CB – Controle bacteriano

CC – Controle do Cultivo

CMC – Carboximetilcelulose

Kg – Quilograma

BFM – *Bifidobacterium* médium

LBS – *Lactobacillus* selection agar

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Generalidades sobre os Fungos	17
3.1.1 Filo Basidiomycota	18
3.1.1.1 Propriedades medicinais dos Basidiomicetos	19
3.1.1.2 O gênero <i>Agaricus</i>	20
3.1.1.2.1 Polissacarídeos do gênero <i>Agaricus</i>	23
3.1.1.2.2 Atividade antimicrobiana do gênero <i>Agaricus</i>	24
3.1.1.3 O gênero <i>Pleurotus</i>	25
3.1.1.3.1 Polissacarídeos do gênero <i>Pleurotus</i>	27
3.1.1.3.2 Atividade antimicrobiana do gênero <i>Pleurotus</i>	27
3.2 Microbiota intestinal.....	30
3.2.1 Bifidobactérias.....	32
3.2.2 Lactobacilos	34
3.2.3 Substâncias que afetam a microbiota intestinal - Prebióticos.....	35
3.2.3.1 Efeito Prebiótico de Polissacarídeos	37
4. METODOLOGIA	40
4.1 Basidiomas.....	40
4.2 Extração dos polissacarídeos dos basidiomas desidratados	40
4.3 Avaliação do efeito dos basidiomas desidratados e dos polissacarídeos obtidos dos basidiomas sobre o crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium lactis in vitro</i>	40
4.4 Avaliação do efeito do basidioma desidratado e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre a microbiota intestinal de camundongos	42
4.4.1 Animais e dieta.....	42
4.4.2 Análise bacteriológica do conteúdo cecal.....	43
4.5 Análise Estatística	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1 Avaliação do efeito do basidioma e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre o crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>in vitro</i>	45
5.2 Avaliação do efeito do basidioma e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre o crescimento de <i>Lactobacillus</i> spp e <i>Bifidobacterium</i> spp <i>in vivo</i>	52
6. CONCLUSÕES	61
7. PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido reportados como uma fonte inesgotável de compostos bioativos como antibióticos, polissacarídeos com ação antitumoral, enzimas, micotoxinas, vitaminas, entre outros (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2010). O cultivo de fungos da classe dos Basidiomicetos em meio sólido resulta em corpos frutíferos (cogumelos) de alto valor nutricional, por possuírem elevado teor de proteínas, carboidratos e fibras e baixo teor de lipídeos. Aliado ao valor nutricional atribui-se aos fungos da classe dos Basidiomicetos atividade medicinal proporcionada por inúmeras moléculas bioativas, principalmente polissacarídeos, presentes na biomassa fúngica (KALAC, 2009).

Os fungos pertencentes à classe dos Basidiomicetos, são reconhecidos por apresentarem polissacarídeos do tipo β -D-glucanos como constituintes da parede celular tanto do basidioma como do micélio e excretar estes polissacarídeos para o meio de cultivo. Estas moléculas são apontadas como as principais responsáveis pelas propriedades medicinais desses fungos (PRAMANIK, 2005).

Os cogumelos fazem parte da alimentação há milhares de anos, envolvendo um grande número de espécies comestíveis, e, em vários países, há uma aceitação bem estabelecida para o cultivo de cogumelos devido ao seu sabor e textura única (WONG e CHYE, 2009). Nos últimos anos, o consumo de cogumelos aumentou, seja do cogumelo *in natura* ou suplementos à base de seu extrato (NEYRINCK et al., 2009). As propriedades benéficas dos cogumelos comestíveis levaram à comercialização de inúmeras marcas de compostos a base de cogumelos desidratados nas formas de cápsulas, tabletes e comprimidos, avaliados como “Novo Alimento”, que atendem à Resolução ANVS/MS nº. 16/99 da ANVISA (BRASIL, 1999).

Embora não seja permitido alegar propriedades funcionais e/ou de saúde para os Novos Alimentos à base de corpos frutíferos ou micélio de fungos desidratados, várias marcas disponibilizadas para a venda de forma virtual são comercializadas para diversas finalidades, sendo que algumas delas são: prevenir e combater diversas doenças inclusive o câncer, fortalecer o sistema imunológico, tratar a hipertensão, a hipercolesterolemia, o diabetes,

aumentar ou controlar a atividade mental e reduzir o estresse. O comércio via *WebSite* é realizado principalmente no Brasil, Japão e China, onde são vendidos produtos como o corpo de frutificação seco, inteiro e moído, tabletes, cápsulas, extratos e chás (CHEN, 2001).

No entanto, de acordo com a literatura, os polissacarídeos presentes nos fungos podem tanto estimular o crescimento de micro-organismos como atuar como antimicrobianos. Sendo assim, torna-se relevante averiguar o efeito destes produtos a base de fungos sobre a microbiota intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de cogumelos desidratados sobre o crescimento de bactérias probióticas *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência da adição de corpos frutíferos desidratados de *A. blazei* e *P. ostreatus* e dos polissacarídeos extraídos dos corpos frutíferos desidratados sobre o crescimento de bactérias da microbiota intestinal humana
- Avaliar a influência da adição de corpos frutíferos desidratados e seus respectivos polissacarídeos sobre a microbiota intestinal de camundongos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Generalidades sobre os Fungos

Fungos são eucariotos que apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não tem celulose na parede celular (exceto alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substância quitinosa na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Nos fungos filamentosos, cada filamento cresce principalmente na extremidade, por extensão de uma célula terminal. Um único filamento é chamado hifa. As hifas geralmente crescem juntas, através da superfície e formam ramificações compactas, que coletivamente são chamadas de micélio e que podem ser vistas facilmente sem uso de microscópio (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004).

A nutrição da maioria dos fungos se dá por absorção, processo pelo qual enzimas adequadas hidrolisam macromoléculas, tornando-as assimiláveis através de mecanismos de transporte. Para seu desenvolvimento, os fungos exigem, de preferência, carboidratos simples como a D-glicose. Entretanto, outros açúcares mais complexos também podem ser utilizados. A temperatura de crescimento abrange uma larga faixa, porém, fungos de importância médica, em geral, apresentam temperatura ótima entre 20°C e 30°C (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Os fungos são importantes na cadeia alimentar porque decompõem vegetais mortos e por isso reciclam elementos vitais. São utilizados pelo homem como alimento (cogumelos) e na produção de drogas. Das mais de 100 mil espécies conhecidas, apenas cerca de 200 são patogênicas aos humanos e animais (TORTORA et al., 2005).

Os fungos são classificados em quatro grupos: os Zigomicetos, os Ascomicetos, os Basidiomicetos e os Fungos imperfeitos (Deuteromicetos). Este último não é um verdadeiro filo, mas um grupo de fungos cujas estruturas

sexuadas não estão bem identificadas. Aqui se incluem os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os Zigomicetos são os fungos mais simples, formados por cerca de 600 espécies com hifas asseptadas, incluindo o bolor do pão e alguns fungos parasitas de animais. Os Ascomicetos incluem fungos cujas hifas apresentam septos perfurados, sendo o zigoto substituído por um pequeno saco, o asco. Leveduras, *Morchella* e *Truber* são exemplos de fungos deste grupo. Os Basidiomicetos constituem os cogumelos propriamente ditos. Alguns são comestíveis como o champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) e o cogumelo ostra (*Pleurotus* spp) e outros agentes de doenças de plantas como os chamados carvões e ferrugens (LACAZ et al., 2002).

3.1.1 Filo Basidiomycota

Os Basidiomicetos (Filo Basidiomycota) apresentam hifas septadas, com parede quitinosa. Produzem um tipo de esporo, basidiósporo, suportado por um esporângio característico, com forma de dedos, o basídio. A partir do micélio, hifas desenvolvem-se de forma organizada, constituindo o corpo de frutificação ou basidiocarpos (CÉSAR e SÉZAR, 2003).

De acordo com Martho (1994) no basidiocarpo, algumas hifas se diferenciam em estruturas especiais, os basídios, onde ocorre fusão dos núcleos, resultando em um núcleo zigótico diplóide. Este logo sofre meiose e origina quatro esporos haplóides, os basidiósporos. Os basídios se localizam na parte inferior do chapéu dos cogumelos. Na extremidade livre do basídio localizam-se os quatro basidiósporos, que logo serão libertados. Ao cair em local adequado, rico em matéria orgânica, um basidiósporo germina e origina um novo micélio.

A Figura 1 apresenta o ciclo de vida de fungos da classe dos Basidiomicetos.

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos Basidiomicetos

Fonte: PRESCOTT, HARLE e KLEIN (2002)



Além de enzimas que degradam lignina, há evidências de que os polissacarídeos extracelulares produzidos por esses fungos desempenham um papel importante nesse processo (MAZIERO, CAVAZZONI e BONONI, 1999).

Os fungos da classe dos Basidiomicetos habitam diversas zonas climáticas, desde o ártico até as florestas tropicais. Os corpos frutíferos podem ser colhidos de substratos como folhas e madeira. Dentre os cogumelos pertencentes a esse gênero, os mais cultivados são: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus spp*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea* (SANCHEZ, 2004) e *Agaricus blazei* (DELMANTO et al., 2001).

3.1.1.1 Propriedades medicinais dos Basidiomicetos

Conforme Chang (2001), os cogumelos medicinais foram utilizados como suplemento dietético ou alimento medicinal na China por mais de 2000 anos. Nas últimas décadas, pesquisas conduzidas mundialmente confirmaram as propriedades medicinais de várias espécies de Basidiomicetos sendo que mais de 700 espécies de fungos foram descritas por apresentarem propriedades farmacológicas (NASCIMENTO, 2010). Dentre essas propriedades é possível destacar: modulação do sistema imunológico

(GUNDE-CIMERMAN, 1999; WASSER e WEIS, 1999; ELLERTSEN et al., 2006; NASCIMENTO, 2010; ISHII et al., 2011), efeito antitumoral (MIZUNO, 1999; DELMANTO et al., 2001; WASSER, 2002; DE BARBA et al., 2011), antioxidante (MAU, LIN e SONG, 2002; TONG et al., 2009; WONG e CHYE, 2009) e ação antimicrobiana (NGAI e NG, 2004), antiviral, antibacteriana e antiparasitária (MIZUNO, 1995; PINHEIRO et al., 2003).

Dentre os compostos bioativos encontrados em fungos citadas na literatura encontram-se os compostos fenólicos e ácidos orgânicos (MAU, LIN e SONG, 2002; GIANNENAS et al., 2010; CARVAJAL et al., 2012), as lecitinas (WANG, NG e OOI, 1998), o ergosterol (TAKAKU, KIMURA e OKUDA, 2001), os flavonóides (BARROS et al., 2008) as ribonucleases (FANG e NG, 2011), os folatos (FURLANI e GODOY, 2007) e os polissacarídeos, principalmente as β -glucanas (WASSER, 2002).

De maneira geral, β -glucanas fazem parte da composição dos cogumelos, sendo encontradas no basidiocarpo e/ou micélio (ISHII et al., 2011). Estão presentes na maior parte como glucanas ramificadas com diferentes tipos de ligações glicosídicas, tais como (1- 3), (1 - 6) β -glucanas e (1- 3) α - glucanas (WASSER, 2002).

As β - glucanas da parede celular estão ligadas à quitina e proteínas. Essas moléculas são estruturas altamente ordenadas, formadas principalmente por unidades de β -glucose, e diferenciam-se da celulose das plantas, pelo tipo de ligação entre as unidades dos açúcares da cadeia principal e por possuírem ramificações, apresentando geralmente elevada massa molecular (CAMELINI et al., 2005).

3.1.1.2 O gênero *Agaricus*

Basidiomicetos do gênero *Agaricus* são conhecidos como decompositores secundários por poderem ser cultivados somente em substratos previamente fermentados (OEI, 1996).

Dentre as espécies cultivadas do gênero *Agaricus* destacam-se o *Agaricus bisporus* (BURTON, LOVE e SMITH, 1993) e *Agaricus blazei*, que

possui propriedades medicinais e tem despertado grande interesse científico (HERERRA, 2001).

Agaricus blazei (*Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann) (Figura 2) origina-se de Piedade (São Paulo-Brasil). Em 2002, Wasser et al. propuseram para esta espécie a denominação *Agaricus brasiliensis* e em 2005, Kerrigan, baseado na análise da sequência do DNA, concluiu que esta espécie é biológica e filogeneticamente identificada como *Agaricus subrufescens* Peck, classificada em 1893 e nativa na América do Norte. Taxonomicamente, esta espécie de fungo é classificada como filo Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Agaricomycetidae, tribo Agariceae, seção *Arvenses*, gênero *Agaricus* CAMELINI et al., 2005).

Embora os primeiros relatos deste cogumelo datem da década de quarenta, somente após sua descoberta no Brasil, em 1965, por Furumoto, um fazendeiro japonês de Piedade, o interesse maior da comunidade científica foi despertado, principalmente no Japão (país que recebeu as primeiras amostras), China e Estados Unidos. Desde então, diversas pesquisas foram realizadas, demonstrando a qualidade e os benefícios desta espécie (ANTUN, ANTUN e ASSADI, 1999).

O corpo frutífero de *Agaricus blazei* apresenta píleo medindo de 5 a 11 cm de diâmetro, semi-globuloso depois de aberto, com cume truncado, coloração marrom claro até marrom médio, escamado com pequenos flocos brancos no topo, borda encurvada, excedente de 2 a 3 mm. O estipe é estreitado na junção com o píleo, com 6 a 13 cm de comprimento. As lamelas se dispõem muito próximas umas das outras, são conectadas a estipe, com 0,8 a 1,0 cm de largura, variando de esbranquiçada a cinza amarronzado, sendo marrom escuro na senescência. Os esporos têm dimensões elípticas, de cor marrom. O ciclo de vida do *Agaricus blazei* inicia-se quando um cogumelo maduro (véu aberto) lança seus esporos, que são facilmente disseminados pelo ar. Os basidiosporos, quando encontram um substrato com condições favoráveis, germinam e dão origem a hifas haplóides, que recebem o nome de micélio escuro (ANTUN, ANTUN e ASSADI, 1999). Na composição química podem ser encontrados complexos glicoprotéicos e polissacarídeos (β -glucanos) que apresentam propriedades de potencializar o sistema imune,

além de atividade antitumoral pronunciada (OKAZAKI, 1995; MIZUNO et al., 1998; MIZUNO et al., 1999; MACHADO et al., 2005).

Agaricus blazei contém 85-87% de água. Quando desidratado, é rico em proteínas (40-45%), carboidratos (38-45%), fibras (6-8%) e vitaminas como B1 (0,3 mg), B2 (3,2 mg) e niacina (49,2 mg). Também contém uma quantidade significativa de ergosterol (0,1-0,2%), que é convertido em vitamina D2, e o potássio (2,97%) é o principal mineral do cogumelo (MIZUNO, 1995).

