



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS E BIOMASSA EM SUBSTRATO
AGROFLORESTAL AMAZÔNICO DE *Pleurotus* e *Lentinus***

TERESA ALARCON CASTILLO

MANAUS-AM

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

TERESA ALARCON CASTILLO

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS E BIOMASSA EM SUBSTRATO
AGROFLORESTAL AMAZÔNICO DE *Pleurotus* e *Lentinus***

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS-AM

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C352c

Castillo, Teresa Alarcón Castillo.

Caracterização fisiológica, produção de biocompostos e biomassa em substrato agroflorestal amazônico de *Pleurotus* e *Lentinus*. / Teresa Alarcón Castillo. Castillo. 2009
141 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Pleurotus* e *Lentinus*. 2. Crescimento Micelial. 3. Concentração Mínima Inibitória. 4. Protease. 5. Eficiência Biológica. I. Teixeira., Maria Francisca Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

TERESA ALARCÓN CASTILLO

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS E BIOMASSA EM SUBSTRATO
AGROFLORESTAL AMAZÔNICO DE *Pleurotus* e *Lentinus***

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovado em 21 de Fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira (Presidente)
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a Dr^a. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof^a Dr^a. Lidia Medina Araújo
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof Dr. Jair Putzke
Universidade de Santa Cruz (UNISC)

Aos meus inesquecíveis avôs.
Aos meus amados pais Magdalena Adela e Pedro Abilio,
Ao apoio incondicional dos meus irmãos Merli, Pedro e Abilio.
Ao meu amigo Dudú por sempre.

Dedico com todo meu amor infinito.

Agradecimentos

À Santíssima Trindade por me abençoar todos os dias.

Aos meus pais Magdalena Adela e Pedro Abilio, o meu firme reconhecimento pela dedicação e responsabilidade na construção do meu caráter profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, a minha inesquecível gratidão pelos ensinamentos de vida, oportunidade, paciência, dedicação e competência na orientação científica teórica e experimental.

Aos Profs. Drs. José Raimundo G. Pereira; Elton Nunes Britto e ao Eng. Quim. Omar Salhuana Lozano, pelo processamento dos dados nas análises estatísticas.

Aos Profs. Drs. Lidia Medina, Antônio Fábio Lopes de Souza e a Técnica de Laboratório Carmen Lúcia Moura Machado, pelo processamento das amostras para as análises físico-química.

Ao Tenente Coronel do Exército Mikhail Bourlakov, pelas correções do português na publicação dos artigos e pela amizade.

À família Simas Teixeira, pela atenção e estima.

À família Cristo Fernandes, pela acolhida e o carinho.

À Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, pela apreciação e sincera amizade.

Aos colegas do Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas: Antônio, Kilma, Taciane, Herlon, Larisa, Rosana, Elton, Rosimar, Michel, Josy, Nelly, Renata, Jhully, Thiago, Ana Rita, Ericka e Carol, pelo companheirismo, convivência, amizade e ajuda durante os experimentos.

À Universidade Federal do Amazonas, por meio do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil (RENNEBRA) pelo apoio no desenvolvimento da parte experimental da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas- FAPEAM, pelo suporte financeiro no desenvolvimento da tese.

Finalmente agradeço a todas aquelas pessoas que de alguma forma tornaram possível a concretização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“ Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar...
as facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito. ”*

Chico Xavier (1910-2002†)

*“Onde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto.
Queira o melhor do melhor,
se pensamos pequeno, coisas pequenas teremos,
mas se desejarmos fortemente o melhor
e, principalmente, lutarmos pelo melhor....
o melhor vai se instalar em nossa vida
porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do
tamanho da minha altura.”*

Carlos Drummond de Andrade (1902-1987†)

RESUMO

Este trabalho apresenta a análise do crescimento de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Quél. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536, em meios natural e complexo sob diferentes condições de cultivo, para verificar a produção de biocompostos contra fungos e bactérias, avaliar o crescimento micelial vertical, analisar a produção das proteases e biomassa em resíduos agroindustriais selecionados por fermentação sólida. A atividade antimicrobiana dos cogumelos frente à *Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501, *Aspergillus flavus* DPUA 1836, *Escherichia coli* DAUPE 224 e *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 foi determinada pelo Método do Bloco de Gelose e pela Concentração Mínima Inibitória. Para a produção de proteases de *Pleurotus* e *Lentinus* por fermentação no estado sólido, os cultivos foram realizados em 200 g de casca de cupuaçu + casca de arroz (CC+CA); casca de cupuaçu + farelo de arroz (CC+FA), em frasco de vidro transparente, umidade 60% e pH 6,0. A esterilização dos substratos foi realizada a 121 °C/90 minutos/dois dias consecutivos. Em cada frasco foram inoculados 12 discos de 10 mm de diâmetro e a fermentação foi conduzida a 25 °C, sem luminosidade por 15 dias, determinando-se a velocidade de crescimento micelial em centímetros, a cada 24 horas. Para determinação da atividade proteolítica a 440 nm foi utilizado solução de azocaseína 1% (p/v), pH 7,2. *L. citrinus* foi a espécie selecionada para produção de biomassa. Nesta etapa para a realização da fermentação no estado sólido foram preparados sacos plásticos de 5 kg contendo diferentes combinações e proporções de casca de cupuaçu, casca de arroz e farelo de arroz. Efetuaram-se processos para avaliar a formação, desenvolvimento dos primórdios, tempo total de cultivo, número de fluxos de produção e análises de composição centesimal de basidiomas de *L. citrinus* em triplicata. Os resultados demonstraram que a composição dos meios de cultura, o tempo de cultivo, a luz e a temperatura influenciam significativamente no crescimento das espécies de *Lentinus* e *Pleurotus*, nos meios de cultura analisados. Nas condições experimentais, esses cogumelos expressaram atividade antimicrobiana contra a maioria dos fungos e bactérias testados, contudo *L. citrinus* e *N. lepideus* não expressaram atividade antimicrobiana frente *Aspergillus flavus*. A mistura de casca de cupuaçu com casca de arroz (1:1) estimulou a velocidade de crescimento vertical de *L. citrinus* (13 cm), *P. ostreatus* (12,6 cm) e *N. lepideus* (12,3 cm). As melhores médias da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas foram determinadas no extrato bruto de *P. ostreatus* (24,0 U/g) e *L. citrinus* (22,0 U/g), obtidos na solução de NaCl 2%, a 36 °C e com água destilada, a 25 °C. Na produção de biomassa, as melhores médias de eficiência biológica (61,0 %), produtividade (0,86 %), taxa de produção (32,0 %) e proteína (13,44 %) foram observadas nas formulações realizadas com os diferentes substratos agroflorestais que dependendo da concentração têm demonstrando a viabilidade do processo para o crescimento e produção de *L. citrinus* DPUA 1535.

Palavras chave: *Pleurotus*, *Lentinus*, crescimento micelial, concentração mínima inibitória, proteases, eficiência biológica, fermentação sólida.

ABSTRACT

This work presents the analysis of mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Quél. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 and *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536, in natural and complex media under different growing conditions to verify production of biocompounds against fungi and bacteria, to evaluate vertical mycelial growth, to analyze the production of proteases and biomass in agroindustrial residues selected by solid fermentation. Antimicrobial activity of mushrooms against *Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501, *Aspergillus flavus* DPUA1836, *Escherichia coli* DAUPE 224 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 was determined by the Gelose Block Method and Minimum Inhibitory Concentration. For the production of *Pleurotus* and *Lentinus* proteases by solid state fermentation, the cultivations were realized on 200 g of cupuaçu shell + rice husk (CC+CA); cupuaçu shell + bran rice (CC+FA), in flask of transparent glass, humidity 60% and pH 6,0 and the sterilization of the substrates was accomplished at 121 °C/90 minutes for two consecutive days. Each flask was inoculated with 12 agar disks (10 mm in diameter) from stock culture and allowed to fermented for 15 days at 25 °C, without light and mycelial growth was determined in centimeters every 24 hours. For determination of proteolytic activity at 440 nm solution of azocasein 1% (p/v), pH 7,2 was used. *L. citrinus* was the specie selected for biomass production. In this stage for the accomplishment of the fermentation in the solid-state were prepared 5 kg plastic bags containing different combinations and proportions of cupuaçu shell, rice husk and rice bran. Methods were carried out to evaluate the formation, development of the primordia, total culture time, number of production flows and analysis of centesimal composition of basidiomas of *L. citrinus* in triplicate. The results demonstrate that the composition of culture media, the time of cultivation, the light and the temperature influence significantly in the growth of *Lentinus* and *Pleurotus* species, on culture media analyzed. In the experimental conditions, those mushrooms express antimicrobial activity against most fungi and bacteria tested, however *L. citrinus* and *N. lepideus* didn't express antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. The mixture of cupuaçu shell and rice husk (1: 1) stimulated the vertical growth rate of *L. citrinus* (13 cm), *P. ostreatus* (12.6 cm) and *N. lepideus* (12.3 cm). The best averages of the activity and effect of the proteolytic enzyme extraction conditions were determined in the crude extract of *P. ostreatus* (24.0 U / g) and *L. citrinus* (22.0 U / g) obtained in the NaCl 2 solution % at 36 °C and with distilled water at 25 °C. In the biomass production, the best averages of biological efficiency (61.0%), productivity (0.86%), production rate (32.0%) and protein (13.44%) were observed in the formulations different agroforestry substrates that depending on the concentration have demonstrated the viability of the process for the growth and production of *L. citrinus* DPUA 1535.

Keywords: *Pleurotus*, *Lentinus*, mycelial growth, minimal inhibitory concentration, proteases, biological efficiency, solid fermentation.

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 - Produção de espécies de cogumelos em larga escala no mundo ou em alguns países	22
Quadro 2 - Produção mundial de cogumelos nos últimos 19 anos (período de 1993 – 2012)	23
Quadro 3 - Espécies de cogumelos comestíveis mais cultivadas no mundo e substratos comumente utilizados no cultivo	24
Quadro 4 - Cogumelos cultivados com finalidades medicinais	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) Kumm	30
Figura 2 - <i>Lentinus citrinus</i> Walley & Rammeloo (1994)	30
ARTIGO 3 Perfil proteolítico de cogumelos comestíveis cultivados em resíduos da agroindústria amazônica por fermentação no estado semi-sólido	112
Figura 1 - Velocidade do crescimento micelial vertical de <i>P. ostreatus</i>, <i>P. ostreatus</i> cv. Florida, <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> em cultivos realizados em diferentes substratos agroflorestais (valores de medidas em centímetros de crescimento das espécies, nas concentrações e substratos [CC+FA (1:1)]; [CC+FA (2:1)]; [CC+CA (1:1)]; [CC+CA (2:1)]	121
Figura 2 - Atividade volumétrica máxima das proteases de <i>P. ostreatus</i>, <i>P. ostreatus</i> cv. Florida, <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> obtidos por fermentação no estado sólido	126
ARTIGO 4 Produção de basidiomas em substratos agroflorestais como alternativa de sustentabilidade na Amazônia	129
Figura 1 - Ciclo de Cultivo: parâmetros comportamentais na produção de <i>L. citrinus</i> (miceliação, emissão de primórdios, frutificação e cultivo total (dias)	138

LISTA DE TABELAS

	Pág.
ARTIGO 1. Crescimento micelial e atividade antimicrobiana de espécies de <i>Pleurotus</i> (Agaricomycetes)	62
Tabela 1 - Efeito da temperatura, do tempo de cultivo e da luminosidade no crescimento micelial de <i>P. ostreatus</i> em diferentes meios de cultura	81
Tabela 2 - Efeito da temperatura, do tempo de cultivo e da luminosidade no crescimento micelial de <i>P. ostreatus</i> cv. Florida em diferentes meios de cultura	82
Tabela 3 - Valores da velocidade de crescimento radial (VCR) de <i>P. ostreatus</i> e <i>P. ostreatus</i> cv. Florida (mm/d) em diferentes meios de cultura	83
Tabela 4 - Atividade antibacteriana e antifúngica de <i>P. ostreatus</i> e <i>P. ostreatus</i> cv. Florida no 15º dia de crescimento sob diferentes condições de cultura	84
Tabela 5 - Atividade antibacteriana e antifúngica de <i>P. ostreatus</i> e <i>P. ostreatus</i> cv. Florida no 30º dia de crescimento sob diferentes condições de cultura	85
Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) de extratos orgânicos do micélio de <i>P. ostreatus</i> e <i>P. ostreatus</i> cv. Florida pelo Método de Microdiluição em Microplacas	86
ARTIGO 2. Crescimento micelial e atividade antimicrobiana do gênero <i>Lentinus</i> (Agaricomycetes) do Brasil	87
Tabela 1 - Efeito da temperatura, do tempo de cultivo e da luminosidade no crescimento micelial de <i>L. citrinus</i> em diferentes meios de cultura	106
Tabela 2 - Efeito da temperatura, do tempo de cultivo e da luminosidade no crescimento micelial de <i>N. lepideus</i> em diferentes meios de cultura	107
Tabela 3 - Valores da velocidade de crescimento radial (VCR) de <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> (mm/d) em diferentes meios	108
Tabela 4 - Atividade antibacteriana e antifúngica de <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> no 15º dia de crescimento sob diferentes condições de cultura	109
Tabela 5 - Atividade antibacteriana e antifúngica de <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> no 30º dia de crescimento sob diferentes condições de cultura	110
Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) de extratos orgânicos do micélio de <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> pelo Método de Microdiluição em Microplacas	111

LISTA DE TABELAS

Pág.

ARTIGO 3 Perfil proteolítico de cogumelos comestíveis cultivados em resíduos da agroindústria amazônica por fermentação no estado semi-sólido	112
Tabela 1 - Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de <i>P. ostreatus</i> determinada no extrato bruto obtido por fermentação semi-sólido em diferentes resíduos agrofloretais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1	123
Tabela 2 - Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de <i>P. ostreatus</i> cv. Florida determinada no extrato bruto obtido por fermentação semi-sólida em diferentes resíduos agrofloretais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1	124
Tabela 3 - Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de <i>L. citrinus</i> determinada no extrato bruto obtido por fermentação semi-sólida em diferentes resíduos agrofloretais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1	125
Tabela 4 - Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de <i>N. lepideus</i> determinada no extrato bruto obtido por fermentação semi-sólida em diferentes resíduos agrofloretais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1	126
ARTIGO 4 Produção de basidiomas em substratos agrofloretais como alternativa de sustentabilidade na Amazônia	129
Tabela 1 - Composição centesimal dos substratos [g por 100 g de substrato (base seca)] ...	137
Tabela 2 - Valores médios dos parâmetros de produção no cultivo de <i>L. citrinus</i>	140
Tabela 3 - Composição centesimal dos basidiomas de <i>L. citrinus</i> (g/100 g de base seca) ...	141

LISTA DE SIGLAS

RENNEBRA	Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil
BDA	Ágar Batata Dextrose
SAB+YE	Ágar Sabouraud + extrato de levedura
Coleção de Cultura DPUA	Coleção de Cultura do Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas
Coleção DAUPE	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
ATCC	American Type Culture Collection
YES	Ágar – sacarose – extrato de levedura
AOAC	Association of Official Analytical Chemist.
AIDS	Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida
CC + CA	Casca de cupuaçu + casca de arroz
CC + FA	Casca de cupuaçu + farelo de arroz
PDA	Potato Dextrose Agar;
SA+YE	Sabouraud Agar added Yeast Extract;
RBEA	Rice Bran Extract Agar;
L	With Light
WL	Without light
RGR	Radial Growth Rate
CA	Czapek Agar
NA	Nutrient Agar
YESA	Yeast Extract Sucrose Agar
MIC	Minimum Inhibitory Concentration;
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
TTC	Triferyl Tetrazolium Chloride

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Valor nutricional e consumo de cogumelos	21
2.2 Biodegradação e reciclagem de matéria orgânica	23
2.3 Fermentação semi-sólida	26
2.4 Os gêneros <i>Pleurotus</i> e <i>Lentinus</i>	27
2.4.1 Considerações taxonômicas dos gêneros utilizados na pesquisa	28
2.4.2 Alguns aspectos sobre a obtenção da cepa de <i>L. citrinus</i>	31
2.5 Princípios bioativos em fungos macroscópicos	31
2.5.1 Enzimas	32
2.5.2 Metabólitos secundários	33
2.5.3 Atividade antimicrobiana de <i>P. ostreatus</i> , <i>P. ostreatus</i> cv. Florida, <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i>	35
2.6 Nutracêuticos e nutricêuticos	37
3. METODOLOGIA	38
3.1 Cultivo dos basidiomicetos em meio sólido	38
3.2 Determinação das condições de cultivo das espécies de <i>Pleurotus</i> e <i>Lentinus</i> em meios natural e complexo	38
3.3 Avaliação da velocidade do crescimento micelial das espécies de <i>Pleurotus</i> e <i>Lentinus</i> sob diferentes condições de cultivo	39
3.4 Detecção da atividade antimicrobiana em meio sólido	39
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
3.6 Avaliação do desenvolvimento micelial vertical com fitas milimetradas de <i>P. ostreatus</i> , <i>P. ostreatus</i> cv Florida, <i>L. citrinus</i> e <i>N. lepideus</i> cultivados nos substratos selecionados	43
3.7 Produção de proteases por fermentação no estado sólido	44
3.8 Produção de biomassa de <i>L. citrinus</i> nos resíduos agroindustriais no estado sólido selecionados por fermentação	46
3.9 Composição centesimal dos basidiomas de <i>L. citrinus</i> e dos substratos agroflorestais	47
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49

5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS	51
7. ARTIGOS GERADOS DA TESE	60
ARTIGO 1 Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of <i>Pleurotus</i> Species (Agaricomycetes)	61
ARTIGO 2 Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of Species of Genus <i>Lentinus</i> (Agaricomycetes) from Brazil	87
ARTIGO 3 Proteolytic profile of edible mushrooms grown in Amazon agro-industry residues by semi-solid state fermentation	112
ARTIGO 4 Production of <i>Lentinus citrinus</i> URM 2672 in agroforestry substrates as a sustainability alternative in the Amazon	129
8. PATENTE GERADA DA TESE	150
Patente: Processo de produção de cogumelo comestível utilizando resíduos vegetais de cupuaçu, cogumelo comestível obtido e uso de resíduos vegetais de cupuaçu como substrato para crescimento de cogumelos	150

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade os cogumelos são utilizados como alimento de importante valor nutritivo e terapêutico. A produção comercial desses fungos na cultura oriental é relatada a partir do século VI na região da China, com a espécie *Auricularia auricula*, sendo que o cultivo das espécies *Flamulina velutipes* e *Lentinus edodes* por sua vez começaram apenas no início do século IX e XII (URBEN; OLIVEIRA, 1998).

Atualmente são conhecidas aproximadamente duas mil espécies potencialmente comestíveis, porém apenas 25 delas são utilizadas na alimentação humana e um número menor tem sido produzido comercialmente (FURLANI; GODOY, 2005).

De acordo com os relatos de Rangunathan; Swaminathan (2003), as espécies comestíveis mais cultivadas são o Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Cogumelo-do-Sol (*Agaricus blazei* Murril), (Himematsutake), Shitake (*Lentinus edodes*), Shimeji (*Pleurotus* sp) e Hiratake (*Pleurotus ostreatus*).

Na cultura ocidental o consumo de cogumelos tem evoluído consideravelmente. Uma estatística mundial revela que em 1993, a produção mundial anual foi de 2,3 milhões de toneladas e, em 2012, aumentou para 7,9 milhões de toneladas, ou seja, acrescentou-se mais de 60% em 12 anos (VIEIRA, 2016).

No Brasil desde 1968 até a atualidade o consumo per capita aumentou de vinte toneladas para cinco mil toneladas, o quantitativo ainda é muito baixo (apenas 30 gramas por ano) contra duas kilogramas na França e 1,3 kg na Itália, como conseqüência o consumo *in natura* representa 60% da produção nacional e os 40% restantes são absorvidos pela indústria de conservas alimentícias (FURLANI; GODOY, 2008; MOURA, 2006).

Além de serem alimentos com elevadas quantidades de proteínas quase equivalentes à carne, vegetais e frutos, ricos em vitaminas e com baixo teor de gordura e carboidratos, os cogumelos estimulam o sistema imunológico e têm se mostrado importantes aliados no tratamento complementar de doenças que afligem a população mundial, como o câncer, lúpus, hepatite, HPV (Vírus do Papiloma Humano) e AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), entre outras (MOURA, 2006; SMITH *et alli*, 2002).

Devido a essas propriedades terapêuticas, os basidiomicetos tem recebido especial atenção dos pesquisadores, especialmente da indústria farmacêutica, portanto tornam-se oportunos para serem investigados como fontes de novos antibióticos com diferentes tipos estruturais e novos modos de ação (LINDENQUIST *et alli*, 2005; STAMETS, 2002; SUAY *et alli*, 2000).

RELEVÂNCIA DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Os cogumelos possuem uma diversidade de representantes nos ecossistemas tropicais e sub-tropicais, estimando-se a existência de 140.000 espécies, das 7000 ainda não foram exploradas, 700 podem ser utilizados como alimento, 50 a 200 para uso medicinal e 50 com fins toxicológicos. Entre os comestíveis, embora tenham alto valor gastronômico, poucos são os estudos a cerca da descoberta de metabólitos de importância industrial (FORTES; NOVAES, 2006; LINDENQUIST *et alli*, 2005).

Entre os metabólitos bioativos tem destaque aqueles com atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, citotóxica alucinogênica e reguladores do crescimento de vegetais (LEE *et alli*, 2005; ROSA *et alli*, 2003; SUAY *et alli*, 2000).

Nesse contexto Rosa *et al* (2003), destaca também que novas tecnologias fermentativas e de purificação estão contribuindo para que os cogumelos sejam utilizados como potenciais fontes de novos antibióticos, substâncias cujas ações têm sido observadas *in vivo* contra bactérias, actinomicetos (bactérias filamentosas) e outros fungos, no micro-habitat desses microrganismos, condição que comprova a importância ecológica ambiental desses macrofungos.

Sob o ponto de vista nutricional, o cultivo dos cogumelos tem sido apontado como uma alternativa para acrescentar a oferta de proteínas aos países com alto índice de desnutrição. Estes cogumelos são eficientes na bioconversão de resíduos agrícolas por fermentação semi-sólida, processo que viabiliza a produção de alimento humano ou ração animal (MUSHWORLD, 2005; SCHMIDT *et alli*, 2003; URREA, 2001).

Dependendo das espécies de cogumelos e dos meios de cultivo utilizados para a produção, tais macrofungos podem ser considerados excelentes alimentos, pois apresentam alto teor de proteínas, carboidratos e baixos teores de gordura. Além desse potencial nutricional, possuem também considerável quantidade de fibra alimentar e aminoácidos essenciais, embora não sejam considerados fontes de vitaminas podem contribuir com o aporte das mesmas na dieta alimentar (URREA, 2001).

Atualmente, a comercialização e o consumo de cogumelo *in natura* têm-se iniciado na região amazônica, pesquisas vêm sendo encaminhadas com resultados promissores quanto à produção de biomassa, podendo ser considerada uma nova alternativa de fonte protéica mediante o manejo de resíduos agrícolas regionais, com ajuda de técnicas de cultivo simples que permitam o desenvolvimento sustentável e gerem fonte de renda para a população.

Levando em consideração a carência de estudos acerca das propriedades fisiológicas e nutricional de *Pleurotus* e *Lentinus*, justifica-se a realização desta pesquisa na região sendo que os cogumelos têm sido pouco explorados para fins alimentícios.

OBJETIVO GERAL

- ❖ Avaliar o crescimento de espécies de *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535, *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536 e *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533 and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Qué. cv. Florida DPUA 1534, sob diferentes condições de cultivo para verificar a produção de biocompostos extracelulares contra fungos e bactérias, a produção de proteases e biomassa em resíduos agroindustriais selecionados por fermentação no estado sólido.

Objetivos específicos

- ❖ Estabelecer condições de cultivo para *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534 em meios natural e complexo;
- ❖ Analisar a velocidade do crescimento radial micelial de *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534;
- ❖ Investigar a atividade antimicrobiana de *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534

sob diferentes condições de cultivo pelo Método do Bloco de Gelose e pela Concentração Mínima Inibitória.

- ❖ Avaliar o desenvolvimento micelial vertical com fitas milimetradas de *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534 cultivados nos substratos selecionados;
- ❖ Selecionar substrato natural de baixo custo da região Norte para a produção de proteases de *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534 por fermentação no estado sólido;
- ❖ Produzir biomassa de *L. citrinus* DPUA 1535 nos resíduos agroindustriais selecionados por fermentação no estado sólido.
- ❖ Determinar a composição centesimal dos resíduos selecionados e dos basidiomas de *L. citrinus* DPUA 1535.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1. Valor nutricional e consumo de cogumelos

No Brasil, o consumo e a produção de cogumelo vêm crescendo de forma expressiva devido à busca por alimentos “naturais”, livres de resíduos agrotóxicos ou qualquer tipo de produtos químicos (REFFATTI *et alli*, 2006).