Figura 2: Imagem de *Agaricus blazei*



Fonte disponível em: pharmaceuticalmushrooms.nwbotanicals.org

Acesso em: 30/08/2011

Diversos estudos farmacológicos demonstraram que *A. blazei* tem potencial antioxidante (TSAI, TSAI e MAU, 2007; SUI et al., 2010), anti-inflamatório e antinociceptivo (KOMURA et al., 2010), antitumoral (KANENO et al., 2004; LIU e SUN, 2011); antiviral (BRUGGEMANN et al., 2006), imunomodulatório e quimiopreventivo (LIN et al., 2004; ELLERTSEN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; FORLAND et al., 2010), bem como efeito hipocolesterolêmico, controlador do diabetes (MIZUNO, 1995; FORLAND et al., 2010), antimutagênico (GUTERREZ et al., 2004) e leishmanicida (VALADARES et al., 2011). Além disso, estudos demonstram que *A. blazei* pode exercer tanto efeito antimicrobiano (BERNARDSHAW, JOHNSON e HETLANDY, 2005; AL-FATIMI et al., 2005; FIORI-TUTIDA et al., 2007; ÖZTÜRK et al., 2011; OZEN et al., 2011), como de estímulo de bactérias que habitam o sistema gastrointestinal (FORTES et al., 2010; GIANNENAS et al., 2011).

3.1.1.2.1 Polissacarídeos do gênero *Agaricus*

As estruturas químicas de polissacarídeos, como composição de açúcar e tipos de ligações glicosídicas, podem ser caracterizadas pela análise espectral, análise química ou cromatografia (YANG e ZHANG, 2009).

Smiderle et al. (2011) avaliaram a composição polissacarídica de extratos parcialmente purificados de *A. bisporus* e *A. brasiliensis* e encontraram α -glucanas com ligações (1 $\rightarrow$ 6),(1 $\rightarrow$ 4) β -glucanas com ligações (1 $\rightarrow$ 6) e manogalactanas. Os autores ainda afirmaram que as proporções dos polissacarídeos, determinadas por NMR, foram consideravelmente diferentes para as duas espécies estudadas. *A. brasiliensis* mostrou um alto teor de β -glucanas enquanto que *A. bisporus* apresentou manogalactanas como seu principal polissacarídeo.

Um polissacarídeo solúvel em água foi isolado por extração em solução a 5% de hidróxido de sódio a partir dos corpos de frutificação de *Agaricus blazei*. O polímero era composto de galactose, glicose, fucose, arabinose e manose com a razão molar de 29: 20: 6: 2: 2, respectivamente (LIU e SUN, 2011).

Sui et al. (2010) analisaram polissacarídeos extraídos do corpo frutífero de *Agaricus blazei*. Os resultados indicaram que os polissacarídeos continham glicose (93,87%), manose (3,54%) e arabinose (2,25%).

Cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (GC-MS) foram utilizadas para caracterizar os polissacarídeos extraídos de *Agaricus brasiliensis*. Os resultados mostraram que o polissacarídeo obtido era um heteropolissacarídeo composto principalmente de arabinose, glicose e manose nas percentagens molares de 78,38%, 10,46% e 8,51%, respectivamente (ZHANG et al., 2010).

Camelini et al.(2005) analisaram frutificações de *A. subrufescens* (= *A. blazei*) coletadas em diferentes estágios de maturação e avaliaram o rendimento e as características estruturais dos polissacarídeos solúveis em água. Os autores identificaram um polissacarídeo de estrutura (1 $\rightarrow$ 6)-(1 $\rightarrow$ 3)- β -glucanas, com baixo teor de proteínas (em média 0,59 %) nos dois estágios de maturação.

Park et al. (2003) avaliaram a quantidade de β -glucanas em *Agaricus blazei* de três diferentes regiões, utilizando o método enzimático, observando quantidades significativas dessa substância na espécie estudada, em torno de 38%.

3.1.1.2.2 Atividade antimicrobiana do gênero *Agaricus*

O efeito antibacteriano de um extrato aquoso de *Agaricus blazei* Murill (ABM) foi avaliado em um trabalho realizado por Bernardshaw, Johnson e Hetlandy (2005). O extrato foi administrado em camundongos NIH / OlaHsd por via oral antes e após a inoculação intraperitoneal de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B. Os parâmetros avaliados foram o efeito bactericida e a taxa de sobrevivência dos camundongos. Os resultados mostraram a capacidade de proteção do extrato de *A. blazei* contra a infecção sistêmica dos camundongos por *S. pneumoniae* 6B tendo sido mais eficaz quando administrado 24 horas antes da inoculação, mas também apresentando efeito protetor quando administrado em conjunto com *S. pneumoniae* quando comparado ao controle (camundongos que receberam somente PBS). A ausência de efeito antibiótico em pneumococos *in vitro* e o aumento dos níveis de citocinas MIP-2 e TNF-alfa no soro dos camundongos que receberam o extrato também indicaram que o efeito protetor do extrato de *A. blazei* envolve o sistema imunológico dos camundongos. Os resultados sugerem que o extrato de *A. blazei* pode ser útil como profilático adicional e possivelmente para o tratamento terapêutico contra infecções bacterianas em seres humanos.

Al-Fatimi et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos e aquosos de 23 espécies de Basidiomicetos sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida maltos*. *Agaricus* sp apresentou atividade antibacteriana.

Um extrato aquoso bruto de *Agaricus blazei* foi capaz de inibir a germinação de esporos do fungo *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *in vitro* (FIORITUTIDA et al., 2007).

O efeito antimicrobiano de extratos metanólicos de três espécies de *Agaricus* (*Agaricus essettei*, *Agaricus bitorquis* e *Agaricus bisporus*) foi testado contra seis espécies de bactérias Gram-positivas, sete espécies de bactérias Gram-negativas e duas espécies de levedura. Os resultados revelaram que bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos de cogumelos do que as bactérias Gram-negativas. A maior atividade inibitória foi determinada contra espécies de *Micrococcus*, especialmente contra *M. Flavus*, ocasionada pelo extrato de *A. bisporus*. As leveduras *Candida albicans* e *C. tropicalis* foram também sensíveis aos extratos metanólicos das três espécies de *Agaricus* estudadas (ÖZTÜRK et al., 2011).

Ozen et al. (2011) reportaram um forte efeito inibitório de um extrato metanólico de *Agaricus bisporus* sobre o crescimento de *Escherichia coli*.

3.1.1.3 O gênero *Pleurotus*

Dentre os fungos da classe dos Basidiomicetos, os do gênero *Pleurotus* (Figura 3) são cultivados em vários países principalmente nos localizados no sudeste Asiático, Índia, Europa e África. Naturalmente, é decompositor de madeiras e vários outros substratos (BERNARDI et al., 2009).

Pleurotus são cogumelos comestíveis geralmente denominados “cogumelos ostra”, devido ao formato do píleo ser semelhante a uma concha. Possui coloração clara (branco, cinza ou castanho) e seu basidiocarpo possui formato de folha carnuda (FERREIRA, 1998, apud SÁ-RIVAS et al., 2010).

O gênero *Pleurotus* pertence à família Agaricaceae Fr., incluída na ordem Agaricales e as espécies desse gênero possuem ampla distribuição mundial (PUTZKE e WARTCHOW, 2008).

O cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* pode ser realizado em meio sólido ou líquido. O processo em meio sólido depende da interação entre o fungo e o substrato lignocelulósico (SANTOS, 2000). O cultivo em meio líquido, começou a ser estudado a fim de utilizar o caldo de cultivo de *Pleurotus* para a produção de substâncias com potencialidades terapêuticas (WISBECK et al., 2002).

Dentre as propriedades medicinais do gênero *Pleurotus* pode-se citar a capacidade de modular o sistema imunológico (TONG et al., 2009; SUN e LIU 2009), a ação antitumoral (MIZUNO,1995; PRAMANICK 2005; SUN e LIU, 2009; TONG et al., 2009), bem como propriedades antiinflamatória e antimicrobiana (TONG et al., 2009).

O gênero *Pleurotus* é um dos mais cultivados devido a sua alta eficiência biológica, adaptando-se bem à condição brasileira de clima tropical. Possui a capacidade de colonizar e degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, produzindo corpos frutíferos (cogumelos) com elevado valor gastronômico e medicinal (HOLTZ et al., 2009). São cogumelos apreciados por causa do seu paladar, por apresentarem quantidade relativamente alta de proteína, carboidratos, minerais e vitaminas, e baixo teor de lipídeos. *Pleurotus* spp requerem pequeno tempo de crescimento, comparado a outros cogumelos e seu corpo de frutificação não é muito atacado por doenças e pragas. Pode ser cultivado de um modo simples e barato (SILVA et al., 2007).

Pleurotus ostreatus é cultivado em substratos como palha de cereais (SOUZA DIAS, 2003), serragem (SÁ RIVAS et al., 2010), bagaço de cana (ORTEGA et al., 1993), algodão (HOLTZ et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010), folhas de bananeira (BONATTI et al., 2004), cascas de árvores e folhas (VIEIRA, PAZ e GIOVANNI, 2007). A composição química dos corpos frutíferos pode variar de acordo com o tipo de substrato no qual foi cultivado (CURVETTO et al., 2002).

Figura 3: Imagem de *Pleurotus ostreatus*



Fonte disponível em: http://genome.igj-psf.org/PleosPC15_1/PleosPC15_1.home.html

Acesso em: 30/08/2011

3.1.1.3.1 Polissacarídeos do gênero *Pleurotus*

A composição monomérica de um polissacarídeo de *Pleurotus ostreatus* geralmente é formada por glicose, manose e galactose (SEVIOUR, 1992).

Segundo Santos-Neves (2007) foi possível realizar a caracterização de uma manogalactana de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* através de análises espectroscópicas e de metilação. Além desta, duas glucanas foram caracterizadas, uma β -glucana com ramificação α e uma glucana apresentando configuração α e β .

Komura et al. (2009) cultivaram o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* var. *florida* em dois diferentes meios líquidos, CZAPECK e POL, com o objetivo de obter os exopolissacarídeos e a biomassa micelial. A partir dos exopolissacarídeos foram caracterizadas mananas similares, independente do meio no qual o micélio foi cultivado. Ainda, a partir da biomassa cultivada em meio CZAPECK foram obtidos extratos aquosos e alcalinos, os quais foram submetidos a processos de purificação. Estas frações foram caracterizadas quanto a sua estrutura química, como uma manogalactana, glicogênio e uma β -glucana.

Synytsya et al. (2009) relataram que corpos frutíferos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* contém cadeias ramificadas β -1, 3 - 1,6 glucana e linear α -1,3-glucana como os principais componentes da parede celular. Os autores ainda afirmaram que glucanas biologicamente ativas ou seus complexos protéicos e outros polissacarídeos isolados de corpos frutíferos de *Pleurotus* também estão sendo estudados para a preparação de suplementos alimentares.

3.1.1.3.2 Atividade antimicrobiana do gênero *Pleurotus*

Substâncias antibióticas obtidas de fungos do gênero *Pleurotus* podem ser divididas em polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais, na maior parte dos casos, também exercem atividade anticancerígena e antiviral, através da estimulação da resposta imunológica do organismo, em metabólitos secundários, principalmente de origem terpenóide e em diferentes derivados protéicos (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Gerasimenya et al. (2002) avaliaram catorze linhagens de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kumm. (Agaricales sl) como possíveis produtoras de substâncias biologicamente ativas em cultivo submerso. Extratos do micélio e do caldo de cultivo foram evaporados e o resíduo seco ressuspenso. A atividade antimicrobiana foi testada pelo método de difusão em ágar. Placas com as substâncias avaliadas foram inoculadas com as linhagens de *Pleurotus*. Todas as cepas manifestaram atividade antimicrobiana. O caldo de cultivo demonstrou apenas uma atividade mínima. Para a investigação seguinte, a linhagem de *P. ostreatus* com a maior atividade antimicrobiana foi testada em cultivo submerso e produziu duas substâncias bioativas: uma com elevada atividade contra *Aspergillus niger* INA 00.760 e a outra com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. .

Vários métodos de isolamento de componentes voláteis de *P. ostreatus* foram comparados: a extração por tetracloreto de carbono (CCl₄), a destilação a vácuo, e o arraste pelo fluxo de nitrogênio. Os compostos extraídos por CCl₄ foram 3-octanona, 3-octanol, 1-octeno-3-ol, benzaldeído, 1-octanol, ácido benzóico e um componente não identificado. A mistura de compostos extraídos demonstrou atividade antimicrobiana contra algumas cepas bacterianas. A adição de uma mistura contendo estes compostos voláteis no meio de cultivo resultou na inibição completa das oito bactérias utilizadas para o ensaio antibacteriano (BELTRAN-GARCIA, ESTARRON-ESPINOSA e OGURA, 1997).

Garcia et al. (1998), ao testar extratos de micélio de *P. ostreatus*, cultivados em grãos de trigo, também verificaram atividade antibacteriana da espécie, contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Bacillus subtilis*, porém, não foi encontrada qualquer atividade contra fungos e leveduras.

A extração do caldo de cultivo de *P. griseus* com clorofórmio resultou no antibiótico pleurotin, produzido em escala industrial, que afeta as seguintes bactérias: *Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis*, *Photobacterium fischeri* e *Staphylococcus aureus* (GUNDE-CINERMAN, 1999).

Pleuromutilin é um diterpenóide com ação antibacteriana isolado de *P. mutilus*, que atua diretamente sobre o ribossomo, impedindo a síntese de proteínas (LORENZEN e ANKE, 1998).

Gutiérrez et al. (1994), estudando a produção de enzimas oxidativas e compostos aromáticos por fungos do gênero *Pleurotus*, observaram a presença de ácido benzóico, conhecido pelas suas propriedades antimicrobianas contra leveduras e bactérias, e de álcool benzílico no caldo de cultivo de *P. ostreatus*.

Gunde-Cimerman (1999) relata ainda que glicopeptídeos com excelentes atividades terapêuticas e fungicidas são produzidas por *P. ostreatus*, sendo aplicados no controle de doenças de plantas agrícolas.

Wolff et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Pleurotus ostreatus*: infusão em água dos corpos de frutificação frescos (B1), basidiocarpos desidratados (B2), micélio fresco (M1), e micélio desidratado (M2). Polissacarídeos a partir do micélio fresco também foram obtidos por infusão de água seguido por tratamento com etanol (PE). Os extratos foram testados contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. B1, B2, e M1 mostraram mais de 50,0% de inibição de *C. albicans*. M2 apresentou um elevado grau de inibição de *E. coli* (87,5%) e *B. subtilis* (57,5%), enquanto PE não foi eficaz.

A atividade de um extrato aquoso de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* foi testada contra 39 micro-organismos de importância ambiental e clínica, incluindo 29 bactérias e 10 fungos. O extrato mostrou atividade inibitória do crescimento de apenas 3 bactérias: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas sp.* (HEARST et al., 2009).

A atividade antimicrobiana de extratos etanólicos do micélio obtido a partir de 10 cogumelos comestíveis selvagens, (*Armillaria mellea*, *Meripilus giganteus*, *Morchella costata*, *Morchella elata*, *Morchella esculenta* var. *vulgaris*, *Morchella hortensis*, *Morchella rotunda*, *Paxillus involutus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatus*) foi investigada. Para a determinação da atividade antimicrobiana, o crescimento de 11 micro-organismos foi avaliado pelo método de difusão em agar. *P. ostreatus* e *M. giganteus* foram as espécies mais ativas contra bactérias e leveduras (KALYONCU et al., 2010).

Wisbeck et al. (2002) encontraram atividade antimicrobiana no caldo de cultivo de *P. ostreatus* contra *C. albicans*. Gern, (2005), ao avaliar a ação de extratos polissacarídicos utilizando o mesmo fungo (*Pleurotus ostreatus*) também contra *C. albicans*, obteve resultados diferentes de Wisbeck (2002) e concluiu que o uso de outro meio de cultivo e outra metodologia de análise podem influenciar significativamente no resultado da atividade antimicrobiana deste fungo.

Coutinho et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos do micélio desidratado de *P. ostreatus* cultivado em meio contendo extrato de trigo e glicose. O extrato promoveu uma inibição de 57,5% no crescimento de *Escherichia coli* e de 87,21% no crescimento de *Bacillus subtilis*, não apresentando atividade contra *Candida albicans*. Neste trabalho, um extrato de micélio fresco da mesma linhagem fúngica apresentou 33,57% de inibição, sugerindo a perda de substâncias bioativas no processo de desidratação.

3.2 Microbiota intestinal

O conceito de saúde intestinal é recente, e se refere a três componentes básicos: a alimentação, a mucosa e a microbiota intestinal (FORTUN-LAMOTHE e BOULLIER, 2007).

Define-se microbiota intestinal como o conjunto de bactérias que habitam o intestino. Esta pode ter ação positiva e ser favorável a uma boa digestão, porém, pode se apresentar com qualidade desfavorável, comprometendo a saúde (BORSARINI, 2006).

O trato gastrointestinal alberga o maior número e a maior diversidade de espécies de bactérias que colonizam o corpo humano. As bactérias são encontradas em todo trato gastrointestinal, porém têm distribuição heterogênea. No estômago e no intestino delgado o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, que é reduzida, por ação bactericida do suco gástrico, da bile e da secreção pancreática, como pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. Entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa flora do cólon existe um sítio de transição bacteriana chamado íleo. No cólon, as bactérias encontram condições

favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais, peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional (BRANDT, SAMPAIO e MIUKI, 2010).

O habitat intestinal de um indivíduo contém de 300 a 500 espécies diferentes de bactérias, e o número de células microbianas dentro do lúmen intestinal é cerca de 10 vezes maior do que o número de células eucarióticas no corpo humano. O intestino grosso contém uma complexa e dinâmica microbiota com altas densidades de bactérias que atingem até 10^{11} ou 10^{12} UFC/g. Uma grande proporção da massa fecal também é composta de bactérias - cerca de 60% de sólidos fecais (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

O trato gastrointestinal abriga bactérias gram-positivas e gram-negativas (DOGI et al., 2008). Bactérias anaeróbias superam as aeróbias por um fator de 100-1000. Os gêneros *Bacteróides*, *Bifidobactérias*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* são predominantes em seres humanos (SALMINEN, OUWEHAND e ISOLAURI, 1998) enquanto os aeróbios ou anaeróbios facultativos, tais como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococos*, *Klebsiella*, *Lactobacilos* e *Proteus* estão entre os gêneros subdominantes (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

Com base em dados experimentais é possível identificar três funções principais da microbiota intestinal: a) funções de nutrição e metabolismo, como resultado da atividade bioquímica da microbiota, formação de ácido graxos de cadeia curta, a produção de vitaminas e efeitos favoráveis sobre a absorção de cálcio e ferro no cólon. b) proteção, impedindo invasão por agentes infecciosos ou crescimento de micro-organismos com potencial patógeno, e c) funções tróficas sobre a proliferação e diferenciação do epitélio intestinal, e o desenvolvimento do sistema de modulação e imune (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

Vários fatores garantem a defesa da mucosa intestinal contra os micro-organismos nocivos, sendo que alguns não são pertencentes ao sistema imunológico. Primeiramente, junções permitem a coesão entre as células epiteliais e impedem a passagem intercelular dos agentes patógenos e o peristaltismo intestinal acelera a eliminação de agentes patogênicos, reduzindo

a sua interação com células epiteliais. Além disso, a proliferação de células pluripotentes localizadas em criptas na base das vilosidades permite a permanente renovação do epitélio digestivo. Há também a formação de muco, gerando camada protetora na superfície dos enterócitos, diminuindo a fixação de patógenos em enterócitos. Por fim, a microbiota digestiva saudável cria um ambiente desfavorável para o crescimento de micro-organismos patógenos (FORTUN-LAMOTHE e BOULLIER, 2007).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a microbiota intestinal normal é uma barreira extremamente efetiva contra micro-organismos patogênicos e oportunistas (FULLER, 1991). Fortun-Lamothe e Boullier (2007) apontam que o papel dos micro-organismos benéficos inclui tanto uma proteção contra patógenos, quanto implicação no desenvolvimento e maturação da imunidade da mucosa digestiva.

É possível modificar a composição da microbiota intestinal pela administração oral de probióticos, ou pela administração de prebióticos, que estimulam seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias no cólon. Várias evidências demonstram que a administração de prebióticos diferentes como inulina e fruto-oligossacarídeos, induz uma modificação significativa da microbiota intestinal, aumentando o número de lactobacilos e bifidobactérias (KRUSE, KLEESSEN e BLAUT, 1999).

Em animais monogástricos, micróbios são transferidos para o intestino do neonato com vários processos, tais como amamentação e cuidados logo após o nascimento. No recém-nascido, a microbiota intestinal começa a ser formada por esses micro-organismos e se desenvolve gradualmente. Nos seres humanos, o intestino infantil é inicialmente colonizado por um grande número de bactérias das espécies *Escherichia coli* e *Streptococcus*. Em camundongos, *E. coli*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* são os principais micro-organismos durante algumas semanas. Após o desmame, bactérias anaeróbicas, como *Bacteroidaceae* e lactobacilos, tornam-se dominantes (INOUE e USHIDA, 2003).

3.2.1 Bifidobactérias

Bifidobactérias são bactérias anaeróbias, gram-positivas, com bacilos não-móveis comumente encontrados no trato gastrointestinal de animais, incluindo humanos. São as espécies predominantes de bactérias no trato gastrointestinal dos bebês e representam cerca de 3% da microbiota total do intestino de seres humanos adultos saudáveis (SOLANO-AGUILAR et al., 2008). Foram isoladas pela primeira vez por Henry Tissier do Instituto Pasteur, a partir de um lactente. A bactéria foi chamada de *Bacillus bifidus communis* (World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines: Probiotics and prebiotics, 2009). Hoje já existem cerca de trinta e nove espécies atribuídas ao gênero *Bifidobacterium* (POKUSAEVA, FITZGERALD e VAN SINDEREN, 2011).

Dentre os efeitos benéficos das bifidobactérias incluem-se: redução de doenças infecciosas, redução de doenças inflamatórias crônicas, melhora da taxa de colesterol e intolerância à lactose (TURRONI et al., 2009; PAVAN e KLEEREBEZEM, 2006). Um estudo realizado por Philippe et al. (2011), mostrou que a administração oral diária de *Bifidobacterium lactis* foi capaz de reduzir mediadores inflamatórios e promover aumento de marcadores específicos em modelo de ratos com colite.

As bifidobactérias mais comumente usadas na produção de probióticos são *Bifidobacterium animalis* subespécie *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium longum* (MASCO et al., 2005).

Chiang et al. (2000) demonstraram que *Bifidobacterium lactis* (N019) pode aumentar a imunidade e a produção de diferentes tipos de leucócitos, bem como, a produção de fagócitos e de citocinas pró-inflamatórias, após realizarem estudo experimental duplo-cego, com 50 indivíduos saudáveis entre 41 à 81 anos, que consumiram leite adicionado de *Bifidobacterium lactis* (N019) durante 3 semanas.

Cepas de *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* demonstraram ter propriedades imunomodulatórias. Neste contexto, tem sido sugerido que cepas de Bifidobactérias do intestino humano poderiam contribuir para regular os distúrbios no balanço de células T-helper, respostas dos linfócitos aos antígenos exógenos relacionados com doenças alérgicas, doença de Crohn e doença celíaca (COLLADO et al., 2008).

3.2.2 Lactobacilos

Os lactobacilos são uma das principais bactérias comensais do trato gastrointestinal humano (HIRANO et al., 2003). São bactérias Gram-positivas produtoras de ácido láctico, bastante utilizadas na indústria de alimentos. (KURATSU, HAMANO e DAIRI, 2010).

São amplamente utilizados para garantir o equilíbrio intestinal bacteriano para melhorar a saúde do hospedeiro (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005), na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese. Seus efeitos anticarcinogênicos podem ser atribuídos à inibição de enzimas pro-carcinogênicas ou a estimulação do sistema imunitário do hospedeiro. A administração de *Lactobacillus casei* foi relacionada com a indução de uma resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos, assim como a supressão da formação de tumores de cólon em camundongos e a inibição de metástases pulmonares (COPPOLA E GIL-TURNES, 2004).

Em estudo com 135 pacientes com mais de 62 anos apresentando diarreia no decorrer de tratamento antibiótico, o tratamento com probióticos contendo *Lactobacillus casei* L.; *bulgaris* e *Streptococcus thermophilus*, administrado duas vezes ao dia durante período entre o início da antibioticoterapia e uma semana após, mostrou-se eficaz, evitando diarreia associada a antibióticos nos idosos (HICKSON et al., 2008).

Xie et al. (2011) avaliaram os efeitos de *Lactobacillus plantarum* 9-41- A e *Lactobacillus fermentum* M1-16 na massa corporal, metabolismo lipídico e microbiota intestinal de ratos alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica, sugerindo que a suplementação com lactobacilos tem efeito hipocolesterolêmico bem como, promovem equilíbrio microbiano intestinal e, melhora do tempo de trânsito intestinal.

Carnicer et al. (2006) estudaram as características da microbiota intestinal de crianças que receberam dieta com leite fermentado acrescido de *Lactobacillus casei* e seu impacto sobre os valores das imunoglobulinas. Os

resultados mostraram evidências da sobrevivência de *L. casei* no trato gastrointestinal e seu efeito imunoestimulador, bem como, aumento significativo de IgA.

3.2.3 Substâncias que afetam a microbiota intestinal - Prebióticos

O termo prebiótico foi introduzido por Gibson e Roberfroid (1995), que definiram prebiótico como um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de bactérias no cólon.

O potencial prebiótico tem sido atribuído a muitos componentes do alimento sem considerar devidamente os critérios exigidos para tal, em particular, aos oligossacarídeos e polissacarídeos dos alimentos (que incluem as fibras dietéticas) foi atribuído atividade prebiótica. No entanto, de acordo com Gibson et al. (2004) há necessidade de estabelecer critérios para classificar um alimento como prebiótico. Tal classificação requer uma demonstração científica de que o componente ou o ingrediente do alimento: 1. resiste aos processos de digestão, absorção e adsorção do hospedeiro; 2. é fermentado pela microflora colonizadora do sistema gastrointestinal; 3. estimula seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de bactérias do sistema gastrointestinal.

Prebióticos apresentam características tecnológicas e nutricionais importantes e são comumente encontrados ou extraídos de material vegetal, incluindo frutas, cereais e vegetais, mas também estão presentes no leite materno e colostro. Incluem inulina, fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos e lactulose (O'TOOLE e COONEY, 2008). Quando utilizados em formulações alimentícias melhoram significativamente as características organolépticas (WANG et al., 2000).

Atualmente, sabe-se que algumas fibras desempenham papel fundamental na manutenção da microbiota intestinal e que a quantidade de bactérias e sua excreção pelas fezes é diretamente proporcional ao consumo de fibra, tanto em animais como em humanos. Nos últimos anos, o papel da inulina e dos fruto-oligossacarídeos (FOS) sobre a microbiota intestinal e na

produção de bifidobactérias tem despertado atenção no meio científico (BÚRIGO, 2007).

Assim como ocorre no caso de outros carboidratos não-digeríveis, os prebióticos exercem um efeito osmótico no trato gastrointestinal, enquanto não são fermentados. Quando fermentados pela microbiota endógena, o que ocorre no local em que exercem o efeito prebiótico, eles aumentam a produção de gás. Portanto, os prebióticos apresentam o risco teórico de aumentar a diarreia em alguns casos (devido ao efeito osmótico) e de serem pouco tolerados por pacientes com síndrome do intestino irritável. Entretanto, a tolerância de doses baixas de prebióticos é geralmente excelente (MARTEAU e BOUTRON-RUAULT, 2002).