Quanto ao valor nutritivo, os cogumelos são ricos em proteínas (19 a 35 %) e são de baixo valor calórico (30 cal/100 g de matéria seca), assim também com alto valor de aminoácidos essenciais, como a lisina, triptofano e leucina, vitaminas (B₁ e C), polissacarídeos, minerais (sódio, potássio e fósforo), de 4 a 20% de fibra e seu conteúdo (peso fresco) de carboidratos oscila entre 51 a 88 % (BERMÚDEZ *et alli*, 2003).

Estudos realizados por Furlani; Godoy (2005), mencionam que são conhecidas aproximadamente 2000 espécies comestíveis e 25 delas são cultivadas comercialmente, entre as quais quatro são as mais cultivadas e consumidas no Brasil: champignon-de-Paris (*Agaricus bisporus*), shiitake (*Lentinula edodes*), shimeji ou hiratake (*Pleurotus spp.*) e cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei*).

Além dos valores nutricionais, os cogumelos vêm se destacando devido as descobertas científicas acerca de produtos naturais produzidas por esses fungos que abrangem desde compostos que desempenham atividade antitumoral, imunomodulatória, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais e produção de enzimas, reguladores de crescimento, flavorizantes e aromas (BRIZUELA *et alli*, 1998; DONINI *et alli*, 2006).

Atualmente os cogumelos estão sendo mais uma alternativa protéica que está contribuindo para a melhoria da qualidade de vida de populações de países pobres e com altos índices de desnutrição (MUSHWORLD, 2005; SPINOSA, 2008).

Os estudos acerca da utilização de basidiomicetos são bastante recentes no mundo e está começando a despertar interesse no Brasil. Sabendo-se que a biodiversidade brasileira é uma das fontes de recursos a ser melhor conhecida e estudada, existe um grande potencial de aplicação de espécies de fungos nativos do Brasil a ser pesquisado para dar solução a problemas ambientais de nossas regiões (BONATTI *et alli*, 2003).

O quadro 1 abaixo apresenta as principais espécies de cogumelos que são produzidas em larga escala no mundo ou em alguns países (CHAKRAVARTY, 2011; DE MENEZES, 2014).

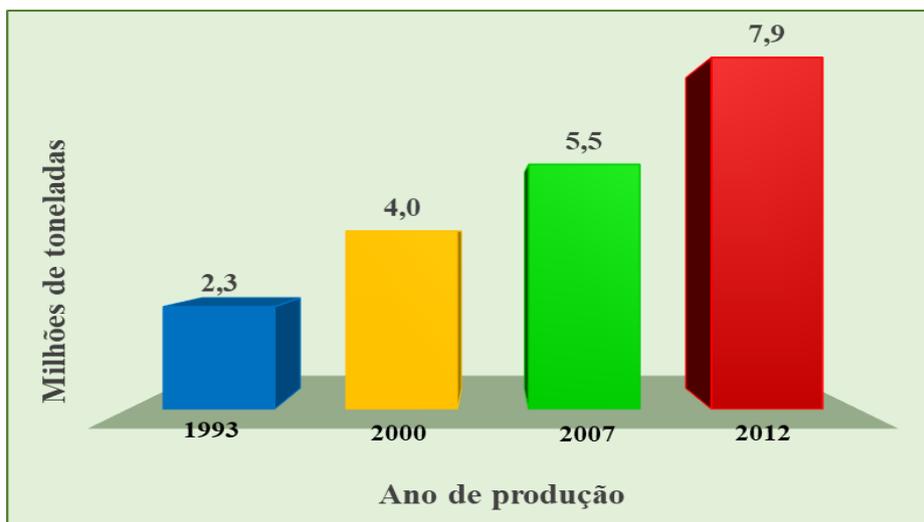
Nome comum	Nome científico	Área de produção
Cogumelo branco, marrom, botão	<i>Agaricus bisporus</i>	Mundial
Shiitake	<i>Lentinula edodes</i>	Mundial
Ostra	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mundial
Cogumelo palha	<i>Volvariella volvacea</i>	Ásia
Enokitake	<i>Flammulina velutipes</i>	Japão, Taiwan, China, América do Norte
Maitake	<i>Grifola frondosa</i>	Japão, China, América do Norte
Nameko	<i>Pholiota nameko</i>	Japão, China
Stropharia vermelho-vinho	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Europa
Shiimeji	<i>Lyophyllum decastes</i>	Japão, China, América do Norte
Kuritake	<i>Naemataloma sublaterium</i>	Japão
Kukirage	<i>Auricularia auricula</i>	Ásia
Fungo geléia branca	<i>Tremella fuciformis</i>	China
Reishi ou Ling Zhi	<i>Ganoderma lucidum</i>	China, Japão, Coreia
Fungo lagarto	<i>Cordyceps sinensis</i>	China
Trufa de verão	<i>Tuber aestivum</i>	Europa, Nova Zelândia, Austrália

Quadro 1

Produção de espécies de cogumelos em larga escala no mundo ou em alguns países.

FONTE: Chakravarty (2011); De Menezes (2014).

A FAO STAT (2014) referida por Vieira (2016), publicou que a produção mundial de cogumelos nos últimos 19 anos aumentou mais de 60% (Quadro 02). Em 1993 iniciou-se com uma produção de 2,3 milhões de toneladas e até o 2012, a produção de cogumelos e trufas foi cerca de 7,9 milhões de toneladas.



Quadro 02
Produção mundial de cogumelos nos últimos 19 anos (período de 1993 – 2012)
FONTE: Vieira (2016)

2.2. Biodegradação e reciclagem de matéria orgânica

Um dos processos mais importantes, do ponto de vista econômico, é a utilização de fungos na conversão de resíduos lignocelulósicos em cogumelos comestíveis. Após degradação por basidiomicetos, os substratos podem ser reciclados misturando-se a outros materiais orgânicos, fertilizando o solo e/ou como forragem para ruminantes tornando-se mais digerível e com maior teor protéico (COELHO *et alli*, 2001; HERNANDEZ *et alli*, 2006; SILVEIRA *et alli*, 2005).

Sendo que a maioria das espécies de basidiomicetos utiliza os componentes da madeira para seu crescimento destacam-se dois grandes grupos: 1) fungos causadores de podridão branca (degradam celulose, hemicelulose e lignina) e 2) fungos causadores de podridão parda (degradam celulose e hemicelulose) (MATHEUS; OKINO, 1998).

O cultivo de fungos comestíveis está sendo uma alternativa biotecnológica para a transformação de substratos agrícolas e agroflorestais em um alimento altamente nutritivo ao mesmo tempo saboroso e suave (DIAS *et alli*, 2003; FERNANDO *et alli*, 2005; KÜES; LIU, 2000).

Segundo Bonatti *et al* (2003); Furlan *et al* (2000); Tonini (2004), os resíduos lignocelulósicos representam a fonte orgânica de maior abundância no planeta. Estima-se que 70% da produção agrícola e florestal não têm aproveitamento e somente 1,25% dessa biomassa está sendo usada para a alimentação humana embora ocorram perdas em torno de 9% na colheita, pós-colheita e no beneficiamento.

No quadro 03, estão citados os basidiomicetos mais cultivados no mundo e os tipos de substratos específicos para cada um deles. Observa-se que a maioria desses organismos utiliza substratos ricos em celulose, lignina e hemicelulose suplementados de fontes nitrogenadas, como os farelos de cereais.

Espécie	Nome popular	Produção em 1991 (x 1.000 t)	Substratos utilizados
<i>Agaricus bisporus</i>	champignon	1.590	Composto a base de palha e esterco
<i>Lentinula edodes</i>	shiitake	526	Toras ou serragem esterilizada suplementada com farelo de cereais
<i>Pleurotus spp.</i>	cogumelo gigante	917	Vários resíduos lignocelulósicos
<i>Auricularia spp.</i>	orelha de judeu	465	Toras ou serragem esterilizada suplementada com farelo
<i>Volvariella volvacea</i>	cogumelo de palha	253	Palha de arroz, folhas de bananeiras ou resíduos de algodão
<i>Flammulina velutipes</i>	-	187	Serragem esterilizada suplementada com farelo

Quadro 03

Espécies de cogumelos comestíveis mais cultivadas no mundo e substratos comumente utilizados no cultivo.

FONTE: Chang (1996).

Atualmente devido ao aumento da demanda mundial por alimentos a biotecnologia industrial tem procurado novos procedimentos biotecnológicos que incluam um adequado rendimento, com menos produção de resíduos e eficiente bioconversão de substratos agroindustriais em proteína para consumo do homem e animais com o uso de cogumelos como excelentes decompositores de tecidos lignocelulósicos (VIEIRA, 2016).

Uma constante preocupação é que apenas 60 milhões toneladas de resíduos agrícolas são reaproveitados e o restante é queimado. Com esse volume seria possível produzir 600 milhões de kg de cogumelos já que cerca de 30% da população da Terra, têm deficiência de proteínas, e como a taxa média de proteína encontrada nos cogumelos varia de 19% a 39%, eles poderiam ter a função de suprir deficiências nutricionais (DUPRAT, 2015).

Da mesma forma na Amazônia, a atividade agrícola gera grandes quantidades de resíduos agrofloretais como casca e farelo de arroz resultado do processamento do arroz entre os quais o farelo ou cuim de arroz vem sendo usado como suplemento alimentar para aves e suínos.

Além disto, a fruticultura regional tem no cupuaçuzeiro o seu mais típico representante, cujo fruto é apreciado pela população amazonense e consumido na forma de sucos, doces, geléias, etc. Deste fruto todo é aproveitado, desde a casca, que normalmente é descartada é usada como adubo. Um projeto que utiliza a casca como fonte de biomassa para produzir energia está em fase de teste em uma comunidade do Amazonas (EMBRAPA, 2008).

Com o exposto anteriormente, o uso dos recursos naturais deve-se fazer de forma a contribuir com a minimização de impactos ao meio ambiente, gerando a sustentabilidade e garantir a satisfação de necessidades humanas a curto, médio e longo prazo (COELHO *et alli*, 2001).

Assim, pretende-se manter os resíduos dentro da capacidade de assimilação do sistema, explorar a uma taxa compatível com capacidade de regeneração dos recursos naturais renováveis e desenvolver substitutos renováveis para os recursos não renováveis (GONZÁLES, 2005).

2.3. Fermentação semi-sólida

O desenvolvimento tecnológico mundial aplicado aos processos biotecnológicos avança cada vez mais, devido ao surgimento de processos que envolvem tecnologias de baixo custo energético, com menos impacto ambiental e que utiliza matérias primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de sub-produtos da agroindústria. Como consequência à substituição de processos químicos convencionais por processo enzimáticos torna-os importantes (COELHO *et al*, 2001; TERZI *et al*, 2005).

Nesse contexto, um processo seguro e opcional de baixo custo, é a fermentação semi-sólida. Trata-se de tecnologia adaptada ao crescimento microbiano, no qual os microrganismos desenvolvem o ciclo vital em substrato sólido, na ausência de água livre e reproduzem o processo microbiológico natural (CHEN *et alli*, 2003; TEIXEIRA, 2007).

Este processo apresenta diversas vantagens em relação aos cultivos em meio líquido, dentre as quais, têm destaque o tipo de fermentador de menor volume, gastos menores de energia para esterilização, aeração, menor custo em equipamentos e manutenção para promover a agitação e homogeneização, baixos custos de recuperação do produto, desidratação e meio menos favorável à contaminação bacteriana (SCHMIDT *et alli*, 2003; TORRES, 2007).

Entre os fungos mais usados em processos fermentativos semi-sólidos para obtenção de produtos ricos em proteínas, aminoácidos, enzimas e vitaminas, têm destaque *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosus*, *Auricularia auricula*, *Cordyceps sinensis*, *Tremella fuciformis*, *Flamulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e certas espécies do gênero *Saccharomyces*, *Hansenula* e *Pichia* (HERRERA, 2001).

2.4. Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus*

As espécies de *Pleurotus* (Fig. 1) e *Lentinus* (Fig.2) têm se mostrado ser mais eficientes decompositores de substratos lignocelulósicos em estado sólido. Na literatura são citados aspectos medicinais e terapêuticos destes cogumelos devido a um grande número de compostos biologicamente ativos que já foram isolados e purificados, assim como, de enzimas que podem ser usadas para diversas aplicações biotecnológicas e ambientais (COHEN *et alli*, 2002).

2.4.1. Considerações taxonômicas dos gêneros utilizados na pesquisa

Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) P. Kumm.

Kirk *et al* (2011) citado por Vieira (2016), menciona a seguinte classificação taxonômica para *P. ostreatus*:

Reino: Fungi

Divisão: Basidiomycota

Classe: Homobasidiomycetes

Ordem: Agaricales

Família: Pleurotaceae

Gênero: *Pleurotus*

Espécie: *P. ostreatus*.

Menolli *et al* (2010), nos seus estudos de isolamento de espécies do gênero *Pleurotus* utilizando morfologia e sequência de DNA para facilitar a identificação de *P. ostreatus*, obteve a seguinte descrição:

Píleo ligeiramente infundibuliforme, branco, creme ou acinzentado, em alguns casos cinzento escuro quando jovem, superfície lisa, margem lisa ou ocasionalmente lobada. Estipe lateral-excêntrica, creme, superfície lisa. Lamela decorrente, da mesma cor com o estipe, borda lisa, lamelas presentes. Esporo branco a cremoso-acinzentado. Basidiósporos cilíndricos, paredes finas, hialinos, lisos, inamilóides. Basídio, clavado, com quatro esporos. Numerosos basidiomas. Pleurocistídio não observado. Cheilocistídio subventricoso, ventricoso ou subclavado. Lamela trama irregular, composta de hifas de paredes grossas ou finas, hialinas, septadas, com grampos. Píleo contexto indiferenciado, composto de hifas de paredes espessas, com grampos. Pileipellis indiferenciado.

O gênero *Lentinus*=*Lentinula*

Segundo Kirk *et al* (2008) mencionado por Lipreri (2012), a classificação taxonômica atual para *Lentinus edodes* é:

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Subfilo: Agaricomycotina

Classe: Agaricomycetes

Ordem: Agaricales

Família: Marasmiaceae

Gênero: *Lentinus*

Espécie: *Lentinus edodes*.

Barros (2009), nos seus experimentos químicos com *Lentinus strigellus* descreve ao gênero *Lentinus* como:

Macrofungo caracterizado por possuir basidioma clicibóide, pinelado, pinelado, estipado e lamelado, firme; estipe excêntrico a subcentral confluyente com o píleo; sistema hifal dimítico; lamelas finas, duras, geralmente serrilhadas; basidiósporos hialinos, elípticos e lisos. Basidiocarpos são frequentemente duros, com consistência quase que lenhosa e são mais persistentes que os membros típicos dos Agaricales.



Figura 1 – *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer
Fonte: CASTILLO, 2008



Figura 2 – *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo (1994)
Fonte: CASTILLO, 2006.

2.4.2. Alguns aspectos sobre a obtenção da cepa de *L. citrinus* (Walley & Rammeloo)

L. citrinus URM 2672 foi inicialmente isolado no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e identificado pela micologista Dra. Maria Auxiliadora Cavalcante.

Posteriormente, incorporado no acervo da Micoteca URM da Rede Norte e Nordeste de coleções de culturas de microrganismos, (RENNEBRA), uma rede multi-institucional da qual fazem parte as Coleções de Culturas Micoteca URM/UFPE, UFPEDA/UFPE, DPUA/UFAM, CCMB/UEFS, LAPEM/UEFS, em 2005.

A RENNEBRA proporcionou o intercâmbio de uma cepa de *L. citrinus* fornecido para estudo em nível de pós-graduação a Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). Atendendo a legislação da RENNEBRA, a cultura desse cogumelo foi incorporada no acervo da Coleção de Culturas DPUA, sob o número *L. citrinus* DPUA 1535 (KIRSCH, 2009).

2.5. Princípios bioativos em fungos macroscópicos

A busca de princípios bioativos (enzimas, antibióticos, aminoácidos, ácidos e outros) de microrganismos é uma das áreas em que mais se investe nos países desenvolvidos, principalmente nas pesquisas de bioprospecção realizadas na indústria farmacêutica (PINTO *et alli*, 2002).

2.5.1. Enzimas

Enzimas são catalisadores orgânicos, responsáveis pelos milhares de reações bioquímicas envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos. Esses compostos apresentam ampla utilização: enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos, papel, celulose, têxtil e produtos de limpeza), enzimas para alimentos (produção de néctares, queijos) para bebidas (extração e clarificação de sucos de frutas e vinho) e enzimas para ração animal (NEVES *et alli*, 2006; ORLANDELLI *et alli*, 2012; TERZI *et alli*, 2005).

Na medicina, várias enzimas têm ação antibiótica ou anti-inflamatória (lisozima, bromelina, hialuronidase e outras), as que auxiliam a terapia da leucemia (L-asparaginase) ou facilitam a digestão (papaína, tripsina, etc). Também são usadas na síntese de fármacos como a penicilina (Penicillium-acilase), no diagnóstico e prognóstico de doenças e o acompanhamento do tratamento por meio da detecção de enzimas em análises laboratoriais (ARANGO *et alli*, 2004; MUSSATTO *et alli*, 2007).

Os microrganismos são a principal fonte de enzimas de aplicação industrial que podem ser obtidas de animais e vegetais, porém como é possível modificar geneticamente os microrganismos para que forneça qualquer enzima, a tendência é substituí-las pelas de origem microbiana (MONTEIRO; SILVA, 2009; ORLANDELLI *et alli*, 2012).

O mercado mundial de enzimas industriais é estimado hoje em US\$ 3,7 bilhões anuais. No Brasil, em 2005, houve uma movimentação de US\$ 147 milhões, entre as quais as importações atingiram o 86% e o 14% de exportações de enzimas. Sendo as mais importadas as amilases (US\$ 4 milhões) e as proteases (US\$ 2,5 milhões) (MONTEIRO; SILVA, 2009; MUSSATTO *et alli*, 2007).

No campo da comercialização de enzimas, o Brasil torna-se, basicamente consumidor de produtos importados, apesar de ser um país que dispõe de fontes naturais em especial os fungos, organismos responsáveis pela produção de compostos bioativos e pelo desencadeamento de reações de biotransformação, processos que proporcionam a obtenção de compostos ou produtos cujo resultado final contribui para melhoria da qualidade de vida do homem (ORLANDELLI *et alli*, 2012; PINTO, 2002).

Por tanto, é vantajoso usar enzimas porque elas são naturais, não tóxicas e específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de variados tipos de resíduos, contribuindo a reduzir a poluição ambiental (CHEN *et alli*, 2003).

2.5.2. Metabólitos secundários

Além das enzimas, a natureza também é fonte de uma ampla variedade de moléculas bioativas que podem ser utilizadas como base para o desenho e a formulação de novas gerações de medicamentos com o objetivo de solucionar diversos problemas de saúde, isto é, a busca de novos fármacos com maior espectro, menor efeitos colaterais e menor custo que os existentes (ARANGO *et alli*, 2004).

Neste contexto, os produtos naturais isolados de fungos, bactérias e actinomicetos (bactérias filamentosas) de uma forma geral, têm uma importância sem precedentes como medicamentos (antibióticos), menos danosos à saúde humana (PINTO *et alli*, 2002).

Os antibióticos, compostos de diferentes famílias químicas, são tóxicos para microrganismos, isto é, interferem de forma seletiva nos processos metabólicos dos microrganismos. São compostos do metabolismo secundário de fungos e bactérias do grupo dos actinomicetes (BROCK *et alli*, 2000; DEACON, 1997; MATEOS, 2004).

Quanto ao efeito sobre os microrganismos, os antibióticos podem ter ação bactericida quando causam alterações que levam à morte das bactérias e bacteriostática quando inibem a reprodução sem que haja morte imediata do microrganismo, estas ações dependem da concentração do antibiótico e da sensibilidade dos microrganismos a esse composto assim como o efeito pode ser reversível com a retirada do antibiótico (MURRAY *et alli*, 2000).

Dentre os microrganismos, os fungos sintetizam uma variedade de biocompostos, como as ciclosporinas, ácido fusídico, alcalóides e compostos antifúngicos, etc. A partir do aumento do número de microrganismos resistentes aos antibióticos comerciais, os basidiomicetos vêm tornando-se uma alternativa como fontes de novos antibióticos com diferentes tipos estruturais e novos modos de ação (STAMETS, 2002; SUAY *et alli*, 2000).

Desde os tempos passados os basidiomicetos e seus metabólitos como o levostatin (*Pleurotus florida*), pleuroteryn (*Pleurotus eryngii*), lentinan (*Lentinus edodes*), krestin (*Trametes versicolor*) e Schizophylan (*Schizophyllum commune*) têm sido explorados e usados na medicina popular no tratamento de diversas doenças humanas, especialmente pelas propriedades antibióticas, antioxidantes, anticancerígenas e antitumorais (NAYANA; JANARDHANAN, 2000).

Conforme Law (2001) citado por Herrera (2001), relacionou as espécies de cogumelos medicinais, cultivados para a indústria de *Health Food*, na América do Norte, Ásia e Europa, como apresentado no quadro 4.

1. <i>Ganoderma lucidum</i> (Reishi)	7. <i>Grifola frondosus</i> (Maitake)
2. <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	8. <i>Auricularia auricula</i>
3. <i>Cordyceps sinensis</i>	9. <i>Coriolus versicolor</i>
4. <i>Tremella fuciformis</i>	10. <i>Polyporus umbellatus</i>
5. <i>Poria cocos</i>	11. <i>Flamulina velutipes</i>
6. <i>Hericiium erinaceus</i>	12. <i>Schizophyllum commune</i>

Quadro 4

Cogumelos cultivados com finalidades medicinais

FONTE: HERRERA (2001).

2.5.3. Atividade antimicrobiana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Quéf. cv. Florida, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns

Cogumelos são alimentos e fontes de diversos produtos com propriedades terapêuticas. No cenário mundial, os cogumelos têm destaque principalmente as espécies nativas comestíveis que podem ser novas fontes promissoras de diversos compostos bioativos para uso medicinal (LINDEQUIST *et alli*, 2005; RAI *et alli*, 2005)

Entre os biocompostos, os antibióticos representam um grupo importante de metabólitos secundários que compreendem diferentes padrões moleculares para aplicação no tratamento de diversas doenças infecciosas causadas por microrganismos. Portanto, pesquisas recentes despertaram interesse em grupos de microrganismos que ainda não foram estudados minuciosamente (KARWA; RAI, 2012; ROKEM *et alli*, 2007; ROUPAS *et alli*, 2012).

O uso indiscriminado de compostos antibacterianos tem contribuído para o aumento de microrganismos multirresistentes às drogas, condição que tem proporcionado o desenvolvimento de pesquisas para isolar e identificar substâncias de diferentes tipos estruturais e novos modos de ação contra microrganismos patogênicos (EFREMENKOVA *et alli*, 2003).

Os cogumelos, *L. citrinus* e *N. lepideus*, são espécies comestíveis que têm distribuição geográfica mundial que causam respectivamente podridão branca e parda. O resultado de investigação realizada com *L. citrinus* mostrou o seu potencial proteolítico (KIRSCH *et alli*, 2011).

O *N. lepideus* além de ser uma excelente fonte de nutrientes pode induzir a hematopoioses, atuar como imunomodulador, antitumoral, antioxidante, antitirosinase, profilático contra a hipercolesterolemia, hiperlipidemia e complicações relacionadas que são os fatores de risco da aterosclerose; atualmente vários estudos têm mostrado que produz inibidores naturais de óxido nítrico capazes de proteger de doenças inflamatórias e câncer, e compostos com atividade antidiabética (JIN *et alli*, 2003; JUNG *et alli*, 2008; LEE *et alli*, 2008; LI *et alli*, 2013; OCAÑAS *et alli*, 2016; YOON *et alli*, 2011).

No caso de *P. ostreatus* ele é capaz de inibir a atividade do HIV-1, vírus da Hepatite C, ajudar na síntese de nano partículas de prata com aplicações em setores de saúde, estimular o sistema imunológico, aumentar a atividade de antioxidantes, evitar hipertensão arterial e aterosclerose. Além disso, possui efeitos hipoglicemiantes, antitrombótico, anticataractogênico *in vivo*, anti-inflamatório, relaxamento muscular e industrialmente usado para micorremediação (AL-BAHRANI *et alli*, 2017; BAUEROVÁ *et alli*, 2009; DOS SANTOS *et alli*, 2013; EL-FAKHARANY *et alli*,

2010; GUZMÁN-DÁVALOS; BARAJAS, 2014; ISAI *et alli*, 2009; WANG; NG, 2000).