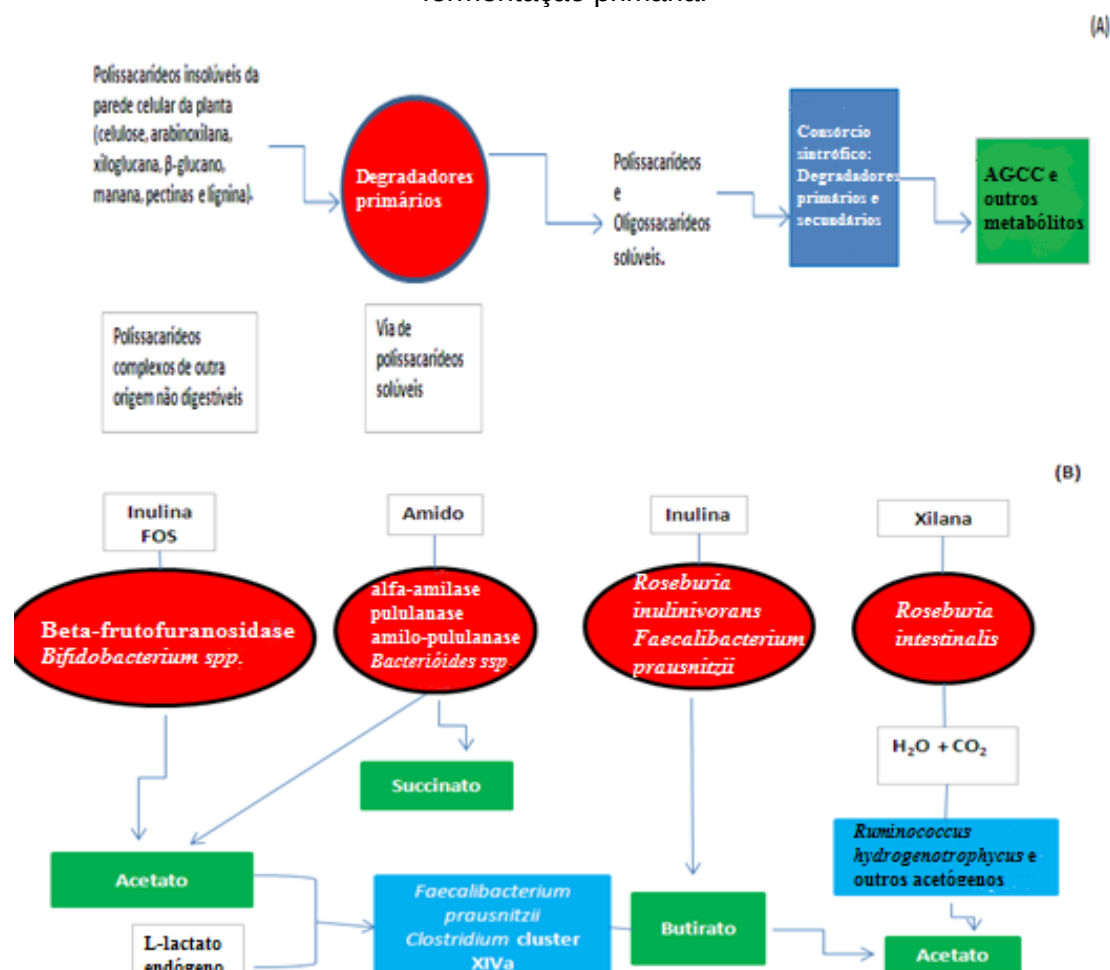
Cogumelos parecem ser potenciais candidatos a prebióticos já que contém carboidratos como a quitina, hemicelulose, glucanas, mananas, galactanas e xilanas (AIDA, 2009). As β -glucanas têm se destacado entre os ingredientes utilizados para produção de alimentos funcionais (TOKUNAKA et al., 2002; RAMESH e THARANATHAN, 2003). Em função da sua estrutura molecular e conformação dos fragmentos obtidos a partir desta macromolécula, os oligossacarídeos, podem atuar como prebióticos estimulando seletivamente o crescimento de bactérias do trato intestinal, servindo de fonte energética para a microflora benéfica contribuindo assim para o processo de digestão (PRZEMYSŁAW e PIOTR, 2003). Outros aspectos positivos, como redução dos níveis de colesterol e de açúcar no sangue, pela inclusão da β -glucana na dieta também já foram comprovados em humanos (KIM et al., 2006).

Portanto, oligossacarídeos de várias origens (bactérias, plantas e fungos) têm sido amplamente utilizados como suplementos farmacológicos, ingredientes alimentares, e alimentos processados para ajudar no controle de peso, controle da glicose, redução de níveis séricos de lipídios e outras doenças e modulação da microbiota intestinal (QIANG, YONGLIE, QIANBING, 2009).

3.2.3.1 Efeito Prebiótico de Polissacarídeos

De acordo com Candela et al. (2010), o metabolismo de micro-organismos intestinais é suportado principalmente por dois dos seguintes tipos das fontes de energia: xilanas não-digeríveis, pectina, arabinose, celulose, hemicelulose, amidos resistentes e glucanas. A degradação deste grupo heterogêneo de oligossacarídeos complexos envolve uma sintrofia metabólica forte entre os micro-organismos diversos que constituem a microbiota intestinal. Os polissacarídeos não-digeríveis que alcançam o intestino grosso são os primeiros substratos dos decompositores primários especializados. A atividade metabólica dos decompositores primários conduz à liberação de uma larga escala de polissacarídeos que se tornam disponíveis para os colonizadores secundários (Figura 4).

Figura 4 - (a) Estabelecimento de consórcios sintróficos no ecossistema presente no cólon humano. Os polissacarídeos complexos insolúveis são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta e em oligossacarídeos solúveis pelas bactérias decompositoras primárias, que são caracterizadas pela presença de enzima específica não compartilhada com outras bactérias comensais. (b) Exemplo de vias metabólicas bacterianas utilizadas na fermentação dos oligossacarídeos e dos produtos da fermentação primária.



Fonte: Adaptado de Candela et al. (2010).

Alguns estudos têm demonstrado que ratas alimentadas com FOS diminuíram a produção de certos metabólitos associados ao câncer (SILVA, 2007). Modelos *in vivo* envolvendo ratos têm demonstrado a influência favorável dos FOS na inibição da carcinogênese do cólon. Lesões pré-cancerosas foram induzidas em ratos usando azoximetano e foram alimentados com rações contendo 10% de FOS, tendo verificado redução significativa das lesões (REDDY et al., 1997).

Alterações significativas na microbiota intestinal humana foram observadas com doses de 100g de produto contendo 10^9 UFC de probióticos e

5 a 20g de inulina e/ou oligofrutose, sendo administrada durante 15 dias (SAAD, 2006).

Em humanos, polissacarídeos como os fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos são conhecidos pela sua capacidade de estimular o crescimento de Bifidobactérias e Lactobacilos, bem como, de inibir potencialmente bactérias patogênicas, enterobactérias, Clostridium e Salmonella. Os produtos finais da fermentação dos oligossacarídeos por bactérias do cólon são absorvidos e utilizados pelas células epiteliais do intestino, estimulando o seu crescimento, assim como a absorção de sal e água, aumentando a umidade do bolo fecal através da pressão osmótica, e consequentemente melhorando a motilidade intestinal. (QIANG, YONGLIE, QIANBING, 2009).

4. METODOLOGIA

4.1 Basidiomas

Cápsulas contendo corpos frutíferos (basidioma) de *Agaricus blazei* desidratados e moídos foram adquiridas em uma loja de produtos naturais de Joinville/SC. Os corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* desidratados foram obtidos do Laboratório de Cultivo de Basidiomicetos da Univille e moídos a pó em liquidificador.

4.2 Extração dos polissacarídeos dos basidiomas desidratados

Os basidiomas desidratados e moídos de *A. blazei* e *P. ostreatus* foram adicionados de água deionizada na proporção de aproximadamente 1:13 (m/m), afim de manter a biomassa recoberta com água, e aquecidos a 100°C por 4h, por 3 vezes. O extrato foi filtrado em papel filtro Wathman nº1 e o filtrado concentrado em rotavapor. A solução concentrada foi adicionada de etanol na proporção 1:4 (v/v), mantida sob refrigeração (4°C) por 24h e centrifugada. O precipitado foi liofilizado e mantido em frasco vedado até sua utilização (POKHREL e OHGA, 2007).

4.3 Avaliação do efeito dos basidiomas desidratados e dos polissacarídeos obtidos dos basidiomas sobre o crescimento de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium lactis* *in vitro*.

Para os testes de avaliação *in vitro* foram utilizadas as seguintes linhagens bacterianas: *Lactobacillus casei* (ATCC 393 - CCT 1465) e *Bifidobacterium lactis* (CCT 7573) cultivadas e mantidas sob refrigeração (4°C) em meio de cultivo Main-Rogosa-Sharp (MRS) Himedia® (composição em g/L: · Peptona Proteose: 10,00 · Extrato de Carne: 10,00 · Extrato de Levedura: 5,00 · Dextrose: 20,00 · Polisorbato 80: 1,00 · Citrato de Amônio: 2,00 · Acetato de Sódio: 5,00 · Sulfato de Magnésio: 0,10 · Sulfato de Manganês: 0,05 · Fosfato

Dipotássico: 2,00 pH FINAL: $6,5 \pm 0,2$) para *L. casei* e MRS acrescido de cloreto de L-cisteína 0,05% Merck® para *B. lactis*.

A ativação das linhagens (pré-inóculo) foi realizada em tubos de ensaio contendo 5 mL dos meios de cultivo próprios para cada linhagem, inoculados com duas alçadas de células das linhagens bacterianas obtidas no pré-inóculo e incubados a 37°C, por 24h em microaerofilia (Microaerobac, marca Probac®.) para *L. casei* e 72h em anaerobiose (Anaerobac, marca Probac®) para *B. lactis*.

Os ensaios descritos a seguir foram conduzidos utilizando 0,5ml da suspensão de células ativadas contidas no pré-inóculo em 2,5ml do meio de cultivo próprio para cada micro-organismo duas vezes concentrado, acrescido de 2,5ml das substâncias a serem avaliadas, previamente autoclavados por 20 minutos à 120°C.

- basidiomas de *A. blazei* desidratados e moídos (**Ab**);
- basidiomas de *P. ostreatus* desidratados e moídos (**Po**);
- polissacarídeos extraídos dos basidiomas de *A. blazei* por extração aquosa a quente (**PAb**);
- polissacarídeos extraídos dos basidiomas de *P. ostreatus* por extração aquosa a quente (**PPo**).

As concentrações finais das substâncias teste (T) foram de 0,5; 1 e 2 g/L. Nas mesmas condições foram preparados: 1) tubos contendo 5mL dos meios de cultivo próprios para cada micro-organismo, inoculados com as linhagens bacterianas, para controle dos testes (CB); 2) tubos contendo 2,5mL dos meios de cultivo próprios para cada micro-organismo, duas vezes concentrado, acrescido de 2,5ml das substâncias a serem avaliadas, para controle da interferência da turvação do meio conferida pela adição das substâncias(CC). O crescimento celular foi avaliado pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro Bioespectro SP-22em, a 690 nm. O efeito sobre o crescimento dos micro-organismos foi verificado quando os valores de absorbância (ABS) dos tubos contendo as substâncias avaliadas se apresentaram estatisticamente diferentes dos valores de absorbância dos controles. Os experimentos foram realizados em quintuplicata e os resultados

expressos em percentual de ativação/inibição do crescimento em relação aos controles de acordo com a equação 1.

$$\frac{ABS_T * 100}{(ABS_{CB} + ABS_{CC})} \quad \text{Equação 1}$$

na qual:

ABS_T é a absorbância dos meios contendo a substância a ser avaliada após o cultivo;

ABS_{CB} é a absorbância dos tubos contendo o controle da bactéria;

ABS_{CC} é a absorbância dos meios contendo só a substância a ser avaliada, antes do cultivo, para eliminação da interferência da cor da substância.

4.4 Avaliação do efeito do basidioma desidratado e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre a microbiota intestinal de camundongos

4.4.1 Animais e dieta

Camundongos “Swiss” machos pesando entre 30 a 35g, obtidos do Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), foram mantidos em caixas com cama de serragem, em grupos de seis animais, à temperatura de $22^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Depois de uma semana de aclimação, os camundongos foram pesados e randomicamente divididos em grupos, de acordo com o experimento. Todos os grupos foram alimentados com ração comercial para camundongos Nuvilab CR1 (composição: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos) e água *ad libitum*. O grupo controle recebeu dieta composta de Carboximetilcelulose (CMC) à 0,5%. Os demais grupos receberam as soluções das substâncias avaliadas suspensas em CMC, administradas por gavagem, nas dosagens definidas de acordo com o experimento (Tabela 1). Os camundongos receberam a dieta uma vez ao dia durante 14 dias.

Um dia após a última administração, os animais foram eutanizados através de anestesia com pentobarbital em dose letal (60mg/Kg, via intraperitoneal) e um fragmento de aproximadamente 3 cm do ceco dos animais foi extraído e mantido congelado, em tubos esterilizados a -70°C para posterior análise bacteriológica do conteúdo cecal, conforme metodologia adaptada de Li et al. (2008).

O procedimento descrito acima teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Univille (Anexo 1).

Tabela 1. Distribuição dos animais de acordo com as concentrações e as substâncias avaliadas

SUBSTÂNCIA	DOSE	NÚMERO DE ANIMAIS
Controle – CMC 0,5%	0,1 mL/10 g	4
Ab	1 mg/Kg	6
Ab	10 mg/Kg	6
Ab	30 mg/Kg	6
PAb	1 mg/Kg	6
PAb	10 mg/Kg	6
PAb	30 mg/Kg	6
Po	1 mg/Kg	6
Po	10 mg/Kg	6
Po	30 mg/Kg	6
PPo	1 mg/Kg	6
PPo	10 mg/Kg	6
PPo	30 mg/Kg	6
TOTAL: 76 animais		

Fonte: O autor, 2012

4.4.2 Análise bacteriológica do conteúdo cecal

O efeito do basidioma e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre a microbiota intestinal dos camundongos foi avaliado por meio do crescimento das seguintes bactérias: *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. O meio utilizado para detecção das bifidobactérias do conteúdo cecal foi o meio formulado segundo o meio de cultivo Bifidobacterium Agar, Modified® (BFM), contendo Columbia Agar base, glicose, lactulose, cloreto de cisteína, riboflavina, ácido propiônico, ágar e água deionizada. Para a contagem de

lactobacilos foi utilizado o meio de cultivo Lactobacillus Selection Agar (LBS) BD® (caseína pancreática; hidrato de acetato de sódio; extrato de levedura; ácido acético; di-hidrogenofosfato de potássio; sulfato de magnésio; citrato de amônio; sulfato de manganês; glicose; sulfato ferroso; polissorbato e agar) adicionado de ácido acético glacial e água deionizada. O crescimento dos micro-organismos foi detectado pelo método da contagem em placas. O conteúdo cecal (0,1g) foi descongelado e imediatamente adicionado a 2 mL de uma solução salina com cloreto de sódio 85%, cisteína a 5% e água deionizada, a partir da qual foram feitas várias diluições. 25 µL de cada diluição foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo os respectivos meios de cultivo. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas. As placas inoculadas com lactobacilos e bifidobactérias foram incubadas a 37°C por 48 horas em microaerofilia (Microaerobac, marca Probac®.) e 72h em anaerobiose (Anaerobac, marca Probac®) respectivamente. Após o tempo de incubação, as colônias bacterianas em cada placa foram contadas com auxílio de um contador de colônias modelo CP600, marca PHOENIX® e o resultado reportado como unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g) conforme metodologia adaptada de Li et al. (2008). Os experimentos para cada ceco foram realizados em triplicata.

4.5 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste Q de Dixon (r10) com intervalo de confiança de 95%, para determinação de valores desviantes em relação à média (RORABACHER, 1991). O teste ANOVA fator único (teste F) foi utilizado para determinação de diferenças significativas entre os grupos, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do efeito do basidioma e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre o crescimento de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium lactis in vitro*.

O efeito do basidioma de *A.blazei* (Ab), dos polissacarídeos extraídos do basidioma de *A.blazei* (PAb), do basidioma de *P. ostreatus* (Po) e dos polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) sobre os micro-organismos avaliados foi verificado quando os valores de absorvância (ABS) dos tubos contendo as substâncias testadas se apresentaram estatisticamente diferentes dos valores de absorvância dos controles.

Os resultados das absorvâncias obtidas com o crescimento de *Lactobacillus casei* nos meios de cultivo na ausência e na presença das substâncias avaliadas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Absorvâncias obtidas com o crescimento de *Lactobacillus casei* nos meios de cultivo na ausência (controle) e na presença das substâncias Ab, PAb, Po e PPo nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l. Os valores representam a média de quintuplicatas $\pm$ o erro padrão.