Em adição, *P. ostreatus* cv. Florida, expressa atividade antitumoral, imunomoduladora, antinociceptiva, antiinflamatória, analgésica, agregação antiplaquetária, hipolipidêmica e hepatoprotetora. Também atua na eliminação de radicais oxidrilos, inibem a peroxidação lipídica, auxilia na biossíntese de nanopartículas de prata, prevenindo a formação de cataratas nos testes *in vivo* e atuando na biorremediação de efluentes da indústria têxtil (BHAT *et alli*, 2011; GANESHPURKAR *et alli*, 2011; GANESHPURKAR; RAI, 2013; JOSE *et alli*, 2004; RANA *et alli*, 2012; SATHISHKUMAR *et alli*, 2013).

2.6. Nutraceuticos e nutriceuticos

Os cogumelos são macrofungos alimentícios funcionais e uma fonte fisiologicamente benéfica de produtos medicinais não tóxicos com diversas propriedades farmacológicas para prevenir e tratar várias doenças. Eles podem ser consumidos desidratados ou frescos (*nutraceuticos*) ou em forma de cápsulas e suplementos dietéticos. Já os fármacos são usados terapeuticamente com acompanhamento médico e administrado por via oral, tópica ou injetável (*nutriceuticos*) (STAMETS, 2002; URBEN, 2007).

A venda anual mundial desses produtos no mercado internacional foi avaliada em cerca de 1,6 bilhões de dólares, sendo *Ganoderma lucidum* como o cogumelo mais vendido no mundo cujos princípios ativos as glucanas, estão sendo mais estudados pelos cientistas pelo aporte à imunoterapia, dentro da medicina complementar, assim

como atividades antitumorais, anticolesterol, anti-AIDS, etc, vem sendo comercializadas nos países asiáticos e europeus (URBEN, 2007).

Após o conhecimento do potencial de alguns metabólitos secundários com atividade antimicrobiana em diversos organismos, é importante realizar programas de bioprospecção que, a longo prazo, contribuirão no melhoramento da grande variedade de fármacos antimicrobianos disponíveis (ARANGO *et alli*, 2004).

3 METODOLOGIA

3.1. Cultivo dos basidiomicetos em meio sólido

Nesta pesquisa foram utilizados *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534, basidiomicetos cedidos pela Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco (Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil- RENNEBRA). As culturas preservadas sob óleo mineral foram reativadas em ágar batata dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v), mantidas a 25 °C, sem luminosidade, por oito dias (ROLLAN, 2003).

3.2. Determinação das condições de cultivo das espécies de *Pleurotus* e *Lentinus* em meios natural e complexo.

O cultivo das espécies de *Pleurotus* e *Lentinus* foi realizado em ágar batata dextrose (BDA), pH 5,6; ágar Sabouraud acrescido de extrato de levedura 0,5% (p/v) (SAB+YE), pH 5,6 ambos suplementados com cloranfenicol (0,2 mg/L), em placa de Petri (90 mm de diâmetro) e ágar farelo de arroz, pH 6,0. O extrato de farelo de arroz (1:2 g/mL) foi obtido por cocção desse resíduo em água por 10 minutos.

Após semeadura do fragmento de cultura medindo 5 mm de diâmetro, os cultivos foram mantidos com e sem luminosidade, à temperatura de 25 °C e 28 °C por 8, 15 e 30 dias.

3.3. Avaliação da velocidade do crescimento radial micelial das espécies de *Pleurotus* e *Lentinus* sob diferentes condições de cultivo.

A velocidade de crescimento radial foi registrada em milímetros, medindo o diâmetro da colônia a cada 24 horas durante 8, 15 e 30 dias (FAN et al., 2006). Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata. A VCR (mm/dia) foi determinada segundo a formula:

$$VCR = \frac{\text{diâmetro da colônia (mm)}}{\text{tempo de cultivo (dia)}}$$

3.4. Detecção da atividade antimicrobiana em meio sólido

A verificação do potencial antimicrobiano de *L. citrinus* DPUA 1535, *N. lepideus* DPUA 1536, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534, foi realizado utilizando o Método do Bloco de Gelose frente aos microrganismos-teste, *Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501; *Aspergillus flavus* DPUA 1836; *Escherichia coli* DAUPE 224 e *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607.

3.4.1. Cultivo dos microrganismos-teste

Para os testes de antibiose, *Candida albicans* e *Cryptococcus laurentii* foram cultivados em ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (0,2 mg/L), a 25 °C por 24 horas e *Aspergillus flavus* em ágar Czapek (Cz), a 25 °C por sete dias. *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis* foram cultivados em ágar nutritivo (AN), a 37 °C por 12 horas.

Nas culturas das leveduras e bactérias foi preparada uma suspensão celular e de esporos com solução salina de concentração semelhante ao nº 1 da escala Mac Farland. De cada suspensão celular, 200 µL foi retirado para ser semeado na superfície de ágar nutritivo e ágar Sabouraud, respectivamente, de forma a se obter uma camada uniforme.

Seguido a este procedimento, para detecção da atividade antimicrobiana foi realizada a inoculação de discos das culturas dos cogumelos medindo cinco milímetros de diâmetro. Os discos foram retirados da área central das culturas dos basidiomicetos obtidas durante 15 e 30 dias, em BDA, SAB acrescido de YE e ágar sacarose extrato de levedura (YES). Rifampicina e Griseofulvina foram utilizados como padrão para as bactérias e fungos, respectivamente.

Os testes de antibiose foram realizados a 37 °C por 18-24 horas (bactérias), 25 °C durante 48 horas (leveduras) e a 25 °C por sete dias (*Aspergillus*). A atividade antimicrobiana foi verificada observando a presença ou ausência de formação de halos de inibição (LARPENT; SANGLIER, 1989) e classificada como bacteriostático (BA): aquelas culturas com crescimento após formação de halo e; bactericida (BI): aquelas culturas com formação de halo e sem crescimento durante o período de incubação.

3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.5.1. Maceração com solventes orgânicos para obtenção dos extratos

Os extratos de *L. citrinus*, *P. ostreatus*, *P. ostreatus* cv. Florida foram preparados a partir da massa micelial cultivadas em BDA com 8 dias de crescimento e de *N. lepidus* com 15 dias de crescimento. Após esse período discos de 5 mm de diâmetro foram cortados da colônia em BDA utilizando um furador esterilizado e

transferidos para frascos Erlenmeyer onde foram submetidos à extração sucessiva com solventes orgânicos nas seguintes proporções: metanol/acetona P.A. [2:1], hexano/acetato de etila P.A. [1:2] e acetato de etila P.A. Um total de 20 discos miceliais para cada 30 mL de solvente em frasco de Erlenmeyer foram deixados para extração por maceração durante 72 horas sob temperatura ambiente.

3.5.2. Filtração, concentração e solubilização dos extratos obtidos

Os extratos foram filtrados, concentrados sob pressão reduzida em um evaporador rotatório, secados na capela de exaustão e estocados a 4° C até serem usados no teste. Antes de iniciar os ensaios biológicos esses extratos foram pesados e solubilizados em etanol a 70% e dimetil sulfóxido DMSO P. A. na proporção 1:4 para obtenção dos extratos a 1% (v/v). Finalmente, os extratos foram filtrados em membrana polietersulfônica (0,22 µm) para frascos de vidro estéreis e armazenados sob refrigeração para posterior utilização.

3.5.3. Microorganismos – Teste

Reativação das culturas

Foram utilizados os microrganismos-teste que expressaram atividade antimicrobiana em meio sólido como: *Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501, *Escherichia coli* DAUPE 224 e *Micobacterium smegmatis* ATCC 607. As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud com Cloranfenicol (0,2 mg L), a 25 °C por 48 horas, e as bactérias em ágar Muller-Hinton e Ágar BHI, a 37 °C por 24 horas.

Nas culturas das leveduras e bactérias foi preparada uma suspensão de células com água destilada esterilizada de turbidez igual ao N^o. 1 da escala de Mac Farland e como controle positivo foi utilizado Rifampicina para as bactérias e Itraconazol para as leveduras.

3.5.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos da massa micelial de *L. citrinus*, *N. lepideus*, *P. ostreatus* e *P. ostreatus* cv. Florida.

A atividade foi avaliada pelo Método de Microdiluição em Microplacas de 96 orifícios (ANDRIOLI, 2008) utilizando-se os indicadores de viabilidade celular Resazurina para bactérias (ARANTES *et alli*, 2005; SARAIVA, 2012) e TTC (Cloro de Trifenil Tetrazolico) Sigma Aldrich para leveduras (SANTOS *et alli*, 2007).

Nas placas foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud, Muller-Hinton e BHI respectivamente e 100 µL dos extratos orgânicos a 1% (p/v) na coluna n^o 1 (controle negativo do extrato) e a coluna 2, a partir da coluna 2 procedeu-se a homogeneização e diluição até a coluna 11 transferindo-se 100 µL para o poço seguinte de forma sucessiva e na última coluna foi descartado 100 µL.

Os extratos foram diluídos nas microplacas iniciando-se da maior para menor concentração, ou seja de: 1,0 até 0,0019%. Na coluna n^o 12 foram adicionados 100 µL de Itraconazol 10 mg/mL e de Rifampicina 0,01 mg/mL como controle positivo e o extrato orgânico como controle negativo, homogeneizados com o meio líquido e descartados 100 µL do volume.

Em seguida, foram adicionados 100 µl de cada suspensão celular dos microrganismos teste nos poços da coluna 2 a 12 e 20 µl de Resazurina e TTC. As placas foram protegidas com papel alumínio esterilizado e incubadas a 37 °C por um

período de 24 horas (bactérias) e 48 horas (leveduras), sendo as leituras realizadas na 1^a, 4^a e 24^a hora de incubação.

A cor azul no poço foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa como de viabilidade e multiplicação celular (Arantes *et alli*, 2005). Nos testes de atividade realizados com as leveduras foram considerados resultado positivo na ausência de coloração e negativo na presença da cor rosa avermelhado em período de 24 horas de incubação (Santos *et alli*, 2007).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da droga capaz de prevenir a alteração de cor do reagente Resazurina e TTC.

3.6. Avaliação do desenvolvimento micelial vertical com fitas milimetradas de *L. citrinus*, *N. leptideus*, *P. ostreatus* e *P. ostreatus* cv. Florida cultivados nos substratos selecionados

Os resíduos para os cultivos no estado sólido foram utilizados na razão 1:1 ou 2:1, na seguinte composição: Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz (CC+CA); Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz (CC+FA), uniformemente distribuídos em frasco de vidro transparente, cilíndricos, com capacidade de 1 L. Em cada frasco contendo 200 g de substrato, a umidade foi corrigida para 60% com água de torneira e o pH aferido para 6,0, com solução de carbonato de cálcio 1% (p/v).

Em cada vidro, a tampa foi perfurada (diâmetro= 10 mm), procedendo-se o tamponamento com algodão hidrófobo e a esterilização a 121 °C por 90 minutos durante dois dias consecutivos.

Seguido do resfriamento dos substratos, em cada frasco foram inoculados, superficialmente, 12 discos de 10 mm de diâmetro das culturas de *L. citrinus*, *N. leptideus*, *P. ostreatus* e *P. ostreatus* cv. Florida.

A fermentação foi conduzida a 25 °C, sem luminosidade por 15 dias, em condições estacionárias.

A umidade relativa da sala de incubação foi mantida entre 60 e 70% e todos os cultivos foram realizados em triplicata. Em cada frasco foram colocadas quatro fitas milimetradas de 4 cm, em posições opostas, verticalmente e, o crescimento micelial foi determinado em centímetros, a cada 24 horas (ROSSI *et alli*, 2000; TONINI, 2004).

3.7. Produção de proteases por Fermentação no estado sólido

3.7.1. Organismos e condições de crescimento

Os cogumelos comestíveis neste estudo foram *L. citrinus*, *N. lepideus*, *P. ostreatus* e *P. ostreatus* cv. Florida, gentilmente cedidos pela Micoteca URM, através da RENNEBRA - Rede de Coleções de Culturas Norte e Nordeste, instalada na Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

As culturas preservadas em óleo mineral foram reativadas em BDA+YE 0,5% [ágar Batata Dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri de 100 mm x 15 mm e, mantidas a 25 °C, sem luminosidade por oito dias para obtenção de cultura-estoque.

A partir destes cultivos foi preparado o inóculo para a fermentação no estado sólido transferindo-se um disco de cultivo medindo 10 mm de diâmetro para BDA+YE 0,5% (p/v). As placas de Petri de 100 mm x 15 mm foram mantidas a 25 °C, sem luminosidade por oito dias.

3.7.2. Extração das enzimas proteolíticas do substrato fermentado

As proteases foram extraídas a 25 °C e a 36 °C, utilizando 250 mL de água destilada esterilizada e NaCl 2%, na razão 5:1 (água ou NaCl: substrato) sob agitação de 150 rpm. Após 30 minutos o extrato bruto foi recuperado por filtração em tecido de algodão e o sólido prensado manualmente para extração do líquido, seguindo-se a centrifugação a 8000 xg por 10 minutos, a 4 °C.

3.7.3. Determinação da atividade de proteases

Para a determinação da atividade proteolítica utilizou-se 150 µL do extrato bruto e como substrato 250 µL de azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. Após 60 minutos na reação mantida em câmara escura foi adicionada 1,2 mL de Ácido Tricloroacético 10 % (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000xg), a 4 °C por 10 minutos.

Do sobrenadante foi retirado 1,2 mL para ser adicionado a 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 1 absorbância/minuto em uma hora a 440 nm e expressa em U/mL (MOREIRA *et alli*, 2001). A atividade da enzima foi também expressa por unidades por grama de substrato sólido inicial (em base seca) (U/g^{-1}) e unidades por grama de substrato final seco (U/gss).

3.8. Produção de biomassa de *L. citrinus* nos resíduos agroindustriais selecionados por fermentação no estado sólido

3.8.1. Obtenção de cultura matriz e manutenção de *L. citrinus*

L. citrinus, a espécie selecionada no item 3.6 para a produção de basidioma em diferentes resíduos agrofloretais [Casca de cupuaçu (CC), casca de arroz (CA) e farelo de arroz (FA)], a cultura matriz foi obtida em ágar batata dextrose, a 25 °C, sem luz. Após oito dias, esses cultivos foram usados para obtenção de inóculo ou *spawn*.

3.8.2 Pedido de Registro de Patente

O presente estudo originou pedido de registro de patente do processo de produção de cogumelo comestível utilizando resíduos vegetais de cupuaçu, cogumelo comestível obtido e uso de resíduos vegetais de cupuaçu como substrato para crescimento de cogumelos no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o número de registro BR 000037 do 25 de Maio de 2011. Assim uma parte da metodologia que envolve as etapas de produção do inóculo (*spawn*), preparação de substrato para a produção de *L. citrinus*, indução da frutificação e colheita tem se tornado de caráter sigiloso.

Após dessas etapas os basidiomas foram pesados e submetidos a secagem a 40 °C, em estufa com circulação de ar. Finalizada a desidratação, o produto foi triturado em mini processador e embalado em potes de vidro hermeticamente fechado para a determinação da eficiência biológica, produtividade (DIAS *et alli*, 2003; ZANETTI; RANAL, 1997) e taxa de produção (HERNÁNDEZ, 2000)

Os procedimentos foram realizados em triplicata e submetidos aos cálculos das formulas a seguir:

$$\text{*Eficiência biológica (EB)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base úmida)}}{\text{massa do substrato (base seca)}}$$

$$\text{*Produtividade (P)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base seca)}}{\text{massa do substrato (base seca)}}$$

$$\text{*Taxa de Produção (TP)} = \frac{\text{eficiênciabiológica}}{\text{número total de dias de cultivo}}$$

Os resíduos agroflorestais (em base seca) também foram submetidos ao procedimento similar para caracterização da composição centesimal. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.9. Composição centesimal dos basidiomas de *Pleurotus* e *Lentinus* e dos substratos agroflorestais

As análises de composição centesimal e mineral foram realizadas no Centro de Apoio Multidisciplinar Divisão Central Analítica e no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

As amostras de basidiomicetos e de substrato agroflorestal utilizados nos experimentos foram submetidas às análises de composição centesimal em triplicatas segundo métodos da AOAC (1997) descritas a seguir:

-Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 60 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante.

-Proteína: foi determinada a concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* que consistiu em: 1) Digerir a matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado até a formação de sulfato de amônio. 2) Destilar o sulfato de amônio em destilador de nitrogênio e recolher em solução de ácido bórico como borato de amônio. 3) Titular o destilado com ácido sulfúrico a 0,2N. 4) Os resultados foram expressos em gramas de proteínas por 100g de amostra. A conversão de % N em proteína foi realizada aplicando o fator de conversão 6,26 para os substratos e 4,28 para os cogumelos por apresentarem componente nitrogenado proteico e não proteico (SCARIOT *et alli*, 2000; SILVA *et alli*, 2002; SILVA *et alli*, 2007).

-Cinzas (resíduo mineral fixo): as amostras dessecadas foram pesadas, carbonizadas a temperatura baixa e incineradas em mufla a 550 °C até obtenção de cinzas esbranquiçadas.

-Lipídios: as amostras dessecadas foram submetidas à extração com misturas de solventes a frio, pelo método *Bligh and Dyer*. Nesta técnica os solventes utilizados foram clorofórmio, metanol e água. A amostra foi misturada e a fase de clorofórmio que contém os lipídeos se separou após a evaporação do clorofórmio. A quantidade de lipídeos se obteve por pesagem e os resultados foram expressos em gramas por 100g de amostra.

-Carboidratos totais: foram estimados por diferença (100 – gramas totais de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibra alimentar) (LATINFOODS, 2002; NEPA 2006).

-**Energia:** a energia total metabolizável, expressa em kilocalorias (kcal), foi calculada pelo fator de conversão de *Atwater*: $(4 \times \text{g proteína}) + (4 \times \text{g carboidratos totais}) + (9 \times \text{g de lipídeos})$ (LATINFOODS, 2002; NEPA 2006).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinação do crescimento radial, os dados foram submetidos à análise de variância e o Teste de DUNCAN com nível de significância 5%, utilizando-se o *software* SAS System Release 6.12 no procedimento GLM. Os dados relativos ao crescimento micelial vertical e os obtidos da produção de *Lentinus citrinus* foram analisados pelo Teste de Tukey e ANOVA, com nível de significância de 5% (VALENTIN, 2000).

5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a composição dos meios de cultura, o tempo de cultivo, a luz e a temperatura influenciam significativamente no crescimento de *Pleurotus florida* URM 4066, *P. ostreatus* URM 4072, *Lentinus citrinus* URM 2672 e *Lentinus lepideus* URM 404, nos meios de cultura analisados.

Nas condições experimentais, esses cogumelos expressam atividade antimicrobiana contra a maioria dos fungos e bactérias testados, contudo *Lentinus citrinus* URM 2672 e *Lentinus lepideus* URM 404 não expressaram atividade antimicrobiana frente *Aspergillus flavus*.

Com relação ao potencial proteolítico, na maioria dos substratos observou-se resultado positivo, sendo que as maiores atividades foram determinadas no extrato bruto de *P. ostreatus* URM 2672 (24,0 U/g) e *L. citrinus* URM 2672 (22,0 U/g), obtidos solução de NaCl 2%, a 36 °C e com água destilada, a 25 °C.

Na produção de biomassa, as médias de eficiência biológica foram de 61,0% e 60% observadas em CC+CA [1:1 e 2:1], respectivamente, demonstrando a viabilidade do processo.

6. REFERÊNCIAS

AL-BAHRANI, R. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. *Materials Letters*. v. 186, p. 21-25, 2017.

ANDRIOLI, William Jonis. Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos. 2008. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ARANGO, A. C. M; SÁNCHEZ, J. G. B; GALVIS, L. A. B. P. Productos naturales con actividad antimicótica. *Ver. Esp. Quimioterap*. v. 17, n. 4, p. 325-331, 2004.

ARANTES, V. et al. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. *Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada*. v. 26, p. 195-198. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of A.O.A.C. International. 16a. ed. 3a. rev. A.O.A.C. International. Gaithersburg: MD, 1997. 858 p.

BARROS, Bartholomeu Araújo. Estudo químico do basidiomiceto *Lentinus strigellus*. 2009. 222 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BAUEROVÁ, K. et al. Study of new ways of supplementary and combinatory therapy of rheumatoid arthritis with immunomodulators glucomannan and immunoglukan in adjuvant arthritis. *Toxicol Ind Health*. v. 25, p. 329-335, 2009.

BERMÚDEZ, R. C; MORRIS, H. J; DONOSO, C; MARTÍNEZ, C. E; RAMOS, E. I. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas. La Habana-Cuba*. v. 22, n. 4, p. 226-231, 2003.

BHAT, R. et al. Photo-irradiated biosynthesis of silver nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus florida* and their antibacterial activity studies. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. doi: 10.1155/2011/650979, p. 1-7, 2011.

BONATTI, M; KARNOPP; SOARES, H.M; FURLAN, S.A. Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. *Revista Saúde e Ambiente*. v. 4, n. 1, p. 31-35, 2003.

BRIZUELA, M. A; GARCIA, L; PÉREZ, L; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micologia. La Habana-Cuba*, v. 15, p. 69-74, 1998.

BROCK, T. D; MADIGAN, M.T; MARTINKO, J. M; PARKER, J. Biology of microorganisms. New Jersey: Prentice Hall International Inc., 2000. 909 p.

CHAKRAVARTY, Bipasha. Trends in mushroom cultivation and breeding. Australian Journal of Agricultural Engineering. v. 2, n. 4, p. 102-109, 2015.

CHANG, S.; BUSWELL, J. Mushroom nutraceuticals. World Journal of Microbiological and Biotechnological. v. 12, p. 473-476, 1996.

CHEN, L. et al. Produção de enzimas proteolíticas neutras por fermentação fúngica em meio semi-sólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES. XIV SINAFERM, 2003. Florianópolis. Anais do XIV SINAFERM.

COELHO, M. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B. CEPPA. Curitiba. v. 19, n. 1, p. 33-42, jan/jun. 2001.

COHEN, R.; PERISKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushroom of the genus *Pleurotus*. Appl Microbiol Biotechnol. v. 58, p. 582-594, 2002.

DEACON, J. Modern micology. Oxon-NY: Blackwell Science. 1997. 303 p.

DE MENEZES, Thaís Almeida. Produção de basidiomas e enzimas ligninolíticas de *Ganoderma lucidum* em resíduos de licuri. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

DIAS, E. et al. Cultivo do Cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. Ciências Agrotécnicas. Lavras. v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DONINI, L.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 6, n. 2, p. 185-193, 2006.

DOS SANTOS, L. et al. Hypolipidemic and antiatherosclerotic potential of *Pleurotus ostreatus*, cultivated by submerged fermentation in the high-fat diet fed rats. Biotech Bioproc Engin, v.18, p. 201-208, 2013.

DUPRAT, Mariana Falcão. et al. Potencial nutritivo de cogumelos *Pleurotus ostreatus* cultivados em folhas de pupunheira. B. CEPPA, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 18-29, jan./jun. 2015.

EFREMENKOVA, O. et al. Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (Agaricomycetidae). Int J Med Mushrooms. v. 5, p. 37-41, 2003.

EL-FAKHARANY, E. et al. Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein Pept Lett.* v. 17, p. 1031-1039, 2010.

EMBRAPA. O cupuaçu: usos e potencial para o desenvolvimento rural na Amazônia. Disponível em: www.cpafrf.embrapa.br/index.php/cpafrf/artigos/o_cupua_u_usos_e_potencial_para_o_desenvolvimento_rural_na_Amazonia. Acesso em: 20 de Maio 2008.

FAN, L. et al. Effect of caffeine and tannins on captivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. *Brazilian Journal of Microbiology.* v. 37, n. 4, p. 420-424, 2006.

FERNANDO, Ana Luisa. et al. Valorização de resíduos agrícolas: produção de cogumelos do gênero *Pleurotus*. Alimentos do século XXI: matérias primas, processos e produtos. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS, Alimentos: Tradição e Inovação, Saúde e Segurança, 7, Viseu. 2005. Livro de resumos, pág. 241, Secção 3: Alimentos do século XXI: matérias-primas, processos e produtos. Instituto Politécnico de Viseu, Viseu. Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, SPQ, Viseu, 2005. p. 3-16.

FORTES, R.; NOVAES, M. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

FURLAN, S. et al. Influência da suplementação de palha de arroz na produção de *Pleurotus sajor-caju*. *Revista Saúde e Ambiente.* v. 1, n. 1, p. 60-63, 2000.

FURLANI, R.; GODOY, H. Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry.* v. 106, n. 2008, p. 816-819, 2008.

FURLANI, R.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Revi Inst Adolfo Lutz. Campinas.* v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

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

GANESHPURKAR, A. et al. *In vitro* prevention of cataract by oyster mushroom *Pleurotus florida* extract on isolated goat eye lens. *Indian J Pharmacol.* v. 43, p. 667-670, 2011.

GANESHPURKAR, A.; RAI, G. Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of Oyster mushroom *Pleurotus florida*. *Indian J Pharmacol.* v. 45, p. 66-70, 2013.

GONZÁLES, A. Aprovechamiento del bagazo del maguey verde (*Agave salmiana*) de la agroindustria del mezcal em San Luis Potosí para la producción de Hongo Ostra

(*Pleurotus ostreatus*). 2005. 116 p. Tesis de Maestro em Ciências Aplicadas (Ciências Ambientales). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis de Potosí.

GUZMÁN-DÁVALOS, L.; BARAJAS, I. Hongos y líquenes como bioindicadores y micorremediación. In: Zuarth CAG, Vallarino A, Jiménez JCP, Pfeng AML, editors. Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental. México DF: El Colegio de la Frontera Sur e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2014, p. 579-603.

HERNÁNDEZ, G. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. Revista Iberoamericana de Micología. v. 17, p. 20-24, 2000.

HERNANDEZ, R. et al. Bioconversão of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Appl Microbiol Biotechnol. v. 71, p. 432-439, 2006.

HERRERA, Ozana Maria. Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*: um enfoque de cadeia produtiva. 2001. 200 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

ISAI, M. et al. Anticataractogenic effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in an experimental model. Current Eye Research. v. 34, p. 264-273, 2009.

JIN, M. et al. Enhancement of repopulation and hematopoiesis of bone marrow cells in irradiated mice by oral administration of PG101 a water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. Exp Biol Med. v. 228, p. 759-766, 2003.

JOSE, N.; AJITH, T.; JANARDHANAN, K. Methanol extract of the Oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. Phytother Res. v. 18, p. 43-46, 2000.

JUNG, Y. et al. Immunomodulating activities of water-soluble exopolysaccharides obtained from submerged culture of *Lentinus lepideus*. J Microbiol Biotechnol. v. 18, p. 1431-1438, 2008.

KARWA, A.; RAI, M. Naturally occurring medicinal mushroom derived antimicrobials: a case study using Lingzhi or Reishi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes). Int J Med Mushr. v. 14, p. 481-490, 2012.

KIRSCH, Larissa de Souza. *Lentinus citrinus* (Walleyne e Rammeloo) DPUA 1535: crescimento, produção e extração de proteases por fermentação submersa. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) – Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

KIRSCH, L. et al. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushr.* v. 13, p. 185-192, 2011.

KÜES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* v. 54, n. 2, p. 141-152, 2000.

LARPENT, J.; SANGLIER, J. *Biotechnologie des antibiotiques.* Paris : Mason, 1989. 481 p.

LATINFOODS. 2002. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. Latinfoods website. Disponível em <http://www.fao.org/LAmerica/grupo.htm>. Acessado em: 20 de maio 2006.

LEE, W. et al. Factors influencing the production of water-soluble endopolysaccharides and exopolysaccharides from *Lentinus lepideus* and their effects on immune cytokine production. *J Microbiol Biotechnol.* v. 18, p. 560-567, 2008.

LEE, J.; BAIK, H.; PARK, S. Purification and characterization of two novel fibrinolytic protease from mushroom, *Fromitella fraxinea*. *Journal of Microbiology and Biotechnology,* v. 16, n. 2, p. 264-271, 2005.

LI, Y. et al. A new benzoquinone and a new benzofuran from the edible mushroom *Neolentinus lepideus* and their Inhibitory activity in NO production inhibition assay. *Food Chemistry.* v. 141, p. 1614-1618, 2013.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.; JÜLICH, W. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM.* v. 2, p. 285-299, 2005.

LIPRERI, Anaméli. Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para aumento da atividade extracelular de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas. 2012. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

MATEOS, P. Producción de antibióticos. Disponível em: [HTTP://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema15MI.html](http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema15MI.html). Acesso em: Fev de 2004.

MATHEUS, D.; OKINO, L. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. (org.). *Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos. Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.* São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 1998.184 p.

MENOLLI, N. et al. Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* v. 53, n. 2, p. 397-408, March-April. 2010.

MONTEIRO, Valdirene.; SILVA, Roberto. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos-SENAI, Goiânia, v. 3, n. 5, p. 9-23, jan/jun. 2009.

MOREIRA, K. et al. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. Brazilian Journal of Microbiology. v. 32, p. 215-220, 2001.

MOURA, L. Empresa de produção e comercialização de cogumelos no município de Videira-SC. Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2006, p. 82.

MURRAY, P. Microbiologia Médica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MUSHWORLD. Mushroom growers handbook 1. Oyster mushroom cultivation. Seoul: Mushworld, 2005.

MUSSATTO, S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. In: Revista Ciência Hoje. Bioterrorismo: uma ameaça real? v. 41, p. 28-33, 2007.

NAYANA, J.; JANARDHANAN, K. Antioxidant and antitumour activity of *Pleurotus florida*. Current Science. v. 79, n. 7, p. 941-943, 2000.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação–Tabela de Composição de Alimentos/ NEPA-UNICAMP. Campinas: São Paulo. 2006.

NEVES, K.; PORTO, A.; TEIXEIRA, M. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. Acta Amazônica. v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

OCAÑAS, L. et al. Insulin release activity of fraction II of aqueous extract of *Lentinus lepideus* from Northeastern Mexico in healthy and alloxan- induced diabetic rats. Abstracts/Toxicology Letters. v. 258S, p. 87S62-S324, 2016.

ORLANDELLI, Ravely Casarotti. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios: Rev. Saúde e Biol. v. 7, n. 3, p. 97-109, set/dez. 2012.

PINTO, A.; SILVA, D.; BOLZANI, V. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Quim. Nova. v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. Food Chemistry. v. 80, p. 371-375, 2003.

RAI, M.; TIDKE, G.; WASSER, S. Therapeutic potential of mushrooms. Natural Product Radiance. v. 4, p. 246-257, 2005.

RANA, T. et al. *Pleurotus florida* lectin normalizes duration dependent hepatic oxidative stress responses caused by arsenic in rats. Exp Toxicol Path. v. 64, p. 665-671, 2012.

- REDDY, G. et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1457-1462, 2003.
- REFFATTI, P. F. et al. Caracterização de resíduos de erva-mate para produção axênica de cogumelos. *Synergismus scyentifica*. v. 1, p. 771-778, 2006.
- ROKEM, J.; LANTZ, A.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep*. v. 24, p. 1262-1287, 2007.
- ROLLAN, G. *Cultivo de Setas y Trufas*. 4. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2003. 239 p.
- ROSA, L. et al. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.
- ROSSI, I.; MONTEIRO, A.; MACHADO, J. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesq. Agropec. Bras*. v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.
- ROUPAS, P. et al. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence. *J Functional Food*. v. 4, p. 687-709, 2012.
- SANTOS, S. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Braz J Pharmacog*. v. 17, p. 215-219, 2007.
- SARAIVA, Rosa Maria Corrêa. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém.
- SAS. Sas Institute Inc. *Sas/Stat. User's guide*. version 6. 4 ed. SAS Institute Inc, Cary, NC. 1989.
- SATHISHKUMAR, P. et al. Efficiency of *Pleurotus florida* laccase on decolorization and detoxification of the reactive dye remazol brilliant blue R (RBBR) under optimized conditions. *Clean – Soil, Air, Water*. v. 41, p. 665–672, 2013.
- SCARIOT, R. et al. Composição química de cogumelos comestíveis cultivados em resíduo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Scientarium*. v. 22, n. 2, p. 317-320, 2000.
- SCHMIDT, P. et al. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.
- SILVA, G. et al. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 27, n. 1, p. 72-75, 2007.

SILVA, O.; COSTA, G.; CLEMENTE, E. Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. substrates and residue after cultivation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 45, n. 4, p. 531-535, 2002.

SILVEIRA, M.; NINOW, J.; FURLAN, S. Parâmetros de produção de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus*, cultivados em resíduos lignocelulósicos a partir de inóculos sólido e líquido. In: XV SINAFERM. Simpósio Nacional de Bioprocessos. Recife. Anais do XV SINAFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.

SMITH, J.; ROWAN, N.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*. v. 24, p. 1839-1845, 2002.

SPINOSA, R. *Fungi and Sustainability*. Spring. v. 1, n. 1, p. 38-43, 2008.

STAMETS, P. Novel antimicrobials from mushrooms. *Herbal Gram*. v. 54, p. 28-33, 2002.

SUAY, I. et al. *Screening* of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie von Leeuwenhoek*. v. 78, p. 129-139, 2000.

TEIXEIRA, M. Usando fungos em ração animal. In: V Congresso Brasileiro de Micologia. Recife. Conferências plenárias, Simpósios e palestras do V Congresso Brasileiro de Micologia. *Micologia: avanços no conhecimento*, 2007.

TERZI, S. et al. Influência da variação da concentração de inóculo do *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção da enzima poligalacturonase. In: XV SINAFERM. Simpósio Nacional de Bioprocessos. Recife. Anais do XV SINAFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.

TONINI, Rosa Cristina Gallassini. Utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart. - Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade Regional de Blumenau, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

TORRES, F. Melhoramento genético de fungos para a produção industrial de enzimas. In: V Congresso Brasileiro de Micologia. Recife. Conferências plenárias, Simpósios e palestras do V Congresso Brasileiro de Micologia. *Micologia: avanços no conhecimento*, 2007.

URBEN, A. Cogumelos funcionais e sua importância na saúde humana. In: V Congresso Brasileiro de Micologia. Recife. Conferências plenárias, Simpósios e palestras do V Congresso Brasileiro de Micologia. *Micologia: avanços no conhecimento*, 2007.

URBEN, A.; OLIVEIRA, C. Cogumelos comestíveis: utilização e fontes energéticas. In: Revisão anual de patologia de plantas, 1998, Passo Fundo-RS. Anais [s.n.], v. 6, p. 173-196, 1998.

URREA, L. F. Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Crónica Forestal y del Medio Ambiente. Medellín-Colombia. n. 16. p. 99-119, 2001.

VALENTIN, J. Ecologia Numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Editora Interciência. Rio de Janeiro. 2000, 117 p.

VIEIRA, Fabrício Rocha. Substrato de cultivo para os cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus*: composição físico-química e metagenômica microbiana. 2016. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

WANG H.; Ng TB. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immune deficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities. Biochem Biophys Res Commun. v. 276, p. 587-593, 2000.

WANG, H; NG, T B. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 289, p. 750-755, 2001.

YOON, K. et al. Antioxidant and antithyrosinase activities of various extracts from the fruiting bodies of *Lentinus lepideus*. Molecules. v. 16, p. 2334-2347, 2011.

YOON K. et al. Appraisal of antihyperlipidemic activities of *Lentinus lepideus* in hypercholesterolemic rats. Mycobiology. v. 39, p. 283-289, 2011.

ZANETTI, A.; RANAL, M. Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. “Florida”. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 32, n. 9, p. 959-964, 1997.

7. ARTIGOS GERADOS DA TESE

Artigo aceito para publicação

Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of *Pleurotus* species.

Artigo submetido a: International Journal of Mushroom Medicinal.

**Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of *Pleurotus* Species
(Agaricomycetes)**

Teresa A. Castillo¹, Renata A. Lemos², José Raimundo G. Pereira³, José Maria A.
Alves⁴ and Maria Francisca S. Teixeira^{2*}

¹Laboratory of Microbial Biodiversity of Amazonia of Importance for Health LDMAIS, Fiocruz, Manaus, Brazil.

²Laboratory of Mycology, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

³Department of Statistics, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

⁴Department of Plant Science, Course of Agronomy, Federal University of Roraima, Boa Vista, Brazil.

Authors for correspondence: teresa.ferreira@fiocruz.br and mteixeira@ufam.edu.br

¹Institute Leônidas and Maria Deane. ILMD/Fiocruz AM, Teresina Street, 476, Adrianópolis, Oswaldo Cruz Foundation, ZIP CODE: 69.057-070 - Manaus, AM – Brazil.

²Institute of Biological Sciences, Department of Parasitology, Mycology Laboratory, Federal University of Amazonas, General Rodrigo Otávio Avenue, 6200, Coroado, University Campus south sector, ZIP CODE: 69067- 005 - Manaus, AM – Brazil.

ABSTRACT: The objective of this study was to analyze the mycelial growth in different culture conditions and antimicrobial activity of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533 and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Qué. cv. Florida DPUA 1534, against fungi and bacteria of medical importance. The growth of *Pleurotus* species were evaluated in natural and complex medium, with and without light at 25°C and 28°C for 8, 15 and 30 days. For the tests of antibiosis were used *Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501, *Aspergillus flavus* DPUA 1836, *Escherichia coli* DAUPE 224 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. In all growth conditions *in vitro*, species of *Pleurotus*, evidenced growth and high density of mycelium on PDA and SAB+ YE, although mycelial growth but reduced mycelial density was observed in RBEA. Organic mycelial extracts of *Pleurotus* species expressed a potential antibacterial and antifungal activity, being selective for tested microorganisms.

KEYWORDS: *Pleurotus*, mycelial growth, organic extract, antibacterial, antifungal, minimum inhibitory concentration.

ABBREVIATIONS: PDA: potato dextrose agar; SA+YE: Sabouraud agar added yeast extract; RBEA: rice bran extract agar; L: with light; WL: without light; RGR: radial growth rate; CA: Czapek agar; NA: nutrient agar; YESA: yeast extract sucrose agar; MIC: minimum inhibitory concentration; DMSO: dimethyl sulfoxide; TTC: triferyl tetrazolium chloride.

I. INTRODUCTION

Edible mushrooms are foods and sources of various compounds with therapeutic properties. In the world scenario, mushrooms have been highlighted mainly due to edible native species, which can be new promising sources of diverse bioactive compounds for medicinal use.¹⁻²

Indiscriminate use of antibacterial compounds has contributed to the increase of multidrug-resistant microorganisms, a condition that has promoted the development of research to isolate and identify substances of different structural types and new action modes against pathogenic microorganisms.³

Recent research has been conducted in the isolation of new secondary metabolites or crude extracts from edible and medicinal mushrooms, which possibly might have potential to replace synthetic drugs, due to the decrease of secondary effects and the benefits that can be applied in medical activities and in therapy.⁴

In order to succeed in the production and synthesis of substances with biological activity in industrial processes, mushrooms require adequate nutrient sources associated with temperature, light, humidity, aeration and gravity during *in vitro* growth. However, growth may be affected by other factors, such as lineage genetic characteristics, mycelium age and cultivation conditions.⁵

Due to factors that interfere with mushrooms development, research to know optimal growth conditions is a prerequisite for commercial production. Thus, among the various subsidies used, the solid culture medium may be an alternative, considering that such fungi develop on solid substrates, such as plant and animal residues or soil.⁶

Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm. is a species of mushroom capable of inhibiting HIV-1 and Hepatitis C virus activity and assisting in silver nanoparticles synthesis, with applications in health sectors.⁷⁻¹¹

In addition, it has hypolipidemic, hypoglycemic, anti-atherosclerotic, antithrombotic, *in vivo* anti-cataractogenic, anti-inflammatory effects, indicated in the complementary and combinatorial therapy of rheumatoid arthritis, muscle relaxation also being industrially used for mycoremediation.¹²⁻¹⁵

In addition, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Quél. cv. Florida has immunoenhancing, anti-inflammatory, analgesic, antiplatelet aggregation, hypolipidemic and hepatoprotective activity.¹⁶⁻¹⁸

It also acts in oxydryl radicals elimination, inhibits lipid peroxidation and helps in silver nanoparticles biosynthesis, preventing cataracts formation in *in vivo* tests and acting in effluents bioremediation in the textile industry.¹⁹⁻²¹

The objective of this study was to evaluate *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida radial mycelial growth under different cultivation conditions, and to verify the production of extracellular biocompounds with activity against unicellular and filamentous fungi and bacteria of medical importance.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Cultivation of *Pleurotus* species on agar medium

Species of *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida, were provided by the Network of Collection of Cultures of Microorganisms in the North and Northeast Brazil (RENNEBRA), URM Culture Collection – Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil. For reactivation of the species preserved in mineral oil,

they were grown on potato dextrose agar (PDA) with yeast extract 0.5% (w v) at 25 °C for eight days.

B. Mycelial growth of *Pleurotus* species on agar media.

The mycelial growth of *Pleurotus* species was observed on potato dextrose agar (PDA), pH 5.6, Sabouraud agar with yeast extract 0.5% (w v) (SA + YE), pH 5.9 and Rice Bran Extract agar (RBEA), pH 6.0 contained in Petri dishes.

The rice bran extract (1:2 g mL) was obtained by cooking in water for 10 minutes.²² After seeding the culture plates (diameter=5 mm), Petri dishes (five replications) were maintained in luminosity conditions [with light (L) and without light (WL)]. Two temperatures (25°C and 28°C), during 8, 15 and 30 days were used for mycelial incubation. The radial growth rate of mycelia (RGR) was evaluated every 24 hours and expressed in millimeters (mm).²³

C. Evaluation of antimicrobial activity

The antimicrobial activity was determined by the Block Agar Method.²⁴ Five test-microorganisms 3 fungal (*Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501 and *Aspergillus flavus* DPUA 1836,) and 2 bacterial, (*Escherichia coli* DAUPE 224 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607) were used in the evaluation of antimicrobial activity. Yeasts were grown in Sabouraud agar (SA) with chloramphenicol (0.2 mg L) at 25 °C for 24 hours, and *Aspergillus flavus* on Czapek agar (CA) at 25 °C for 7 days. The bacteria were cultivated in nutrient agar (NA), at 37 °C for 12 hours.

In cultures of yeasts and bacteria, a cell suspension was prepared with sterile distilled water with turbidity equal to the *Mac Farland* scale 1, while a cell suspension at 10^{-1} concentration was prepared for *Aspergillus flavus*. From each suspension, 200 μ L was removed to be seeded on nutrient agar and Sabouraud agar, respectively.

In each culture were inoculated 5 mm blocks taken from the central area of basidiomycetes cultures with 15 and 30 days growth on PDA, SA + YE and yeast extract sucrose agar (YESA). Rifampicin was used for bacteria and griseofulvin for fungi as controls. Antibiosis tests bacteria was performed at 37°C during 18-24 hours and 48 hours and 7 days at 25 °C for yeast and *Aspergillus*, respectively.

Antimicrobial activity was determined by observing the presence or absence of formation of inhibition halos.

D. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

In order to extract mushroom culture biocompounds in PDA, 20 mycelial blocks (5 mm in diameter) were transferred to 30 mL methanol/acetone (2:1), hexane/ethyl acetate (1:2) and ethyl acetate in Erlenmeyer flasks and left for maceration for 72 hours.

Extracts were filtered and concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator. Dried extracts were stocked at 4 °C and tests were solubilized in 70% ethanol and dimethyl sulfoxide 1% (v/v), DMSO. Activity was evaluated by microdilution method using microplates,²⁵ in which resazurin was used for bacteria²⁶ and trifenyl tetrazolium chloride (TTC) was used for yeasts.²⁷

In each microorganism culture, a cell suspension similar to that of *Mac Farland* standard was prepared. In each well, 100 μ l of 1% organic extract (w/v) was inoculated at concentrations ranging from 1.0% to 0.0019%. Rifampicin 0.01 mg/mL and

Itraconazole 10 mg/mL were used as positive control, and the organic extract was used as negative control. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours (bacteria) and 48 hours (yeast).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest drug concentration capable of preventing color change in the Resazurin and TTC reagent.

E. Statistical analysis

The data were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test for multiple comparisons with 5% significance level, using the SAS software system release 6.12 [GLM].²⁸

III. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 show that culture media composition, cultivation time, light and temperature significantly influenced ($p < 0.05$) mycelial growth of *P. ostreatus*. Similar results were observed for the *P. ostreatus* cv. Florida species, with the exception of cultivation carried out on PDA, in which colony diameter variations were not significantly influenced ($p = 0.2042$) by the interaction between luminosity and temperature, incubation factors shown in table 2.

Other authors verified similar data when evaluating the composition of culture medium that significantly influenced the growth rate and mycelial mass on PDA of *P. ostreatus* and *P. ostreatoroseus* lineages.²⁹

In *P. ostreatus* mycelial growth evaluation, interactions between culture medium and temperature were significant on malt agar 3% (w/v) at 25 °C, factors that promoted higher growth for this species.³⁰

In Table 3, the highest growth rate in *P. ostreatus* cv. Florida and *P. ostreatus* was recorded on PDA [11 mm/day /WL] and SAB + YE [9.5 mm/day/WL] at 8 and 15 days, and at tested temperatures tested, 25 °C and 28 °C, respectively. Therefore, *Pleurotus* species can growth both at 25 °C and at 28 °C.

In the experiments conducted in this study, *Pleurotus* species were able to grow up and take nutrients from solid media during mycelium development especially when enriched with yeast extract, which can be justified by the quality and concentration of nutrients of each culture medium.

In other experiments was verified that wheat and corn brans used in culture medium supplementation did not have stimulating effect but soybean and rice brans were the most efficient, which contributed to *P. ostreatoroseus* biomass and mycelial growth increase.³¹

Opposite to the results of this study *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida expressed growth sparsely mycelial density on RBEA.

Data from the present study, conducted with *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida show that rice bran extract can be used as an alternative nutrient source due to starch predominance and the availability of this residue in large quantities in the Amazon.

Given the fungi *in vitro* mycelial growth observed, fungi often do not express the suitable behavior for large scale production, but it may reduce error possibilities, since lineages that cannot grow advantageously are not apt to produce inoculum.³²

Regarding *P. ostreatus*, in the analysis of cultivation carried out in PDA, at 28 °C, in environments with light during 15 days, bactericidal and fungicidal activities against all the evaluated microorganisms predominated, while *E. coli*, *M. smegmatis*

and *C. albicans* were sensitive to *P. ostreatus* cv. Florida compounds, except for *A. flavus*. *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida compounds also expressed bacteriostatic action on *E. coli* and *M. smegmatis*, respectively, and only *P. ostreatus* cv. Florida had fungistatic action on *C. laurentii* (Table 4).

P. ostreatus and *P. ostreatus* cv. Florida cultures on SA + YE obtained at 25 °C and 28 °C, in environments without light for 30 days, inhibited the growth of most microorganisms.

In *P. ostreatus* cultures, fungicidal effect for *A. flavus*, followed by a low bactericidal and bacteriostatic effect against *E. coli* and *M. smegmatis* prevailed, but did not inhibit *C. albicans*. *P. ostreatus* cv. Florida bactericidal and fungicidal activity was observed in relation to *E. coli*, *C. laurentii* and *A. flavus*, and low fungistatic activity against *C. albicans*. (Table 5)

Obtained data coincide with results of tests with *P. ostreatus* and *P. sajor-caju*, which expressed antibacterial activity for *E. coli*, without activity for *C. albicans*.³³ Tests with *P. ostreatus* and *P. pulmonarius* evidenced bacteriostatic effect in *E. coli*.³⁴

In addition, *P. sajor-caju* and *P. ostreatus* isolates performance in *E. coli* also favored moderate to optimal antimicrobial activity development.³⁵

However, the results found in this study are different when compared to the results obtained with *P. ostreatus*, *P. eryngii* and *P. ostreatus* cv. Florida, which showed good antimicrobial and antifungal activity in *E. coli* and *C. albicans* presence. Concluding that the activity depends on strain characteristics.^{36, 37}

In other assays, *P. ostreatus* did not synthesize compounds with antimicrobial effect, as opposed to *E. coli*, *A. flavus* and *C. albicans*.³⁸

The fact that no antimicrobial activity was detected for *E. coli* is probably associated with Gram-negative bacteria higher resistance to the action of organic extracts of these basidiomycetes.

This is due to the complexity of the double membrane found in these microorganisms, which is a limiting factor for compounds diffusion due to its lipopolysaccharide structure.³⁹

On the other hand, experiments with *P. ostreatus* cv. Florida and *P. tuberregium*, showed low antimicrobial activity against *E. coli* and antifungal activity absence against *A. flavus* and *C. albicans* for both *Pleurotus* species.⁴⁰

On the other hand, in studies with *P. ostreatus* cv. Florida fruiting bodies, no bactericidal effect was detected when they were tested against *E. coli*.⁴¹

However, active compounds of *P. ostreatus* cv. Florida and *P. ostreatus* cv. Floridanus fruiting bodies acted on *E. coli*.⁴²

Finally, all these antimicrobial effects of compounds isolated by several researchers from mycelial extracts of several *Pleurotus* species have been classified as a defense mechanism against other organisms.⁴³

Data shown in table 6 indicated that only *E. coli* and *C. laurentii* were sensitive to all *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida extracts at 5 mg/mL concentration. *M. smegmatis* sensitivity was only observed for *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida ethyl acetate extract (MIC=5 and 2.5 mg/mL), respectively.

In this study, *C. albicans* showed lower values of MIC=2.5 mg/mL for all *P. ostreatus* organic extracts, exhibited MIC= 5 mg/mL for *P. ostreatus* cv. Florida methanol/acetone extract and was resistant to ethyl acetate and hexane/ethyl acetate extracts.