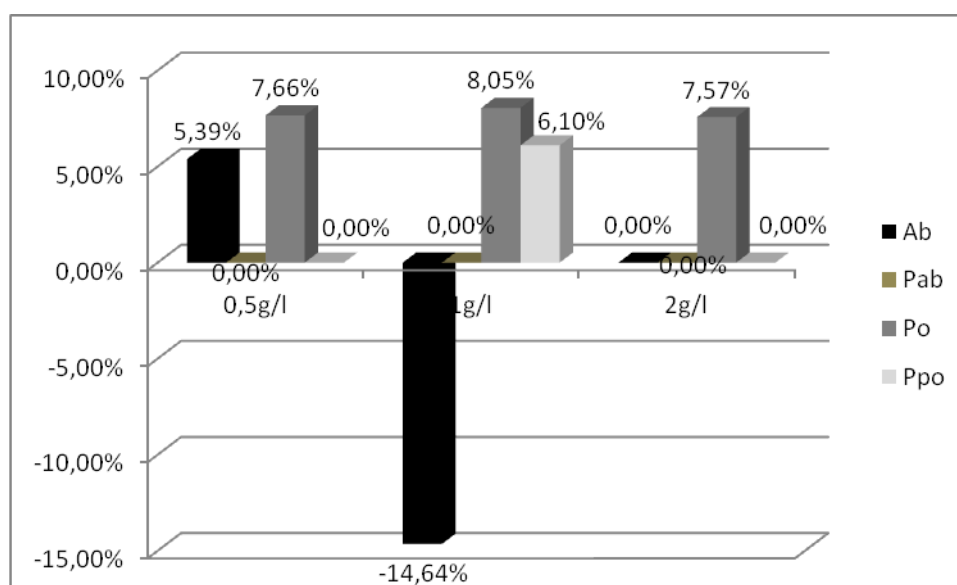
ABS (690 nm)			
Substância	0,5g/l	1,0g/l	2,0g/l
CAb	4,60 $\pm$ 0,11 ^a	4,31 $\pm$ 0,09 ^g	4,15 $\pm$ 0,07 ⁿ
Ab	4,85 $\pm$ 0,03 ^b	3,68 $\pm$ 0,17 ^h	3,83 $\pm$ 0,30 ⁿ
CPAb	4,52 $\pm$ 0,11 ^c	4,11 $\pm$ 0,09 ⁱ	3,82 $\pm$ 0,07 ^o
PAb	4,72 $\pm$ 0,17 ^c	4,18 $\pm$ 0,20 ⁱ	3,78 $\pm$ 0,35 ^o
CPo	4,60 $\pm$ 0,11 ^d	4,19 $\pm$ 0,09 ^j	4,03 $\pm$ 0,07 ^p
Po	4,95 $\pm$ 0,09 ^e	4,53 $\pm$ 0,11 ^k	4,34 $\pm$ 0,12 ^q
CPPo	4,58 $\pm$ 0,11 ^f	4,10 $\pm$ 0,09 ^l	3,80 $\pm$ 0,07 ^r
PPo	4,66 $\pm$ 0,12 ^f	4,35 $\pm$ 0,19 ^m	4,08 $\pm$ 0,33 ^r

*CAb= Controle basidioma de *A.blazei* (Ab); CPAb= Controle polissacarídeos extraídos do basidioma de *A.blazei* (PAb); CPo= Controle basidioma de *P. ostreatus* (Po) e CPPo= Controle polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo). Letras iguais entre o controle e sua respectiva substância representam valores sem

diferença significativa, para cada concentração testada. Não há diferença significativa entre as diferentes concentrações.

Os resultados estatisticamente significativos do efeito (percentual de ativação/inibição) das substâncias avaliadas nas concentrações de 0,5g/l, 1,0g/l e 2,0g/l sobre o crescimento celular de *Lactobacillus casei* estão apresentados na figura 5.

Figura 5: Percentual de ativação/inibição do crescimento celular de *Lactobacillus casei* pelas substâncias Ab, PAb, Po e Ppo nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l.



De acordo com o teste estatístico Anova, quando as substâncias avaliadas foram utilizadas na concentração de 0,5g/l, houve diferença significativa positiva ($p < 0,05$) no crescimento de *Lactobacillus casei* cultivado em meio contendo **Ab** e **Po** em relação ao crescimento no meio controle. Os resultados positivos apontam para percentuais de ativação do crescimento de *L. casei*, ainda que em baixos valores (7,66% para Po e 5,39% para Ab). Já os polissacarídeos extraídos dos respectivos fungos, **PAb** e **PPo**, não apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p > 0,05$) sobre o crescimento de *L. casei* quando utilizados nessa concentração.

Quando as substâncias avaliadas foram utilizadas na concentração final de 1,0g/l observa-se que houve diferença significativa positiva ($p < 0,05$) entre as absorbâncias obtidas no cultivo controle e nos cultivos contendo **Po** e **PPo**

indicando a ativação no crescimento de *L. casei* de 8,05% e 6,10%, respectivamente. Os polissacarídeos extraídos de *A. blazei* (**PAb**) não apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p>0,05$) sobre o crescimento de *L. casei* enquanto **Ab** inibiu o crescimento da bactéria em 14,64%.

Quando as substâncias avaliadas foram utilizadas na concentração final de 2,0g/l observou-se que apenas **Po** teve efeito sobre o crescimento de *L. casei*, proporcionando uma ativação de 7,57%. As demais substâncias testadas não apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o crescimento bacteriano ($p>0,05$).

De um modo geral, **Po** ativa o crescimento de *L. casei*, independentemente da concentração, considerando-se a faixa testada. O uso de 0,5 g/l de **Ab** proporciona a ativação do crescimento de *L. casei*, mas o aumento da concentração para 1g/l causa a inibição do crescimento do micro-organismo, o que não se repete quando a concentração é aumentada para 2g/l. Dos polissacarídeos extraídos, apenas **PPo** parece ter efeito sobre o crescimento de *L. casei*, na concentração de 1g/l. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com as três concentrações de **Po** avaliadas, não caracterizando dose dependência.

Os resultados das absorbâncias obtidas com o crescimento de *Bifidobacterium lactis* nos meios de cultivo na ausência e na presença das substâncias avaliadas estão apresentados na tabela 3.

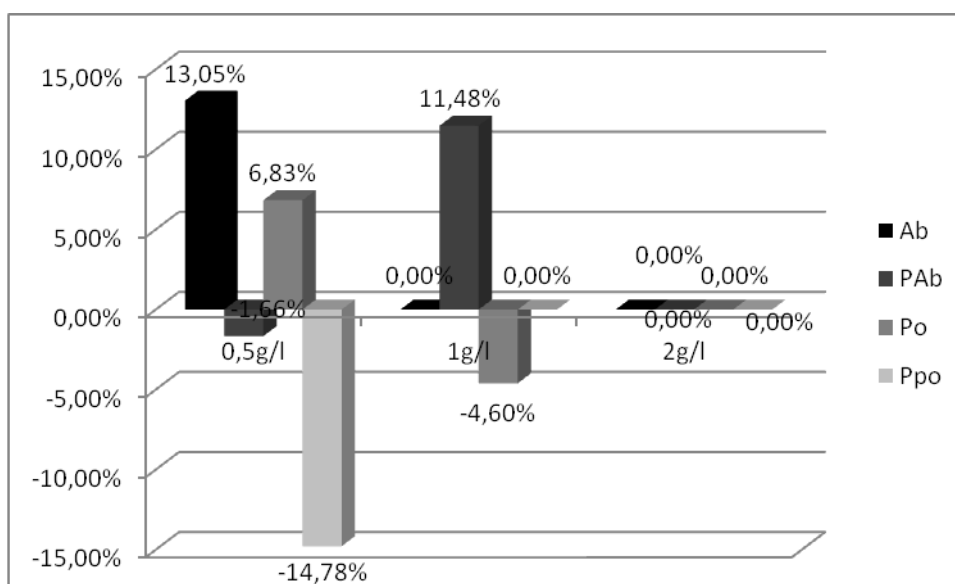
Tabela 3: Absorbâncias obtidas com o crescimento de *Bifidobacterium lactis* nos meios de cultivo na ausência (controle) e na presença das substâncias Ab, PAb, Po e PPo nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0g/l. Os valores representam a média de quintuplicatas $\pm$ o erro padrão.

ABS (690 nm)			
Substância	0,5g/l	1,0g/l	2,0g/l
CAb	3,00 $\pm$ 0,05 ^a	3,53 $\pm$ 0,09 ⁱ	3,73 $\pm$ 0,13 ^o
Ab	3,39 $\pm$ 0,14 ^b	3,65 $\pm$ 0,26 ⁱ	3,55 $\pm$ 0,12 ^o
CPAb	2,91 $\pm$ 0,05 ^c	3,37 $\pm$ 0,09 ^j	3,40 $\pm$ 0,13 ^p
PAb	2,86 $\pm$ 0,30 ^d	3,76 $\pm$ 0,57 ^k	3,76 $\pm$ 0,46 ^p
CPo	2,98 $\pm$ 0,05 ^e	3,47 $\pm$ 0,09 ^l	3,60 $\pm$ 0,13 ^q
Po	3,19 $\pm$ 0,16 ^f	3,31 $\pm$ 0,39 ^m	3,55 $\pm$ 0,24 ^q
CPPo	2,92 $\pm$ 0,05 ^g	3,34 $\pm$ 0,09 ⁿ	3,36 $\pm$ 0,13 ^r
PPo	2,48 $\pm$ 0,15 ^h	3,19 $\pm$ 0,18 ⁿ	3,58 $\pm$ 0,16 ^r

*CAb= Controle basidioma de *A. blazei* (Ab); CPAb= Controle polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb); CPo= Controle basidioma de *P. ostreatus* (Po) e CPPo= Controle polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo). Letras iguais entre o controle e sua respectiva substância representam valores sem diferença significativa, para cada concentração testada. Não há diferença significativa entre as diferentes concentrações.

Os resultados significativos ($p < 0,05$) do efeito, percentual de ativação/inibição, das substâncias avaliadas nas concentrações de 0,5g/l, 1,0g/l e 2,0g/l sobre o crescimento celular de *Bifidobacterium lactis* estão apresentados na figura 6.

Figura 6: Percentual de ativação/inibição do crescimento celular de *Bifidobacterium lactis* pelas substâncias Ab, PAb, Po e PPO, nas concentrações de 0,5; 1,0 /l e 2,0g/l



Quando utilizados na concentração final de 0,5g/l, observou-se que **Ab** e **Po** proporcionaram ativação do crescimento celular de *B. lactis* da ordem de 13,05% e 6,83%, respectivamente. Já os polissacarídeos de *P. ostreatus* (**PPO**) e *A. blazei* (**PAb**) apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de *B. lactis* da ordem de 14,78% e 1,66%, respectivamente.

Os polissacarídeos extraídos de *A. blazei* (**PAb**) utilizados na concentração de 1g/l ativaram o crescimento celular de *B. lactis* em 11,48% enquanto que a mesma concentração de *P. ostreatus* (**Po**) inibiu o crescimento celular em 4,60%. Na concentração de 2g/l, nenhuma das substâncias testadas apresentou efeito significativo ($p>0,05$) sobre o crescimento de *B. lactis*.

Ab e **PPO** só causaram efeito sobre o crescimento de *B. lactis* (ativação e inibição, respectivamente) na concentração de 0,5g/l. Os efeitos foram eliminados com o aumento da concentração para 1 e 2g/l. **Po** e **PAb** reverteram seus efeitos (ativação para inibição e inibição para ativação, respectivamente) com o aumento da concentração de 0,5 para 1g/l. O aumento da concentração para 2g/l não proporcionou efeito em nenhuma das concentrações, independente da substância utilizada.

A reversão dos efeitos de inibição para ativação do crescimento ou ativação para inibição pode ser explicada pelo fato de não se estar trabalhando com

substâncias puras, cuja composição pode ser formada por inibidores e ativadores cujos efeitos são dose dependentes. Assim, por exemplo, em uma baixa concentração, o efeito inibitório de uma determinada substância presente no basidioma ou nos polissacarídeos extraídos do basidioma poderia ser observado, mas, aumentando-se a concentração, outra substância com potencial ativador poderia apresentar seus efeitos, eliminando o efeito inibitório da primeira.

Em trabalho realizado por Kontula et al. (1998), os efeitos de farelo de aveia fermentado por *Lactobacillus*-GG sobre a atividade da microbiota intestinal, e a ação estimuladora/inibidora do sobrenadante do farelo de aveia sobre o crescimento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), e *Bifidobacterium lactis* subsp. *lactis* foram avaliados através de um método *in vitro*. Os autores utilizaram um meio contendo 2,7g (30%) e 5,6g (60%) de farelo de aveia, adicionados de 10 ml de fermentado de *Lactobacillus rhamnosus* (10×10^8 UFC). Os experimentos mostraram que o crescimento de *Lactobacillus* GG foi estimulado pela dosagem de 2,7g (30%) de farelo de aveia, mas ligeiramente inibido por 5,6g (60%) de farelo de aveia e pelo sobrenadante de farelo de aveia fermentada. Possivelmente, a quantidade de 30% do farelo de aveia aumenta a produção de estimulantes de *Lactobacillus* GG, enquanto a alimentação de 60% de farelo de aveia pode aumentar a quantidade de metabolitos bacterianos inibidores de *Lactobacillus* GG. O farelo de aveia também favoreceu o crescimento de bifidobactérias, isso provavelmente ocorre devido à presença de alguns fatores bifidogênicos do farelo. Embora os autores não relatem quais os estimuladores ou inibidores de *Lactobacillus* GG e nem os fatores bifidogênicos presentes no farelo de aveia, sabe-se que este cereal contém beta-glucanos (ANDERSSON e BÖRJESDOTTER, 2011) semelhantes àqueles encontrados na parede celular de basidiomicetos.

Su et al. (2007) avaliaram o efeito da adição de 1,5% de onze diferentes carboidratos comerciais compostos de fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, arabinogalactana, oligossacarídeos de soja (SOS), beta-glucanos (hidrolisado de cevada e concentrado), rafinose e glicose (controle positivo) ao meio de cultivo das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (L10),

Bifidobacterium animalis lactis (B94) e *Lactobacillus casei* (L26). Os autores relatam que B94 alcançou moderado crescimento em relação ao controle (DO = 1,5) quando beta-glucano foi utilizado. L26 teve um baixo crescimento (DO=1,0) quando o concentrado de beta-glucana foi utilizado, justificado pela baixa solubilidade desse composto no meio de cultivo.

Synytsya et al. (2009) avaliaram o efeito prebiótico de frações solúveis em água (L1) e em álcali (L2) contendo polissacarídeos, principalmente β -glucanas e α -glucanas, extraídos de *Pleurotus ostreatus* e de *Pleurotus eryngii* sobre nove linhagens diferentes de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*. Os resultados mostraram que, na maioria dos casos, os extratos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* proporcionam crescimento bacteriano de *Lactobacillus*, sendo que a máxima ativação foi de aproximadamente 70% com uso de L1 de *P. ostreatus*. Duas cepas de *Bifidobacterium* tiveram seu crescimento estimulado com ambos os extratos, com crescimento maior para L1 de *P. eryngii* em torno de 60%, e uma cepa teve seu crescimento ligeiramente inibido com maior concentração dos extratos, cerca de 85% com a utilização de L1 de *P. ostreatus*. Os autores concluem que estes probióticos apresentam características diferentes de crescimento dependendo do extrato utilizado e da especificidade de cada cepa, devido à presença de compostos estruturalmente diversos.