It is emphasized that all organic extracts from mycelia tested of *P. ostreatus* were more active against *C. albicans*, *C. laurentii* and *E. coli* than *M. smegmatis*. However, organic mycelial extracts of *P. ostreatus* cv. Florida were more active against *E. coli*, *M. smegmatis* and *C. laurentii* than *C. albicans*.

However, *P. squarrosulus* methanol extracts were an excellent antimicrobial agent source when *C. albicans* and *E. coli* were susceptible to 0,05 mg/mL.⁴⁴

Antagonistically, *P. pulmonarius* methanolic extracts reached 1 mg/mL MIC for *C. albicans*, although antimicrobial activity was not detected when they were tested against *E. coli*.⁴⁵

Another study was carried out with *P. sapidus* fruiting bodies acetylic and ethanolic extracts, in which researchers determined the lowest MIC as 0,0006250 mg/mL, constituting a very efficient fungicidal agent in relation to two *C. albicans* strains (MTCC224 and MTCC226).⁴⁶

Other researchers, while evaluating *P. ostreatus* cv. Florida, *P. ostreatus* and *P. squarrosulus* bioactive compounds extracted with ethanol, found MIC antimicrobial effect responses ranging from 0.4 to 50 mg/mL for *E. coli* and from 0.78 to 50 mg/mL for *C. albicans*.^{47,48,49}

In nature, numerous antimicrobial compounds can be isolated from many basidiomycetes, for the benefit of human health. They are currently on the market as antibiotics consisting of microscopic fungi. Therefore, it is important to investigate antimicrobial activity and carry out studies with unknown species.⁵⁰

IV. CONCLUSION

From the results obtained in *in vitro* growth conditions, *P. ostreatus* and *P. ostreatus* cv. Florida evidenced mycelium growth and high density in PDA and SAB + YE, although mycelial growth but reduced mycelial density was observed in RBEA. *Pleurotus* species produced compounds with antibacterial and antifungal potential, being selective to test microorganisms.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Federal University of Amazonas (UFAM), the National Research Council (CNPq), Network of Microorganisms Cultures Collection in the North and Northeast Brazil (RENNEBRA) financial support.

Authors also thank the Foundation of Amazon Research (FAPEAM) for granting the scholarship.

REFERENCES

- [1] Lindequist U, Niedermeyer T, Jülich W. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM*. 2005; 2: 285-299.
- [2] Rai M, Tidke G, Wasser SP. Therapeutic potential of mushrooms. *Natural Product Radiance*. 2005; 4: 246-257.
- [3] Efremenkova OV, Ershova EY, Tolstych IV, Zenkova VA, Dudnik YV. Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms*. 2003; 5: 37-41.

- [4] Chien RC, Tsai SY, Lai EYC, Mau JL. Antiproliferative activities of hot water extracts from culinary-medicinal mushrooms, *Ganoderma tsugae* and *Agrocybe cylindracea* (higher basidiomycetes) on cancer cells. *Int J Med Mushrooms*. 2015; 17: 453-462.
- [5] Chang ST, Miles PG. Mushroom: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. Washington DC: CRC Press; 2004. Second edition, 480 p.
- [6] Siqueira GF. Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei*. [Dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2006.
- [7] Gern RMM, Wisbeck E, Rampinelli JR, Ninow JL, Furlan SA. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*. 2008; 99: 76–82.
- [8] Silva MCS, Naozuka J, Luz JMR, Assunção LS, Oliveira PV, Vanetti MCD, Bazzolli DMS, Kasuya MCM. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chemistry*. 2012; 131: 558–563.
- [9] Wang H, Ng TB. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immune deficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276: 587-593.
- [10] El-Fakharany EM, Haroun BM, Ng TB, Redwan, ER. Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein Pept Lett*. 2010; 17: 1031-1039.

- [11] Al-Bahrani R, Raman J, Lakshmanan H, Hassan AA, Sabaratnam V. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. *Materials Letters*. 2017; 186: 21-25.
- [12] Dos Santos LF, Zanatta AL, Soccol VT, Torres MF, Bonatto SJR, Rubel R, Soccol CR. Hypolipidemic and antiatherosclerotic potential of *Pleurotus ostreatus*, cultivated by submerged fermentation in the high-fat diet fed rats. *Biotech Bioproc Engin*. 2013; 18: 201-208.
- [13] Isai M, Elanchezhian R, Sakthivel M, Chinnakkaruppan A, Rajamohan M, Jesudasan CN, Thomas PA, Geraldine P. Anticataractogenic effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in an experimental model. *Current Eye Research*. 2009; 34: 264-273.
- [14] Bauerová K, Paulovičová E, Mihalová D, Švík K, Poništ S. Study of new ways of supplementary and combinatory therapy of rheumatoid arthritis with immunomodulators glucomannan and immunoglukan in adjuvant arthritis. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25: 329-335.
- [15] Guzmán-Dávalos L, Barajas IA. Hongos y líquenes como bioindicadores y micorremediación. In: Zuarth CAG, Vallarino A, Jiménez JCP, Pfeng AML, editors. *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental*. México DF: El Colegio de la Frontera Sur e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2014, p. 579-603.
- [16] Ganeshpurkar A, Rai G. Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of Oyster mushroom *Pleurotus florida*. *Indian J Pharmacol*. 2013; 45: 66-70.

- [17] Jose N, Ajith TA, Janardhanan KK. Methanol extract of the Oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytother Res.* 2004; 18:43-46.
- [18] Rana T, Bera AK, Das S, Bhattacharya D, Pan D, Bandyopadhyay S, Mondal DK, Samanta S, Bandyopadhyay S, Das SK. *Pleurotus florida* lectin normalizes duration dependent hepatic oxidative stress responses caused by arsenic in rats. *Exp Toxicol Path.* 2012; 64: 665-671.
- [19] Bhat R, Deshpande R, Ganachari SV, Huh DS, Venkataraman. Photo-irradiated biosynthesis of silver nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus florida* and their antibacterial activity studies. *Bioinorganic Chemistry and Applications.* 2011; 1-7.
- [20] Ganeshpurkar A, Bhadoriya SS, Pardhi P, Jain AP, Rai G. In vitro prevention of cataract by oyster mushroom *Pleurotus florida* extract on isolated goat eye lens. *Indian J Pharmacol.* 2011; 43: 667-670.
- [21] Sathishkumar P, Balan K, Palvannan T, Kamala-Kannan S, Oh BT, Rodríguez-Couto S. Efficiency of *Pleurotus florida* Laccase on Decolorization and Detoxification of the Reactive Dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) under Optimized Conditions. *Clean – Soil, Air, Water.* 2013; 41: 665–672.
- [22] Gern RMM. Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. [Doutorado]. Florianópolis : Universidade federal de Santa Catarina, 2005.
- [23] Fan L, Soccol TA, Pandey A, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. *Braz J Microbiol.* 2006; 37: 420-424.

- [24] Larpent JP, Sanglier JJ. *Biotechnologie des antibiotiques*. Paris: Mason; 1989.
- [25] Andrioli WJ. Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.
- [26] Saraiva RMC. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. [Dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará, 2012.
- [27] Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Braz J Pharmacog*. 2007; 17: 215-219.
- [28] Sas Institute Inc. *Sas/Stat, SAS. User's guide, System Release 6.12*. NC: SAS Institute Inc, Cary, 1989.
- [29] Donini LP, Bernardi E, Minotto E, Nascimento JS. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. *Arq Inst Biol*. 2005; 72: 331-338.
- [30] Sales-Campos C, Eira AF, Jesus MA, Campagnolli F, Andrade MCN. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. *Pesq Agropec Bras*. 2008; 11: 1633-1635.
- [31] Minotto E, Bernardi E, Donini LP, Nascimento JSD. Crescimento miceliano *in vitro* de *Pleurotus ostreatoroseus* e colonização do substrato capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) suplementado com diferentes farelos. *Arq Inst Biol*. 2008; 75: 379-383.

- [32] Wille CN. Potencial do fungo *Pycnoporus sanguineus* na biopolpação de *Eucalyptus grandis* e *Acácia mearnsii*. [Monografia]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2007.
- [33] Biswas G, Pradhan P, Mandal SC, Acharya K. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. Pharm Tech. 2012; 4: 1554-1560.
- [34] Karaman M, Jovin E, Malbaša M, Popović M. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidante and antibacterial agents. Phytother Res. 2010; 24: 1473-1481.
- [35] Neelam S, Singh S. Comparative *in vitro* studies on phytochemical and antibacterial properties of ethanolic extracts of *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Int J Pharm Bio Sci. 2013; 4: 396-400.
- [36] Kalyoncu F, Oskay M, Sağlam H, Erdoğan TF, Tamer AÜ. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. J Med Food. 2010; 13: 415-419.
- [37] Fagade OE, Oyelade AA. A comparative study of the antibacterial activities of some wood decay fungi to synthetic antibiotics discs. Electronic J Environ Agricul Food Chem. 2009; 8: 184-188.
- [38] Hearst R, Nelson D, Mc Collum G, Millar BCh, Maeda Y, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Rao JR, Moore JE. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. Complement Ther in Clin Pract. 2009; 15: 5-7.
- [39] Kosanić M, Ranković B, Rancić A, Stanojković T. Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial and anticancer potentials of two

- edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. J Food Drug Analysis. 2016; 24: 477-484.
- [40] Jonathan SG, Kigigha LT, Ohiman E. Evaluation of the inhibitory potentials of eight higher Nigerian against pathogenic microorganism. African Journal of Biomedical Research. 2008; 11: 197-202.
- [41] Iftekhhar AFMH, Choudhry ZK, Khan MI, Saleh AA. Comparative study of antibacterial activity of wood-decay fungi and antibiotics. Bangladesh J Pharmacol. 2011; 6: 14-17.
- [42] Das N, Paskan B, Mishra S, Bhattacharya B, Sengupta Ch. Comparative studies of antibacterial properties of three *Pleurotus* species (Oyster mushroom). Nature and Science. 2012; 10: 178-183.
- [43] Vamanu E. *In vitro* Antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. Molecules. 2012; 17: 3653-3671.
- [44] Giri S, Biswas G, Pradhan P, Mandal SC, Acharya K. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. Int J Pharm Tech Res. 2012; 4: 1554-1560.
- [45] Ramesh Ch, Pattar MG. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of Western Ghats of Karnataka, India. Pharmacognosy Res. 2010; 2: 107-112.
- [46] Shahi SK, Sharma PK, Kumar S, Sharma PK. Evaluation of antifungal activity of extracts of wild fruiting bodies and cultured basidiomycete macrofungi *Pleurotus sapidus* and *Pleurotus flabellatus* on several azole-resistant *Candida* spp. International Journal of Microbial Resource Technology. 2012; 1: 5-10.

- [47] Rahman MM, Rahaman A, Nahar T, Uddin B, Basunia MA, Hossain S. Antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus florida* cultivated in Bangladesh. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2013; 1: 166-175.
- [48] Vamanu E. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of two edible mushrooms mycelia obtained in the presence of different nitrogen sources. *J Med Food*. 2013; 16: 155-166.
- [49] Nwachukwu E, Uzoeto HO. Antimicrobial activity of some local mushrooms on pathogenic isolates. *J Med Plants Res*. 2010; 4: 2460-2465.
- [50] Nehra K, Kumar MM, Yadav A. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Int J Microb Res Tech*. 2012; 1: 391-400.

Table 01

Effects of temperature, cultivation time and luminosity on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* on different culture media.

Factors	df	Diameter extent variation after inoculation (ρ)		
		PDA	RBEA	SA + YE
Temperature	1	0.0001	0.0001	0.0064
Time	2	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Time	2	0.0001	0.0012	0.0001
Light	1	0.0001	0.0009	0.0001
Temperature*Light	1	0.0001	0.0105	0.0001
Time*Light	2	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Time*Light	2	0.0001	0.0001	0.0001

df: degree of freedom, PDA: potato dextrose agar, RBEA: rice bran extract agar, SA+YE: Sabouraud agar added yeast extract.

Values lower than 0.05 were considered significant.

Table 02

Effects of temperature, cultivation time and luminosity on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* cv. Florida on different culture media.

Factors	Diameter extent variation after inoculation (ρ)			
	df	PDA	RBEA	SA + YE
Temperature	1	0.0004	0.0200	0.0001
Time	2	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Time	2	0.0001	0.0001	0.0001
Light	1	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Light	1	0.2042	0.0045	0.0001
Time*Light	2	0.0182	0.0001	0.0001
Temperature*Time*Light	2	0.0050	0.0001	0.0001

df: degree of freedom, PDA: potato dextrose agar, RBEA: rice bran extract agar, SA+YE: Sabouraud agar added yeast extract.

Values lower than 0.05 were considered significant.

Table 03

Radial growth rate (RGR) values of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus ostreatus* cv. Florida (mm/d) on different media

Species	Medium	Growth conditions											
		25°C						28°C					
		8 days		15 days		30 days		8 days		15 days		30 days	
		L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL
<i>P. ostreatus</i>	PDA	5.5	5.8	9.0	8.8	5.3	5.1	6.3	4.5	7.7	6.0	5.3	3.5
	RBEA	5.6	8.9	6.9	7.2	5.1	4.7	8.6	6.8	7.1	8.7	5.2	5.0
	SA +YE	7.1	7.1	9.4	8.9	4.9	4.7	7.1	9.3	5.2	9.5	5.3	5.1
<i>P. ostreatus</i> cv. Florida	PDA	6.4	11.0	9.8	10.0	4.9	5.1	6.1	7.2	7.8	8.9	4.9	5.4
	RBEA	4.6	7.1	6.5	7.9	3.9	5.0	7.1	9.0	4.9	8.5	5.0	4.8
	SA +YE	10.0	9.6	9.2	9.8	5.1	5.0	8.1	8.1	5.6	8.9	5.1	5.1

PDA: potato dextrose agar, RBEA: rice bran extract agar, SA + YE: Sabouraud agar added yeast extract, L = with light, WL = without light.

PDA= potato dextrose agar; SA+ YE= Sabouraud agar with yeast extract; YESA= sucrose yeast extract agar; L= with light; WL= without light; bactericidal (BC), fungicidal (FC) = (+); bacteriostatic (BS); fungistatic (FS); not detected= (-).

Table 6

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of organic extracts from mycelia of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus ostreatus* cv. Florida by Microdilution Method in Microplates.

Extracts Tested microorganisms	<i>Pleurotus ostreatus</i>			<i>Pleurotus ostreatus</i> cv. Florida		
	MET/ACET	ACTE	HEX/ACTE	MET/ACET	ACTE	HEX/ACTE
<i>M. smegmatis</i>	10	5	5	5	2,5	10
<i>E. coli</i>	5	5	5	5	5	5
<i>C. albicans</i>	2,5	2,5	2,5	5	-	-

<i>C. laurentii</i>	5	5	5	5	5	5
---------------------	---	---	---	---	---	---

MET/ACET= methanol/acetone extract; ACTE=ethyl acetate extract; HEX/ACTE=hexane/ethyl acetate extract;

MIC= mg/mL; (-) = no inhibition microorganism growth.

7. Artigo aceito para publicação

Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of Species of Genus *Lentinus*
(Agaricomycetes) from Brazil.

Artigo submetido a: International Journal of Mushroom Medicinal.

**Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of Species of Genus *Lentinus*
(Agaricomycetes) from Brazil.**

Teresa A. Castillo¹, José Raimundo G. Pereira², José Maria A. Alves³ and Maria
Francisca S. Teixeira⁴

¹Laboratory of Microbial Biodiversity of Amazonia of Importance for Health
LDMAIS, Fiocruz, Manaus, Brazil.

²Department of Statistics, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

³Department of Plant Science, Course of Agronomy, Federal University of Roraima,
Boa Vista, Brazil.

⁴Laboratory of Mycology, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

Authors for correspondence: teresa.ferreira@fiocruz.br and mteixeira@ufam.edu.br

¹Institute Leônidas and Maria Deane. ILMD/Fiocruz AM, Teresina Street, 476,
Adrianópolis, Oswaldo Cruz Foundation, ZIP CODE: 69.057-070 - Manaus, AM –
Brazil.

⁴Institute of Biological Sciences, Department of Parasitology, Mycology Laboratory,
Federal University of Amazonas, General Rodrigo Otávio Avenue, 6200, Coroado,
University Campus south sector, ZIP CODE: 69067- 005 - Manaus, AM – Brazil.

ABSTRACT: The objective of this study was to analyze the mycelial growth in different culture conditions and antimicrobial activity of *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 and *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536, against fungi and bacteria of medical importance. The growth of basidiomycetes were evaluated in natural and complex medium, with and without light at 25°C and 28°C for 8, 15 and 30 days. For the tests of antibiosis were used *Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501, *Aspergillus flavus* DPUA 1836, *Escherichia coli* DAUPE 224 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. *L. citrinus*, showed strong growth in potato dextrose and rice meal agar in the absence and presence of light, 28°C, and 8, 15 and 30 days and *N. lepideus* in Sabouraud agar in the absence and presence of light at 25°C for 8 and 15 days. *L. citrinus* evidenced mycelium growth and high density in PDA, although mycelial growth but reduced mycelial density was observed in RBEA. *N. lepideus* showed that mycelial growth and density were less abundant in the three culture media. Organic mycelial extracts of *Lentinus* species demonstrated a potential antibacterial and antifungal activity, with selectivity to the test-microorganisms under *in vitro* growth conditions.

KEYWORDS: *Lentinus*, mycelial growth, organic extract, antibacterial, antifungal, minimum inhibitory concentration.

ABBREVIATIONS: **PDA:** potato dextrose agar; **SA+YE:** Sabouraud agar added yeast extract; **RBEA:** rice bran extract agar; **L:** with light; **WL:** without light; **RGR:** radial growth rate; **CA:** Czapek agar; **NA:** nutrient agar; **YESA:** yeast extract sucrose agar; **MIC:** minimum inhibitory concentration; **DMSO:** dimethyl sulfoxide; **TTC:** trifenyl tetrazolium chloride.

I. INTRODUCTION

Edible mushrooms are functional foods and beneficial source of non-toxic medicinal products which have been standing out as by producing molecules with antimicrobial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, hypoglycemic, analgesic, hemostatic, diuretic and anti-tumor activities.^{1,2}

Studies about the use of mushrooms are quite recent and are starting to awaken interest in Brazil once that Brazilian biodiversity becomes one of alternative funding sources to be known and studied.³

In this context, the native species of mushrooms that occur in different regions become promising sources to be investigated for isolation and identification of biocompounds with of industrial importance.^{4,5}

Among biocompounds produced by fungi, antibiotics represent an important group of secondary metabolites that have different molecular patterns for use in treating various diseases caused by microorganisms, including the multiple drug-resistant bacteria. Therefore, recent research has aroused interest in groups of microorganisms that have not yet been thoroughly studied.⁶⁻⁸

Mushrooms *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 and *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536, are edible species that have global geographical distribution, causing white and brown rot, respectively.

In recent years, studies has been oriented to the search of mushroom species with proteolytic and fibrinolytic potential from solid culture and basidiomas, especially for medicinal purposes such as *L. citrinus*.⁹

N. lepideus, besides being an excellent nutrient source, may induce hematopoiesis, acting as an immunomodulatory, antitumor, antioxidant,

antithyrosinase, and as a prophylactic against hypercholesterolemia, hyperlipidemia and related complications, which are risk factors for atherosclerosis.¹⁰⁻¹⁴

Currently, several studies have shown that *N. lepideus* produces nitric oxide natural inhibitors capable of protecting the organism against inflammatory diseases and cancer, besides producing compounds with antidiabetic activity.^{15, 16}

Values of mycelial growth in solid culture media has been widely used for comparison and selection of basidiomycete species. It can vary significantly depending on the type of cultivation, constitution of the culture medium, supplementation and other factors such as pH, light, incubation temperature etc. Therefore, it is important to understand the influence of these factors to determine the optimal culture conditions.¹⁷

In consideration of the physiological potential of mushrooms, this study aimed to analyze the radial mycelial growth of *L. citrinus* and *N. lepideus* under different growing conditions and check the production of extracellular biocompounds with activity against unicellular and filamentous fungi and bacteria of medical importance.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Cultivation of *Lentinus* species on agar medium

Species of *L. citrinus* and *N. lepideus* were provided by the Network of Collection of Cultures of Microorganisms in the North and Northeast Brazil (RENNEBRA), URM Culture Collection – Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil. For reactivation of the species preserved in mineral oil, they were grown on potato dextrose agar (PDA) with yeast extract 0.5% (w/v) at 25 °C for eight days.

B. Mycelial growth of *Lentinus* species on agar media.

The mycelial growth of *Lentinus* species was verified on potato dextrose agar (PDA), pH 5.6, Sabouraud agar with yeast extract 0.5% (w/v) (SA + YE), pH 5.9 and Rice Bran Extract agar (RBEA), pH 6.0 contained in Petri dishes.

The rice bran extract (1:2 g/mL) was obtained by cooking in water for 10 minutes.¹⁸ After seeding the culture plates (diameter = 5 mm), Petri dishes (five replications) were maintained in luminosity conditions [with light (L) and without light (WL)]. Two temperatures (25°C and 28°C), during 8, 15 and 30 days were used for mycelial incubation. The radial growth rate of mycelia (RGR) was evaluated every 24 hours and expressed in millimeters (mm).¹⁹

C. Evaluation of antimicrobial activity

The antimicrobial activity was determined by the Block Agar Method.²⁰ Five test-microorganisms 3 fungal (*Candida albicans* DPUA 1336, *Cryptococcus laurentii* DPUA 1501 and *Aspergillus flavus* DPUA 1836,) and 2 bacterial, (*Escherichia coli* DAUPE 224 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607) were used in the evaluation of antimicrobial activity.

Yeasts were grown in Sabouraud agar (SA) with chloramphenicol (0.2 mg/L) at 25 °C for 24 hours, and *Aspergillus flavus* on Czapek agar (CA) at 25 °C for 7 days. The bacteria were cultivated in nutrient agar (NA), at 37 °C for 12 hours.

In cultures of yeasts and bacteria, a cell suspension was prepared with sterile distilled water with turbidity equal to the *Mac Farland* scale 1, while a cell suspension at 10⁻¹ concentration was prepared for *Aspergillus flavus*. From each suspension, 200 µL was removed to be seeded on nutrient agar and Sabouraud agar, respectively.

In each culture were inoculated 5 mm blocks taken from the central area of basidiomycetes cultures with 15 and 30 days growth on PDA, SA + YE and yeast extract sucrose agar (YESA). Rifampicin was used for bacteria and griseofulvin for fungi as controls. Antibiosis tests bacteria was performed at 37°C during 18-24 hours and 48 hours and 7 days at 25 °C for yeast and *Aspergillus*, respectively.

Antimicrobial activity was determined by observing the presence or absence of formation of inhibition halos.

D. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

In order to extract mushroom culture biocompounds in PDA, 20 mycelial blocks (5 mm in diameter) were transferred to 30 mL methanol/acetone (2:1), hexane/ethyl acetate (1:2) and ethyl acetate in Erlenmeyer flasks and left for maceration for 72 hours.

Extracts were filtered and concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator. Dried extracts were stocked at 4 °C and tests were solubilized in 70% ethanol and dimethyl sulfoxide 1% (v/v), DMSO. Activity was evaluated by microdilution method using microplates,²¹ in which resazurin was used for bacteria²² and trifenyl tetrazolium chloride (TTC) was used for yeasts.²³

In each microorganism culture, a cell suspension similar to that of *Mac Farland* standard was prepared. In each well, 100 µl of 1% organic extract (w/v) was inoculated at concentrations ranging from 1.0% to 0.0019%. Rifampicin 0.01 mg/mL and Itraconazole 10 mg/mL were used as positive control, and the organic extract was used as negative control. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours (bacteria) and 48 hours (yeast). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest drug concentration capable of preventing color change in the Resazurin and TTC reagent.

E. Statistical analysis

The data were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test for multiple comparisons with 5% significance level, using the SAS software system release 6.12 [GLM].²⁴

III.-RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of variance applied to the data of colonies diameter of *L. citrinus* and *N. lepidus*, in each medium, showed significant differences ($p < 0.05$) between interactions of growth conditions studied (table 1 and 2).

However, in experiments with *L. lepidus* (Fr.) Fr found no significant differences in mycelial growth when incubated at 22.5°C and 25°C in PDA and 20°C to 22.5°C in SA, getting the maximum mycelial growth at 27.5°C on PDA and SA.^{25,26}

In the experiments conducted in this study, *Lentinus* species were able to grow up and take nutrients from solid media during mycelium development especially when enriched with yeast extract, which can be justified by the quality and concentration of nutrients of each culture medium.