De acordo com os resultados *in vitro* deste trabalho bem como os de outros autores mencionados na discussão verifica-se que as bactérias avaliadas (*L. casei* e *B. lactis*) apresentaram comportamentos diferentes de crescimento na presença das substâncias avaliadas. Sendo assim, os basidiomas de *A. blazei* e *P. ostreatus* e seus polissacarídeos podem ter função tanto prebiótica como antimicrobiana, dependendo da dosagem, da cepa probiótica selecionada e do meio de cultivo (substrato) onde os corpos frutíferos foram cultivados.

5.2 Avaliação do efeito do basidioma e dos polissacarídeos obtidos do basidioma sobre o crescimento de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp *in vivo*.

O efeito do basidioma de *A.blazei* (Ab), dos polissacarídeos extraídos do basidioma de *A.blazei* (PAb), sobre os microrganismos avaliados foi verificado quando os valores de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) das substâncias testadas se apresentaram estatisticamente diferentes dos valores de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos controles.

Os resultados do efeito de Ab e PAb nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg sobre o crescimento celular de *Lactobacillus* spp estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Crescimento celular de *Lactobacillus* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de *A. blazei* (Ab) e polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão

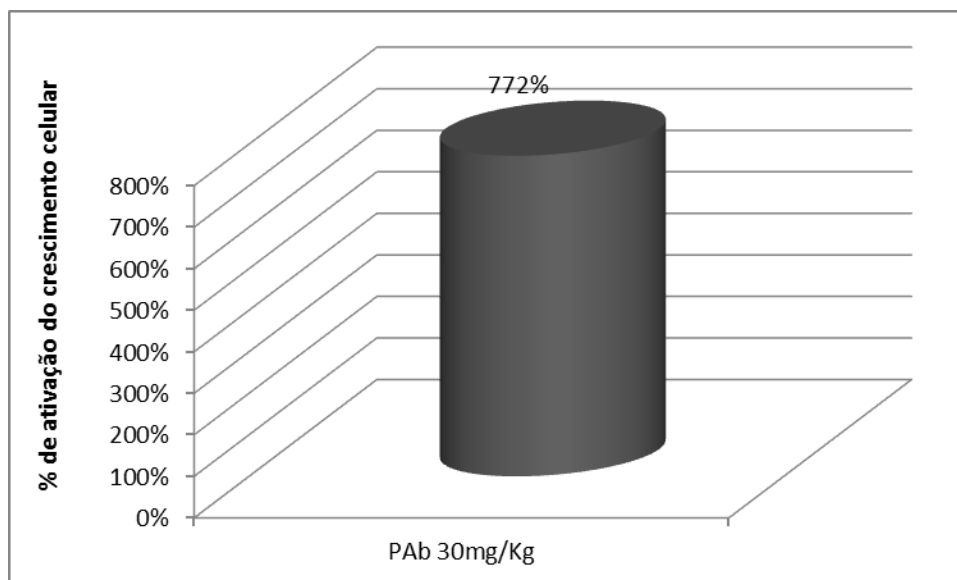
SUBSTÂNCIAS	UFC/g de fezes		
	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg	30,0 mg/kg
Controle	41,2 $\pm$ 18,4 ^a	41,2 $\pm$ 18,4 ^b	41,2 $\pm$ 18,4 ^c
Ab	105,3 $\pm$ 59,6 ^a	109,1 $\pm$ 47,4 ^b	4,3 $\pm$ 0,8 ^c
PAb	13,6 $\pm$ 4,2 ^a	207 $\pm$ 100 ^b	359,3 $\pm$ 80,0 ^d

Letras iguais entre o controle e sua respectiva substância representam valores sem diferença significativa, para cada concentração testada. Não há diferença significativa entre as diferentes concentrações.

De acordo com o teste estatístico Anova, os resultados positivos ($p < 0,05$) apontam para a ativação do crescimento de lactobacilos na concentração de 30mg/kg (772%). As demais dosagens, tanto de Ab quanto de PAb não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre o crescimento de *Lactobacillus* spp.

A figura 7 apresenta o efeito (percentual de ativação) da substância avaliada na concentração de 30mg/kg para PAb sobre o crescimento celular de *Lactobacillus* spp.

Figura 7: Percentual de ativação do crescimento celular de *Lactobacillus* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb) na concentração de 30mg/kg.



Os resultados mostram que as doses mais baixas de PAb (1 e 10 mg/kg) não foram suficientes para causar um efeito significativo sobre a microbiota intestinal dos camundongos. Avaliando a ausência de efeito de Ab (basidioma de *A. blazei*) e considerando o rendimento de 0,06g de açúcar redutor por grama de corpo frutífero (dados não apresentados) é possível concluir que as concentrações testadas desta substância não continham polissacarídeos em quantidade suficiente para causar efeito de inibição ou ativação da microbiota.

O efeito de Ab e PAb nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg sobre o crescimento celular de *Bifidobacterium* spp estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Crescimento celular de *Bifidobacterium* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de *A. blazei* (Ab) e polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão

SUBSTÂNCIAS	UFC/g de fezes		
	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg	30,0 mg/kg
Controle	5,16 $\pm$ 3,2 ^a	5,16 $\pm$ 3,2 ^b	5,16 $\pm$ 3,2 ^c
Ab	14,4 $\pm$ 8,4 ^a	42,4 $\pm$ 13,0 ^b	13,6 $\pm$ 6,8 ^c
PAb	62,8 $\pm$ 52,6 ^a	173,6 $\pm$ 126,4 ^b	24,2 $\pm$ 13,8 ^c

Letras iguais entre o controle e sua respectiva substância representam valores sem diferença significativa, para cada concentração testada. Não há diferença significativa entre as diferentes concentrações.

De acordo com o teste estatístico Anova, nenhuma das dosagens, tanto de Ab quanto de PAb apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre o crescimento de *Bifidobacterium* spp.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, observa-se crescimento bacteriano significativo somente para *Lactobacillus* spp quando PAb é utilizado em sua maior dose, entretanto, alguns autores reportam a atividade prebiótica do gênero *Agaricus* em estudo *in vivo* tanto para lactobacilos quanto para bifidobactérias.

Giannenas et al. (2010) avaliaram a morfologia e a população de bactérias intestinais em aves alimentadas por seis semanas com diferentes quantidades do cogumelo *Agaricus bisporus*. Os resultados mostraram que a dieta a base de cogumelos não afetou significativamente a morfologia intestinal e, em geral, aumentou a população de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp em relação à dieta controle (sem cogumelos), sugerindo um efeito benéfico de *Agaricus bisporus* sobre a saúde intestinal de frangos de granja.

Em outro estudo, Giannenas et al. (2011) concluíram que a dieta com *Agaricus bisporus* causou aumento das bactérias benéficas da microbiota intestinal - *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp. A dose de inclusão na dieta foi de 0; 10 ou 20 g/kg do cogumelo seco, e foi consumida como parte da alimentação habitual dos animais. Verificou-se que a suplementação dietética com *A. bisporus* em dose de 20g/kg aumentaram o número de *Lactobacillus*

spp do íleo e *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp no ceco. Destaca-se que a dose utilizada por este autor foi extremamente superior a dose utilizada nesse trabalho.

Os resultados do efeito de Po e PPO nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg sobre o crescimento celular de *Lactobacillus* spp estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Crescimento celular de *Lactobacillus* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de *P. ostreatus* (Po) e polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPO) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão

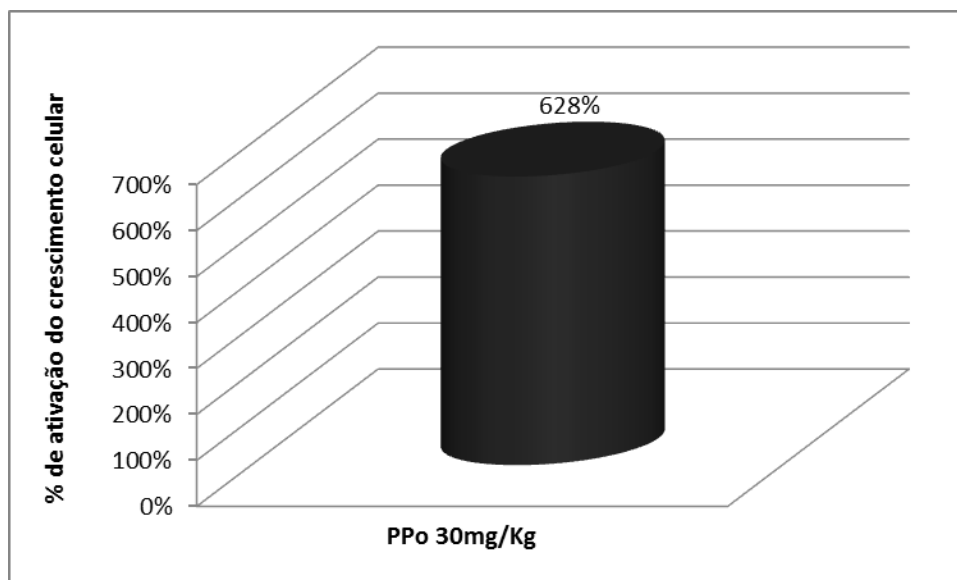
SUBSTÂNCIAS	UFC/g de fezes		
	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg	30,0 mg/kg
Controle	41,2 $\pm$ 18,4 ^a	41,2 $\pm$ 18,4 ^b	41,2 $\pm$ 18,4 ^c
Po	18,7 $\pm$ 12,0 ^a	214,6 $\pm$ 91,3 ^b	184 $\pm$ 119,9 ^c
PPO	68,2 $\pm$ 31,2 ^a	326,1 $\pm$ 148,7 ^b	300 $\pm$ 27,0 ^d

Letras iguais entre o controle e sua respectiva substância representam valores sem diferença significativa, para cada concentração testada. Não há diferença significativa entre as diferentes concentrações.

De acordo com o teste estatístico Anova, os resultados positivos ($p < 0,05$) apontam para ativação do crescimento de *Lactobacillus* spp pela substância PPO na concentração de 30mg/kg (628%). As demais dosagens, tanto de Po quanto de PPO não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre o crescimento de *Lactobacillus* spp.

A figura 8 apresenta o efeito (percentual de ativação) da substância avaliada na concentração de 30mg/kg para PPO sobre o crescimento celular de *Lactobacillus* spp.

Figura 8: Percentual de ativação do crescimento celular de *Lactobacillus* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) na concentração de 30mg/kg



Os resultados do efeito de Po e PPo nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg sobre o crescimento celular de *Bifidobacterium* spp estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Crescimento celular de *Bifidobacterium* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com basidiomas desidratados de *P. ostreatus* (Po) e polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) nas concentrações de 1,0 mg/kg; 10 mg/kg e 30mg/kg. Os valores representam a média de triplicatas $\pm$ o erro padrão.

SUBSTÂNCIAS	UFC/g de fezes		
	1,0 mg/kg	10,0 mg/kg	30,0 mg/kg
Controle	5,16 $\pm$ 3,24 ^a	5,16 $\pm$ 3,24 ^b	5,16 $\pm$ 3,24 ^d
Po	9,5 $\pm$ 4,8 ^a	302 $\pm$ 216,5 ^b	276,2 $\pm$ 232,9 ^d
PPo	24,9 $\pm$ 18,8 ^a	24,7 $\pm$ 1,22 ^c	35,4 $\pm$ 12,2 ^d

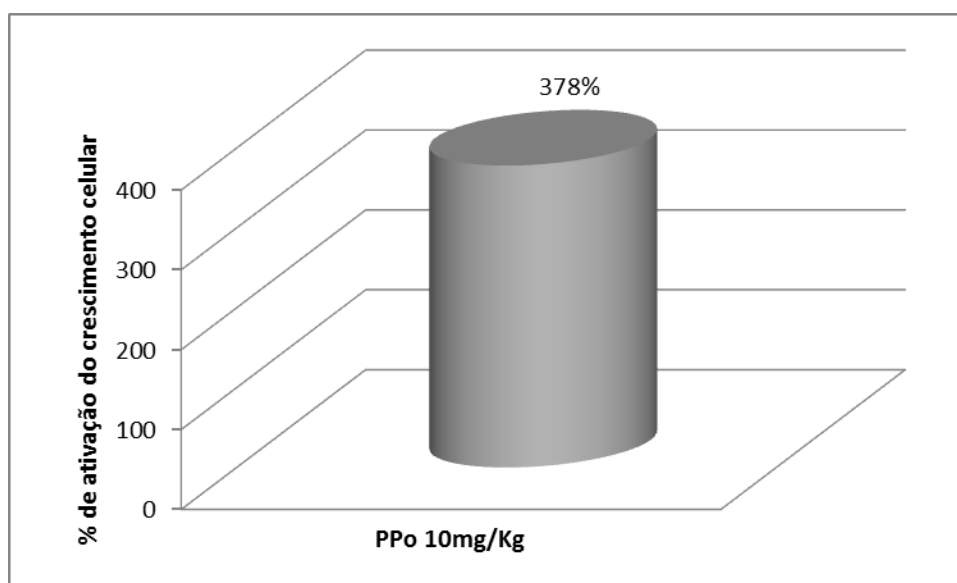
Letras iguais entre o controle e sua respectiva substância representam valores sem diferença significativa, para cada concentração testada. Não há diferença significativa entre as diferentes concentrações.

De acordo com o teste estatístico Anova, os resultados positivos ($p < 0,05$) apontam para a ativação do crescimento de *Bifidobacterium* spp (378%) somente na concentração da substância PPo de 10mg/kg. As demais

dosagens, tanto de Po quanto de PPo não apresentaram efeitos significativos ($p>0,05$) sobre o crescimento de *Bifidobacterium* spp.

A figura 9 apresenta o efeito (percentual de ativação) das substâncias avaliadas na concentração de 10mg/kg para PPo sobre o crescimento celular de *B. lactis*.

Figura 9: Percentual de ativação do crescimento celular de *Bifidobacterium* spp presentes na microbiota intestinal de camundongos alimentados com polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) na concentração de 10mg/kg



Considerando os efeitos obtidos, observa-se que somente polissacarídeos extraídos da biomassa de *P. ostreatus* (PPo) em dosagens a partir de 10 mg/kg foram capazes de promover o crescimento de bactérias probióticas na microbiota intestinal dos camundongos. Observa-se, portanto que o potencial prebiótico de *P. ostreatus* se dá devido à presença dos polissacarídeos.