In this context, other studies also mention that the type and amount of nitrogen and carbon sources added to the culture medium influence basidiomycetes mass and mycelial growth.²⁷⁻²⁸

For basidiomycetes growth, several researchers have advantageously used yeast extract or PDA and meat peptone as source of carbon and nitrogen.^{17, 29-30}

In contrast to the results afore mentioned, *L. boryana* (Berk. & Mont.) mycelial growth rate decrease was observed when complex nitrogen sources were used, such as a yeast extract, whereas malt extract did not affect the growth rate of this specie.³¹

L. citrinus, expressed highest RGR values in the three culture media at 28 °C, during 8, 15 and 30 days, in environments with and without light, showing more mycelium density on PDA. Unlike *N. lepidus*, highest RGR values were kept at 25 °C when cultured on SA + YE for 8 and 15 days although mycelial growth and density were less abundant in the three culture media. In the case of RBEA, the deficiency on mycelial growth is probably related to the amount of nitrogen source (Table 3).

Thus, nitrogen supplementation for mycelial growth is justified due to its influence on amino acids, proteins, nucleic acids and vitamins synthesis.³² However, high concentrations inhibit lignolytic enzymes synthesis, which retard or hinder macrofungus development.³³

Data from the present study, conducted with *L. citrinus* and *N. lepidus*, show that rice bran extract can be used as an alternative nutrient source due to starch predominance and the availability of this residue in large quantities in the Amazon.

The cultures showed activity against most test-microorganisms, except for *A. flavus*. *L. citrinus* cultures in PDA and SA + YE, at 28°C in environments without light for 15 and 30 days of incubation showed higher antimicrobial activity. However, *N. lepidus* cultures on PDA, SA + YE and YESA higher antimicrobial activity was observed under same growth conditions for 30 days (Table 4 and 5).

Lentinus species can grow both at 25 °C and at 28 °C. In contrast, others authors assessing the optimal conditions of *in vitro* mycelial growth of *L. strigosus* in the Brazilian Amazon mention this species growth at 35°C without light.³⁴

It is evident that light addition compared to other culture conditions was not a stimulating agent of mycelial growth for species of *L. citrinus* and *N. lepidus*, but in others studies the light presence during fruiting phase was essential for forming basidiomata.³⁵

On the other hand the fungi *in vitro* mycelial growth, often do not express the suitable behavior for large scale production, but it may reduce error possibilities, since lineages that cannot grow advantageously are not apt to produce inoculum.³⁶

In the antimicrobial activity test microorganisms *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* and *Cryptococcus laurentii* were sensitive to compounds synthesized by *L. citrinus* in PDA, SAB + YE e YESA.

This result is similar to that obtained by others authors, who also noted that *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler produces fungistatic agent able to control *C. albicans* proliferation.³⁷ Others investigations mentions the fungistatic activity of *L. edodes* on *Candida albicans* which was dependent on the time and mycelium development conditions.³⁸

Unlike *N. lepideus*, it was observed that bacteriostatic activity against *E. coli* and *M. smegmatis*, fungistatic and fungicidal activity against to *C. laurentii* and *C. albicans* have prevailed in PDA and SA + YE.

In the same subject, was observed few antimicrobial activity of *L. edodes* in liquid cultures against *C. albicans*, not showing activity against *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium luteus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Campylobacter jejuni*.^{39,40}

In turn, investigations reports that cultures at 25°C for 30 days of incubation in supplemented culture media improved both the mycelial growth as the antimicrobial activity.⁴¹

In other similar experiments, found that the antibacterial activity of mycelium filtered of *L. edodes* was dependent on the culture age, noting greater inhibition at 25°C from 18 to 25 days of cultivation in malt extract broth.⁴²

In this study, when *L. citrinus* and *N. lepideus* ethyl acetate and hexane/ethyl acetate extracts were used, *E. coli* and *C. laurentii* were sensitive to 10 and 5 mg/mL, respectively, with exception methanol/acetone extract that expressed 5 mg/mL MIC only for *M. smegmatis* and *C. albicans* (Table 6).

It is observed that all organic extracts from mycelia tested of *Lentinus* species were more active against *C. laurentii*, *C. albicans* and *M. smegmatis* than *E. coli*.

Similar results were obtained when *Lactarius deliciosus* (L.) Gray and *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer methanolic extracts were tested against *E. coli*, in which the highest MIC was 20 mg/mL and the lowest MIC was 5 mg/mL, against *C. albicans*.⁴³

In addition, methyl australate, a new compound obtained from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. with MIC value of 2 mg/mL, was effective against *C. albicans* and *E. coli*.⁴⁴

Antagonistically, *Morchella esculenta* (L.) Pers. ethyl acetate extracts reached 0,75 mg/mL MIC for *E. coli*.⁴⁵ Moreover, *L. edodes* ethanolic extracts were tested, with MIC values ranging from 1,25 to 6,74 mg/mL.^{46,47}

However, silver nanoparticles with hetero polysaccharide isolated from *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer were an excellent antimicrobial agent source when *E. coli* was susceptible to 0,04 mg/mL.⁴⁸

Therefore, it can be inferred that the sensitivity probably depends on the external and internal structures of the cell wall of bacteria and fungi, of mushroom species, its concentration and the combination of natural compounds with antimicrobial activity whose interactions may have different effects on the extracts activity.⁴³

In relation to *E. coli*, cases of resistance to several broad-spectrum antibiotics have been reported as constituting an alarming threat to public health, which has aroused interest in re-investigating medicinal edible basidiomycetes and their natural defense strategies to produce a new class of effective antimicrobials that could be of great health benefit because of their curative and preventative properties.^{45,48,49}

IV. CONCLUSION

From the results obtained in *in vitro* growth conditions, *L. citrinus* evidenced mycelium growth and high density in PDA, although mycelial growth but reduced mycelial density was observed in RBEA. *N. lepideus* showed that mycelial growth and density were less abundant in the three culture media. It can be inferred from the results obtained in this research that *Lentinus* species produced compounds with antibacterial and antifungal potential with selectivity to the test-microorganisms under *in vitro* growth conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Federal University of Amazonas (UFAM), the National Research Council (CNPq), Network of Microorganisms Cultures Collection in the North and Northeast Brazil (RENNEBRA) financial support.

Authors also thank the Foundation of Amazon Research (FAPEAM) for granting the scholarship.

REFERENCES

- [1] Heleno SA, Ferreira RC, Antonio AL, Queiroz MJRP, Barros L, Ferreira ICFR. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Biosci.* 2015; 2: 48-55.
- [2] Taofiq O, González-Paramása AM, Martins A, Barreiroc MF, Ferreira ICFR. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. *Ind Crops Prod.* 2016; 90: 38–48.
- [3] Urben AF. Cogumelos funcionais e sua importância na saúde humana. In: V Congresso Brasileiro de Micologia: Conferências plenárias, Simpósios e palestras do V Congresso Brasileiro de Micologia. *Micologia: avanços no conhecimento;* 2007; Recife, Brasil.
- [4] Carvalho MPD, Sand STVD, Rosa, EAR, Germani JC, Ishikawa NK. Investigação da atividade antibacteriana dos basidiomicetos *Lentinula boryana* e *Lentinula edodes*. *Biociências.* 2007; 15: 173-179.
- [5] Vieira GRT, Liebl M, Tavares LBB, Paulert R, Júnior AS. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antibacterial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. *Braz J Microbiol* 2008; 39: 561-568.
- [6] Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep.* 2007; 24: 1262-1287.
- [7] Karwa A, Rai M. Naturally occurring medicinal mushroom derived antimicrobials: a case study using Lingzhi or Reishi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushr.* 2012; 14: 481-490.
- [8] Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence. *J Funct Food.* 2012; 4: 687-709.

- [9] Kirsch LS. *Lentinus citrinus* (Walleyne e Rammeloo) DPUA 1535: crescimento, produção e extração de proteases por fermentação submersa. [Mestrado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2009.
- [10] Jin MR, Jeon H, Jung HJ, Kim BC, Shin SS, Choi JJ, Lee JK, Kang ICY, Kim SY. Enhancement of repopulation and hematopoiesis of bone marrow cells in irradiated mice by oral administration of PG101 a water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp Biol Med*. 2003; 228: 759-766.
- [11] Jung YS, Byung-Keun Y, Yang-Tae J, Razuanul I, Sang-Min K, Chi-Hyun S. Immunomodulating activities of water-soluble exopolysaccharides obtained from submerged culture of *Lentinus lepideus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18: 1431-1438.
- [12] Yoon KN, Alam N, Lee KR, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, Lee TS. Antioxidant and Antityrosinase Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of *Lentinus lepideus*. *Molecules*. 2011; 16: 2334-2347.
- [13] Yoon KN, Lee JS, Kim HY, Lee KR, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, Alan N, Ha TM, Lee TS. Appraisal of antihyperlipidemic activities of *Lentinus lepideus* in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology*. 2011; 39: 283-289.
- [14] Lee WY, Jin KA, Donghyun K, Kang HK, Sungyoung K. Factors influencing the production of water-soluble endopolysaccharides and exopolysaccharides from *Lentinus lepideus* and their effects on immune cytokine production. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18: 560-567.
- [15] Li Y, Bao L, Song B, Han J, Li H, Zhao F, Liu H. A new benzoquinone and a new benzofuran from the edible mushroom *Neolentinus lepideus* and their Inhibitory activity in NO production inhibition assay. *Food Chem*. 2013; 141: 1614-1618.

- [16] Ocañas LG, Garza DMC, Calderón MZ, Ocañas FG, Quintana OB, Pérez JZV. Insulin release activity of fraction II of aqueous extract of *Lentinus lepideus* from Northeastern Mexico in healthy and alloxan-induced diabetic rats. *Abstracts/Toxicol Lett.* 2016; 258S: S131.
- [17] De Lima MA. Potencial biotecnológico de basidiomicetos isolados no estado do Paraná. [Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009.
- [18] Gern RMM. Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. [Doutorado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- [19] Fan L, Soccol TA, Pandey A, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. *Braz J Microbiol.* 2006; 37: 420-424.
- [20] Larpent JP, Sanglier JJ. *Biotechnologie des antibiotiques*. Paris: Mason; 1989.
- [21] Andrioli WJ. Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos. [Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.
- [22] Saraiva RMC. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. [Mestrado]. Belém: Universidade Federal do Pará, 2012.
- [23] Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Braz J Pharmacog.* 2007; 17: 215-219.
- [24] Sas Institute Inc. *Sas/Stat, SAS. User's guide, System Release 6.12*. NC: SAS Institute Inc, Cary, 1989.

- [25] Gaitán-Hernández R, Mata G, Guzmán G. Behavior of a Mexican strain of *Lentinus lepideus* on three solid media. *Rev Mex Micol.* 1995; 11: 23-27.
- [26] Julca-Canto M, Aguilar-Pérez MM, Rios N, Sousa JPB, Cubilla-Rios L. Additional new natural products produced by *Lentinus strigellus*: a biotechnological approach. *Tetrahedron Lett.* 2016; 57: 650-653.
- [27] Mata G, Delpech P, Savoie JM. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 118-122.
- [28] De Andrade MCN, Da Silva JH, Minhoni MTA, Zied DC. Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in cultura media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. *Acta Sci Agron.* 2008; 30: 333-337.
- [29] Montini RMC, Passos JRS, Eira AF. Digital of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler on agar medium. *Braz J Microbiol.* 2006; 37: 90-95.
- [30] Souza CMCO. Produção de metabólitos com atividade antimicrobiana e antioxidante de *Lentinula edodes* em cultivo submerso. [Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009.
- [31] De Faria RO. Avaliação do potencial biotecnológico de *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler. [Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [32] Wisniewski AC, Almeida MAL, Palma MB, Tavares LBB. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. *R Bras Bioci.* 2010; 8: 285-293.

- [33] Silva EM, Machuca A, Milagres AMF. Effect of cereals brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Lett Appl Microbiol.* 2005; 40: 283-288.
- [34] Isla RV, Ishikawa NK. Optimal conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience.* 2008; 49: 215-219.
- [35] Tonini RC. Utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart.-Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. [Mestrado]. Santa Catarina: Universidade Regional de Blumenau, 2004.
- [36] Wille CN. Potencial do fungo *Pycnoporus sanguineus* na biopolpação de *Eucalyptus grandis* e *Acácia mearnsii*. [Monografia]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2007.
- [37] Paccola EAS, Maki CS, Nobrega GMA, Meirelles LDP. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. *Braz J Microbiol.* 2001; 32: 176-178.
- [38] Tonucci NM. Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Tobacco mosaic vírus* (TMV). [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004.
- [39] Hirasawa M, Shouji N, Tomotake N, Fukushima K, Takada K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *Int J Antimicrob Agents.* 1999; 11: 151-157.
- [40] Hatvani N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 17: 71-74.

- [41] Hasegawa R, Kasuya MC, Vanetti MC. Growth and antibacterial activity of *Lentinus edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electron J Biotechnol.* 2005; 8: 212-217.
- [42] Ishikawa NK, Kasuya MCM, Vanetti MCD. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Braz J Microbiol.* 2001; 32: 206-210.
- [43] Kosanić M, Ranković B, Rancić A, Stanojković T. Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. *J Food Drug Anal.* 2016; 24: 477-484.
- [44] Smania EFA, Monache FD, Yunes RA, Paulert R, Smania Junior A. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. *Braz J Pharmacogn.* 2007; 17: 14-16.
- [45] Shammeen N, Kamili AN, Ahmad M, Masoodi FA, Parray JA. Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North Western Himalaya. *Microb Pathog.* 2017; 105: 356-360.
- [46] Ghenov F. Avaliação in vitro das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de chá preto (*Camellia sinensis*) e dos cogumelos shiitake (*Pleurotus ostreatus*) e shimeji (*Lentinula edodes*). [Monografia]. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.
- [47] Negri KMS. Estudo comparativo de diferentes cogumelos comestíveis comercializados no Brasil: ação contra radicais livres, espécies reativas e atividade antibacteriana. [Mestrado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

- [48] Manna DK, Mandal AK, Sem IK, Maji PK, Chakraborti S, Chakraborty R, Islam SS. Antibacterial and DNA degradation potential of silver nano particles synthesized via green route. *Int J Bio Mac*. 2015; 80: 455-459.
- [49] De Oliveira, KKC. Atividade antimicrobiana de basidiomicetos ocorrentes na Amazônia. [Mestrado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2014.

Table 1

Effects of temperature, cultivation time and luminosity on the mycelial growth of *Lentinus citrinus* on different culture media.

Factors	Diameter extent variation after inoculation (ρ)			
	df	PDA	RBEA	SA + YE
Temperature	1	0.0001	0.0001	0.0001
Time	2	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Time	2	0.0001	0.0122	0.0792
Light	1	0.0001	0.0001	0.0015
Temperature*Light	1	0.0001	0.0001	0.0001
Time*Light	2	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Time*Light	2	0.0001	0.0001	0.3624

df: degree of freedom, PDA: potato dextrose agar, RBEA: rice bran extract agar, SA + YE: Sabouraud agar added yeast extract.

Values lower than 0.05 were considered significant.

Table 2

Effects of temperature, cultivation time and luminosity on the mycelial growth of *Neolentinus lepideus* on different culture media.

Factors	Diameter extent variation after inoculation (p)			
	df	PDA	RBEA	SA + YE
Temperature	1	0.0001	0.0001	0.0001
Time	2	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Time	2	0.0132	0.0001	0.0001
Light	1	0.0001	0.0001	0.0001
Temperature*Light	1	0.0001	0.0001	0.0042
Time*Light	2	0.0031	0.0001	0.0001
Temperature*Time*Light	2	0.0001	0.0001	0.0001

df: degree of freedom, PDA: potato dextrose agar, RBEA: rice bran extract ágar, SA + YE: Sabouraud agar added yeast extract.

Values lower than 0.05 were considered significant.

Table 3

Radial growth rate (RGR) values of *Lentinus citrinus* and *Neolentinus lepideus* (mm/d) on different media

Species	Medium	Growth conditions											
		25°C						28°C					
		8 days		15 days		30 days		8 days		15 days		30 days	
		L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL
<i>L. citrinus</i>	PDA	6.5	6.6	6.1	6.2	5.6	7.2	7.2	7.4	6.7	6.9	6.1	6.3
	RBEA	6.4	6.7	6	6.2	4.6	5.5	7.2	7.0	6.7	6.6	5.2	5.3
	SA +YE	6.6	6.4	6.2	6.0	5.4	5.1	6.8	7.0	6.3	6.6	5.4	5.3
<i>N. lepideus</i>	PDA	5.3	4.9	6.0	5.7	4.8	4.4	5.6	5.2	5.9	6.0	4.7	4.8
	RBEA	4.6	3.5	4.9	3.4	3.3	4.2	6.2	4.0	5.6	4.1	4.0	3.4
	SA +YE	5.8	5	5.8	5.7	4.9	4.4	5.1	3.4	4.7	3.3	4.6	4.2

PDA: potato dextrose agar, RBEA: rice bran extract agar, SA + YE: Sabouraud agar added yeast extract, L = with light, WL = without light.

Table 4

Antibacterial and antifungal activity of *Lentinus citrinus* and *Neolentinus lepideus* in 15th day of growth under different culture conditions

		Test-microorganism																			
		<i>Escherichia coli</i>				<i>Micobacterium smegmatis</i>				<i>Cryptococcus laurentii</i>				<i>Candida albicans</i>				<i>Aspergillus flavus</i>			
Incubation		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C	
Species	Medium	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL
<i>L. citrinus</i>	BDA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	FS	FS	-	FS	FS	+	-	-	-	-
	SA+YE	+	+	+	+	+	+	+	+	-	FS	+	-	-	-	-	FS	-	-	-	-
	YESA	-	BS	-	+	-	-	-	+	-	-	-	FS	-	-	-	FS	-	-	-	-
<i>N. lepideus</i>	BDA	BS	BS	BS	+	BS	BS	BS	-	FS	FS	+	+	-	FS	FS	-	-	-	-	-
	SA+YE	+	-	BS	+	-	BS	BS	-	+	-	FS	+	+	-	FS	-	-	-	-	-
	YESA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	FS	-	-	-	-

PDA= potato dextrose agar; SA+ YE= Sabouraud agar with yeast extract; YESA= sucrose yeast extract agar; L= with light; WL= without light;

bactericidal (BC), fungicidal (FC) = (+); bacteriostatic (BS); fungistatic (FS); not detected= (-).

Table 5

Antibacterial and antifungal activity of *Lentinus citrinus* and *Neolentinus lepideus* in 30th day of growth under different culture conditions

Incubation Species	Medium	Test-microorganism																					
		<i>Escherichia coli</i>				<i>Micobacterium smegmatis</i>				<i>Cryptococcus laurentii</i>				<i>Candida albicans</i>				<i>Aspergillus flavus</i>					
		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C		25 °C		28 °C			
L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL	L	WL		
<i>L. citrinus</i>	BDA	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	FS	FS	-	FS	FS	-	-	-	-	-	-	-
	SA+YE	-	-	-	+	-	-	+	+	-	FS	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	YESA	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	FS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. lepideus</i>	BDA	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	SA+YE	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	YESA	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

PDA= potato dextrose agar; SA+ YE= Sabouraud agar with yeast extract; YESA= sucrose yeast extract agar; L= with light; WL= without light;

bactericidal (BC), fungicidal (FC) = (+); bacteriostatic (BS); fungistatic (FS); not detected= (-).

Table 6

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of organic extracts from mycelia of *Lentinus citrinus* and *Neolentinus lepideus* mycelia by Microdilution Method in Microplates.

Extracts Tested microorganisms	<i>L. citrinus</i>			<i>N. lepideus</i>		
	METACET	ACTE	HEXACTE	METACET	ACTE	HEXACTE
<i>M. smegmatis</i>	5	-	-	5	-	-
<i>E. coli</i>	-	10	10	-	10	10
<i>C. albicans</i>	5	-	-	5	-	-
<i>C. laurentii</i>	-	5	5	-	5	5

METACET= methanol/acetone extract; ACTE=ethyl acetate extract; HEXACTE=hexane/ethyl acetate extract;

MIC= mg/mL; (-) = not inhibit microorganism growth.

7. Artigo

Mycelial growth and proteolytic profile of edible mushrooms cultivated in Amazon agro-industry residues by semi-solid state fermentation

Artigo submetido a: *Biotechnology Letters*

Mycelial growth and proteolytic profile of edible mushrooms cultivated in
Amazon agro-industry residues by solid state fermentation

Crescimento micelial e perfil proteolítico de cogumelos comestíveis
cultivados em resíduos da agroindústria amazônica por fermentação no
estado sólido

Teresa Alarcón Castillo¹, Elton Nunes Britto², José Maria Arcanjo Alves³ and Maria
Francisca Simas Teixeira⁴

¹Instituto Leônidas e Maria Deane. ILMD, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Fundação
Oswaldo Cruz, CEP: 69.057-070 - Manaus, AM – Brasil.

²Instituto Federal do Pará, Avenida Marechal Castelo Branco, 621, Campus de
Santarém, Interventória, CEP: 68.020-000 - Santarém, PA – Brasil.

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Brasil.
Centro de Ciências Agrárias – Campus de Cauamé – Monte Cristo, BR 174, CEP:
69.301-970 - Boa Vista, RR – Brasil.

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Laboratório de
Micologia, Universidad Federal de Amazonas, Avenida General Rodrigo Otávio 6200,
Coroado I, Campus Universitário Setor Sul, CEP: 69067- 005 - Manaus, AM – Brasil.

e-mail: mteixeira@ufam.edu.br ; fone: +55 (92) 3305-4276.

Resumo

O objetivo foi avaliar o desenvolvimento micelial vertical com fitas milimetradas cultivados nos substratos selecionados e analisar a produção e o efeito das condições de extração das proteases de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Quéll. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536 em formulações com casca de cupuaçu, casca de arroz e farelo de arroz. A mistura de casca de cupuaçu com casca de arroz numa concentração de 1:1 estimulou a velocidade de crescimento vertical nos cultivos de *L. citrinus* DPUA 1535, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *N. lepideus* DPUA 1536, obtendo valores máximos de 13 cm; 12,6 cm e 12,3 cm respectivamente. As melhores médias da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas foram determinadas no extrato bruto de *P. ostreatus* (24,0 U/g) e *L. citrinus* (22,0 U/g), obtidos na solução de NaCl 2%, a 36 °C e com água destilada, a 25 °C e, os melhores valores de produtividade nos substratos de casca de cupuaçu com farelo de arroz (2:1). A composição dos substratos em diferentes concentrações e as condições de extração de proteases influenciaram na atividade proteolítica de todas as espécies de *Pleurotus* e *Lentinus*.

Palavras-chave: Crescimento micelial vertical, protease, *Pleurotus*, *Lentinus*, resíduos agroindustriais, fermentação sólida.

Introdução

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais as quais representam cerca de 60% do mercado total de enzimas no mundo e 40% da venda total de enzimas no mundo. São altamente exploradas em processos biotecnológicos, principalmente na indústria de processamento de alimentos, curtumes, detergentes, biofarmacêuticos, diagnósticos, gerenciamento de resíduos e recuperação de prata (Moreira et al., 2005, Ravikumar et al., 2012, Silva 2015).

Nos últimos anos, tem aumentado a produção de diferentes tipos de proteases (ácida, neutra, alcalina) via fermentação no estado sólido devido a inúmeras vantagens, especialmente por tratar-se de processo cujo meio usado para crescimento de microrganismo são resíduos resultantes de atividades agrícolas ou agroindustrial (Pandey et al., 1999, Ravikumar et al., 2012, Fonseca 2013, Damasceno, 2016).

A fermentação no estado sólido é especialmente adequado ao crescimento de fungos quando comparado com as bactérias devido à baixa umidade, e oferece vantagens como boa produtividade volumétrica, uso de máquinas simples, uso de substratos baratos, processos simples na eliminação de impurezas e purificação do produto e economia na energia quando comparados com a fermentação submersa (Ravikumar et al., 2012, Damasceno 2016, Santos et al., 2016).

Desse segmento são produzidas centenas de toneladas de bioprodutos, substratos de baixo valor comercial que são nutricionalmente classificados em dois tipos: resíduo fibroso, os de alta digestibilidade, como polpa de cítricos, farelo de milho, casca de soja, resíduo da cevada fermentada e; os de baixa digestibilidade, bagaço de cana de açúcar, milho, cereais, palha e casca de algodão, casca de soja e amendoim (Graminha et al., 2008; Inforsato e Porto 2016)).

Além desses resíduos, na Amazônia são produzidos diversos bioprodutos pela atividade agroindustrial regional, como casca do fruto do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Wild. Ex. Spreng. Schum), cascas e caroços de outros frutos em função do aumento da exploração da diversidade de frutos naturais da Região Norte.

O vasto potencial dos resíduos agrícola e agroindustrial tem contribuído para a realização de muitas investigações centradas no uso desses substratos em processo de fermentação para descoberta de biocompostos de origem microbiana, especialmente a partir de bactérias e fungos como viabilidade biotecnológica na obtenção de subprodutos com superior valor agregado e com benefícios econômicos como é a produção de enzimas (Fonseca 2013, Neves 2014, Machado et al., 2016, Hu et al., 2017).

Numerosos conhecimentos sobre proteases dos fungos inferiores estão disponíveis na literatura, todavia, acerca dos basidiomicetos são predominantemente limitados àquelas envolvidas nos fatores de virulência em espécies patogênicas (Sabotic et al., 2007, Campos et al., 2010).

Os fungos, entre outros organismos, representam uma rica fonte de compostos naturais, dos quais as proteases desenvolvem papel importante, na fisiologia, morfogênese e metabolismo tanto de basidiomicetos quanto dos demais grupos. Os basidiomas das espécies comestíveis são tradicionalmente produzidas em resíduos lignocelulósicos, consumidos como fonte de proteínas de excelente qualidade e muito bem difundidos como finos ingredientes na culinária mundial (Elisashvili 2012, Machado et al., 2016).

Entre as várias espécies de basidiomicetos, proteases já foram detectadas em *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreoroseus*, *Lentinus citrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Coprinus* sp., *Chondrostereum purpureum*,

Hypsizygus marmoreus, *Amanita muscaria*, *Irpex lacteus*, *Macrolepiota bonaerensis* (Maki; Paccola-Meirelles 2002, Sabotic et al., 2007; Campos et al., 2010; Fonseca et al., 2013; Neves, 2014; Machado et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento micelial vertical com fitas milimetradas cultivados nos substratos selecionados e analisar a produção e o efeito das condições de extração das proteases de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Qué. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536 por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria da Amazônia.

Material e métodos

Organismos e condições de crescimento

Os cogumelos comestíveis utilizados neste estudo foram *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Qué. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536, gentilmente cedidos pela Micoteca URM, através da RENNEBRA - Rede de Coleções de Culturas Norte e Nordeste, instalada na Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. As culturas preservadas em óleo mineral foram reativadas em BDA+YE 0,5% [ágar Batata Dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri de 100 mm x 15 mm e, mantidas a 25 °C, sem luminosidade por oito dias para obtenção de cultura-estoque. A partir destes cultivos foi preparado o inóculo para a fermentação no estado sólido transferindo-se um disco de cultivo medindo 10 mm de diâmetro para BDA+YE 0,5%

(p/v). As placas de Petri de 100 mm x 15 mm foram mantidas a 25 °C, sem luminosidade por oito dias.

Métodos Analíticos

Produção de proteases por Fermentação no estado sólido

Os resíduos para os cultivos no estado sólido foram utilizados na razão 1:1 ou 2:1, na seguinte composição: Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz (CC+CA); Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz (CC+FA), uniformemente distribuídos em frasco de vidro transparente, cilíndricos, com capacidade de 1 L. Em cada frasco contendo 200 g de substrato, a umidade foi corrigida para 60% com água de torneira e o pH aferido para 6,0, com solução de carbonato de cálcio 1% (p/v). Em cada vidro, a tampa foi perfurada (diâmetro= 10 mm), procedendo-se o tamponamento com algodão hidrófobo e a esterilização a 121 °C por 90 minutos durante dois dias consecutivos. Seguido do resfriamento dos substratos, em cada frasco foram inoculados, superficialmente, 12 discos de 10 mm de diâmetro. A fermentação foi conduzida a 25 °C, sem luminosidade por 15 dias, em condições estacionárias. A umidade relativa da sala de incubação foi mantida entre 60 e 70% e todos os cultivos foram realizados em triplicata. Em cada frasco foram colocadas quatro fitas milimetradas de 4 cm, em posições opostas, verticalmente e o crescimento micelial foi determinado em centímetros, a cada 24 horas (Rossi et al., 2001, Tonini 2004).

Extração das Enzimas

As proteases foram extraídas a 25 °C e a 36 °C, em 250 mL de água destilada esterilizada e NaCl 2%, na razão 5:1 (água ou NaCl: substrato) sob agitação de 150 rpm. Após 30 minutos o extrato bruto foi recuperado por filtração em tecido de

algodão e o sólido prensado manualmente para extração do líquido, seguindo-se a centrifugação a 8000 xg por 10 minutos, a 4 °C (Neves, 2014).

Determinação da atividade de proteases

Para a determinação da atividade proteolítica utilizou-se 150 µL do extrato bruto e como substrato 250 µL de azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. Após 60 minutos na reação mantida em câmara escura foi adicionada 1,2 mL de Ácido Tricloroacético 10 % (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000xg), a 4 °C por 10 minutos. Do sobrenadante foi retirado 1,2 mL para ser adicionado a 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 1/minuto em uma hora a 440 nm (Moreira et al., 2005). A produção da enzima foi expressa em U/mL, unidades por grama de substrato sólido inicial seco (Ug^{-1}) e unidades por grama de substrato final seco (U/gss).

Resultados e discussão

O resultado do crescimento micelial vertical de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Qué. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536, em resíduo agroflorestal por 15 dias estão citados na Figura 1.

Nas condições de cultivo quando se aumentou a concentração de casca de cupuaçu houve redução do crescimento de *P. ostreatus* DPUA 1533, em todas as misturas de substrato, contudo o valor maior da velocidade de crescimento vertical foi 12,6 cm, em CC+CA (1:1).

Nos substratos, o crescimento micelial médio de *P. ostreatus* DPUA 1533 equivaleu a 8 cm (0,53 cm/dia) e 5,3 cm (0,35 cm/dia), respectivamente, em CC + FA, nas duas concentrações analisadas. Em CC+CA, nas concentrações de análise, o crescimento micelial médio de *P. ostreatus* DPUA 1533 foi de 12,6cm (0,84 cm/dia) e 4,6cm (0,31 cm/dia). Resultado inverso foi observado com *P. ostreatus* cv. Flórida DPUA 1534, espécie que expressou velocidade de crescimento inferior ao observado nos cultivos de *P. ostreatus* DPUA 1533, registrando-se o máximo crescimento em CC+CA (2:1).

Entre as espécies de *Lentinus*, a velocidade de crescimento foi superior nos cultivos de *L. citrinus* DPUA 1535 quando comparado aos de *N. lepideus* DPUA 1536, no entanto, essas espécies expressaram velocidade de crescimento máxima, 13 cm (0,86 cm/dia) e 12,3 cm (0,82 cm/dia), ambos os cultivos contendo CC+CA (1:1) (Figura 1). Quanto a velocidade de crescimento, comportamento diferente foi observado por Marino e Abreu, 2009; Rossi et al., 2001 nas investigações realizadas com *L. edodes*, utilizando serragem de casca de coco suplementada com 5% de farelo de arroz cujos melhores valores de crescimento micelial foram 0,53 cm/dia e com bagaço de cana suplementado com farelo de arroz foram 0,2 cm /dia, respectivamente.

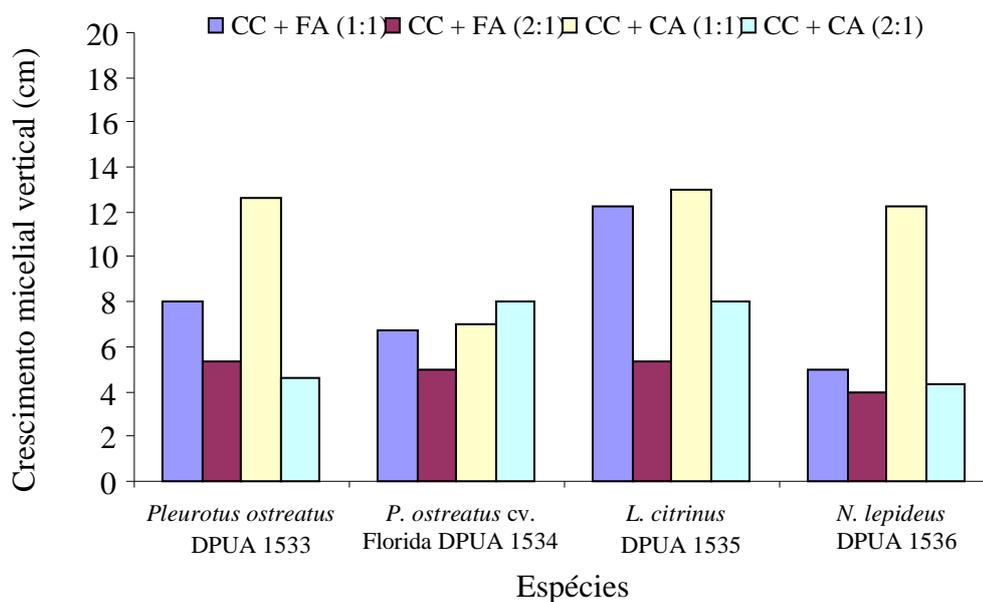


Figura 1. Velocidade do crescimento micelial vertical de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. DPUA 1533, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Qué. cv. Florida DPUA 1534, *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 e *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns DPUA 1536 em cultivos realizados em diferentes substratos agroflorestais (valores de medidas em centímetros de crescimento das espécies, nas concentrações e substratos [CC+FA (1:1)]; [CC+FA (2:1)]; [CC+CA (1:1)]; [CC+CA (2:1)]).

Nestes experimentos, avaliando-se os dados da velocidade em resposta a profundidade, nas misturas de substrato quando se aumentou a concentração da casca de cupuaçu, o crescimento vertical dos cogumelos em todos os cultivos, o desenvolvimento micelial foi reduzido. Provavelmente, esse comportamento esteja associado ao elevado conteúdo de carboidratos (78,48%) presente na casca de cupuaçu quando comparado ao da casca de arroz (55,55%) e farelo de arroz (50,18%), respectivamente, visto que o teor de nitrogênio de CC (1,34%), CA (2,7%) e farelo de arroz (1,2%) são inferiores ao quantitativo de ação inibidora (18% e 64%) descrito na literatura por Rossi et al., 2001 e Tonini (2004).

Dentre as várias utilizações desses resíduos, o uso na fermentação no estado sólido está sendo uma das alternativas para geração de sustentabilidade, inclusive, por esse processo diversas pesquisas estão demonstrando o potencial da produção de biocompostos de importância nutricional, farmacêutica, entre outros (Graminha et al., 2008).

A tabela 1 demonstra a produção de proteases por *Pleurotus ostreatus* URM 4072, em diferentes substratos. Os resultados mostram que os maiores valores, em média, da atividade proteolítica foi 15,0 U/g e 24,0 U/g, a 36 °C, nas misturas de substratos, CC+ FA (1:1) e CC+FA (2:1), nos extratos brutos obtidos da extração utilizando-se água e NaCl, respectivamente. Quando o processo de fermentação foi realizado com CC+CA, as máximas atividades de proteases, nas concentrações 1:1 e 2:1 foi igual a 10,4 U/g e 15,0 U/g, respectivamente nos extratos brutos obtidos por extração em água e NaCl /36 °C.

Nessas condições, nos demais substratos, os valores de atividade foram homogêneos. Nos trabalho realizado por Palmieri et al., 2001, utilizando *P. ostreatus* como fonte de proteases seus resultados mostraram que o cogumelo também produziu a enzima desejada, mas por fermentação em meio líquido e no extrato bruto a atividade detectada foi de 10,0 e 0,3 U/mL, ao término de 3 dias de crescimento.

Tabela 1. Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 determinada no extrato bruto obtido por fermentação sólida em diferentes resíduos agroflorestais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1.

Substratos	Substância extratora/Proteases/ <i>P. ostreatus</i> URM 4072											
	Água						NaCl					
	25 °C			36 °C			25 °C			36 °C		
Temperatura de extração	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g
CC+FA (1:1)	1,0	6,0	14,4	1,0	5,3	15,0	0,48	5,4	12,0	0,07	5,0	11,0
CC+FA (2:1)	0,53	5,2	12,3	3,7	10,0	18,0	2,0	6,2	19,0	5,0	10,2	24,0
CC+CA (1:1)	0,15	10,4	10,4	0,11	5,4	10,0	0,13	10,3	10,0	0,03	6,0	9,3
CC+CA (2:1)	0,2	5,04	11,0	1,5	7,0	14,0	1,06	6,0	13,0	2,20	8,0	15,0

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da atividade proteolítica de *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534. De acordo com esses dados verificou-se que as maiores atividades proteolíticas foram 11,0 U/g/ [CC+FA (1:1)]; 14,0 U/g/[CC+FA (2:1)]; 12,3 U/g/[CC+CA (1:1)] determinadas nos extratos brutos oriundos da extração realizada em água destilada esterilizada, a 36 °C e 13,0 U/g/[CC+CA (2:1)] no extrato obtido com NaCl/36 °C. Os valores da atividade proteolítica maiores de *P. ostreatus* cv. Florida foram mais expressivas nos extratos obtidos com solução de NaCl 2% do que em água destilada esterilizada tanto que, neste líquido extrator não foi determinada atividade proteolítica em CC+FA (1:1).

Tabela 2. Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de *Pleurotus ostreatus* cv. Florida DPUA 1534 determinada no extrato bruto obtido por fermentação sólida em diferentes resíduos agroflorestais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1.

Substratos	Substância extratora/Proteases/ <i>Pleurotus ostreatus</i> cv. Florida DPUA 1534											
	Água						NaCl					
	25 °C			36 °C			25 °C			36 °C		
Temperatura de extração	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g
CC+FA (1:1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,13	5,4	10,0	0,4	6,0	11,0
CC+FA (2:1)	1,0	12,0	12,0	1,0	12,0	12,0	1,0	6,0	14,0	0,4	6,0	11,0
CC+CA (1:1)	0,1	5,0	1,02	0,03	5,0	11,0	0,11	10,3	10,3	0,14	5,0	12,3
CC+CA (2:1)	0,2	6,0	9,0	0,3	5,0	13,0	0,2	6,0	10,0	0,4	5,0	13,0

A tabela 3 mostra os valores da atividade proteolítica de *L. citrinus* DPUA 1535. Os resultados revelaram que as maiores atividades das proteases determinadas em CC+FA (1:1) e (2:1) foi igual a 14,0 U/g e 22,0 U/g, a 25 °C, das extrações realizadas com água e solução de NaCl. Na mistura de substrato CC+FA (1:1), as maiores atividades foram de 13,0 U/g, nesse mesmo substrato, mas na concentração (2:1), os resultados mostraram que os maiores valores de atividade proteolítica foi 12,0 U/g, tanto a 25 °C quanto a 36 °C, valor que predominou nos extratos originários da extração realizada com água e solução de NaCl.

Tabela 3. Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 determinada no extrato bruto obtido por fermentação sólida em diferentes resíduos agroflorestais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1.

Substratos	Substância extratora/Proteases/ <i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535											
	Água						NaCl					
	25 °C			36 °C			25 °C			36 °C		
Temperatura de extração	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g
CC+FA (1:1)	1,3	7,0	12,0	1,0	7,0	12,0	2,0	8,0	14,0	1,3	8,0	12,0
CC+FA (2:1)	4,0	9,0	22,0	0,3	5,0	13,0	3,0	8,3	18,0	2,0	7,0	16,0
CC+CA (1:1)	0,2	5,0	13,0	0,3	6,0	10,3	1,0	7,0	12,0	0,07	5,3	10,0
CC+CA (2:1)	0,5	11,2	11,2	1,0	7,0	12,0	1,0	12,0	12,0	1,0	7,0	12,0

Os resultados da atividade proteolítica citado na tabela 4 mostra que essas enzimas não foram determinadas a 36 °C/CC+FA e CC+CA (1:1), nas condições de análises. Nos demais substratos [CC+FA (2:1)], [CC+CA (1:1)] e [CC+CA (2:1)], os máximos valores proteolíticos foram determinados a 36 °C (13,0 U/g); 25 °C (11,4 U/g) e a 36 °C (12,0 U/g) (Tabela 4).

Tabela 4. Média da atividade e efeito das condições de extração de enzimas proteolíticas de *Neolentinus lepideus* DPUA 1536 determinada no extrato bruto obtido por fermentação sólida em diferentes resíduos agroflorestais da Amazônia, CC+FA (Casca de Cupuaçu + Farelo de Arroz); CC+CA (Casca de Cupuaçu + Casca de Arroz) na razão 1:1 e 2:1.

Substratos	Substância extratora/Proteases/ <i>Neolentinus lepideus</i> DPUA 1536											
	Água						NaCl					
	25 °C			36 °C			25 °C			36 °C		
Temperatura de extração	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g	U/mL	U/gss	U/g
CC+FA (1:1)	0,03	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,03	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CC+FA (2:1)	0,4	5,0	12,0	1,3	13,0	13,0	0,3	5,0	11,0	1,0	6,0	13,0
CC+CA (1:1)	0,01	5,0	11,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CC+CA (2:1)	0,2	11,0	11	0,03	4,0	12,0	0,1	5,4	10,0	0,03	5,2	10,0

No substrato fermentado, as produtividade máxima das proteases nos cultivos obtidos por fermentação no estado sólido foram determinadas em CC+FA (2:1) 5,0 U/mL, 1,0 U/mL, 4,0 U/mL, 1,3 U/mL, com produtividade de 0,33 U/mL; 0,06 U/mL; 0,26 U/mL e 0,08 U/mL, respectivamente para *P. ostreatus* DPUA 1533, *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534, *L. citrinus* DPUA 1535 e *N. lepideus* DPUA 1536.

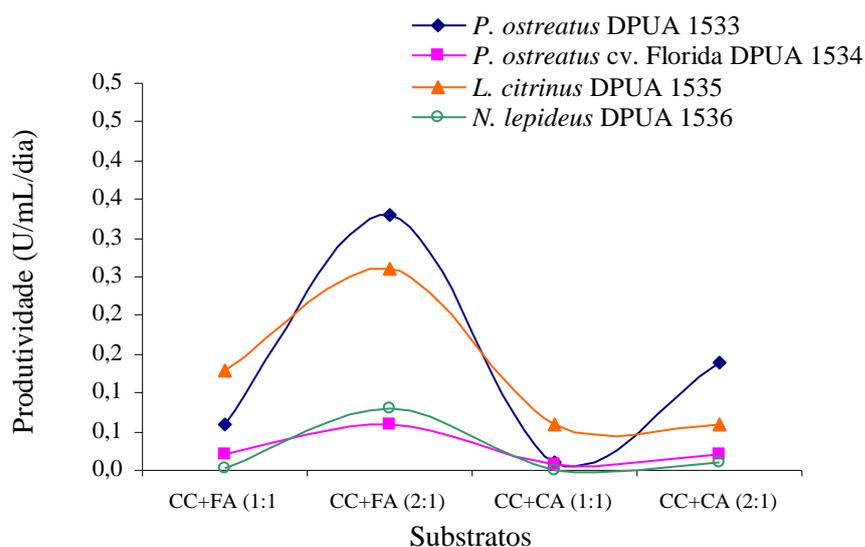


Figura 2. Produtividade máxima das proteases de *P. ostreatus* DPUA 1533, *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534, *L. citrinus* DPUA 1535 e *N. lepideus* DPUA 1536 obtidos por fermentação no estado sólido.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa conclui-se que a mistura de casca de cupuaçu com casca de arroz numa concentração de 1:1 estimulou a velocidade de crescimento vertical nos cultivos de *L. citrinus* DPUA 1535, *P. ostreatus* DPUA 1533 e *N. lepideus* DPUA 1536, obtendo valores máximos de 13 cm; 12,6 cm e 12,3 cm respectivamente;

A atividade proteolítica de *P. ostreatus* DPUA 1533, *P. ostreatus* cv. Florida DPUA 1534, *L. citrinus* DPUA 1535 e *N. lepideus* DPUA 1536 foi influenciada pelas condições de extração de proteases e pela composição das misturas dos substratos em diferentes concentrações, em tais substratos, *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 e *Lentinus citrinus* DPUA 1535 expressaram os melhores valores de produtividade nos substratos CC+FA (2:1).

Referências

- Campos C et al (2010) Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama 13: 19-24.
- Damasceno AA (2016) Purificação e caracterização da Lacase do fungo *Trametes cubensis* (Mont.) Sacc. 1891. Tese, Universidade Federal do Amazonas.
- Elisashvili V (2012) Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). Int J Med Mush 14: 211-239.
- Fonseca TRB (2013) *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: avaliação do crescimento, produção de basidioma e determinação da atividade proteolítica em resíduos agroindustriais. Dissertação, Universidade Federal do Amazonas.
- Graminha EBN et al (2008) Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Animal Feed Science and Technology 144: 1-22.
- Hu Y et al (2017) Isolation of a protease-resistant and pH-stable α -galactosidase displaying hydrolytic efficacy toward raffinose family oligosaccharides from the button mushroom *Agaricus bisporus*. International Journal of Biological Macromolecules 104: 576–583

Inforsato FJ, Porto ALM (2016) Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. *Revista Brasileira de Energias Renováveis* 5: 444-465.

Machado ARG et al (2016) Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 621–627

Maki CS, Paccola-Meirelles LD (2002) Caracterização e cultivo de uma espécie de cogumelo silvestre isolado no Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 23: 77-82.

Marino RH, Abreu LD (2009) Cultivo de cogumelo shiitake em resíduo de coco suplementado com farelo de trigo e/ou arroz. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár* 4: 11-16.

Moreira, KA et al (2005) Partition behavior and partial purification of alkaline protease from *Nocardopsis* sp. in poly (ethylene glycol)/ phosphate aqueous two-phase systems. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 1: 22-32.

Neves KCS (2014) Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. Tese, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Palmieri G et al (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2754-2759.

Pandey A et al (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 34: 1-20.

Ravikumar G et al (2012) A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S411-S417.

Rossi H et al (2001) Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 887-891.

Sabotič J et al (2007) Basidiomycetes harbor a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology* 128: 297-307.

Santos AG et al (2016) Produção de enzimas por fermentação semissólida a partir de fungos isolados de resíduos da agroindústria. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química 1-8.

Silva LSC (2015) Produção de proteases neutras de cogumelos para aplicação na indústria de detergente. Dissertação, Universidade Federal do Amazonas.

Tonini RC (2004) Utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart.-Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. Dissertação, Universidade Regional de Blumenau.

7. Artigo

Production of *Lentinus citrinus* DPUA 1535 in Agroforestry Substrates as a Sustainability Alternative in the Amazon

Artigo submetido a: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Production of *Lentinus citrinus* DPUA 1535 in Agroforestry Substrates as a
Sustainability Alternative in the Amazon

Produção de *Lentinus citrinus* URM 2672 em Substratos Agroflorestais como
Alternativa de Sustentabilidade na Amazônia

Teresa Alarcón Castillo⁽¹⁾, Elton Nunes Britto⁽²⁾, José Maria Arcanjo Alves⁽³⁾ and
Maria Francisca Simas Teixeira⁽⁴⁾

⁽¹⁾Institute Leônidas and Maria Deane. Laboratory of Microbial Biodiversity of Amazonia of Importance for Health LDMAIS, Teresina Street, 476, Adrianópolis, Oswaldo Cruz Foundation, ZIP CODE: 69.057-070 - Manaus, AM– Brazil. E-mail: teresa.ferreira@fiocruz.br ⁽²⁾Federal Institute of Pará, Marechal Castelo Branco Avenue, 621, Campus of Santarém, Interventória, ZIP CODE: 68.020-000 - Santarém, PA – Brazil. E-mail: eltonbritto@yahoo.com ⁽³⁾Department of Plant Science, Course of Agronomy, Federal University of Roraima, Boa Vista, Brazil. Center for Agrarian Sciences – Campus of Cauamé – Monte Cristo, BR 174, ZIP CODE: 69.301-970 - Boa Vista, RR – Brazil. E-mail: jmaalves@gmail.com ⁽⁴⁾Institute of Biological Sciences, Department of Parasitology, Mycology Laboratory, Federal University of Amazonas, General Rodrigo Otávio Avenue, 6200, Coroado, University Campus south sector, ZIP CODE: 69067- 005 - Manaus, AM – Brazil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Abstract - The objective of this research was to select low cost natural substrate from the Amazon for the production of biomass of *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 by semi-solid fermentation. In the methodology were prepared 5 kg plastic bags containing different combinations and proportions of cupuaçu shell, rice husk and rice bran. Substrate preparation for the production of *L. citrinus*, parameters for induction of fruiting and collection of basidiomas were developed. Both the substrates and the basidiomas were submitted to analyzes of centesimal composition in triplicate. In the biomass production, the best averages of biological efficiency (61.0%), productivity (0.86%), production rate (32.0%) and protein (13.44%) were observed in the formulations different agroforestry substrates that depending on the concentration have demonstrated the viability of the process for the growth and production of *L. citrinus* DPUA 1535.

Index terms: *Lentinus citrinus*, semi-solid fermentation, agroforestry residues, biological efficiency, productivity, production rate.

Produção de basidiomas em substratos agroflorestais como alternativa de sustentabilidade na Amazônia

Resumo - O objetivo desta pesquisa foi selecionar substrato natural de baixo custo da região Amazônica brasileira para a produção de biomassa de *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo DPUA 1535 por fermentação semi-sólida. Na metodologia foram preparados sacos plásticos de 5 kg contendo diferentes combinações e proporções de casca de cupuaçu, casca de arroz e farelo de arroz. Desenvolveram-se processos para produção do inóculo (*spawn*), preparação de substrato para a produção de *L. citrinus*, parâmetros para indução da frutificação e colheita de basidiomas. Tanto os substratos

como os basidiomas se submeteram às análises de composição centesimal em triplicata. Na produção de biomassa, as melhores médias de eficiência biológica (61,0 %), produtividade (0,86 %), taxa de produção (32,0 %) e proteína (13,44 %) foram observadas nas formulações realizadas com os diferentes substratos agroflorestais que dependendo da concentração têm demonstrando a viabilidade do processo para o crescimento e produção de *L. citrinus* DPUA 1535.