Yang et al. (2008) demonstraram os efeitos de mananoligossacarídeos (MOS) sobre o crescimento, digestibilidade de nutrientes e microbiota intestinal de aves receberam uma dieta baseada em sorgo de trigo. Dois níveis de MOS (1 e 2 g/kg) foram incluídos na dieta e uma redução na população de *Lactobacillus* spp e coliformes no íleo e ceco foi observada. A adição de MOS tende a reduzir a carga de coliformes e lactobacilos na mucosa do intestino. Os resultados dos pesquisadores são contrários aos encontrados nessa pesquisa,

onde tanto *Lactobacillus* spp quanto *Bifidobacterium* spp foram estimulados na presença de polissacarídeos de *P. ostreatus*.

Assim como no presente estudo, outros pesquisadores relataram o crescimento de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp em animais suplementados com diferentes polissacarídeos. De acordo com Gibson (2005), devido à sua estrutura química, oligossacarídeos são substratos que só podem ser consumidos por um número limitado de bactérias, estimulando assim, o seu crescimento, e, entre o grupo de bactérias presentes no trato gastrointestinal, as bifidobactérias e os lactobacilos são os que utilizam a maioria dos oligossacarídeos capazes de afetar benéficamente a saúde do hospedeiro.

As respostas biológicas na nutrição animal, quanto à utilização de substâncias prebióticas, nem sempre são comprovadas, e isso pode estar relacionado com a composição química de outros ingredientes da dieta, com a dosagem adicionada, com a adaptação e a seletividade da microbiota ao prebiótico, e também, ao nível de estresse do animal (SILVA e NORNBERG, 2003).

A Tabela 8 apresenta uma visão geral dos resultados obtidos nesse trabalho com os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 8: Síntese dos resultados do efeito de ativação/inibição das substâncias testadas nesse trabalho sobre o crescimento de *Lactobacilos* e *Bifidobactérias* obtidos nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

<i>In vivo</i>												
<i>Lactobacillus</i> spp												
Substância	Po	Po	Po	PPo	PPo	PPo	Ab	Ab	Ab	PAb	PAb	PAb
Concentração (mg/kg)	1	10	30	1	10	30	1	10	30	1	10	30
%ativação/inibição	-	-	-	-	-	628	-	-	-	-	-	772
<i>In vitro</i>												
<i>Lactobacillus casei</i>												
Substância	Po	Po	Po	PPo	PPo	PPo	Ab	Ab	Ab	PAb	PAb	PAb
Concentração g/l	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
%ativação/inibição	7,66	8,05	7,57	-	6,10	-	5,39	-14,64	-	-	-	-
<i>In vivo</i>												
<i>Bifidobacterium</i> spp												
Substância	Po	Po	Po	PPo	PPo	PPo	Ab	Ab	Ab	PAb	PAb	PAb
Concentração (mg/kg)	1	10	30	1	10	30	1	10	30	1	10	30
%ativação/inibição	-	-	-	-	378%	-	-	-	-	-	-	-
<i>In vitro</i>												
<i>Bifidobacterium lactis</i>												
Substância	Po	Po	Po	PPo	PPo	PPo	Ab	Ab	Ab	PAb	PAb	PAb
Concentração g/l	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
%ativação/inibição	6,83	-4,60	-	-14,78	-	-	13,05	-	-	-1,66	11,48	-

Embora os basidiomas desidratados de *P. ostreatus* (Po) tenham produzido um aumento no crescimento (em média 7,76%) de *L. casei in vitro*, nenhum estímulo do crescimento de *Lactobacillus* spp presentes na microbiota de camundongos foi percebido. Apesar das bactérias do gênero *Lactobacillus* presentes na microbiota intestinal de camundongos tenham tido seu crescimento estimulado (628%) na maior dosagem dos polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) avaliada (30 mg/kg), *L. casei* teve o seu crescimento estimulado (6,10%) na presença dessa substância *in vitro*.

Os basidiomas de *A. blazei* (Ab) não apresentaram nenhum efeito sobre *Lactobacillus* spp presentes na microbiota de camundongos. No entanto, esta substância mostrou-se bioativa estimulando o crescimento de *L. casei in vitro* (5,39%) quando 0,5 g/l foi utilizado e inibindo o crescimento desse micro-organismo (14,64%) quando 1 g/l foi utilizado.

Os polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb) mostraram atividade biológica estimulando em 772% o crescimento dos *Lactobacillus* spp da microbiota dos camundongos. No entanto, nenhum efeito foi percebido quando essa substância foi utilizada no cultivo de *L. casei in vitro*.

O basidioma desidratado de *P. ostreatus* (Po) ativou o crescimento de *B.lactis in vitro* (6,83%) na concentração de 0,5 g/l. No entanto, o aumento da concentração para 1 g/l proporcionou inibição (4,60%) do crescimento deste micro-organismo. Nenhuma atividade significativa desta substância foi observada nos experimentos *in vivo*.

Embora os polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) tenham estimulado em 378% o crescimento de *Bifidobacterium* spp da microbiota de camundongos, o mesmo inibiu o crescimento de *B. lactis* (14,78%) quando testado na concentração 0,5 g/l *in vitro*. Os basidiomas de *A. blazei* (Ab) apresentaram efeito sobre o crescimento de *B. lactis* somente nos testes *in vitro* (13,05%), na concentração de 0,5 g/l. Os polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb) proporcionaram pequena inibição do crescimento de *B. lactis in vitro* com 0,5 g/l, e estimularam o crescimento deste micro-organismo em 11,48% quando a concentração aumentou para 1 g/l. Entretanto, nenhum efeito foi observado nos testes *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

A partir dos testes *in vitro*, sugere-se que polissacarídeos do basidioma de *P. ostreatus* (PPo) apresentam potencial prebiótico e basidiomas de *P. ostreatus* (Po) podem atuar tanto como prebióticos e como antimicrobianos. O uso de basidiomas (Ab) e polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. blazei* (PAb) tem potencial tanto prebiótico como antimicrobiano quando avaliados nos testes *in vitro*.

Os resultados apontam para um possível potencial prebiótico de polissacarídeos extraídos dos basidiomas de *A. blazei*, bem como, demonstram potencial prebiótico de polissacarídeos extraídos do basidioma de *P. ostreatus* nos testes *in vivo*.

7. PERSPECTIVAS

- Ampliar a faixa de concentração das substâncias testadas *in vitro*;
- Aumentar a dosagem de administração das substâncias testadas *in vivo*;
- Caracterizar as substâncias bioativas encontradas nos extratos testados;
- Avaliar o efeito das substâncias testadas sobre outros micro-organismos da microbiota intestinal;
- Avaliar o efeito do micélio fúngico *in vitro* e *in vivo*.

REFERENCIAS

AIDA, F.M.N.A.; SHUHAIMI, M.; YAKID, M.; MAARUF, A.G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology** n.20, p. 567-575. 2009.

AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; KREISER, H.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of selected basidiomycetes from Yemen. **Pharmazie**. v.60, n.10, p.776-780, 2005.

ANDERSSON, A.A.M.; BÖRJESDOTTER, D. Effects of environment and variety on content and molecular weight of β -glucan in oats. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n.1, 122-128, 2011.

ANTUN, G.; ANTUN J.R.G.; ASSADI, T.C. Manual de Cultivo - *Agaricus blazei* Murill. **Apostila Técnica**, UNESP, 1999.

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L.M.; FERREIRA, I.C.F.R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.2742–47. 2008.

BELTRAN-GARCIA, M.J.; ESTARRON-ESPINOSA, M.; OGURA, T. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.10, p.4049-4052, 1997.

BERNARDI, E; DONINI, L.P.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. **Bragantia**, v.68, n.4. 2009.

BERNARDSHAW, S.; JOHNSON E.; HETLANDY, G. An Extract of the Mushroom *Agaricus blazei* Murill Administered Orally Protects Against Systemic

Streptococcus pneumoniae Infection in Mice. **Scandinavian Journal Immunology**, v.62, p.393–398. 2005.

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

BORSARINI, L. R. Disbiose intestinal - conheça as causas e os tratamentos. Disponível em: <http://www.profissionaisdasaude.com.br/article.php?article=104> Acesso em: 16/11/2010.

BORGES, G.M.; WISBECK, E. Aproveitamento de resíduos da cultura da banana para a produção de *Pleurotus ostreatus*, cogumelo comestível e medicinal. Disponível em: <http://www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/514a.pdf>. Acesso em: 30/03/2010.

BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M.S.C., MIUKI, C.J. Importância da microflora intestinal. Disponível em: <http://pediatriasaopaulo.usp.br/upload/html/1167/body/06.htm> Acesso em: 16/11/2010.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 mai. 1999.

BRUGGEMANN, R.; ORLANDI, J.M.; BENATI, F.J.; FACCIN, L.C.; MANTOVANI, M.S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiviral activity of *Agaricus blazei* Murrill ss. Hei nem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. **Brazil Journal of Microbiology**, v.37 n.4, São Paulo. 2006

BÚRIGO, T.; FAGUNDES, R.L.M.; TRINDADE, E.B.S.M.; VASCONCELOS, H.C.F.F. Efeito bifidogênico do fruto-oligossacarídeo na microbiota intestinal de

pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.5, p.491-497, set-out. 2007.

BURTON, K.S.; LOVE, M.E.; SMITH, J.F. Biochemical changes associated with mushroom quality in *Agaricus spp.* **Enzyme Microbiology Technology**, vol. 15, 1993.

CAMELINI, C.M.; MENDONÇA, M.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. B-Glucanas dos Cogumelos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 8, n.35. p.36-47. 2005.

CANDELA, M.; MACCAFERRI, S.; TURRONI, S.; CARVENALI, P.; BRIGIDI, P. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. **International Journal of Food Microbiology** v. 140, 2010.

CARNICER, R.T.; PIÑA, I.D.; MAYANS, E.R.; COMAS, R.B. Efecto de la ingesta de leche fermentada con *Lactobacillus casei* DN-114 001 sobre la flora intestinal. **Anais de Pediatria**, v.65 n.5 p.448-53, 2006.

CARVAJAL, A.E.S.S.; KOEHLEN, E.A.; SOARES, A.A.; ELER, G.J.; NAKASHIMA, A.T.A.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M.; Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. **Food Science and Technology**, v.46, n.2, p. 493-499, 2012.

CARVALHO, C., ALVES, N. C., MONTEIRO, A. C., PELÓGIA, N. C. C. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Agaricus blazei* Murill in rats submitted to the modified formalin test. **Revista Dor** v.12, n.1, p. 50-53, 2011.

CÉSAR, S.J.; SEZAR, S.; **Biologia**. 3.ed, São Paulo: Saraiva, 2003.

CHANG, S. T. Products of medicinal mushrooms as a good source of dietary supplements. Disponível em: <http://www.isms.biz>. Acesso em: 23/07/2011.

CHEN, A. Cultivation of *Agaricus blazei* Murrill, a mushroom of culinary and biomedical importance. **International Journal of Medicinal Mushroom**, v. 3, p. 128-135. 2001.

CHIANG, B.L.; SHEIH, Y.H.; WANG, L.H.; LIAO, C.K.; GILL, H.S. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimisation and definition of cellular immune responses. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.849–855. 2000.

COLLADO, M.C.; DONATT, E.; RIBES-KONICKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalances in faecal and duodenal *Bifidobacterium* species composition in active and non-active coeliac disease. **BMC Microbiology**, v.8, n.232. 2008.

COUTINHO, P.B.N.; FURLAN, S.A.; WISBECK, E.; GERN, R.M.M. Avaliação do potencial terapêutico de *Pleurotus ostreatus*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa**, v. 6, 2004.

CURVETTO, N.R.; FIGLAS, D.; DEVALIS, R.; DELMASTRO, S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄⁺ and/or Mn (II). **Bioresource Technology**, v.84, n.2, p.171-176. 2002.

DE BARBA, F.F.M.; et al. Influence of *Pleurotus djamor* Bioactive Substances on the Survival Time of Mice Inoculated with Sarcoma 180. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 478-484. 2011.

DELMANTO, R.D.; ALVES DE LIMA, P.L.; SUGUI, M.M; FERREIRA DA EIRA, A.; SALVADORI, D.M.F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R.; Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v.496, p.15–21. 2001.

DOGI, C.A. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. **Cytokine**, v.41, p.223–231. 2008.

ELLERTSEN, L.K; HETLAND, G.; JOHNSON, E.; GRINDE,B. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. **International Immunopharmacology**, v.6, p.133–143. 2006.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. **Universidade Federal Caxias do Sul/RS**. 2010.

FANG, E.F.; NG, T.B.; Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications Review Article Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - **Reviews on Cancer**, v.1815, n.1, p.65-74. 2011.

FIORI-TUTIDA, A.C.G.; et al.; Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f. sp. tritici, in vitro. **Summa phytopathology**, v.33, n.3, p. 287-289. 2007.

FORLAND, D.T.; JOHNSON, E.; TRYGGESTAD, A.M.A.; LYBERG, T.; HETLAND, G. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production in vitro. **Cytokine**, v.49, p.245–250, 2010.

FORTES, R.C.; RECÔVA, V.L.; MELO, A.L.; NOVAES, M.R.C.G. Alterações Gastrointestinais em Pacientes com Câncer Colorretal em Ensaio Clínico com Fungos *Agaricus sylvaticus*. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.30, n.1. 2010.

FORTUN-LAMOTHE, L; BOULLIER, S. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. **Livestock Science**, v.107, p.1–18. 2007.

FULLER, R . Probiotics in human medicine. **Gut**, v.32, p.439-442. 1991.

FURLANI, R.P.Z; GODOY, H.T.; Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, 2007.

GARCIA, I.; CISNEROS, F.; SEDRES, J.M.. Estudio de la actividad antimicrobiana en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* HB 184. **Alimentaria**, p-63-65. 1998.

GERASYMENYA, V.P; EFREMENKOVA, O.V.; KAMSOLKIVA, O.V.; BBOGUSH, T.A.; TOLSTYCH, I.V.; ZENKOVA, V.A. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kumm. Extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.2, 2002.

GERN, R.M.M. Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. **Tese (Doutorado em Engenharia Alimentos)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GIANNENAS, I.; TONTIS, D.; TSALIE, E.; CHRONIS, E.F.; DOUKAS, D.; KYRIAZAKIS, I. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 78–84. 2010.

GIANNENAS, I.; TSALIE, E.; CHRONIS, E.F.; MAVRIDIS, S.; TONTIS, D.; KYRIAZAKIS I. Consumption of *Agaricus bisporus* mushroom affects the performance, intestinal microbiota composition and morphology, and antioxidant status of turkey poults. **Animal Feed Science and Technology**, v. 165, n. 3–4, 2011.

GIBSON, G. R.; Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, n.1, 2004.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G. R., ROBERFROID, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics; **Jornal de Nutrição** v.125, p.1401-1412, 1995.

GONÇALVES, C.C.M.; PAIVA, P.C.A.; DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G.; HENRIQUE, F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.1, p. 220-225. 2010

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.360, p.512-518. 2003.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1. 1999.