Termos de indexação: *Lentinus citrinus*, fermentação semi-sólida, resíduos agroflorestais, eficiência biológica, produtividade, taxa de produção.

Introdução

Estimativas mostram que 70 % da produção agrícola e florestal não têm aproveitamento, contudo, 1,25 % dessa biomassa vêm sendo usada para a alimentação humana, com exceção das perdas (aproximadamente 9 %), na colheita, pós-colheita e no beneficiamento (Bonati et al., 2003; Furlan et al., 2000; Tonini 2004; Ferreira, 2014; Silva, 2016).

Somado a esses, os resíduos originários da indústria e comércio de alimentos também envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros (Senhoras 2009; Carvalho, 2014; Assis, 2015; Inforsato e Porto, 2016).

Na Amazônia, a atividade agrícola e agroindustrial proporcionam a geração de resíduos que incluem, casca, farelos e caroços, os quais comumente não são reaproveitados. Entre outros resíduos, o farelo de arroz, no Estado de Roraima vem sendo usado como suplemento alimentar para aves e suínos.

Outro resíduo, contudo, nativo da Amazônia e resultante da fruticultura regional, também disponível em volume considerável, é a casca do fruto do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex. Spreng. Schum) quando descartada no ambiente se torna um substrato para microrganismos oportunistas, além de proporcionar o crescimento de fitopatógenos, entre outros. Nos últimos anos, o aproveitamento desse substrato está sendo na forma de adubo ou como fonte de biomassa para produzir energia no Estado do Amazonas, uma pesquisa em desenvolvimento (Embrapa 2005, Santos 2009).

Dentre as várias utilizações de resíduos agrícolas ou agroindustriais tem destaque a fermentação no estado sólida que visa a geração de sustentabilidade, inclusive, por esse processo diversas atividades científicas estão demonstrando o potencial da produção de biocompostos de importância nutricional e farmacêutica (Chen et al., 2003; Teixeira, 2007; Graminha et al., 2008; Ravikumar et al., 2012; Fonseca, 2013; Damasceno, 2016; Santos et al., 2016).

Assim, pelo processo de fermentação semi-sólida, a viabilidade da produção de cogumelos comestíveis pode ser uma alternativa econômica para produção de alimento humano ou ração animal, considerando-se a eficiência desses macrofungos na bioconversão de substratos lignocelulósicos. A facilidade de acesso aos resíduos vegetais está associada ao estilo de crescimento dos fungos, cuja hifa tem crescimento apical proporcionando a completa colonização do substrato que pode ser utilizado como fonte de carbono e de outros nutrientes (Deacon, 1994; Bonfá et al., 2003; Graminha et al., 2008; Fonseca, 2013; Neves, 2014; Machado et al., 2016; Hu et al., 2017).

Os cogumelos são excelentes alimentos de baixo valor calórico (30 cal/100 g de matéria seca), têm conteúdo protéico entre 19 a 35 %, fibra (4 a 20 %), carboidratos (51 a 88 %), aminoácidos essenciais como lisina e arginina, polissacarídeos, minerais e vitaminas (B₁, B₂, B₃ e D) (Kwon & Hobbs 2005, Furlani & Godoy 2008).

Além dos valores nutricionais, os cogumelos se sobressaem pelas propriedades medicinais, como fontes de compostos com atividade antitumoral, imunomodulatória, antimicrobianos, antifúngicos, antivirais até a produção de enzimas, reguladores de crescimento, saborizantes e aromas (Brizuela et al., 1998; Ganeshpurkar et al., 2013; Chien et al., 2015; Heleno et al., 2015; Reis e Rocha, 2015; Kosanic et al., 2016; Taofiq et al., 2016).

Contudo, essas potencialidades vêm contribuindo para o aumento do interesse por esses fungos no Brasil, contudo o consumo como alimento está dependente da maior divulgação das vantagens medicinais (Dias et al., 2003; Elisashivili, 2012; Tavares, 2015; Machado et al., 2016; Soccol et al., 2016).

Considerando os cogumelos como uma alternativa nutricional e medicinal, o objetivo deste trabalho foi selecionar substrato natural de baixo custo disponível na região amazônica brasileira para a produção de *Lentinus citrinus* Walleyn & Rammeloo DPUA 1535.

Materiais e métodos

Cultivo e manutenção de *Lentinus citrinus* DPUA 1535

Lentinus citrinus DPUA 1535 foi cedido pela Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco UFPE, Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil (RENNEBRA). Para obtenção de cultura viável, as espécies preservadas em óleo mineral, foram reativadas em ágar

batata dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v), a 25 °C, sem luz. Após oito dias, esses cultivos foram usados para obtenção de inóculo.

Pedido de Registro de Patente

O presente estudo originou pedido de registro de patente de produto e processo no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o número de registro BR 000037 do 25 de Maio de 2011. Assim uma parte da metodologia que envolve as etapas de produção do inóculo (*spawn*), preparação de substrato para a produção de *L. citrinus*, indução da frutificação e colheita tem se tornado de caráter sigiloso.

Após dessas etapas os basidiomas foram pesados e submetidos a secagem a 40 °C, em estufa com circulação de ar. Finalizada a desidratação, o produto foi triturado em mini processador e embalado em potes de vidro hermeticamente fechado para a determinação da eficiência biológica, produtividade (DIAS et alli, 2003; ZANETTI; RANAL, 1997) e taxa de produção (HERNÁNDEZ, 2000).

Os procedimentos foram realizados em triplicata e submetidos aos cálculos das formulas a seguir:

$$\text{*Eficiência biológica (EB)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base úmida)}}{\text{massa do substrato (base seca)}}$$

$$\text{*Produtividade (P)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base seca)}}{\text{massa do substrato (base seca)}}$$

$$\text{*Taxa de Produção (TP)} = \frac{\text{eficiênciabiológica}}{\text{número total de dias de cultivo}}$$

Os resíduos agroflorestais (em base seca) também foram submetidos ao procedimento similar para caracterização da composição centesimal. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Composição centesimal dos basidiomas de *L. citrinus* e dos substratos agroflorestais

As análises de composição centesimal foram realizadas no Centro de Apoio Multidisciplinar Divisão Central Analítica e no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

As amostras de basidiomicetos e de substrato agroflorestal utilizados nos experimentos foram submetidas às análises de composição centesimal em triplicatas segundo métodos da AOAC (1997) descritas a seguir:

Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 60 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante A.O.A.C. (1997).

Proteína: foi determinada a concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* e aplicando o fator de conversão 6,26 para os substratos e 4,28 para os cogumelos por apresentarem componente nitrogenado não protéico e protéico (Scariot *et al.* 2000, Silva *et al.* 2002, Silva *et al.* 2007).

Cinzas (resíduo mineral fixo): determinado por incineração do material em mufla a 550-660 °C até obtenção de cinzas esbranquiçadas (A.O.A.C., 1997).

Lipídios: obtido com misturas de solventes a frio segundo o método *Bligh and Dyer*.

Carboidratos totais: estimados por diferença (100 – gramas totais de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibra alimentar) (LATINFOODS, 2002; NEPA 2006).

Energia: a energia total metabolizável, expressa em kilocalorias (kcal), foi calculada pelo fator de conversão de Atwater: (4 g proteína) + (4 g carboidratos totais) + (9 g de lipídeos), preconizados pelo LATINFOODS, 2002 e NEPA 2006.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey para as comparações múltiplas com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A composição centesimal de casca de cupuaçu, casca de arroz e farelo de arroz usados como substrato para produção de *L. citrinus* DPUA 1535 está citada na tabela 1. Em casca de arroz foi determinada a maior quantidade de proteína (16,65 %), o dobro do teor da casca de cupuaçu enquanto em farelo de arroz apenas 7,74, porém, nesse substrato, a porcentagem de lipídeos foi superior (15,38%) ao demais (CC e CA). O conteúdo de cinzas predominou em casca de arroz (19,39%) e farelo de Arroz (12,06%); carboidratos em casca de cupuaçu (78,48 %).

Tabela 1. Composição centesimal dos substratos [g por 100 g de substrato (base seca)]

Variáveis (g/100 g ms)	Casca de cupuaçu	Casca de arroz	Farelo de arroz
Umidade (%)	10,02	7,76	14,64
Energia (kcal)	357,17	294,65	370,1
Nitrogênio (%)	1,34	2,70	1,2
Proteína (N x 6,25)	8,36	16,65	7,74
Lipídeos (%)	1,09	0,65	15,38
Cinzas (%)	2,05	19,39	12,06
Carboidratos totais (%)	78,48	55,55	50,18

Os substratos utilizados nesta pesquisa, no processo de fermentação no estado sólido foram escolhidos em função da disponibilidade na natureza e a aquisição economicamente viável na Região Amazônica. Nos substratos avaliados verificou-se que o número de fluxo para obtenção dos basidiomas de *L. citrinus* DPUA 1535 foram realizadas de 2 a 4 colheitas, em cada mistura. Dados semelhantes foram observados por Furlan et al. (2000) nos cultivos de *Pleurotus sajor-caju*, em palha de arroz com farelo de arroz.

Os resultados acerca do ciclo de cultivo de *L. citrinus* DPUA 1535 comprovaram a ocorrência de precocidade de todas as etapas (miceliação, emissão dos primórdios, frutificação e cultivo total) quando a produção desse cogumelo foi realizada em CC+FA [1:1] (Figura 1). Pode-se inferir que a redução do tempo de crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535 pode estar associada à presença e concentração do farelo de arroz usada nesse experimento, visto que, nos demais ocorreu o inverso.

Com relação a essa proposição, Dias et al. (2003) cita que farelos geralmente são fontes de enriquecimento de substrato utilizado para produção de cogumelos e que proporciona a maior velocidade de crescimento desses fungos. No entanto, em todas as misturas de substratos, desde a miceliação até a frutificação, as estruturas que caracterizam cada etapa do ciclo de cultivo foram formadas em períodos diferentes, exceto o tempo de cultivo total (dias) que foi similar nos seguintes substratos: CC+CA [1:1]; CC+CA [2:1] e CC+FA [2:1].

Esses resultados mostraram que as tecnologias utilizadas para o crescimento *in vitro* de *L. citrinus* DPUA 1535 são processos viáveis para produção desse cogumelo.

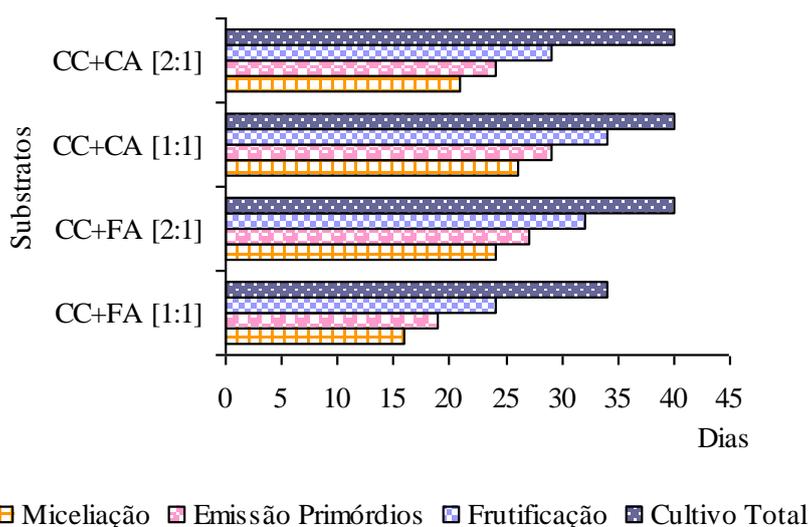


Figura 1. Ciclo de Cultivo: parâmetros comportamentais na produção de *L. citrinus* DPUA 1535 (miceliação, emissão de primórdios, frutificação e cultivo total (dias)).

Na tabela 2 estão apresentados os dados de produtividade, eficiência biológica e taxa de produção de *L. citrinus* DPUA 1535, nos substratos CC+FA e CC+CA, nas proporções 1:1 ou 2:1. Os valores máximos de produtividade 0,86%; 0,85% e 0,73% foram determinadas em CC+CA [1:1; 2:1] e CC+FA [1:1], respectivamente, entretanto, estatisticamente a diferença foi significativa ($p < 0,05$) entre os valores de produtividade obtida nos substratos CC+CA (1:1), CC+CA (2:1), CC+FA (2:1) e CC+FA (1:1).

Enquanto que as maiores porcentagens de eficiência biológica e taxa de produção foi observada em CC+CA [1:1 e 2:1] e em CC+FA [2:1], respectivamente. Tais resultados mostram que o melhor resíduo para produção de *L. citrinus* DPUA 1535 foi a mistura CC+CA porque apresentou a maior eficiência biológica sem adição de outros nutrientes, significando assim redução do custo de produção.

Contudo, vale ressaltar que foi observado variação da eficiência biológica, assim como, do formato, número, essencialmente o tamanho dos basidiomas, características peculiares de cada espécie, visto que não há como controlar as áreas para o surgimento dos primórdios.

Os resultados mostraram também a viabilidade dos diversos substratos para cultivo de cogumelo comestível e que tais substratos podem se tornar o principal produto deste processo pioneiro que pode ser uma alternativa viável de valorização e aproveitamento de casca de cupuaçu e dos rejeitos do processamento de arroz para geração de sustentabilidade.

Tabela 2 Valores médios dos parâmetros de produção no cultivo de *L. citrinus* DPUA 1535^d

Substratos	Concentrações	Produtividade (%)	Eficiência Biológica (%)	Taxa Produção (%)
CC+FA	[1:1]	0,63 ^a	20,0 ^a	11,7 ^a
CC+FA	[2:1]	0,73 ^b	36,3 ^{ab}	12,0 ^a
CC+CA	[1:1]	0,86 ^b	61,0 ^b	21,3 ^{ab}
CC+CA	[2:1]	0,85 ^b	60,0 ^b	32,0 ^b

^d As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

A tabela 3 mostra a qualidade nutricional dos basidiomas de *L. citrinus* DPUA 1535 (g/100 g base seca). Nas condições de produção de *Lentinus citrinus* URM 2672, os valores de energia e lipídeos predominaram nos basidiomas obtidos em CC+CA; CC+FA (2:1); proteína e cinzas em CC+FA; CC+CA (1:1). Tratando-se de carboidratos totais, os maiores valores foram determinados em CC+FA (1:1) e CC+CA (2:1).

De acordo os dados obtidos, quando houve aumento do teor proteínas nos basidiomas foi constada a redução de lipídeos e o aumento das porcentagens de cinzas. Dessa forma, esses resultados estão em conformidade com citações da literatura, a composição química dos cogumelos comestíveis é variável e dependente da espécie, da composição dos substratos nos quais são produzidos e do estágio de desenvolvimento dos basidiomas (Scariot et al., 2000; Silva et al., 2002; Shashirekha et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Silva et al., 2007; Carvalho et al., 2014).

Tabela 3. Composição centesimal dos basidiomas de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (g/100 g de base seca)

Variáveis (g/100 g ms)	CC+FA (1:1)	CC+FA (2:1)	CC+CA (1:1)	CC+CA (2:1)
Umidade (%)	11	15	13	12
Energia (kcal)	347	354	339	370
Proteína (N x 4,28)	13,44	12,88	12,96	11,47
Lipídeos (%)	3	6	3	6
Cinzas (%)	6	4	6	3
Carboidratos totais (%)	57	52	56	59

Conclusão

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a mistura de casca de cupuaçu, casca e farelo de arroz, dependente da concentração são substratos viáveis para o crescimento e produção de *L. citrinus* DPUA 1535. Basidiomas com maiores teores de proteína são obtidos na mistura de casca de cupuaçu com farelo de arroz enquanto que basidiomas com mínimo teor proteico são oriundos de cultivo em casca de cupuaçu com casca de arroz. Os quantitativos de proteínas expressos nos basidiomas são inversamente proporcionais aos teores de nitrogênio das misturas de substrato.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), a Micoteca URM/Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil (RENNEBRA) pelo

suporte financeiro. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

A.O.A.C. 1997. Official methods of analysis of A.O.A.C. International. 16a. ed. 3a. rev. A.O.A.C. International. Gaithersburg: MD. 858 p.

BONATTI, M.; KARNOPP; SOARES, H.M; FURLAN, S.A. 2003. Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. Revista Saúde e Ambiente. v. 4, n. 1, p. 31-35.

BONFÁ, M.R.L.; XAVIER-SANTOS, S.; CARVALHO, C.C.; DA SILVA, R. & GOMES, E. 2003. Produção de Ligninases por Fungos de Degradação Branca em Resíduos Agroindustriais. SINAFERM.

BERMÚDEZ, R. C; MORRIS, H. J; DONOSO, C; MARTÍNEZ, C. E; RAMOS, E. I. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas. La Habana-Cuba. v. 22, n. 4, p.226-231, 2003.

BRIZUELA, M.A; GARCIA, I; PÉREZ, I; MANSUR, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología. La Habana-Cuba 15: 69-74.

CARVALHO, C.S.M. Viabilidade do uso de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. 2014. 74 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

COELHO, M. A. Z; LEITE, S. G. F; ROSA, M. F; FURTADO, A. A. L. 2001. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B. CEPPA. Curitiba 19, n. 1, p. 3342.

CHEN, L.S; HECK, J.X; DE JESUS, K.R; ORTEGA, C.E; RIZZATTO, M.L; SILVA, F; DA SILVA, F. L.H; DEL BIANCHI, V. L. Produção de enzimas proteolíticas neutras por fermentação fúngica em meio semi-sólido. In: XIV SINAFERM. **Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis. Anais do XIV SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

CHIEN, R.C. ET AL. Antiproliferative activities of hot water extracts from culinary-medicinal mushrooms, *Ganoderma tsugae* and *Agrocybe cylindracea* (higher basidiomycetes) on cancer cells. **Int J Med Mushrooms**, v.17, p.453-462, 2015.

DAMASCENO, A.A. Purificação e caracterização da Lacase do fungo *Trametes cubensis* (Mont.) Sacc. 1891. 2016. 68p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

DIAS, E; KOSHIKUMO, E. M; SCHWAN, R; DA SILVA, R. 2003. Cultivo do Cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciências Agrotécnicas. Lavras**. v. 27, n. 6, p. 1363-1369.

ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). **Int J Med Mush**, v.14, p.211-239, 2012.

EMBRAPA. O cupuaçu: usos e potencial para o desenvolvimento rural na Amazônia.

Disponível em: <http://revistacafeicultura.com.br/?mat=4238>. Acesso em 20/10/2017.

FERREIRA, I.I.S. Avaliação do Ciclo de Vida de Cogumelos Nativos: Comparação entre Sistemas de Produção Abertos e Fechados. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Coimbra, Coimbra.

FONSECA, T.R.B. *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: avaliação do crescimento, produção de basidioma e determinação da atividade proteolítica em resíduos agroindustriais. 2013. 78p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

FURLAN, S.A; MENDONÇA, M.M; GERN, R.M.M; SANTOS, V.M.C.S; ARAÚJO, R.P. Influência da suplementação de palha de arroz na produção de *Pleurotus sajor-caju*. **Revista Saúde e Ambiente**, v.1, p.60-63, 2000.

FURLANI, R.P.Z. & GODOY, H.T. Vitamins B₁ and B₂ contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v.106, p.816-819, 2008.

GANESHPURKAR, A.; RAI, G. Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of Oyster mushroom *Pleurotus florida*. **Indian J Pharmacol**, v.45, p.66-70, 2013.

GONZÁLES, A.B. Aprovechamiento del bagazo del maguey verde (*Agave salmiana*) de la agroindustria del mezclal em San Luis Potosí para la producción de Hongo Ostra

(*Pleurotus ostreatus*). 2005. Dissertação (Mestrado) - Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C, San Luis de Potosí, México.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.1-22, 2008.

HELENO, S.A.; FERREIRA, R.C.; ANTONIO, A.L.; QUEIROZ, M.J.R.P.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. **Food Biosci**, v.2, p.48-55, 2015.

HERNÁNDEZ, G.R. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.20-24, 2000.

HUY, H. ET AL. Isolation of a protease-resistant and pH-stable α -galactosidase displaying hydrolytic efficacy toward raffinose family oligosaccharides from the button mushroom *Agaricus bisporus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p.576–583, 2017.

INFORSATO, F.J.; PORTO, A.L.M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.5, p.444-465, 2016.

KOSANIĆ. M.; RANKOVIĆ, B.; RANCIĆ, A.; STANOJKOVIĆ, T. Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. **J Food Drug Anal**, v.24, p.477-484, 2016.

KWON, H.; HOBBS, C. Nutritional and medicinal values of shiitake. In: **Shiitake Cultivation. Mushroom Growers Handbook**, MushWorld, Korea Seoul, 2005. p.1-109.

LATINFOODS. **Tabla de Composición de Alimentos de América Latina**. Latinfoods website. 2002. Disponível em <http://www.fao.org/LAmerica/grupo.htm>. Acessado em: 20 de maio 2006.

LEE, J.S.; BAIK, H.S.; PARK, S.S. Purification and characterization of two novel fibrinolytic protease from mushroom, *Fromitella fraxinea*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p.264-271, 2005.

MACHADO, A.R.G. ET AL. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p.621–627, 2016.

NEVES, K.C.S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. 2014. 99p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação–**Tabela de Composição de Alimentos/ NEPA-UNICAMP**. Campinas: São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, A.M.; DONEGA, M.A.; PERALTA, R.M.; SOUZA, M.C.G. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.84-87, 2007.

RAVIKUMAR, G. ET AL. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.S411-S417, 2012.

ROLLAN, G.M. **Cultivo de Setas y Trufas**. 4ª. Edición. Mundi-Prensa, Madrid, 2003. 239 p.

ROSA, H.; MACHADO, K.M.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. **Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro**, v.98, p.967-974, 2003.

SANTOS, S.E.C.; SOUZA, R.R.C.; SEYE, O.; LAU, J.; FREITAS, T.K. 2004. **Aproveitamento da casca do cupuaçuzeiro para a produção de energia**. Centro de Desenvolvimento Energético Amazônico-CDEAM, UFAM. Disponível em: <http://www.seeds.usp.br/pir/arquivos/congressos/AGRENER202004/Fscommand/PDF/Agrener/Trabalho%2090.pdf>. Acessado em: 12 de janeiro de 2007.

SANTOS, A.G. ET AL. Produção de enzimas por fermentação semissólida a partir de fungos isolados de resíduos da agroindústria. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p.1-8, 2016.

SCARIOT, R.M.; RAK, L.; COSTA, G.S.M.; CLEMENTE, E. Composição química de cogumelos comestíveis cultivados em resíduo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Acta Scientiarum**, v.22, p.317-320, 2000.

SENHORAS, M.E. Oportunidades da cadeia agroindustrial do coco verde. (Do coco verde nada se perde, tudo se desfruta). **Revista Urutágua**, v.5, p.1-8. 2009.

SHASHIREKHA, M.N.; RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chemistry**, v.92, p.255-259, 2005.

SILVA, O.S.; COSTA, G.S.M.; CLEMENTE, E. Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéél., substrates and residue after cultivation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, p.531-535. 2002.

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

STAMETS, P. Novel antimicrobials from mushrooms. **Herbal Gram**, v.54, p.28-33, 2002.

REIS, MF; ROCHA, CLMS. Cogumelos medicinais: uma revisão sobre compostos bioativos e efeitos biológicos. *Sabios Revista de Saúde e Biologia*. p.1-16, 2015.

SILVA, A.S.C. Parâmetros industriais para a produção de *Pleurotus ostreatus*. 2016. 137 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

SOCCOL, C. ET AL. Cogumelos uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de bioprodutos farmacêuticos e Nutracêuticos. In: RESENDE, R.R. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São ç

TAOFIQ, O.; GONZÁLEZ-PARAMÁSA, A.M.; MARTINS, A.; BARREIROC, M.F.; FERREIRA, I.C.F.R. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. **Ind Crops Prod**, v.90, p.38–48, 2016.

TAVARES, A.C.D. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* INPA 1467: produção, composição centesimal e mineral. 2015. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

PATENTE

Processo de produção de cogumelo comestível utilizando resíduos vegetais de cupuaçu, cogumelo comestível obtido e uso de resíduos vegetais de cupuaçu como substrato para crescimento de cogumelos

Alarcón Castillo, T.^a ; Machado, A.R.G.^b ; Simas, L.^c ; Teixeira, M.F.S.^d

^{a,b,c,d} Coleção de Cultura DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

Depósito de Patente Instituto Nacional de Propriedade Industrial INPI, sob protocolo geral: 25 de Maio de 2011 00037