GUTERREZ, Z.R.; MANTOVANI, M.S.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, R.L.; JORDÃO, B.Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.301–309. 2004.

GUTIÉRREZ, A., CAMELO, L.; PRIETO, A., MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.6, n.6, p.1783-1788, 1994.

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

HERERRA, O.M. Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*: um enfoque de cadeia produtiva. **Tese (doutorado)** -- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2001.

HICKSON, M.; D'SOUZA, A.L; MUTHU N.; ROGERS T.R.; WANT S.; RAJKUMAR C. El consumo de probióticos puede reducir la incidencia de diarrea secundaria a antibióticos. **FMC**. v.15 n.3 p.183-204. 2008

HIRANO, J. et al.; YOSHIDA, T.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; MORI, I.; YIOKOCHI, T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. **Microbiology and Immunology**, v.47 p.405–9. 2003.

HOLTZ, M.; BORGES, G.M.; FURLAN, S.A.; WISBECK, E. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.3, n.1. 2009.

INOUE, R. USHIDA, K. Development of the intestinal microbiota in rats and its possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine. **FEMS Microbiology Ecology**, v.45, p.147-153. 2003.

ISHII, P.L.; PRADO, C.K.; MAURO, M.O.; CARREIRA, C.M.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; DICHI, J.B.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.59, p.412–422. 2011.

KALAC, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry** v.113, 2009.

KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.S.; DI STASI, L.C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A.F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.909–916. 2004.

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

KIM, C-F; JIANG, J.J.; LEUNG, K-N.; FUNG, K.P.; LAU, C.B-S. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.320–326. 2009.

KOMURA, D.L.; CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; SANTOS, A.R.; GORIN, P.A.; IACOMINI, M. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**, v.101, n.15, p. 6192-99, 2010.

KOMURA, L. D. *Pleurotus ostreatus* variedade florida: caracterização estrutural de polissacarídeos do micélio e exopolissacarídeos. Disponível em: http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/1884/18049/1/DIRCE_DISERTACAO_2009.pdf . Acesso em: 29/04/2010

KRUSE HP, KLEESSEN B, BLAUT M. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. **Brasilian Journal Nutrition**. n. 82, 1999.

KONTULA, P.; JASKARI, J.; NOLLET, L.; DE SMET, I.; VON WRIGHT, A.; POUTANEN, K.; MATTILA-SANDHOLM, T. The colonization of a stimulator of

the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic. **Applied Microbiology and Biotechnology** 50, 1998.

KURATSU M. HAMANO Y. DAIRI, T. Analysis of the *Lactobacillus* metabolic pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, p.7299–730, 2010.

LACAZ, C. S.; SILVA, C.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINSS-VACARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, Y-L; HUANG, G-W.; LIANG, Z-C.; MAU, J.L. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. **LWT**, v.40 p.823–833, 2007.

LEE, Y-L; KANG, B.H.; ROH, J.K.; KIM, J.R. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v.46 p.87-95. 2008.

LI, D.; KIM, J.M.; JIN, Z.; ZHOU, J. Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. **Anaerobe**, v.14 p.29–34. 2008.

LIN, H.; SHE, Y.H.; CASSILETH, B.R.; SIROTNAK, F.; RUNDLES, S.C. Maitake beta-glucan MD fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. **International Immunopharmacology**, v.4, p 91–99. 2004.

LIU, M.; LI, J.; KONG, F.; LIN, J.; GAO, Y. Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide–peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. **Immunopharmacology**, v.40 p.187–198. 1998.

LIU, J.; MIAO, S.; WEN, X.; SUN, Y. Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill using response surface methodology (RSM). **Carbohydrate Polymers**, v.78 p.704–709. 2009.

LIU, J. SUN, Y. Structural analysis of an alkali-extract a bleand water-soluble polysaccharide (ABP-AW1) from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydrate Polymers**, 2011.

LORENZEN, K. ANKE, T. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. **Current Organic Chemistry**, v.2, p.329-364, 1998.

MACHADO, M.P.; FILHO, E.R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.533–539, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO J. M.; PARKER J. **Microbiologia de Brock**.10.ed. São Paulo: Prentice hall, 2004.

MAHAN e ESCOTT-STUMP. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, 11^a ed. São Paulo, Rocca, 2005.

MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **Brasilian Journal of Nutrition**.v.87 n.2, 2002.

MARTHO,G.R. **Biologia dos organismos. Classificação. Estrutura e função dos seres vivos**. 1 ed, v.2; São Paulo: Moderna, 1994.

MARTINS DE OLIVEIRA, J. JORDÃO, B.K.; RIBEIRO, R.L.; FERREIRA da EIRA, A.; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v.40 p.1775–1780. 2002.

MASCO, L.; HUYS, G.; DE BRANDT, E.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, G. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic

products claimed to contain bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p.221– 230. 2005.

MATSUI, K.; KODAMA, N.; NANBA, H. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis. **Cancer Letters**, v.172 p.193-198. 2001.

MAU, JL; LIN, HC; SONG, SF; Antioxidant properties of several specialty mushrooms. **Food Research International**, v.35, p.519–526. 2002.

MAZIERO, R. CAVAZZONI, V. BONONI, V.L.R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p.77-84, 1999.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms—food, function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Review International**, v.11, p.7–21. 1995.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agariucs blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci. Biotechnol.Biochem**, v.62, n.3, p.434-437, 1998.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polisacchrde from the mycelium of liquid-cultured *Agariucs blazei* Murill. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.47, n.4, p.707-714. 1999.

MIZUNO T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharide from medical mushrooms in Japan. **International Journal of Medicinal Mushroom**, v.1, p.9-29. 1999.

NASCIMENTO, M.S. Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum*. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

NEYRINCK, A.M.; BINDELS, L.B.; BACKER, F. PACHIKIAN, B.D.; CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to its lipid-lowering action. **International Immunopharmacology**, v.9, p.767–773. 2009.

NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, v. 25. 2004.

OEI, P. Mushroom cultivation. Leiden, the Netherlands: **Tool Publications**, p. 126-137, 93-204. 1996.

OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Structure-activity relationship of (1-3)-b -D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.18, n.10, p.1320-1327. 1995.

OLIVEIRA, M.N. Probióticos: Seus benefícios à saúde humana. **Revista Nutrição em Pauta**, 2007.

OLIVEIRA, R.J; SALLES, M.J.S.; SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.S.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI, H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Effects of the polysaccharide b-glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.53, p.164–173. 2009.

ORTEGA GM.; MARTÍNEZ, E.O.; BETANCOURT, D.; GONZÁLEZ, A.E.; OTERO, M.A. Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi

Pleurotus sp. **World of Microbiology and Biotechnology**, n.8, p.402-405. 1992

O'TOOLE, P.W.; COONEY, J.C.; Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2008.

OZEN, T.; DARKAN, C.; AKTOP, O.; TURKEKUL, I. Screening of Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Contents of Edible Mushrooms Wildly Grown in the Black Sea Region of Turkey **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening** v. 14, n.2, p.72-84. 2011.

ÖZTÜRK, Mehmet,; DURU, M.E; KIVRAK, S.; MERCAN-DOGAN, N.; TURKOGLU, A.; OZLER, M.A. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.6, p.1353-1360, 2011.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, S.L. Determinação da concentração de B-Glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murrill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.23, p.312-316, 2003.

PAVAN, M.M.L.S.; KLEEREBEZEM, M.; Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion Biotechnology** v.17, p.204–210, 2006.

PATTERSON, J.A.; et al. Selective enrichment of bifidobacteria in the intestinal tract of broilers by thermally produced kestoses and effect on broiler performance. **Poultry Science** v.76, n.3, 1997.

PHILIPPE, D.; FAVRE, L.; FOATA, F.; ADOLFSSON, O.; PERRUISSEAU-CARRIER, G.; VIDAL, K.; REUTELER, G.; DAYER-SCHNEIDER, J.;

MUELLER, C.; BLUM, S. Bifidobacterium lactis attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. **World Journal Gastroenterology** v.17, n.4, p.459-469. 2011.

PINHEIRO, F.; FARIA, R.R.; DE CAMARGO, J.L.V.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; DA EIRA, A.F.; BARBISAN, L.F. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.1543–1550. 2003.

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORT, I.; ROUT, D.; ISLAM, S.S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, v.340, p.629–636. 2005.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5^a ed., New York: McGraw-Hill, 2002.

PRZEMYSŁAW, J.T.; PIOTR, T. Probiotics and Prebiotics. **Cereal Chemistry**. v.2, n.80, 2003.

POKHREL, C.P.; OHGA, S. Cattle bedding waste used as a substrate in the cultivation of *Agaricus blazei* Murill. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, v.52, 2007.

POKUSAIEVA, K. FITZGERALD, G.F VAN SINDEREN, D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. **Genes Nutrition** v.6, p.285–306, 2011.

PUTZKE, J.; WARTCHOW, F. Lista de espécies de *Pluteaceae* (*Agaricales*) que ocorrem no Brasil. **Biociências**, v. 16, n. 2, p. 110-113, 2008.

QIANG, X; YONGLIE, C; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers** N.77, 2009.

RAMESH, H.P.; THARANATHAN, R.N.; Carbohydrates – the renewable raw materials of high biotechnological value. **Critical Review Biotechnology**, v.23. 2003.

REDDY, B. S.; WANG, C.X.; SAMAHA, H.; LUBET, R.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; RAO, C.V. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. **Cancer Research**, v.67, p.415-422. 1997.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6, 2000.

ROLFE, R.D. O papel das culturas probióticas no controle da saúde gastrointestinal; Department of Microbiology and Immunology, Texas Tech University Health Sciences Center, **Lubbock**, 2008.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and subrange ratios at the 95% confidence level. **Analytical Chemistry** v.63 p.139-146, 1991.

SÁ RIVAS, P.M.; FILHO, A.A.P.; SANTOS, F.A.S.; ROSA, I.G. Avaliação de substratos pectocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *pleurotus sp.* (agaricales). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v.17, n.3. 2010.

SAAD, S.M.I.; Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**. v. 42, n.1. 2006.

SANCHEZ, C. Mini-review: modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.756-762. 2004.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* v.8, n.5, p.563-572. 1998.

SANTOS-NEVES, J.C. Caracterização estrutural dos polissacarídeos obtidos do basidioma de *Pleurotus ostreatus* var. florida. 65 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná**, 2007.

SANTOS, V.M.C.S. Contribuição ao Estudo da Produção de *Pleurotus* spp em Resíduos Lignocelulósico. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS S.J.; AUER D.P.F.; GIBBS P.A. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.12, p.279-298. 1992.

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

SILVA, L.P.; NORBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

SMIDERLE, F.R; RUTHES, A.C.; ARKEL, J.V.; CHANPUT, W.; IACOMINI, I.; WICHES, H.J.; VAN GRIENSVEN, J.L.D. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, n.1. 2011.

SOLANO-AGUILAR, G.; DAWSON, H.; RESTREPO, M.; ANDREWS, K.; VINYARD, B.; URBAN JR.; J.F. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (Bb12) in the Intestine after Feeding of Sows and Their Piglets. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6338–6347. 2008.

SOUZA DIAS, E.; KOSHIKUMO, E.M.S.; SCHWAM, R.F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo pleurotus saior-caju em diferentes resíduos agrícolas. **Ciências e agrotecnologia**, v.27, n.6, 2003.

SU, P.; HENRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-culture in vitro. **Anaerobe**, 2007.

SUI, ZF.; YANG, R.; LIU, B.; GU, T.M.; ZHAO, Z.; SHI, DF.; CHANG, D. Chemical analysis of *Agaricus blazei* polysaccharides and effect of the polysaccharides on IL-1 β mRNA expression in skin of burn wound-treated rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.47, p.155–157. 2010.

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

SUTHERLAND, LW. Novel and established application of microbial polysaccharide. Trends. **Biotechnology**. V.16, 1998.

SYNYTSYA, A.; MÍČKOVÁ, K. SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPEVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘÍKOVÁ, E.; ČOPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v.76, n.4. 2009.

TAKAKU T.; KIMURA, Y.; OKUDA H. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. **Journal of Nutrition**. n.131, p.1409-1413. 2001.

TAO, Y.; ZHANG L.; CHEUNG, P.C.K; Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.341 p.2261–2269. 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TONG, H. XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D.; SUN, X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, n.100, p.1682–1686. 2009.

TORTORA, G.J. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TSAI, SY; TSAI HL; MAU, JL. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. **LWT**, v.40, p.1392–1402. 2007.

TURRONI, F.; FORONI, E.; PIZZETTI, P.; GIUBELLINI, V.; RIBBERA, A.; MERUSI, P.; CAGNASSO, P.; BIZZARRI, B.; DE'ANGELIS, G.L.; SHANAHAN, F.; SINDEREN, D.V.; VENTURA, M. Exploring the Diversity of the Bifidobacterial Population in the Human Intestinal Tract. **Applied and environmental microbiology**, p.1534–1545. 2009.

VALADARES, D.G.; DUARTE M.C.; OLIVEIRA J.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI M.A.; MARTINS V.T.; COSTA L.E.; LEITE J.P.; SANTORO M.M.; RÉGIS W.C.; TAVARES C.A; COELHO E.A. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different Leishmania species. **Parasitology international**, v.60, n.4, p. 357–363. 2011.

VIEIRA, E.; PAZ, M.F.; GIOVANNI, R.N. Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de uva pela técnica junção. In: **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 16, 2007, Curitiba, 2007.

XIE, N.; CUI, Y.; YIN, Y.N.; ZHAO, X.; YANG, J.W.; WANG, Z.G.; FU, N.; TANG, Y.; WANG, X-H.; LIU, X.W.; WANG, C.L.; LU, F.G. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a

high-cholesterol diet. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, n.53. 2011.

YANG, Y.; IJI P.A.; KOCHER A.; THOMSON E.; MIKKELSEN L.L.; CHOCT M. Effects of mannanoligosaccharide in broiler chicken diets on growth performance, energy utilisation, nutrient digestibility and intestinal microflora. **British Poultry Science**. v.49, 2008.

WANG, H. X. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *P. ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.275 p.810–816. 2000.

WANG Y.; HAN, F.; HU, B.; LI, J.; YU, W. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research*, v. 26, n. 11. 2006.

WANG, H.; NG, TB.; OOI, V.E.C.; Lectins from mushrooms. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208609661>. Acesso em: 30/01/2012.

WASSER, S.P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.258–274, 2002.

WASSER, S.P. WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, p.31–62, 1999.

WISBECK, E. ROBERT, A. P.; FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v.3, n.2, p. 7-10. 2002.

WOLFF, E.R.S. Antimicrobial and Antineoplastic Activity of *Pleurotus ostreatus* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, n.2-3, 402-412. 2008.

WONG, J.Y.; CHYE, F.Y. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p.269–277, 2009.

YANG, L.; ZHANG, L-M.; Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v.76 p.349–361. 2009.

ZHANG, S.; HE B.; GE J.; ZHAI C.; LIU X.; LIU P. Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia–reperfusion rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, n.3, p.363–366. 2010.